

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DICER E ARGONAUTA EM  
*Aedes aegypti*

**LÍVIA FERREIRA DA SILVA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ  
OUTUBRO/2014

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DICER E ARGONAUTA EM  
*Aedes aegypti*

**LÍVIA FERREIRA DA SILVA**

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.”

**ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> MARÍLVIA DANSA DE ALENCAR**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ  
OUTUBRO/2014**

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DICER E ARGONAUTA  
EM *Aedes aegypti*

LÍVIA FERREIRA DA SILVA

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.”

Aprovada em 02 de outubro de 2014.

COMISSÃO EXAMINADORA:



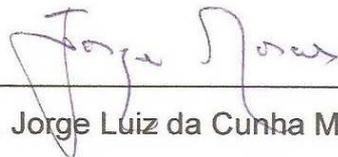
---

Prof. Dr. Francisco José Lemos – LBT/CBB/UENF



---

Profª Drª. Andrea Cristina Veto Arnholdt – LBR/CBB/UENF



---

Prof. Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes – LIBHM/NUPEM/UFRJ



---

Profª. Drª. Marília Dansa de Alencar – LQFPP/CBB/UENF

(Orientadora)

Dedico este trabalho:

“Aos meus pais, meus irmãos e meu namorado.”

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

Friedrich Nietzsche

## AGRADECIMENTOS

Como não agradecer a Deus o que faz por mim? Seria como correr atrás do vento; poderia tentar, mas nunca conseguiria chegar perto. Contudo é principalmente a Ele que agradeço por cada letra aqui escrita.

Aos meus pais Alcina e Achillis, que me educaram e me ensinaram como caminhar e alcançar meus objetivos com determinação. Obrigada por não desistirem de cumprir essa difícil tarefa. O caminho ainda é longo.

À minha avó Cecília (*in memoriam*) que com muito carinho ensinou-me tanto; sobretudo a amar. Seus ensinamentos me impulsionaram.

Aos meus queridos irmãos Leonardo e Daniel, pela amizade e companheirismo. Muitas vezes sem que soubessem, me inspiraram. Obrigada pelo incentivo.

A todos da minha família, aos de perto e aos de longe, que com carinho me incentivaram.

Ao meu namorado Lucas, pela força, companheirismo e muito mais pela paciência. Por acreditar em mim nos momentos em que eu me esquecia do real sentido do verbo “acreditar”.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Marilvia Dansa de Alencar, pela confiança em me receber no laboratório, pelos ensinamentos e amizade neste tempo. Com certeza me proporcionou crescimento em várias áreas.

À Flávia Borges, que não hesitou em ajudar nos momentos de desespero e dúvidas. Obrigada por ser tão atenciosa e companheira.

Aos amigos do laboratório (SEBIN): Lígia, Magda, Rosana, Diana, Gabi, Gustavo, Breno, Raynan. Lígia e Magda, vocês foram importantíssimas nesse processo.

Aos amigos do LQFPP, que estavam presentes no dia-a-dia do trabalho, nas dúvidas, ajudas, risadas e conversas: Nádia, Lucilene, Gustavo, Leonardo, Eduardo, Ariane, Helena e Janaina.

A todos os meus colegas e amigos, em especial aqueles que estiveram mais perto durante esse período: Lidiane, Rose, Adriana e Luana. A amizade de todos foi essencial para mim.

Ao professor Francisco José Lemos (Franzé), pela colaboração com o trabalho, diante dos problemas na manutenção da colônia de *A. aegypti*. Suas sugestões e interesse pelo trabalho me ajudaram muito.

Às alunas do professor Franzé: Sâmella, Juliani e Josiane e à técnica Rivea, que estiveram dispostas a ajudar quando precisei.

Aos professores do LQFPP, Dr<sup>a</sup> Kátia Valevski, Dr<sup>a</sup> Elenir Amâncio e Dr. Gustavo Rezende, por autorizarem a utilização dos equipamentos em seus respectivos laboratórios.

Ao professor Dr. Carlos Logullo (Unidade de Experimentação Animal), por autorizar o uso do termociclador para os experimentos de qPCR. E aos alunos da UEA pela disponibilidade em ajudar quando precisei.

À professora Dr<sup>a</sup> Kátia Valevski pela revisão desta dissertação.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Campos dos Goytacazes, especialmente ao biólogo Eufrásio, que sempre me atendeu com educação e disposição em ajudar.

À Superintendência de Saúde Coletiva - Secretaria de Saúde de Campos dos Goytacazes.

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense e ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia.

Obrigada a todos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIACÕES .....	xii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. A dengue como problema de saúde pública .....	1
1.2. Histórico da dengue .....	3
1.2.1. Incidência no mundo .....	3
1.2.2. Incidência no Brasil .....	4
1.3. O vetor – <i>Aedes aegypti</i> .....	5
1.4. O vírus Dengue .....	7
1.5. Ciclo de transmissão .....	9
1.6. Competência vetorial .....	11
1.7. Sistema imune em insetos .....	13
1.8. RNA de interferência .....	16
1.8.1. Principais proteínas envolvidas no mecanismo de RNAi .....	20
1.8.1.1. Dicer .....	21
1.8.1.2. Argonata .....	22
2. JUSTIFICATIVA .....	24
3. OBJETIVOS .....	26
3.1. Objetivo geral .....	26
3.2. Objetivos específicos .....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Manutenção da colônia de <i>Aedes aegypti</i> .....	27
4.2. Coleta de larva, pupa e mosquito adulto .....	27
4.3. Alimentação dos mosquitos adultos .....	28
4.3.1. Mosquitos alimentados com sangue, plasma e sacarose, dissecados em diferentes tempos após a alimentação .....	28
4.3.2. Mosquitos alimentados com sangue, plasma e sacarose, dissecados logo após a alimentação .....	29

4.4. Extração de RNA .....	29
4.5. Remoção da contaminação por DNA genômico e síntese de cDNA .....	29
4.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	30
4.7. Expressão relativa dos genes – PCR em tempo real .....	31
5. RESULTADOS .....	32
5.1. Expressão do gene endógeno S7RP de <i>Aedes aegypti</i> .....	32
5.2. Expressão relativa dos genes Dicer e Argonauta nos estágios de vida de <i>Aedes aegypti</i> .....	32
5.3. Expressão de Dicer e Argonauta em diferentes tecidos de <i>Aedes aegypti</i> , em resposta à alimentação sanguínea .....	34
5.4. Expressão de Dicer e Argonauta em diferentes tecidos de <i>Aedes aegypti</i> , em resposta à alimentação com plasma .....	37
5.5. Expressão de Dicer e Argonauta em diferentes tecidos de <i>Aedes aegypti</i> , em resposta à alimentação com sacarose .....	40
5.6. Expressão de Dicer e Argonauta em diferentes tecidos de <i>Aedes aegypti</i> , dissecados logo após diferentes alimentações .....	43
6. DISCUSSÃO .....	46
7. CONCLUSÕES .....	54
8. REFERÊNCIAS .....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Risco global para transmissão da dengue .....	1
Figura 2: Número de casos de dengue, notificados à OMS, por década, e incidência nos últimos anos, de 2008 à 2010 .....	2
Figura 3: Ciclo de desenvolvimento do <i>Aedes aegypti</i> .....	6
Figura 4: Modelo do vírus da dengue .....	9
Figura 5: Barreiras que o arbovírus enfrenta para infectar artrópodes .....	12
Figura 6: Via do RNAi .....	19
Figura 7: Domínios de Dicer .....	21
Figura 8: Domínios de Argonata .....	22
Figura 9: Expressão relativa de <i>dcr</i> em diferentes fases do ciclo de vida de <i>A. aegypti</i> – L1, L2, L3, L4, pupa e adulto .....	33
Figura 10: Expressão relativa de <i>ago</i> em diferentes fases do ciclo de vida de <i>A. aegypti</i> – L1, L2, L3, L4, pupa e adulto .....	33
Figura 11: Expressão relativa de <i>dcr</i> em cabeça, intestino e carcaça de <i>A. aegypti</i> , em resposta à alimentação com sangue .....	35
Figura 12: Expressão relativa de <i>ago</i> em cabeça, intestino e carcaça de <i>A. aegypti</i> , em resposta à alimentação com sangue .....	36
Figura 13: Expressão relativa de <i>dcr</i> em cabeça, intestino e carcaça de <i>A. aegypti</i> , em resposta à alimentação com plasma .....	38
Figura 14: Expressão relativa de <i>ago</i> em cabeça, intestino e carcaça de <i>A. aegypti</i> , em resposta à alimentação com plasma .....	39
Figura 15: Expressão relativa de <i>dcr</i> em cabeça, intestino e carcaça de <i>A. aegypti</i> , em resposta à alimentação com sacarose .....	41
Figura 16: Expressão relativa de <i>ago</i> em cabeça, intestino e carcaça de <i>A. aegypti</i> , em resposta à alimentação com sacarose .....	42
Figura 17: Expressão relativa de <i>dcr</i> em cabeça, intestino e carcaça de <i>A. aegypti</i> , dissecados logo após ingerir diferentes alimentações .....	44
Figura 18: Expressão relativa de <i>ago</i> em cabeça, intestino e carcaça de <i>A. aegypti</i> , dissecados logo após ingerir diferentes alimentações .....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de casos de dengue, de acordo com a região do país, até a semana epidemiológica 14 (2014) .....	5
Tabela 2: Tabela 2: Fatores de ativação das 3 vias de sinalização intracelular – Toll, IMD e Jak-Stat .....	15
Tabela 3: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação por RT-PCR e qPCR .....	31

## LISTA DE ABREVIACOES

Ago: Argonauta

AMP: peptídeo antimicrobiano

ATP: Adenosina Trifosfato

ATPase: família de enzima de catalisa a hidrólise de ATP

cDNA: DNA complementar

CHS: chalcona sintase

Dcr: Dicer

DENV: vírus Dengue

DEPC: dietil pirocarbonato

DNase: desoxirribonuclease

Dpa: dias após alimentação

DRF: diidroflavonol-4-redutase

dsRBD: proteína celular ligadora de dsRNA

dsRNA: dupla-fita de RNA

EDTA: cido etilenodiaminotetracético

kb: quilobase

kDa: Quilodalton

LOQS: Loquacious

MEB: barreira de escape do intestino

MIB: barreira de infecção no intestino

miRNA: micro RNA

mRNA: RNA mensageiro

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPAS: Organização Panamericana de Saúde

ORF: janela aberta de leitura

Pb: pares de base

PFU: unidade formadora de colônia

piRNA: RNA associado à proteína PIWI

PMM: membrana perimicrovilar

pré-miRNA: precursor de miRNA

pri-miRNA: micro RNA primário

prM: proteína precursora de membrana

Proteína C: proteína do capsídeo

Proteína E: proteína do envelope

Proteína M: proteína da membrana

Proteínas NS's: proteínas não-estruturais

PTGS: silenciamento gênico pós transcricional

qPCR: reação em cadeia da Polimerase quantitativa

rasiRNA: pequeno RNA de interferência associado à repetições

RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA

RNA: ácido ribonucléico

RNAi: ácido ribonucleico de interferência

RNAse: ribonuclease

rRNA: RNA ribossomal

RT-PCR: Transcriptase reversa – reação em cadeia da Polimerase

SINV: vírus Sindbis

siRNA: pequeno RNA de interferência

TB: barreira de transmissão

tRNA: RNA transportador

## RESUMO

RNAi é um dos mecanismos moleculares para regulação de expressão gênica, e tem papel central na imunidade antiviral de insetos. As proteínas Dicer e Argonata são componentes essenciais para o bom funcionamento da via de RNAi. Através das técnicas de RT-PCR e qPCR medimos a expressão destes dois genes – *dcr* e *ago* – em *Aedes aegypti*. A expressão dos genes foi medida nos diferentes estádios do ciclo de vida do inseto, em resposta a diferentes dietas e em diferentes tempos. Investigamos também os níveis de transcritos dos genes em três tecidos – cabeça, intestino e carcaça, baseados no princípio de que a dinâmica da infecção é essencial para o sucesso do vírus no vetor. A baixa expressão dos genes nas fases de larva e pupa sugere uma maior permissividade destas fases à infecção viral. Quando os insetos foram submetidos à alimentação sanguínea, foi observado aumento na expressão de *dcr*, na cabeça e carcaça. Na carcaça e intestino houve aumento de expressão de *ago* pela alimentação com sangue. O perfil de expressão de *ago* mostrou poucos períodos em que houve indução do gene a partir da alimentação com plasma. Não houve diferença significativa no número de transcritos de *dcr* frente à mesma condição alimentar. Após a alimentação dos mosquitos com sacarose o perfil transcricional dos dois genes mostrou que na cabeça foi onde houve maior expressão. Quando os insetos foram alimentados com diferentes dietas e dissecados logo após a alimentação, a análise do nível de mRNA de *dcr* mostrou que na carcaça houve aumento da expressão do gene para todas as alimentações oferecidas, enquanto que para *ago* essa modulação só aconteceu quando os mosquitos foram alimentados com sacarose (alimentador). As três dietas oferecidas aos mosquitos modularam diferentemente a expressão dos dois genes, nos três tecidos analisados. A expressão dos genes da via do RNAi pode gerar subsídios para se entender a suscetibilidade do vetor ao vírus.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, Dicer, Argonata, RNAi

## ABSTRACT

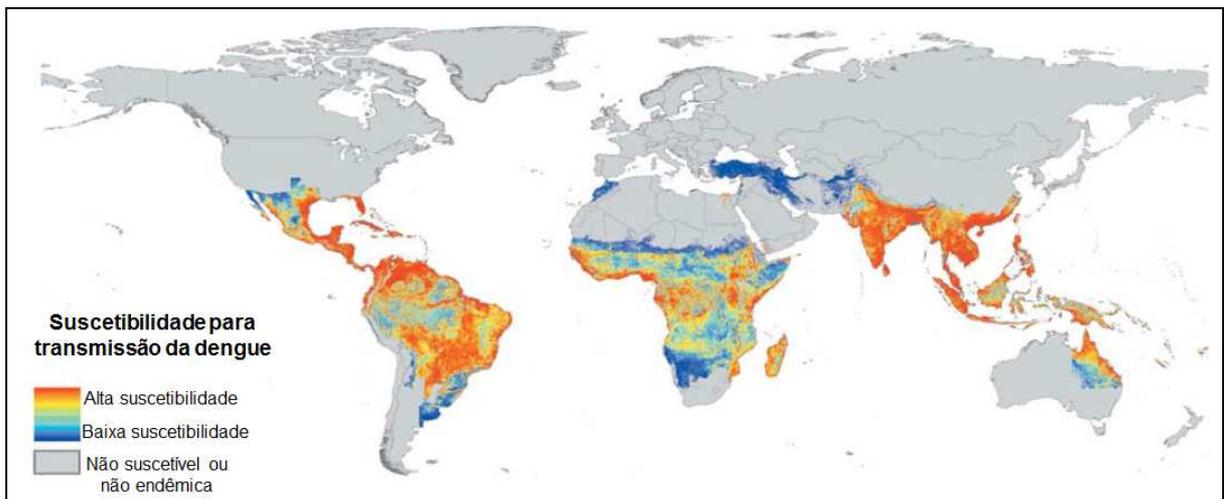
RNAi is one of the molecular mechanisms for regulation of gene expression and plays a central role in antiviral immunity of insects. The Dicer and Argonaute proteins are essential components for the proper functioning of the RNAi pathway. Through the techniques of RT-PCR and qPCR we have measured expression of these two genes – *dcr* and *ago* – in *Aedes aegypti*. The genes expression was measured at different stages of the life cycle of the insect, in response to different diets and at different times. We have also examined the levels of these genes transcripts in three tissues - head, midgut and carcass, based on the principle that the dynamics of the infection is essential for the success of the virus within the vector. The low expression of genes in the larval and pupal stages suggests a greater permissiveness of these phases to viral infection. When the insects were subjected to blood feeding, increased expression of *dcr* in head and carcass was observed. In carcass and midgut there was an increased expression of the *ago* by feeding on blood. The expression profile of the *ago* showed few periods of gene induction when insects fed on plasma. There was no significant difference in the number of transcripts of *dcr* forward to the same feed condition. After feeding mosquitoes with sucrose, the transcriptional profile of the two genes showed that the head was where there was a higher expression. When insects were fed on different diets and dissected immediately after feeding, the analysis of the mRNA level of *dcr* showed that gene expression in carcass there was an increased for all offered diets, while for *ago* this modulation only happened when mosquitoes were fed with sucrose (feeder). The three diets offered to mosquitoes modulate differently the expression of the two genes in the three tissues analyzed. The expression of the genes of the RNAi pathway can generate important information for understanding the susceptibility of the vector to the virus.

Keywords: *Aedes aegypti*, Dicer, Argonaute, RNAi

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A dengue como problema de saúde pública

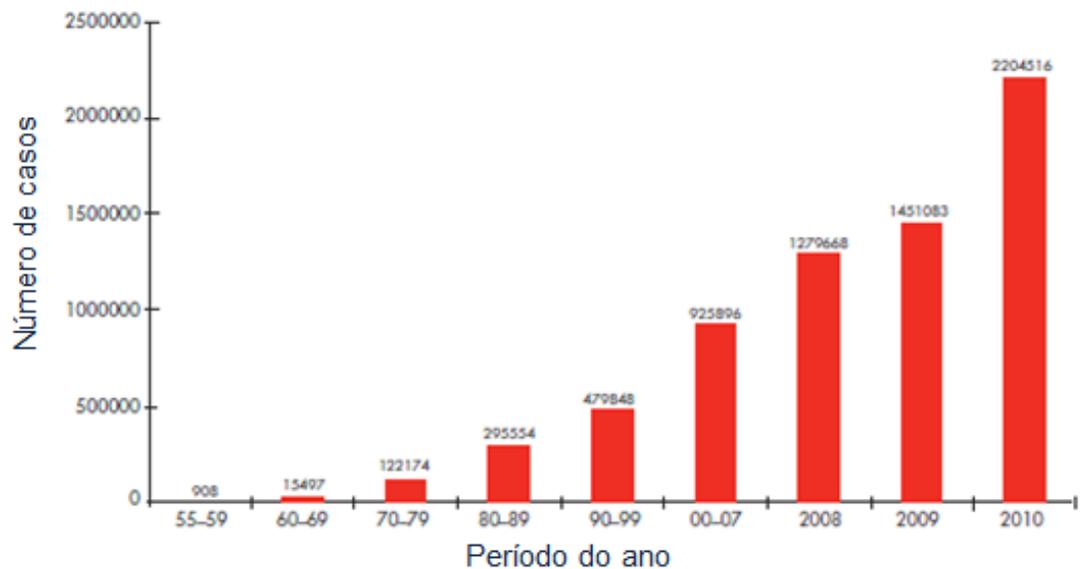
Frequentes epidemias de dengue passaram a configurar-se como sérios problemas de saúde pública, sobretudo nos países tropicais e subtropicais (figura 1), com possibilidades de expansão para outros países, antes isentos da infecção. Desse modo, atualmente a dengue é considerada um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo.



**Figura 1: Risco global para transmissão da dengue.** A exclusão de risco foi baseada no modelo biológico de adequação de temperatura, e áreas com aridez excessiva. Com base em relatórios anteriores, o autor mostra o risco de transmissão da dengue de acordo com as áreas onde o mosquito *Aedes aegypti* encontra melhores condições para proliferação, pelas razões descritas acima (Adaptado de CAMERON *et al*, 2012).

Pode haver, globalmente, de 50 a 100 milhões de infecções por dengue a cada ano. Mais de 40% da população mundial (mais de 2,5 bilhões de pessoas) estão em risco de contaminação pelo vírus. Atualmente a dengue é endêmica em mais de 125 países, sendo que na África, nas Américas, no Mediterrâneo Oriental, no Sudeste da Ásia e nas regiões ocidentais do Pacífico, a doença apresenta maior incidência. Em 2010, somente nas Américas, 1,6 milhões de casos da doença foram notificados, dos quais 49.000 eram casos graves (WHO, 2012).

A figura 2 mostra o crescimento no número de casos de dengue ao longo das décadas – no período de cinco décadas a doença aumentou em 30 vezes (WHO, 2012).



**Figura 2: Número de casos de dengue, notificados à OMS, por década, e incidência nos últimos anos, de 2008 à 2010.** Adaptado de WHO, 2012.

A dengue já havia sido erradicada, porém alguns fatores fizeram com que a doença voltasse a se constituir em um problema de saúde pública. Dentre os fatores responsáveis pela reemergência da dengue, alguns deles estão associados a mudanças demográficas e sociais: o crescimento global da população, associado à urbanização desordenada; as precárias condições de moradia e de abastecimento de água e sistema de esgoto; o aumento do uso de descartáveis e a urbanização não planejada criaram condições ideais para o aumento da ocorrência de doenças transmitidas por mosquitos. Outros fatores associados às epidemias da doença são: falta de efetivo controle dos mosquitos nas áreas endêmicas (o uso de inseticida em larga escala gerou um “falso controle” do *Aedes aegypti*); densidade populacional e distribuição geográfica do vetor, sobretudo em áreas urbanas de países tropicais; aumento do tráfego aéreo; decadência da infraestrutura do sistema público de saúde em muitos países. As viagens aéreas internacionais facilitam a dispersão do vírus, aumentando assim o risco de epidemias, inclusive de dengue hemorrágica, através da introdução de novos sorotipos e novas cepas, em populações suscetíveis (GUBLER, 1998; KOH *et al.*, 2008; WHO, 2006).

## 1.2. Histórico da dengue

### 1.2.1. Incidência no mundo

A dengue distribuiu-se pelo mundo a partir dos séculos XVIII e XIX. Tanto o mosquito vetor quanto o vírus Dengue foram espalhados através de navios, porque os mosquitos utilizavam a água armazenada em recipientes dos navios, como local de reprodução, mantendo o ciclo, mesmo por longos períodos. Como esses meios de transporte eram lentos, as epidemias aconteciam em longos intervalos de tempo – de 10 a 40 anos. Quando os navios aportavam, a doença se espalhava nas cidades onde havia infestação de *A. aegypti* (GUBLER, 2002). A partir daí o vírus e o mosquito foram transportados para cidades do interior e pelas cidades portuárias, por todo o mundo (GUBLER, 2004). O primeiro relato de epidemias de dengue ocorreu em 1779-1780 na Ásia, África e América do Norte (MAHMOOD, 2006).

