

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Efeito da refeição sanguínea, anticorpos e infecções mistas no desenvolvimento esporogónico de *Plasmodium* spp.**

**Luís Filipe Vieira da Silva Lopes**

Dissertação para a obtenção de grau de Doutor em Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia.

Orientador: Professor Doutor Henrique Silveira

**2008**



## Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no Centro de Malária e outras Doenças Tropicais LA (CMDT) e Unidade de Malária do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), da Universidade Nova de Lisboa, com uma bolsa de doutoramento (SFRH/BD/10202/2002) da Fundação para a Ciência e a Tecnologia do Ministério de Ciência, Tecnologia e do Ensino Superior. Este trabalho foi ainda suportado por diversos projectos: da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (POCTI/ESP/43636/99; POCTI/MGI/35815/00, POCTI/MGI/44905/2002, POCI/SAU-IMI/59489/2004) e da Fundação Calouste Gulbenkian (Processo nº 21-63044-B).

Gostaria também de expressar a minha gratidão a todos quantos contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar ao Prof. Doutor Henrique Silveira, o meu orientador que esteve sempre presente e me apoiou sempre.

Ao Prof. Doutor Virgílio do Rosário, Director da Unidade de Ensino e Investigação em Malária do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pelas sugestões enquanto membro da minha comissão tutorial e pelo seu apoio a toda a investigação realizada na Unidade de Malária.

Ao Prof. Doutor Ricardo Parreira, da Unidade de Virologia, membro da minha comissão tutorial, pelas sugestões dadas no decorrer do trabalho.

À Doutora Ana Paula Arez pela possibilidade de integrar o projecto das infecções mistas, pelo seu apoio e revisão da tese.

À Catarina Alves pela manutenção do insectário de mosquitos *Anopheles stephensi*.

À Catarina Casimiro por me ter ensinado os métodos e procedimentos de cultura de *Plasmodium falciparum* e também à Doutora Fátima Nogueira pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A todos os colegas do CMDT/IHMT, especialmente àqueles com os quais trabalhei directamente, por constituírem um grupo unido, mantendo boas relações e espírito de entreatajuda, especialmente a Patrícia Abrantes, a Susana Ramos, a Patrícia Marques, a Maria João Leandro, a Cristina Mendes, a Patrícia Coutinho, a Rute Félix.

Ao Doutor Sócrates Herrera e Doutora Myriam Arevalo-Herrera, por me terem recebido no seu grupo e pelo apoio ao trabalho realizado em Cali e Buenaventura.

A todos do Instituto de Imunologia que contribuíram para que este trabalho pudese ter sido realizado em Cali e Buenaventura: à Doutora Maria Manzano, directora da Unidade de Entomologia, ao Yezid Solarte e às técnicas da Unidade de Entomologia, por todo o apoio ao trabalho realizado na Unidade de Entomologia da Universidad del Valle. Ao Leonardo Rocha e ao

Dr. Bernard Murrain, assim como a todos os técnicos, que em Buenaventura trabalharam para a produção e infecção de mosquitos.

Um obrigado especial ao Felipe pelo empenho, apoio e companheirismo durante a execução do trabalho e também à Lina e à sua família por me ajudarem em Bogotá.

Aos pacientes que, em Buenaventura, aceitaram participar neste estudo.

E a todos com quem contactei no dia-a-dia enquanto estive na Colômbia, me ajudaram quando necessário e que tornaram a minha estadia mais agradável.

Ao Doutor Jesús Martínez-Barnetche pela cedência de sequências parciais de alguns genes de *Anopheles albimanus*.

Um agradecimento muito especial à minha família e aos meus amigos.

E por fim, em especial à Paula pelo seu amor e pelo que partilhamos ao longo destes anos, e também apoio no laboratório, e ao David que veio tornar a nossa vida mais cheia e feliz.

## Resumo

A transmissão de *Plasmodium* ao mosquito e o seu desenvolvimento esporogónico são alvos importantes para o desenvolvimento de métodos de controlo de transmissão. Nesta fase do ciclo de vida, o parasita enfrenta condições muito adversas derivadas do mosquito e da própria refeição sanguínea. É nesta altura que se observam as maiores reduções do número de parasitas e como tal a manipulação artificial destas condições poderia levar a uma redução significativa da transmissão.

Vários factores da refeição sanguínea tais como anticorpos, fármacos, refeições múltiplas ou presença de várias estirpes ou espécies de parasitas, podem diminuir ou pelo contrário potenciar a transmissão. Além disso, o ambiente no intestino médio é adverso devido à digestão da refeição sanguínea e a uma resposta imunológica eficaz produzida pelo mosquito contra o parasita. Várias linhas experimentais foram seguidas no sentido de contribuir para o entendimento da forma como alguns destes factores afectam o desenvolvimento do parasita.

Estudou-se o efeito de uma segunda alimentação sanguínea e de soro de *Rattus rattus* e de *Mus musculus* (BALB/c) contendo anticorpos anti-esporozoíto de *Plasmodium yoelii yoelii*, na taxa e na intensidade de infecção em mosquitos *Anopheles stephensi*. Foram ainda avaliadas alterações na expressão de genes do parasita e do mosquito, pelo método de DDRT-PCR e os resultados confirmados por qRT-PCR. A taxa e a intensidade de infecção foram reduzidas de forma significativa quando os mosquitos foram alimentados com soro imune. Foram também identificados, por DDRT-PCR, dois genes de *P. yoelii yoelii* e oito de *A. stephensi*, cuja expressão foi alterada pela segunda alimentação sanguínea e/ou pelo tratamento com soro imune. Quando a expressão foi analisada por qRT-PCR observaram-se diferenças estatisticamente significativas, na expressão de alguns genes nos diferentes grupos de tratamento.

No decurso deste trabalho foi testado um método para a cultura de oocinetos de *Plasmodium falciparum*. Embora se tenham obtido oocinetos, o seu número era insuficiente para utilização em experiências subsequentes e o método não foi implementado.

Para determinar o impacto de uma infecção mista no desenvolvimento parasitário no mosquito foram realizadas infecções experimentais com *P. falciparum* e/ou *Plasmodium vivax*. Mosquitos *Anopheles albimanus*, foram infectados por alimentação artificial de membrana, com sangue de doentes infectados com apenas uma das espécies. A realização de infecções experimentais e recolha de material biológico foi feita em Buenaventura e Cali, na Colômbia. Analisou-se a dinâmica de infecção nos mosquitos, assim como a resposta de alguns genes do seu sistema imunológico a infecções simples e mistas, com ambas as espécies. Os resultados obtidos para a dinâmica de infecções não mostrou nenhum efeito evidente de uma espécie sobre a outra,

no entanto tratou-se de um estudo preliminar. Verificou-se que alguns dos genes estudados parecem responder à infecção e foram também observados padrões de expressão diferentes de acordo com o tipo de infecção. Observou-se o aumento de expressão de alguns genes, sendo mais evidente no corpo gordo, especialmente na altura de libertação de esporozoítos do oocisto. No intestino médio, a *cecropina 3* foi o gene cuja expressão foi mais alterada, verificando-se um aumento de expressão às 24 horas, altura em que se dá a invasão do epitélio pelos oocinetos.

Alguns dos factores analisados mostraram ter um efeito no desenvolvimento esporogónico de *Plasmodium*, podendo esse efeito ser directo no parasita ou indirecto afectando a resposta do mosquito à infecção. Verificaram-se alterações na expressão génica quer em *Plasmodium* quer em *Anopheles* como resposta às diferentes variantes experimentais mas estudos mais específicos são necessários para aferir os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos observados e o seu impacto em medidas de controlo da malária.

**Palavras-chave:** Malária; *Plasmodium yoelii yoelii*; *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium vivax*; *Anopheles stephensi*; *Anopheles albimanus*; infecções experimentais; infecções mistas; cultura oocinetos

## Abstract

*Plasmodium* sporogonic development and transmission to the mosquito are important targets for the design or improvement of transmission control methods. At this stage, the parasite has to face adverse conditions caused both by bloodmeal and mosquito factors and the greatest losses of parasite numbers are observed. Thus, artificial manipulation of these conditions could lead to a significant reduction of malaria transmission.

Several factors of the blood meal could diminish or increase transmission, such as antibodies, drugs, multiple blood meals or the presence of more than one genotype or species of parasites. Also, the environment of the midgut is harsh, due to both blood meal digestion and effective immune response mounted by the mosquito. Several research lines were pursued aiming at contribute to the knowledge of how some of these factors can affect mosquito development.

Infection rate and intensity were accessed in *Anopheles stephensi* mosquitoes after a second blood meal with and without immune sera from *Rattus rattus* or *Mus musculus* (BALB/c), containing antibodies anti-*Plasmodium yoelii yoelii* sporozoite. DDRT-PCR and qRT-PCR methods were used to identify and evaluate changes in the expression of parasite and mosquito genes. Both infection rate and intensity were significantly reduced when mosquitoes were fed with immune serum. Also, two *P. yoelii yoelii* and eight *A. stephensi* genes, whose expression was altered by the second blood meal, with or without immune serum, were isolated by DDRT-PCR. When the expression of these genes was further analysed by qRT-PCR, significant differences in genes expression was observed for some of the genes, in different treatment groups.

A new method for the *in vitro* cultivation of *Plasmodium falciparum* ookinetes was also tested but ookinete production was insufficient to use in subsequent experiments and the method was not implemented.

To determine the impact of mixed infection in the parasite development in the mosquito, experimental infections of *Anopheles albimanus*, with *P. falciparum* and/or *Plasmodium vivax*, were performed. The mosquitoes were infected by membrane artificial feeding with blood from patients infected with one of those species. The experimental infections and biologic material collection were done in Buenaventura and Cali, Colombia. Infection dynamics and expression of some genes involved in the immune system were analysed in single and mixed infections. Regarding infection dynamics, there was no evident effect of one species over another but this was only a preliminary study. Some of the studied genes seemed to respond to infection and different expression patterns were observed according to the type of infection. Some genes showed higher expression and this was observed mostly at the fat body at the time the sporozoites were being released by the oocyst. At the midgut, *cecropin 3* displayed the higher

expression changes in response to infection, at 24 hours post-infection, the time at which ookinete epithelium invasion occurs.

In this study, we observed that some of the studied factors were proved to have an effect on the *Plasmodium* sporogonic development, affecting directly the parasite or indirectly by affecting mosquito physiologic functions. Expression changes of some genes were observed, both in *Plasmodium* and *Anopheles*, as a consequence of different experimental treatments. Further specific studies are necessary to identify the molecular mechanisms behind the observed effects and their possible impact in malaria control.

**Keywords:** Malaria; *Plasmodium yoelii yoelii*; *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium vivax*; *Anopheles stephensi*; *Anopheles albimanus*; experimental infection; mixed infection; ookinete

## Lista de abreviaturas

- $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]dATP- ATP marcado com um isótopo de fósforo 32
- ATPase- Enzima que cataliza a decomposição de adenosine tri-fosfato em adenosine difosfato
- BLAT- Algoritmo de alinhamento de sequências de DNA
- C- Grupo de infecção experimental que recebeu uma refeição sanguínea ao 3º dia p.i.
- CDPK- Proteína cinase dependente de cálcio
- CLIP- Protease serínica contendo domínio *clip*
- COI- Citocromo C oxidase subunidade 1
- CS- Proteína circunsporozoítica
- CTL- Lectina tipo C
- CTLMA- Lectina tipo C que se liga à manose
- CTRP- Proteína associada à CS e TRAP
- DDRT-PCR- Análise de expressão diferencial de produtos reversamente transcritos
- DDT- Dicloro-difenil-tricloroetano
- dNTP- 3'- deoxinucleósido-5'-trifosfatos
- L-DOPA- L-Dihidroxifenilalanina
- DTT- Ditioneitol
- cDNA- Ácido desoxiribonucleico complementar
- CMDT- Centro de Malária e outras Doenças Tropicais
- DNA- Ácido desoxiribonucleico
- EDTA- Ácido etileno diamina tetra acético
- Exp.- Experiência
- gDNA- Ácido desoxiribonucleico genómico
- GNBP- Proteínas que se ligam a bactérias gram(-)
- GPI- Glicosilfosfatidilinositol
- HEPES- Ácido (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico])
- IFA- Imunofluorescência indirecta
- IgG- Imunoglobulina G
- IHMT- Instituto de Higiene e Medicina Tropical
- INSP- Instituto nacional de Salud Pública do México
- i.p.- Intraperitoneal
- KDa- Kilodalton
- LDH- Desidrogenase de lactato
- LPS- Lipopolissacáridos
- LRIM- Proteínas do sistema imunológico ricas em leucina
- MMLV-RT- Transcriptase reversa do vírus Moloney de leucemia murina.
- MX- Infecção mista com *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*
- NA- Grupo de infecção experimental que não recebeu qualquer refeição sanguínea p.i.
- NOS- Sintetase de óxido nítrico
- NO- Óxido nítrico
- oligo-d(I)<sub>15</sub>- Fragmento de DNA constituído por 15 timinas
- PABA- Ácido p-aminobenzóico

Pb- Pares de bases  
PBS- Tampão fosfato salino  
PCR- Reacção de polimerização de DNA em cadeia  
Pf- *Plasmodium falciparum*  
PGN- Peptidoglicano  
PGRP- Proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos  
p.i.- Pós-infecção  
PPLP- Proteínas de *Plasmodium* tipo perforinas  
Pv- *Plasmodium vivax*  
qRT-PCR- PCR quantitativo em tempo real de amostras reversamente transcritas  
QT-PCR- PCR quantitativo em tempo real.  
RFLP- Análise de polimorfismos de tamanho após digestão por enzimas de restrição  
RNA- Ácido ribonucleico  
RNAi- RNA de interferência  
RPMI- Meio de cultura RPMI 1640  
SAGE- Análise em série da expressão génica  
SI- Grupo de infecção experimental que recebeu uma refeição sanguínea contendo soro imune anti-esporozoíto ao 3º dia p.i.  
SID- Grupo de infecção experimental que recebeu uma refeição sanguínea contendo soro imune anti-esporozoíto diluído 1:1 com plasma não imune ao 3º dia p.i.  
SOAP- Proteína adesiva secretada pelo oocineto  
Srpn- Serpina  
tBLASTX- Algoritmo que compara uma sequência de DNA traduzida contra outra sequência de DNA traduzida  
TEP- Proteínas contendo tioéster  
TGF- $\beta$ - Factor de crescimento tumoral  $\beta$   
TRIS-HCl- tampão TRIS com pH ajustado com ácido clorídrico  
U- Unidade  
Th- Célula T auxiliar  
TLP- Proteína semelhante à TRAP  
TRAP- Proteína anónima relacionada com a trombospondina  
TSR- Repetição de tipo I da trombospondina  
WARP- Proteína relacionada com o domínio de factor-A de vonWillebrand  
XA- Ácido xanturénico

## Índice

<b>Agradecimentos</b>	<b>iii</b>
<b>Resumo</b>	<b>v</b>
<b>Abstract</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>ix</b>
<b>Índice</b>	<b>xi</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>xiii</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>xiv</b>
<b>Capítulo I- Introdução geral</b>	<b>1</b>
<b>I.1- A Malária</b>	<b>3</b>
<b>I.2- Ciclo de vida</b>	<b>4</b>
<b>I.3- Interações entre o parasita e o mosquito vector durante o desenvolvimento esporogónico.</b>	<b>6</b>
<b>I.4- Factores do hospedeiro vertebrado que poderão influenciar a transmissão e desenvolvimento do parasita no mosquito.</b>	<b>11</b>
I.4.1- Efeito da refeição sanguínea no desenvolvimento do parasita no mosquito.	11
I.4.2- Factores do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado presentes na refeição sanguínea.	11
I.4.2.1- Anticorpos	12
I.4.2.2- Sistema do complemento	14
I.4.2.3- Leucócitos	15
I.4.2.4- Citocinas e NO	15
I.4.3- Fármacos	16
I.4.4- Outras infecções	17
<b>I.5- Factores do mosquito</b>	<b>20</b>
<b>I.5.1- Matriz peritrófica e enzimas digestivas</b>	<b>20</b>
<b>I.5.2- Resposta do mosquito à infecção. Sistema imunológico do mosquito.</b>	<b>21</b>
I.5.2.1- Resposta epitelial do mosquito à invasão por <i>Plasmodium</i> .	21
I.5.2.2- Receptores de reconhecimento de padrões	22
I.5.2.3- Modulação de sinal e transdução	23
I.5.2.4- Mecanismos efectores	26
<b>Capítulo II- Objectivos</b>	<b>29</b>
<b>II.1- OBJECTIVOS</b>	<b>31</b>

II.1.1-Objectivos específicos:	31
<b>Capítulo III- Efeito do soro imune anti-esporozoíto na transmissão de <i>Plasmodium yoelii yoelii</i> a <i>Anopheles stephensi</i>.</b>	<b>33</b>
<b>III.1- INTRODUÇÃO</b>	<b>35</b>
<b>III.2 – MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
III.2.1- Manutenção e infecção de mosquitos	37
III.2.2- Produção do soro imune	37
<b>III.2.3- Segunda alimentação sanguínea dos mosquitos infectados com soro imune e não imune</b>	<b>38</b>
<b>III.2.4- Extração e purificação de RNA</b>	<b>39</b>
III.2.5- Produção de cDNA por transcrição reversa	40
III.2.6- DDRT-PCR usando marcação radioactiva	40
III.2.7- DDRT-PCR sem marcação radioactiva	40
III.2.8- Reamplificação e limpeza do produto de PCR	41
III.2.9- Clonagem e sequenciação	41
III.2.10- Hibridação por dot blot	41
III.2.11- Sequenciação dos fragmentos clonados	41
III.2.12- PCR quantitativo em tempo real	41
III.2.13- Análise estatística	43
<b>III.3- RESULTADOS</b>	<b>44</b>
III.3.1- Infecções experimentais de mosquitos – análise da infecção.	44
III.3.2- Identificação de genes diferencialmente expressos	45
III.3.3- Análise de sequências	46
III.3.4- PCR quantitativo em tempo real.	48
III.3.4.1- Genes de <i>Plasmodium</i>	48
III.3.4.2- Genes de <i>Anopheles</i>	50
<b>III.4- DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>
<b>Capítulo IV- Produção de oocinetos de <i>Plasmodium falciparum</i> in vitro.</b>	<b>61</b>
<b>IV.1- INTRODUÇÃO</b>	<b>63</b>
<b>IV.2- MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>65</b>
IV.2.1- Manutenção culturas <i>Plasmodium falciparum</i>	65
IV.2.2- Produção de culturas com grandes quantidades de gametócitos maduros.	65
IV.2.3- Produção de oocinetos.	65
<b>IV.3- RESULTADOS</b>	<b>67</b>
IV.3.1- Produção de culturas com grande número de gametócitos.	67
IV.3.2- Cultura de oocinetos	67
<b>IV.4- DISCUSSÃO</b>	<b>69</b>
<b>Capítulo V- Infecções mistas experimentais de mosquitos <i>Anopheles albimanus</i> com <i>Plasmodium falciparum</i> e <i>Plasmodium vivax</i>.</b>	<b>71</b>

<b>V.2- MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>75</b>
<b>V.2.1- Manutenção de mosquitos</b>	75
<b>V.2.2- Recolha de amostras sanguíneas</b>	75
<b>V.2.3- Infecções de mosquitos</b>	75
V.2.4- Recolha de material biológico.	76
V.2.5- Extração de DNA	77
V.2.6- Detecção de <i>Plasmodium</i> por PCR	78
V.2.7- Extração e purificação de RNA	78
V.2.8- Produção de cDNA por transcrição reversa	78
V.2.9- Identificação de genes de <i>Anopheles albimanus</i>	79
V.2.10- PCR para identificação de sequências de <i>Anopheles albimanus</i> .	79
V.2.11- Purificação de produto de PCR a partir de bandas do gel de agarose.	81
V.2.12- Clonagem e isolamento dos plasmídeos	81
V.2.13- Sequenciação dos fragmentos clonados	81
V.2.14- PCR quantitativo em tempo real	81
V.2.15- Análise estatística	83
V.3.1- Análise da dinâmica de infecção	84
V.3.1- Identificação de genes de <i>Anopheles albimanus</i>	87
V.3.2- Análise de expressão de genes associados à resposta imunológica	89
<b>V.4- DISCUSSÃO</b>	<b>94</b>
<b>Capítulo VI- Discussão geral e perspectivas futuras</b>	<b>99</b>
<b>VI- DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>101</b>
<b>Capítulo VII- Referências bibliográficas</b>	<b>107</b>
<b>VII.1- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>109</b>
<b>Anexos</b>	<b>127</b>
<b>Modelo do Consentimiento Informado</b>	<b>129</b>
<b>Artigo publicado</b>	<b>131</b>
<b>Índice de Figuras</b>	
Figura I.1- Área de distribuição da Malária.	3
Figura I.2- Esquema do ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> .	5
Figura I.3- Esquema simplificado das vias de transdução de sinal do sistema imunológico de <i>Drosophila</i> .	25
Figura I.4- Esquema geral da resposta imunológica de <i>Drosophila</i> .	26
Figura III.1– Esporozoítos fluorescentes, marcados por anticorpos pelo método de IFA.	38

Figura III.2- Desenho experimental, para aferir o efeito do soro imune anti-esporozoíto no desenvolvimento e expressão génica do parasita e mosquito hospedeiro.	39
Figura III.3- Identificação de genes expressos diferencialmente por DDRT-PCR.	45
Figura III.4- Perfis de expressão do gene <i>COI</i> de <i>P. yoelii yoelii</i> , obtido por qRT-PCR.	49
Figura III.5- Perfis de expressão do gene <i>brp</i> de <i>P. yoelii yoelii</i> , obtido por qRT-PCR.	49
Figura III.6- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene <i>As1</i> , de <i>A. stephensi</i> .	50
Figura III.7- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene <i>As4</i> , de <i>A. stephensi</i> .	51
Figura III.8- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene <i>As5</i> , de <i>A. stephensi</i> .	52
Figura III.9- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene <i>As6</i> , de <i>A. stephensi</i> .	52
Figura III.10- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene <i>As7</i> , de <i>A. stephensi</i> .	53
Figura III.11- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene <i>As8</i> , de <i>A. stephensi</i> .	54
Figura III.12- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene <i>As9</i> , de <i>A. stephensi</i> .	54
Figura III.13- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene <i>As10</i> , de <i>A. stephensi</i> .	55
Figura IV.1- Fases de desenvolvimento esporogónico de <i>P. falciparum in vitro</i> .	68
Figura V.1- Esquema de recolha de material biológico.	76
Figura V.2- Electroforese de produtos de PCR.	87
Figura V.3- Padrão de expressão, obtida por PCR quantitativo em tempo-real, da <i>PGRP-LB</i> ; no intestino médio e corpo gordo, 1 dia p.i. (D1) e 8 a 10 dias p.i. (D8-10).	89
Figura V.4- Padrão de expressão, obtida por PCR quantitativo em tempo-real, da <i>defensina</i> ; no intestino médio e corpo gordo, 1 dia p.i. (D1) e 8 a 10 dias p.i. (D8-10).	90
Figura V.5- Padrão de expressão, obtida por PCR quantitativo em tempo-real, da <i>cecropina 3</i> ; no intestino médio e corpo gordo, 1 dia p.i. (D1) e 8 a 10 dias p.i. (D8-10).	91
Figura V.6- Padrão de expressão, obtida por PCR quantitativo em tempo-real, da <i>gambicina</i> ; no intestino médio e corpo gordo, 1 dia p.i. (D1) e 8 a 10 dias p.i. (D8-10).	92
Figura V.7- Padrão de expressão, obtida por PCR quantitativo em tempo-real, da <i>atacina</i> ; no intestino médio e corpo gordo, 1 dia p.i. (D1) e 8 a 10 dias p.i. (D8-10).	92

## Índice de Tabelas

Tabela III.1- <i>Primers</i> usados para PCR quantitativo em tempo real.	42
--	----

Tabela III.2- Efeito da segunda refeição sanguínea e do soro imune anti- <i>Plasmodium</i> , na taxa e intensidade de infecção de mosquitos <i>A. stephensi</i> infectados com <i>P. yoelii yoelii</i> .	44
Tabela III.3- Número de bandas isoladas por DDRT-PCR, com cada par de <i>primers</i> usados.	46
Tabela III.4- Resultados da análise por BLAST realizada com as sequências obtidas a partir de bandas diferencialmente expressas.	47
Tabela IV.1- Dados referentes às culturas de formas sanguíneas <i>in vitro</i> , usadas para cultura de oocinetos.	67
Tabela V.1- Tipo de amostra e quantidade recolhida, em cada experiência.	77
Tabela V.2- <i>Primers</i> usados para identificação de espécies de <i>Plasmodium</i> .	78
Tabela V.3- Informação sobre <i>primers</i> usados em reacções de PCR com DNA genómico e complementar de <i>A. albimanus</i> , assim como a espécie para que foram inicialmente desenhados.	80
Tabela V.4- <i>Primers</i> usados para reacção de PCR em tempo real.	82
Tabela V.5- Detecção e parasitémia de <i>Plasmodium</i> nos pacientes participantes neste estudo, por microscopia óptica e por PCR.	84
Tabela V.6- Contagens de oocistos.	85
Tabela V.7- Detecção e identificação de espécies de <i>Plasmodium</i> , por PCR.	86
Tabela V.8- Lista de sequências obtidas, o seu tamanho e resultados obtidos por BLAT e tBLASTX em base de dados de sequências de <i>A. gambiae</i> .	88



# Capítulo I

## Introdução Geral

---



## I.1- A Malária

A malária é uma doença parasitária transmitida pela picada de mosquitos infectados. É a doença parasitária mais importante no Homem sendo normalmente causada por cinco espécies, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* (Greenwood *et al.*, 2008). Apesar das outras espécies causarem uma grande morbilidade, a enorme taxa de mortalidade é sobretudo devida a *P. falciparum*.

Cerca de 3,2 mil milhões de pessoas, em 107 países vivem em zonas de risco de malária (figura I.1), causando 350-500 milhões de casos clínicos todos os anos. Aproximadamente um milhão de pessoas, a maioria crianças, morrem todos os anos com malária causada por *P. falciparum*. A malária contribui ainda indirectamente para mortes em conjunto com outras doenças (WHO, 2005a). As crianças, as mulheres grávidas e adultos sem contacto prévio com o parasita ou com imunidade deprimida são os principais grupos de risco (Korenromp *et al.*, 2005; WHO, 2005b).

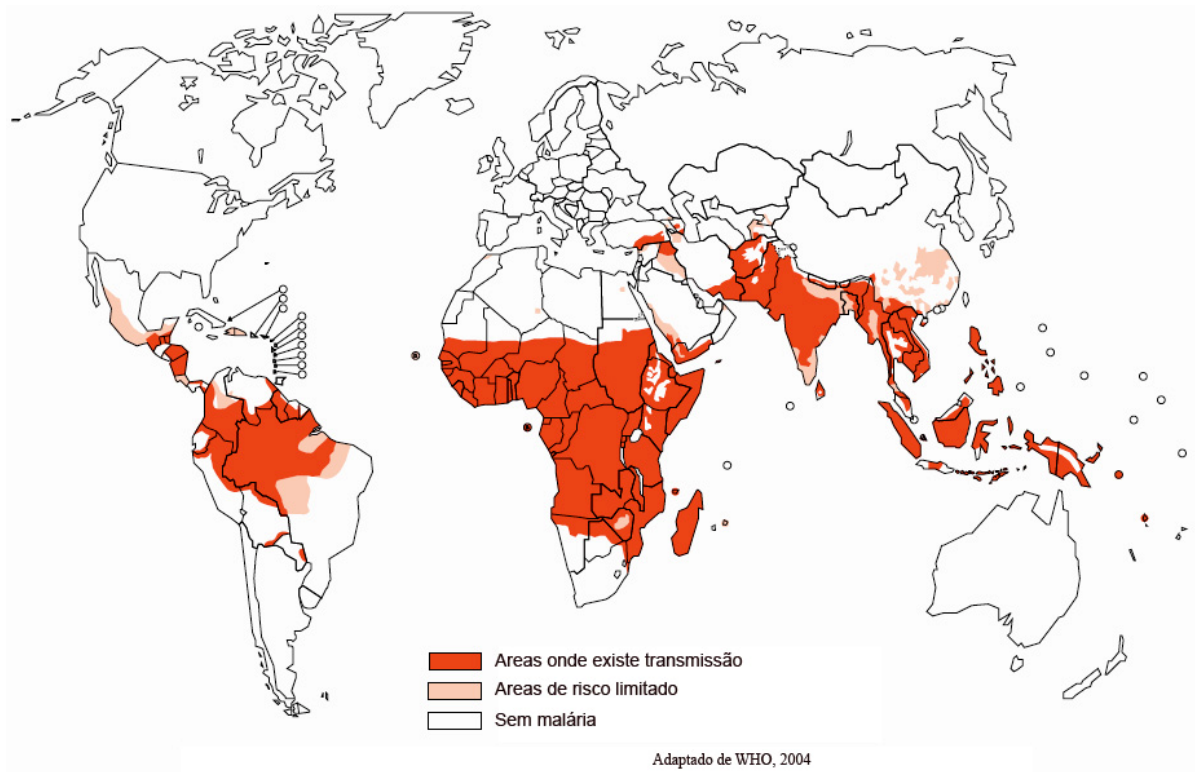


Figura I.1- Área de distribuição da Malária.

A transmissão de malária pode ser endêmica ou epidêmica, e em muitos casos é sazonal, com picos de malária coincidentes com a estação das chuvas. Factores ecológicos, ambientais, sócio-económicos e os vectores fazem com que a malária varie entre regiões (WHO, 2005a).

A malária é uma doença que está associada sobretudo à pobreza, tendo por sua vez grande impacto na economia de países com elevadas taxas de infecção, sendo esse impacto notado sobretudo na África sub-sariana onde ocorre 90% das mortes causadas por esta doença (Gallup e Sachs, 2001; Sachs e Malaney, 2002).

Nos últimos anos os casos de malária, a sua gravidade e a mortalidade associada, têm aumentado. Isto deve-se sobretudo ao aparecimento de resistência dos parasitas aos fármacos anti-maláricos e à resistência dos mosquitos vectores aos insecticidas.

A cloroquina, um fármaco anti-malárico usado em grande escala no passado, é agora ineficaz na maior parte das zonas endémicas para *P. falciparum*. Também a resistência à sulfadoxina/pirimetamina (SP) e à amodiaquina tem vindo a aumentar rapidamente (WHO, 2005c). Actualmente verifica-se a existência disseminada de estirpes multi-resistentes e os tratamentos mais usados são baseados em terapias de combinação, usando especialmente artemisinina combinada com outros fármacos (WHO, 2006a).

O DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), muito usado a partir dos anos 40 para controlo vectorial, foi visto como tendo potencial para erradicar os mosquitos vectores. O seu uso resultou numa redução significativa da transmissão de malária em muitas partes do mundo e foi essencial na erradicação da transmissão da doença na Europa e América do Norte (WHO, 2005d). O aparecimento de resistência aos insecticidas e as restrições impostas ao seu uso devido a problemas ambientais, associado à resistência do parasita aos fármacos, contribuiu para o grande aumento de casos verificados a partir dos anos 90.

O desenvolvimento de vacinas poderia ter um enorme impacto no combate e prevenção desta doença, mas até ao momento não foi ainda possível obter nenhuma verdadeiramente eficaz. Por enquanto, outros métodos são aplicados para controlo e prevenção da severidade da doença, tais como prevenção da transmissão, através do uso de redes mosquiteiras tratadas com insecticida; controlo do mosquito vector; tratamento preventivo intermitente; diagnóstico rápido e tratamento adequado dos indivíduos infectados.

## **I.2- Ciclo de vida**

O ciclo de vida de *Plasmodium* compreende duas fases distintas, uma no hospedeiro vertebrado e outra no mosquito vector (figura I.2). O desenvolvimento esporogónico (reprodução sexual) inicia-se com a ingestão de gametócitos masculinos e femininos maduros durante a alimentação sanguínea do mosquito num vertebrado. Uma vez ingeridos pelo

mosquito, os gametócitos encontram novas condições ambientais que desencadeiam a formação dos gametas femininos e masculinos. Cada gametócito feminino dá origem a um gameta feminino sem movimento próprio e o gametócito masculino dá origem a vários gametas masculinos, flagelados, que saem do gametócito pelo processo denominado de exflagelação.

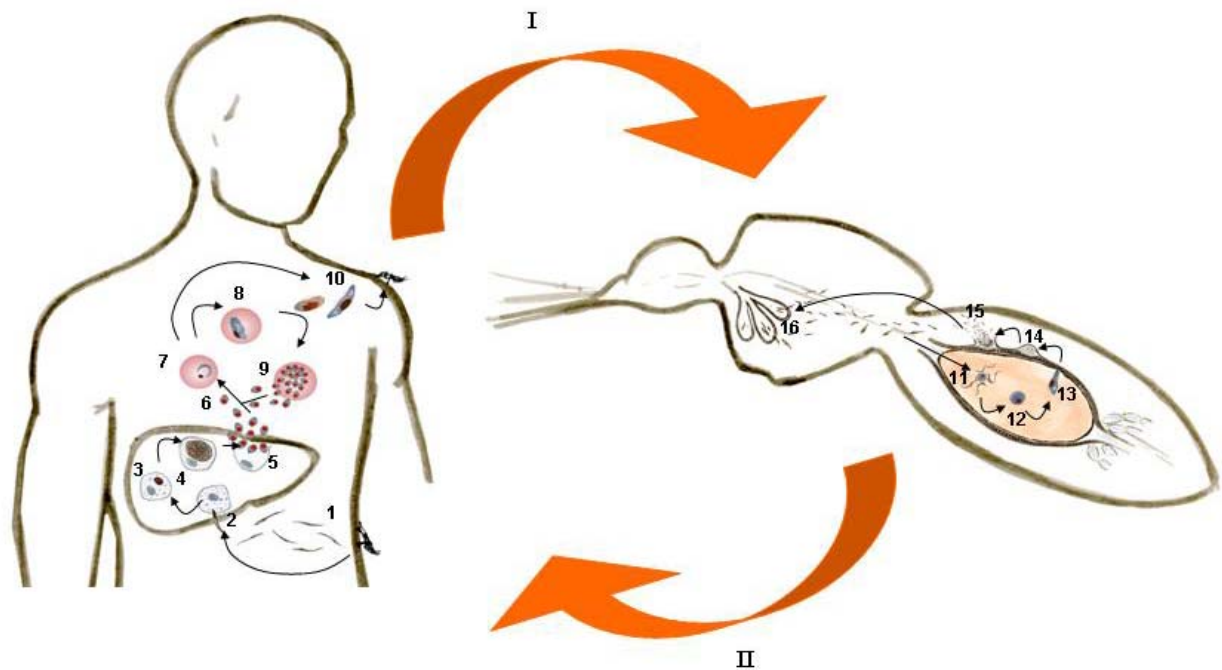


Figura I.2- Esquema do ciclo de vida de *Plasmodium*. I- transmissão ao mosquito; II- transmissão ao hospedeiro vertebrado. 1- esporozoítos entram na circulação sanguínea; 2- esporozoítos invadem hepatócito; 3,4- esquizogonia hepática; 5- liberação dos merozoítos hepáticos para a circulação sanguínea; 6- invasão dos eritrócitos pelos merozoítos; 7- formação trofozoíto (fase de anel); 8- trofozoíto; 9- ruptura de esquizonte e liberação de merozoítos; 10- gametócitos maduros; 11- gametogênese e fecundação; 12- zigoto; 13- oocineto; 14- oocisto; 15- ruptura de oocisto libertando esporozoítos para hemolinfa; 16- esporozoítos invadem glândulas salivares.

O gameta masculino fertiliza o feminino dando origem ao zigoto. Nas 3 primeiras horas após a fusão dos gametas dá-se a replicação do genoma e a meiose, sem haver contudo divisão nuclear formando um núcleo tetraplóide (revisto em Reininger *et al.*, 2005). O zigoto diferencia-se em oocineto, com forma alongada e móvel que inicia a migração e sai da refeição sanguínea, atravessando a matriz peritrófica até atingir e invadir o epitélio do intestino médio.

Depois de atravessar as células do epitélio, o oocineto entra em contacto com a lâmina basal, aí imobiliza-se e torna-se arredondado, formando o oocisto. No oocisto dão-se mitoses

sucessivas, e os oocistos deixam de ser sólidos e passam a ser vacuolados formando os esporoblastos que se diferenciam em centenas de esporozoítos (Terzakis *et al.*, 1967). O número de esporozoítos que cada oocisto pode produzir varia conforme a espécie. Por exemplo em *Anopheles dirus* um estudo observou uma média de 3688 esporozoítos de *P. vivax* e uma média de 3385 de *P. falciparum* (Rosenberg e Rungsiwongse, 1991), para a combinação de *Anopheles stephensi/Plasmodium berghei* foram observados em média 8000 esporozoítos por oocisto (Sinden, 1997).

Quando este processo está concluído o oocisto rompe-se libertando os esporozoítos para o hemocélio do mosquito, onde são transportados pela hemolinfa a diversas partes do mosquito. Alguns desses esporozoítos chegam às glândulas salivares e invadem-nas. No ducto das glândulas salivares os esporozoítos, atingem a fase final de maturação sendo agora mais infecciosos do que antes da invasão das glândulas (Matuschewski *et al.*, 2002a) e estão prontos a ser transmitidos ao hospedeiro vertebrado na próxima refeição sanguínea.

Uma vez no hospedeiro vertebrado os esporozoítos entram na corrente sanguínea e quando chegam ao fígado invadem os hepatócitos iniciando-se a esquizogonia hepática ou exoeritrocitária. O esporozoíto dá origem ao esquizonte hepático, que quando maturo, contém milhares de merozoítos. Estes são libertados do hepatócito agregados em merossomas e entram na circulação sanguínea. Os esporozoítos de *P. ovale* e *P. vivax* podem também diferenciar-se em hipnozoítos, que permanecem dormentes no fígado e dão origem às recaídas. O tempo entre inoculação de esporozoítos e o momento em que os merozoítos são detectados no sangue é denominado de período de pré-patência.

Na corrente sanguínea os merozoítos invadem os eritrócitos e iniciam a esquizogonia eritrocitária, onde cada merozoíto dá origem a um trofozoíto que depois se diferencia num esquizonte que produz vários merozoítos. Quando maturo dá-se a ruptura do esquizonte e os merozoítos são libertados na corrente sanguínea onde podem invadir novos eritrócitos e recomeçar o ciclo eritrocitário.

Alguns merozoítos dão origem a gametócitos feminino ou masculino. Os gametócitos femininos e masculinos desenvolvem-se e quando maturos estão prontos a infectar o mosquito vector se forem ingeridos durante a alimentação sanguínea.

### **I.3- Interações entre o parasita e o mosquito vector durante o desenvolvimento esporogónico.**

O ciclo esporogónico é considerado um alvo potencial para futuras estratégias de controlo parasitário, tais como o desenvolvimento de vacinas e quimioterapia. Para que tal seja possível é necessário conhecer-se bem a biologia do parasita assim como os factores ambientais que

afectam o seu desenvolvimento. Estudos recentes identificaram uma série de moléculas essenciais para o desenvolvimento do parasita e para a sua interacção com o mosquito que poderão ser alvos importantes para o desenvolvimento de estratégias para o bloqueio do desenvolvimento do parasita no mosquito, impedindo a sua transmissão.

A interacção com as células e moléculas do hospedeiro desempenha um papel fundamental no processo de reconhecimento e invasão. Segundo Mazzacano e colaboradores (1998) a transformação *in vitro* de zigotos em oocinetos aumenta 5 a 10 vezes, quando são incluídas na cultura células de mosquito ou de *Drosophila*. A presença destas células na cultura levou ainda a um aumento da longevidade dos oocinetos em cultura de 24 para 42 horas. Células de mosquito são também necessárias para a produção de oocistos maduros *in vitro* (Warburg e Schneider, 1993; Mazzacano *et al.*, 1998) e o contacto dos oocinetos com componentes da membrana basal é essencial para a transformação dos oocinetos em oocistos (Warburg e Schneider, 1993; Adini e Warburg, 1999; Vlachou *et al.*, 2001; Ariighi e Hurd, 2002).

No intestino médio do mosquito os gametócitos são activados e os gâmetas masculinos deixam o gametócito pelo processo de exflagelação, que pode ser induzida por uma diminuição de temperatura de 5°C, aumento do pH (revisto Sinden *et al.*, 1996) ou moléculas existentes no intestino médio com o ácido xanturénico (Billker *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 1998; Arai *et al.*, 2001). O aumento exógeno de ácido xanturénico (XA) induz exflagelação e aumenta a infectividade de *P. falciparum* aos mosquitos (Bhattacharyya e Kumar, 2001). Este efeito é regulado pelo aumento de cálcio no citoplasma, e mediado pela CDPK4 (proteína cinase dependente de cálcio 4) que transforma este sinal numa resposta celular que regula a progressão do ciclo celular no gametócito masculino (Billker *et al.*, 2004). Esta proteína é assim essencial para o desenvolvimento do ciclo de vida e para a reprodução sexual. Outra proteína de *P. berghei*, a Pbmap-2 (proteína cinase activada por mitogénio 2), apesar de não afectar a gametocitogénese é necessária à formação dos gâmetas masculinos, sendo a exflagelação, e consequentemente a transmissão, fortemente afectada em parasitas mutantes que não possuem este gene (Rangarajan *et al.*, 2005).

Nesta altura os gâmetas terão de se encontrar para que a fecundação ocorra. Este processo terá maior probabilidade de sucesso quanto maior for a gametocitémia e poderá ainda ser facilitado pela agregação de microgâmetas aos eritrócitos circundantes e macrogâmetas formando centros de exflagelação (Templeton *et al.*, 1998) e pela existência de gametócitos masculinos e femininos no mesmo eritrócito (Jovani e Sol, 2005).

A proteína Pfs230 parece ter um papel na ligação dos gametócitos a outros glóbulos vermelhos, de modo a formar os centros de exflagelação; esta proteína poderá ainda ter outras funções pois verificou-se que a sua disrupção causa uma redução significativa do número de

oocistos (Eksi *et al.*, 2006). A proteína Pfs230 pertence a uma família de proteínas específicas de *Plasmodium*, caracterizadas pela presença de domínios que contêm 6 cisteínas, sendo a unidade básica desta família constituída por 2 destes domínios, representado pela proteína Pf12. Duas moléculas desta família, Pf48/45 e Pf230, são expressas na superfície tanto de gâmetas masculinos como femininos e evidências sugerem que sejam ligandos da fertilização (revisto por Carter, 2001).

O parasita ao tornar-se extracelular encontra um meio adverso, sendo a fase de desenvolvimento entre gâmetas e oocinetos onde se verifica a maior perda de parasitas (Vaughan *et al.*, 1994; Alavi *et al.*, 2003; Gouagna *et al.*, 2004). O oocineto é móvel e terá de enfrentar o ambiente hostil do intestino médio, devido a factores tais como: 1) componentes do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado ainda activos na refeição sanguínea; e 2) enzimas digestivas e degradação da refeição sanguínea. Para além de sobreviver ao ambiente hostil, o oocineto necessita de migrar através da matriz peritrófica e ser capaz de aderir, invadir e atravessar as células do epitélio do intestino médio até à membrana basal. Várias proteínas de *Plasmodium* essenciais para estes processos foram já identificadas.

A passagem através da membrana peritrófica do mosquito, que é constituída essencialmente por quitina e poderá funcionar como barreira à passagem de oocinetos (Clements, 1992), é facilitada por uma quitinase que é secretada pelo micronema do oocineto e activada pelas enzimas digestivas do mosquito (Shahabudin *et al.*, 1995).

A locomoção, por deslizamento (*gliding motility*), é essencial para o oocineto se deslocar até ao epitélio do intestino médio e para a invasão do epitélio. Um motor actina/miosina envolvendo alterações do cálcio intracelular será responsável por esta mobilidade como sugerem alguns trabalhos nesta (Wetzel *et al.*, 2003, Siden-Kiamos *et al.*, 2006) e em outras fases (Baum *et al.*, 2006) do ciclo de vida do parasita. A CTRP (proteína adesiva do micronema do oocineto) é uma proteína com várias funções nesta fase da vida do parasita e verificou-se que é essencial para o movimento e invasão dos oocinetos (Dessens *et al.*, 1999; Yuda *et al.*, 1999). A PbGC $\beta$ , uma guanil ciclase, foi também recentemente identificada em *P. berghei* e mostrou ser necessária para a mobilidade do oocineto através das células epiteliais (Hirai *et al.*, 2006).

Ao atingir o epitélio o parasita necessita receptores de membrana capazes de reconhecer as células epiteliais e de um mecanismo para as invadir. Diferentes espécies de parasitas invadem o intestino médio de forma diferente, quer em termos da via usada para atravessar o epitélio, que pode ser inter e/ou intracelular, quer pelo tipo de células que são invadidas. O reconhecimento poderá mesmo ter um papel limitante na infecção de diferentes espécies de *Plasmodium* a diferentes espécies de mosquito (Shahabuddin, 2002). O reconhecimento e adesão ao epitélio serão feitos através de ligações a glicoproteínas, mais especificamente à sua parte glicosídica.

Alguns dos possíveis alvos de ligação foram já identificados, tais como resíduos de N-acetil glucosamina de glicoproteínas do intestino médio de *Anopheles tessellatus* (Ramasamy *et al.*, 1997) e uma aminopeptidase N (AgAPN1) de *Anopheles gambiae*, que é reconhecida pela lectina jacalina que tem efeito de bloqueio de transmissão (Dinglasan *et al.*, 2007b). Também uma população de glicosaminoglicanos de condroitina que está presente ao longo das microvilosidades das células do epitélio em *A. gambiae* é reconhecida por oocinetos *in vitro*, quando os níveis de sulfato de condroitina foram diminuídos a invasão de *P. falciparum* foi substancialmente inibida (Dinglasan *et al.*, 2007a).

Também os lípidos poderão ter algum papel na ligação do oocineto às células do intestino médio, como demonstraram experiências com fosfolípases de veneno de cobra (Zieler *et al.*, 2001) e de abelha (Moreira *et al.*, 2002). Verificou-se ainda que a proteína Pvs25, de *P. vivax*, interage com a proteína calreticulina nas microvilosidades da superfície apical das células do intestino médio de *Anopheles albimanus* (Rodríguez *et al.*, 2007), no entanto não se sabe ainda ao certo qual o significado desta interação.

O processo de invasão do epitélio do intestino médio do mosquito parece envolver a perfuração da membrana por proteínas segregadas pelo oocineto já que proteínas de *Plasmodium* tipo perforinas (PPLPs), que contêm um domínio de formação de poros são fundamentais para a invasão do epitélio (Kadota *et al.*, 2004; Ecker *et al.*, 2007).

A CeTOS (proteína de oocineto e esporozoíto para atravessamento celular), é necessária para que o oocineto de *P. berghei* possa atravessar a célula, experiências em que a sequência do gene foi alterada de modo a impedir a sua expressão originou oocinetos capazes de invadir a célula mas que depois não se moviam no seu interior (Kariu *et al.*, 2006) resultando numa infectividade reduzida na ordem das 200 vezes.

Após atravessar as células do epitélio o oocineto torna-se imóvel e transforma-se em oocisto. Este acontecimento dá-se provavelmente pela sinalização de proteínas da membrana parasitária, quando se ligam especificamente a componentes da membrana basal. Em *P. berghei* as proteínas P25, P28 e a SOAP ligam-se especificamente à laminina (Vlachou *et al.*, 2001; Arrighi e Hurd, 2002; Dessens *et al.*, 2003) e a CTRP liga-se à laminina e colagénio IV (Arrighi e Hurd, 2002). Estas proteínas poderão estar envolvidas no processo que desencadeia a transformação de oocineto em oocisto, no entanto verificou-se que em *P. berghei* a CTRP e a SOAP não são necessárias para a transformação de oocinetos em oocistos (Nacer *et al.*, 2008).

Dentro do oocisto o parasita multiplica-se originando milhares de esporozoítos. Neste processo de multiplicação, citocinese e libertação de esporozoítos estão envolvidos várias proteínas. A PbSR (*Plasmodium* scavenger receptor) é uma proteína altamente conservada entre espécies de *Plasmodium*, e contém vários domínios associados ao reconhecimento/ativação

imune e a interação ou adesão a lípidos e proteínas da superfície celular. É expressa em esporozoítos e a sua disrupção leva à produção de oocistos em número normal, mas que não produzem esporozoítos (Claudianos *et al.*, 2002).

O oocisto parece também ser mais resistente ao sistema imunológico do mosquito que o oocineto, esta característica pensa-se ser pelos menos parcialmente devido à cápsula do oocisto. Em *P. berghei* a PbCap380, uma proteína da cápsula, verificou-se ser necessária à sobrevivência do oocisto, pois parasitas que não possuem este gene desenvolvem oocistos normalmente, mas estes são depois eliminados (Srinivasan *et al.*, 2008).

A proteína circunsporozoítica (CS) é a proteína mais abundante do esporozoíto e está ancorada à membrana exterior por um GPI (glicosilfosfatidilinositol). É essencialmente constituída por um domínio imunodominante, que consiste na repetição de pequenas sequências peptídicas, flanqueada por duas regiões altamente conservadas a região I e a região II que é homóloga à repetição de tipo I da trombospondina (TSR) (Menard, 2000; Wang *et al.*, 2005). A CS é essencial em vários processos: formação e definição morfológica dos esporozoítos no oocisto (Ménard *et al.*, 1997); movimento do esporozoíto por deslizamento (Stewart e Vanderberg, 1988); adesão e invasão das glândulas salivares (Myung *et al.*, 2004) e dos hepatócitos (Ménard *et al.*, 1997) para o qual o seu domínio tipo TSR é essencial; a CS é também libertada no citoplasma dos hepatócitos após invasão onde possivelmente inibe a síntese de proteínas ligando-se aos ribossomas (Thathy *et al.*, 2002). A região I parece ter um papel preponderante na invasão das glândulas salivares, e *Plasmodium gallinaceum*, que não possui esta região, infecta apenas culicíneos e não anofelinos (Menard, 2000). Também esporozoítos de *P. berghei* em que a CS foi substituída pela CS de *P. gallinaceum* perderam a capacidade de invadir as glândulas de mosquitos anofelinos (Tewari *et al.*, 2005). Assim a CS poderá ter grande influência nas possíveis combinações de espécies de parasitas e mosquitos. Em *P. vivax* diferentes fenótipos de CS estão relacionados com a susceptibilidade dos mosquitos à infecção: *Anopheles pseudopunctipennis* é susceptível a parasitas do fenótipo VK247 mas refractária a VK210 o inverso é observado em *A. albimanus* (González-Cerón *et al.*, 2001).

A TRAP (proteína anónima relacionada com a trombospondina) é uma proteína semelhante à CTRP, transmembranar com vários domínios extracelulares: domínio A (um módulo adesivo), 1 domínio TSR e uma região repetitiva de tamanho e sequência variável de acordo com a espécie. Vários estudos TRAP mostraram que esta é essencial ao esporozoíto para a invasão das glândulas salivares, hepatócitos murinos e hepatócitos imortalizados HepG2, sendo também fundamental à mobilidade por deslizamento (revisto por Menard, 2000). Estudos usando parasitas *P. berghei*, com deleções no domínio adesivo TSR do gene TRAP, mostraram que esse domínio é essencial, no esporozoíto, para a invasão das glândulas salivares (Wengelnik *et al.*,

1999) mas não do fígado de rato (Matuschewski *et al.*, 2002b). Outra proteína da família das proteínas TRAP/MIC2 foi descrita recentemente, a TLP (proteína semelhante à TRAP) que à semelhança da TRAP e CTRP, está envolvida na deslocação e invasão do parasita, contudo esta não é essencial (Heiss *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2008), indicando que existe alguma redundância nas adesinas parasitárias envolvidas no processo de mobilidade e invasão.

#### **I.4- Factores do hospedeiro vertebrado que poderão influenciar a transmissão e desenvolvimento do parasita no mosquito.**

Constituintes da refeição sanguínea tais como componentes do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado, ou fármacos antimaláricos, podem alterar a transmissão do parasita ao mosquito e o seu desenvolvimento esporogónico. Esse efeito poderá ser directo sobre o parasita ou indirecto, afectando a resposta do mosquito à infecção. A forma como os diferentes factores interagem entre si, como afectam o desenvolvimento do parasita e do mosquito, necessita ainda de ser melhor esclarecidos.

##### **I.4.1- Efeito da refeição sanguínea no desenvolvimento do parasita no mosquito.**

Ao longo da sua vida, o mosquito pode efectuar diversas refeições sanguíneas, infecciosas ou não, que podem ter um impacto no desenvolvimento parasitário de infecções já estabelecidas. Beier e colaboradores (1989) mostraram que uma segunda alimentação sanguínea levava a um desenvolvimento mais rápido dos oocistos, e a carga parasitária média foi mais alta em mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea (Lopes *et al.*, 2007). Noutro estudo observou-se que duas alimentações prévias à refeição sanguínea infectante, causaram um aumento na taxa de infecção (Okesh *et al.*, 2004). Embora pouco se saiba acerca do efeito de múltiplas alimentações na infecção, estes estudos parecem indicar que estas poderão ter um efeito positivo no desenvolvimento do parasita.

##### **I.4.2- Factores do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado presentes na refeição sanguínea.**

No intestino médio do mosquito os parasitas tornam-se extracelulares ficando expostos a componentes do sistema imunológico do vertebrado, que se poderão manter activos na refeição sanguínea durante algum tempo, ou mesmo atravessar o epitélio do mosquito até ao hemocélio. Estes componentes do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado podem assim contribuir para a destruição de parasitas no mosquito. A aglutinação de gâmetas dependente de anticorpos, a opsonização e fagocitose, a morte por mecanismos dependentes de NO e lise por acção de

complemento são mecanismos mediados por factores do hospedeiro que têm um impacto negativo no desenvolvimento esporogónico (revisto por Sinden *et al.*, 1996).

#### I.4.2.1- Anticorpos

Os anticorpos são um importante factor, do sistema imunológico do vertebrado e poderão afectar a transmissão do parasita, podendo bloquear ou mesmo potenciar o desenvolvimento do parasita no mosquito. Anticorpos presentes na refeição sanguínea poderão afectar o desenvolvimento do parasita, impedindo ou aumentando a transmissão. O impacto dos anticorpos não é observado apenas ao nível da refeição sanguínea já que anticorpos atravessam o epitélio e são detectados na hemolinfa (Vaughan e Azad, 1988). Anticorpos anti-CS são detectados na hemolinfa de *A. gambiae* até 36 horas depois da ingestão e até 3 dias ligados a esporozoítos (Vaughan *et al.*, 1988). A presença de anticorpos foi também detectada dentro das glândulas salivares por Beier e colaboradores (1989). Por outro lado num estudo com *A. stephensi* já não se detectam anticorpos às 24h (Vaughan *et al.*, 1990), o que indica que o efeito dos anticorpos poderá depender do mosquito vector.

Anticorpos anti-*Plasmodium* que podem suprimir a infecção por *Plasmodium* no mosquito, podem ter o efeito contrário quando em baixa concentração. Tal foi observado por Peiris e colaboradores (1988) em que anticorpos contra *P. vivax*, capazes de diminuir a transmissão tinham um efeito oposto quando em baixas concentrações. O mesmo efeito dependente do título de anticorpos foi verificado durante o desenvolvimento hepático de *Plasmodium yoelii* (Nudelman *et al.*, 1989) e em formas sanguíneas de *P. falciparum* (Jesuino *et al.*, 2006). Este efeito foi observado em trabalhos com outros microrganismos como vírus causador do dengue e *Toxoplasma gondii* (revisto em Nudelman *et al.*, 1989).

Vários antigénios de *Plasmodium* têm sido estudados com o intuito de produzir vacinas que induzem a produção de anticorpos capazes de bloquear a transmissão do parasita. Este estudo está centrado essencialmente em antigénios de superfície dos gâmetas extracelulares, do zigoto e do oocineto.

As proteínas Pf48/45 e Pf230, expressas na superfície dos gâmetas, têm sido usadas como alvo para a produção de anticorpos monoclonais, que reduzem a transmissão do parasita ao mosquito (Carter *et al.*, 1990; Read *et al.*, 1994; Outchkourov *et al.*, 2007; Outchkourov *et al.*, 2008). No entanto, o desenvolvimento destes candidatos a vacinas bloqueadoras de transmissão não avançou muito devido à dificuldade em isolar os epítomos para produzir material imunogénico eficiente por tecnologia recombinante *in vitro* (Carter, 2001).

Moléculas de superfície do zigoto ou oocinetos também foram estudadas com vista à produção de vacinas de bloqueio de transmissão. Duas destas proteínas são a P25 e P28,

especialmente a P25 que é neste momento o candidato mais estudado para a produção de vacinas de bloqueio de transmissão. Estudos usando quer soros, quer anticorpos monoclonais, contra a Pfs25 e Pvs25 mostraram a sua capacidade como alvo, para bloquear o desenvolvimento de *P. falciparum* e *P. vivax* respectivamente, no mosquito (Barr *et al.*, 1991; Arakawa *et al.*, 2003; Sattabongkot *et al.*, 2003; Arevalo-Herrera *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2006; Kubler-Kielb *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2007; Saul *et al.*, 2007) e a molécula TBV25H, baseada na Pfs25, entrou já em fase I de ensaio clínico (Malkin *et al.*, 2005).

Anticorpos específicos para outras proteínas de superfície do oocineto têm sido produzidos para estudar a função de diversas moléculas do parasita, tais como a quitinase, a WARP e a CTRP, e que demonstraram a capacidade de impedir a transmissão, inibindo fortemente o desenvolvimento esporogónico do *Plasmodium* (Abraham *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004).

### **Anticorpos anti-mosquito**

Para além de anticorpos contra o próprio parasita, anticorpos direccionados contra moléculas do mosquito poderão ser uma alternativa para interferir no desenvolvimento esporogónico do parasita.

Tecidos como o intestino, o corpo gordo ou as glândulas salivares, assim como moléculas do mosquito, foram usados como alvo para a produção de anticorpos que quando administrados aos mosquitos tiveram um efeito negativo sobre o desenvolvimento do parasita (Ramasamy e Ramasamy, 1990; Lal *et al.*, 1994; Srikrishnaraj *et al.*, 1995; Shahabuddin *et al.*, 1996; Ramasamy *et al.*, 1997; Brennan *et al.*, 2000; Lal *et al.*, 2001; Almeida e Billingsley, 2002; Suneja *et al.*, 2003; Dinglasan *et al.*, 2003; Dinglasan *et al.*, 2007a; Lavazec *et al.*, 2007).

Além dos efeitos observados no desenvolvimento de *Plasmodium*, verificou-se que anticorpos anti-mosquito, causaram uma redução da sobrevivência do mosquito (Ramasamy *et al.*, 1992; Almeida e Billingsley, 1998; Lal *et al.*, 2001; Almeida e Billingsley, 2002; Foy *et al.*, 2003) e da sua fecundidade (Ramasamy *et al.*, 1992; Almeida e Billingsley, 1998; Gakhar *et al.*, 2001; Lal *et al.*, 2001; Almeida e Billingsley, 2002; Gulia *et al.*, 2002; Suneja *et al.*, 2003; Gakhar *et al.*, 2005; Lavazec *et al.*, 2007).

Nalguns destes estudos foram caracterizadas as moléculas alvo e verificou-se que os anticorpos usados reconheciam antígenos glicosídicos demonstrando a importância das glicoproteínas no reconhecimento ou invasão do intestino médio pelos oocinetos (Lal *et al.*, 2001; Dinglasan *et al.*, 2003; Dinglasan *et al.*, 2007a). Além disso nas experiências realizadas por Lal e colaboradores (2001) anticorpos produzidos contra antígenos de *A. gambiae*, diminuíram a sobrevivência e reprodução de mais quatro espécies de mosquito do género *Anopheles* (*A. stephensi*, *A. albimanus*, *Anopheles freeborni* e *Anopheles farauti*) e também diminuíram a transmissão de *P.*

*falciparum* e *P. vivax* a várias destas espécies, indicando que existe um certo nível de conservação entre os epítomos das moléculas do intestino médio.

#### I.4.2.2- Sistema do complemento

O sistema do complemento é composto por um conjunto de proteínas solúveis, ou ligadas a membranas que servem como sensores e activadores do sistema imunológico. O sistema do complemento pode ser activado por complexos antigénio/anticorpo, lectinas que ligam a manose e ficolinas que se ligam à proteína C-reativa, resultando na activação de três vias distintas do complemento, normalmente designadas de via clássica, via das lectinas e a via alternativa. Contudo, todas elas culminam na activação da C3 (molécula 3 da via do complemento) que leva ao recrutamento de moléculas proinflamatórias, opsonização do agente patogénico e à formação do complexo de ataque de membrana (MAC). (revisito por Wills-Karp, 2007).

Vários estudos têm sido feitos de modo a avaliar possíveis efeitos de componentes deste sistema no desenvolvimento esporogónico do parasita. Foi demonstrado que vários componentes do sistema do complemento estão activos durante várias horas após a refeição sanguínea, inclusive o MAC, apesar da sua actividade se tornar cada vez mais fraca ao longo do tempo (Grotendorst e Carter, 1987; Margos *et al.*, 2001).

Por outro lado verificou-se que os zigotos parecem estar protegidos contra o complemento do seu hospedeiro normal nas primeiras horas. Os zigotos de *P. gallinaceum*, possuem componentes à superfície que os tornam resistentes à APC (via alternativa do complemento) da galinha, durante as primeiras seis horas (Grotendorst *et al.*, 1986).

A espécie de malária murina, *P. yoelii*, por outro lado, mostrou ser sensível a moléculas do complemento presentes na refeição sanguínea. Mosquitos *A. stephensi* alimentados em murganhos DBA/2 (deficientes em C5) mostraram um número de oocistos significativamente superior ao dos mosquitos alimentados em murganhos BDA/1 (não deficientes em C5), mais ainda quando o soro de DBA/2 foi suplementado com C5 os níveis de infecção foram semelhantes (Tsuboi *et al.*, 1995). Contudo, uma experiência semelhante, utilizando *P. berghei*, em estirpes de murganho DBA/2 e BALB/c (não deficiente em C5), não mostrou diferenças na infecção (Sinden *et al.*, 1996). As diferenças observadas poderão dever-se à velocidade com que o parasita se desenvolve no mosquito ficando mais ou menos tempo exposto às moléculas do complemento (Vaughan *et al.*, 1994; Tsuboi, 1995).

Em estudos *in vitro* com *P. falciparum*, observou-se a lise de gâmetas por efeito do complemento apenas na presença de anticorpos anti-Pfs230, um antigénio de superfície dos gametócitos e não na presença de outros antigénios específicos dessa fase sexual, tais como Pfs48/45 e Pfs 27/25 (Healer *et al.*, 1997). Um estudo mais recente usando soros de portadores

de gametócitos, dos Camarões, verificou a importância de anticorpos anti-Pfs230 no bloqueio de transmissão de *P. falciparum*, mas não observaram qualquer efeito devido à presença de complemento activo (Gouagna *et al.*, 2007).

Estes estudos demonstram que o efeito do complemento poderá variar de acordo com o estado imune do hospedeiro vertebrado e com a combinação parasita/mosquito usada, mas em geral não parece ser um factor determinante na transmissão.

#### **I.4.2.3- Leucócitos**

A refeição sanguínea não apresenta condições ideais para a actividade fagocítica, no entanto os parasitas, após activação e exflagelação dos gametas, podem ser fagocitados na refeição sanguínea, por neutrófilos e monócitos (Sinden e Smalley, 1976).

Lensen e colaboradores (1997) verificaram que a fagocitose de *P. falciparum* na refeição sanguínea no intestino médio do mosquito é mais elevada na presença de soros de áreas endémicas e que o bloqueio de transmissão de alguns desses soros está relacionado com a presença de leucócitos.

Estes estudos parecem indicar que a fagocitose na refeição sanguínea é dependente de anticorpos opsonizadores e embora possa ter algum efeito no bloqueio de transmissão é pouco provável que tenha um impacto significativo na infecção, quando existe um grande número de parasitas na refeição sanguínea. Mais ainda, os leucócitos não actuam de forma independente e a sua capacidade fagocitária pode variar conforme a presença de anticorpos, factores do complemento e citocinas presentes na refeição sanguínea (Lensen *et al.*, 1997; Naotunne *et al.*, 1993).

#### **I.4.2.4- Citocinas e NO**

No hospedeiro vertebrado, a resposta imune adaptativa à malária, depende essencialmente da imunidade mediada por citocinas libertadas por células T auxiliar (Th), Th1 e Th2. As células Th1 iniciam imunidade mediada por células necessária à eliminação de organismos intracelulares e a Th2 inicia resposta humoral (revisto em Luty *et al.*, 2000). A protecção contra a malária parece estar dependente da produção de níveis elevados de IL-12 (Luty *et al.*, 2000), e em diversos modelos (Gyan *et al.*, 1994; Jacobs *et al.*, 1995; Stevenson *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1996) parece ser mediada essencialmente pelo óxido nítrico (NO), que é induzido pelo TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Stevenson *et al.*, 1995; Yoshimoto *et al.*, 1998) e parece estar sob controlo da TGF- $\beta$  (Vodovotz, 1997). A NO é uma molécula efectora do sistema imunológico, conferindo uma protecção inespecífica contra diversos agentes patogénicos, e a sua produção é induzida pela iNOS (óxido nítrico sintetase induzível) (Fang, 1997).