A Segunda Guerra Mundial fez com que houvesse alterações na transmissão do vírus – houve maior difusão do mosquito nos centros populacionais, causando epidemias e ocorrência da febre hemorrágica. O crescimento da economia e aumento da urbanização após a Segunda Guerra fizeram com que epidemias de dengue se espalhassem para outras partes do mundo a partir do Sudeste Asiático (WEAVER e VASILAKIS, 2009).

Em vários países das Américas (durante a década de 60 e início da década de 70) foram realizadas sérias campanhas para erradicação do *A. aegypti*, o que fez com que diminuíssem os casos da doença. No entanto as medidas de vigilância e controle do vetor não foram sustentadas, havendo reinfestações subsequentes do mosquito (WHO, 2009). A reinfestação ocorreu de forma gradual, ampliando a distribuição geográfica do mosquito, e subsequentes surtos causados por vários sorotipos, em diversos países (DICK *et al.*, 2012).

A dengue tem se disseminado com surtos cíclicos que ocorrem a cada 3-5 anos. O maior surto aconteceu em 2002, com mais de 1 milhão de casos relatados. (WHO, 2009). Em 2012 a distribuição geográfica da dengue incluiu mais de 125 países (WHO, 2013).

### 1.2.2. Incidência no Brasil

Durante as três epidemias de dengue ocorridas no Rio de Janeiro entre o fim do século XIX e início do século XX (1846/1847/1848; 1886 e 1923/1924), foram realizadas campanhas para erradicação do *A. aegypti*, sendo dirigidas para o controle da febre amarela. Estas campanhas resultaram também no controle da dengue; assim o estado esteve livre da infecção por algumas décadas. Porém, alguns países não participaram das campanhas, e uma amostra do sorotipo 2, de baixa virulência, continuou circulando, na presença de populações de mosquitos remanescentes. A não participação nos programas de erradicação do vetor por parte de alguns países, a circulação de populações de *A. aegypti* remanescentes, e a desarticulação dos programas de erradicação coordenados pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS), fizeram com que o vetor voltasse a circular na América Central, Caribe e América do Sul, juntamente com as amostras de vírus Dengue que foram surgindo nos países, ao longo do tempo (SCHATZMAYR e CABRAL, 2012).

*A. aegypti* foi introduzido no Brasil no período colonial, possivelmente no tráfico de escravos. A reinfestação do *A. aegypti* no Brasil, ocorreu a partir de Roraima, causando uma epidemia (a primeira com confirmação laboratorial) em 1981/1982, quando foi registrada a circulação dos sorotipos 1 e 4. Esse episódio não foi responsável pela propagação viral no Brasil, porque foi rapidamente controlado, e ainda, porque o mosquito não estava disperso pelo país (CONSOLI E OLIVEIRA, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 1999).

Após a epidemia em Roraima, a entrada do sorotipo 1 se deu em 1986, em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro (SCHATZMAYR *et al.*, 1986) e, a partir daí, alcançou vários estados do Nordeste, todos com infestação elevada do vetor. Quatro anos depois, o sorotipo 2 foi isolado em Niterói/RJ (SCHATZMAYR e CABRAL, 2012). Em 2000 surgiu o sorotipo 3, novamente em Nova Iguaçu (NOGUEIRA *et al.*, 2001).

Em virtude da progressiva hiperendemicidade da dengue e da circulação simultânea de quatro sorotipos no território nacional, observa-se um aumento na gravidade dos casos. Um aspecto epidemiológico importante é a reintrodução do sorotipo 4, e para o qual a população brasileira não possui imunidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Após um período de cerca de 30 anos o sorotipo 4 voltou a ser detectado no Brasil, em julho de 2010, em Roraima. Oito meses após esse episódio, mesmo sendo grande a distância entre os dois estados, DENV-4 (vírus Dengue, sorotipo 4) foi detectado também no Rio de Janeiro, em Niterói, no ano de 2011. O estado do RJ apresenta muitas atividades turísticas estando ligado a um grande e movimentado sistema rodoviário e ferroviário, que o liga às partes mais populosas do país. Além disso, as populações de *A. aegypti* são altamente suscetíveis à DENV e possuem densidade populacional elevada. Desse modo, o Rio de Janeiro é conhecido como o local mais importante de disseminação do vírus dengue no Brasil; por isso há a preocupação de que o sorotipo 4 se espalhe por todo o país (NOGUEIRA e EPPINGHAUS, 2011).

Até o início do mês de abril de 2014 (dia 5) foram registrados 215.169 casos de dengue no Brasil. A partir desse ano o Brasil passou a adotar a nova classificação de casos de dengue da OMS (Organização Mundial da Saúde) – dengue, dengue com sinais de alerta e dengue grave. As regiões com maior número de registros de casos graves e com sinais de alerta são a Sudeste e Centro Oeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A tabela 2 mostra os números de casos em cada região do país.

**Tabela 1: Número de casos de dengue, de acordo com a região do país, até a semana epidemiológica 14 (2014)**

<b>Região</b>	<b>Número de casos/ %</b>
Sudeste	109.843/51,0
Centro-Oeste	50.800/23,6
Nordeste	19.689/9,2
Sul	19.268/9,0
Norte	15.569/7,2

Fonte: Ministério da Saúde, 2014

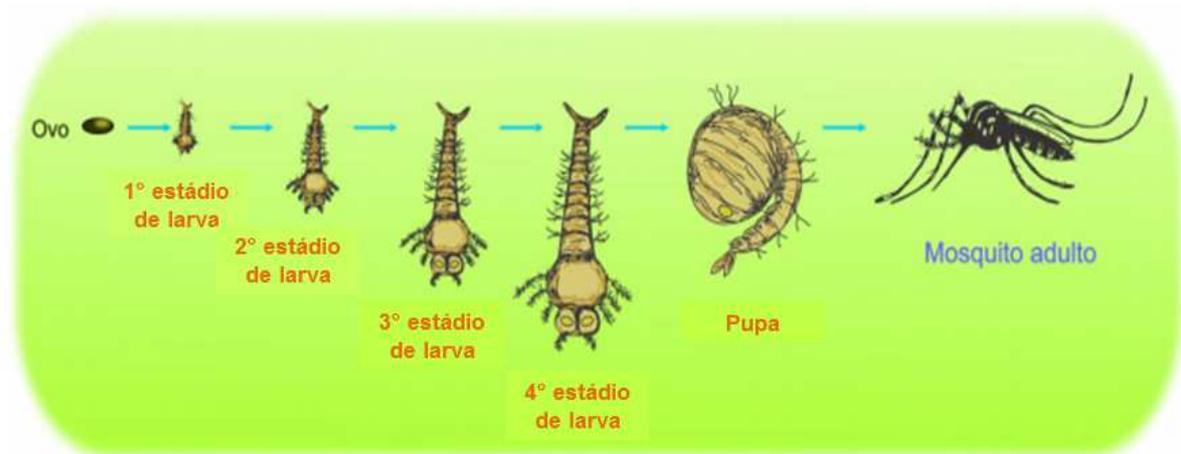
### **1.3. O vetor – *Aedes aegypti***

Comumente os insetos representam ameaça ao ser humano por serem importantes transmissores de diversos patógenos, que causam doenças aos animais e também danos às plantas.

Dentre esses insetos, um dos mais preocupantes vetores de patógenos é o mosquito *A. aegypti*, principal espécie responsável pela transmissão da dengue. *Aedes albopictus* também é suscetível ao vírus dengue, sendo considerado vetor secundário da doença. Devido à importância dessas espécies como transmissoras de arboviroses, é necessário o controle desses mosquitos, para evitar ou diminuir os riscos de epidemia (FERNÁNDEZ *et al.*, 2012; RAHARIMALALA *et al.*, 2012).

O *A. aegypti* é considerado um mosquito cosmopolita, ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais, dentro de zonas isotermais de 20° C. Embora possa ser encontrado longe de aglomerados humanos, está sempre ligado ao peridomicílio e domicílio humano; nas cidades brasileiras o *A. aegypti* é encontrado em locais de maior concentração humana, onde as alterações provocadas pelo homem propiciam sua proliferação (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994; SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2008).

O ciclo de desenvolvimento dos mosquitos do gênero *Aedes* compreende quatro estádios: ovo, larva (L1, L2, L3 e L4), pupa e inseto adulto (Figura 3). O tempo de crescimento e o desenvolvimento das larvas variam com a temperatura da água, disponibilidade de alimento e densidade populacional no criadouro (ELDRIDGE, 2004). O ciclo de desenvolvimento dessa espécie, desde o ovo até a fase adulta leva em média de 7 a 8 dias; a fêmea vive em média de 30 a 35 dias na natureza, porém esse tempo pode variar em condições laboratoriais (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SANTA CATARINA, 2008);



**Figura 3: Ciclo de desenvolvimento do *Aedes aegypti*.** Desde a eclosão do ovo, até que o mosquito chegue à fase adulta, passa por quatro estádios larvais e pela fase de pupa, emergindo o mosquito adulto. Adaptado de AMARAL e DANSA-PETRETSKI, 2012.

Os ovos podem persistir na natureza por grandes períodos de seca, sem sofrer nenhum dano. As larvas vivem na água e vão à superfície para respirar. São compostas de cabeça, tórax e abdome, onde se encontra o sifão respiratório. Após o 4º estágio larval, transformam-se em pupas, fase em que não se alimentam, pois utilizam a energia armazenada na fase anterior. A pupa é dividida em cefalotórax e abdome, tendo o formato de vírgula. Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas; seu corpo é dividido em cabeça, tórax e abdome. Na cabeça encontram-se os principais órgãos dos sentidos, como olhos, antenas e palpos; as pernas e asas localizam-se no tórax; os órgãos do aparelho reprodutor, digestivo e excretor são encontrados no abdome. Possui cor amarronzada, com anéis brancos, e um desenho prateado em forma de lira na parte dorsal do tórax (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SANTA CATARINA, 2008).

A fêmea do *A. aegypti* possui atividade hematofágica diurna, e utiliza depósitos de água parada para colocar seus ovos, que têm alta capacidade de resistir à dessecação, mantendo-se viáveis na ausência de água por até 450 dias (TAUIL, 2002). As fêmeas alimentam-se mais de uma vez entre duas oviposições sucessivas, o que aumenta a possibilidade do mosquito ingerir e transmitir o vírus. Após um ou mais repastos sanguíneos, é realizada a ovogênese; não havendo a digestão completa do sangue, os ovócitos não se desenvolverão (BARATA *et al.*, 2001). Os machos também possuem hábito diurno, e seguem as fêmeas para realizarem a cópula (CONSOLI e OLIVEIRA, 1994), mas não se alimentam de sangue.

#### **1.4. O vírus Dengue**

Arbovírus são vírus que infectam animais, transmitidos a hospedeiros vertebrados por artrópodes hematófagos (KUNO e CHANG, 2005). O vírus Dengue é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, onde se encontram vírus causadores de outras patologias humanas além da dengue – febre amarela, encefalite japonesa e febre do Oeste do Nilo (MERCADO-CURIEL *et al.*, 2008).

*Flavivirus* são partículas envelopadas com uma única fita de RNA (single-stranded, ssRNA), de sentido positivo, de aproximadamente 11 kb, com os

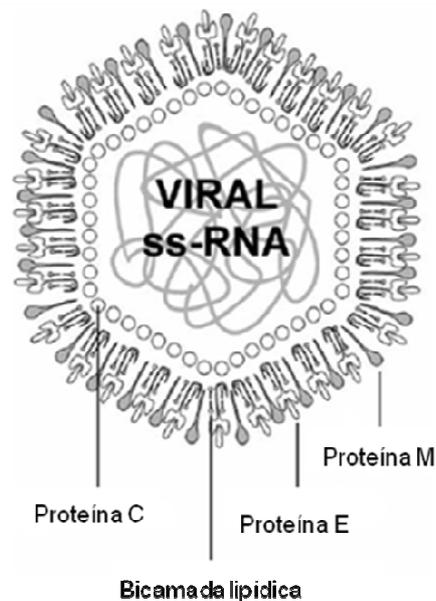
nucleotídeos organizados em única fase de leitura aberta (ORF - Open Reading Frame). Seu genoma codifica uma poliproteína que posteriormente é clivada, gerando 3 proteínas estruturais (C, prM e E) e 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (PI-CHUN *et al.*, 2012). São conhecidos quatro sorotipos geneticamente distintos: DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4. Em 2012, DENV5 foi identificado e sua descoberta discutida em termos de impacto na saúde pública e no desenvolvimento de uma vacina para a dengue (VASILAKIS *et al.*, 2012).

DENV apresenta em sua superfície um ectodomínio icosaédrico, contendo 180 cópias da proteína E, que é a principal proteína glicosilada do envelope proteico e a maior proteína estrutural exposta na superfície do envelope do vírion maduro. Esta glicoproteína, de 53 kDa, é essencial para ligação do vírus ao receptor de membrana da célula hospedeira; é importante para a fixação, entrada e fusão do invólucro viral, que pode ligar-se à receptores celulares e induzir a produção de anticorpos neutralizantes (PIERSON *et al.*, 2008). A proteína do capsídeo (C) interage com o RNA genômico do vírus, para formar o nucleocapsídeo. É essencial na montagem do vírus, para garantir a encapsulação específica do genoma viral. Um importante papel da proteína C está na existência de partículas subvirais, que são liberadas quando as células são infectadas. A glicoproteína prM é clivada em proteína de membrana (M), assumindo sua forma madura e fazendo com que partes da proteína do envelope (E) (que se projetam para o vírus) fiquem em evidência, e o vírus seja liberado (MODIS *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2004).

As proteínas NS's são responsáveis pela replicação do RNA viral, mas podem auxiliar na junção viral e evasão da resposta imune do hospedeiro (PUIGBASAGOITI *et al.*, 2006). NS1 é requerida no processo de replicação do RNA; NS2A e NS2B (polipeptídeos hidrofóbicos) podem ser úteis para ancorar as partes da maquinaria de replicação das membranas internas da célula; NS3 forma um complexo com NS2B e ativa uma serino-protease, que cliva várias ligações da poliproteína; NS4A e NS4B são polipeptídeos hidrofóbicos associados com as membranas, que podem funcionar em conjunto com a replicase viral nas membranas intracelulares; NS5 é uma RNA polimerase, que parece ser uma

proteína citoplasmática que se liga às membranas, através da associação com outros peptídeos virais (STRAUSS e STRAUSS, 2002).

A figura 4 mostra como o RNA viral é rodeado pela proteína C, formando o nucleocapsídeo viral. A bicamada lipídica e as proteínas prM e E, formam o envelope da partícula do vírus. Após a clivagem da proteína precursora (prM) durante a exocitose da partícula viral, a proteína M confere infecciosidade para o vírus (BARTH, 2000).



**Figura 4: Modelo do vírus da dengue.** A partícula viral é envelopada e possui uma fita de RNA. As três proteínas estruturais estão representadas: Proteína C (capsídeo), Proteína E (envelope) e Proteína M (membrana). Adaptado de Barth, 2000.

### 1.5. Ciclo de transmissão

As arboviroses são mantidas em ciclos por artrópodes hematófagos, que transmitem os vírus aos hospedeiros vertebrados (HIGGS e BEATY, 2004). Ciclos de transmissão de arboviroses são dependentes de relações entre o vírus, o vetor e o hospedeiro vertebrado, sendo que cada um deles pode ser influenciado por condições ambientais (HARDY *et al.*, 1983). Vírus podem ser transmitidos aos artrópodes por transmissão horizontal, vertical, transovariana ou venérea (KUNO e CHANG, 2005; HIGGS e BEATY, 2004). A transmissão horizontal (mosquito-homem) é o melhor mecanismo documentado para transmissão de DENV, porém a transmissão vertical, ou transovariana, em que a fêmea passa o vírus para a progênie, também tem sido documentada (GÜNTHER *et al.*, 2007).

Cada um dos quatro sorotipos de DENV pode ser mantido em dois ciclos de transmissão, ecologicamente e evolutivamente distintos: um ciclo silvestre e um ciclo humano. O ciclo silvestre envolve primatas não humanos e no ciclo humano, somente os seres humanos são os hospedeiros do vírus (VASILAKIS *et al.*, 2012).

No ciclo de transmissão humano, depois que uma pessoa é picada por um mosquito infectado, o vírus passa por um período de incubação, em média de 4 a 7 dias, sendo que após esse período os sinais da fase aguda são apresentados. Nessa fase o vírus está circulando no sangue do indivíduo, fazendo com que haja maiores possibilidades de dispersão do vírus, pois se outros mosquitos picarem a pessoa, estes poderão se tornar infectados. O período de incubação extrínseco (PIE) do vírus no corpo do mosquito dura em média de 8 a 12 dias (GUBLER, 1998). Durante o PIE o vírus infecta e se replica nas células do intestino, passando a disseminar a infecção nos outros órgãos. Ao chegar às glândulas salivares, o vírus infecta os ductos salivares, fazendo com que possa ser transmitido a outro hospedeiro em uma próxima picada (HIGGS e BEATY, 2004).

Sabe-se que a infecção viral é modulada diferencialmente em diferentes órgãos, e que vários órgãos e tecidos – intestino médio, glândula salivar, corpo gorduroso, hemócitos, esôfago, tecidos do sistema nervoso, omatídeos, tubos de Malpighi – estão envolvidos diretamente na disseminação do vírus no corpo do mosquito. DENV pode utilizar também o sistema traqueal do mosquito para se disseminar (SALAZAR *et al.*, 2007). A infecção das glândulas salivares é o último processo que ocorre no corpo do *A. aegypti* antes do vírus ser transmitido. A infecção por DENV nas glândulas salivares regula a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na resposta imune inata do vetor (LUPLERTLOP *et al.*, 2011). 2778.4057/ 9997-0021

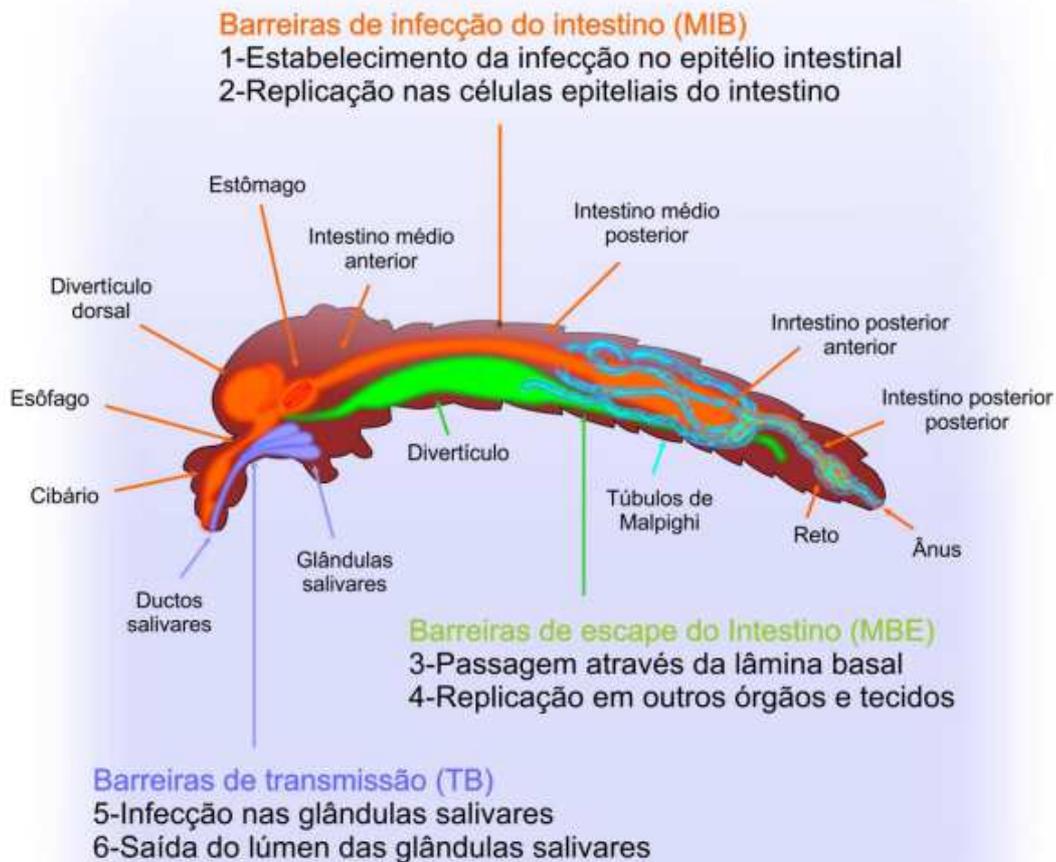
Vazeille e colaboradores (2010) destacaram a capacidade que *Aedes albopictus* possui de ser co-infectado, por dois arbovírus: Dengue e Chikungunya (em humanos esse fenômeno já havia sido relatado). O mosquito é capaz não somente de disseminar os vírus, mas de liberar as partículas virais, fazendo com que os vírus cheguem às glândulas salivares para serem transmitidos.

## 1.6. Competência vetorial

Muitas espécies de artrópodes são competentes em transmitir um determinado patógeno, porém somente aquelas capazes de manter todo o ciclo do agente patogênico em seus tecidos e células são consideradas os vetores biológicos primários (GUEDES *et al.*, 2010).

A competência vetorial, ou seja, a permissividade intrínseca de um vetor à infecção, replicação e transmissão do vírus, é afetada tanto por fatores extrínsecos (como por exemplo, densidade da população do mosquito e do hospedeiro vertebrado; e condições ambientais) como por fatores intrínsecos (como por exemplo, fatores genéticos; e capacidade do mosquito se infectar por um arbovírus após a ingestão de sangue infectado) (COX *et al.*, 2011; HIGGS e BEATY, 2004; HARDY *et al.*, 1983). Fatores como nutrição e competição na fase larval, idade do mosquito adulto e título do vírus no sangue podem afetar significativamente sua capacidade infectiva (BOSIO *et al.*, 1998). Outro conceito importante é o de capacidade vetorial, que depende de parâmetros relativos à competência vetorial. Capacidade vetorial é a capacidade de uma espécie de vetor, em um determinado local e tempo específico, transmitir um patógeno. É uma propriedade dinâmica, que pode ser influenciada pelos seguintes fatores: tipo de alimentação, comportamento alimentar, número de ciclos gonadotróficos e tamanho da população (HIGGS e BEATY, 2004). O conhecimento dos genes que controlam a competência vetorial, associado aos fatores que interferem na capacidade vetorial das populações de insetos, poderá levar ao desenvolvimento de novas tecnologias para o controle das doenças transmitidas por vetores (GUEDES, 2012).

Para que o vírus seja transmitido ao homem, é preciso, primeiramente, haver interação entre o vírus e os tecidos do mosquito, principalmente com o epitélio intestinal e glândula salivar. Porém existem barreiras que o vírus precisa ultrapassar para que ele possa chegar à glândula salivar e ser transmitido ao hospedeiro vertebrado (figura 5). A presença ou ausência dessas barreiras determinam parcialmente (pois outros fatores estão envolvidos) a competência vetorial de um artrópode (HIGGS e BEATY, 2004).



**Figura 5: Barreiras que o arbovírus enfrenta para infectar artrópodes.** MIB – midgut infection barrier; MEB – midgut escape barrier; TB – transmission barrier (AMARAL e DANSA-PETRETSKI, 2012).

Black e colaboradores (2002) descrevem três barreiras que o arbovírus enfrenta: primeiramente o vírus deve estabelecer a infecção nas células epiteliais do intestino médio e se replicar nessas células; qualquer fator que bloqueie esses processos se constitui em uma barreira de infecção no intestino (MIB). Em seguida, o vírus deve ser capaz de atravessar a lâmina basal e se replicar em outros órgãos e tecidos, através da hemocele; se algum fator bloquear esses processos, se constituirá em uma barreira de escape do intestino (MEB) e assim, não haverá a disseminação nos tecidos. Por fim, o vírus precisa atingir e infectar as glândulas salivares e, posteriormente, escapar para o lúmen das glândulas para que seja transmitido na picada seguinte; se algo impedir esses processos, se constituirá em

uma barreira de transmissão (TB) e interromperá a passagem do vírus para um novo hospedeiro. Estas barreiras estão associadas à competência vetorial do mosquito.

Salazar e colaboradores (2007) caracterizaram populações de *A. aegypti*, dentre outros aspectos, quanto à suscetibilidade à DENV-2 e mostraram que tanto mosquitos de uma população natural (recém-colonizada), quanto uma linhagem de laboratório altamente suscetível à DENV-2, apresentaram semelhantes taxas de infecção e disseminação, quando infectados com  $1.7 \pm 0.7 \times 10^7$  PFU/mL. Porém, uma população mantida em laboratório por várias gerações apresentou menores taxas de infecção e disseminação quando comparada com as outras populações citadas anteriormente. O fenótipo suscetível do mosquito é provavelmente condicionado por diferentes mecanismos genéticos, que determinarão as condições enfrentadas pelo vírus no interior do vetor e, conseqüentemente, sua sobrevivência ou não neste ambiente. Dentre os fatores determinantes da sobrevivência se destaca a resposta imune do inseto e a capacidade do vírus de escapar destes mecanismos de defesa.

### **1.7. Sistema imune em insetos**

Os insetos representam a maior classe dentro do reino animal, em número de espécies. Vários eventos evolutivos e várias características anatômicas e fisiológicas importantes contribuem para esta diversidade. Insetos vivem em ambientes com grande exposição a diversos agentes infecciosos, por isso necessitam diminuir o risco de infecção aos diferentes tipos de patógenos. Em invertebrados a imunidade inata é o único sistema de defesa sendo, portanto, de vital importância (CHRISTOPHIDES *et al.*, 2004). Insetos desenvolveram barreiras físicas e um eficiente mecanismo de defesa humoral e celular (ORFANÓ, 2012). As respostas humorais a patógenos envolvem melanização e a produção de moléculas antimicrobianas efectoras (peptídeos antimicrobianos). As reações celulares incluem fagocitose ou encapsulamento, exigindo a ação direta dos hemócitos (ELROD-ERICKSON *et al.*, 2000 e CIRIMOTICH *et al.*, 2010). A resposta imune dos insetos é um dos fatores que pode ditar sua suscetibilidade à infecção por vírus (CARVALHO-LEANDRO *et al.*, 2012).

Os insetos contam com a resposta imune inata para defendê-los contra vários patógenos. Esse mecanismo de defesa evolutivamente antigo confere aos insetos habilidade para resistir à infecção (FRANC e WHITE, 2000). A cutícula provê a primeira linha de defesa física eficaz contra microorganismos. Duas das principais vias de infecção – intestino e traquéia – são revestidas com membranas quitinosas. O baixo pH do intestino, associado à secreção de fatores antimicrobianos, podem fazer com que esse órgão ofereça um ambiente hostil à colonização microbiana. Quando os patógenos conseguem violar as barreiras químicas e físicas, eles ativam uma gama de reações imunológicas. De início a ruptura da cutícula induz uma complexa interação de reações humorais e celulares. É montada uma resposta celular imunitária, que envolve diferentes tipos de hemócitos. Por fim, durante a infecção sistêmica, um grande conjunto de moléculas efetoras, como AMP's (peptídeos antimicrobianos), proteínas de resposta ao estresse e outros fatores necessários para a opsonização e sequestro de ferro, é produzido pelo corpo gorduroso, e secretado na hemolinfa (TZOU *et al.*, 2002; BULET *et al.*, 1999).

Estudos genéticos em *Drosophila* identificaram as três maiores vias de sinalização que regulam a expressão de genes efetores do sistema imune – TOLL, IMD (do inglês, *immune deficiency*) e JAK-STAT (do inglês, *Janus Kinase and Signal Transducer and Activator of Transcription*) (LEMAITRE e HOFFMANN, 2007).

A via Toll é ativada por bactérias Gram-positivas e fungos; também tem sido aplicada na defesa contra vírus em mosquitos. Em *Drosophila* a família de receptores Toll compreende nove membros – Toll e Toll-2 até Toll-9 (TAUSZIG *et al.*, 2000); em *A. aegypti* três genes homólogos aos de *Drosophila* foram identificados – AeToll1A, AeToll1B e AeToll5 (LUNA *et al.*, 2003). A proteína Toll foi originalmente identificada em *Drosophila* como um receptor necessário na formação do eixo dorso-ventral, durante seu desenvolvimento (LEMAITRE *et al.*, 1996). Xi e colaboradores (2008) mostraram que a via Toll desempenha um importante papel na regulação de resistência à DENV em *A. aegypti*, como indicado por uma regulação responsiva da infecção, frente a genes com funções putativas, relacionadas ao sistema imune inato do mosquito. Outros grupos de genes funcionais foram afetados pela infecção pelo vírus, incluindo funções como metabolismo e processos de oxirredução.

A via IMD está envolvida na defesa contra bactérias Gram-negativas, e após a ativação resulta em uma cascata de eventos semelhantes aos da via Toll, envolvendo degradação do regulador negativo Caspar, translocação do fator de transcrição Relish para o núcleo e produção de compostos efetores antimicrobianos (XI *et al.*, 2008). Tem sido mostrado que esta via está envolvida no controle da infecção do vírus Sindbis em *D. melanogaster*, suprimindo a replicação viral pela ativação do fator de transcrição Relish (AVADHANULA *et al.*, 2009). A ativação da via IMD em *A. aegypti* através do silenciamento de Caspar por RNAi, causou a redução dos níveis de infecção por DENV (XI *et al.*, 2008).

A via JAK-STAT foi originalmente identificada como uma via de sinalização de uma citocina em mamíferos, e demonstrou ser uma chave no mecanismo antiviral, incluindo defesas anti-Dengue (SOUZA-NETO *et al.*, 2009). Esta via também tem sido envolvida no controle do vírus C em *Drosophila*; sugerindo uma função conservada da via JAK-STAT em defesas antivirais em humanos e insetos (DOSTERT *et al.*, 2005). Souza-Neto e colaboradores (2009) mostraram que *A. aegypti* utiliza a via JAK-STAT para o controle da infecção por DENV. Em seu trabalho demonstraram que a suscetibilidade do mosquito ao vírus aumenta quando a via JAK-STAT é suprimida através do silenciamento de seus receptores Domeless (Dome) e Janus Kinase (Hop); enquanto os mosquitos tornam-se mais resistentes ao vírus quando o regulador negativo PIAS é silenciado. JAK-STAT contribui para a imunidade através da indução dos fatores tipo complemento (AGAISSE e PERRIMON, 2004).

Outra importante via de sinalização do sistema imune e principal mecanismo antiviral utilizado por mosquitos para modular a infecção viral é o RNA de interferência. RNAi é uma via antiviral acionada por dupla fita de RNA (dsRNA, do inglês *double-stranded RNA*) que, sendo degradada, cria moldes-guia utilizados para a localização e destruição do genoma viral. Mesmo com esse mecanismo, o mosquito *A. aegypti* muitas vezes não é capaz de combater a infecção por vírus antes que este chegue às glândulas salivares e seja transmitido a um novo hospedeiro (CAMPBELL *et al.*, 2008). Entretanto, os mecanismos virais de contra-defesa ainda não são conhecidos.

### 1.8. RNA de interferência

A descoberta de que moléculas de RNA podem regular a expressão gênica tem sido considerada um dos mais importantes avanços da Biologia nas últimas décadas. Durante muitos anos pensava-se que o RNA possuía apenas duas funções nas células – servir como intermediário vital na expressão gênica (mRNA) na via de síntese das proteínas; e participar da estrutura, catálise e decodificação no processo de síntese proteica, via tRNA (RNA transportador) e rRNA (RNA ribossomal) (NOVINA e SHARP, 2004).

Desde as décadas de 1980/1990 vem sendo realizados estudos de regulação gênica por RNA. Biólogos introduziram cópias dos genes chalcona sintase (CHS) e diidroflavonol-4-redutase (DFR) no genoma da planta *Petunia hybrida*, para testar se as enzimas que esses genes codificavam eram limitantes da taxa de biossíntese de antocianina. Observaram que a introdução desses genes bloqueou a expressão de antocianina, ou seja, ocorreu um mecanismo natural de silenciamento gênico (NAPOLI *et al.*, 1990). Sabe-se que em plantas, transgenes podem induzir seu próprio silenciamento e silenciar simultaneamente o gene endógeno, por um processo–que foi chamado inicialmente de silenciamento gênico pós transcricional (PTGS, do inglês *post-transcriptional gene silencing*), ou co-supressão. Na levedura *Neurospora crassa* transgenes também induzem silenciamento gênico, ao nível pós transcricional, processo conhecido como *quelling* (BOSHER e LABOUESSE, 2000). Em 1998, Fire e colaboradores explicaram o fenômeno, chamando-o de RNAi (RNA de interferência) e anunciaram a descoberta do mecanismo capaz de silenciar a expressão gênica por RNA dupla fita no nematóide *Caenorhabditis elegans* (FIRE *et al.*, 1998).

RNA de interferência, interferência mediada por RNA ou RNA interferente é um mecanismo de silenciamento gênico, induzido por uma dupla fita de RNA (dsRNA), que varia em comprimento e origem, e ocorre no citoplasma de células eucarióticas, culminando na degradação de uma sequência específica de RNA. Esse processo ocorre naturalmente em plantas e animais e constitui-se como importante mecanismo de defesa contra ataques de vírus, atuando também na manutenção da estabilidade do material genético, através do controle de elementos de transposição (transposons) (NOVINA e SHARP, 2004; HAASNOOT *et al.*, 2003). RNAi pode

regular alguns processos celulares e desempenhar várias funções em organismos eucariotos: controle do desenvolvimento embrionário animal; formação da heterocromatina em animais; inibição da infecção viral; proteção contra danos causados por transposons, entre outras (AMBROS, 2004; LIPPMAN e MARTIENSSEN, 2004; JONES *et al.*, 2004; BAULCOMBE, 2004).

As diferentes funções do RNAi são mediadas por pequenos RNAs, como miRNAs e siRNAs. A utilização destas pequenas moléculas de RNA é uma importante ferramenta que as células utilizam na regulação de genes e conseqüentemente no controle das suas funções biológicas. Esse processo de silenciamento natural pode ser aproveitado para induzir artificialmente o silenciamento de um gene específico por introdução de uma dupla fita exógena (FARAZI *et al.*, 2008).

O mecanismo de RNA de interferência pode ser dividido em duas fases: uma fase inicial, onde ocorre a geração de moléculas efetoras; e a fase de execução, quando essas moléculas são incorporadas aos complexos de ribonucleoproteínas, havendo promoção do silenciamento gênico (GOLDEN *et al.*, 2008; GELEY e MÜLLER, 2004).

Vários tipos de pequenos RNAs tem sido identificados e relacionados a diversos papéis celulares: miRNAs (micro RNAs), siRNAs (do inglês *short interfering RNAs*), piRNA (associam-se a proteínas PIWI), stRNA (do inglês, *small temporal RNA*), tncRNA (do inglês, *tiny non-coding RNA*) e smRNA (do inglês, *small modular RNA*) (GULERIA *et al.*, 2011).

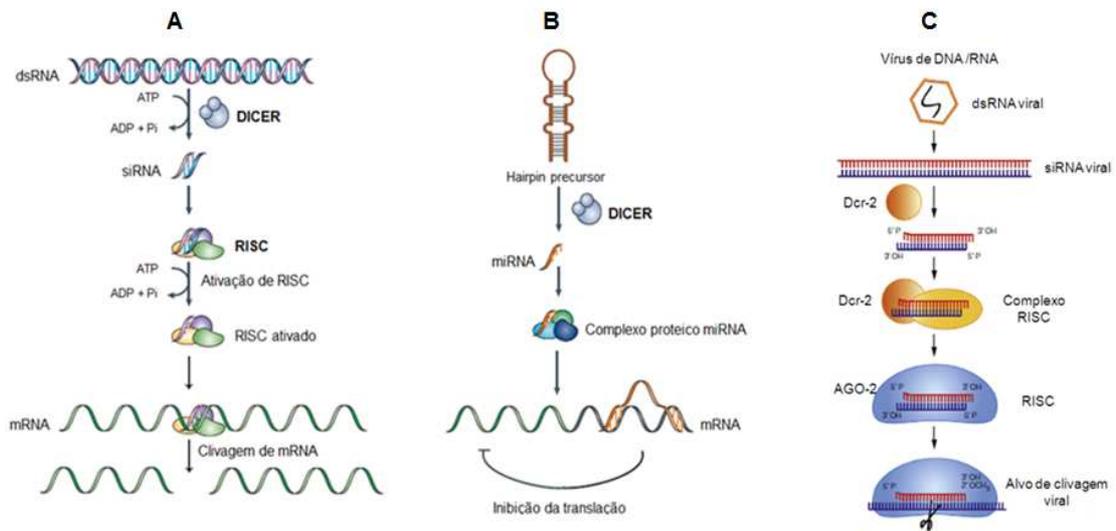
Dessas classes de pequenos RNAs duas categorias se destacam: miRNAs (micro RNAs) e siRNAs (do inglês *short interfering RNAs*). miRNAs são gerados por uma região de precursores de dsRNA em forma de *hairpin*, enquanto siRNAs são derivados de dupla-fitas longas de RNA (KIM, 2006). Com base em sua biogênese e função, alguns tipos de siRNAs tem sido identificados: Ta-siRNA (do inglês, *trans-acting small interfering RNA*), Ra-siRNA (do inglês *repeat associated small interfering RNA*) e Nat-siRNA (do inglês, *natural-antisense transcript-derived siRNA*) (SUNKAR e ZHU, 2007).

Embora compartilhem características comuns, as diferentes classes de pequenos RNAs diferem entre si em alguns aspectos – tamanho (devido a distintos

mecanismos de biogênese), estrutura precursora, cofator requerido, posição da sequência e modo de regulação, sendo que as diferenças podem variar de acordo com a espécie. Outras diferenças significativas entre eles são a presença de uridina na extremidade 5` e a fosforilação na extremidade 5` terminal (GOLDEN *et al.*, 2008; FARAZI, *et al.*, 2008). Essas características determinam o carregamento dos pequenos RNAs nos complexos ribonucleoproteicos. Esses complexos mediam diferentes funções do RNA, a nível transcricional e pós transcricional, como a clivagem do RNA, a repressão translacional e a regulação da estrutura da cromatina (FARAZI *et al.*, 2008).

Dentre os pequenos RNAs derivados de duplas fitas há diferença no mecanismo de ação de acordo com sua formação (figuras 6A e 6B). siRNAs de aproximadamente 21-23 bases, por exemplo, são gerados a partir da clivagem de duplas fitas de RNA (dsRNA), pela enzima Dicer, em um processo dependente de ATP (BERNSTEIN *et al.*, 2001; FRANÇA *et al.*, 2010). Com a separação das dsRNAs, a fita antisense é incorporada ao complexo RISC (do inglês, *RNA Induced Silencing Complex*), que possui atividade helicase e é composto por proteínas da família Argonauta, que guiam o RNA com sequência homóloga à fita complementar (MEISTER e TUSCHI, 2004). A fita antisense (fita guia) do siRNA guia RISC para o RNA alvo complementar e o componente nuclease do complexo cliva e degrada o RNA alvo da sequência específica (HAASNOOT *et al.*, 2003).

miRNAs, por outro lado, formam um grupo de pequenas dsRNAs endógenas com aproximadamente 22 nucleotídeos, que inibem a tradução do mRNA-alvo em proteína. Sua produção ocorre pela transcrição de genes pela RNA polimerase II, gerando o miRNA primário (pri-miRNA), que é clivado por um complexo proteico, do qual fazem parte as proteínas Drosha e Pasha. O pré-microRNA é exportado para o citoplasma pela exportina-5, onde é clivado por Dicer. A fita antisense é incorporada à RISC que, por complementaridade de bases, permite o pareamento entre a fita do miRNA incorporada e a região homóloga do mRNA alvo (FRANÇA *et al.*, 2010).



**Figura 6: Via do RNAi.** **A.** Via do siRNA. As moléculas de dsRNA são reconhecidas pela endonuclease Dicer, no citoplasma. Esta enzima promove a clivagem de dsRNA em pequenos fragmentos com cerca de 20-25 pb, denominados siRNAs, os quais são incorporados ao complexo RISC, estando este ainda inativado. Ao ser incorporada ao complexo RISC inativo, a cadeia dupla de siRNA é desnaturada por uma helicase, levando à liberação da cadeia sense e ativação de RISC. A cadeia antisense guia RISC, havendo o reconhecimento e ligação ao mRNA alvo. Por fim, ocorre a clivagem do mRNA alvo ou a repressão da tradução, silenciando o gene alvo. **B.** Via do miRNA. Embora tenha sido identificada por sua capacidade de processar dsRNA, Dicer é capaz de clivar um hairpin precursor, produzindo fragmentos fita-simples de 22 pb (miRNA). Esses fragmentos são incorporados ao complexo proteico miRNA, que é guiado até o mRNA alvo, causando inibição da tradução e inibição da síntese proteica. Adaptado de Dykxhoorn *et al.*, 2003. **C.** Via do RNAi em insetos. Dicer-2 detecta a dupla-fita de RNA viral, produzida por vírus de DNA/RNA, gerando pequenas moléculas de RNA viral (siRNA). Dcr-2 e R2D2 são requeridas para a incorporação de siRNA por Argonauta (AGO2), no complexo RISC. A fita incorporada a RISC guia e cliva o RNA viral alvo, inibindo a replicação viral. Adaptado de BRONKHORST e RIJ (2014).

Em mosquitos tem sido demonstrado o papel da via do RNAi na mediação da resistência ao vírus, induzida pela introdução de dupla fita de RNA (dsRNA) (OLSON *et al.*, 2002). dsRNA viral pode fazer com que a maquinaria de RNAi impeça a replicação viral (BRONKHORST e RIJ, 2014) (figura 6C). Em mosquitos infectados com vírus (DENV2), maiores níveis de replicação viral são observados quando há inativação de proteínas efetoras da via de RNAi (SÁNCHEZ-VARGAS *et al.*, 2009).

### 1.8.1. Principais proteínas envolvidas no mecanismo de RNAi

Agrawal e colaboradores (2003) realizaram análises genéticas no fungo *Neurospora crassa*, na alga *Chlamydomonas reinhardtii*, no nematóide *Caenorhabditis elegans* e na planta *Arabidopsis thaliana*, para procurar mutantes defectivos em quelling, RNA interferente ou PTGS. A análise desses mutantes levou à identificação de proteínas codificadas pelos hospedeiros envolvidos no

silenciamento gênico, e também revelou que um número de enzimas ou fatores são comuns a esses processos. Alguns dos componentes identificados servem como iniciadores, enquanto outros servem como efetores, amplificadores e transmissores no processo de silenciamento gênico.

As proteínas Dicer e Argonata são reconhecidas como os componentes essenciais no silenciamento por RNA, sendo capazes de manter a funcionalidade da via de RNAi (CARTHEW e SONTHEIMER, 2009); porém outras proteínas também estão envolvidas no processo (DRINNENBERG *et al.*, 2009).

Em *Drosophila melanogaster*, Loquacious (LOQS), uma proteína celular ligadora de dsRNA (dsRBD), associa-se com Dicer e participa da maturação de miRNA (FÖRSTEMANN *et al.*, 2005). Liu e colaboradores (2003) identificaram a proteína R2D2, um homólogo da proteína RDE-4, de *Caenorhabditis elegans*. O complexo DCR-2/R2D2, mas não Dicer-2 sozinha, liga-se ao siRNA e aumenta a degradação do RNA mensageiro específico mediada por RISC. Dessa forma R2D2 facilita a passagem de dsRNA de Dicer-2 para RISC.