Estas citocinas, em indivíduos infectados, poderão ter um efeito na transmissão do *Plasmodium* ao mosquito. Os gametócitos de *Plasmodium cynomolgi* são inactivados em macacos Toque, devido a TNF e IFN-g (Naotunne *et al.*, 1991), e gametócitos de *P. vivax* são inactivados por acção da IFN- $\gamma$  (Karunaweera *et al.*, 1992). No entanto estas citocinas necessitam de outros componentes “acessórios”, e Naotunne e colaboradores (1993) verificaram que em *P. falciparum* esse efeito é dependente de TNF, de NO e da presença de leucócitos.

Em *P. berghei* verificou-se que a transmissão a mosquitos *A. stephensi*, é mais alta antes de atingir o pico de gametocitémia, o que se deve ao desenvolvimento de propriedades de bloqueio de transmissão do soro dos murganhos a partir dos dias 4 e 5, e que esta propriedade é causada por factores do soro que não são anticorpos (Fleck *et al.*, 1994). A mesma propriedade foi observada em infecções de *P. yoelii* em que o soro do quinto dia de infecção apresenta bloqueio de transmissão que se verificou ser dependente de NO, pois o efeito foi revertido pela administração de monoacetato de N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMME), um inibidor específico de NO (Cao *et al.*, 1998a). Este efeito tem lugar no hospedeiro vertebrado e torna os gametócitos incapazes de produzir gâmetas (Cao *et al.*, 1998b).

Recentemente verificou-se ainda que o TGF- $\beta$ 1, regulador da iNOS no hospedeiro vertebrado, é ingerido e depois activado no intestino médio do mosquito de *A. stephensi*, onde é reconhecido pelas células do mosquito, induzindo a expressão NOS e conseqüente aumento de produção de NO (Luckhart *et al.*, 2003), que é um factor limitante da infecção no mosquito (Luckhart *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 2007).

### **I.4.3- Fármacos**

Os estudos de fármacos anti-maláricos têm sido desenvolvidos essencialmente por motivos clínicos, contra as fases assexuais do sangue, com acção eficaz especialmente contra esquizontes. Se infecções de *Plasmodium* forem tratadas com fármacos que não sejam gametocidas, os gametócitos persistirão durante vários dias no sangue.

O uso de fármacos gametocidas e/ou esporontocidas é importante para prevenir a transmissão do parasita. A primaquina é um fármaco bastante eficaz na eliminação de gametócitos quando usado em conjunto com sulfadoxina/pirimetamina (SP) e artesunato (Pukrittayakamee *et al.*, 2004; Shekalaghe *et al.*, 2007), mas não apresenta actividade esporozontocida (Teklehaimanot *et al.*, 1985).

Também terapias de combinação com artemisinina têm função de bloqueio de transmissão, reduzindo a gametocitémia e conseqüentemente a transmissão aos mosquitos, no entanto essa protecção pode não ser completa, visto após tratamento ainda serem detectados gametócitos a

nível sub-patente que podem contribuir para a transmissão (Targett *et al.*, 2001; Bousema *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2007).

Estudos com SP têm mostrado resultados antagónicos. Alguns estudos referem que a SP causa um aumento da gametocitémia, o que poderá ter um efeito positivo na transmissão (Putu e Manyando, 1997; Hogg *et al.*, 1998; von Seidlein *et al.*, 2001; Barnes e White, 2005). Outro estudo mostrou que o tratamento preventivo com SP é capaz de prevenir o aparecimento de gametócitos (Dunyo *et al.*, 2006) e outros trabalhos referem que a SP (Robert *et al.*, 2000) e a pirimetamina isoladamente (Teklehaimanot *et al.*, 1985) são esporonticidas.

A cloroquina, um fármaco usado à escala mundial durante muitos anos, potencia a transmissão do parasita ao mosquito (Enosse *et al.*, 2000), causando um aumento de gametócitos circulantes (Buckling *et al.*, 1997; Buckling *et al.*, 1999) e/ou aumentando a infectividade do parasita ao mosquito (Ichimori *et al.*, 1990; Hogg *et al.*, 1998; Buckling e Read, 1999; Abrantes *et al.*, 2005). Foi também demonstrado que a cloroquina afecta a expressão de genes do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado (Weber e Levitz, 2000; Weber *et al.*, 2002) e do mosquito (Abrantes *et al.*, 2005). O aumento da transmissão causado pela cloroquina é um dos factores apontados para que a resistência a este fármaco se tenha espalhado tão rapidamente, algo que provavelmente poderia ter sido evitado usando a cloroquina em combinação com um fármaco capaz de bloquear a transmissão, eliminando os gametócitos.

Vários outros fármacos têm capacidade de afectar a transmissão. A tafenoquina, afecta todas as fases de desenvolvimento do parasita (Ponsa *et al.*, 2003). O malarone, um fármaco que combina atovacona e proguanil, reduz significativamente a transmissão de *P. falciparum* e *P. berghei* (Enosse *et al.*, 2000).

O cicloguanil (Teklehaimanot *et al.*, 1985), assim como quatro diacetonas de dihidroacridina (Coleman *et al.*, 2001; Ponsa *et al.*, 2003) mostraram acção esporonticida. Várias outros compostos são gametocidas, tais como a riboflavina (Akompong *et al.*, 2000), a elubaquina que é análoga da primaquina (Puri e Dutta, 2005) e inibidores de pironaridina e de DNA topoisomerase II (Chavalitshewinkoon-Petmitr *et al.*, 2000).

A presença de fármacos poderá ser mais um factor a afectar a transmissão do *Plasmodium* ao mosquito vector, quer alterando o número e infectiosidade dos gametócitos quer afectando o desenvolvimento esporogónico, actuando a nível do parasita ou do mosquito vector.

#### **I.4.4- Outras infecções**

Em áreas endémicas é comum haver pessoas cronicamente infectadas com parasitas de diferentes genótipos (infecção múltipla), ou mesmo várias espécies de *Plasmodium* (infecção

mista), mas a questão de como cada população de parasitas altera o curso de infecção de outra está ainda muito pouco estudado.

Observações epidemiológicas parecem mostrar algum tipo de interação biológica entre *P. falciparum* e *P. vivax* (Haghdoost e Alexander, 2007). Vários estudos sugerem que infecções com outras espécies de *Plasmodium* poderão levar ao desenvolvimento de uma protecção imunológica suficiente para atenuar a gravidade clínica de infecções por *P. falciparum* (Black *et al.*, 1994; Maitland *et al.*, 1996; Luxemburger *et al.*, 1997; Price *et al.*, 1997), no entanto tal não é consensual e um estudo recente sugere que os mecanismos de aquisição de imunidade deverão ser diferentes, entre *P. vivax* e *P. falciparum* (Michon *et al.*, 2007). A produção de gametócitos de *P. falciparum* é aumentada pela infecção prévia ou concomitante de *P. malariae*, pelo contrário a infecção por *P. falciparum* não afecta ou leva a uma redução da produção de gametócitos por *P. malariae* (McKenzie *et al.*, 2002).

A análise da prevalência de infecções mistas em diversas áreas tem mostrado uma sub-representação da combinação *P. falciparum*/*P. vivax* (Maitland *et al.*, 1996; McKenzie e Bossert, 1997; McKenzie e Bossert, 1999) e em contraste parece haver um excesso de infecções mistas de *P. falciparum*/*P. malariae* (Barnish *et al.*, 1993; Pinto *et al.*, 2000; Arez *et al.*, 2003).

Arez e colaboradores (2003) observaram na Guiné-Bissau diferentes associações de espécies no hospedeiro Humano, onde a maior prevalência é da associação *P. falciparum*/*P. malariae*, em relação ao mosquito vector, onde a associação de maior prevalência é *P. falciparum*/*P. ovale*. Estes autores verificaram ainda que as infecções com *P. falciparum* em mosquitos apresentam menos variedade de genótipos que o hospedeiro humano.

Um estudo usando 3 clones diferentes de *Plasmodium chabaudi* mostrou que provavelmente a competição entre os clones é elevada diminuindo a taxa de crescimento dos parasitas, mas que por outro lado torna a infecção mais difícil de combater pelo sistema imunológico do hospedeiro vertebrado. Também a transmissão aos mosquitos foi mais baixa na infecção policlonal, sendo o número de gametócitos mais baixo na infecção múltipla (de Roode *et al.*, 2003). No entanto resultados contrários foram observados noutro estudo com dois clones distintos de *P. chabaudi*, onde o potencial de transmissão de infecções múltiplas foi mais alto do que o de infecções simples, verificando-se a existência de um maior número de gametócitos na infecção mista (Taylor *et al.*, 1997).

Estudos de infecções múltiplas de *P. chabaudi* com diferentes virulências têm mostrado uma tendência para selecção das estirpes mais virulentas (de Roode *et al.*, 2005) e que essa selecção é também dependente do hospedeiro vertebrado, verificando-se que as estirpes virulentas são preferencialmente seleccionadas em murganhos mais resistentes à infecção, enquanto que em murganhos menos resistentes a vantagem das estirpes mais virulentas é diluída (de Roode *et al.*,

2004; Raberg *et al.*, 2006). Também foi observado, em *P. chabaudi*, que a composição clonal no hospedeiro vertebrado é semelhante à observada no mosquito, implicando que a competição no hospedeiro vertebrado será determinante para o sucesso da transmissão (Taylor e Read, 1998; de Roode *et al.*, 2005)

A competição interespecífica entre *P. gallinaceum* e *Plasmodium juxtannucleare* foi observada, ao nível da fertilização na refeição sanguínea, sendo a transmissão de *P. gallinaceum* significativamente afectada. Esta interacção poderá ser importante ao ponto de definir restrição geográfica a *P. gallinaceum*, que não será capaz de se transmitir convenientemente em zonas de transmissão de *P. juxtannucleare* (Paul *et al.*, 2002).

Além de infecções mistas e múltiplas de *Plasmodium*, outras espécies de microorganismos poderão estar presentes no hospedeiro vertebrado e afectar a transmissão ao mosquito.

Em macacos observou-se que infecções com um micoplasma hemotrófico (Neimark *et al.*, 2002) e com *Haemobartonella sp.* (Contamin e Michel, 1999), influenciam a infecção de *P. falciparum*. Em ratos, *Haemobartonella muris* e *P. berghei* têm um efeito sinérgico, em que *P. berghei* activa *H. muris* latente e por sua vez *H. muris* causa um aumento da parasitémia de *P. berghei* (Hsu e Geiman, 1952). Segundo estes autores o efeito positivo sobre a infecção por *P. berghei* será provavelmente devido a um aumento da eritropoiese, como resposta à anemia causada por *H. muris*, que leva a um aumento de novos eritrócitos que são preferencialmente invadidos por *P. berghei*. Ott e Stauber (1967) verificaram que infecções de *P. chabaudi* em murganhos contaminados com *Eperythrozoon coccoides* se mantinham num nível baixo e crónico raramente resultando em morte, ao contrário de infecções na ausência de *E. coccoides* que são agudas e causam sempre a morte do murganho.

A co-infecção de parasitas helmintas com *Plasmodium* está ainda pouco estudada, especialmente o seu efeito na transmissão de *Plasmodium*. Vários estudos têm obtido resultados contraditórios, especialmente com *Ascaris* (Nematoda) e *Schistosoma* (Platihelminta), mostrando efeitos quer sinérgicos quer antagonistas (revisto em Mwangi *et al.*, 2006). Em murganhos, a filária *Litomosoides sigmodontis* potencia a infecção com *P. chabaudi*, provavelmente por alterar a resposta imune de Th1 para Th2 (Graham *et al.*, 2005). Um estudo recente com *Schistosoma hematobium*, que se verificou ser antagonista da infecção por *Plasmodium*, impedindo a agudização da doença em crianças, propõe que esta protecção se deve a um enriquecimento de uma resposta Th2 (Lyke *et al.*, 2006). Outros estudos verificaram que a co-infecção de murganhos com *P. yoelii* e *Echinostoma caproni* (Platihelminta) leva a um aumento de parasitémia de *P. yoelii* (Noland *et al.*, 2005) e a um aumento da transmissão a mosquitos *A. stephensi*, comparando com a transmissão a partir de murganhos com infecções simples de *P. yoelii* (Noland *et al.*, 2007).

Existem ainda poucos trabalhos acerca das infecções múltiplas e mistas, quer seja com diferentes espécies de *Plasmodium* quer seja com outras espécies de parasitas, de modo que pouco se sabe ainda sobre de que forma os parasitas interagem e como isso afecta a infecção. Esse conhecimento é ainda mais escasso quanto ao seu efeito na transmissão ao mosquito, ou sobre o efeito no desenvolvimento esporogónico.

### **I.5- Factores do mosquito**

O mosquito dispõe de diversos mecanismos de defesa, directa ou indirecta contra a invasão de agentes patogénicos, como é o caso de parasitas do género *Plasmodium*. Enzimas digestivas e membrana peritrófica serão consideradas como meios de defesa indirectos, mas o mosquito dispõe de outros sistemas de defesa que envolvem alterações no epitélio, e uma resposta imune produzida por diferentes órgãos como o intestino médio, hemócitos, corpo gordo e glândulas salivares.

#### **I.5.1- Matriz peritrófica e enzimas digestivas**

A matriz peritrófica do mosquito forma-se à volta da refeição sanguínea e é essencialmente constituída por quitina, proteínas e proteoglicanos. A sua função tem sido bastante discutida, podendo ter uma função de contenção, aglutinando a massa sanguínea, de forma a facilitar a digestão. Assim poderá possivelmente servir como primeira barreira a agentes estranhos presentes no sangue, como parasitas. Em *Aedes aegypti* verificou-se ainda que está ligada à destoxificação do heme, produzido durante a digestão da hemoglobina dos glóbulos vermelhos, que se liga à matriz peritrófica, atingindo um máximo de acumulo por volta das 48 horas pós-alimentação (Pascoa *et al.*, 2002).

A matriz peritrófica de *Ae. aegypti* difere na sua composição oligosacarídica (N-acetil glucosamina) da de *A. stephensi* (N-acetil galactosamina) (Rudin e Hecker, 1989). Estes autores sugerem que a composição da matriz peritrófica poderá influenciar a especificidade do parasita ao tipo de mosquito que infecta, visto apenas os mosquitos do género *Anopheles* serem capazes de suportar o desenvolvimento das espécies de *Plasmodium* que infectam o Homem.

Embora no modelo *P. gallinaceum/Ae. aegypti* se tenha observado que a matriz peritrófica reduz a infecção (Billingsley e Rudin, 1992) em geral a matriz peritrófica parece não ser um factor importante na infecção do mosquito por *Plasmodium* humano e murino.

As enzimas digestivas poderão ter um papel no desenvolvimento do *Plasmodium* (Feldmann *et al.*, 1990; Warbur e Miller, 1991; Shahabuddin *et al.*, 1995; Beier, 1998). O pico de produção de oocinetos de *P. falciparum* no intestino médio de mosquitos das espécies *A. gambiae*, *Anopheles freeborni* e *A. albimanus* dá-se na altura de actividade máxima das proteases e por isso os autores

advogam que as enzimas digestivas por si só não serão um factor limitante do desenvolvimento esporogónico (Chege *et al.*, 1996).

Shahabuddin e colaboradores (1995) verificaram que a inibição experimental da tripsina de *Ae. aegypti* bloqueia a transmissão de *P. gallinaceum*, pois o parasita produz uma quitinase, necessária para atravessar a matriz peritrófica, que é activada por essas proteases. Noutro estudo que comparou a actividade proteolítica de tripsina e aminopeptidase em estirpes de *Ae. aegypti* susceptível (Red) e refractárias (Moyo-R e Formosus) chegou-se à conclusão que esse factor não era determinante para definir a refractoriedade do mosquito (Kaplan *et al.*, 2001). As enzimas proteolíticas parecem ter dois efeitos opostos no sucesso de transmissão do parasita: por um lado danificam os oocinetos e por outro activam a sua quitinase, factor necessário para atravessar a matriz peritrófica. Assim, as enzimas digestivas poderão afectar o desenvolvimento do parasita mas não são um factor com impacto suficiente para determinar a susceptibilidade do mosquito (Chege *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 2001).

### **I.5.2- Resposta do mosquito à infecção. Sistema imunológico do mosquito.**

O sistema imunológico dos mosquitos é um sistema inato e actua essencialmente nos epitélios e no sistema circulatório aberto dos mosquitos (hemocélio), envolvendo os hemócitos e o corpo gordo. O sistema imunológico do mosquito usa, na defesa contra o *Plasmodium*, mecanismos desenvolvidos contra infecções bacterianas, mas no entanto alguns destes mecanismos parecem ser usados especificamente na resposta à infecção por *Plasmodium* e o sistema imunológico do mosquito tem mesmo a capacidade de apresentar respostas imunes diferenciadas contra diferentes espécies de *Plasmodium* (Tahar *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2006).

#### **I.5.2.1- Resposta epitelial do mosquito à invasão por *Plasmodium*.**

A invasão do epitélio do intestino médio de *A. stephensi* por oocinetos de *P. berghei* causa danos severos ao tecido epitelial, pois os oocinetos normalmente executam movimentos laterais, invadindo mais que uma célula. Como resposta a célula epitelial perde as microvilosidades e é induzida a expressão da NOS. A indução da NOS é um importante mecanismo de defesa do epitélio, capaz de limitar a sobrevivência do parasita (Luckhart *et al.*, 1998) através da produção de NO. As células epiteliais entram em apoptose, sendo normalmente expelidas para o lúmen do intestino médio (Han *et al.*, 2000). O gene da *Serpina 10* (*srpn10*) provavelmente está envolvida neste processo de resposta do epitélio, verificando-se a sua translocação do núcleo para o citoplasma, assim como um grande aumento de expressão, em *A. stephensi* e *A. gambiae* como resposta à infecção (Danielli *et al.*, 2005). À medida que a apoptose

avança a célula apresenta elevados níveis de nitratação e a *srpn10* é altamente expressa (Kumar *et al.*, 2004).

A resposta epitelial à invasão vai variar consoante o par parasita hospedeiro. No sistema *A. gambiae*/*P. berghei* não se verifica uma resposta do epitélio tão evidente como a observada em *A. stephensi*/*P. berghei*: há menos apoptose e não há extrusão celular sendo os parasitas mortos essencialmente por lise no espaço extracelular (Shiao *et al.*, 2006). A comparação da resposta de *Ae. aegypti* e *A. stephensi* demonstrou que as células danificadas são expulsas em ambos os mosquitos mas por diferentes mecanismos, verificou-se também que a resposta epitelial de *A. stephensi* a *P. berghei* é distinta da reacção a *P. gallinaceum* e da resposta de *Ae. aegypti* a *P. berghei* e *P. gallinaceum* (Gupta *et al.*, 2005). Por outro lado na combinação *A. stephensi*/*P. falciparum* observa-se a extrusão mais rápida das células, algumas ainda com oocinetos dentro, provavelmente devido à temperatura ambiente usada neste sistema experimental ser mais alta do que nas experiências com *P. berghei* (Baton e Ranford-Cartwright, 2004).

Foi ainda observada em diversos mosquitos e combinações de espécies a formação de uma zona fibrilar, sem organelos e rica em actina, no ponto de contacto das células epiteliais com o oocineto. Pensa-se que esta formação poderá ser uma resposta aos danos causados à célula ou mesmo um mecanismo de defesa, apesar de nunca ter sido provado o seu envolvimento na morte de parasitas (revisto por Shiao *et al.*, 2006).

### **I.5.2.2- Receptores de reconhecimento de padrões**

Em geral a resposta imune do mosquito inicia-se após a detecção de agentes “externos”, feita através de receptores que reconhecem padrões moleculares associados a agentes patogénicos, presentes em microorganismos mas não em células eucarióticas, tais como lipopolissacáridos (LPS), peptidoglicano (PGN) e  $\beta$ -1-3-glicanos (Christophides *et al.*, 2004).

Várias classes de receptores de padrões estão já identificadas em *Anopheles*. Algumas das principais classes estudadas são: proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRP); proteínas contendo tioester (TEP); proteínas que se ligam a bactérias gram(-) (GNBP); proteínas do sistema imunológico ricas em leucina (LRIM) e lectinas de tipo C (CTL) (Osta *et al.*, 2004a).

Os PGRPs podem ser solúveis ou transmembranares e em *A. gambiae* foram até agora descritos 7 PGRPs, 3 da subfamília PGRPs curtos (PGRP-S1, PGRP-S2 e PGRP-S3) e quatro da subfamília PGRPs longos (PGRP-LA, PGRP-LB, PGRP-LC e PGRP-LD) (Christophides *et al.*, 2002). O PGRP-LB é sobrerregulado por infecção com *P. berghei*, mantendo um elevado nível de expressão ao longo de todo o ciclo de vida do parasita (Dimopoulos *et al.*, 2002; Christophides *et al.*, 2002).

A generalidade dos GNBP são sobrerregulados após infecções bacterianas. Em *A. gambiae* foram até agora descobertas 6 possíveis GNBP, que estão divididas em 2 sub-famílias, a A à qual pertencem todas a GNBP descritas para *Drosophila* e a família B que é específica de mosquitos (Christophides *et al.*, 2002). Warr e colaboradores (2008) caracterizaram as diferentes GNBP de *A. gambiae* mostrando que a GNBPB4 é um componente importante na defesa contra vários patogénios estando envolvido na resposta contra bactérias e *P. berghei* enquanto as outras GNBP serão mais específicas na sua acção, como a GNBPBA2 e a B3 terão um papel importante na defesa contra *P. berghei* e *P. falciparum*.

A TEP1 inclui um motivo tioester altamente conservado em relação ao da C3, componente principal do sistema do complemento em mamíferos, e ao da  $\alpha$ -2-macroglobulina, e possui actividade tipo opsonina promovendo a fagocitose de bactérias por hemócitos (Levashina *et al.*, 2001). Em *A. gambiae* a TEP1 é essencial para a morte de parasitas (Blandin *et al.*, 2004; Shiao *et al.*, 2006) e também para a sua melanização (Shiao *et al.*, 2006). O gene da *TEP4* é também imunoregulado em *A. gambiae*, respondendo especificamente à infecção por *P. berghei* e não a bactérias (Oduol *et al.*, 2000).

As moléculas CTLMA2 (lectina de tipo C que se liga à manose) e CTL4 parecem ter um efeito agonista para o parasita e quando são silenciados verifica-se um grande aumento de melanização em estirpes de *A. gambiae* que geralmente não melanizam o parasita (Osta *et al.*, 2004b).

A LRIM1, tem grande impacto no desenvolvimento do parasita no mosquito vector e a sua acção parece estar de alguma forma relacionado com a das CTLMA2 e CTL4 (Osta *et al.*, 2004b). A expressão destas duas lectinas tipo C e do gene *LRIM1* é aumentada às 24h pós-infecção na carcassa de mosquito onde são substancialmente mais expressas do que no intestino médio. O aumento de expressão às 24 h, na altura em que os oocinetos estão a atravessar o epitélio do intestino médio, pode indiciar um mecanismo de sinalização ainda desconhecido entre os órgãos de mosquito (Osta *et al.*, 2004b). O LRIM1 verificou-se ainda estar envolvido na melanização (Warr *et al.*, 2006).

### **I.5.2.3- Modulação de sinal e transdução**

O próximo passo da resposta, geralmente passa pela modulação de sinal e transdução, desencadeado pelo reconhecimento de moléculas estranhas.

#### **Modulação de sinal**

O sinal desencadeado pelo reconhecimento de moléculas estranhas é amplificado inicialmente por uma cascata proteolítica, em que proteases serínicas amplificam o sinal,

activando outras proteínas por clivagem. Nesta cascata são muito importantes as proteases serínicas com domínio CLIP, que estão envolvidas no processo que leva à expressão de péptidos antimicrobianos (Gorman *et al.*, 2000b; Ligoxygakis *et al.*, 2002), coagulação (Gorman e Paskewitz, 2001) e melanização (Gorman *et al.*, 2000b; Paskewitz *et al.*, 2006) na hemolinfa. As proteases serínicas de domínio CLIP foram divididas em quatro subclasses: CLIPA, CLIPB, CLIPC e CLIPD.

As proteases serínicas de *A. gambiae* CLIPB1, CLIPB4, CLIPB9, CLIPB14 e CLIPB15 estão envolvidas na resposta imune tanto a bactérias gram(-) como a *Plasmodium* (Gorman *et al.*, 2000a; Gorman *et al.*, 2000b; Volz *et al.*, 2005). Várias proteínas de domínio CLIP têm ainda importantes papéis na melanização: as CLIPA2, CLIPA5 e CLIPA7 suprimem a melanização, enquanto a CLIPA8 e as CLIPB3, CLIPB4 e CLIPB17 têm efeito positivo na melanização (revisto por Barilla-Mury, 2007), o efeito de diversas destas proteínas é, no entanto variável de acordo com a estirpe de mosquito estudada.

A amplificação de sinal pelas cascatas enzimáticas de proteases serínicas está sob controlo das serpinas (inibidores de proteases serínicas), que actuam como substratos irreversíveis fazendo ligações covalentes com o local activo da enzima. Três serpinas (srpn1, srpn2 e srpn3) de *A. gambiae* foram estudadas por genética reversa (RNAi) e quando a srpn2 foi silenciada, observou-se um grande aumento na melanização e diminuição drástica do desenvolvimento de oocinetos para oocistos (Michel *et al.*, 2005). O silenciamento com dsRNA da expressão da srpn6, que é normalmente produzida nas células do epitélio do mosquito como resposta à infecção por *Plasmodium*, leva a que os oocinetos sejam mortos de forma mais lenta e ao mesmo tempo causam um aumento da melanização em conjunto com a CTL4 (Abraham *et al.*, 2005).

### **Transdução de sinal**

Em *Drosophila* foram identificadas duas vias principais de transdução de sinal: a via Toll e a via Imd (revisto por Hoffmann e Reichhart, 2002). A caracterização destas vias em *Drosophila* permitiu um avanço mais rápido do estudo destas vias em *Anopheles* (ver figura I.3).

A via Toll é activada após clivagem proteolítica da proteína Spaetzle que se liga directamente ao receptor de membrana Toll. O Toll tem um domínio intracitoplasmático, o TIR (Toll II-1R) que após activação recruta 3 proteínas com o domínio death: MyD88, Tube e Pelle, funcionando as duas primeiras como adaptadores. Este complexo sinaliza dois factores de transcrição tipo Rel/NFκB: Dorsal e Dif, causando a dissociação do Cactus, uma proteína inibidora. A Dif está essencialmente ligada à activação da expressão de genes efectores da resposta imune ao ser translocada para o núcleo após dissociação do Cactus (revisto em Osta *et al.*, 2004a).

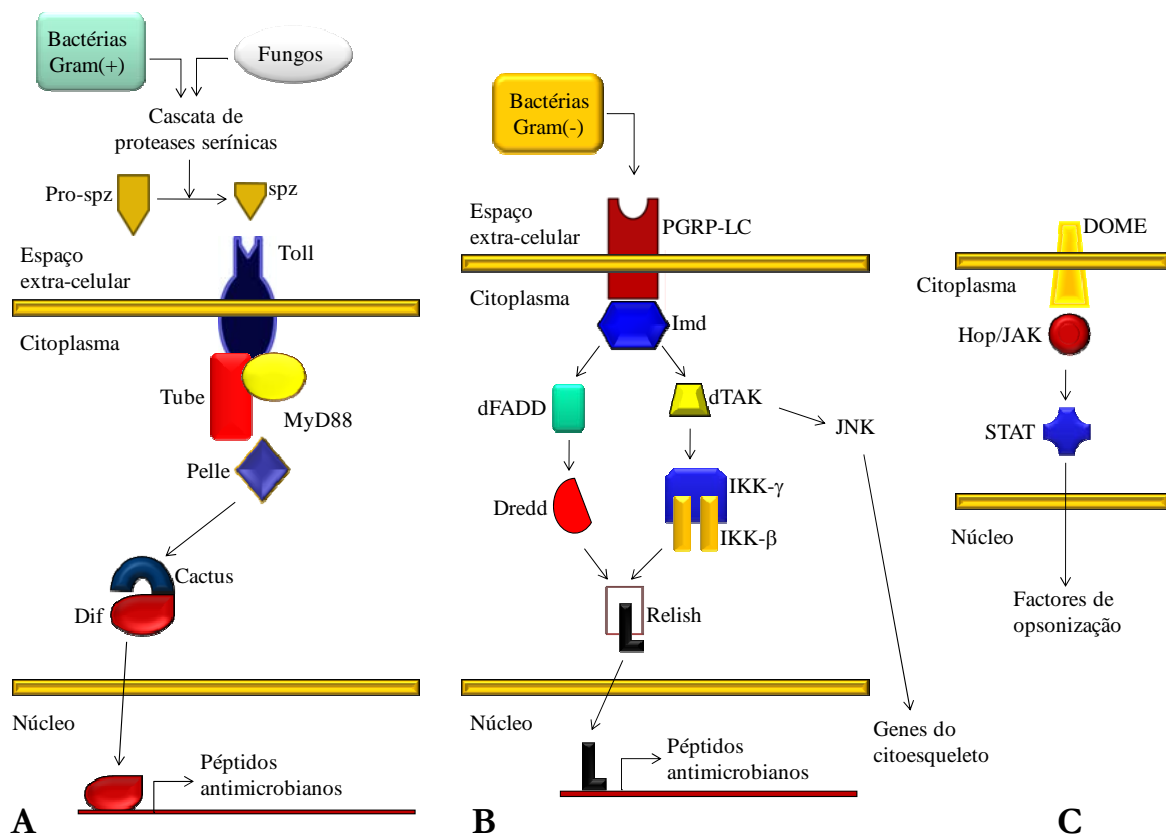


Figura I.3- Esquema simplificado das vias de transdução de sinal do sistema imunológico de *Drosophila*. A- Via Toll; B- Via Imd; C- Via JAK/STAT.

Em *A. gambiae* apesar de terem sido identificadas 10 proteínas semelhantes ao Toll e 6 semelhantes à Spaetzle, assim como a MyD88, Tube e Pelle, nenhum homólogo de Dif foi encontrado em *A. gambiae*. A Rel1 que é um ortólogo no mosquito da Dorsal, foi caracterizado e verifica-se que se transloca para o núcleo após infecção bacteriana, mas não por *Plasmodium*.

Em *Drosophila* a via Imd é ativada por infecção com bactérias gram(-) que leva à clivagem de outra proteína da família Rel/NFκB, a Relish, provavelmente através da caspase Dredd, que leva à libertação do domínio de homologia com o Rel, da Relish do seu domínio inibitório C-terminal. Ainda não é claro qual o receptor transmembranar desta via mas o PGRP-LC parece estar envolvido no processo (Osta *et al.*, 2004a). A activação intracelular da via inicia-se com o recrutamento de Imd, uma proteína com domínio death. O processo entre a activação da Imd e a activação do Relish provavelmente envolve a dTAK1 (uma proteína cinase) e a dFADD (uma proteína com domínio death).

Em *A. gambiae* a Rel2 foi identificada como ortóloga da Relish (Osta *et al.*, 2004a) e produz duas formas por splice alternativo: a Rel2-f (longa) e a Rel2-s (curta), estando cada uma dessas

formas ligadas à resposta imune contra bactérias gram(+) e gram(-), respectivamente. Verificou-se ainda que a cascata de sinalização Imd/Rel2-f limita a intensidade da infecção do mosquito por *P. berghei* (Meister *et al.*, 2005). O mesmo estudo mostrou também que a via de sinalização imune Imd e o Rel2-f regulam, entre outros, a expressão dos péptidos antimicrobianos Cecropina-1, Cecropina-3 e Gambicina-1 e do LRIM1 (Meister *et al.*, 2005).

Outra via, denominada de JAK/STAT, poderá também estar envolvida na resposta imune. Esta via existe nos mamíferos e já foi identificada em *Drosophila* essencialmente com funções no desenvolvimento embrionário (Christophides *et al.*, 2004). Esta via inclui um receptor, denominado de DOME que é activado por uma molécula tipo citocina, levando à sua fosforilação pela proteína cinase associada ao receptor, a JAK. Esse processo leva à activação do STAT citoplasmático que é depois translocado para o núcleo onde activam a expressão de diversos genes (Christophides *et al.*, 2004). A primeira evidência do envolvimento desta via na resposta imune, em insectos, foi devido à observação da translocação do gene STAT1 de *A. gambiae*, para o núcleo de células do corpo gordo, após infecção bacteriana (Barillas-Mury *et al.*, 1999).

#### I.5.2.4- Mecanismos efectores

Existem vários mecanismos efectores, com o objectivo de eliminar agentes patogénicos (figura I.4). Estes mecanismos podem ser celulares ou humorais.