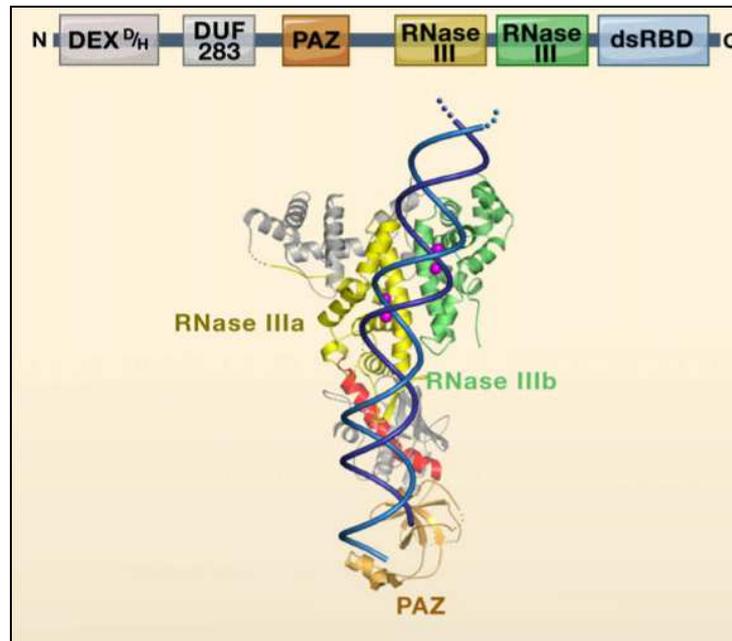
Drosha funciona com um grande complexo, o qual interage com Pasha/DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein), que apresenta um domínio de ligação para dsRNA. DGCR8 pode ser um componente essencial no processamento de pri-miRNA, juntamente com Drosha (HAN *et al.*, 2004). O mecanismo que orienta Drosha para a posição de clivagem no pri-miRNA permanece indeterminada (BURKE *et al.*, 2014).

As proteínas Swi6/HP1 e Chp1/Twi estão envolvidas no processo de formação da heterocromatina (FOLCO *et al.*, 2008; PETRIE *et al.*, 2005). Em *C. elegans* SID1, proteína transmembrana, participa da resposta sistêmica ao RNAi (FEINBERG e HUNTER, 2003); e RDE-4, proteína citoplasmática, interage com Dicer1 (PARKER *et al.*, 2006).

#### **1.8.1.1. Dicer**

Dicer pertence à família de endonucleases RNase III, que cliva duplas fitas de RNA e é evolutivamente conservada em vermes, moscas, plantas, fungos e mamíferos (BERNSTEIN *et al.*, 2001). A figura 7 mostra os vários domínios de Dicer, da extremidade amino-terminal para a carboxi-terminal: um domínio ATPase

(DEXD/H), um domínio DUF/283, um domínio PAZ, dois domínios RNase III e um domínio ligador de dupla-fita (dsRBD). Alguns membros dessa família podem diferir desse arranjo – pode faltar um domínio ATPase ou PAZ, por exemplo (CARTHEW E SONTHEIMER, 2009).



**Figura 7: Domínios de Dicer.** Proteínas Dicer clivam dsRNA através de dois domínios RNase III. O processamento ocorre mais rapidamente na extremidade de dsRNA, na região do domínio PAZ. O substrato é posicionado no sítio ativo dos domínios RNase III, que clivam siRNA ou miRNA. A estrutura mostra também íons ativos (vermelho) no sítio ativo e uma estrutura em hélice que ajuda a determinar o produto de siRNA (CARTHEW E SONTHEIMER, 2009).

Alguns organismos, incluindo mamíferos e nematóides, possuem apenas uma Dicer, que participa da biogênese tanto de siRNA quanto de miRNA, enquanto outros organismos utilizam várias proteínas Dicer (CARTHEW E SONTHEIMER, 2009). Em *Drosophila*, duas Dicers parálogas explicam as vias paralelas para a biogênese de pequenas moléculas de RNA – Dicer-1 (*dcr-1*) libera miRNA do pre-miRNA; Dicer-2 (*dcr-2*) gera siRNAs a partir de longas dsRNAs (LIU *et al.*, 2003; FÖRSTEMANN *et al.*, 2005).

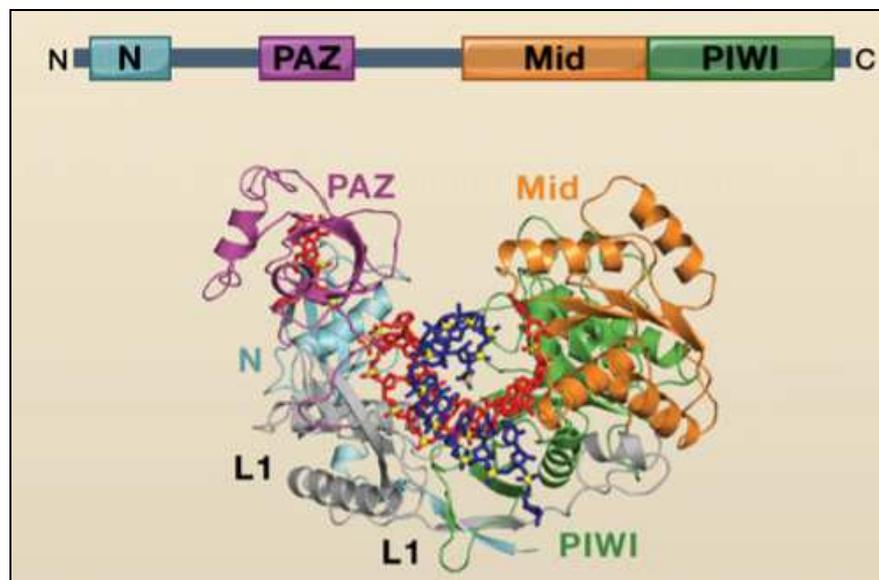
#### 1.8.1.2. Argonauta

Proteínas Argonauta possuem quatro domínios – um domínio PAZ (que interage com Dicer), um domínio PIWI (que é exclusivo da superfamília Argonauta), um domínio N-terminal e um domínio Mid (do inglês, *middle*) (Figura 8). A estrutura

global dessa proteína é bilobada, com um lóbulo que consiste no domínio PAZ e outro que consiste no domínio PIWI, flanqueado pelos domínios N-terminal e Mid. O domínio PAZ tem uma atividade ligadora com a extremidade 3' da dupla fita de RNA; a outra extremidade da fita liga-se ao domínio Mid (MEISTER e TUSCHL, 2004; CARTHEW e SONTHEIMER, 2009).

As proteínas Argonautas são classificadas em três grupos parálogos: proteínas AGO (que são similares à AGO1 de *Arabidopsis thaliana*); proteínas PIWI (relacionadas com PIWI de *D. melanogaster*); e Argonautas Grupo 3, específicas de *Caenorhabditis elegans* (HUTVAGNER e SIMARD, 2008).

A descoberta e compreensão desta família de proteínas altamente conservadas está intimamente relacionada ao estudo dos mecanismos de silenciamento gênico baseados no RNA. Com seus domínios funcionais Argonauta pode se ligar a pequenos RNA's não codificantes e controlar a síntese de proteínas, afetar a estabilidade do RNA mensageiro, ou até mesmo participar da formação de uma nova classe de pequenos RNA's – piRNA (HUTVAGNER e SIMARD, 2008).



**Figura 8: Domínios de Argonauta.** Proteínas Argonauta são guiadas para o alvo por pequenos ácidos nucléicos fita simples. A extremidade 5' orienta a fita no domínio Mid e a extremidade 3' liga o domínio PAZ. O sítio de clivagem está sobreposto do sítio ativo do domínio PIWI (CARTHEW E SONTHEIMER, 2009).

Há variação no número de genes de Argonauta presentes em diferentes espécies. Existem 8 genes de *ago* no ser humano; 5 em *D. melanogaster*; 10 em *A. thaliana*; apenas 1 em *Schizosaccharomyces pombe*; e pelo menos 26 no genoma

de *C. elegans* (HUTVAGNER e SIMARD, 2008). Dentre as cinco proteínas Argonauta de *Drosophila*, duas são requeridas no processo de clivagem de pequenos RNA's – *ago1* e *ago2* (OKAMURA *et al.*, 2004).

Amaral (2008) mediu a expressão do gene *ago* em populações naturais de *A. aegypti*, quando foram infectados com os arbovírus DENV e SINV. Mosquitos infectados apresentaram redução dos níveis de transcritos de *ago*, sugerindo a presença de supressores de RNAi, inibindo a expressão desse gene. Em uma linhagem transgênica de *Aedes aegypti*, *ago 2* é requerido para defesa contra a infecção pelo vírus Dengue, mediada por RNAi (FRANZ *et al.*, 2006). Transcritos dos genes *dcr 2*, *ago 2* e *TSN* foram silenciados antes da infecção oral de *Aedes aegypti* pelo vírus Sindbis. Após o silenciamento desses genes houve aumento dos títulos virais e da taxa de infecção, enfatizando os papéis desses genes na defesa anti-viral (CAMPBELL *et al*, 2008).

## 2. JUSTIFICATIVA

A dengue é considerada hoje como um dos principais problemas de saúde pública, haja visto o número de pessoas que superlotam as unidades de saúde quando as epidemias acontecem. O surgimento da dengue como problema de saúde está relacionado à dispersão do principal mosquito vetor – *A. aegypti* (CAMERON *et al.*, 2012). Sabendo que, até o momento, não há vacina disponível comercialmente contra a dengue, o controle do vetor é o método mais eficaz para diminuir a incidência da doença. *A. aegypti* está presente em áreas urbanas; esses ambientes favorecem a dispersão e elevação da densidade populacional do mosquito. Considerando as falhas nas estratégias de combate utilizadas atualmente, é de extrema importância melhorar a eficiência dos programas de controle epidemiológico através do desenvolvimento de novas metodologias visando a redução do número de casos.

A suscetibilidade/refratoriedade do mosquito à infecção pelo vírus pode variar em diferentes populações. Esta variabilidade, em populações naturais, tem sido relacionada às barreiras de infecção e transmissão presentes nos tecidos do vetor (BLACK *et al.*, 2002). A competência vetorial é afetada tanto por fatores extrínsecos como por fatores intrínsecos. Neste trabalho investigamos a expressão de genes-chave da principal via antiviral de insetos.

RNAi é um dos mecanismos moleculares para regulação de expressão gênica, e tem papel central na imunidade antiviral de insetos. Em mosquitos, tem sido demonstrado o papel da via do RNAi na mediação da resistência ao vírus, induzida pela introdução de dupla fita de RNA (dsRNA) (OLSON *et al.*, 2002). Ainda que *A. aegypti* lance mão desse mecanismo, muitas vezes não consegue combater o vírus antes que seja transmitido para outro hospedeiro. Assim, torna-se necessário entender fatores que possam contribuir para o bom funcionamento dessa via, a fim de compreender como o mosquito se prepara para uma provável infecção por DENV.

Dados preliminares obtidos por nosso grupo mostram que mosquitos *Aedes aegypti* infectados com o DENV-2 ou SINDV tem a expressão do gene *ago* modulada negativamente, de forma a inibir a resposta antiviral mediada pela via de RNA de interferência (AMARAL, 2008).

Neste trabalho nos propomos a medir a expressão de dois genes participantes da via do RNAi – *dcr* e *ago* – em *A. aegypti*, em diferentes condições experimentais, buscando entender fatores que possam contribuir para a capacidade vetorial dessa espécie. A hipótese do trabalho é que a expressão de *dcr* e *ago* pode ser modulada positiva ou negativamente quando os mosquitos são submetidos a diferentes condições experimentais. Essa variação pode servir de parâmetro para o entendimento do comportamento desses insetos frente à infecção viral.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Medir a expressão dos genes Dicer e Argonauta em *A. aegypti*, identificando fatores que possam contribuir para variações no padrão de expressão e, conseqüentemente interfiram na capacidade vetorial do mosquito *A. aegypti*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Comparar a expressão de *dcr* e *ago* nos estádios de vida do *A. aegypti*;
- Monitorar a expressão de *dcr* e *ago* em *A. aegypti*, em resposta a diferentes alimentações;
- Verificar se a expressão de *dcr* e *ago* é tecido-específica.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Manutenção da colônia de *Aedes aegypti***

A colônia de *A. aegypti*, linhagem Rockefeller, é mantida no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) por várias gerações, e originalmente foram obtidas de uma colônia mantida pelo Prof. Dr. Francisco José Lemos (LBT/UENF). Os ovos são mantidos em recipiente seco até que o processo de eclosão seja iniciado. Na fase de larva os mosquitos são mantidos em bacias, com água da torneira, e recebem ração de pássaro (Gorjeio/Gold) como dieta. Ao atingir a fase de pupa são colocadas em recipientes de plástico adaptados, para finalização do seu desenvolvimento em mosquito adulto. Na fase adulta, os mosquitos são alimentados com solução de sacarose (1%) para manutenção da colônia, até que sejam utilizados nos experimentos. A alimentação com sangue foi realizada para postura. Utilizamos sangue de coelho, obtido por punção na orelha do animal, acrescido de heparina (5000 U/mL), para evitar que o sangue coagulasse. Os coelhos não foram utilizados em períodos fixos. À medida que havia necessidade de aumentar a colônia, por meio da postura, os coelhos eram utilizados.

O presente trabalho foi submetido à comissão de ética da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob o número 792325.

### **4.2. Coleta de larva, pupa e mosquito adulto**

De acordo com o desenvolvimento dos mosquitos, desde a eclosão dos ovos até a fase adulta, foram realizadas coletas dos quatro estádios de larva, da fase de pupa e de adultos. A quantidade de larvas para cada estágio foi diferente, devido à diferença de massa entre L1, L2, L3 e L4. Ao serem retiradas das bacias, as larvas em cada estágio e pupas foram colocadas em microtubos de 1,5 mL e lavadas com água tratada com DEPC (Dietil pirocarbonato) por cinco vezes, para inativar enzimas RNase, caso estivessem presentes na água das bacias. Mosquitos inteiros na fase adulta foram lavados em água DEPC e colocados no microtubo de 1,5 mL. As patas e as asas dos mosquitos foram retiradas e descartadas, antes que eles fossem coletados. Os materiais foram conservados no freezer a -70°C para posterior extração de RNA.

### **4.3. Alimentação dos mosquitos adultos**

Os mosquitos foram alimentados com sangue ou plasma, através de um sistema de alimentação artificial (HIGGS E BEATY, 1996). Mosquitos também foram alimentados com solução de sacarose 1%, nos mesmos recipientes utilizados para manutenção da colônia (sacarose disponível).

As fêmeas foram separadas em 3 gaiolas (juntamente com alguns machos, para estimular a alimentação) e três dietas foram oferecidas aos mosquitos: fêmeas foram alimentadas com sangue de coelho, obtido por punção na orelha do animal, utilizando heparina (5000 U/mL); ou foram alimentadas com plasma, obtido a partir da centrifugação do sangue de coelho; ou foram alimentadas com solução de sacarose 1%, disponível na gaiola. Para as três dietas oferecidas, foram utilizadas fêmeas de 4-8 dias de idade, desprovidas de sacarose por 24 horas antes da alimentação.

O sangue/plasma utilizado para a alimentação foi mantido a 37°C, em um sistema de banho circulante com aquecimento. A membrana utilizada nas mamadeiras para alimentação artificial foi a tripa de boi. Também foi utilizada solução de ATP a 1 mM, adicionada ao sangue, como fagoestimulante.

#### **4.3.1. Mosquitos alimentados com sangue, plasma e sacarose, dissecados em diferentes tempos após a alimentação**

Foram separadas 4 gaiolas: 3 delas com mosquitos que foram alimentados com sangue, plasma ou sacarose, e dissecados em 1, 4, 7 e 14 dias após a alimentação; e 1 gaiola com mosquitos mantidos em jejum, para que fossem utilizados como controle. Os insetos foram dissecados em água DEPC, com auxílio de microscópio estereoscópico. Cabeças, intestinos e carcaças (20 de cada) foram colocados separadamente em microtubos de 1,5 mL. As patas e as asas dos mosquitos foram retiradas e descartadas, antes que eles fossem dissecados. A carcaça foi considerada como sendo todos os tecidos, exceto intestino e cabeça.

#### **4.3.2. Mosquitos alimentados com sangue, plasma e sacarose, dissecados logo após a alimentação.**

Foram separadas 5 gaiolas, cada uma delas com mosquitos que foram submetidos a diferentes alimentações: mosquitos alimentados com sangue, plasma, sacarose (alimentador artificial) ou sacarose (disponível); e 1 gaiola com mosquitos mantidos em jejum, para que fossem utilizados como controle. Os insetos foram dissecados em água DEPC, com auxílio de lupa. Cabeças, intestinos e carcaças (20 de cada) foram colocados separadamente em microtubos de 1,5 mL. As patas e as asas dos mosquitos foram retiradas e descartadas, antes que eles fossem dissecados. A carcaça foi considerada sendo todos os tecidos, exceto intestino e cabeça.

#### **4.4. Extração de RNA**

Os tecidos dissecados dos mosquitos na fase adulta e os mosquitos nas fases larvais e de pupa foram macerados, utilizando-se pistilos de plástico, lavados em água DEPC e autoclavados. Cada *pool* contendo 20 tecidos foi submetido à extração de RNA em 500 µL do reagente Trizol (Invitrogen). Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio absoluto gelado, e a suspensão vigorosamente agitada. Estas amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos à 4°C de temperatura. A fase aquosa resultante da centrifugação foi transferida para outro tubo e adicionados 500 µL de isopropanol (p/v) desprezando a fase orgânica. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 7.500 g; o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75%, centrifugado em seguida a 7.500 g por 8 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o RNA total foi secado pela inversão dos tubos em papel absorvente. Após a secagem o RNA total foi dissolvido com 50 µL de água DEPC, e as amostras aquecidas por 10 minutos a 56 °C. O RNA foi quantificado por determinação da absorbância a 260 e 280 nm no aparelho Nanodrop 1000 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific®), conforme instruções do fabricante.

#### **4.5. Remoção da contaminação por DNA genômico e síntese de cDNA**

As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Fermentas). Para tal, foram mantidas em gelo em tubos de 0,2 mL, e foram adicionados 1 µg de RNA

total, 1 µL do tampão de DNase I (10X), 1 µL de DNase I (1 U/µL) e água DEPC 0,1% suficiente para completar o volume para 10 µL. As reações foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C. Após adição de 1 µL de EDTA 25 mM, as reações foram incubadas a 65 °C por 10 minutos.

A síntese de cDNA foi realizada com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* – Applied Biosystems. Aos 11 µL obtidos anteriormente, foram adicionados 11 µL do mix que continha 2,2 µL de tampão de reação (10x), 0,88 µL de dNTP (100 mM), 2,2 µL de oligos aleatórios (10x), 1,1 µL da enzima transcriptase reversa (50 U/ µL) e água DEPC 0,1 %, até que o volume final de cada reação completasse 22 µL. As reações foram incubadas por 10 minutos a 25 °C, em seguida incubadas por 2 horas a 37 °C, e por 5 minutos a 85 °C. As reações foram realizadas no termociclador Applied Biosystems, modelo Veriti TM – 96 well – Thermal Cycler. Após a reação de transcrição reversa, as amostras de cDNA foram conservadas a -20°C até o uso.

#### **4.6. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)**

Cada reação continha 1 µL de cDNA; 2,0 µL de tampão para Taq DNA Polimerase; 0,2 mM de dNTP; 1,5 mM de cloreto de magnésio; 1,2 µL de cada iniciador; 0,16 µL da enzima Taq DNA polimerase 5 U/µL (Fermentas); e água ultra pura para completar um volume de 20 µL. As reações foram realizadas no termociclador Applied Biosystems, modelo Veriti TM – 96 well – Thermal Cycler, com os ciclos de temperatura programados para: 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 30 s e 72°C por 1 min, e uma etapa final a 72°C por 10 min. Os iniciadores utilizados foram desenhados para os genes de interesse. O gene usado para controle positivo foi da proteína ribossomal S7RP de *A. aegypti* (BAI *et al.*, 2007). Neste trabalho foram utilizados 2 pares de iniciadores, que encontram-se apresentados na tabela 1. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com Safer Dye (Kasvi), em tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA; pH 8). Os géis foram fotografados depois de terem sido visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador UV.

Tabela 2: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação por RT-PCR e qPCR

Gene	Sequência	Tm (°C)	Amplicon (bp)	Eficiência do primer
<b>S7RP</b>	F ACCGCCGTCTACGATGCCA	60	145 pb	100%
	R ATGGTGGTCTGCTGGTTCTT			
<b>Ago</b>	F TCCAACCTCTGCCTGAAGAT	60	98 pb	169%
	R ATGACCGGTTTCGTCGAATAC			
<b>Dcr</b>	F GGACGCTGTGTGGAAGGTAT	60	148 pb	107%
	R TCCATCGGCCAACTTCTC			

#### 4.7. Expressão relativa dos genes – PCR em tempo real

Para iniciar a realização da PCR quantitativa (qPCR), foram utilizados 7,5 µL de *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) misturados com 0,75 µL de cada iniciador a 5 µM (senso e anti-senso), 1 µL de água ultrapura e 5 µL de cDNA a 40 ng (Cf= 200 ng), em um volume final de 15 µL. As reações foram realizadas no sistema *StepOnePlus Real-Time PCR* (Applied Biosystems) nas condições seguintes: 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C.

Os valores de  $\Delta\Delta C_t$  e de expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) foram calculados a partir dos valores de  $C_t$  (*threshold cycle*) obtidos através da qPCR. Os valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  foram utilizados para montagem dos gráficos, através do programa Prism 5.0 (GraphPad Software). O cálculo da expressão relativa dos produtos amplificados para cada gene foi realizada empregando o gene S7RP como gene referencial (gene housekeeping).

## 5. RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados da análise quantitativa de *dcr* e *ago* em *A. aegypti*. A expressão desses genes foi monitorada nos estádios de vida do mosquito (L1, L2, L3, L4, pupa e adulto); bem como em três tecidos (cabeça, intestino e carcaça) de fêmeas submetidas a diferentes alimentações (sangue, plasma e sacarose). A comparação dos transcritos de *dcr* e *ago* deu-se em diferentes tempos – 1, 4, 7 e 14 dias após a alimentação e também logo após a alimentação dos mosquitos.

### 5.1. Expressão do gene endógeno S7RP de *Aedes aegypti*

Antes da análise da expressão dos genes em estudo, testou-se o gene endógeno (S7RP) – que codifica uma subunidade de uma proteína ribossomal de *A. aegypti*, como um controle para a normalização da expressão gênica. Todas as amostras foram submetidas à RT-PCR, para que a utilização desses iniciadores fosse validada. O primer S7RP amplifica uma banda de aproximadamente 145 pares de bases.

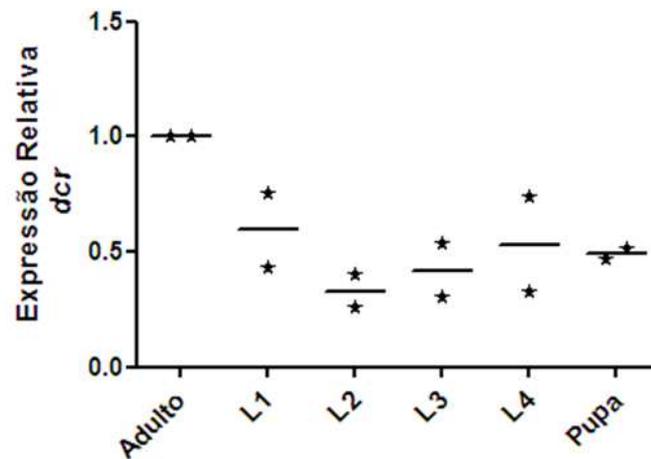
### 5.2. Expressão relativa dos genes Dicer e Argonata nos estádios de vida de *Aedes aegypti*

A fim de observar se houve variação nos transcritos dos genes *dcr* e *ago* ao longo do desenvolvimento do mosquito, amostras de cDNAs dos estádios de larva, pupa e mosquito adulto foram submetidas à qPCR. As figuras 9 e 10 mostram perfis semelhantes quando as expressões de *dcr* e *ago* são comparadas. A expressão dos genes durante as fases de larva e pupa foi inferior à expressão dos genes em mosquito na fase adulta.

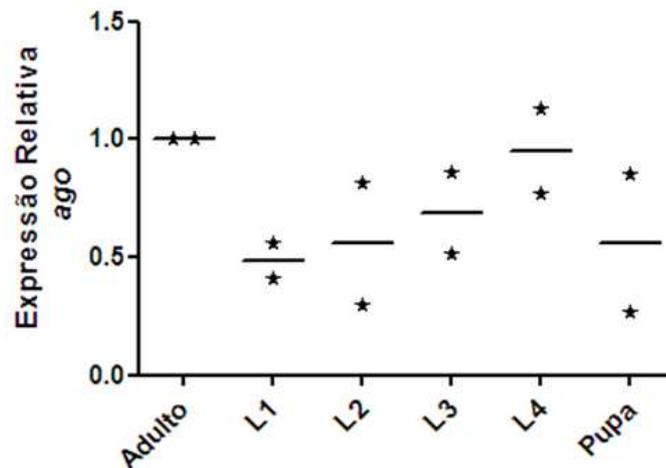
O primeiro instar tem aproximadamente 50% a menos de expressão do gene *dcr* quando comparado com o mosquito adulto. No segundo instar observamos 65% a menos de expressão de *dcr*, comparando ao adulto. Houve pequeno aumento nos 3º e 4º instares; na fase de pupa esse aumento se manteve constante quando comparado à fase anterior.

O mesmo perfil foi verificado quando a expressão relativa de *ago* foi medida nos diferentes estádios. O maior nível de expressão foi verificado no adulto. A

expressão de *ago* foi 50% menor em L1, 45% em L2, 30% em L3. Em L4 observamos aproximadamente o mesmo nível de expressão do adulto e no estágio de pupa, em torno de 45% dos níveis de expressão verificados em mosquitos adultos.



**Figura 9: Expressão relativa de *dcr* em diferentes fases do ciclo de vida de *Aedes aegypti* – L1, L2, L3, L4, pupa e adulto.** Os insetos foram coletados logo após a muda; o RNA total foi extraído e as amostras utilizadas para a síntese de cDNA; posteriormente foi realizada a qPCR. As variações da expressão de *dcr* nos estádios foram baseadas no valor obtido no controle (adulto). O gráfico mostra os valores obtidos em cada um dos 2 experimentos independentes (\*) e a barra representa a média dos dois valores mostrados.



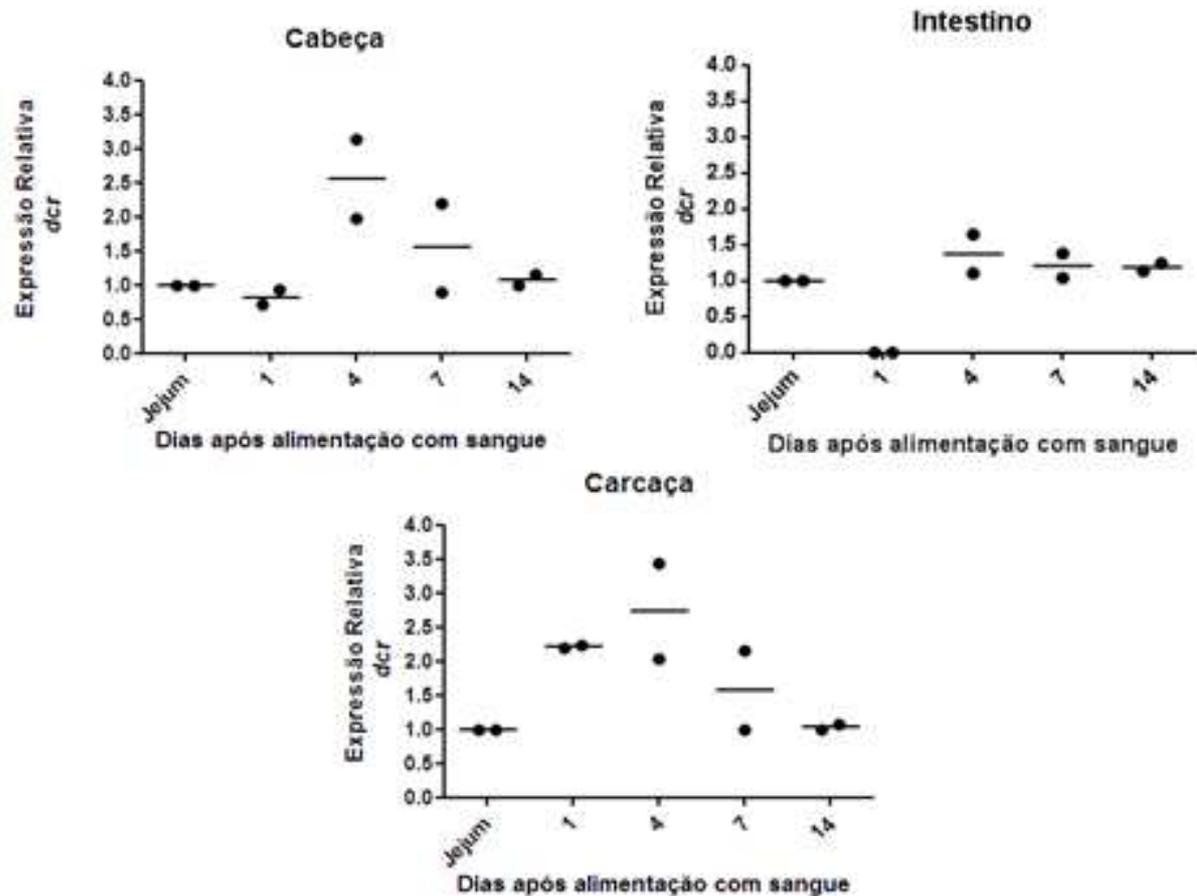
**Figura 10: Expressão relativa de *ago* em diferentes fases do ciclo de vida de *Aedes aegypti* – L1, L2, L3, L4, pupa e adulto.** Os insetos foram coletados logo após a muda; o RNA total foi extraído e as amostras utilizadas para a síntese de cDNA; posteriormente foi realizada a qPCR. As variações da expressão de *ago* nos estádios foram baseadas no valor obtido no controle (adulto). O gráfico mostra os valores obtidos em cada um dos 2 experimentos independentes (\*) e a barra representa a média dos dois valores mostrados.

Os genes *dcr* e *ago* são expressos em todas as fases de larva, pupa e mosquito adulto de *A. aegypti*. A análise quantitativa mostrou um padrão de expressão semelhante para ambos os genes – menor expressão nos estádios de larva e pupa quando comparados com o mosquito adulto. Por outro lado, em L4 os transcritos de *ago* mantiveram-se no nível basal de expressão. A maior expressão dos genes-chave da via do RNAi ocorre na fase adulta, fase em que se dá a transmissão vetor-vertebrado.

### **5.3. Expressão de Dicer e Argonauta em diferentes tecidos de *Aedes aegypti*, em resposta à alimentação sanguínea**

A infecção viral inicia-se com a alimentação em um hospedeiro infectado. Primeiramente a infecção é estabelecida no intestino, o vírus atravessa a lâmina basal, dissemina-se nos tecidos e finalmente a invade a glândula salivar e escapa para a saliva do inseto. Isso significa que diferentes tecidos podem apresentar-se infectados ou não.

Com base no princípio de que a expressão de genes pode variar em resposta à alimentação com sangue, foi verificada a variação dos níveis transcricionais de *dcr* e *ago* através da PCR quantitativa. Os valores de expressão de *dcr* (figura 11) e *ago* (figura 13) em fêmeas em jejum foram utilizados como referência (valor de expressão = 1,0) e comparados a fêmeas nos dias subsequentes à alimentação com sangue. A expressão relativa foi medida na cabeça, no intestino e na carcaça de fêmeas após a alimentação, no sentido de entender a dinâmica de expressão da via do RNAi no corpo do inseto como um todo.

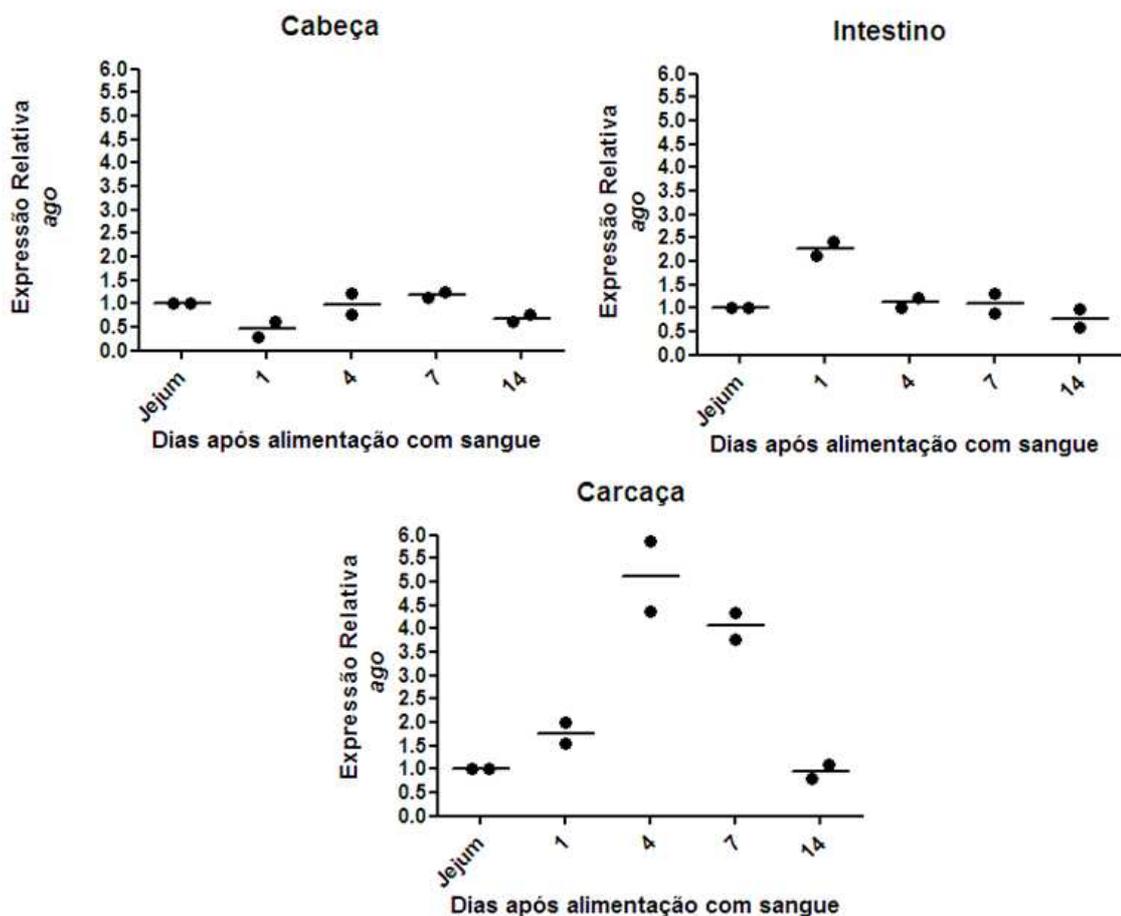


**Figura 11: Expressão relativa de *dcr* em cabeça, intestino e carcaça de *Aedes aegypti*, em resposta à alimentação com sangue.** O RNA total foi extraído de 20 fêmeas em jejum, 1, 4, 7 e 14 dias \* após alimentadas com sangue; as amostras foram utilizadas para a síntese de cDNA, e posteriormente foi realizada a qPCR. As variações da expressão de *dcr* nos tecidos foram baseadas no valor obtido no controle (jejum). A representação dos resultados foi obtida a partir das médias de 2 experimentos independentes. Os resultados dos dois experimentos estão mostrados (●). (\*) Níveis de expressão não foram detectados no intestino, no 1º dia após alimentação.

A análise da expressão de *dcr* mostrou que cabeça e carcaça apresentaram perfis semelhantes, com poucas diferenças. Na cabeça foi observada pequena redução da expressão no 1º dpa (dia pós-alimentação), enquanto que na carcaça, no mesmo período, houve aumento da expressão, em comparação à amostra do mosquito obtida na condição de jejum. Observamos que houve redução no 7º dpa, nos três tecidos (no intestino mostrou-se menor), com retorno ao nível basal de expressão no 14º dpa. Observamos ainda que para os três tecidos a maior expressão ocorreu no 4º dpa. Para as amostras de intestino de insetos dissecados no 1º dpa com sangue, níveis de expressão não foram detectados.

Quando analisamos a expressão de *ago* nesses mesmos tecidos, observamos que o perfil é diferente do mostrado anteriormente para *dcr*. No 14º dpa

o nível de expressão desse gene fica próximo ao nível basal (jejum), em todos os tecidos analisados. Não houve regularidade quanto ao pico de expressão de *ago* nos diferentes tecidos (na cabeça não houve pico), visto que para cada um deles o número máximo de transcritos foi observado em dias distintos – no intestino no 1º dpa e na carcaça no 4º dpa (figura 12). Enquanto na expressão de *drc* houve regularidade quanto ao pico de expressão em relação aos tecidos (cabeça e carcaça – 4º dia após alimentação), o mesmo não ocorreu na quantificação dos transcritos de *ago*, o qual apresentou picos de expressão diferentes entre os tecidos (intestino – 1º dpa; carcaça – 4º dpa). A carcaça foi o tecido que obteve maiores níveis de mRNA, tanto de *drc* quanto de *ago*, ambos no 4º dia após alimentação sanguínea.



**Figura 12: Expressão relativa de *ago* em cabeça, intestino e carcaça de *Aedes aegypti*, em resposta à alimentação com sangue.** O RNA total foi extraído de 20 fêmeas em jejum, 1, 4, 7 e 14 dias \* após alimentadas com sangue; as amostras foram utilizadas para a síntese de cDNA, e posteriormente foi realizada a qPCR. As variações da expressão de *ago* nos tecidos foram baseadas no valor obtido no controle (jejum). A representação dos resultados foi obtida a partir das médias de 2 experimentos independentes. Os resultados dos dois experimentos estão mostrados (●).

#### **5.4. Expressão de *Dicer* e *Argonauta* em diferentes tecidos de *Aedes aegypti*, em resposta à alimentação com plasma**

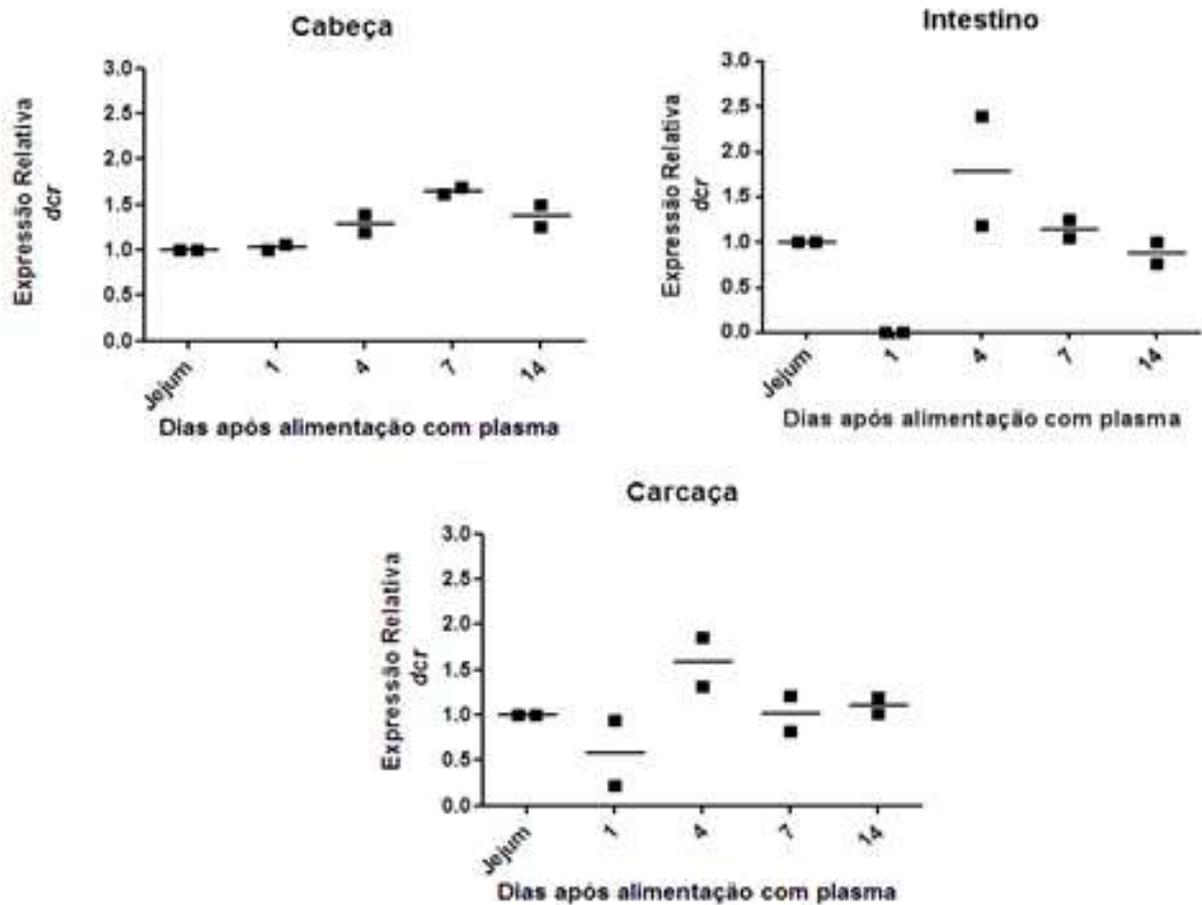
Com o objetivo de analisar a expressão dos genes em relação a diferentes condições alimentares, insetos foram alimentados com plasma e os níveis de mRNA de *dcr* e *ago* foram quantificados em 1, 4, 7 e 14 dias após a alimentação. Comparamos o perfil de expressão dos genes dos mosquitos submetidos à alimentação com plasma em relação aos tecidos dissecados (cabeça, intestino e carcaça).

A expressão relativa de *dcr* variou entre os tecidos, ao longo dos dias em que os insetos foram dissecados (figura 13). Níveis de expressão não foram detectados para intestino de mosquitos dissecados no 1º dpa. Tanto no intestino quanto na carcaça os picos de expressão de *dcr* ocorreram no 4º dpa, enquanto na cabeça deu-se no 7º dpa. Os níveis de *dcr* na cabeça, no 1º dpa se mantiveram os mesmos quando comparados ao controle; no 4º e 14º dias após a alimentação a expressão foi a mesma. Quando medimos a expressão desse gene no intestino e carcaça, observamos que no 4º dpa ocorreu um aumento e posterior redução da expressão, sendo que no 14º dpa os níveis foram semelhantes ao controle. Para as amostras de intestino de insetos dissecados no 1º dpa com plasma, níveis de expressão de *dcr* não foram detectados.

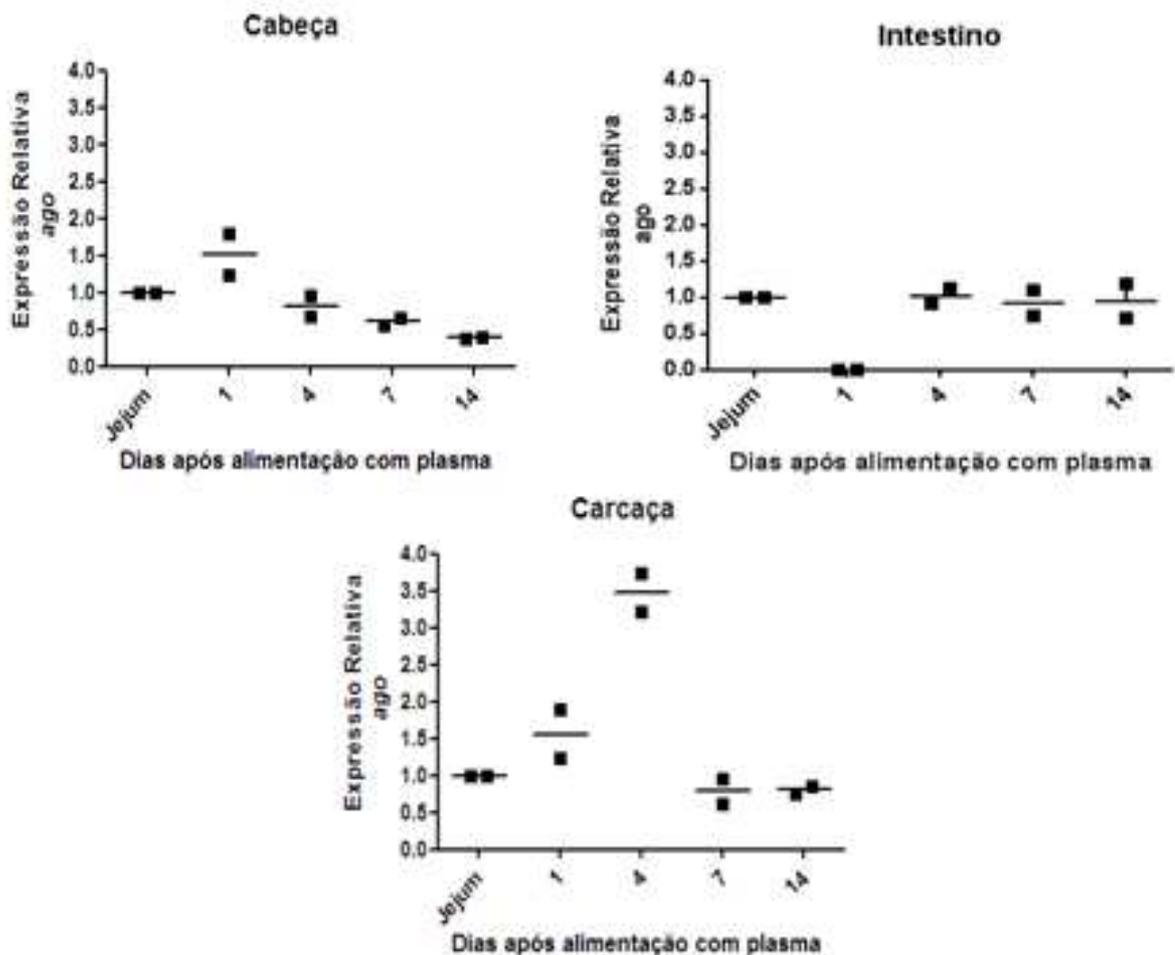
O perfil de expressão de *ago* nos três tecidos não foi semelhante: na cabeça, após aumento da expressão no 1º dpa, houve gradativa redução no número de transcritos. A partir do 4º até o 14º dpa houve repressão do gene. No intestino (primeiro tecido onde o vírus se instala) não houve variação dos níveis de mRNA de *ago*, comparando-se ao controle. No 1º dpa com plasma, níveis de expressão de *ago* não foram detectados; pode ser que antes desse período ocorra algum pico de expressão ou mesmo a repressão desse gene. Na carcaça, no 4º dpa, ocorreu um aumento de transcritos 1,5 vezes maior em relação ao controle – maior expressão do gene quando comparamos aos outros tecidos e tempos (figura 14).