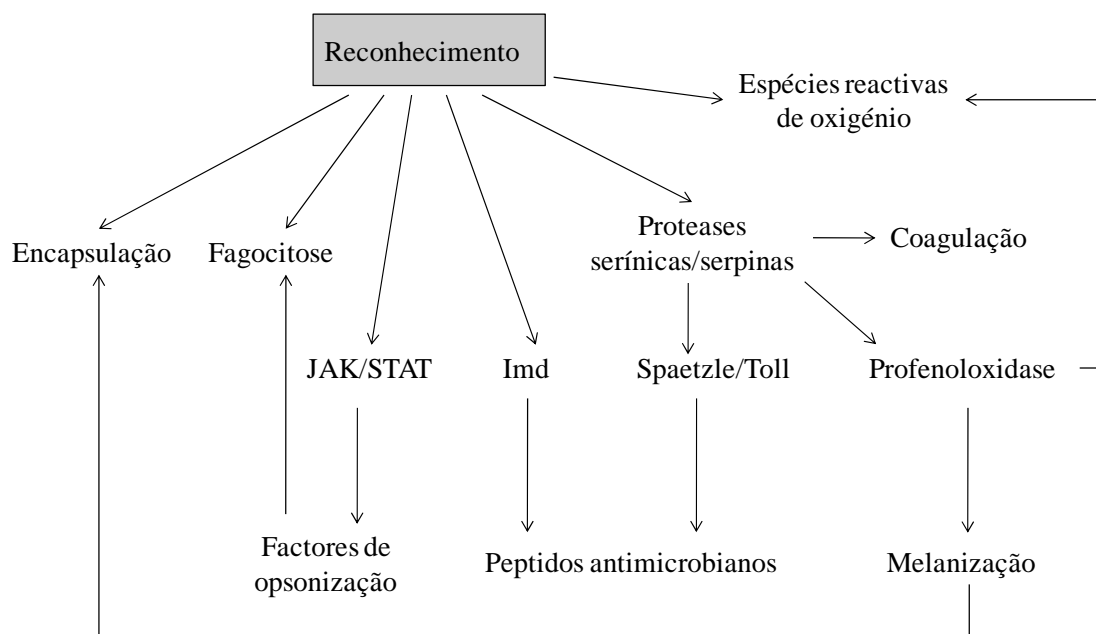


Figura I.4- Esquema geral da resposta imunológica de *Drosophila* (adaptado de Tzou *et al.*, 2002).

A fagocitose é um mecanismo efector, que é realizado por hemócitos que fagocitam patogéneos e células apoptóticas. Em *A. gambiae* verificou-se que a TEP1 tem uma actuação tipo opsonina do sistema do complemento, promovendo a fagocitose de bactérias gram(-) (Levashina *et al.*, 2001).

Outro mecanismo celular é a encapsulação celular, em que os hemócitos formam uma cápsula de várias camadas à volta de invasores de grande tamanho, normalmente parasitários, no hemocélio, resultando no isolamento, imobilização e morte por asfíxia, oxidação e melanização do invasor (revisto por Osta *et al.*, 2004a).

A coagulação é um processo humoral, em geral de resposta a ferimentos, impedindo a infecção estancando a saída de hemolinfa e contribuindo para a cicatrização. Esta resposta apenas recentemente foi identificada em larvas de *A. gambiae* (Agianian *et al.*, 2007).

A melanização é também um processo humoral que não necessita do envolvimento de hemócitos, e está envolvida na regeneração de lesões e sequestração de invasores. Este mecanismo é desencadeado pela activação proteolítica de profenoloxidase (PPO) em fenoloxidase (PO), que por sua vez oxida substâncias fenólicas tais como tirosina, L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina) e dopamina em melanina. Em *A. gambiae* foram identificados 9 genes que codificam PPOs (PPO1 a PPO9) (Christophides *et al.*, 2002). A melanização foi até recentemente considerada um processo importante na resposta imune dos mosquitos tornando-os refractários. No entanto estudos recentes têm apontado teorias contraditórias em que a melanização é cada vez mais vista como um processo de cicatrização e não como um processo que mata activamente os parasitas (Michel *et al.*, 2006; Shiao *et al.*, 2006), apesar de trabalhos anteriores indicarem o contrário (Michel *et al.*, 2005). O silenciamento dos genes *Fz2 (frizzled-2)* e *Cdc42 (cell division cycle 42)* afecta a melanização mas não tem qualquer efeito na morte dos parasitas (Shiao *et al.*, 2006). O seu papel, como causa ou efeito da morte do parasita, poderá eventualmente ser dependente da estirpe (Barillas-Mury, 2007).

Os péptidos antimicrobianos são uma resposta humoral, activada pelas vias de transdução de sinal e são produzidos pelo corpo gordo e secretados para a hemolinfa ou então secretados pelo epitélio durante a resposta local. Em *Anopheles* vários péptidos antimicrobianos foram identificados: quatro defensinas, quatro cecropinas, uma atacina, uma gambicina. A defensina é uma molécula efectora primária, produzida pelos mosquitos em resposta à invasão por bactérias ou *Plasmodium*, em *A. gambiae* (Eggleston *et al.*, 2000), parecendo ser o oocineto a fase mais susceptível a este péptido anti-microbiano (Lowenberger *et al.*, 1999). A expressão do gene da

*cecropina 1* é também significativamente sobrerregulada pela infecção por *P. berghei* (Christophides *et al.*, 2002). A gambicina é um péptido antimicrobiano identificado apenas em *Anopheles* e *Aedes*, e a sua expressão é activada por *E. coli* e também, de forma fraca, pela infecção por *P. berghei* (Vizioli *et al.*, 2001).

A expressão de alguns péptidos anti-microbianos como a cecropina 3, gambicina e defensina assim como outras moléculas que englobam reconhecimento (LRIM1 e PGRPLC3) e modulação do sinal (CLIPB14) envolvidos na resposta a *Plasmodium* parecem ser reguladas pelo factor de transcrição Rel2 através da via de sinalização Imd (Meister *et al.*, 2005) sugerindo um papel desta via na resposta ao *Plasmodium*.

O sistema imunológico do mosquito é visto actualmente como uma possível ferramenta no controlo da malária, de modo que a identificação dos mecanismos efectores, que são eficazes no controlo do desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito, seria um passo importante para o desenvolvimento de mosquitos refractários.

# Capítulo II

## Objetivos

---



## II.1- OBJECTIVOS

O estudo do desenvolvimento esporogónico, em todos os seus componentes, é essencial para o desenvolvimento de novas e mais eficazes estratégias de controlo da malária. Sendo um sistema multifactorial é necessário compreender as interacções do parasita com ambos os hospedeiros, vertebrado e invertebrado, assim como as interacções entre os próprios parasitas. Consequentemente pretendeu-se com este trabalho analisar o efeito de diferentes componentes da refeição sanguínea e a presença de infecções concomitantes por outra espécie de *Plasmodium* no desenvolvimento esporogónico de *Plasmodium* ao nível do parasita e do mosquito vector.

### II.1.1-Objectivos específicos:

- 1- Caracterizar o efeito de múltiplas refeições sanguíneas e do seu estado imunológico no desenvolvimento esporogónico, através da identificação de genes do parasita e do vector, cuja expressão está alterada pela presença de soro imune anti-*Plasmodium* na refeição sanguínea.
- 2- Optimizar um método de produção de oocinetos de *P. falciparum*.
- 3- Caracterizar o efeito da infecção mista no desenvolvimento esporogónico
  - a) Dinâmica de infecções mistas de *P. falciparum* e *P. vivax* em mosquitos *A. albimanus*.
  - b) Estudo da resposta imune do mosquito à infecção individual ou concomitante destas duas espécies.



# Capítulo III

Efeito do soro imune anti-esporozoíto na  
transmissão de *Plasmodium yoelii yoelii* a  
*Anopheles stephensi*.

---



### III.1- INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por um parasita do género *Plasmodium*, que é transmitida por um mosquito geralmente do género *Anopheles*. O ciclo esporogónico inicia-se quando uma fêmea *Anopheles* se alimenta de sangue infeccioso. A alimentação sanguínea é uma mistura complexa e a sua composição pode afectar o desenvolvimento da infecção. Moléculas do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado, metabolitos de fármacos anti-maláricos e a presença de mais do que uma espécie ou genótipo de parasita são alguns dos factores que podem afectar o desenvolvimento esporogónico do parasita.

O sistema imunológico do vertebrado pode bloquear a transmissão de *Plasmodium* ao mosquito, e em muitos estudos foi observado o efeito negativo sobre a transmissão de anticorpos anti-*Plasmodium* (Carter *et al.*, 1990; Arakawa *et al.*, 2003; Abraham *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Gouagna *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2007) e de anticorpos anti-mosquito (Lal *et al.*, 2001; Almeida e Billingsley, 2002; Suneja *et al.*, 2003; Dinglasan *et al.*, 2003; Dinglasan *et al.*, 2007a; Lavazec *et al.*, 2007).

Os anticorpos anti-*Plasmodium*, produzidos pelo hospedeiro vertebrado podem estar presentes numa alimentação sanguínea infecciosa assim como em sangue de alimentações subsequentes do mosquito. Esses anticorpos atravessam o epitélio do intestino médio e podem ser detectados na hemolinfa de mosquitos *Anopheles* (Vaughan e Azad, 1988; Beier *et al.* 1989; Vaughan *et al.* 1990;). Anticorpos anti-CS são detectados até 24 horas pós-alimentação, na hemolinfa de *A. stephensi* (Vaughan e Azad, 1988; Vaughan *et al.* 1990), até 36 horas na hemolinfa de *A. gambiae* e até 3 dias depois de ligados aos esporozoítos (Beier *et al.* 1989).

Contudo o bloqueio de transmissão por anticorpos parece ser dependente da quantidade e o efeito oposto foi observado com o uso de anticorpos em baixa concentração. Vaughan e colaboradores (1988) verificaram que quando mosquitos infectados foram alimentados artificialmente, por membrana, com soro contendo anticorpos anti-esporozoíto, o número de esporozoítos recuperados das glândulas salivares, assim como a sua infectividade, foi maior do que em mosquitos alimentados em soro naïve. Verificou-se também que anticorpos anti-*Plasmodium* que podem suprimir a infecção de *P. vivax* têm o efeito contrário quando em baixas concentrações (Peiris *et al.* 1988), sendo o mesmo observado com soro diluído de indivíduos imunes em infecções com *P. vivax* (Gamage-Mendis *et al.* 1992) e *P. falciparum* (Graves *et al.* 1988).

Anticorpos adquiridos naturalmente ou através de vacinas poderão assim ter um efeito importante não só para a resposta individual à malária mas também na transmissão, podendo mesmo aumentá-la de forma indesejada, o que pode ter grande impacto na implementação de vacinas e no controlo da malária em regiões endémicas.

Até agora o sucesso do controlo da malária em diversas regiões do planeta tem sido muito reduzido, especialmente porque não existem vacinas eficazes na prevenção da infecção por *Plasmodium*. Métodos de bloqueio de transmissão de *Plasmodium* que sejam capazes de impedir o desenvolvimento do parasita no próprio mosquito, poderão ser de crucial importância no controlo da malária.

Com este trabalho pretendeu-se estudar como é que sucessivas alimentações sanguíneas e a presença de anticorpos anti-*Plasmodium* de *Rattus rattus*, afectam o desenvolvimento esporogónico de *Plasmodium yoelii yoelii*. Para tal foi usado um método que permite identificar genes diferencialmente expressos após determinado tratamento: *differential display* PCR (DDRT-PCR) (Schroeder *et al.* 1999). Com esta técnica foram identificados genes diferencialmente expressos de *Plasmodium* e *Anopheles*, após tratamento com soro imune contendo anticorpos anti-esporozoíto. A identificação desses genes e o modo como a sua expressão é afectada pelo soro imune poderá ajudar a perceber quais os mecanismos moleculares que estarão por trás de alterações de infectividade e desenvolvimento da infecção. De modo a verificar se os efeitos observados são semelhantes mesmo com diferentes hospedeiros vertebrados, foram também realizadas algumas experiências com soro anti-*Plasmodium* originário de *Mus musculus*.

## III.2 – MATERIAL E MÉTODOS

### III.2.1- Manutenção e infecção de mosquitos

Mosquitos *A. stephensi* adultos foram mantidos a 25°C, com 65% de humidade, com um ciclo diário de 12 horas luz/escuro. Os mosquitos foram alimentados com uma solução de 10% glucose e 0,5% de PABA.

Os mosquitos foram infectados com *P. yoelii yoelii*, clone 17XL por picada directa em murganhos *M. musculus*, da estirpe CD1, infectados. Os mosquitos não alimentados foram descartados.

Murganhos com 5 a 8 semanas, obtidos e mantidos no biotério do IHMT, de acordo com as normas da União Europeia (86/609/CEE), reconhecido na lei Portuguesa (DR DL129/92 e Portaria 1005/92) foram inoculados intraperitonealmente com  $10^7$  eritrócitos infectados por mililitro. A infecção foi controlada regularmente pela análise de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa a 15%, durante cerca de 20 minutos. Os murganhos usados para infecção de mosquitos apresentavam exflagelação e tinham preferencialmente parasitémias entre 10 e 20%. Os parasitas *P. yoelii yoelii* 17XL foram obtidos do *Institute of Cell, Animal and Population Biology*, da Universidade de Edimburgo e mantidos por passagem sanguínea até ao máximo de 6 passagens consecutivas, altura em que os murganhos foram infectados através da infecção por picada directa de mosquitos, para subsequentes passagens sanguíneas.

### III.2.2- Produção do soro imune

Ratos da espécie *R. rattus* e murganhos da espécie *M. musculus*, estirpe BALB/c foram infectados por picada directa de mosquitos *A. stephensi* infectados com *P. yoelii yoelii*. A infecção foi monitorizada por esfregaços sanguíneos (como descrito anteriormente) até se detectar formas sanguíneas. Uma vez atingida a patência, os ratos e murganhos foram tratados por via oral com uma dose de 20 mg/kg de pirimetamina, por dia, durante 3 dias seguidos. O mesmo protocolo foi repetido mais duas vezes, sendo as infecções realizadas com pelo menos 10 dias de intervalo após tratamento com pirimetamina.

Após 3 ciclos de infecção/tratamento bem sucedidos, os animais foram anestesiados com uma injeção i.p. de 40 µl de uma mistura 1:1 de Imalgene 1000 (quetamina 1g/ml) (Merial) e Rompun 2% (Bayer). O sangue foi recolhido por punção cardíaca sem anticoagulante. Os animais foram depois sacrificados, ainda sob efeito da anestesia, por deslocação cervical.

O sangue ficou cerca de 30 minutos em gelo, de forma a coagular, foi depois centrifugado 5 minutos a 3000 g e o soro recolhido. O título de anticorpos anti-esporozoíto foi determinado por imunofluorescência indirecta (IFA), usando como antigénio esporozoítos fixados em lâminas.

O soro foi aplicado nos poços em diluições seriadas seguido de anticorpos conjugados com fluoresceína específicos para IgG de *M. musculus* (Sigma) e IgG de *R. rattus* (Sigma).

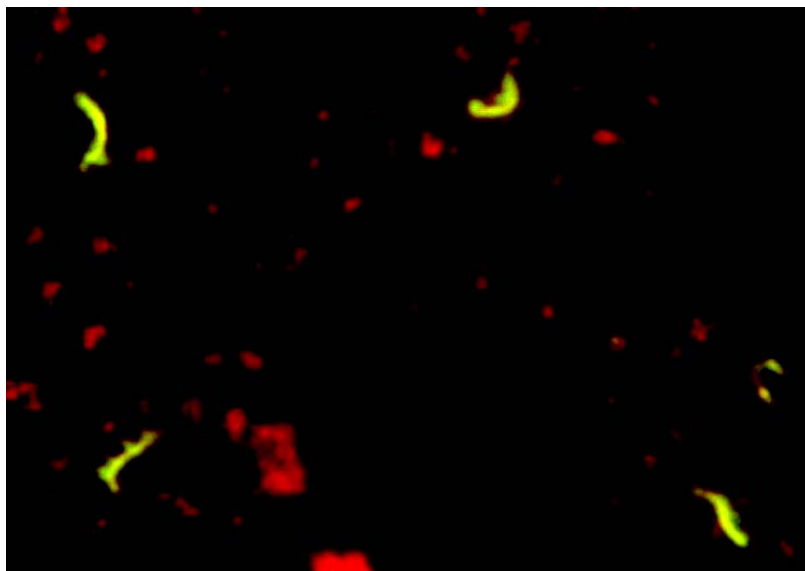


Figura III.1– Esporozoítos fluorescentes, marcados por anticorpos pelo método de IFA.

O soro de *M. musculus* foi recolhido de vários animais e misturado no mesmo lote, que foi usado nas várias experiências realizadas. No caso do soro de *R. rattus* o soro usado foi todo recolhido de apenas um animal. O título de anticorpos anti-esporozoíto foi detectado por IFA (figura III.1), sendo o título de anticorpos de *M. musculus* de 1:400 e o de *R. rattus* de 1:8000.

### III.2.3- Segunda alimentação sanguínea dos mosquitos infectados com soro imune e não imune

Ao terceiro dia pós-infecção os mosquitos infectados foram divididos em quatro grupos, em gaiolas individuais, sendo 3 deles alimentados de novo por alimentação artificial de membrana, do seguinte modo: grupo controlo (C)- mosquitos alimentados com sangue de indivíduos não imunes; grupo soro imune (SI)- mosquitos alimentados com o mesmo sangue do grupo controlo, mas em que o plasma foi totalmente substituído por um volume equivalente do soro imune obtido anteriormente (ponto III.2.2.); grupo soro imune diluído (SID)- mosquitos alimentados com o mesmo sangue do grupo controlo, mas em que metade do plasma foi substituído por um volume equivalente do soro imune obtido anteriormente (ponto III.2.2.). Os mosquitos não alimentados foram descartados. O quarto grupo não foi alimentado (NA) e foi mantido como controlo sem segunda alimentação.

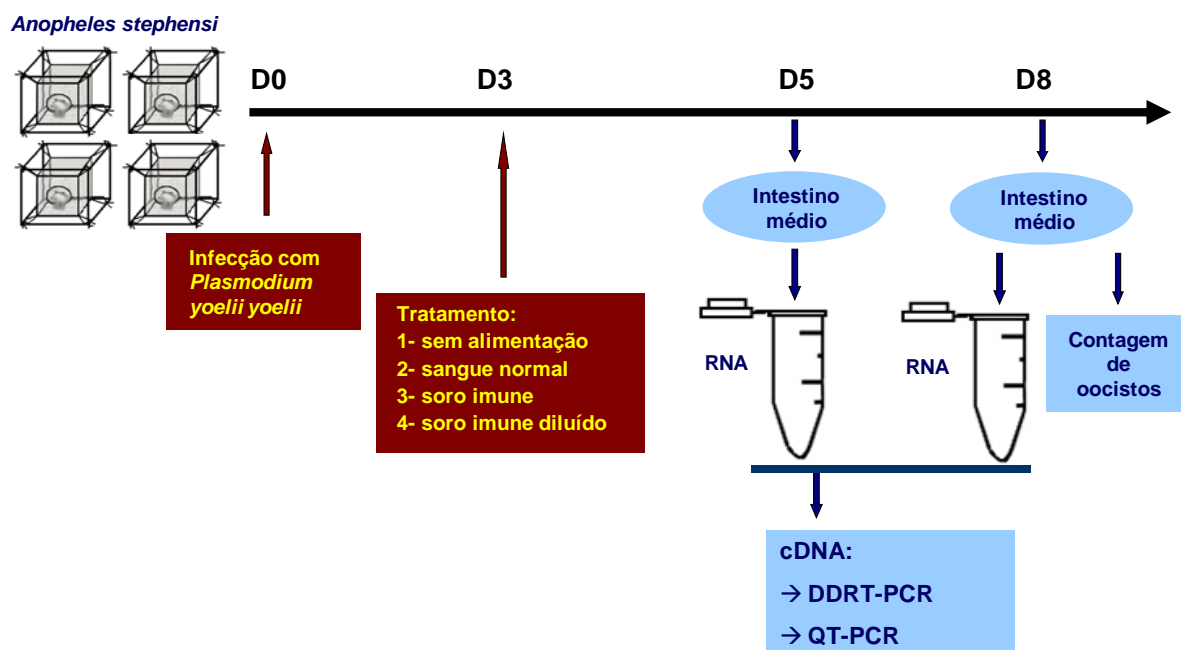


Figura III.2– Desenho experimental, para determinar o efeito do soro imune anti-esporozoíto no desenvolvimento e expressão génica do parasita e mosquito hospedeiro.

Ao quinto dia (D5) da infecção, 48h após a segunda alimentação, intestinos médios de mosquitos de cada um dos quatro tratamentos foram recolhidos, para um tubo de 1,5 ml com 500 µl de PBS, para extração de RNA. Os tubos foram centrifugados 10 minutos a 12000g e o PBS descartado. Os intestinos médios foram esmagados em 500 µl de Trizol (Invitrogen, Espanha) com homogeneizadores plásticos, sendo depois adicionado mais 500 µl de Trizol. As amostras foram depois guardadas a -70 °C para posterior extração de RNA.

Ao oitavo dia pós infecção (D8) este procedimento foi repetido e foram também recolhidos intestinos médios para determinação da intensidade e taxa de infecção (número de mosquitos infectados e quantidade de oocistos por mosquito, respectivamente). O desenho experimental encontra-se esquematizado na figura III.2.

Foram realizadas quatro experiências independentes com soro de *R. rattus* e três com soro de *M. musculus*, no entanto uma das experiências realizadas com *M. musculus* produziu poucos mosquitos infectados e apenas foi usada para contagens de oocistos.

#### III.2.4- Extração e purificação de RNA

O RNA celular total foi extraído dos intestinos médios recolhidos, pelo método de Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, e foi depois tratado com DNaseI (Invitrogen) usando 1U por cada µg de RNA para remover potencial contaminação com DNA genómico. Após este tratamento foi efectuada uma nova purificação usando o método de

fenol/clorofórmio, para o que se adicionou 40 µl de uma mistura de fenol/clorofórmio (3:1), as amostras foram agitadas no vórtex e deixadas 10 min em gelo. As amostras foram depois centrifugadas durante 5 minutos a 13000 g, a 4 °C. A fase superior aquosa foi recolhida e o RNA foi precipitado adicionando 5 µl de 3 M acetato de sódio e 200 µl de isopropanol e deixado pelo menos 1 hora a - 80 °C. Depois as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 13000 g, a 4 °C. O sobrenadante foi removido, o depósito foi lavado com 0,5 ml de etanol a 70 % e as amostras foram de novo centrifugadas durante 5 minutos a 13000 g, a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e o RNA foi diluído em 10 µl de água.

### **III.2.5- Produção de cDNA por transcrição reversa**

Uma porção do RNA total (0,4 - 1 µg) foi transcrito reversamente num volume de reacção de 20 µl, contendo tampão de reacção (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT); 20 µM de dNTPs; 0,2 µM de oligo-d(T)<sub>15</sub> (Roche Molecular Biochemicals, Portugal) ou 3 oligo-dTs ancorados diferentes (H-T<sub>11</sub>A, H-T<sub>11</sub>G, H-T<sub>11</sub>C) do kit GenHunter RNAimage (GenHunter, EUA) e 100 U MMLV-RT (Promega).

### **III.2.6- DDRT-PCR usando marcação radioactiva**

O cDNA foi usado para amplificação e marcação radioactiva por PCR, num volume total de 10 µl, contendo 75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween 20; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 µM dNTPs; 0,2 µM de cada um dos oligo-dTs ancorados usados previamente na síntese de cDNA, combinados com um primer inespecífico com 13 nucleótidos, arrançados em diversas combinações (do kit RNAimage, GenHunter); 1 µl (0,037 MBq) de α-[<sup>32</sup>P]dATP (Amersham Biosciences, Portugal) para marcação radioactiva e 0,5 U Taq DNA polimerase (Fermentas, Lituânia).

Os produtos obtidos foram submetidos a electroforese num gel de sequenciação de acrilamida:bis-acrilamida (19:1) 6%. O gel foi seco durante 2h a 80 °C e exposto a uma chapa de raio-X (Kodak) durante a noite a -70 °C. As bandas diferencialmente expressas foram identificadas e excisadas do gel. O DNA foi extraído dos fragmentos de gel e re-amplificado por PCR.

### **III.2.7- DDRT-PCR sem marcação radioactiva**

O cDNA foi usado para amplificação por PCR, num volume total de 25 µl, contendo 75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween 20; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 µM dNTPs; 2 µM oligo-dT<sub>15</sub>, combinados com um primer inespecífico com 13 nucleótidos, arrançados em diversas combinações (do kit RNAimage, GenHunter); 0,5 U Taq DNA polimerase (Fermentas).

O produto de PCR foi depois corrido por electroforese em gel de agarose, a 2% e visualizado após ligação a brometo de etídio. As bandas diferencialmente expressas foram excisadas do gel e o DNA foi recuperado da matriz de agarose usando o kit QIAquick (Qiagen).

### **III.2.8- Reamplificação e limpeza do produto de PCR**

Os 109 fragmentos obtidos das bandas diferencialmente expressas foram reamplificados usando 4 µl de amostra num volume final de 25 µl, contendo 75 mM de Tris-HCl a pH 8,8; 20 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween 20; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 20 µM de dNTPs; 2 µM do par de primers usado previamente para obtenção de cada uma das bandas; 0,5 U de Taq polimerase (Fermentas). O produto obtido foi depois clonado num vector TA.

### **III.2.9- Clonagem e sequenciação**

Dos fragmentos de DNA reamplificados, 30 foram clonados num vector TA, pGEM-T (Promega) ou pCRII (Invitrogen) de acordo com as instruções dos fabricantes. Os plasmídeos foram recuperados, usando o kit QIAprep Miniprep (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. Para diferenciar possíveis clones, procedeu-se à amplificação por PCR de cada um deles seguido por análise RFLP, usando as enzimas de restrição RsaI e MspI (Roche Molecular Biochemicals) para hidrolisar o DNA.

### **III.2.10- Hibridação por dot blot**

De forma a determinar se a origem do DNA era de *Anopheles* ou de *Plasmodium*, os fragmentos clonados foram imobilizados numa membrana de nylon e hibridados com sondas produzidas de gDNA de *A. stephensi* e *P. yoelii yoelii*, hidrolisado com a enzima de restrição RsaI e marcado com o kit *DIG High-Prime* (Roche Molecular Biochemicals) de acordo com as instruções do fabricante.

### **III.2.11- Sequenciação dos fragmentos clonados**

Dos clones obtidos 21 foram sequenciados (Macrogen, Coreia do Sul), usando *primers* M13. As seqüências obtidas foram processadas e comparadas com seqüências das bases de dados do Ensembl e TIGR, usando os programas BLASTN e tBLASTX.

### **III.2.12- PCR quantitativo em tempo real**

A confirmação da expressão diferencial dos genes identificados foi feita por PCR quantitativo em tempo real (QT-PCR).

Usaram-se amostras de cDNA produzido a partir de mRNA extraído dos intestinos médios, recolhidos ao quinto e oitavo dia p.i. de acordo com o dia em que foi visualizada a expressão diferencial pelo método DDRT-PCR. Foram realizadas pelo menos três experiências independentes para as experiências realizadas com *R. rattus* e pelo menos duas para as experiências realizadas com *M. musculus*.

Os genes que codificam para a *ldh* (lactato desidrogenase) e para a proteína ribossomal S7, foram usados como controlo interno para o *P. yoelii yoelii* e *A. stephensi*, respectivamente.

Tabela III.1- *Primers* usados para PCR quantitativo em tempo real.

Gene alvo (espécie)	Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' → 3')
<i>ldh</i> ( <i>P. yoelii yoelii</i> )	LDH-Py-F	CCAGGAAAAAGTGACAAAGAATG
	LDH-Py-R	AAA CACCACCTAATCCAACAATC
Py1 ( <i>P. yoelii yoelii</i> )	Py1-F	ATTTCCATTTTGT'TTTATCTATTG
	Py1-R	TAT'TCCACCCATT'TAAAGCGTCTG
Py2 ( <i>P. yoelii yoelii</i> )	Py2-F	AGTGCCGGAGCTGGATTCTGTATGG
	Py2-R	CGGGCATACTCCTGGCATAAC
<i>ribossomal S7</i> ( <i>A. stephensi</i> )	S7-As-F	CGGCTGGTGCCTGAAT'TGG
	S7-As-R	GCGGTCTCT'TCTGCT'TGTTGG
As1 ( <i>A. stephensi</i> )	As1-F	AGTGCCGGAGCTGGATTCTGTATGG
	As1-R	CTGAAGTAGCCGACGTCGATGAAAAC
As4 ( <i>A. stephensi</i> )	As4-F	CACGCGTGCAGCCCAGAACATC
	As4-R	CCGATAACGAACGCGACTCAAACAA
As5 ( <i>A. stephensi</i> )	As5-F	GCGCTGCTGGCCGAGTTGAA
	As5-R	CCGCTTTGGCAGTGGAGGAGTAGTT
As6 ( <i>A. stephensi</i> )	As6-F	CGGCGTTCGAGGTGATTACA
	As6-R	CAGCGGGCAGGGTGATTT
As7 ( <i>A. stephensi</i> )	As7-F	TCCGGGGCGAGAACATC
	As7-R	ACCATCCAGCGCCTTATCCAGTA
As8 ( <i>A. stephensi</i> )	As8-F	CGCTAAGCCGAAATGAG
	As8-R	GAATAGGACGCGAGCAAACCTG
As9 ( <i>A. stephensi</i> )	As9-F	GCGAGCTCTGCGTGAAGGGATTGA
	As9-R	CCGCCAGCCGCACCGTT'TTA
As10 ( <i>A. stephensi</i> )	As10-F	GCCGGAGATATTGAGGGTT'TGTGC
	As10-R	CATGGTCCCAGGCGGTATTT'TGT

A reacção de PCR foi feita usando qPCR core kit para SYBR Green (Eurogentec, Belgica), usando o Gene Amp 5700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Portugal). A concentração final dos reagentes foi 1x tampão de reacção contendo ROX, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 0,3 µM de cada primer (ver tabela III.1), 0,025 U/µl de enzima Hot GoldStar e 1/66000 de SYBR green num volume final de 20 µl. Usou-se 1 µl de cDNA diluído 1:10 ou 1:100 para amplificação. As condições de amplificação foram 10 minutos a 95 °C para desnaturação, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 60 segundos.

### **III.2.13- Análise estatística**

O teste exacto de Fisher (<http://www.langsrud.com/fisher.htm>) foi usado para comparar as taxas de infecção dos mosquitos em dados combinados de 4 experiências independentes. A intensidade de infecção (número de oocistos/intestino médio) e níveis de expressão foram comparados para cada experiência usando o teste de Mann-Whitney, usando o SPSS v 16.0 for Windows (SPSS, Inc.), seguido por um teste de comparação múltipla. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ . Para análise da intensidade de infecção foram consideradas apenas experiências com pelo menos 10 indivíduos em cada grupo.

### III.3- RESULTADOS

#### III.3.1- Infecções experimentais de mosquitos – análise da infecção.

Para avaliar o efeito da refeição sanguínea na infecção, os mosquitos foram dissecados ao oitavo dia pós infecção e os oocistos contados.

Tabela III.2- Efeito da segunda refeição sanguínea e do soro imune anti-*Plasmodium*, na taxa e intensidade de infecção de mosquitos *A. stephensi* infectados com *P. yoelii yoelii*.

Origem do soro imune	Tratamento	Taxa de infecção % (N)	Número de oocistos por intestino médio: Média (máximo - mínimo)
<i>R. rattus</i> (4 experiências independentes)	NA	90,9 (110)	59 (1-456)
	C	95 (80)* **	108 (1-568)*
	SI	82,3 (96)*	48 (1-554)*
	SID	83,3 (66)**	58 (1-656)
<i>M. musculus</i> (BALB/c) (3 experiências independentes)	NA	96,9 (65)	162,14 (2-502)
	C	95,6 (45)	267,7 (1-864)*
	SI	92,2 (51)	151 (1-635)
	SID	89,7 (39)	146,17 (1-659)*

NA- mosquitos que não receberam uma segunda alimentação sanguínea; C- controle, receberam segunda alimentação sanguínea sem soro imune); SI- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto; SID- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto diluído. \* e \*\*- diferença estatisticamente significativas entre esses grupos.

#### Efeito da refeição sanguínea na infecção do mosquito.

Nas experiências realizadas com soro de *R. rattus* a taxa de infecção foi mais alta no grupo controle que recebeu uma segunda refeição sanguínea ao terceiro dia p.i., em relação ao grupo não alimentado, no entanto nas experiências realizadas com soro de murganho a taxa de infecção foi muito semelhante entre os dois grupos (tabela III.2).