Os picos de expressão de *ago* variaram entre os tecidos – na cabeça deu-se no 1º dpa; na carcaça no 4º dpa; e no intestino não houve pico, visto que o nível de transcritos permaneceu o mesmo em todos os períodos. Comparando a expressão

dos dois genes, concluímos que os mesmos apresentaram perfis diferentes na cabeça, intestino e carcaça, embora nesta tenha havido pouca variação.



**Figura 13: Expressão relativa de *dcr* em cabeça, intestino e carcaça de *Aedes aegypti*, em resposta à alimentação com plasma.** O RNA total foi extraído de 20 fêmeas em jejum, 1, 4, 7 e 14 dias \* após alimentadas com plasma; as amostras foram utilizadas para a síntese de cDNA, e posteriormente foi realizada a qPCR. As variações da expressão de *dcr* nos tecidos foram baseadas no valor obtido no controle (jejum). A representação dos resultados foi obtida a partir das médias de 2 experimentos independentes. Os resultados dos dois experimentos estão mostrados (■). (\*) Níveis de expressão não foram detectados no intestino, no 1º dia após alimentação.



**Figura 14: Expressão relativa de *ago* em cabeça, intestino e carcaça de *Aedes aegypti*, em resposta à alimentação com plasma.** O RNA total foi extraído de 20 fêmeas em jejum, 1, 4, 7 e 14 dias \* após alimentadas com plasma; as amostras foram utilizadas para a síntese de cDNA, e posteriormente foi realizada a qPCR. As variações da expressão de *ago* nos tecidos foram baseadas no valor obtido no controle (jejum). A representação dos resultados foi obtida a partir das médias de 2 experimentos independentes. Os resultados dos dois experimentos estão mostrados (■). (\*) Níveis de expressão não foram detectados no intestino, no 1º dia após alimentação.

### 5.5. Expressão de *Dicer* e *Argonauta* em diferentes tecidos de *Aedes aegypti*, em resposta à alimentação com sacarose

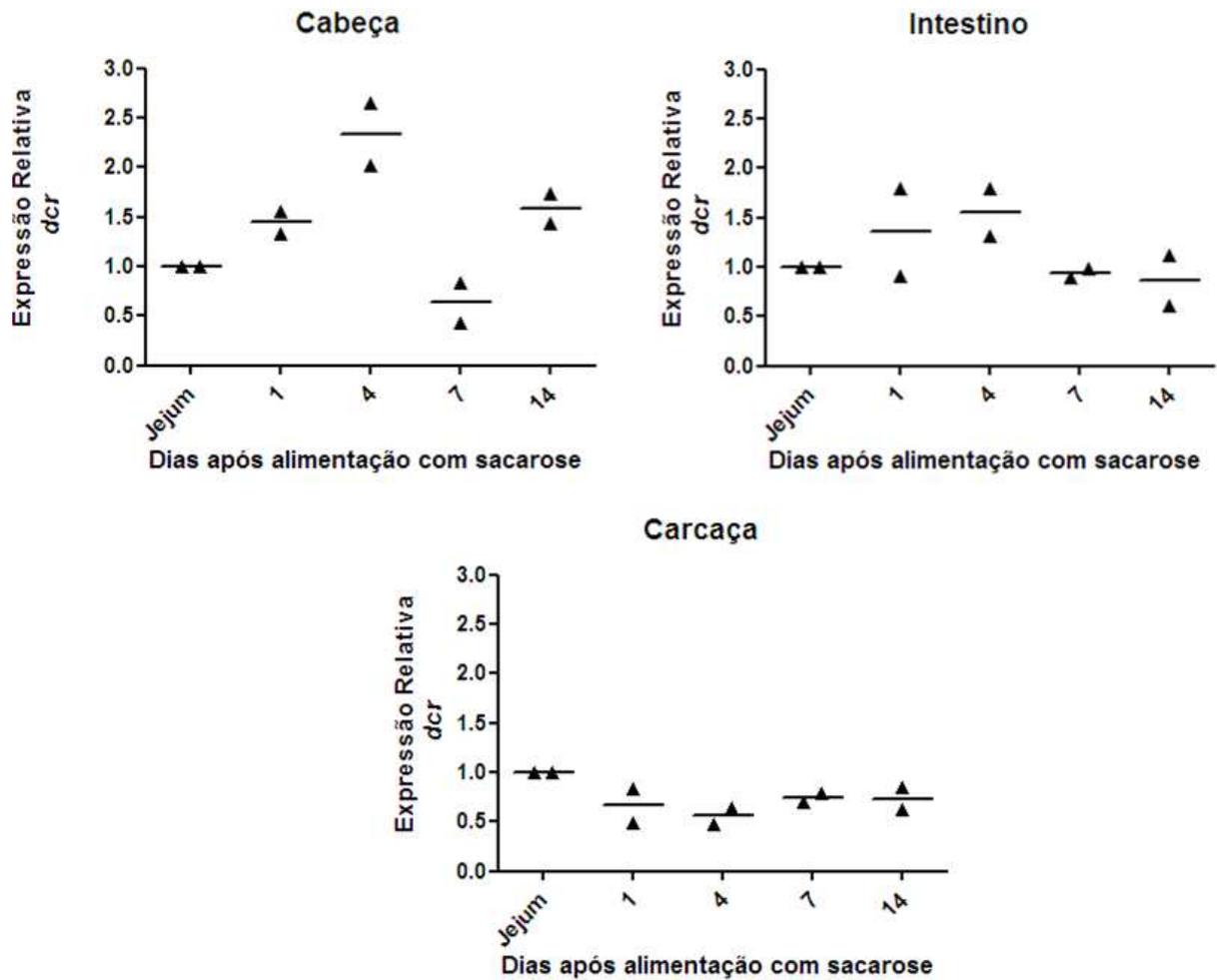
Embora tenham sido observadas semelhanças, a expressão relativa do gene *dcr* apresentou variação entre os tecidos quando os mosquitos foram alimentados com sacarose. Comparamos o perfil de expressão dos genes dos mosquitos submetidos à alimentação com sacarose em relação aos tecidos dissecados (cabeça, intestino e carcaça).

Tanto na cabeça quanto no intestino houve um aumento gradativo dos níveis de mRNA de *dcr* a partir do 1º dpa, mantendo-se até o 4º dpa. No 7º dpa ocorreu

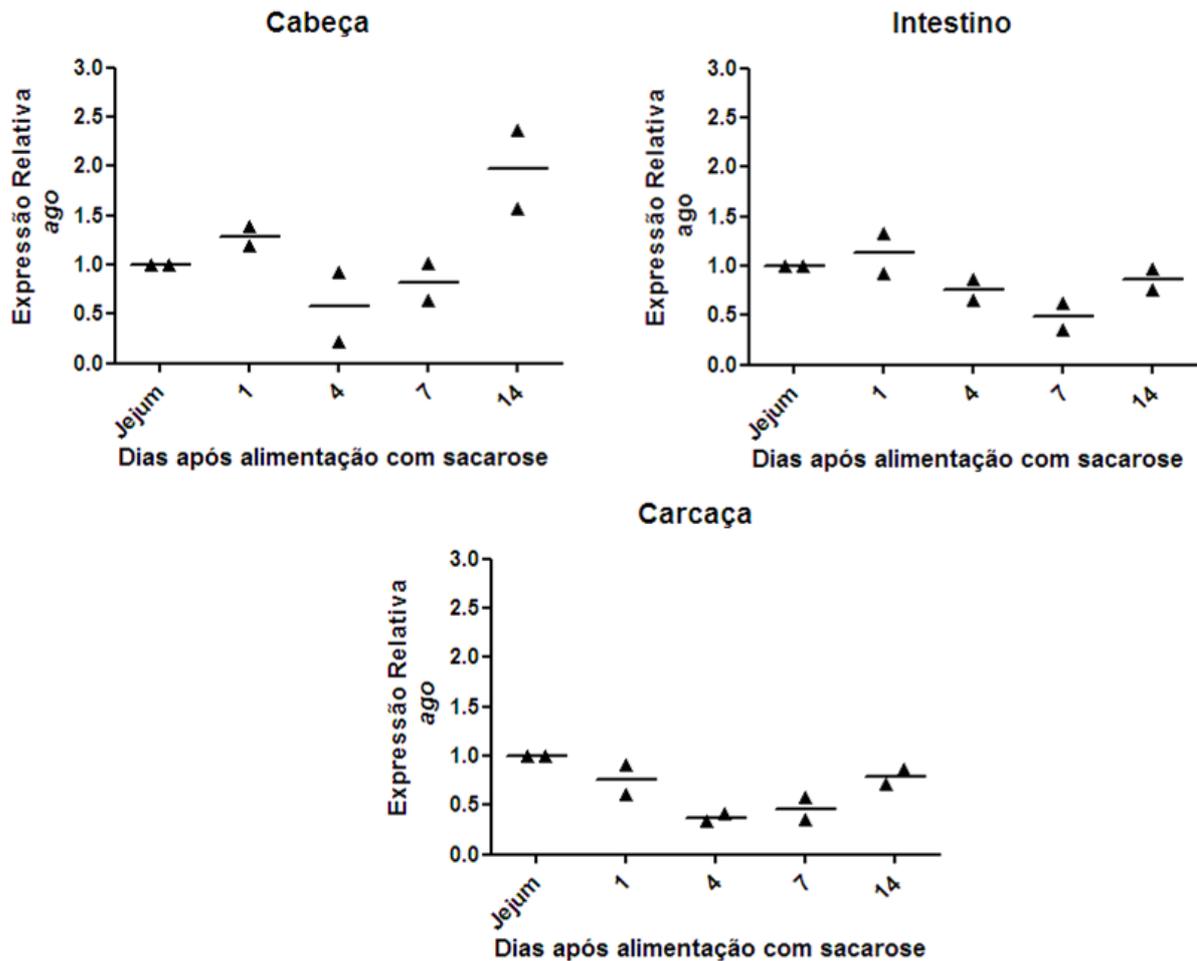
redução da expressão (pequeno aumento na carcaça). Analisando a expressão de *dcr* no 14<sup>o</sup> dpa, para todos os tecidos, observamos que os perfis foram distintos – em relação ao controle, na cabeça houve aumento da expressão; no intestino e na carcaça a expressão foi reduzida.

Uma maior expressão de mRNA de *dcr*, tanto na cabeça quanto no intestino, deu-se no 4<sup>o</sup> dpa, enquanto na carcaça não houve pico de expressão do gene. O número de transcritos de *dcr* na carcaça, em todos os dias, foi inferior ao controle. O maior número de mRNA do gene observado excedeu em 1,5 vezes o controle – cabeça (figura 15).

Os mosquitos alimentados com sacarose não mostraram variação de expressão de *ago* na carcaça – onde o número de transcritos foi inferior ao controle (o mesmo ocorreu na expressão de *dcr* nesse tecido). Perfil semelhante foi verificado no intestino. Quando analisamos os níveis de transcritos de *ago* na cabeça, observamos alternância entre aumento e redução da expressão; o pico de expressão de *ago* deu-se no 14<sup>o</sup> dpa (figura 16).



**Figura 15: Expressão relativa de *dcr* em cabeça, intestino e carcaça de *Aedes aegypti*, em resposta à alimentação com sacarose.** O RNA total foi extraído de 20 fêmeas em jejum, 1, 4, 7 e 14 dias após alimentadas com sacarose; as amostras foram utilizadas para a síntese de cDNA, e posteriormente foi realizada a qPCR. As variações da expressão de *dcr* nos tecidos foram baseadas no valor obtido no controle (jejum). A representação dos resultados foi obtida a partir das médias de 2 experimentos independentes. Os resultados dos dois experimentos estão mostrados (▲).



**Figura 16: Expressão relativa de *ago* em cabeça, intestino e carcaça de *Aedes aegypti*, em resposta à alimentação com sacarose.** O RNA total foi extraído de 20 fêmeas em jejum, 1, 4, 7 e 14 dias após alimentadas com sacarose; as amostras foram utilizadas para a síntese de cDNA, e posteriormente foi realizada a qPCR. As variações da expressão de *ago* nos tecidos foram baseadas no valor obtido no controle (jejum). A representação dos resultados foi obtida a partir das médias de 2 experimentos independentes. Os resultados dos dois experimentos estão mostrados (▲).

### 5.6. Expressão de *Dicer* e *Argonauta* em diferentes tecidos de *Aedes aegypti*, dissecados logo após diferentes alimentações

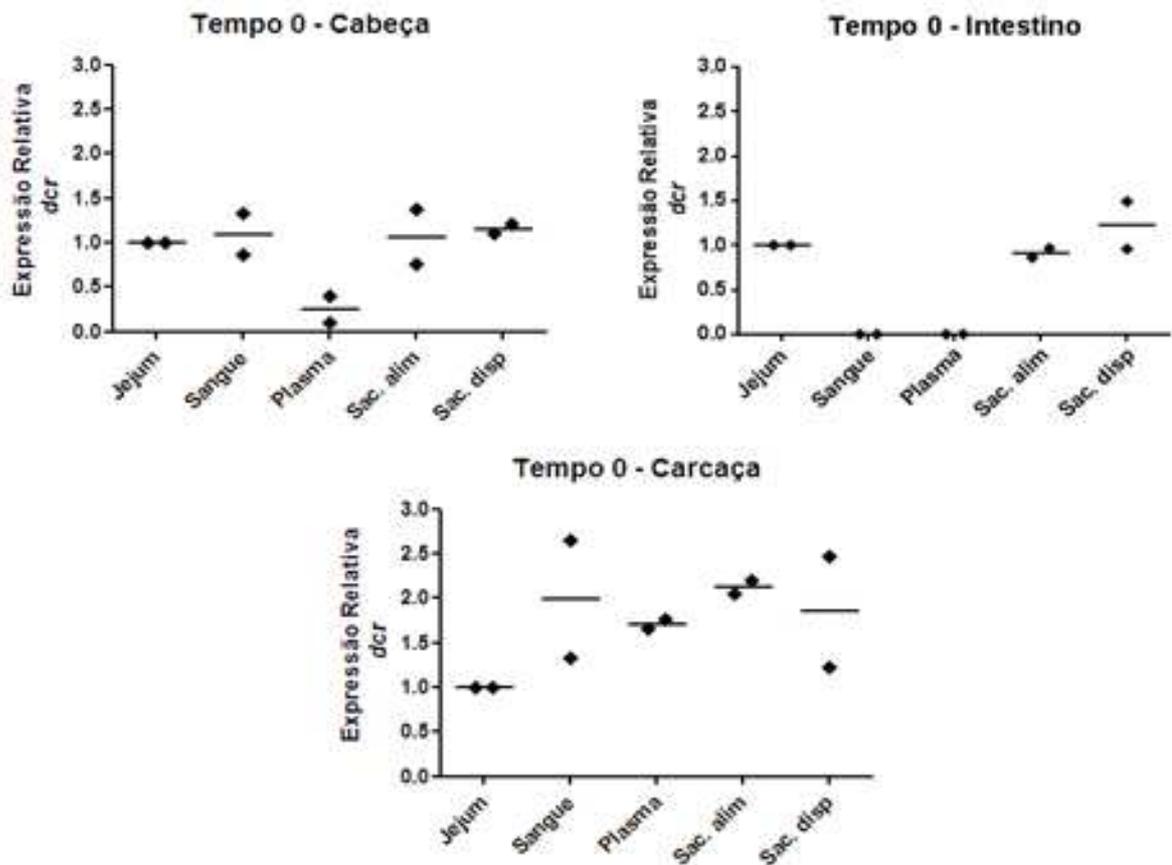
Com o objetivo de observar o perfil de expressão dos genes logo após a alimentação, cabeça, intestino e carcaça dos insetos foram dissecados e os níveis de mRNA de *dcr* e *ago* foram medidos, através da qPCR. Os mosquitos foram alimentados com sangue, plasma, sacarose através do alimentador artificial e sacarose disponível. A alimentação com sacarose por duas fontes diferentes tem o objetivo de analisar se, quando há maior distensão abdominal (promovida pela

alimentação no alimentador artificial) ocorre variação na expressão desses dois genes envolvidos na via de RNAi. Níveis de expressão de *dcr* e *ago* não foram detectados para intestino de mosquitos dissecados logo após alimentação com sangue (tempo 0) e intestino de mosquitos dissecados logo após alimentação com plasma (tempo 0).

Para os insetos alimentados com sangue, sacarose (alimentador) e sacarose (disponível), a expressão relativa de *dcr* se manteve no nível basal. Os níveis transcricionais de *dcr*, na cabeça, mostram que a expressão foi modulada negativamente, para os mosquitos alimentados com plasma.

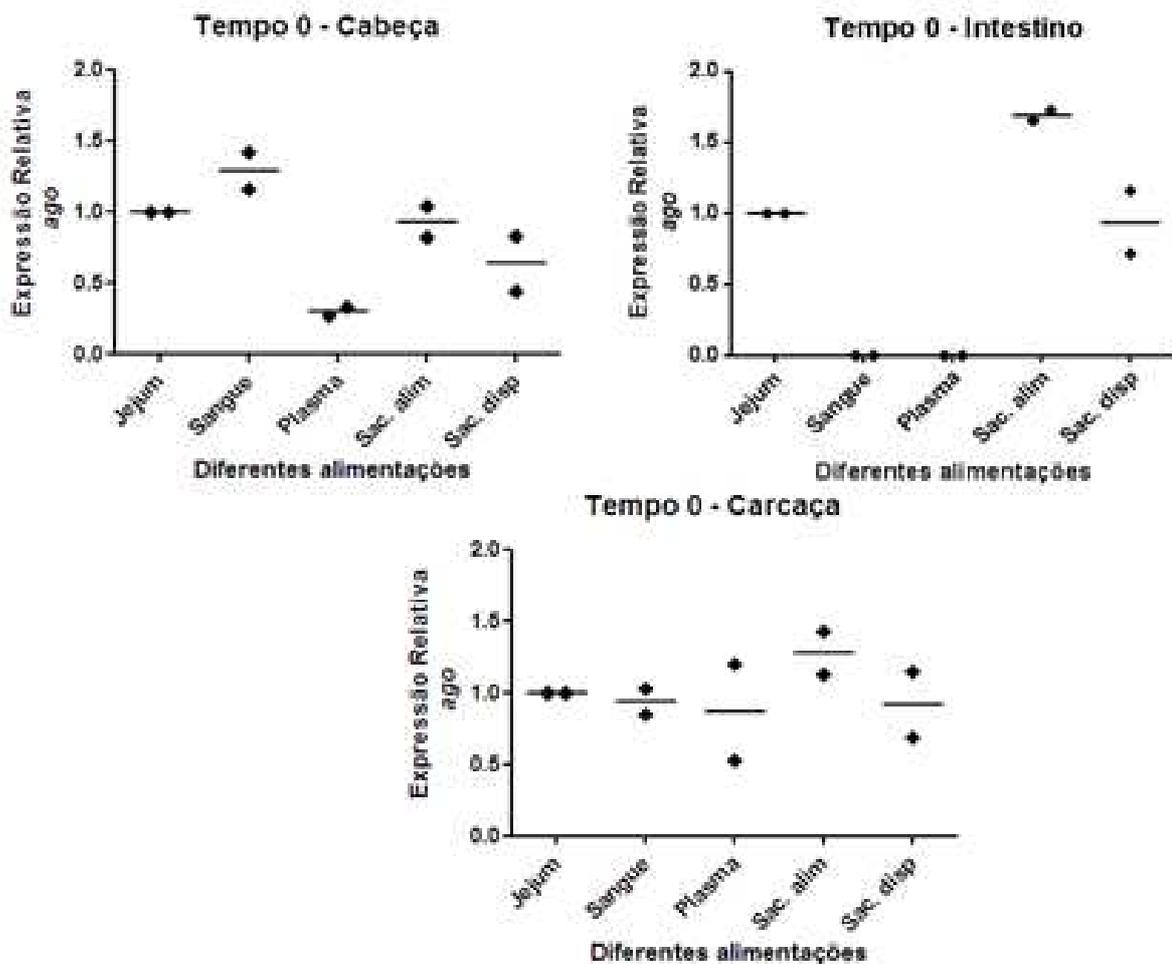
No intestino somente três condições foram analisadas – mosquitos em jejum, submetidos à alimentação com sacarose (alimentador artificial) e submetidos à alimentação com sacarose (disponível). Os níveis transcricionais de *dcr* mantiveram-se basais. Quando a carcaça é analisada, concluímos que os maiores níveis de expressão deram-se para os mosquitos alimentados com sangue e sacarose (alimentador); aqueles alimentados com plasma e sacarose (disponível) mantiveram os mesmos níveis de expressão de *dcr* (figura 17).

Ao analisar os níveis de mRNA de *ago* observamos na cabeça, perfil de expressão semelhante ao de *dcr* – parece que a expressão do gene é inibida quando os insetos são alimentados com plasma (figura 18). Um maior número de transcritos está presente em insetos alimentados com sangue. Enquanto no intestino a maior expressão de *ago* ocorreu em mosquitos alimentados com sacarose (alimentador), os insetos submetidos à alimentação com sacarose (disponível) permaneceram no nível basal de expressão. Na carcaça (expressão de *ago*) maior número de transcritos foi observado em mosquitos alimentados com sacarose (alimentador).



**Figura 17: Expressão relativa de *dcr* em cabeça, intestino e carcaça de *Aedes aegypti*, dissecados logo após ingerir diferentes alimentações.** O RNA total foi extraído de 20 fêmeas em jejum, alimentadas com sangue, plasma, sacarose (alimentador artificial) e sacarose (disponível) \*; as amostras foram utilizadas para a síntese de cDNA, e posteriormente foi realizada a qPCR. As variações da expressão de *dcr* nos tecidos foram baseadas no valor obtido no controle (jejum). A representação dos resultados foi obtida a partir das médias de 2 experimentos independentes. Os resultados dos dois experimentos estão mostrados (♦).

(\*) Níveis de expressão não foram detectados no intestino para os mosquitos alimentados com sangue e plasma.



**Figura 18: Expressão relativa de *ago* em cabeça, intestino e carcaça de *Aedes aegypti*, dissecados logo após ingerir diferentes alimentações.** O RNA total foi extraído de 20 fêmeas em jejum, alimentadas com sangue, plasma, sacarose (alimentador artificial) e sacarose (disponível) \*; as amostras foram utilizadas para a síntese de cDNA, e posteriormente foi realizada a qPCR. As variações da expressão de *ago* nos tecidos foram baseadas no valor obtido no controle (jejum). A representação dos resultados foi obtida a partir das médias de 2 experimentos independentes. Os resultados dos dois experimentos estão mostrados (♦).

(\*) Níveis de expressão não foram detectados no intestino para os mosquitos alimentados com sangue e plasma.

Considerando a diferença de distensão abdominal que pode ser causada quando os mosquitos são alimentados com sacarose em diferentes fontes (alimentador artificial/disponível), podemos sugerir que para ambos os genes houve maior expressão quando os insetos foram submetidos à maior distensão do abdome (sacarose no alimentador artificial).

## 6. DISCUSSÃO

As arboviroses são causadoras das mais graves doenças infecciosas humanas, como febres hemorrágicas e encefalites. Contudo, as infecções nos artrópodes, que são elos essenciais para transmissão do vírus, são persistentes e quase nunca são patogênicas. A resposta imune dos vertebrados tem sido estudada com objetivo de controlar as doenças através do desenvolvimento de vacinas, mas também pelo interesse no fato de que a imunopatologia desempenha importante papel no agravamento de doenças. Entretanto, a dinâmica epidemiológica envolve também o invertebrado, sendo este um aspecto menos estudado das arboviroses humanas. Conhecer a Biologia do vetor e sua dinâmica com o vírus é essencial para entender um aspecto importante da doença. Dentro dos diversos aspectos da resposta do inseto à presença do vírus, o RNAi tem se mostrado central para se entender a infecção persistente e a competência vetorial de populações de mosquitos (SANCHEZ-VARGAS, 2004; AMARAL, 2008; BLAIR, 2011; AMARAL E DANSA-PETRETSKI, 2012).

O equilíbrio dinâmico entre a resposta de defesa baseada na via de RNA de interferência e a capacidade do vírus burlar esse sistema para causar infecção é fundamental para o sucesso da transmissão do arbovírus. Nesse sentido conhecer o mecanismo de RNAi e seu papel como principal mecanismo de resposta imune inata de mosquito é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias de combate à dengue.

Pequenos RNAs não-codificantes foram descobertos como importantes contribuintes para a regulação gênica; e para exercerem suas funções biológicas necessitam de proteínas, dentre as quais estão Argonata e Dicer. Essas proteínas são essenciais para que a via de RNAi mantenha sua funcionalidade (FIRE *et al.*, 1998; HUTVAGNER e SIMARD, 2008; MCMANUS, 2004). Estes dois genes chaves foram os escolhidos para o estudo mostrado aqui.

A medida da expressão relativa dos dois genes foi realizada através da PCR quantitativa, também chamada de real time PCR, em *A. aegypti* em diferentes condições experimentais, de maneira a descrever o efeito de diferentes variáveis fisiológicas na expressão destes genes e, portanto, na funcionalidade da via de RNAi.

Primeiramente acompanhamos a variação de expressão de *dcr* e *ago* ao longo do ciclo de vida do inseto – desde o 1º estágio larval até a fase adulta. A expressão relativa dos genes mostrou perfis semelhantes, com exceção em L4 (expressão de *ago*). Para os transcritos de *ago* observamos que a partir do 1º estágio larval houve um progressivo aumento, que se manteve até o 4º estágio, período quando ocorreu maior expressão do gene. O perfil de expressão de *dcr* mostra que nesse mesmo período os níveis de transcritos variam, não havendo aumento progressivo. Porém para ambos os genes, em todas as fases, a expressão foi menor do que no controle (adulto); a exceção deu-se em L4 (expressão de *ago*). Para pupa, a expressão de *ago* foi semelhante à L1 e L2. Os níveis de mRNA de *dcr* no mesmo estágio mostrou que a expressão foi semelhante à L1, L4. A baixa expressão dos genes nas fases de larva sugere uma maior permissividade destas fases à infecção viral e indica que a transmissão transovariana (vertical), quando ocorrer, encontrará um ambiente propício para a persistência nestas fases do ciclo de vida do vetor, até atingir a fase adulta.

A transmissão vertical pode fornecer mecanismos para entender como o vírus persiste na natureza na ausência de hospedeiros vertebrados não imunes, ou quando as condições ambientais não são favoráveis à sua sobrevivência (ROSEN *et al*, 1983). Guedes e colaboradores (2010) detectaram a presença de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 em ovos de *A. aegypti* coletados em Recife (PE); a transmissão transovariana ocorreu em uma taxa inferior à transmissão horizontal. Martins e colaboradores (2012) registraram transmissão vertical de DENV-2 e DENV-3 em *A. aegypti* e *Aedes albopictus* coletados em Fortaleza. O papel epidemiológico deste tipo de transmissão é de grande importância, pois atua como um mecanismo de manutenção do vírus na natureza durante os períodos interepidêmicos.

As larvas de *A. aegypti* vivem na água, onde se alimentam, e vão à superfície para respirar. Alimentam-se de partículas orgânicas dissolvidas na água e não resistem a longos períodos sem alimentação. Após o 4º estágio transformam-se em pupas, fase em que não se alimentam; utilizam a energia armazenada na fase larvária. Após 2 ou 3 dias emerge o adulto. Nessa fase, alimenta-se de sangue, fonte de proteína, ou seiva vegetal, fonte de carboidrato para os processos metabólicos (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SANTA CATARINA, 2008).

Pelo fato da larva alimentar-se de matéria orgânica e estar em contato maior com microrganismos, supomos que, ao ser comparada com a pupa (que não se alimenta), apresente maiores níveis de transcritos tanto de *dcr* como de *ago*. Esse perfil não é observado em todos os estádios de larva, para os dois genes – L1 e L4 apresentam maior expressão de *dcr*; L2, L3 e L4 apresentam maior expressão de *ago*, quando comparados com pupa.

Após analisarmos a expressão dos genes nas fases de vida do mosquito, testamos a hipótese de que diferentes tecidos de fêmeas de *A. aegypti* apresentem variação dos níveis de transcritos de *dcr* e *ago*, quando submetidos a diferentes dietas. Sabe-se que estas duas variáveis e suas características, são determinantes da dinâmica de infecção viral e, conseqüentemente da competência vetorial.

Processos bioquímicos e fisiológicos que resultam na digestão de polímeros de nutrientes no intestino médio de insetos são organizados espacial e temporalmente. Essa separação espacial e temporal é resultado de características morfo-fisiológicas do trato intestinal, associada ao fluxo de fluidos no intestino (TERRA *et al.*, 1996). O conhecimento do funcionamento de todo processo de digestão de nutrientes é importante para o entendimento das vias metabólicas dos insetos, possibilitando correlação entre essas vias e o alimento ingerido. O conhecimento do processo de digestão possibilita, por sua vez, uma melhor compreensão do processo de interação de patógenos e seus vetores.

A maioria das espécies de mosquitos alimenta-se obrigatoriamente de sangue, pois essa fonte alimentar contém nutrientes necessários para a produção de ovos. A anautogenia (necessidade da fêmea alimentar-se de sangue de um vertebrado antes da oviposição) é observada em vários vetores de agentes patogênicos contidos no sangue, causadores de doenças humanas, incluindo *A. aegypti* e *Anopheles gambiae* (TELANG *et al.*, 2013). Durante as primeiras horas após a alimentação com sangue, o mosquito *Anopheles gambiae* sofre alterações fisiológicas e hormonais importantes. A alimentação sanguínea estimula, por exemplo, a atividade proteolítica no intestino médio, fazendo com que cerca de 80% das proteínas sejam digeridas em um dia, nesta espécie (DANA *et al.*, 2005). Fêmeas de *Aedes aegypti* alimentadas com sangue são menos suscetíveis à infecção pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* do que fêmeas

alimentadas com sacarose; o sangue aumenta a longevidade das fêmeas, considerando que quando alimentadas com sangue, apresentam menor suscetibilidade ao fungo (PAULA *et al.*, 2011).

Tem sido demonstrado que a molécula de heme (ou ferro-protoporfirina IX) um dos produtos da digestão do sangue, pode atuar como modulador da expressão gênica em vários sistemas (*Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodnius prolixus*, *Haemophilus influenzae*) (GUARENTE e MASON, 1983; MURY *et al.*, 2009; SAKAINO *et al.*, 2009; WHITBY *et al.*, 2009; WHITBY *et al.*, 2013). Por este motivo, no presente trabalho, testamos a hipótese de que, também em mosquitos, o heme ou algum outro fator nutricional, module a expressão dos genes da via do RNAi. A lógica é que a via oral é a principal forma de infecção viral nestes insetos e, conseqüentemente, a mais importante em termos de transmissão. Assim, os insetos foram submetidos a diferentes alimentações: sangue, plasma e sacarose. Quando mosquitos da linhagem Rockefeller foram alimentados com sangue, diferenças importantes são observadas. A análise da expressão de *dcr* mostra que no intestino não houve aumento significativo da expressão; no entanto, na análise da expressão de *ago* observa-se que esse padrão dá-se tanto na cabeça quanto no intestino (de um modo geral não houve diferença significativa). Pode ser que antes do 4º dpa haja um pico de expressão do gene, visto que no intestino não houve pico. Um maior número de transcritos de *dcr* foi observado na cabeça e na carcaça, ambos no 4º dpa. Para os transcritos de *ago*, observamos que a maior expressão deu-se na carcaça, também no 4º dpa. O fato de a cabeça apresentar alto nível de expressão de *dcr*, faz-nos propor que o mecanismo de RNAi no mosquito é efetivo no 4º dpa, visto que este é o último tecido que DENV atinge antes de ser transmitido ao ser humano.

O mesmo perfil não é observado para a expressão do outro gene chave da via de RNAi, pois não há pico de expressão de *ago* na cabeça; pelo contrário, neste tecido a expressão mantém o nível basal para todos os dias após a alimentação (no 1º dia ocorre repressão da expressão); maiores níveis de mRNA são observados na carcaça.

Durante a infecção, DENV instala-se no epitélio intestinal, onde se replica e então, dissemina-se nos outros órgãos (carcaça), até chegar às glândulas salivares

(cabeça) (BLACK *et al.*, 2002). Assim, podemos sugerir que, de acordo com nossos dados, no 4<sup>o</sup> dpa é quando os mosquitos encontram-se melhor preparados para combater uma possível infecção, visto que nesse período ocorre maior expressão de *dcr* em todos os tecidos analisados (no intestino o aumento é muito pequeno), e para *ago* esse aumento é observado principalmente na carcaça. Ou seja, havendo maior número de transcritos de um dos genes-chave da via, supomos que o mosquito esteja mais refratário à infecção no 4<sup>o</sup> dpa, pois quanto maior o número de transcritos, maior a efetividade da via de RNAi e conseqüentemente, maior destruição viral ocorrerá. Isto significa que, para que a infecção tenha sucesso, o vírus precisa ser efetivo nos dias que antecedem o pico de resposta antiviral, no intestino, ou seja, em fases iniciais da digestão ou tenha mecanismos de inibir este processo para impedir o progresso da infecção no vetor. Ser capaz de ultrapassar esta linha de defesa pode ser fundamental para a persistência do vírus durante a transmissão vertical, até o mosquito atingir a fase adulta.

Estudos mostram que a indução da expressão de genes pode ocorrer quando insetos são alimentados com sangue. Müller e colaboradores (1993) mostraram que a transcrição dos genes *Antryp1* e *Antryp2* (membros da família das tripsinas) em *Anopheles gambiae* é induzida pela alimentação sanguínea. Embora a expressão de ambos os genes seja induzida pela alimentação sanguínea, o controle da transcrição dos mesmos parece ser diferente: a quantidade de mRNA de *Antryp1* foi sempre menor do que de *Antryp2*. Ramalho-Ortigão e colaboradores (2007) identificaram transcritos de alguns genes no intestino médio de flebotomíneos alimentados com sangue. Os seguintes genes se expressaram somente após a alimentação sanguínea dos insetos: *PpMVP1*, *PpMVP2* e *PpMVP3* (proteínas associadas às microvilosidades); *PpPer I* (peritrofina); *Pp Tryp4* (tripsina); *PpChym2* (quimotripsina) e duas proteínas desconhecidas.

A *aegyptina* é uma importante proteína salivar secretada por *Aedes aegypti*. Chagas e colaboradores (2014) concluíram que vários componentes salivares trabalham em parceria para que seja alcançado o máximo de eficiência na alimentação sanguínea. A glândula salivar de mosquito tem um papel importante na alimentação sanguínea e transmissão de patógenos. Porém a importância biológica dos diversos componentes salivares ainda não foi completamente determinada.

Em nossos ensaios o controle transcricional dos 2 genes parece ser diferente: ora a expressão de *dcr* é mais alta do que a de *ago*, ora o oposto ocorre. Apesar de não ser observado o mesmo perfil para os dois genes e para todos os tecidos, ao longo dos dias após alimentação, cabeça e intestino (*ago*) apresentaram praticamente em todos os períodos, níveis de expressão menores ou semelhantes ao controle. Esses resultados indicam que na cabeça e intestino não houve modulação de expressão de *ago* pela alimentação com sangue. Como houve aumento dos níveis de transcritos do gene na carcaça, nos dias após alimentação, parece que a alimentação sanguínea induz a expressão desses genes, mediada por componentes da dieta ou como consequência do reflexo de distensão abdominal. Aumento dos níveis de transcritos de *dcr* ocorreu na cabeça (em 4 e 7 dpa) e carcaça (em 1, 4 e 7 dpa).

Os mosquitos alimentados com plasma apresentaram níveis de mRNA de *dcr* e *ago* variáveis entre os tecidos (figura 13). O número de transcritos de *dcr* mantiveram-se semelhantes entre cabeça, intestino e carcaça. Em algumas amostras não houve indução de *dcr* pela alimentação com plasma – cabeça (1<sup>o</sup> dpa); intestino (7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dpa); carcaça (1<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dpa). O perfil de expressão de *ago* mostrou poucos períodos em que houve indução do gene a partir da alimentação com plasma – cabeça (1<sup>o</sup> dpa); carcaça (1<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> dpa). Na cabeça foi onde ocorreu maior modulação de *dcr* e na carcaça maior modulação de *ago*.

Amaral (2008) mostrou diferenças no número de transcritos de *ago* em diferentes populações de *A. aegypti* alimentados com plasma. A análise deu-se a partir de amostras do mosquito inteiro, o que pode mascarar informações importantes sobre a dinâmica da infecção e sobre a eficiência do sistema como defesa antiviral. O trabalho mostra que em mosquitos da linhagem Rockefeller houve aumento da expressão de *ago* 24h após alimentação; enquanto na população natural de Nova Venécia houve aumento gradativo de 12h até 48h após alimentação; na população natural de Vila Velha ocorreu um pequeno aumento 24h após a alimentação. Estas diferenças intrínsecas ao mosquito podem explicar ou contribuir para a determinação de populações suscetíveis ou refratárias ao vírus em populações naturais de *A. aegypti*.

Pode ser que em nossos experimentos tenha havido maior expressão de *dcr* e *ago* no intestino em períodos anteriores ao 4º dpa (pico de expressão de *dcr* ocorreu nesse dia). Para as amostras de intestino de insetos dissecados no 1º dpa com plasma, níveis de expressão de *dcr* e *ago* não foram detectados.

Após a alimentação dos mosquitos com sacarose, o perfil transcricional de *dcr* e *ago* manteve-se semelhante na carcaça – em todos os períodos, a alimentação com solução de sacarose não foi capaz de induzir a expressão dos genes, que se manteve inferior a dos insetos em jejum. Para o intestino, o perfil de expressão de *ago* foi semelhante. Para os dois genes, a expressão na cabeça foi maior indicando, presumidamente, maior eficiência da via de RNAi.

Fernández e Forattini (2003) analisaram duas populações naturais de *Aedes albopictus* ao serem alimentadas com sacarose e com sangue. As fêmeas alimentadas com solução açucarada mostraram maior expectativa de vida. Foster (1995) discute que a importância do açúcar na vida do mosquito parece ter evoluído distintamente em diferentes espécies – fêmeas de algumas espécies evoluíram independentemente, mas a maior parte necessita de sangue para desenvolver os ovos e açúcar para sobreviver, voar e melhorar a reprodução.

No último ensaio do presente trabalho, buscamos relacionar os níveis transcricionais de *dcr* e *ago* com os tecidos dissecados imediatamente após a alimentação, e observamos que houve inibição dos genes para algumas condições e indução para outras. Parece que na cabeça não há bom funcionamento da via de RNAi assim que o mosquito é alimentado nas quatro situações (exceto sangue, que apresentou leve aumento da expressão dos dois genes). A análise de nível de mRNA de *dcr* mostra que na carcaça houve aumento da expressão do gene para todas as alimentações oferecidas, enquanto que para *ago* essa modulação só aconteceu quando os mosquitos foram alimentadas com sacarose (alimentador). Parece que na cabeça a expressão de *dcr* é inibida quando os insetos são alimentados com plasma. Para as amostras de intestino de insetos alimentados com sangue e plasma, níveis de expressão de *dcr* e *ago* não foram detectados. A análise da expressão dos genes no intestino é muito importante porque pode indicar se uma população de mosquitos tem ou não a capacidade de vetorializar DENV, pois é neste tecido que primeiramente o vírus se instala. Embora tenha sido vista modulação dos

genes logo após os mosquitos receberem as dietas, o maior número de mRNA (*dcr*) obtido foi 2 vezes maior do que o controle.

Quanto à diferença de expressão dos genes em mosquitos alimentados com sacarose disponível na gaiola ou no alimentador, podemos observar que não foi mantido um padrão. A única amostra em que o número de transcritos (*dcr*) foi semelhante para as duas condições foi da cabeça. Apenas no intestino (*dcr*) de mosquitos que obtiveram sacarose disponível houve maior expressão do que em mosquitos que obtiveram sacarose por meio do alimentador. Nos outros tecidos, para os dois genes, maiores níveis de mRNA foram obtidos quando os insetos se alimentaram de sacarose através do alimentador artificial. Com base na análise do intestino podemos propor que maior distensão abdominal proveniente da alimentação no alimentador artificial, não é capaz de promover a modulação de *dcr*; porém há a indução da expressão do gene *ago*.

Alguns trabalhos mostram que a distensão do abdome em insetos pode desencadear processos que participam de vias metabólicas diversas. Os processos de alimentação sanguínea e distensão do abdome iniciam uma série de processos fisiológicos associados com a digestão e início do desenvolvimento dos ovos (BEERNTSEN *et al.*, 2000). Albuquerque-Cunha e colaboradores (2004) mostraram que a formação das membranas perimicrovilares (PMM, do inglês *perimicrovillar membrane*) em *Rhodnius prolixus* depende da distensão abdominal e componentes presentes no sangue, resultando na liberação de hormônio protoracicotrópico e produção de ecdisona. Os autores concluíram que a produção de PMM não foi regulada pela distensão do abdome do inseto.

De acordo com nossas análises, os três tipos de dietas oferecidas aos mosquitos – sangue, plasma e sacarose – induziram diferentes perfis de expressão de *dcr* e *ago*. Houve algumas semelhanças, mas ainda assim observamos que os perfis de expressão dos dois genes apresentaram diferenças quando comparamos os tecidos e períodos após a alimentação, com cada dieta oferecida. As três dietas oferecidas aos mosquitos modularam diferentemente a expressão dos dois genes, nos três tecidos analisados. A expressão dos genes da via do RNAi pode gerar subsídios para se entender a suscetibilidade do vetor ao vírus.

## 7. CONCLUSÕES

- O perfil de variação da expressão dos genes *dcr* e *ago* nos estádios larvais foi semelhante, sugerindo que esses genes podem ser controlados coordenadamente.
- O intestino não apresentou alteração da expressão de *ago* quando os mosquitos foram submetidos à alimentação com sangue; entretanto, cabeça e carcaça mostraram modulação de expressão de *dcr* – ambos os tecidos apresentando pico de expressão no dia 4 após a alimentação. Como intestino é o primeiro tecido a entrar em contato com o sangue e, conseqüentemente, com o vírus, é possível que a expressão dos genes tenha um ápice em momentos anteriores não detectados por nós, ou, simplesmente que a baixa expressão no intestino faça deste tecido um tecido permissivo ao vírus.
- A indução dos genes varia entre os tecidos também para mosquitos alimentados com plasma, mas o padrão de modulação é diferente para cada tecido.
- Quando alimentados com sacarose, os mosquitos apresentaram maior eficiência da via de RNAi na cabeça, tecido onde houve maior expressão dos genes.
- Maior distensão abdominal ou fatores de resposta rápida, provenientes da alimentação, não foram capazes de promover a modulação de *dcr* ou *ago* de forma tão eficiente quanto a resposta observada em tempos maiores, sugerindo uma ação a médio prazo, provavelmente controlada via componentes da dieta.