Em relação à carga parasitária (média de oocistos por mosquito) o grupo controle apresentou sempre maior número de oocistos que o grupo não alimentado.

#### Efeito do soro imune na infecção do mosquito.

Nos grupos alimentados com soro imune de *R. rattus* e de *M. musculus*, a taxa de infecção foi mais baixa que a do grupo controle e essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), para ambos os grupos alimentados com soro imune em relação ao grupo controle, nas experiências realizadas com soro de *R. rattus* (tabela III.2).

Também a carga parasitária foi mais alta no grupo controle, tendo os mosquitos alimentados com soro imune apresentado sempre menos oocistos, essa diferença foi significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo alimentado com soro imune de *R. rattus* em relação ao controle, e no grupo alimentado com soro imune diluído de *M. musculus* em relação ao controle (tabela I.2).

### III.3.2- Identificação de genes diferencialmente expressos

De forma a identificar possíveis mecanismos responsáveis pelas alterações observadas no desenrolar da infecção em consequência da segunda alimentação, com ou sem soro imune, foi utilizado o método de DDRT-PCR (figura III.3).

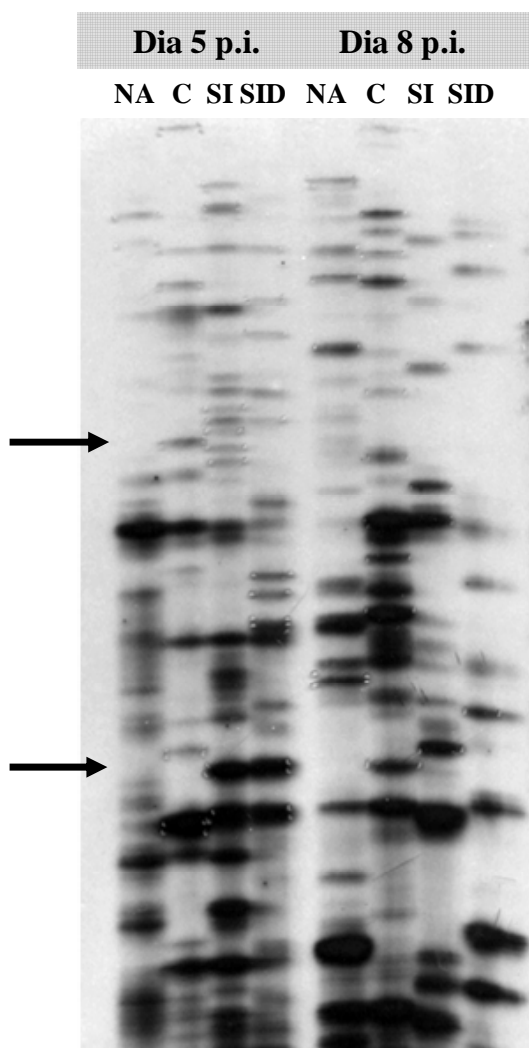


Figura III.3- Identificação de genes expressos diferencialmente por DDRT-PCR. Electroforese de fragmentos de cDNA amplificados em condições de baixa especificidade e marcados radioativamente. As setas indicam algumas bandas que apresentam diferentes intensidades em diferentes grupos experimentais e como tal foram posteriormente isoladas. NA- mosquitos que não receberam uma segunda alimentação sanguínea; C- mosquitos controle; SI- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto; SID- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto diluído.

A expressão génica foi analisada aos dias 5 e 8 pós-infecção por DDRT-PCR, sendo recuperadas e re-amplificadas 125 bandas (Tabela III.3), das quais 30 foram clonadas. Foram recuperados plasmídeos de 117 colónias e os plasmídeos foram diferenciados por hidrólise com as enzimas de restrição RsaI e MspI, tendo sido sequenciados 21 clones.

Tabela III.3 – Número de bandas isoladas por DDRT-PCR, com cada par de *primers* usados.

Nome do primer (sequência do primer)	Nº de bandas
H-T <sub>11</sub> A(AAGCTTTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TA) + H-AP17(AAGCTTACCAGGT)	7
H-T <sub>11</sub> A(AAGCTTTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TA) + H-AP18(AAGCTTAGAGGCA)	3
H-T <sup>11</sup> A(AAGCTTTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TA) + H-AP19(AAGCTTATCGCTC)	17
H-T <sub>11</sub> G(AAGCTTTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TG) + H-AP17(AAGCTTACCAGGT)	12
H-T <sub>11</sub> G(AAGCTTTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TG) + H-AP18(AAGCTTAGAGGCA)	59
H-T <sub>11</sub> G(AAGCTTTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TA) + H-AP20(AAGCTTGTTGTGC)	11
H-T <sub>11</sub> G(AAGCTTTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TA) + H-AP21(AAGCTTCTCTGG)	9
H-T <sub>11</sub> A(AAGCTTTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TTT <sup>*</sup> TG) + H-AP22(AAGCTTTTGATCC)	3
Oligod(T) <sub>15</sub> + H-AP22(AAGCTTTTGATCC)	4
total	125

### III.3.3- Análise de sequências

As sequências obtidas foram analisadas por BLAST de modo a identificar homologia ou função putativa, por comparação com sequências previamente anotadas.

Quatro fragmentos foram identificados como pertencendo a *P. yoelii yoelii*, ambos mais expressos no grupo controlo ao quinto dia pós-infecção. Após alinhamento destes quatro fragmentos verificou-se que correspondiam a apenas 2 sequências diferentes. A análise por BLAST (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) destas sequências identificou os genes da subunidade do citocromo C oxidase (*COI*) e uma proteína relacionada com choque térmico (*hsp*).

Os fragmentos de *A. stephensi* obtidos, foram comparados, por BLAST, à base de dados de *A. gambiae* (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>), dos quais se identificou 11 sequências diferentes de mosquito (tabela III.4).

Quatro das sequências eram semelhantes ao clone G15 submetido por Dimopoulos e colaboradores (número de acesso do GenBank: Z699567), que é uma sequência repetitiva tipo ALU (Claverie e Makalowski, 1994) e não foram consideradas para análise posterior.

Tabela III.4- Resultados da análise por BLAST realizada com as sequências obtidas a partir de bandas diferencialmente expressas.

Nome	Nº de clones	Expressão diferencial	Função putativa/descrição	
			Correspondência na base de dados de <i>P. yoelii</i>	Nº de acesso
Py1	2	D5	Citocromo C oxidase, subunidade 1 ( <i>COI</i> )	AABL01000208.1
Py2	2	D5	Fosfoproteína de 58 kDa relacionada com proteína de choque térmico ( <i>hsp</i> )	AABL01000112.1
			Correspondência na base de dados de <i>A. gambiae</i>	Nº de acesso
As1	1	D5	Precursor de tripsina	AGAP005310
As2	1	D5	Canal de K+. Dominio Myb de ligação a DNA	AGAP004720
As3	1	D5	Na/K_ATPase_beta	AGAP009595
As4	3	D5 e D8	Ribossomal, 60S L26	AGAP002468
As5	1	D5	Proteína de controlo do ciclo celular Cwf15/Cwc15	AGAP010594
As6	1	D5	Agm-1, proteína tipo maltase	AGAP012401
As7	1	D8	Ambigua	AGAP007747
As8	1	D8	Peptidase sinal do microsoma SPC22	AGAP011354
As9	1	D8	ribossomal 40S S25	AGAP004462
As10	1	D8	Precursor de protease serínica	AGAP001240
As11	1	D8	Ambigua*	AGAP007844
			Outros	Nº de acesso
	4		Sequência repetitiva tipo ALU	Z69957

\*- contém os domínios (Interpro): IPR004365 (OB-fold tRNA); IPR004364 (tRNA-synt\_2); IPR002312 (tRNA-synt\_asp); IPR006195 (tRNA\_ligase\_II).

De acordo com a técnica de DDRT-PCR o gene As1 foi mais expresso no quinto dia pós-infecção no grupo controlo e é homólogo a um precursor de tripsina de *A. gambiae*. Os genes As2 (fraca semelhança a um canal de K+ com domínio de ligação Myb), As3 (fraca semelhança a um canal de Na/K dependente de ATPase) e As6 (semelhante ao gene da maltase *agm-1*) foram mais expressos ao quinto dia pós-infecção, no grupo de mosquitos alimentados de sangue com soro imune não diluído.

O gene As5 (semelhante a uma proteína de controlo do ciclo celular) foi mais expresso ao quinto dia pós-infecção no grupo alimentado com soro imune diluído.

Entre as várias sequências obtidas 3 eram semelhantes (As4), e verificou-se serem semelhantes a uma proteína ribossomal (60S ribossomal L26), a expressão deste gene estaria aumentada ao quinto dia p.i. devido ao tratamento com soro imune não diluído e ao oitavo dia p.i. devido ao tratamento com soro imune independentemente da concentração usada.

A sequência do gene As7 é muito semelhante a um gene de *A. gambiae* anotado como ambíguo, sem função conhecida, e nesta experiência foi menos expresso ao oitavo dia pós-infecção nos grupos que receberam uma segunda alimentação sanguínea. O gene As8 é semelhante a um componente do spliceossoma (*spc22*) e foi mais expresso ao D8 p.i. nos grupos controle e não alimentado. A sequência do gene As9 verificou-se ser bastante semelhante a um gene de *A. gambiae* que codifica uma proteína ribossomal (40S ribosomal S25) e foi mais expresso ao oitavo dia p.i. no controle.

A sequência do gene As10 verificou-se ser homóloga a um precursor de protease serínica e foi sobre-expresso ao dia 8 p.i. após alimentação em sangue com soro imune independentemente da concentração.

O gene As11 tem sequência semelhante a um gene de *A. gambiae* anotado como ambíguo, mas que contém diversos domínios (IPR004365: OB-fold tRNA; IPR004364: tRNA-synt\_2; IPR002312: tRNA-synth\_asp; IPR006195: tRNA\_ligase\_2) identificados na base de dados InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), que sugerem o seu envolvimento na maquinaria celular de produção de tRNA.

### **III.3.4- PCR quantitativo em tempo real.**

De modo a confirmar os resultados obtidos por DDRT-PCR a expressão de alguns genes de *P. yoelii yoelii* (*COI*, *hrp*) e de *A. stephensi* (As1, As4, As5, As7, As8, As9 e As10) foi verificada por PCR quantitativo em tempo real em pelo menos 3 experiências independentes realizadas com soro imune de *R. rattus*.

Estes genes foram também analisados para as experiências realizadas com soro de *M. musculus*, no entanto essa análise foi feita em apenas duas experiências. Essa análise não foi no entanto possível para o gene As5, pois apenas se obtiveram resultados numa experiência. Como tal estes resultados foram apenas usados para comparar com os resultados obtidos nas experiências com soro imune de *R. rattus*, de modo a perceber se os resultados eram semelhantes apesar do tratamento com soro originário de diferentes espécies.

#### **III.3.4.1- Genes de *Plasmodium***

Os dois genes de *Plasmodium* analisados tinham padrões de expressão semelhantes ao 5º dia pós-infecção. Para ambos os genes a expressão foi mais alta no grupo não alimentado e no grupo alimentado com soro imune diluído (NA e SID), quando comparado com o controle e grupo alimentado com soro imune não diluído (C e SI). Não houve diferenças significativas de expressão da *COI* (figura III.4), no entanto observaram-se diferenças para o *hrp* (figura III.5).

Quando comparados os valores obtidos nas experiências usando soro de *R. rattus* com aquelas em que se usou soro de *M. musculus* (apenas duas experiências independentes), verificou-se para o gene *COI* os resultados foram semelhantes, com exceção do controle, que na experiência com soro de murganho é o grupo com maior nível de expressão.

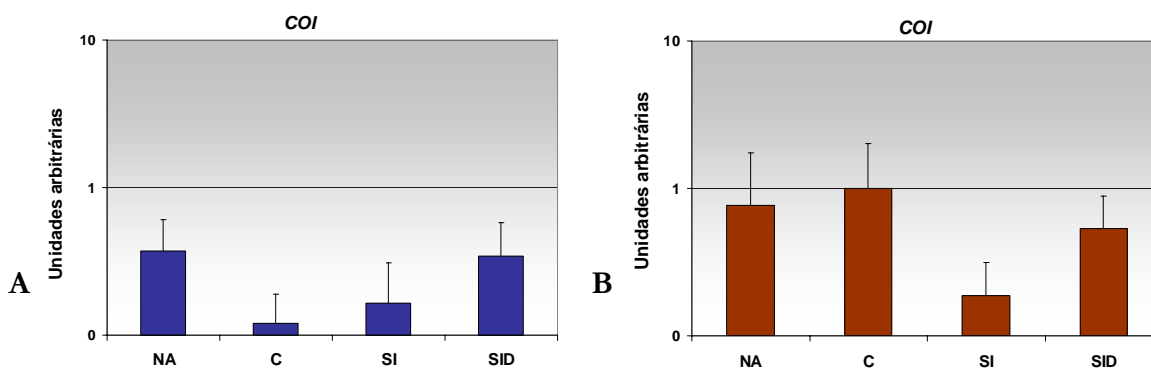


Figura III.4- Perfis de expressão do gene *COI* de *P. yoelii yoelii*, obtido por qRT-PCR. Os valores representados são a média e o erro padrão. A- gene *COI*, analisado em 3 experiências independentes, realizadas com soro de *R. rattus*; B- gene *COI*, analisado em 2 experiências independentes, realizadas com soro de *M. musculus*; NA- mosquitos que não receberam uma segunda alimentação sanguínea; C- mosquitos controle; SI- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto; SID- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto diluído.

Quanto ao gene *hrp*, os grupos de infecção NA e SID são os que apresentaram maior valor de expressão em *R. rattus*. Nas experiências com soro de murganho, observou-se o inverso, sendo os grupos NA e SID que apresentam valores de expressão mais baixos.

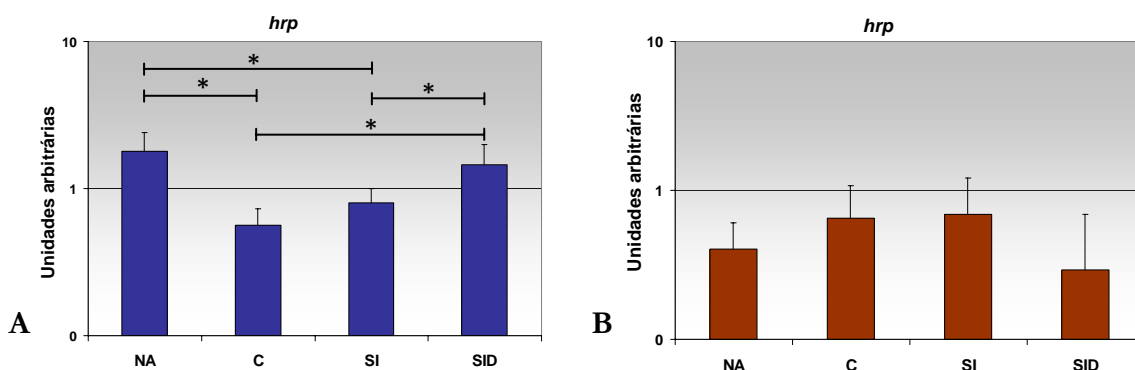


Figura III.5- Perfis de expressão do gene *hrp* de *P. yoelii yoelii*, obtido por qRT-PCR. Os valores representados são a média e o erro padrão. A- gene *hrp*, analisado em 3 experiências independentes, realizadas com soro de *R. rattus*; B- gene *hrp*, analisado em 2 experiências independentes, realizadas com soro de *M. musculus*. NA- mosquitos que não receberam uma segunda alimentação sanguínea; C- mosquitos controle; SI- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto; SID- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto diluído. \*-diferenças estatisticamente significativas.

### III.3.4.2- Genes de *Anopheles*

Para os genes de mosquito analisados, no caso das experiências realizadas com soro de *R. rattus*, verificou-se uma tendência comum, onde a segunda refeição sanguínea com sangue não imune resultou em níveis semelhantes ou maiores de expressão, quando comparando com o grupo não alimentado. Em alguns casos a expressão nos grupos que receberam uma segunda alimentação contendo soro imune seguiu o padrão observado para o grupo controle, noutros foram observadas alterações no padrão de expressão.

Os mesmos genes foram também estudados para *M. musculus*, no entanto apenas duas experiências foram realizadas e os resultados são apresentados para se obter uma indicação se o efeito observado é geral ou se varia de acordo com o modelo usado nas experiências.

#### Gene As1

A expressão do gene As1 foi mais alta no controle comparando com o grupo não alimentado. O grupo SI apresentou uma expressão média mais alta que o controle, no entanto o grupo SID apresentou os valores mais baixos de todos (figura III.6).

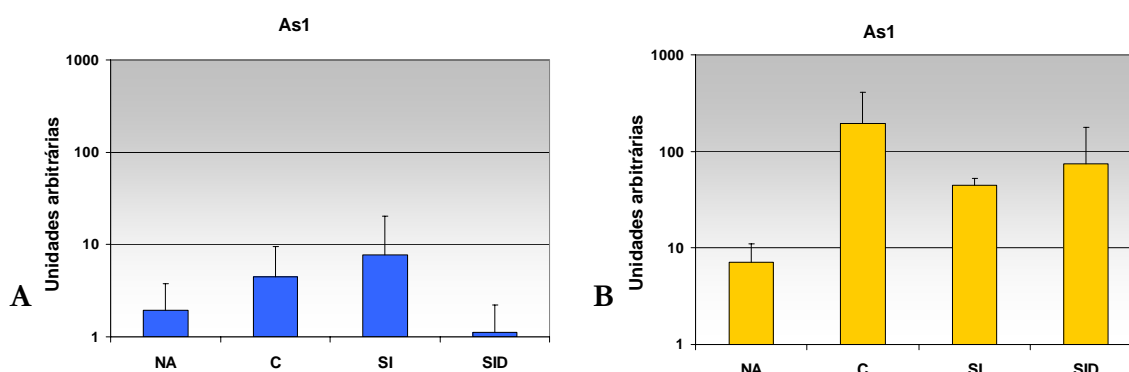


Figura III.6- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene As1, de *A. stephensi*. Os valores representados são a média e o erro padrão. A- Dados de quatro experiências independentes realizadas com soro de *R. rattus*; B- Dados de duas experiências independentes realizadas com soro de *M. musculus*. NA- mosquitos que não receberam uma segunda alimentação sanguínea; C- mosquitos controle; SI- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto; SID- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto diluído.

Com soro de murganho verificou-se que o grupo onde a expressão é mais alta é o controle e a expressão mais baixa no grupo não alimentado. Neste caso o grupo alimentado com soro imune diluído apresentou níveis de expressão próximos do grupo controle e do grupo alimentado com soro não diluído, ao contrário do que foi observado nas experiências com soro de *R. rattus*.

### Gene As4

A expressão do gene As4 foi mais alta no controlo comparando com o grupo não alimentado. A expressão deste gene no grupo SI foi mais baixa que no grupo controlo e no grupo SID foi bastante mais baixa que no controlo, sendo essa diferença estatisticamente significativa (figura III.7).

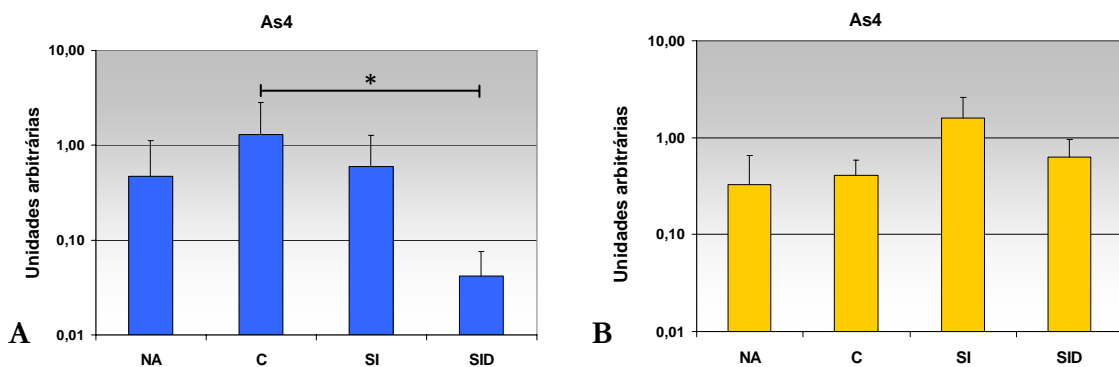


Figura III.7- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene As4 de *A. stephensi*. Os valores representados são a média e o erro padrão. A- Dados de quatro experiências independentes realizadas com soro de *R. rattus*; B- Dados de duas experiências independentes realizadas com soro de *M. musculus*. NA- mosquitos que não receberam uma segunda alimentação sanguínea; C- mosquitos controlo; SI- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto; SID- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto diluído. \*- diferenças estatisticamente significativas.

Nas experiências realizadas com soro de murgancho, observou-se um padrão de expressão diferente, sendo a expressão no controlo semelhante à expressão no grupo NA. A expressão deste gene foi mais alta nos grupos tratados com soro imune, em relação ao controlo, ao contrário do que foi observado com soro de *R. rattus*.

### Gene As5

A expressão do gene As5 foi semelhante no grupo controlo e no grupo NA. A alimentação com soro imune causou um aumento de expressão deste gene, de forma dependente da concentração, sendo a expressão 4,94 vezes mais alta no grupo SI comparando com o controlo (figura III.8).

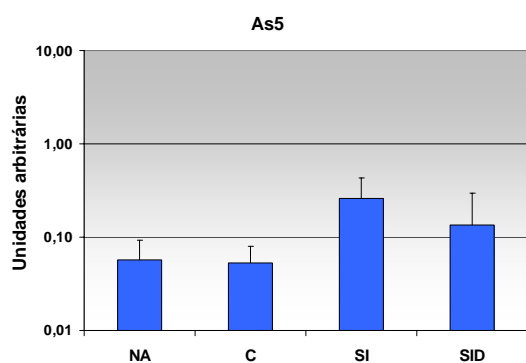


Figura III.8- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene As5 de *A. stephensi*. Dados de quatro experiências independentes, com soro de *R. rattus*. Os valores representados são a média e o erro padrão. NA- mosquitos que não receberam uma segunda alimentação sanguínea; C- mosquitos controle; SI- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto; SID- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto diluído.

Para *M. musculus* não foi possível obter resultados por qRT-PCR.

### Gene As6

A análise da expressão do gene As6 mostrou um aumento de expressão significativo, em todos os grupos que receberam uma segunda alimentação sanguínea, independentemente do tratamento com soro imune (figura III.9). Os níveis de expressão nos grupos tratados com soro imune foram semelhantes aos do grupo controle.

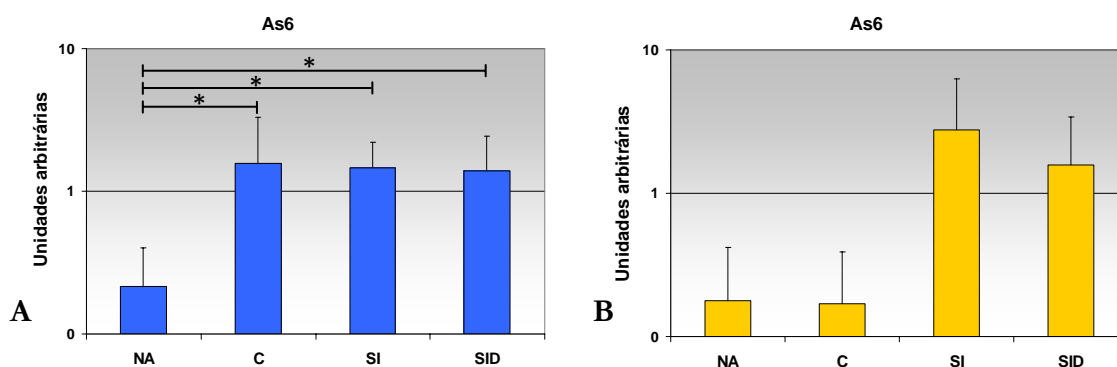


Figura III.9- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene As6 de *A. stephensi*. Os valores representados são a média e o erro padrão. A- Dados de quatro experiências independentes realizadas com soro de *R. rattus*; B- Dados de duas experiências independentes realizadas com soro de *M. musculus*. NA- mosquitos que não receberam uma segunda alimentação sanguínea; C- mosquitos controle; SI- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto; SID- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoíto diluído. \*- diferenças estatisticamente significativas.

Nas experiências em que foi usado soro de murganho, observou-se um comportamento diferente da expressão grupo controle, apresentando níveis de expressão próximos do controle. Os grupos tratados com soro imune apresentaram níveis de expressão mais elevados em relação ao controle e ao grupo NA.

### Gene As7

A expressão do gene As7 foi mais alta em todos os grupos em relação ao grupo não alimentado. O tratamento com soro imune influenciou a expressão deste gene em relação ao controle (figura III.10).

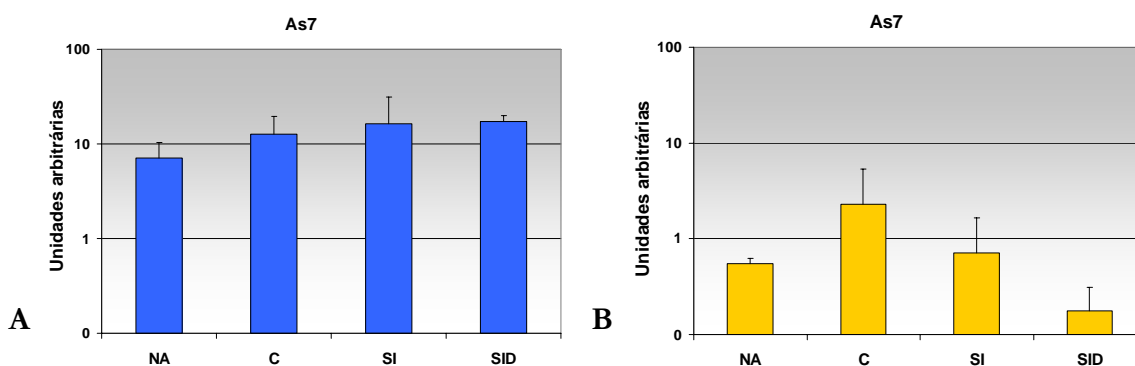


Figura III.10- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene As7 de *A. stephensi*. Os valores representados são a média e o erro padrão. A- Dados de três experiências independentes realizadas com soro de *R. rattus*; B- Dados de duas experiências independentes realizadas com soro de *M. musculus*. NA- mosquitos que não receberam uma segunda alimentação sanguínea; C- mosquitos controle; SI- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoítio; SID- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoítio diluído.

O padrão de expressão foi diferente para as experiências realizadas com soro imune de murganho, verificando-se um aumento de expressão do controle em relação ao grupo não alimentado, mas uma diminuição de expressão deste gene nos grupos alimentados com soro imune (especialmente no SID) em relação ao controle.

### Gene As8

A expressão do gene As8 foi mais alta no controle do que no grupo NA (aumento de 2,72 vezes), no entanto o tratamento com soro imune causou uma diminuição da expressão deste gene a níveis inferiores ao grupo NA, especialmente no grupo SID (figura III.11).

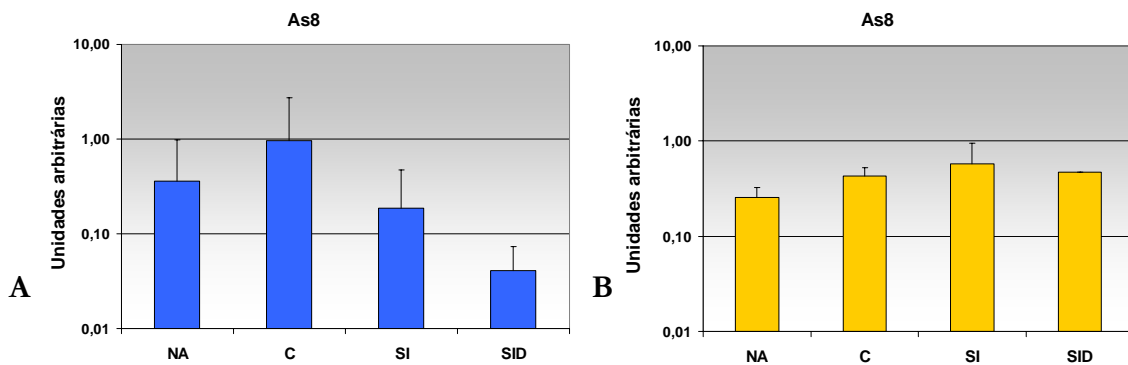


Figura III.11- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene As8 de *A. stephensi*. Os valores representados são a média e o erro padrão. A- Dados de quatro experiências independentes realizadas com soro de *R. rattus*; B- Dados de duas experiências independentes realizadas com soro de *M. musculus*. NA- mosquitos que não receberam uma segunda alimentação sanguínea; C- mosquitos controlo; SI- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoítio; SID- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoítio diluído.

Nas experiências realizadas com soro de *M. musculus*, mais uma vez o padrão de expressão foi diferente, observando-se um aumento ligeiro de expressão em todos os grupos em relação ao grupo NA, com níveis de expressão dos grupos tratados com soro imune próximos do grupo controlo.

### Gene As9

Verificou-se que a expressão do gene As9 foi mais alta no controlo em relação ao grupo NA. A expressão no grupo C foi também bastante superior à observada para os grupos tratados com soro imune, sendo a expressão 6,51 e 7,65 vezes mais elevada em relação aos grupos SID e SI, respectivamente (figura III.12).

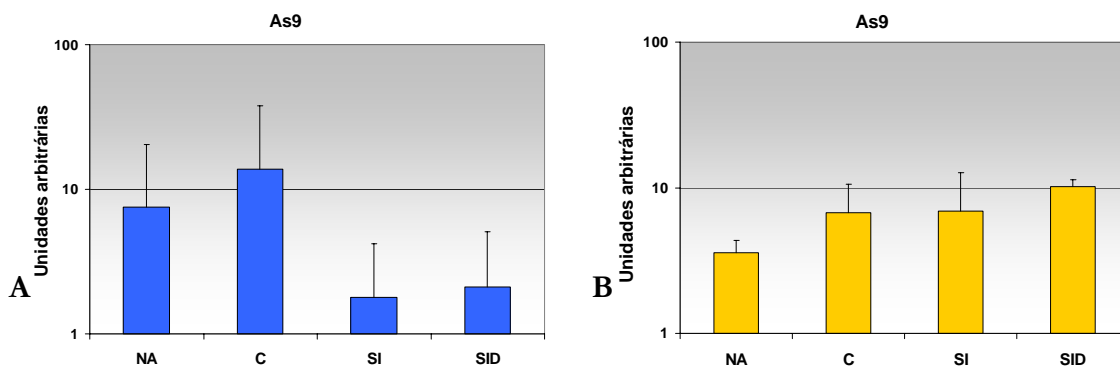


Figura III.12- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene As9 de *A. stephensi*. Os valores representados são a média e o erro padrão. A- Dados de quatro experiências independentes realizadas com soro de *R. rattus*; B- Dados de duas experiências independentes realizadas com soro de *M. musculus*. NA- mosquitos que não receberam uma segunda alimentação sanguínea; C- mosquitos controlo; SI- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoítio; SID- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoítio diluído.

O padrão de expressão foi diferente nas experiências realizadas com soro de murganho, para os grupos tratados com soro imune, não se verificando a diminuição de expressão em relação ao controle que foi observada nas experiências com soro de *R. rattus*.

### Gene As10

Finalmente, o gene As10 foi mais expresso nos grupos que receberam uma segunda alimentação sanguínea, sendo esse aumento entre 2,95 e 3,95 quando comparado com o grupo que não recebeu uma segunda alimentação sanguínea. Os níveis de expressão foram semelhantes entre o controle e os grupos SID e SI (figura III.13).

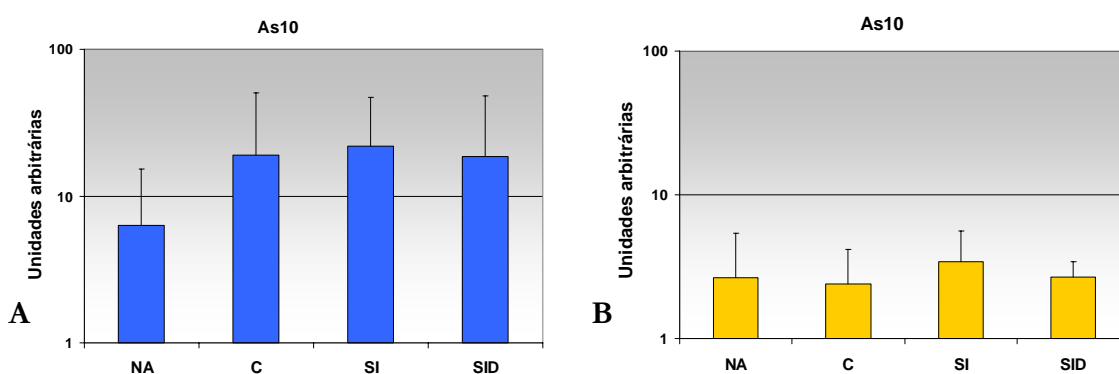


Figura III.13- Perfis de expressão obtidos por qRT-PCR do gene As10 de *A. stephensi*. Os valores representados são a média e o erro padrão. A- Dados de quatro experiências independentes realizadas com soro de *R. rattus*; B- Dados de duas experiências independentes realizadas com soro de *M. musculus*. NA- mosquitos que não receberam uma segunda alimentação sanguínea; C- mosquitos controle; SI- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoítio; SID- mosquitos que receberam uma segunda alimentação sanguínea de sangue com soro anti-esporozoítio diluído.

Nas experiências realizadas com soro de murganho as diferenças entre todos os grupos foram muito pequenas, independentemente do tratamento.

Em geral, apesar de apenas terem sido realizadas duas experiências com soro imune de *M. musculus*, os padrões de expressão foram diferentes aos observados nas experiências realizadas com soro de *R. rattus*.

### III.4- DISCUSSÃO

A refeição sanguínea é uma mistura complexa que contém diversos constituintes do hospedeiro vertebrado que têm efeito no desenvolvimento esporogónico do *Plasmodium*, podendo modular o resultado da infecção. Alguns componentes da imunidade dos vertebrados podem ter um efeito variável entre o bloqueio de transmissão e o aumento da infecção. Os mecanismos de acção pelo qual o soro imune exerce este efeito é muito complexo devido à interacção de vários factores do hospedeiro vertebrado, mosquito e parasita que contribuem para o resultado final da infecção.

O estado imunológico do hospedeiro vertebrado pode variar e dessa forma afectar o resultado da infecção no mosquito. Alguns dados contraditórios foram publicados acerca do efeito de anticorpos numa segunda refeição sanguínea durante a infecção (Vaughan *et al.* 1988; Beier *et al.* 1989; do Rosário *et al.* 1989), provavelmente devido ao uso de diferentes métodos, combinações de espécies mosquito/plasmódio ou ao anticorpo/soro imune usado. Além dos anticorpos outros componentes do soro de sangue infectado foram relacionados com bloqueio de transmissão, tais como citocinas que afectam a capacidade de transmissão dos gametócitos (Naotunne *et al.* 1991; Karunaweera *et al.* 1992; Fleck *et al.* 1994) complemento e leucócitos (Tsuboi *et al.* 1995; Healer *et al.* 1997; Lensen *et al.* 1997). Verificou-se também que a citocina TGF- $\beta$ 1 é ainda capaz de afectar a resposta imunológica do mosquito ao *Plasmodium* (Luckhart *et al.* 2003).

No presente trabalho verificou-se que a segunda alimentação sanguínea levou a um aumento da carga parasitária e nas experiências realizadas com soro de *R. rattus* verificou-se ainda um aumento da taxa de infecção, confirmando que refeições sanguíneas efectuadas por mosquitos durante a infecção têm um efeito positivo sobre esta. Este efeito foi descrito por Beier e colaboradores (1989) que sugerem que a segunda refeição sanguínea leva a um desenvolvimento mais rápido dos oocistos e que isto seria provavelmente devido a uma maior abundância de nutrientes. Contudo, outras hipóteses poderão ser colocadas, tais como o desvio de energia da resposta imune ao parasita para outros processos fisiológicos, tais como a digestão ou produção de ovos. Esta observação tem implicações na relação parasita/mosquito visto que durante a sua vida adulta uma mosquito fêmea faz diversas refeições sanguíneas que podem alterar a infecção por *Plasmodium*.

No entanto, a presença de soro imune anti-esporozoíto, de *R. rattus* ou *M. musculus*, na segunda refeição sanguínea inverteu este efeito positivo, apresentando os mosquitos destes grupos experimentais as taxas de infecção mais baixas. Também a carga parasitária dos mosquitos destes grupos foi mais baixa, mesmo em relação ao grupo que não recebeu uma segunda

alimentação sanguínea, confirmando o seu efeito negativo sobre a infecção. O soro imune usado apresentou títulos elevados de anticorpos anti-esporozoíto e apenas foi usada uma diluição de 1:1 com plasma não imune, de modo que não é possível comparar com outro trabalho em que se verificou um aumento da transmissão, pois foram usadas diluições mais elevadas (Peiris *et al.* 1988).

As experiências não produziram mosquitos suficientes para seguir a infecção até à fase de invasão das glândulas salivares, não tendo sido assim possível verificar se o número mais baixo de oocistos correspondeu na prática a um menor número de esporozoítos nas glândulas ou se houve alguma alteração na sua capacidade para infectar o hospedeiro vertebrado.

Em vários trabalhos foi observada uma relação linear entre o número de oocistos e a produção de esporozoítos (Vaughan *et al.*, 1992; Gamage-Mendis *et al.*, 1993). Por outro lado Vaughan e colaboradores (1988) mostraram que quando expostos a soro anti-esporozoíto de rato, ao quinto dia pós-infecção, houve um aumento da produção de esporozoítos por oocisto e que esses esporozoítos eram mais infecciosos para células de hepatoma cultivadas. No entanto estas observações foram baseadas em poucas contagens e esse efeito não foi confirmado mais tarde (Beier *et al.*, 1989), quando mosquitos foram alimentados com soro imune dez dias pós infecção, que por sua vez já seria uma fase demasiadamente tardia para afectar o desenvolvimento de oocistos e esporozoítos. As diferenças observadas nos diferentes estudos implicam que a variabilidade deste sistema é muito elevada e que para estudar de forma completa as propriedades de bloqueio de transmissão de soro imune é fundamental estudar todo o ciclo esporogónico assim como a transmissão ao hospedeiro vertebrado.

Com o objectivo de contribuir para a compreensão de que forma a refeição sanguínea com ou sem soro imune afecta o desenvolvimento do parasita nos mosquitos, tentou-se identificar genes de parasita ou mosquito que estejam envolvidos neste processo usando o método de DDRT-PCR. A maioria dos fragmentos obtidos por este método eram genes de mosquito, o que é previsível visto que a proporção de tecido de origem *Anopheles/Plasmodium*, obtida na dissecação de intestino médios infectados, é bastante elevada e não foi usado nenhum método de enriquecimento.

Dois genes de *P. yoelii* foram isolados por este método: *COI* (citocromo C oxidase subunidade 1) e o *hsp* (proteína relacionada com choque térmico). A sequência do gene *hsp* partilha 95% de semelhança com a fosfoproteína de 58 KDa de *P. berghei* que foi identificada como sendo uma co-chaperona capaz de interagir com HSP70 (proteína de choque térmico de 70 KDa) assistindo no *foldring* adequado de proteínas substrato (Wiser *et al.*, 1996). Estas proteínas poderão ser importantes devido à alta actividade metabólica e produção proteica, durante o

desenvolvimento dos esporozoítos no oocisto, que em conjunto com factores, como o soro imune ou a resposta imune do mosquito irão causar stress no parasita.

Para ambos os genes foi observada alta variabilidade na sua expressão, entre experiências, o que poderia ser resultado dos oocistos se encontrarem em diferentes fases de maturação, pois ligeiras alterações ambientais, como da temperatura, podem ser suficientes para produzir alterações no desenvolvimento (Noden *et al.* 1995). Foram ainda observadas diferenças nos padrões de expressão dependentes da origem do sangue (*R. rattus* ou *M. musculus*) usado na segunda alimentação artificial.

Entre os genes de mosquito identificados estão representadas diversas funções: digestão, produção de proteínas (transcrição, translação e *splicing*), assim como transporte membranar.

O gene identificado como As1 é semelhante a um precursor da tripsina em *A. gambiae* que se verificou ser expresso especificamente no tracto digestivo e sobre-regulado após alimentação sanguínea (Ribeiro, 2003), apontando para uma função na digestão sanguínea. O gene As10 também se trata de uma protease semelhante ao precursor de uma protease serínica de *A. gambiae* e poderá estar envolvido quer na digestão quer na resposta imune, apesar de não ter sido previamente relacionado com estas funções, sabe-se que várias proteases serínicas estão envolvidas na resposta imune (Christophides *et al.* 2002). No entanto a maioria das proteases envolvidas no sistema imunológico do mosquito partilham um domínio CLIP (Gorman *et al.* 2000b), que não está presente neste gene.

O gene As6 é altamente semelhante ao gene *agm-1*, tipo maltase, de *A. gambiae* e está provavelmente envolvido na digestão de açúcar e é mais expresso após a segunda refeição sanguínea, ao oitavo dia p.i., independentemente do seu estado imunológico. Este gene havia sido previamente descrito como sendo sub-expresso 24 horas após a alimentação sanguínea (Dimopoulos *et al.*, 1996), explicado pelos autores como consequência de alteração do tipo de alimentação, de uma digestão à base de açúcar para uma digestão adaptada a altos conteúdos proteicos, como é o caso da refeição sanguínea. Os resultados neste trabalho reflectem uma provável necessidade de recuperar o stock desta enzima perdido nos dias anteriores e para voltar a fazer uma digestão relacionada com a água açucarada fornecida aos mosquitos.

Vários genes identificados estarão provavelmente envolvidos na produção de proteínas. Dois destes genes codificam proteínas ribossomais (As4 e As9), os genes As5 e As8 são semelhantes a genes de *A. gambiae* que codificam proteínas que fazem parte do spliceossoma e *signal peptidase complex* respectivamente, e o gene As11 provavelmente estará envolvido na translação a nível do tRNA. A expressão dos genes As4, As8 e As9, foi mais alta em mosquitos que receberam uma segunda refeição sanguínea em sangue não imune, mas foi mais baixa em mosquitos que receberam uma alimentação em soro imune, quando comparado com os

mosquitos que não receberam uma segunda alimentação sanguínea. O aumento de aminoácidos disponíveis para a produção proteica, devido à alimentação sanguínea (Sanders *et al.*, 2003) poderá justificar este aumento de expressão. O gene As5 por outro lado apenas é mais expresso na presença de soro imune, no entanto não é claro de que forma o soro imune poderá afectar a expressão destes genes. Se o soro imune afectar a produção de proteínas no mosquito, poderia afectar indirectamente a fertilidade e fecundidade do mosquito e até afectar a disponibilidade de nutrientes para o próprio parasita. Seria interessante verificar também o efeito da alimentação com soro imune na produção de ovos do mosquito.

O transporte membranar é uma função provavelmente representada pelos genes As2 e As3 que mostraram alguma semelhança a canais de membrana de *A. gambiae*. Estes genes foram isolados por DDRT-PCR como estando sobre regulados ao quinto dia pós alimentação. A expressão mais elevada de canais membranares já havia sido descrita, após alimentação sanguínea por Sanders e colaboradores (2003) e provavelmente é uma resposta para permitir a aquisição da grande quantidade de nutrientes disponíveis após a alimentação sanguínea.

A análise destes genes sugere que o soro imune afecta diversas funções celulares do mosquito, especialmente associadas à produção de proteínas: 5 dos 11 genes analisados estão envolvidos na produção de proteínas. Uma análise mais ampla do transcriptoma seria necessária para perceber até que ponto a produção de proteínas e outras funções fisiológicas são afectadas.

A comparação entre os resultados obtidos primariamente para *R. rattus* com os obtidos para *M. musculus*, mostram que a origem do soro é também importante. Na maior parte das experiências, o efeito do soro imune na expressão, em relação ao controlo, é contraditório. Esse efeito é provavelmente devido à diferente composição do soro imune proveniente das diferentes espécies. Diferenças a nível de anticorpos, não só pela quantidade (o título de anticorpos anti-esporozóito observado para *R. rattus* foi muito maior que o observado para *M. musculus*), como pelo tipo de anticorpo.

É ainda necessário considerar outros factores, pois o soro imune é uma mistura complexa que contém outros componentes além de anticorpos que poderiam também ser responsáveis pelos efeitos observados no mosquito, foi já observado que a citocina TGF- $\beta$  é capaz de modular a expressão do gene da NOS em *A. stephensi* (Luckhart *et al.*, 2003). A própria reacção individual dos mosquitos poderá também ser diferente, devido a diferenças genéticas intrínsecas ou mesmo devido a diferenças ambientais.

Este trabalho mostra que soro imune é capaz de reverter o aumento da carga parasitária causada pela segunda refeição sanguínea e que isto poderá estar associado à alteração do perfil de expressão de alguns genes envolvidos na digestão e produção proteica. Um estudo envolvendo métodos de análise de expressão mais abrangentes, e estudos mais específicos com componentes

do soro imune, poderiam ajudar a perceber de que forma estes factores afectam o desenvolvimento do parasita no mosquito e de que forma afecta a relação parasita/hospedeiro.

# Capítulo IV

Produção de oocinetos de *Plasmodium*  
*falciparum in vitro.*

---



#### IV.1- INTRODUÇÃO

O conhecimento detalhado da biologia do parasita e do mosquito, e da sua interacção, durante o desenvolvimento esporogónico é essencial para a identificação de alvos para bloquear a transmissão. A fase inicial do desenvolvimento esporogónico até à fase de oocisto será a fase em que o parasita é mais susceptível de ser bloqueado, pois é nesta altura que sofre grandes diminuições do número de parasitas (revisto em Vaughan, 2007), devido às diversas barreiras ao seu desenvolvimento, quer sejam físicas, ou devidas à actuação do sistema imunológico do mosquito ou de factores da própria refeição sanguínea. Além disso, após a formação do oocisto, o parasita multiplica-se no seu interior e quando maturo a sua ruptura liberta milhares de esporozoítos na hemolinfa o que torna o seu controlo mais difícil. Assim, a fase inicial do desenvolvimento esporogónico seria o melhor alvo para possíveis vacinas ou fármacos provenientes do hospedeiro vertebrado, pois estas moléculas actuariam a partir da refeição sanguínea e logo a sua actuação seria limitada no tempo.

Esta fase do desenvolvimento tem sido essencialmente estudada com recurso a modelos animais, especialmente com *P. berghei*, pois são fáceis de manter em infecções experimentais e são seguros para o humano, não acarretando assim grandes cuidados no seu manuseamento em laboratório. Esta espécie tem ainda a vantagem de, tal como com *P. gallinaceum*, produzir facilmente oocinetos em sistemas de cultura *in vitro* (Janse *et al.*, 1985; Hurd *et al.*, 2003). No entanto, por melhor que seja o modelo, nem todas as observações podem ser transpostas directamente para a malária humana, devido às diferenças entre esta espécie e as espécies que infectam o Homem, ou mesmo na análise do efeito de factores do hospedeiro vertebrado na transmissão, onde as diferenças entre hospedeiros (*M. musculus* e *Homo sapiens*) são acentuadas.

Por outro lado, experiências usando espécies de *Plasmodium* que infectam o Homem, tornam a experimentação mais complicada, por diversas razões:

1- Das quatro espécies que infectam o Homem apenas é possível actualmente manter em cultura contínua *P. falciparum* (Trager e Jensen, 1977), o que torna experiências com outras espécies apenas possíveis usando pacientes naturalmente infectados, o que além de ser difícil de aceder, impede o controlo de um vasto número de factores que tornariam difícil a análise de um parâmetro específico.

2- Para ser feito o estudo do desenvolvimento esporogónico seria necessário proceder à infecção de mosquitos, o que torna a situação ainda mais complicada devido ao nível de investimento necessário para construir e manter um insectário com condições de segurança para a realização destas experiências.

Para o estudo de *P. falciparum* a primeira questão não se coloca devido à possibilidade da produção de parasitas em cultura e a segunda questão poderia ser inicialmente resolvida recorrendo a culturas de oocinetos *in vitro*.

Culturas *in vitro* de fases do ciclo esporogónico, especialmente de *P. berghei* e *P. gallinaceum*, têm sido usadas em diversos trabalhos, permitindo a obtenção de informação importante acerca da sua interacção com factores do hospedeiro e identificação de moléculas alvo para o bloqueio de transmissão (Rosenberg e Koontz, 1984; Grotendorst e Cáster, 1987; Lensen *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 1998; Mazzacano *et al.*, 1998; Adini e Warburg, 1999; Sidén-Kiamos *et al.*, 2000; Arrighi e Hurd, 2002; Langer *et al.*, 2002). No entanto a obtenção *in vitro* de oocinetos de *P. falciparum* foi apenas descrita por Carter e colaboradores (1987) e por Warburger e Schneider (1993), tendo estes últimos obtido em cultura também oocistos e esporozoítos.

Culturas *in vitro* de fases do ciclo esporogónico permitiriam testar isoladamente o efeito de fármacos e compostos químicos no desenvolvimento esporogónico e assim aferir o seu efeito na transmissão. Outra aplicabilidade seria o estudo da relação do parasita com compostos e células do mosquito hospedeiro, através da co-cultura com células ou moléculas do mosquito. Isto permitiria observar o efeito que estas células poderiam produzir no parasita, como também caracterizar a resposta das células do hospedeiro ao parasita.

O objectivo deste trabalho foi obter oocinetos de *P. falciparum in vitro* para o estudo do efeito de factores parasitários e/ou dos hospedeiros na fase inicial do desenvolvimento esporogónico do parasita.

## **IV.2- MATERIAL E MÉTODOS**

### **IV.2.1- Manutenção culturas *Plasmodium falciparum***

Parasitas da espécie *P. falciparum*, estirpe 3D7, foram mantidos em culturas, com eritrócitos humanos em meio RPMI completo (RPMI 1640; Hipoxantina 6,8 M; HEPES 25 mM; 10% soro humano; 5% bicarbonato de sódio; pH 7,4), com um hematócrito de 5%, numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e ar. O meio foi trocado diariamente.

A determinação da parasitemia e controlo de esterilidade foram feitas através de esfregaços fixados com metanol e corados com Giemsa. Através dos esfregaços também se controlou a qualidade da cultura e a produção de gametócitos. Para manter as culturas com parasitas em boas condições foram divididas ou reconstituídas com novas hemácias quando a parasitemia aumentava e começavam a surgir sinais de stress dos parasitas.

### **IV.2.2- Produção de culturas com grandes quantidades de gametócitos maduros.**

As culturas destinadas à produção de oocinetos foram mantidas continuamente de modo a aumentar a parasitemia o máximo possível. Quando as parasitemias se tornaram mais altas e se verificaram os primeiros sinais de stress dos parasitas, dividiu-se o hematócrito para metade, usando o dobro do meio de cultura. Nessa altura começaram a aparecer gametócitos em maior quantidade e as culturas foram mantidas deste modo até a maior parte dos gametócitos se tornarem maduros (estádio 5) (Carter e Miller, 1979).

### **IV.2.3- Produção de oocinetos.**

Para a produção de oocinetos foi usada um protocolo baseado no descrito por Warburg e Schneider (1993). Várias variações foram testadas, o método que produziu melhores resultados foi o que se segue:

As culturas com gametócitos maduros (gametocitemia), com um máximo de 2,5 % hematócrito, foram centrifugadas e ressuspensas num tubo de 15 ml com 10 ml de meio de exflagelação (9ml de soro humano + 1 ml de uma solução com 1,5% NaHCO<sub>3</sub>, 0,5% glicose; 100 µM de ácido xanturénico; pH 8,0) e deixadas por uma hora à temperatura ambiente.

Após uma hora na solução de exflagelação, adicionou-se 0,1% de aglutinina de germen de trigo, de modo a perfazer 5/10% v/v final e deixou-se com agitação leve durante uma hora para permitir a separação dos zigotos extracelulares e a lise parcial e aglutinação dos eritrócitos.

Todo o conteúdo foi depois centrifugado e ressuspensado em meio de transformação de oocineto (RPMI 1640; 10% soro humano; 0,04% NaHCO<sub>3</sub>; 0,25% trealose; pH 7,8), colocado

em frascos de cultura e deixados 48 horas a 26 °C. Durante esse tempo foram feitos esfregaços em intervalos regulares, que foram fixados com metanol e corados com Giemsa.

Algumas condições testadas durante a otimização deste método de cultura:

1- Foi adicionado ácido xanturénico (XA) ao meio de exflagelação.

2- Foram usadas outras soluções de exflagelação descritas em trabalhos com *P. vivax*: 100 µM de XA em PBS (Suwanabun *et al.*, 2001); RPMI1640; 20 mM Hepes; 100 µM de XA; pH 7,5 (Arai *et al.*, 2001).

3- Foram experimentados diferentes meios de transformação de oocineto:

3.1.- meio usado para cultura de *P. vivax*: RPMI 1640; 10-20% soro bovino fetal; 50 mg/ml hipoxantina; 25mM Hepes; pH 7,8-8,2 (Suwanabun *et al.*, 2001).

3.2.- meio usado para cultura de *P. berghei*: RPMI 1640; 20% soro bovino fetal; 25 mM Hepes; 2 mM glutamina; 50000 U penicilina; 50 mg/l esptreptomicina; pH 8,4 (Al Olayan *et al.*, 2002).

### IV.3- RESULTADOS

#### IV.3.1- Produção de culturas com grande número de gametócitos.

O método utilizado permitiu obter culturas com grandes quantidades de gametócitos (tabela IV.1). As experiências da tabela 1 foram realizadas após selecção do método que tinha dado melhores resultados.

Tabela IV.1- Dados referentes às culturas de formas sanguíneas *in vitro*, usadas para cultura de oocinetos.

Exp	Dias em cultura*	Parasitémia (%)	Gametocitémia (%)	Gametócitos fase 5 (%)	Gametócitos femininos (%)
1	14	1,11	0,6	0,33	72,73
2	12	5,6	0,34	0,06	66,67
3	15	0,95	1,11	0,88	76,92
4	13	1,12	1,08	0,57	64,71
5	8	1,76	0,96	0,69	75
6	6	0,39	0,14	0,11	75
7	2	2,19	0,7	0,37	87,5
8	2	5,25	0,45	0,3	66,67

\*- dias em cultura sem que esta seja reconstituída (adição de novas hemácias).

Todas as culturas apresentaram uma maior proporção de gametócitos femininos do que masculinos. Em geral as últimas culturas produziram melhores resultados, esse facto parece estar relacionado com o menor tempo em cultura, após reconstituição da mesma. O facto de as culturas se estenderem ao longo do tempo poderá prejudicar a viabilidade dos gametócitos, devido ao meio apresentar níveis mais elevados de degradação.

#### IV.3.2- Cultura de oocinetos

Nas culturas das experiências 1 a 12, foram observadas formas esféricas (zigotos e gametócitos femininos que não foram fecundados) e formas retortas, de oocinetos que não terminaram o seu desenvolvimento. Em duas culturas, da experiência 4 e 5 (figura IV.1) foram observados oocinetos, mas em quantidade muito reduzida (1-2 por lâmina).

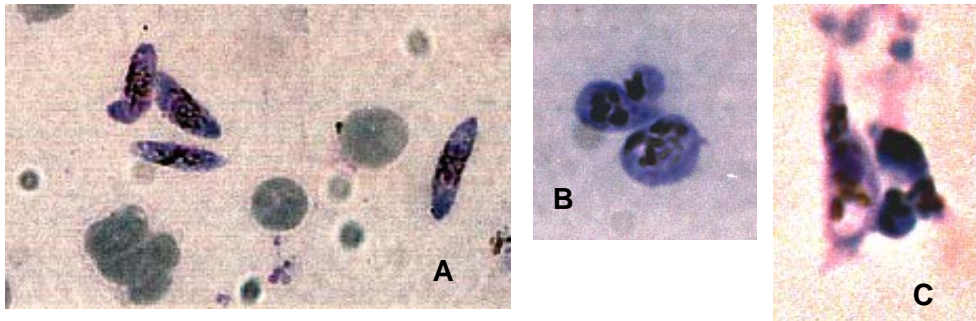


Figura IV.1 – Fases de desenvolvimento esporogónico de *P. falciparum in vitro*. A – Gametócitos maduros de fase 5; B – formas esféricas (zigotos ou macrogametócitos não fecundados); C – Oocineto.

#### IV.4- DISCUSSÃO

Os métodos de cultura *in vitro* de espécies de *Plasmodium* que parasitam o Homem poderiam trazer grandes vantagens para o estudo da malária. Culturas contínuas, *in vitro*, de *P. falciparum*, a espécie mais perigosa para o Homem, estão já bem estabelecidas. No entanto, não existe ainda um método de cultura das fases de desenvolvimento esporogónico que seja eficaz e facilmente reprodutível, apesar de serem realizadas facilmente para *P. berghei* e *P. galinaceum* (Hurd *et al.*, 2003). Apesar de culturas de oocinetos de *P. falciparum* terem sido já realizadas no passado (Carter *et al.*, 1987; Warburg Schneider, 1993), verificou-se não serem métodos reprodutíveis de forma regular (Hurd *et al.*, 2003).

Para proceder à cultura de oocinetos, foi necessário obter primeiro culturas com gametocitémias elevadas, contendo gametócitos masculinos e femininos maduros (fase V). Culturas contendo gametócitos maduros foram obtidas regularmente e verificou-se que a percentagem de gametócitos femininos foi sempre mais elevada. A observação de uma proporção elevada de gametócitos femininos em relação a gametócitos masculinos tem sido observada consistentemente em diversos trabalhos (Paul *et al.*, 2000; Osgood *et al.*, 2002; Robert *et al.*, 2003; Osgood e Schall, 2004; Reece *et al.*, 2005). Segundo Reece e colaboradores (2008) este desvio estará relacionado com a variabilidade genética da população de *Plasmodium*, sendo que variabilidades mais baixas estarão correlacionadas com uma maior proporção de gametócitos femininos enquanto infecções com maior variabilidade estarão relacionadas com proporções mais equilibradas de gametócitos de ambos os sexos. Tal estará relacionado com a produção de um maior número de gâmetas por cada gametócito masculino, que potencialmente poderá produzir oito gâmetas, enquanto o gametócito feminino apenas produz um gâmeta, reduzindo assim o desperdício de gâmetas masculinos e aumentando a probabilidade de fecundação. Sabe-se ainda que a proporção de gâmetas femininos/masculinos pode ser afectada devido a outros factores, tais como a densidade de glóbulos vermelhos, de parasitas e de gametócitos (Reece *et al.*, 2008).

Durante o presente trabalho foram realizadas diversas experiências, e na maioria das experiências não foram observados oocinetos. À medida que as experiências foram sendo repetidas, foi possível obter melhorias nos resultados e nas últimas experiências foram sempre observadas mais formas circulares (zigotos não transformados e macrogâmetas não fertilizados), formas retortas assim como os poucos oocinetos obtidos.

As melhorias observadas provavelmente estão relacionadas com a obtenção de culturas com gametócitos maduros em períodos mais curtos, o que poderá ser devido a uma alteração do meio de cultura resultante do envelhecimento e degradação dos eritrócitos.

Apesar destas melhorias este método não pareceu ser capaz de produzir oocinetos em quantidade suficiente para uso experimental, pois seria difícil observar diferenças entre grupos experimentais com números tão baixos de oocinetos. Devido a estes resultados não mostrarem sucesso suficiente para o avanço do trabalho a realizar no período limitado de um projecto de doutoramento, foi abandonado e outras vias de estudo foram seguidas.

# Capítulo V

Infecções mistas experimentais de mosquitos  
*Anopheles albimanus* com *Plasmodium falciparum* e  
*Plasmodium vivax*.

---



## V.1- INTRODUÇÃO

Na natureza é normal a ocorrência de infecções mistas com diferentes genótipos ou espécies de *Plasmodium*. Contudo a informação de como diferentes populações de parasitas afectam o curso da infecção é bastante escassa, especialmente em relação à transmissão ao mosquito vector e ao desenvolvimento esporogónico. A transmissão destas espécies ao mosquito provavelmente será afectada não só pela interacção entre as espécies e resposta do hospedeiro vertebrado, mas também pela capacidade do mosquito transmitir cada uma das espécies isoladamente.

A competição entre os diferentes clones no hospedeiro vertebrado poderá determinar o sucesso da transmissão como sugerem alguns estudos em que a composição clonal de *P. chabaudi* no hospedeiro vertebrado foi semelhante à observada no mosquito (Taylor e Read, 1998; de Roode *et al.*, 2005) ou que a transmissão aos mosquitos foi mais baixa em infecções policlonais de *P. chabaudi*, nas quais o número de gametócitos era menor (de Roode *et al.*, 2003). No entanto resultados contrários foram observados noutra estudo com dois clones distintos de *P. chabaudi*, onde o potencial de transmissão de infecções policlonais foi mais alto do que o de infecções simples, verificando-se a existência de um maior número de gametócitos na infecção policlonal (Taylor *et al.*, 1997).

Mas a competição no hospedeiro vertebrado não poderá explicar o sucesso/insucesso do desenvolvimento de cada espécie/população parasitária no mosquito. Competição interespecífica entre *P. gallinaceum* e *Plasmodium juxtannucleare* foi observada ao nível da fertilização na refeição sanguínea, sendo a transmissão de *P. gallinaceum* significativamente afectada (Paul *et al.* 2002) e Arez e colaboradores (2003) observaram que as infecções com *P. falciparum* em mosquitos apresentam menos variedade de genótipos que no hospedeiro humano.

O desenvolvimento esporogónico não será apenas afectado por factores intrínsecos do parasita ou competição entre eles, mas também por factores do hospedeiro. Um dos principais factores que provavelmente será determinante para o desenvolvimento esporogónico será a resposta imunológica do mosquito. Hoje sabemos que o mosquito é capaz de montar uma resposta imunológica eficaz contra *Plasmodium*, e embora não existam muitos estudos sobre este assunto, esta resposta poderá ser específica para cada espécie. Os dados da literatura indicam que mosquitos *Anopheles* produzem diferentes respostas imunológicas contra diferentes espécies de *Plasmodium*. Por exemplo, mosquitos *A. gambiae*, têm alterações na transcrição de genes associados à resposta imunológica que diferem com a infecção por *P. falciparum* ou *P. berghei* (Tahar *et al.*, 2002 and Dong *et al.*, 2006).

O modo como as espécies de *P. falciparum* e *P. vivax*, que coabitam geograficamente, interagem durante o desenvolvimento esporogónico é totalmente desconhecido e consequentemente o impacto da infecção mista na transmissão de malária do mosquito ao Homem. Sabendo-se que a competição entre parasitas e o modo como o mosquito controla a infecção pode variar com a espécie, os objectivos do trabalho consistiram em caracterizar e comparar a dinâmica de infecção simples e mista destas duas espécies, assim como estudar a resposta imunológica do mosquito a cada tipo de infecção. Para isso foi estudada a expressão de vários genes envolvidos na resposta imunológica do mosquito.

## V.2- MATERIAL E MÉTODOS

### V.2.1- Manutenção de mosquitos

Mosquitos *A. albimanus* provenientes da colônia de mosquitos do Instituto de Imunologia del Valle, sede de Buenaventura, foram mantidos a 27-29 °C. Nesta colônia são produzidos em separado mosquitos *A. albimanus*, colonizados a partir de mosquitos recolhidos em diferentes localidades: Zacarias, onde há maior transmissão de *P. vivax* e Buenaventura, onde a transmissão de *P. falciparum* é mais preponderante.

### V.2.2- Recolha de amostras sanguíneas

Os pacientes foram seleccionados de acordo com a sua infecção, para tal foi necessário que houvessem dois pacientes infectados, um com infecção simples de *P. falciparum* contendo gametócitos maduros e outro com infecção simples de *P. vivax* com pelo menos duas cruces (11 a 100 parasitas em cada 100 campos). Antes da recolha de sangue para a experiência, os pacientes receberam uma explicação detalhada acerca dos objectivos do estudo e uma declaração de consentimento informado foi assinada (ver modelo usado em anexo). Foi também preenchido um questionário com alguns dados pessoais dos pacientes.

O sangue dos pacientes foi colhido para: 1) produção de esfregaços sanguíneos e gota espessa; 2) preparação de DNA (papel de filtro); 3) preparação de RNA (Trizol LS a -70°C) ; 4) e separação de plasma e eritrócitos. A fracção de glóbulos vermelhos foi lavada com meio RPMI e ressuspendido em plasma AB, sendo depois usado nos ensaios de alimentação artificial de membrana de mosquitos. O plasma foi guardado a -70 °C para uso futuro em estudos imunológicos.

### V.2.3- Infecções de mosquitos

Os mosquitos foram alimentados como descrito por Hurtado e colaboradores (1997). Em resumo, os mosquitos foram mantidos em jejum pelo menos 5 horas antes da alimentação. Lotes de 500 mosquitos foram alimentados durante 30 minutos à temperatura ambiente (28 ±1 °C). Os mosquitos não alimentados foram descartados e os que ficaram foram mantidos com uma solução de 10% de glicose.

Em cada experiência quatro grupos de mosquitos foram alimentados do seguinte modo:

Grupo I – pelo menos 500 mosquitos *A. albimanus* alimentados com uma mistura de sangue infectado com *P. falciparum* e *P. vivax*.