## 8. REFERÊNCIAS

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431:350-355, 2004

AGAISSE, H., PERRIMON, N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological Reviews*, 1(98):72-82, 2004.

AGRAWAL, N., DASARADHI, P. V. N., MOHMMED, A., MALHOTRA, P., BHATNAGAR, R.K., MUKHERJEE, S.K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4):657-685, 2003.

ALBUQUERQUE-CUNHA, J.M., MELLO, C.B., GARCIA, E.S., AZAMBUJA, P., SOUZA, W., GONZALEZ, M.S., NOGUEIRA, N.F.S. Effect of blood components, abdominal distension, and ecdysone therapy on the ultrastructural organization of posterior midgut epithelial cells and perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(8):815-822, 2004.

AMARAL, R.J.V. *Expressão do gene argonauta em populações naturais de Aedes aegypti e sua relação com a resposta à infecção viral mediada por RNA*. 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

AMARAL, R.J.V.; DANSA-PETRETSKI, M.A. Interação Patógeno-Vetor: Dengue. In: INCT – Entomologia Molecular. *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. 2012. 1-35.

AVADHANULA, V., WEASNER, B.P., HARDY, G.G., KUMAR, J.P., HARDY, R.W. A novel system for the launch of *Alphavirus* RNA synthesis reveals a role for the Imd pathway in arthropod antiviral response. *PLoS Pathogens*, 5(9):1-12, 2009.

BAI, H., RAMASESHADRI, P., PALLI, S. R. Identification and characterization of juvenile hormone esterase gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(8) 829-837, 2007.

BARATA, E.A.M.F., COSTA, A.I.P., NETO, F.C., GLASSER, C.M., BARATA, J.M.S., NATAL, D. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 35(3):237-242, 2001.

BARTH, O.M. *Atlas of Dengue Viruses Morphology and Morphogenesis*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2000. 126 p.

BAULCOMBE, D. RNAi silencing in plants. *Nature*, 431:356-363, 2004.

BERNSTEIN, E., CAUDY, A.A., HAMMOND, S.M., HANNON, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409:363-366, 2001.

BEERNTSEN, B.T., JAMES, A.A., CHRISTENSEN, B.M. Genetics of Mosquito Vector Competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1):115-137, 2000.

BLACK, W.C., BENNETT, K.E., GORROCHÓTEGUI-ESCALANTE, N., BARILLAS-MURY, C.V., FERNÁNDEZ-SALAS, I., MUÑOZ, M.L., FARFÁN-ALÉ, J., OLSON, K.E., BEATY, B.J. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research*, 33:379-388, 2002.

BLAIR, C.D. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiology*, 6(3):265-277, 2011.

BOSHER, J.M.; LABOUESSE, M. RNAi interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nature Cell Biology*, 2:31-36, 2000.

BOSIO, C.F., BEATY, B.J., BLACK, W.C. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59:965–970, 1998.

BRONKHORST, A.W. e RIJ, R.P.V. The long and short of antiviral defense: small RNA-based immunity in insects. *Current Opinion in Virology*, 7:19-28, 2014.

BULET, P., HETRU, C., DIMARCQ, J.L., HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*, 23:329-344, 1999.

BURKE, J.M., KELENIS, D.P., KINCAID, R.P., SULLIVAN, C.S. A central role for the primary microRNA stem in guiding the position and efficiency of Drosha processing of a viral pri-miRNA. *RNA*, 20(7):1-10, 2014.

CAMERON, P. S., FARRAR, J.J., CHAU, N.V.V., WILLS, B. Current concepts: Dengue. *The New England Journal of Medicine*, 366:1423-1432, 2012.

CAMPBELL, C.L., KEENE, K.M., BRACKNEY, D.E., OLSON, K.E.O., BLAIR, C.D., WILUSZ, J., FOY, B.D. *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. *BMC Microbiology*, 8:47, 2008.

CARTHEW, R.W.; SONTHEIMER, E.J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4):642-655, 2009.

CARVALHO-LEANDRO, D., AYRES, C.F.J., GUEDES, D.R.D., SUESDEK, L., MELO-SANTOS, M.A.V., OLIVEIRA, C.F., CORDEIRO, M.T., REGIS, L.N., MARQUES, E.T., GIL, L.H., MAGALHÃES, T. Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. *Acta Tropica*, 124(2):113-119, 2012.

CHAGAS, A.C., RAMIREZ, J.L., JASINSKIENE, N., JAMES, A.A., RIBEIRO, J.M.C., MARINOTTI, O., CALVO, E. Collagen-binding protein, Aegyptin, regulates probing time and blood feeding success in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(19):6946-6951, 2014.

CHRISTOPHIDES, G.K., VLACHOU, D., KAFATOS, F.C. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunological Reviews*, 198:127-148, 2004.

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

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994, 225 p.

COX, J., BROWN, H.E., RICO-HESSE, R. Variation in vector competence for Dengue viruses does not depend on mosquito midgut binding affinity. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 5(5):1172, 2011.

DANA, A.N., HOUNG, Y.S., KERN, M.K., HILLENMEYER, M.E., HARKER, B.W., LOBO, N.F., HOGAN, J.R., ROMANS, P., COLLINS, F.H. Gene expression patterns associated with blood-feeding in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, 6:1-24, 2005.

DICK, O.B., MARTÍN, J.L.S., MONTOYA, R.H., DIEGO, J., ZAMBRANO, B., DAYAN, G.H. Review: the history of dengue outbreaks in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4): 584-593, 2012.

DOSTERT, C., JOUANGUY, E., IRVING, P., TROXLER, L., GALIANA-ARNOUX, D., HETRU, C., HOFFMANN, J.A., IMLER, J-L. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nature Immunology*, 6(9):946-953, 2005.

DRINNENBERG, I.A., WEINBERG, D.E., XIE, K.T., MOWER, J.P., WOLFE, K.H., FINK, G.R., BARTEL, D.P. RNAi in budding yeast. *Science*, 326(5952):544-550, 2009.

DYKXHOORN, D.M., NOVINA, C.D., SHARP, P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature*, 4:457-467, 2003.

ELDRIDGE, B.F. Mosquitoes, the Culicidae. In: MARQUARDT, W.C. *Biology of Disease Vectors*. Califórnia: Academic Press. 2 ed, 2004. 95-112.

ELROD-ERICKSON, M., MISHRA, S., SCHNEIDER, D. Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Current Biology*, 10(13):781-784, 2000.

FARAZI, T.A., JURANEK, S.A., TUSCHL, T. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development*, 135(7):1201-1214, 2008.

FEINBERG, E.H.; HUNTER, C.P. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, 301:1545-1547, 2003.

FERNÁNDEZ, Z.; FORATTINI, O.P. Sobrevivência de populações de *Aedes albopictus*: idade fisiológica e idade reprodutiva. *Revista de Saúde Pública*, 37(3):285-291, 2003.

FERNÁNDEZ, M.C.M., JEAN, Y.S.J., CALLABA, C.A.F., LÓPEZ, L.S. The first report of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in Haiti. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(2):279-281, 2012.

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

FOLCO, H.D., PIDOUX, A.L., URANO, T., ALLSHIRE, R.C. Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science*, 319(5859):94-97, 2008.

FÖRSTEMANN, K., TOMARI, Y., DU, T., VAGIN, V.V., DENLI, A.M., BRATU, D.P., KLATTENHOFF, C., THEURKAUF, W.E., ZAMORE, P.D. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biology*, 3(7):1187-1201, 2005.

FOSTER, W.A. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annual Review of Entomology*, 40:443-474, 1995.

FRANC, N.C.; WHITE, K. Innate recognition systems in insect immunity and development: new approaches in *Drosophila*. *Microbes and Infection*, 2:243-250, 2000.

FRANÇA, N.R., JÚNIOR, D.M., LIMA, A.B., CABRAL, F.V., ANDRADE, L.E.C., SILVA, N.P. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 50(6):697-709, 2010.

FRANZ, A.W.E., Sanchez-Vargas, I., ADELMAN, Z.N., BLAIR, C.D., BEATY, B.J., JAMES, A.A., OLSON, K.E. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(11):4198-4203, 2006.

GELEY, S.; MÜLLER, C. RNAi: ancient mechanism with a promising future. *Experimental Gerontology*, 39:985-998, 2004.

GOLDEN, D.E., GERBASI, V.R., SONTHEIMER, E.J. An inside job for siRNAs. *Molecular Cell*, 31(3):309-312, 2008.

GUARENTE, L.; MASON, T. Heme regulates transcription of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell*, 32:1279-1286, 1983.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3):480-496, 1998.

GUBLER, D.J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology*, 10(2):100-103, 2002.

GUBLER, D.J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease*, 27:319-330, 2004.

GÜNTHER, J., MARTÍNEZ-MUÑOZ, J.P., PÉREZ-ISHIWARA, D.G., SALAS-BENITO, J. Evidence of vertical transmission of Dengue virus in two endemic localities in the State of Oaxaca, Mexico. *Intervirology*, 50:347-352, 2007.

GUEDES, D.R.D., CORDEIRO, M.T., MELO-SANTOS, M.A.V., MAGALHÃES, T., MARQUES, E., REGIS, L., FURTADO, A.F., AYRES, C.F.J. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. *Journal of Vector Borne Disease*, 47, 67-75, 2010.

GUEDES, D.R.D. *Análise da competência vetorial para o vírus Dengue em populações naturais de Aedes aegypti e Aedes albopictus de Pernambuco*. 2012. 75 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco.

GULERIA, P., MAHAJAN, M., BHARDWAJ, J. YADAV, S.K. Plant small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 9(9):183-199, 2011.

HAASNOOT, J., CUPAC, D., BERKHOUT, B. Inhibition of virus replication by RNA interference. *Journal of Biomedical Science*, 10:607-616, 2003.

HAN, J., LEE, Y., YEOM, K-H., KIM, Y-K., JIN, H., KIM, V.N. The Drosha–DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes and Development*, 18:3016-3027, 2004.

HARDY, J.L., HOUK, E.J., KRAMER, L.D., REEVES, W.C. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual Review of Entomology*, 28:229-262, 1983.

HIGGS, S. e BEATY, B.J. Rearing and containment of mosquito vectors. In: BEATY, B.J. & MARQUARDT, W.C. *The Biology of Disease Vectors*. Colorado: University Press of Colorado, 1996. 595-604.

HIGGS, S e BEATY, B.J. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: MARQUARDT, W.C. *Biology of Disease Vectors*. Califórnia: Academic Press. 2 ed, 2004. 167-185.

HUTVAGNER, G.; SIMARD, M.J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature*, 9:22-32, 2008.

JONES, S.W., SOUZA, P.M., LINDSAY, M.A. siRNA for gene silencing: a route to drug target discovery. *Current Opinion in Pharmacology*, 4:522-527, 2004.

KIM, V.N. Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes. *Genes and Development*, 20:1993-1997, 2006.

KOH B.K.W., Ching, L.N, KITA, Y., TANG, C.S., ANG, L.W., WONG, K.Y., JAMES, L., GOH, K.T. The 2005 dengue epidemic in Singapore: epidemiology, prevention and control. *Annals Academy of Medicine*, 37:538-545, 2008.

KUNO, G.; CHANG, G.J. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4):608-637, 2005.

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

LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J-M., HOFFMANN, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86:973-983, 1996.

LIPPMAN, Z.; MARTIENSSEN, R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*, 431:364-370, 2004.

LIU, Q., RAND, T.A., KALIDAS, S., DU, F., KIM, H-E., SMITH, D.P., WANG, X. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*, 301:1921-1925, 2003.

LUNA, C., HOA, N. T., ZHANG, J., KANZOK, S. M., BROWN, S.E., IMLER, J.-L., KNUDSON, D. L., ZHENG, L. Characterization of three Toll-like genes from mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 12(1):67-74, 2003.

LUPLERTLOP, N., SURASOMBATPATTANA, P., PATRAMOOL, S., DUMAS, E., WASINPIYAMONGKOL, L., SAUNE, L., HAMEL, R., BERNARD, E., SERENO, D., THOMAS, F., PIQUEMAL, D., YSSEL, H., BRIANT, L., MISSÉ, D. Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following infection with Dengue virus. *PLoS Pathogens*, 7(1):1-15, 2011.

MA, L., JONES, C.T., GROESCH, T.D., KUHN, R.J., POST, C.B. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10):3414-3419, 2004.

MAHMOOD, S.A.I. Dengue: an epidemic is largely a failure in public health administration! The role of Dhaka City Corporation, DCC of Bangladesh. *World Healthy and Population*, 2006.

MARTINS, V.E.P., ALENCAR, C.H., KAMIMURA, M.T., ARAÚJO, F.M.C., SIMONE, S.G., DUTRA, R.F., GUEDES, M.I.F. Occurrence of natural vertical transmission of Dengue-2 and Dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. *PLoS One*, 7(7):1-9, 2012.

MCMANUS, M.T. Small RNAs and immunity. *Immunity*, 21:747-756, 2004.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431:343-349, 2004.

MERCADO-CURIEL, R.F., BLACK IV, W.C., MUÑOZ, M.L. A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiology*, 8:118, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Plano Nacional de Saúde (PNS)*, Secretaria-Executiva. Brasília, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Boletim epidemiológico*, 45(3):1-4. Brasília, 2014.

MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D., HARRISON, S.C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12):6986-6991, 2003.

MÜLLER, H-M., CRAMPTON, J.M., TORRE, A.D., SINDEN, R., CRISANTI, A. Members of a trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. *The EMBO Journal*, 12(7):2891-2900, 1993.

MURY, F.B., SILVA, J.R., FERREIRA, L.S., FERREIRA, B.S., SOUZA-FILHO, G.A., SOUZA-NETO, J.A., RIBOLLA, P.E.M., SILVA, C.P., NASCIMENTO, V.V., MACHADO, O.L.T., BERBERT-MOLINA, M.A., DANSA-PETRETSKI, M. Alpha-Glucosidase promotes hemozoin formation in a blood-sucking bug: an evolutionary history. *PLoS One*, 4(9):1-10, 2009.

NAPOLI, C., LEMIEUX, C., JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *The Plant Cell*, 2:279-289, 1990.

NOGUEIRA, R.M.R., MIAGOSTOVICH, M.P., FILIPPIS, A.M.B., PEREIRA, M.A.S., SCHATZMAYR, H.G. Dengue vírus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(7):925-926, 2001.

NOGUEIRA, R.M.R.; EPPINGHAUS, A.L.F. *Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(3):255-256, 2011.

NOVINA, C.D.; SHARP, P.A. The RNAi Revolution. *Nature*, 430(8):161-164, 2004.

OKAMURA, K., ISHIZUKA, A., SIOMI, H., SIOMI, M.C. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes and Development*, 18:1655-1666, 2004.

OLSON, K.E., ADELMAN, Z.N., TRAVANTY, E.A., SANCHEZ-VARGAS, I., BEATY, B.J., BLAIR, C.D. Developing arbovirus resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32:1333-1343, 2002.

ORFANÓ, A.S. *Avaliação do papel da microbiota intestinal do Aedes aegypti no desenvolvimento esporogônico do Plasmodium gallinaceum*. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte.

PARKER, G.S., ECKERT, D.M., BASS, B.L. RDE-4 preferentially binds long dsRNA and its dimerization is necessary for cleavage of dsRNA to siRNA. *RNA*, 12:807-818, 2006.

PAULA, A.R., CAROLINO, A.T., SILVA, C.P., SAMUELS, R.I. Susceptibility of adult female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is modified following blood feeding. *Parasites and Vectors*, 4(91):1-7, 2011.

PETRIE, V.J., WUITSCHICK, J.D., GIVENS, C.D., KOSINSKI, A.M., PARTRIDGE, J.F. RNA interference (RNAi)-dependent and RNAi-independent association of the Chp1 Chromodomain protein with distinct heterochromatic *loci* in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 25(6):2331-2346, 2005.

PI-CHUN, L., MEI-YING, L., PING-CHANG, C., JIAN-JONG, L., I-JU, L., CHIEN-YU, C., YI-LING, L., GWONG-JEN, J.C., HAN-CHUNG, W. Development of a humanized antibody with high therapeutic potential against Dengue virus type 2. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 6(5):1636, 2012.

PIERSON T.C., FREMONT D.H., KUHN, R.J., DIAMOND, M.S. Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of Flavivirus infection: implications for vaccine development. *Cell Host & Microbe*, 4:229-238, 2008.

PUIG-BASAGOITI, F., TILGNER, M., FORSHEY, B.M., PHILPOTT, S.M., ESPINA, N.G., WENTWORTH, D.E., GOEBEL, S.J., MASTER, P.S., FALGOUT, B., REN, P., FERGUSON, D.M., SHI, P.Y. Triaryl Pyrazoline compound inhibits Flavivirus RNA replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:1320–1329, 2006.

RAHARIMALALA, F.N., RAVAOMANARIVO, L.H., RAVELONANDRO, P., RAFARASOA, L.S., ZOUACHE, K., TRAN-VAN, V., MOUSSON, L., FAILLOUX, A.B., HELLARD, E., MORO, C.V., RALISOA, B.O., MAVINGUI, P. Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. *Parasites and Vectors*, 5(56), 2012.

RAMALHO-ORTIGÃO, M., JOCHIM, R.C., ANDERSON, J.M., LAWYER, P.G., PHAM, V-M., KAMHAWI, S., VALENZUELA, J.G. Exploring the midgut transcriptome of *Phlebotomus papatasi*: comparative analysis of expression profiles of sugar-fed, blood-fed and *Leishmania* major-infected sandflies. *BMC Genomics*, 8(300):1-17, 2007.

ROSEN, L., SHROYER, D.A., TESH, R.B., FREIER, J.E., LIEN, J.C. Transovarial transmission of Dengue viruses by mosquitoes: *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *The American Journal of Tropical Medicine and hygiene*, 32(5):1108-1119, 1983.

SAKAINO, M., KATAOKA, T., TAKETANI, S.T. Post-transcriptional regulation of the expression of Ferrochelatase by its variant mRNA. *The Journal of Biochemistry*, 145(6):733-738, 2009.

SALAZAR, M.I., RICHARDSON, J.H., SÁNCHEZ-VARGAS, I., OLSON, K.E., BEATY, B.J. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology*, 7(9), 2007.

SANCHEZ-VARGAS, I., TRAVANTY, E.A., KEENE, K.M., FRANZ, A.W.E., BEATY, B.J., BLAIR, C.D., OLSON, K.E. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus Research*, 110:65-74, 2004.

SÁNCHEZ-VARGAS, I., SCOTT, J.C., POOLE-SMITH B.K., FRANZ, A.W.E., BARBOSA-SOLOMIEU, V., WILUSZ, J., OLSON, K.E., BLAIR, C.D. Dengue Virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathogens*, 5(2):1-11, 2009.

SCHATZMAYR, H.G., NOGUEIRA, R.M.R., ROSA, A.P.A.T. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81(2):245-246, 1986.

SCHATZMAYR, H.G.; CABRAL, M.C. *A Virologia no Estado do Rio de Janeiro – Uma Visão Global*. 2 ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2012. 175 p.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SANTA CATARINA. Superintendência de Vigilância em Saúde, *Diretoria de Vigilância Epidemiológica*. Santa Catarina, 2008. 73 p.

SOUZA-NETO, J.A., SIM, S., DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(42):17841-17846, 2009.

STRAUSS, J.H.; STRAUSS, E.G. *Viruses and Human Disease*. San Diego: Academic Press, 2002, 383 p. 87-122.

SUNKAR, R., ZHU, J-K. Micro RNAs and short-interfering RNAs in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(6):817-826, 2007.

TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 18(3):867-871, 2002.

TAUSZIG, S., JOUANGUY, E., HOFFMANN, J.A., IMLER, J.L. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(19):10520-10525, 2000.

TEIXEIRA, M.G., BARRETO, M.L., GUERRA, Z. *Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue*. Informe Epidemiológico do SUS, Salvador, 8(4):17, 1999.

TELANG, A., RECHEL, J.A., BRANDT, J.R., DONNELL, D.M. Analysis of ovary-specific genes in relation to egg maturation and female nutritional condition in the mosquitoes *Georgecraigius atropalpus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Physiology*, 59(3):283-294, 2013.

TERRA, W.R., FERREIRA, C., BAKER, J.E. Compartmentalization of digestion. In: LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F. *The Biology of the Insect Midgut*. London: Chapman & Hall, 1996. 206-235.

TZOU, P., GREGORIO, E., LEMAITRE, B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 5(1):102-110, 2002.

VASILAKIS, N., CARDOSA, J., HANLEY, K.A., HOLMES, E.C., WEAVER, S.C. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature Reviews Microbiology*, 9(7):532-541, 2012.

VAZEILLE, M., MOUSSON, L., MARTIN, E., FAILLOUX, A-B. Orally co-infected *Aedes albopictus* from la Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 4(6):1-5, 2010.

WEAVER, S.C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 9:523-540, 2009.

WHITBY, P.W., SEALE, T.W., VANWAGONER, T.M., MORTON, D.J., STULL, T.L. The iron/heme regulated genes of *Haemophilus influenzae*: comparative transcriptional profiling as a tool to define the species core modulon. *BMC Genomics*, 10(6):1-19, 2009.

WHITBY, P.W., VANWAGONER, T.M., SEALE, T.W., MORTON, D.J., STULL, T.L. Comparison of transcription of the *Haemophilus influenzae* iron/heme modulon genes in vitro and in vivo in the chinchilla middle ear. *BMC Genomics*, 14(925):1-12, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *DengueNet – global surveillance of dengue and dengue haemorrhagic fever (DHF)*. Geneva, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneva, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global strategy for dengue prevention and control*. Geneva, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases*. Second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva, 2013.

XI, Z., RAMIREZ, J.L., DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* Toll pathway controls Dengue virus infection. *PLoS Pathogens*, 4(7):1-12, 2008.