Grupo II – pelo menos 500 mosquitos *A. albimanus* alimentados com sangue infectado com *P. falciparum*.

Grupo III – pelo menos 500 mosquitos *A. albimanus* alimentados com sangue infectado com *P. vivax*.

Grupo IV – pelo menos 500 mosquitos *A. albimanus* alimentados com sangue não infectado (controlo negativo).

Esta experiência foi repetida sete vezes, tendo sido utilizado o mesmo dador de sangue infectado com *P. falciparum* na sexta e sétima experiências. No entanto em quatro experiências não foram observados oocistos em pelo menos um dos grupos de infecção, ao oitavo dia pós infecção, e como tal não foram posteriormente usadas para este estudo.

As duas primeiras experiências foram feitas em duplicado, com mosquitos *A. albimanus* provenientes de colónias iniciadas com mosquitos de diferentes localidades: Zacarias e Buenaventura, com o objectivo de avaliar qual dos dois tipos de mosquitos seria o mais adequado para continuar com o estudo. Após a segunda experiência decidiu-se usar os mosquitos isolados da localidade de Zacarias, com base nos bons resultados obtidos na primeira experiência e devido à sobrevivência muito baixa dos mosquitos isolados em Buenaventura. No grupo de mosquitos isolados de Buenaventura, em ambas as experiências, a mortalidade foi tão elevada que ao D8 quase não havia mosquitos suficientes para contagem de oocistos ou recolha de material (< 10 em cada grupo).

#### V.2.4- Recolha de material biológico.

De modo a detectar a infecção no intestino médio e glândulas salivares foram colectados individualmente abdómens ou tóraxes em tubos para extracção de DNA. Para determinar o perfil de expressão de genes do mosquito foram colectados conjuntos de 40 intestinos médios. De seguida, retirou-se da carcaça do abdómen, os túbulos de Malpighi e os ovários; o restante, que equivale ao corpo gordo, foi recolhido para extracção de RNA (ver tabela V.1). O processo de recolha de amostras encontra-se esquematizado na figura V.1.

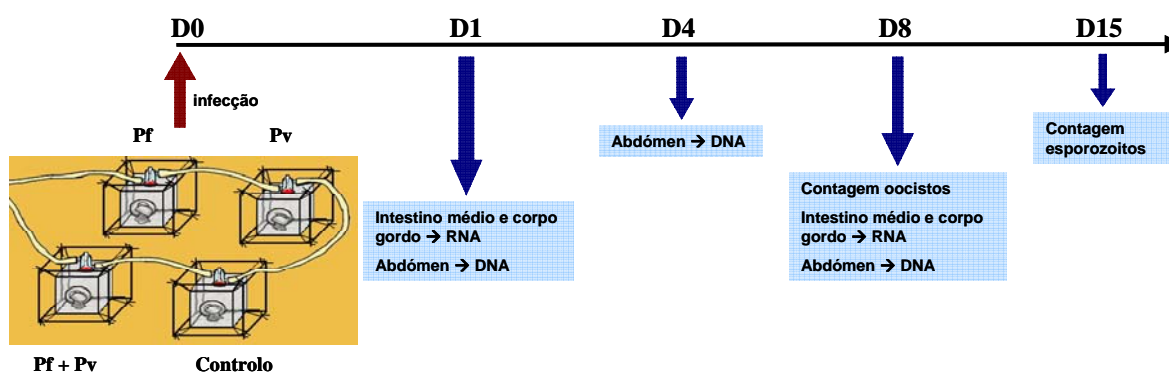


Figura V.1- Esquema de recolha de material biológico. D0- dia zero; D1- dia 1; D5- dia 5; D8-10- dias 8 a 10; D15- dia 15.

Tabela V.1 – Tipo de amostra e quantidade recolhida, em cada experiência.

Experiência		DNA				RNA			
		abdómen			tórax	intestino médio		corpo gordo	
		Dia 1	Dia5	Dia 8	Dia 15	Dia 1	Dia 8	Dia 1	Dia 8
I	Pf	10	10	10	-	40	40	40	40
	Pv	10	10	10	-	40	40	40	40
	Pf + Pv	10	10	10	-	40	40	40	40
	C(-)	10	10	10	-	40	40	40	40
II	Pf	10	20	30	30	40	40	40	40
	Pv	10	20	30	30	40	40	40	40
	Pf + Pv	10	20	30	30	40	40	40	40
	C(-)	10	10	10	10	40	40	40	40
III	Pf	30	30	30	-	40	40	40	40
	Pv	30	30	30	-	40	40	40	40
	Pf + Pv	30	30	30	-	40	40	40	40
	C(-)	10	10	10	-	40	40	40	40
IV	Pf	30	30	30	-	40	40	40	40
	Pv	30	30	30	-	40	40	40	40
	Pf + Pv	30	30	30	-	40	40	40	40
	C(-)	10	10	10	-	40	40	40	40

Pf- infecção com *P. falciparum*; Pv- infecção com *P. vivax*; Pf + Pv- infecção mista com *P. falciparum* e *P. vivax*; C(-)-mosquitos alimentados com sangue não infectado (controlo negativo).

### V.2.5- Extração de DNA

Os mosquitos foram recolhidos para uma solução de NaCl (0,9% p/v) em gelo e foram homogeneizados com a ponta da pipeta. Adicionou-se 240 µl de Chelex-100 (5% p/v) previamente aquecido a 100 °C e agitado no vórtex. As amostras foram aquecidas 10 minutos a 100 °C e depois centrifugadas a 14000 rpm, durante 10 minutos.

O sobrenadante foi recolhido, adicionou-se 45 µl de acetato de sódio e 1 ml de etanol absoluto, agitou-se no vórtex e deixou-se a precipitar de um dia para o outro a -20 °C.

As amostras foram centrifugadas 15 minutos a 140000 rpm, o sobrenadante foi recolhido e adicionou-se 800 µl de etanol a 80%. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 14000 rpm, durante 10 minutos.

O sobrenadante foi retirado e após secagem, o depósito foi diluído em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).

### V.2.6- Detecção de *Plasmodium* por PCR

A detecção de *Plasmodium* foi feita por amplificação de genes que codificam para a pequena unidade de RNA ribossomal por *nested*-PCR (Snounou *et al.*, 1993).

A primeira reacção de PCR foi realizado com 1 µl da solução de DNA num volume final de 20 µl, contendo 10 mM de Tris-HCl a pH 8,3; 50 mM de KCl; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 125 µM de dNTPs; 0,125 µM de *primer* rPLU5 e rPLU6 (tabela V.2); 0,4 U de Taq polimerase (Promega).

A segunda reacção de PCR foi realizado com 1 µl de produto amplificado do primeiro PCR, num volume final de 20 µl, contendo 10 mM de Tris-HCl a pH 8,3; 50 mM de KCl; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 125 µM de dNTPs; 0,125 µM de cada *primer* (FAL1 FAL2, MAL1 MAL2, OVA1 OVA2, VIV1 VIV2- ver tabela V.2); 0,4 U de Taq polimerase (Promega).

Tabela V.2- *Primers* usados para identificação de espécies de *Plasmodium*.

	Nome	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento
Género	rPLU5	CTTGTTGTTGCCTTAAACTTC	1200 pb
<i>Plasmodium</i>	rPLU6	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	
<i>P. falciparum</i>	rFAL1	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	205 pb
	rFAL2	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC	
<i>P. malariae</i>	rMAL1	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC	144 pb
	rMAL2	AAAATTCCTATGCATAAAAAATTATACAAA	
<i>P. ovale</i>	rOVA1	ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTATTGGAGA	800 pb
	rOVA2	GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG	
<i>P. vivax</i>	rVIV1	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	120 pb
	rVIV2	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAAGTCCTTA	

pb- pares de bases

### V.2.7- Extração e purificação de RNA

RNA celular total foi extraído do intestino médio e corpo gordo usando o método de Trizol (Invitrogen- Life Technologies, Espanha) de acordo com as instruções do fabricante.

Para remover potenciais contaminações com DNA genómico (gDNA), o RNA foi tratado com DNaseI. Para tal 1 µg de amostra de RNA foi incubada 15 minutos à temperatura ambiente num volume final de 10 µl, contendo 400mM Tris-HCl (pH 8.0); 100mM MgSO<sub>4</sub>; 10mM CaCl<sub>2</sub>; e 1 U de DNase RQ1 (Promega). A reacção foi interrompida por aquecimento da mistura durante 10 minutos a 65 °C.

### V.2.8- Produção de cDNA por transcrição reversa

Uma porção do RNA total (0,4 - 1 µg) foi usado para transcrição reversa num volume de reacção de 20 µl, contendo tampão de reacção (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT); 10 µM de dNTPs; 0.2 µM do primer 3'-RACE CDS

(AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)<sub>30</sub>VN) (Clontech, E.U.A.) e 100 U da enzima MMLV-RT (Promega).

### V.2.9- Identificação de genes de *Anopheles albimanus*

Como o genoma de *A. albimanus* não se encontra sequenciado, poucas sequências de genes associados ao sistema imunológico desta espécie estão disponíveis em bases de dados públicas. A obtenção dessas sequências permitiria o estudo de expressão desses genes por PCR quantitativo em tempo real. Vários métodos foram usados para tentar obter sequências de genes envolvidos na resposta imunológica e do gene ribossomal *S7*:

1- Usando primers desenhados para outras espécies do mesmo género (*A. gambiae* e *A. stephensi*).

A proximidade genética e existência de zonas codificantes bem conservadas poderiam ser um factor importante para o sucesso deste método. Na tabela V.3 estão representados os primers usados neste procedimento assim como a espécie para a qual foram originalmente desenhados. Estes primers foram usados em reacções de PCR com gDNA e cDNA. Nas reacções de PCR foram utilizados o par de primers originalmente desenhado ou o primer forward foi usado em conjunto com o primer NUP (tabela V.3) para amplificar amostras de cDNA produzido com o primer 3'-RACE CDS.

2- Usando zonas conservadas em sequências de outras espécies de mosquitos, dos géneros *Anopheles* e *Aedes*.

As sequencias foram alinhadas usando o algoritmo ClustalW, no programa BioEdit, ou usando o programa Multalin, em <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html> (Corpet, 1988). As zonas mais conservadas foram usadas para desenhar primers degenerados (tabela V.3). Os primers desenhados para amplificar o gene que codifica a sintetase de óxido nítrico (NOS), foi usado para amplificar gDNA e cDNA; os outros primers foram usados em conjunto com o primer NUP para amplificar amostras de cDNA que haviam sido produzidas com o primer 3'-RACE CDS.

3- A sequência do gene PGRP-LB (GI:66735591) foi obtida a partir da base de dados pública da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4- As sequências (parciais) dos genes defensina, cecropina 3, atacina e gambicina foram gentilmente fornecidas pelo Doutor Jesus Martinez (INSP, México).

### V.2.10- PCR para identificação de sequências de *Anopheles albimanus*.

Para cada reacção de PCR foi usado 1 µl de amostra de gDNA, ou cDNA, de *A. albimanus*, e gDNA de *A. gambiae* ou de *A. stephensi* como controlo positivo.

Tabela V.3– Informação sobre *primers* usados em reacções de PCR com DNA genómico e complementar de *A. albimanus*, assim como a espécie para que foram inicialmente desenhados.

Gene	Espécie	Nome primer	Sequência 5'→3'
S7	<i>A. stephensi</i>	S7As-F	CGGCTGGTGCGTGAATTGG
		S7As-R	GCGGTCTCTTCTGCTTGTGG
	<i>A. gambiae</i>	S7Ag-F	GAGGTGGTCGGCAAGCGTATCC
		S7Ag-R	CGATGGTGGTCTGCTGGTTCTTATCC
5a1 (AGAP005310)	<i>A. stephensi</i>	As5a1-F	AGTGCCGGAGCTGGATTCTGTATGG
		As5a1-R	CTGAAGTAGCCGACGTTCGATGAAAAC
	<i>A. gambiae</i>	Ag5a1-F	CGATCTGGCCGTGGTGGAG
		Ag5a1-R	ACGGTGGCGAGCAAGTTTTCA
ClipB9	<i>A. gambiae</i>	Sp14A-F	GGACGAAGGCGAACGACT
		Sp14A-R	ACAGCTGCTCCCAATGA
ClipB4	<i>A. gambiae</i>	Sp14D1-F	CGGCAAGTGTGTCCTGT
		Sp14D1-R	CGCGTAGAAGTCATCCTC
ClipB1	<i>A. gambiae</i>	Sp14D2-F	TGGGGCCAGACGGAAAACAGT
		Sp14D2-R	CCGCGGCACGAGTCCTTACCC
SCASP1	<i>A. gambiae</i>	Sp22D-F	TATTCCCGCACCCCAGCAACAAAC
		Sp22D-R	GAGCGCAAATCAAACCCATCGTAG
AgSP24D	<i>A. gambiae</i>	Sp24D-F	TGGCCCGAGTAATAACGCACGAG
		Sp24D-R	TACATACGCCCCAGCCGAGATAA
Defensina	<i>A. gambiae</i>	Def-F	GTACCAITGCCGTTGTGCTG
		Def-R	GATAGCGGCGAGCGATACAG
Cecropina	<i>A. gambiae</i>	Cec-F	CAACCCAGAGACCAACCAACCAC
		Cec-R	ACTGCCAGCACGACAAAGATGAAG
Gambicina	<i>A. gambiae</i>	Gamb-F	GCATCGGGGCACGCTACTGT
		Gamb-R	GGTCCTGCCGATGATGGT TCC
NOS	<i>A. gambiae</i>	AgNOS-F	GAACCAATTCCAAAGACCT
		AgNOS-R	GCCGAAAATGTCCTCGTG
PGRP-S2	<i>A. gambiae</i>	PGRPS2-F	ATTCCGGGATGGCGTTGGTGA
		PGRPS2-R	TAGGAAGGATAGGCGGCAGTGAA
PGRP-S3	<i>A. gambiae</i>	PGRPS3-old-R	GGTGACTCCCCGATAACGAATAAT
		PGRPS3-old-F	TCTCAAACCAAGGTAAACACATA
	<i>A. gambiae</i>	PGRPS3-new-F	TATGCAGCGTGACGTAGTATGG
		PGRPS3-new-R	TGATTAGCACAAACGATGAGATTAGC
AGAP001199	<i>A. gambiae</i>	1644280-F	GCCGGCGAGCACGACTTCAG
		1644280-R	CGGTTCCGGCAGCGAGAC
ClipA2	<i>A. gambiae</i>	ISPL5-F	CITAAACAACATTGCCGTGCTGGAG
		ISPL5-R	ATATCTGCGTCCGGTGGTGCCTTCT
Cecropina 1 e	---	Cec1e3-ex1-F	ATGAACTTCDMVAGHTNTTYVTCHTBRTSG
Cecropina 2*	---	Cec2-ex1-F	ATGAACTTCRMVMWGDNTTYSTCS
Defensina*	---	Def-deg-F	GGAYGAACTGCCSGAGGAAAC
NOS	---	NOS-5-8-F	SCAAGCAYGAYTAYCGCATYTG
		NOS-5-8-R	GCTCTCGCTGGCBGTGTGRAC
---	---	NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT

\* O primer reverse usado nesta reacção foi o NUP

A reacção base foi realizada com 1 µl de amostra num volume final de 25 µl, contendo 75 mM de Tris-HCl a pH 8,8; 20 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween 20; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 20 µM de dNTPs; 0,5 µM de cada primer (tabela V.3); 0,5 U de Taq polimerase (Fermentas).

A reacção de PCR foi realizada com um período de desnaturação inicial de 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos 55°C e 45 segundos a 72°C, um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Vários factores foram testados: (1) diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub>; (2) Diferentes concentrações de primers; (3) Diferentes temperaturas de *annealing*, usando inicialmente as temperaturas de *annealing* óptimas para o par de *primers* e posteriormente testando temperaturas mais baixas; (4) variação do número de ciclos. Em alguns casos as amostras foram reamplificadas, usando condições mais ou menos específicas no segundo PCR.

#### **V.2.11- Purificação de produto de PCR a partir de bandas do gel de agarose.**

Quando foram obtidas bandas individuais com tamanho próximo ao esperado, foram extraídas e purificadas do gel de agarose, usando o kit QIAquick (QIAGEN, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **V.2.12- Clonagem e isolamento dos plasmídeos**

As bandas obtidas foram clonadas num vector TA, usando o sistema pGEM-T (Promega, França) de acordo com as instruções do fabricante.

Os plasmídeos foram recuperados, usando o kit QIAprep Miniprep (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **V.2.13- Sequenciação dos fragmentos clonados**

A sequenciação foi feita pela empresa Macrogen (Coreia do Sul). As sequências obtidas foram processadas e comparadas com sequências das bases de dados do Ensembl e TIGR, usando os programas BLAT e tBLASTX.

#### **V.2.14- PCR quantitativo em tempo real**

A expressão dos genes PGRP-LB, defensina, gambicina, cecropina 3 e atacina foi estudada por PCR quantitativo em tempo real (QT-PCR). O gene *S7* foi usado como controlo interno. As rectas padrão foram construídas a partir de concentrações conhecidas e sucessivas diluições 1/10 de uma amostra de gDNA de *A. albimanus*. O valor obtido para os grupos infectados foi dividido pelos obtidos para o grupo controlo não infectado.

A reacção de PCR foi efectuada com qPCR core kit para SYBR Green (Eurogentec, Belgica), usando o ICycler (BIORAD, Portugal). A concentração final dos reagentes foi 1x tampão de reacção, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 0,3 µM de cada *primer*, 0,025 U/µl de enzima Hot GoldStar e 1/66000 de SYBR green num volume final de 20 µl. Usou-se 1 µl de cDNA diluído 1:10 ou 1:100 para amplificação. As condições de amplificação foram 10 minutos a 95 °C para desnaturação, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos e 60 minutos. Os *primers* usados para amplificação estão descritos na tabela V.4. Para alguns genes o primeiro par de *primers* não funcionou, assim foi desenhado um segundo par.

Tabela V.4- *Primers* usados para reacção de PCR em tempo real.

Gene	Nome <i>primer</i>	Sequência 5'→3'
<i>S7</i>	S7Aa-F	CGCTCCCGAACCCCTGAC
	S7Aa-R	GCTTGCCGACCACCTTCC
	S7Aa(2)-F**	AGCCGCGACCCYAACAAGCAGAAG
	S7Aa(2)-R**	CCGCCGGGAAGACCAAATC
<i>clipB1*</i>	Sp14D2Aa-F	GGTGGTGGACAATGAGG
	Sp14D2Aa-R	AATGATTTCCAACCGTATCG
	Sp14D2Aa(2)-F	GCACGAAGAAGCTCCATCTG
PGRP-LB	Sp14D2Aa(2)-R	GAACGCATCGGCACATAAC
	PGRP-LBAa-F**	CTACCGCCGAAGAAAATGC
	PGRP-LBAa-R**	CGAGGAGCGTGTAGTTGC
<i>defensina</i>	AaDef-F	AGTGCTGCCGTTGCCGATAGTC
	AaDef-R	GCCTCTCCGATCTTCTGCGTTCTTAG
	AaDef(2)-F**	CACCATGCGGCACITGAGAACTAC
	AaDef(2)-R**	ACTGCTGCCACACCGAATCCAC
<i>cecropina 3</i>	AaCEC3-F	CGAACCTAAGACGACGATGAAC
	AaCEC3-R	CGGCGATGACTGGCAATG
	AaCEC3(2)-F**	GGAAACCCGCACGAACCTAAGAC
	AaCEC3(2)-R**	AGCACCGCGATCGCCACCATAA
	Gamb-Aa-ex3-F	TGGCAGATGCGTTGATTCTTAC
<i>gambicina</i>	Gamb-Aa-ex3-R	AGAGACTTGCTTCATTCGTTTCC
	AaGamb(3)-F**	CGAGATGAAGGTAGCCAGCGTGTG
	AaGamb(3)-R**	GCAAGTCGAAGCATAAGCGTAGA
<i>atacina</i>	AaAta-F	GAACGGCAAACGAAAGGACATC
	AaAta-R	ATGGAAGTAAGCATTTCAGTAGTTGTG
	AaAta(2)-F**	GGCGGACTGCAGGAATGAAACTCT
	AaAta(2)-R**	CGATCGGCCCTCCAAAACACCAG

\*- não foi possível obter resultados para a *clipB1*; \*\*- pares de primers com os quais os resultados foram obtidos.

Apesar de se ter desenhado e testado mais do que um primer para amplificar a *clipB1*, não foi possível obter resultados de expressão, possivelmente pelos primers não serem muito eficazes. O desenho de primers para este gene é limitado pela sequência disponível ser pequena (165 pares de bases).

#### **V.2.15- Análise estatística**

O teste exacto de Fisher (<http://www.langsrud.com/fisher.htm>) foi usado para comparar as taxas de infecção de cada grupo de infecção, usando dados combinados das várias experiências realizadas. A intensidade de infecção (número de oocistos por mosquito) e a expressão dos vários genes foram analisadas através do teste de Kruskal-Wallis, usando o programa informático SPSS v 16.0 for Windows (SPSS, Inc.). O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .

## V.3- RESULTADOS

### V.3.1- Análise da dinâmica de infecção

A detecção de espécie e parasitémia nos doentes foi realizada, após consulta clínica, por microscopia óptica, e a partir dessa avaliação foram seleccionados os pacientes para as experiências (tabela V.5). O sangue recolhido em sangue de filtro foi depois usado para diagnóstico por PCR das espécies presentes (tabela V.5), assim como para quantificação por PCR quantitativo em tempo real.

Tabela V.5- Detecção e parasitémia de *Plasmodium* nos pacientes participantes neste estudo, por microscopia óptica e por PCR.

Experiência	Paciente	Identificação de espécies	
		Microscopia óptica	PCR
1	1	Pv (++)	Pv
1	2	Pf (320 g/μl)	Pf
2	3	Pv (++)	Pv
2	4	Pf (500 g/μl)	Pf
3	5	Pv (++)	Pv
3 e 4	6	Pf (400 g/μl)	Pf
4	7	Pv (++)	Pf + Pv

Pf- *P. falciparum*; Pv- *P. vivax*; V- resultado positivo para *P. vivax*; F- resultado positivo para *P. falciparum*. g/μl- gametócitos por microlitro; +- 11 a 100 parasitas em 100 campos

Apesar de não ter sido detectado na altura da infecção, por microscopia óptica, análises posteriores por PCR verificaram que o paciente da experiência 4, identificado como infectado com *P. vivax* estava também infectado com *P. falciparum*. Uma segunda análise mais detalhada, das lâminas, por microscopia óptica confirmou a infecção mista. Este caso poderá ter afectado a percentagem de mosquitos infectados com *P. falciparum* na infecção mista da experiência 4. Este factor poderia ainda afectar a análise de expressão génica como resposta a cada uma das espécies, desse modo a quarta experiência não foi considerada para a análise de expressão.

A infecção dos mosquitos foi avaliada por microscopia óptica, por detecção e contagem de oocistos aos dias 8 a 10 pós-infecção (p.i.). Na tabela V.6 estão representadas as contagens efectuadas, representado o número de mosquitos analisados, o número de infectados, a mediana, máximo e mínimo de oocistos por mosquito em cada grupo experimental.

Apesar de mais experiências terem sido realizadas, apenas estas quatro foram apresentadas, pois as outras não apresentaram nenhum mosquito infectado, quando foi feita a contagem de oocistos a partir do dia 8.

Tabela V.6 – Contagens de oocistos.

Exp	Grupo de infecção	N infectados (analisados)	Taxa de infecção (%)	Mediana	Máximo	Mínimo
1	<b>MX</b>	5(20)	25	11	22	1
	<b>F</b>	5(10)	50	14	18	1
	<b>V</b>	9(19)	47	11	20	1
2	<b>MX</b>	14(40)	35	1.5	4	1
	<b>F</b>	19(80)	23	2	22	1
	<b>V</b>	11(40)	28	2	18	1
3	<b>MX</b>	1(80)	1.3	1		
	<b>F</b>	1(60)	1.7	1		
	<b>V</b>	4(40)	10	1	2	1
4	<b>MX</b>	9(40)	22.5	5	36	1
	<b>F</b>	1(60)	1.7	1		
	<b>V</b>	29(41)	70	7	33	1

MX- Infecção experimental mista com *P. falciparum* e *P. vivax*; F- Infecção experimental com *P. falciparum*; V- Infecção experimental com *P. vivax*.

A comparação das taxas de infecção entre cada grupo de infecção, pelo teste de Fisher revelou diferenças estatisticamente significativas entre a taxa de infecção observada para o grupo de infecção com *P. vivax* em relação aos grupos de infecção mista e de infecção com *P. falciparum*.

A carga parasitária (número de oocistos por intestino médio) foi analisada usando o teste de Kruskal-Wallis, mas não foram observadas diferenças entre os vários grupos.

A detecção e identificação de espécies de *Plasmodium* por PCR permitiu-nos avaliar o número de mosquitos infectados e qual a composição específica do grupo de infecção mista. Na tabela V.7 estão representados as percentagens de mosquitos infectados, com cada espécie, em cada grupo, nas quatro experiências analisadas.

Tabela V.7- Detecção e identificação de espécies de *Plasmodium*, por PCR. Percentagem de mosquitos infectados, com cada espécie em cada grupo experimental.

	D1					D4-5					D8-10				
	MX		Pf	Pv		MX		Pf	Pv		MX		Pf	Pv	
	Pf+P	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf+P	Pf	Pv	Pf	Pv	Pf+Pv	Pf	Pv	Pf	Pv
<b>E1</b>	0	0	50	0	80	0	0	100	10	90	10	0	90	20	90
<b>E2</b>	10	0	10	0	30	5	10	25	25	10	6,5	0	9,7	22,6	30
<b>E3</b>	0	3,7	3,7	4,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>E4</b>	0	0	10	4,2	10	0	0	12,5	0	13	0	6,3	28,1	0	71

D1- 24 horas p.i.; D4-5- dias 4 ou 5 p.i.; D8-10- dias 8 a 10 p.i.. MX- grupo infecção mista; F- grupo de infecção com *P. falciparum*; V- grupo de infecção com *P. vivax*. Pf- infecção com *P. falciparum*; Pv- infecção com *P. vivax*. E1, E2, E3 e E4- Experiências 1, 2, 3 e 4.

Tal como previamente observado com a contagem de oocistos a variabilidade entre experiências foi alta, verificando-se que a experiência 1 foi a que apresentou maiores taxas de infecção.

Na experiência 1, o número de mosquitos infectados, detectado no grupo de infecção com *P. falciparum*, foi bastante baixo às 24 horas pós-infecção (p.i.), tendo este valor subido nas análises posteriores. O número de mosquitos detectados por PCR ao dia 8 p.i. foi mais baixo do que o detectado por microscopia óptica. No entanto os mosquitos analisados não foram os mesmos e tal poderá ter-se devido a variação derivada da pequena amostragem (apenas 10 mosquitos analisados por microscopia óptica). Para os outros grupos, o método de PCR detectou mais mosquitos infectados que a microscopia óptica.

A experiência 2 foi aquela em que se observou um maior equilíbrio entre a infecção de *P. falciparum* e *P. vivax*. A detecção de mosquitos por PCR ao dia 9 detectou menos mosquitos infectados no grupo de infecção mista que a contagem pelo microscópio óptico, o que poderá ter sido devido à variabilidade inerente à pequena dimensão da amostra ou eventualmente estar relacionado com a libertação de esporozoítos ter já ocorrido, dificultando a detecção por PCR.

Por outro lado a experiência 3 e experiência 4, que foram realizadas no mesmo dia, usando sangue de um único paciente infectado com *P. falciparum* e sangue de dois pacientes com *P. vivax*, apresentou valores bastante baixos de infecção com *P. falciparum*. No caso da experiência 3 também foi baixa a infecção com *P. vivax*. Na experiência 3 foram detectados poucos mosquitos infectados por microscopia óptica e nenhum por PCR, no entanto foram analisados mais mosquitos por microscopia do que por PCR. Na experiência 4, como se verificou que o paciente infectado com *P. vivax*, estava também infectado com *P. falciparum*, não é possível saber qual a origem da infecção com *P. falciparum*, no grupo de infecção mista ao dia 8.

### V.3.1- Identificação de genes de *Anopheles albimanus*

Várias sequências de *A. albimanus* foram obtidas, contudo apenas duas dessas sequências corresponderam aos genes alvo que pretendíamos sequenciar: os genes *S7* e *clipB1*.

Para obtenção de fragmentos para cada gene, foi realizado um PCR em condições pouco específicas, obtendo-se diversos padrões de bandas (figura V.2). As bandas com tamanhos mais próximo do esperado foram isoladas e depois clonadas num vector TA, as colônias obtidas foram testadas por PCR (figura V.2) e seleccionadas para sequenciação.

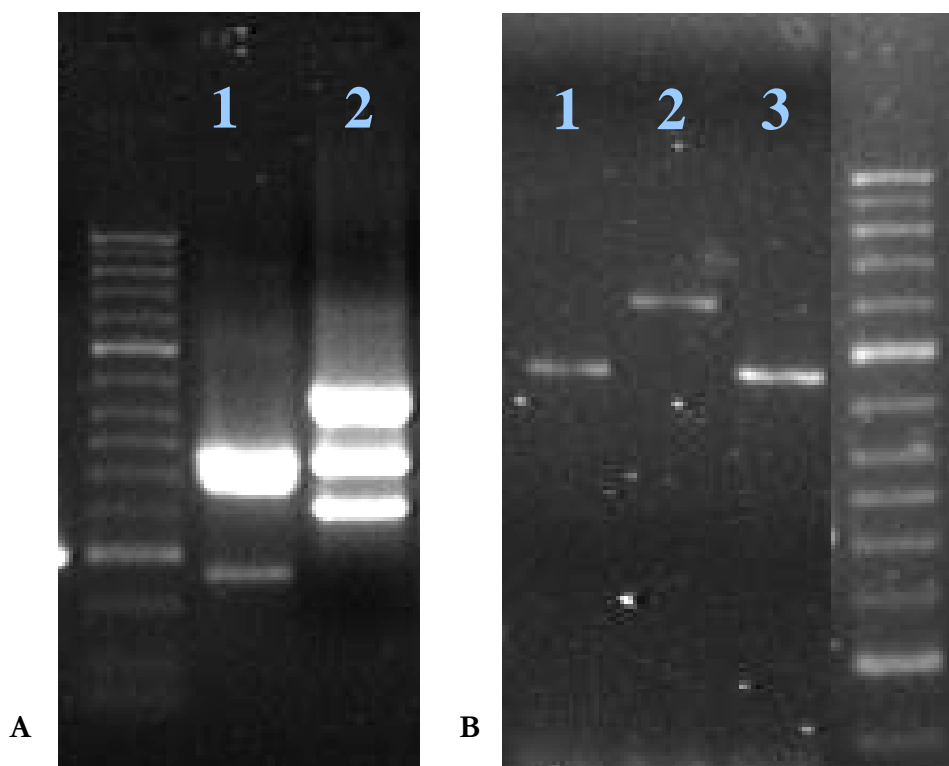


Figura V.2- Electroforese de produtos de PCR. A- PCR com primers *S7*, para amplificar duas amostras diferentes de cDNA de *A. albimanus* (1 e 2); B- Produto de amplificação de três colônias de bactérias clonadas com os produtos de PCR do gel A.

Na tabela V.8 estão anotadas as sequências obtidas, assim como os resultados da análise por BLAT e tBLASTX em comparação com a base de dados de *A. gambiae* da Ensembl (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>).

Tabela V.8- Lista de sequências obtidas, o seu tamanho e resultados da análise por BLAT e tBLASTX em base de dados de sequências de *A. gambiae*.

Nº	Gene alvo	Gene/função putativa	Código de acesso	Tamanho da sequência
13	<i>cecropina</i>	---		453 pb
14	<i>cecropina</i>	---		476 pb
17	<i>cecropina</i>	---		391 pb
18	<i>cecropina</i>	Oxidoredutase	ENSANGP00000018420	212 pb
19	<i>cecropina</i>	Não identificado	AB090813.1	707 pb
20	<i>cecropina</i>	---		221 pb
<b>7</b>	<b><i>ClipB1</i></b>	<b><i>ClipB1</i></b>	<b>ENSANGG00000011095</b>	<b>165 pb</b>
5	<i>ClipB1</i>	G-protein beta WD-40 repeat	ENSANGG00000014925	308 pb
6	<i>ClipB1</i>	Carbohydrate kinase, FGGY	ENSANGG00000015648	157 pb
8	<i>ClipB1</i>	Ligação a quitina/metabolismo	Q6VAV5	672 pb
11	<i>ClipB1</i>	WD repeat 43	ENSANGG00000014925	333 pb
21	<i>ClipB1</i>	G-protein beta WD-40 repeat	ENSANGG00000014925	333 pb
22	<i>ClipB1</i>	G-protein beta WD-40 repeat	ENSANGG00000014925	333 pb
23	<i>ClipB1</i>	---		561 pb
24	<i>ClipB1</i>	---		438 pb
1	<i>defensina</i>	Transportador mitocondrial	ENSANGG00000012281	690 pb
2	<i>defensina</i>	EA2	ENSANGG00000017505	799 pb
3	<i>defensina</i>	Ambíguo	ENSANGG00000013315	670 pb
9	<i>defensina</i>	Protease (quimiotripsina)	ENSANGG00000012272	189 pb
10	<i>defensina</i>	RNA ribossomal (rRNA)	gb  L78065.1  MSQINSP	133 pb
12	<i>defensina</i>	Protease (quimiotripsina)	ENSANGG00000012272	189 pb
25	<i>gambicina</i>	Não identificado	ENSANGP00000027436	703 pb
26	<i>gambicina</i>	---		471 pb
27	<i>gambicina</i>	Não identificado	ENSANGP00000024428	470 pb
28	<i>gambicina</i>	Proteína ribossomal	ENSANGP00000012229	237 pb
29	<i>NOS</i>	---		330 pb
<b>4</b>	<b><i>S7</i></b>	<b>proteína ribossomal S7 40S</b>	<b>ENSANGG00000014460</b>	<b>269 pb</b>
15	<i>S7</i>	aminopeptidase	ENSANGP00000021245	815 pb
16	<i>S7</i>	Não identificado	ENSANGG00000011280	575 pb

pb- pares de bases

Das 29 sequências, duas correspondem ao gene alvo, para o qual tinham sido desenhados os primers. A maior parte das sequências obtidas não correspondeu ao gene alvo que se pretendia amplificar, o que pode ser atribuído ao uso de condições de amplificação pouco específicas e a variações da sequência destes genes entre ambas as espécies.

### V.3.2- Análise de expressão de genes associados à resposta imunológica

De forma a avaliar a resposta imunológica do mosquito, foi analisada a expressão de 5 genes do sistema imunológico do mosquito (PGRP-LB, atacina, cecropina 3, defensina e gambicina), no intestino médio e no corpo gordo às 24 horas e aos dias 8-10 p.i. Os resultados apresentados, nos gráficos das figura V.3 a V.7, representam a média dos valores de expressão obtidos para cada um dos grupos de infecção divididos pelo valor do controlo não infectado. Deste modo, valores acima de 1 representam expressão superior ao controlo e valores abaixo de 1, o inverso.

#### ***PGRP-LB***

A expressão do gene *PGRP-LB* no intestino médio foi mais variável às 24 horas p.i. que aos dias 8 a 10, no entanto os valores de expressão mantiveram-se sempre em níveis próximos do controlo (figura V.3).

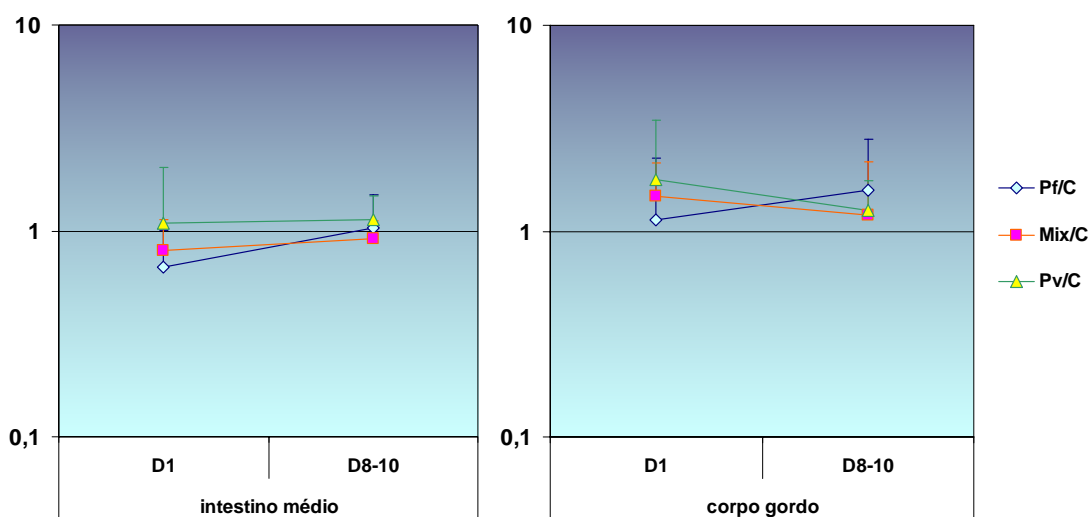


Figura V.3- Padrão de expressão da *PGRP-LB*, obtido por qRT-PCR, no intestino médio e corpo gordo, 1 dia p.i. (D1) e 8 a 10 dias p.i. (D8-10). Os resultados representam a média e o desvio padrão de 3 experiências independentes. O incremento/decremento foi calculado dividindo a expressão de cada grupo de infecção pela expressão do respectivo grupo controlo não infectado. Pf/C- Incremento/decremento da expressão do grupo infectado com *P. falciparum*; Mix/C- Incremento/decremento da expressão do grupo com infecção mista (*P. vivax* e *P. falciparum*); Pv/C- Incremento/decremento da expressão do grupo infectado com *P. vivax*.

No corpo gordo a média de expressão nos dois pontos de análise, 24 horas p.i. e dias 8 a 10 p.i., foi ligeiramente acima da expressão observada para o controlo, a expressão no grupo infectado com *P. falciparum* foi mais alta nos dias 8 a 10 p.i. do que às 24h e o inverso foi observado para os outros grupos de infecção. Os resultados observados são variáveis mas indicam uma regulação positiva deste gene no corpo gordo de mosquitos infectados.

## Defensina

A expressão da *defensina* no intestino médio, foi mais alta no grupo de infecção com *P. vivax* às 24 horas p.i., mostrando um aumento médio de expressão de 2,8 vezes em relação ao controlo e no grupo infectado com *P. falciparum* aos dias 8 a 10 p.i., com um aumento médio de expressão de 2,2 vezes em relação ao controlo (figura V.4). Os outros grupos apresentaram valores de expressão próximos do controlo (diferença inferior a 2).

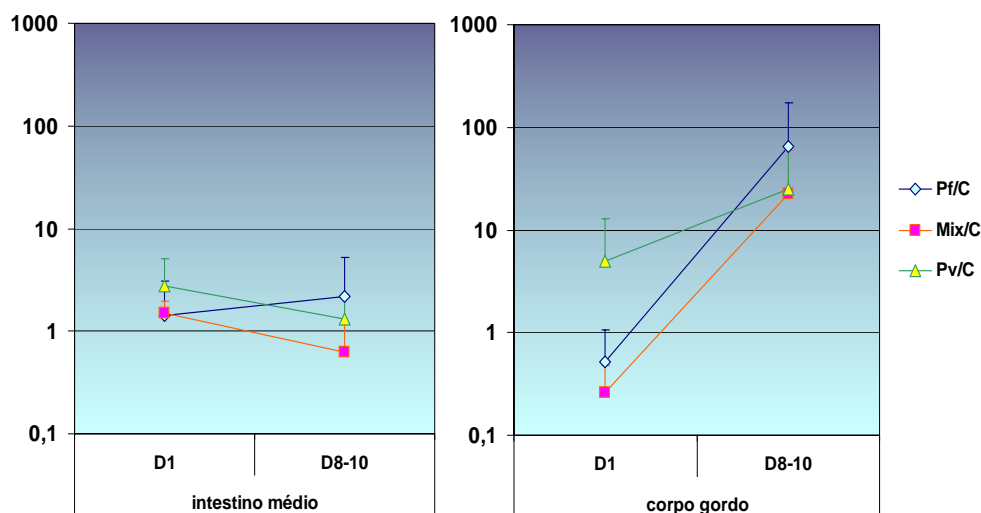


Figura V.4- Padrão de expressão da *defensina*, obtido por qRT-PCR, no intestino médio e corpo gordo, 1 dia p.i. (D1) e 8 a 10 dias p.i. (D8-10). Os resultados representam a média e o desvio padrão de 3 experiências independentes. O incremento/decremento foi calculado dividindo a expressão de cada grupo de infecção pela expressão do respectivo grupo controlo não infectado. Pf/C- Incremento/decremento da expressão do grupo infectado com *P. falciparum*; Mix/C- Incremento/decremento da expressão do grupo com infecção mista (*P. vivax* e *P. falciparum*); Pv/C- Incremento/decremento da expressão do grupo infectado com *P. vivax*.

No corpo gordo detectaram-se maiores diferenças de expressão em relação ao controlo. Existe grande variabilidade entre os grupos infectados às 24 horas, apresentando o grupo de infecção com *P. vivax* um valor de expressão média 5 vezes superior ao controlo e 3,6 vezes maior que o grupo de infecção mista. Nos dias 8 a 10 p.i. a expressão média dos grupos infectados é bastante mais alta do que no controlo, indicando a sobre-regulação da defensina no corpo gordo de mosquitos infectados 8 a 10 dias após a infecção.

## Cecropina 3

A expressão de *cecropina 3* no intestino médio, às 24 horas p.i., foi mais alta nos grupos infectados que no grupo controlo (4,1 a 4,8 vezes mais alta). Nos dias 8 a 10 p.i., a expressão no grupo infectado com *P. vivax* foi 4,2 vezes mais baixa que no controlo (figura V.5).

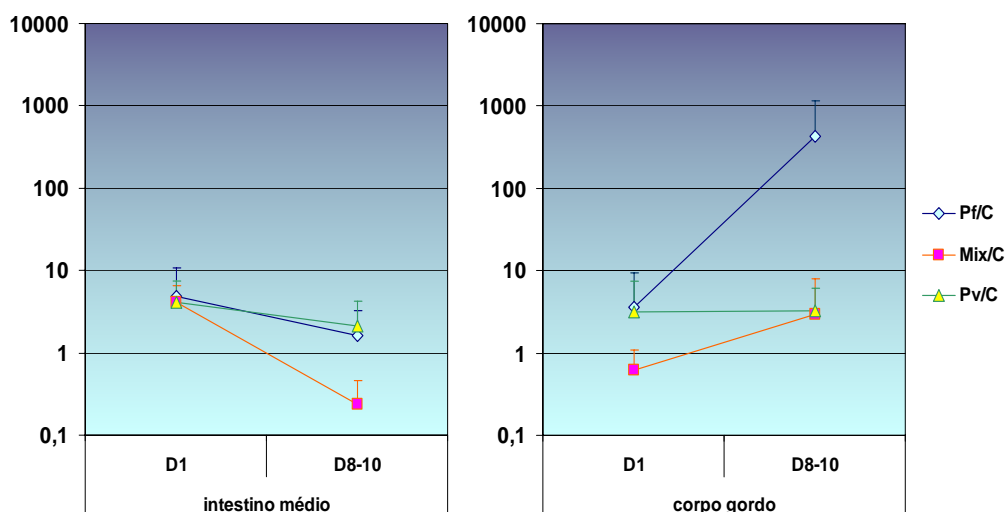


Figura V.5- Padrão de expressão da *cecropina 3*, obtido por qRT-PCR, no intestino médio e corpo gordo, 1 dia p.i. (D1) e 8 a 10 dias p.i. (D8-10). Os resultados representam a média e o desvio padrão de 3 experiências independentes. O incremento/decremento foi calculado dividindo a expressão de cada grupo de infecção pela expressão do respectivo grupo controle não infectado. Pf/C- Incremento/decremento da expressão do grupo infectado com *P. falciparum*; Mix/C- Incremento/decremento da expressão do grupo com infecção mista (*P. vivax* e *P. falciparum*); Pv/C- Incremento/decremento da expressão do grupo infectado com *P. vivax*.

No corpo gordo, às 24 horas, a expressão de cecropina estava aumentada nos mosquitos infectados com *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente 3,2 e 3,6 vezes. Enquanto o grupo de infecção mista apresentou valores de expressão próximos do controle. Nos dias 8 a 10 pós-infecção verificou-se um aumento de expressão em todos os grupos infectados especialmente nos mosquitos infectados com *P. falciparum*. No entanto este valor é desviado por uma experiência que apresenta valores muito altos e diferentes das outras duas experiências.

### ***Gambicina***

A expressão da *gambicina* no intestino médio dos mosquitos infectados apresentou sempre níveis muito próximos do controle, em ambos os pontos de amostragem (figura V.6).

No corpo gordo foi observado uma aumento de expressão a partir dos dias 8-10 p.i.. Todos o grupos de infecção apresentaram neste dia expressões médias entre 3,8 e 166,6 vezes superiores às observadas para o controle. O valor extremamente alto observado para o grupo infectado com *P. falciparum* foi desviado pelo valor obtido em apenas uma das experiências.

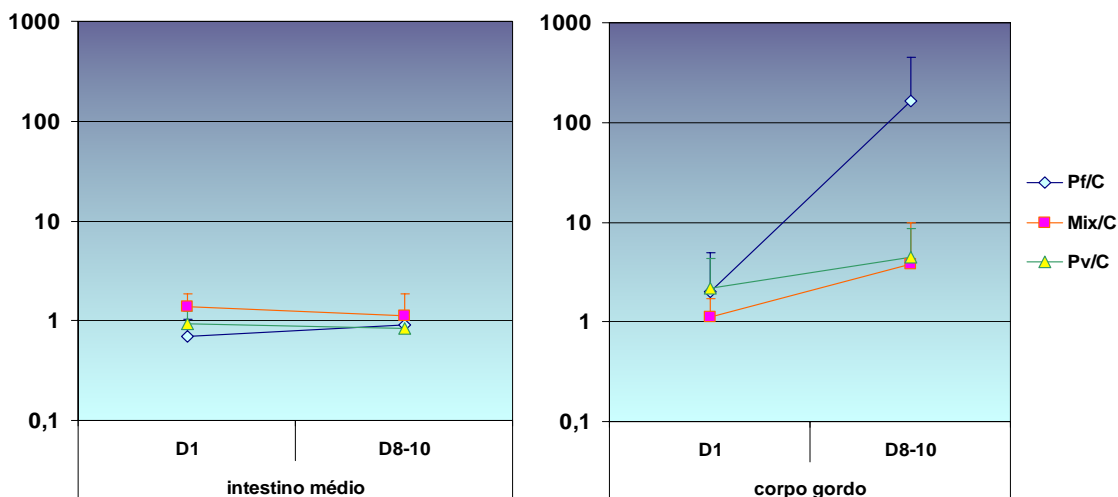


Figura V.6- Padrão de expressão da *gambiciana*, obtido por qRT-PCR, no intestino médio e corpo gordo, 1 dia p.i. (D1) e 8 a 10 dias p.i. (D8-10). Os resultados representam a média e o desvio padrão de 3 experiências independentes. O incremento/decremento foi calculado dividindo a expressão de cada grupo de infecção pela expressão do respectivo grupo controlo não infectado. Pf/C- Incremento/decremento da expressão do grupo infectado com *P. falciparum*; Mix/C- Incremento/decremento da expressão do grupo com infecção mista (*P. vivax* e *P. falciparum*); Pv/C- Incremento/decremento da expressão do grupo infectado com *P. vivax*.

### Atacina

A expressão da *atacina* no intestino médio dos mosquitos infectados mostrou sempre níveis muito próximos do controlo, em ambos os pontos de recolha de amostras (figura V.7).

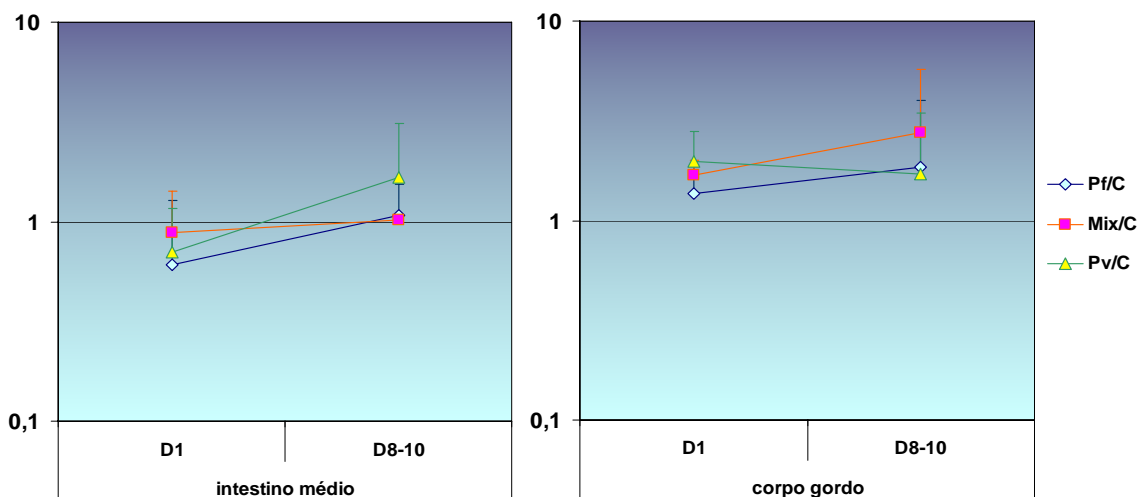


Figura V.7- Padrão de expressão da *atacina*, obtido por qRT-PCR, no intestino médio e corpo gordo, 1 dia p.i. (D1) e 8 a 10 dias p.i. (D8-10). Os resultados representam a média e o desvio padrão de 3 experiências independentes. O incremento/decremento foi calculado dividindo a expressão de cada grupo de infecção pela expressão do respectivo grupo controlo não infectado. Pf/C- Incremento/decremento da expressão do grupo infectado com *P. falciparum*; Mix/C- Incremento/decremento da expressão do grupo com infecção mista (*P. vivax* e *P. falciparum*); Pv/C- Incremento/decremento da expressão do grupo infectado com *P. vivax*.

No corpo gordo foram também observados níveis próximos do controlo, observando-se apenas um maior desvio da expressão deste gene no grupo de infecção mista nos dias 8 a 10 p.i. (2,7 vezes mais alta do que no controlo).

Apesar da variabilidade encontrada, de um modo geral podemos resumir que a cecropina 3 é o péptido antimicrobiano cuja expressão está mais alterada no intestino médio às 24h durante a invasão do epitélio. Que os níveis de expressão são mais elevados no corpo gordo sobretudo ao dia 8-11 (libertação dos esporozoítos) e que as maiores diferenças entre as infecções por *P. vivax*, *P. falciparum* ou mista parecem ocorrer no corpo gordo tanto ao D1 como ao D8-11.

## V.4- DISCUSSÃO

Apesar de infecções naturais com múltiplos genótipos e espécies de parasitas serem comuns, muito pouco tem sido estudado sobre este tema, especialmente no que diz respeito à transmissão. Neste trabalho foi posto em prática, pela primeira vez um sistema de infecção experimental de mosquitos com *P. falciparum* e *P. vivax*, as duas espécies de *Plasmodium* mais importantes para o Homem.

A realização deste tipo de estudo não é simples por várias razões: 1) não existem sistemas de cultura contínua de *P. vivax in vitro*, o que torna este tipo de experiência dependente de pacientes infectados com *P. vivax*, o que introduz várias limitações tais como a necessidade do estudo ser feito numa zona endémica, ou a variabilidade derivada do hospedeiro; 2) a condicionante deste estudo ter de ser efectuado numa zona de transmissão endémica de *P. vivax*, implica também que a transmissão de *P. falciparum* ocorra nesta área, ou então que exista um laboratório com capacidade de produzir *in vitro*, parasitas da espécie *P. falciparum* infecciosos aos mosquitos. As zonas de transmissão endémica destes parasitas são geralmente zonas pobres onde dificilmente se encontrará um laboratório com capacidade de cultivar *P. falciparum*. 3) É ainda necessário um insectário com capacidade para produzir mosquitos suficientes para o trabalho, assim como condições que permitam que estes mosquitos sejam infectados em segurança.

Buenaventura, o local de realização deste trabalho, é um local privilegiado para este tipo de estudo, pois existem pacientes infectados naturalmente com infecções simples de *P. vivax* e *P. falciparum*, cuja transmissão está localizada em diferentes zonas. A transmissão de *P. falciparum* acontece sobretudo na orla costeira e a de *P. vivax* em zonas mais interiores de floresta tropical (Felipe Zamora, comunicação oral). O Instituto de Inmunologia del Valle, possui um insectário bem estabelecido de *A. albimanus* com capacidade de produção de grande número de mosquitos, assim como uma clínica que recebe pacientes infectados com malária e onde é possível fazer o diagnóstico rápido por microscopia óptica, recolher sangue e prepará-lo para a experiência.

Nas instalações de Buenaventura faltam algumas condições para que o seguimento do trabalho seja realizado no local, mas a sua proximidade a Cali, onde o Instituto de Inmunologia del Valle possui outras instalações, permite que estes sejam transportados para o insectário aí existente. Nas instalações de Cali existem condições para realizar o resto da experiência tais como disseções de mosquitos, contagem de oocistos, e extracção de DNA e RNA.

Verificou-se que em geral, com este sistema de infecção de mosquitos *A. albimanus*, a infecção por *P. vivax* é mais forte do que por *P. falciparum*, quer em percentagem de mosquitos infectados quer em termos de carga parasitária. A infecção é também mais fácil de obter para *P.*

*vivax* pois os gametócitos desta espécie mantêm-se activos por mais tempo após a recolha de sangue do que os de *P. falciparum*, podendo a infecção ser realizada num tempo mais alargado.

Várias melhorias foram inseridas neste estudo desde a primeira experiência até à última. Inicialmente foram feitas experiências para definir quais os mosquitos mais adequados para esta experiência, visto que o insectário mantinha mosquitos *A. albimanus* isolados de duas localidades diferentes, uma onde existe transmissão essencialmente de *P. vivax* (Zacarias) e outra onde a transmissão é essencialmente de *P. falciparum* (Buenaventura). O trabalho foi continuado com os mosquitos da localidade de Zacarias pois verificou-se que infectou bem com as duas espécies e apresentou ainda maior sobrevivência. Esta selecção permitiu aumentar o número de mosquitos infectados inicialmente nas experiências seguintes, sendo possível aumentar as dissecções para contagens de oocistos e para recolha de material ao longo da experiência.

Da análise da dinâmica de infecções não foi possível inferir qualquer tipo de efeito duma espécie sobre a outra. Isso não significa que essa interferência, positiva ou negativa, não exista, apenas que seria necessário efectuar um maior número de experiências e aumentar o número de observações em cada experiência para detectar esse efeito.

Os métodos postos em prática para obtenção da sequência parcial de genes de *A. albimanus* a partir do conhecimento existente para outras espécies de mosquitos, foi bem sucedida para o gene *ribossomal S7* e para o gene *ClpB1*, provavelmente devido a serem genes bem conservados entre espécies, pois possíveis mutações na sequência deste gene poderiam ser prejudiciais ao seu funcionamento e como tal seleccionadas negativamente.

Não foi possível obter do mesmo modo as sequências dos outros genes analisados, vários factores terão contribuído para este facto: 1) foi previamente verificado que determinados genes do sistema imunológico do mosquito, especialmente genes de detecção de agentes patogénicos e genes efectores, apresentam um maior nível de diferenciação filogenética (Christophides *et al.*, 2002); 2) O uso de condições pouco específicas para amplificação por PCR levou à observação de diversas bandas inespecíficas ou mesmo observação de arrastamentos na electroforese, indicando inespecificidade demasiado elevada. Estes problemas levaram a que fosse necessário proceder a muitas reacções de optimização, de modo a obter uma ou mais bandas bem definidas. Foi necessário seleccionar algumas bandas para sequenciar e não corresponderam ao gene procurado. O aumento do número de bandas sequenciadas provavelmente permitiria obter algumas das sequências procuradas, mas tal processo tornaria o método demasiadamente longo e dispendioso. Esta lacuna foi parcialmente ultrapassada com a cedência de diversas sequências por Jesus Martinez (INSP, México, México).

Os genes do sistema imunológico analisado representam duas funções, o reconhecimento de padrões (*PGRP-LB*) e mecanismos efectores, nomeadamente por péptidos antimicrobianos

(*defensina*, *cecropina 3*, *gambicina*, *atacina*) (Christophides *et al.*, 2002). Com o estudo da expressão de vários genes do sistema imunológico pretendia-se ter uma ideia preliminar se as infecções com as diferentes espécies afectavam a expressão destes genes, se afectavam a expressão de forma diferente e se a expressão era ainda alterada quando a infecção era mista.

Os pontos de recolha de material para a extracção de RNA, foram seleccionados de acordo, com os eventos mais importantes, na interacção entre mosquito e parasita nesta fase do desenvolvimento: a invasão do intestino médio, às 24 horas pós alimentação sanguínea e o início da ruptura dos oocistos, libertando os esporozoítos para a hemolinfa, a partir do oitavo dia pós alimentação.

Os resultados obtidos para a expressão dos diversos genes analisados foram bastante variáveis, mas permitiram retirar algumas indicações. No intestino médio as maiores diferenças foram observadas às 24 horas, especialmente para o gene da *cecropina 3*, provavelmente como resposta à invasão dos oocinetos. No corpo gordo foram observadas alterações na expressão em ambos os pontos mas mais marcadamente nos dias 8 a 10 pós infecção. Estes resultados estão próximos do esperado, sendo que no intestino médio seria de esperar uma reacção imune mais forte às 24 horas, na altura em que é invadido pelos oocinetos, enquanto que no corpo gordo se esperava uma reacção mais forte a partir do dia 8 pós-infecção, altura em que os oocistos estão completamente desenvolvidos e começam a libertar os esporozoítos para a hemolinfa. No entanto também será normal esperar uma resposta na hemolinfa na altura da refeição sanguínea, pois foi já descrito que o mosquito é capaz de detectar constituintes do sangue infectado, mesmo sem o desenvolvimento de oocinetos e produzir uma resposta imunológica específica, anti-*Plasmodium* (Dong *et al.*, 2006).

As moléculas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRP) são moléculas do sistema imunológico presentes em diferentes grupos animais desde os invertebrados ao Homem (revisto por Dziarski e Gupta, 2006). Em *Drosophila* proteínas desta família estão envolvidas no reconhecimento de patógenos e desencadeiam a transmissão do sinal às vias de sinalização Toll (PGRP-S1) e Imd (PGRP-LC e PGRP-LE). Vários genes pertencentes a esta família estão anotados no genoma de *A. gambiae* (Christophides *et al.*, 2002). No corpo gordo a expressão de PGRP-LB está ligeiramente aumentada em resposta à infecção por *P. vivax*, *P. falciparum* e infecção mista, o que tem algum paralelo com estudos realizados com outras espécies do género *Plasmodium* em que o gene PGRP-LB estava transcripcionalmente activado, em *A. gambiae*, pela infecção com *P. berghei* (Dimopoulos *et al.*, 2002), sendo a sua activação mantida ao longo de todo o ciclo de vida do parasita (Christophides *et al.*, 2002).

O papel do péptido antimicrobiano defensina no controlo da infecção por *Plasmodium* não é totalmente claro. O seu efeito parasiticida foi demonstrado *in vitro* (Shahabuddin *et al.*, 1998) e sua

transcrição é induzida em *A. gambiae* após a infecção por *P. berghei*, no corpo gordo e no intestino médio às 24 horas após a infecção (Richman *et al.*, 1997; Dimopoulos *et al.*, 1997). Contudo, a defensina no mosquito por si só não será a responsável pelo controlo da infecção já que o silenciamento do gene tem pouco impacto no desenvolvimento do parasita até à fase de oocisto (Blandin *et al.*, 2002).

Em consonância com o aumento da expressão verificado em resposta ao *P. berghei* observaram-se valores de expressão mais altos do que no controlo para ambas as espécies e infecções mistas, em especial no corpo gordo para *P. vivax* às 24 h e para todos os grupos no dia oito p.i.. O aumento da expressão 10 dias p.i. (Dimopoulos *et al.*, 1998) já tinha sido descrito para infecções com *P. berghei*, no abdómen e glândulas salivares de *A. gambiae*, sugerindo algum papel no controlo da infecção quando da libertação dos esporozoítos do oocisto. A diferença de expressão observada às 24h no corpo gordo entre os mosquitos infectados com *P. vivax* e os outros grupos sugere que a resposta é específica, embora seja inconclusivo quanto à utilidade destas diferenças no controlo da infecção.

Em *A. gambiae* foram identificadas quatro cecropinas, sendo a *cecropina 1* induzida pela infecção por *Plasmodium* (Christophides *et al.*, 2002), esse gene é também capaz de reduzir a infecção com *P. berghei* em mosquitos transformados (Kim *et al.*, 2004). Em relação à *cecropina 3* não existem dados que relacionem este gene com resposta à infecção por *Plasmodium*, mas a sua regulação parece ser feita de forma semelhante à *cecropina 1* (Meister *et al.*, 2005).

Neste trabalho foi observado um aumento de expressão da *cecropina 3* para todos os grupos de infecção no intestino médio às 24 horas, provavelmente como resposta à invasão do tecido epitelial pelo oocineto. No corpo gordo observou-se um aumento geral da expressão, nos dois pontos de controlo, com excepção do grupo de infecção mista às 24 horas. O grupo de infecção mista apresentou sempre valores de expressão mais baixos que os outros grupos de infecção, sendo esses valores mais baixos que os observados para o controlo, no intestino médio (dias 8-10 p.i.) e corpo gordo (24 horas), sugerindo que o gene é regulado negativamente quando as 2 espécies estão presentes ao mesmo tempo.

Para o gene da *gambicina* os valores observados foram semelhantes ao controlo com excepção dos dias 8-10 no corpo gordo, provavelmente indicando uma resposta à libertação de esporozoítos. A expressão da *gambicina* é induzida em *A. gambiae* por *P. berghei* e parece actuar de forma fraca, contra o desenvolvimento dos oocinetos desta espécie (Vizioli *et al.*, 2001).

Apenas recentemente foi identificado um gene homólogo da *atacina* no genoma de *A. gambiae* (Christophides e tal. 2004), consequentemente a *atacina* não foi até ao momento relacionada com a resposta imune a *Plasmodium*. Os nossos resultados indicam pela primeira vez

que a expressão deste gene poderá estar regulada positivamente pela infecção já que os resultados indicam um ligeiro aumento de expressão no corpo gordo, especialmente nos dias 8-10 p.i..

A análise da resposta à infecção poderá suscitar algumas dúvidas devido à variabilidade de expressão observada entre experiências, não sendo possível observar significância estatística ( $p < 0,05$ ), Contudo algumas tendências foram constantes em todas as experiências para alguns dos grupos. Mesmo assim, as diferenças de expressão observadas sugerem que a resposta possui alguma especificidade, que a expressão no corpo gordo está alterada às 24h, quando o oocineto invade o epitélio do intestino médio e que ao dia 11 após infecção (saída dos esporozoítos do oocisto) a expressão de péptidos antimicrobianos está geralmente aumentada.

Alguns factores que contribuem para a variabilidade destes resultados, serão: 1) o uso de parasitas de diferentes pacientes e com diferentes parasitémias. 2) Baixa carga parasitária e percentagem de mosquitos infectados, tal como é normal nestes modelos, que poderá mascarar a expressão, pois apesar de todos os mosquitos terem tido contacto com o parasita na altura da infecção apenas alguns desenvolveram oocistos, o que pode significar que apenas alguns mosquitos do grupo desenvolveram qualquer resposta à libertação de esporozoítos. Esse problema poderia ser minimizado no futuro, recolhendo a partir do oitavo dia p.i. material para RNA apenas de mosquitos que apresentem oocistos.

Será também necessário considerar que estes genes poderão não ser os mais importantes na resposta a estas espécies, apesar de alguns destes genes terem sido já referidos na resposta de *A. gambiae* a *P. berghei*. Estudos recentes definiram outros genes como os principais actores da resposta de *Anopheles* ao *Plasmodium*, tais como a TEP1 (Blandin *et al.*, 2004; Shiao *et al.*, 2006), LRIM1, CTL4 e CTLMA2 (Osta *et al.*, 2004b). O alargamento da análise de expressão a um maior número de genes no futuro, recorrendo a técnicas capazes de estudar simultaneamente um maior número de genes, tais como os *microarrays* seria uma boa opção. Tal método está já disponível há algum tempo para *A. gambiae* e poderá estar disponível para *A. albimanus* à medida que a sequência parcial de um maior número de genes de *A. albimanus* seja conhecida.

A novidade deste estudo consistiu essencialmente no estabelecimento de um modelo experimental para análise do efeito de infecções simples e mistas de *P. falciparum* e *P. vivax*, no desenvolvimento esporogónico no mosquito. Este foi sobretudo um estudo exploratório e apesar das limitações, demonstrou que tal estudo é viável, devendo no entanto algumas melhorias serem incluídas de forma a diminuir a variabilidade entre experiências.

O estabelecimento deste género de sistema experimental poderia fornecer informações muito importantes sobre a dinâmica de transmissão de infecções mistas e perceber de que forma estas espécies interagem entre si e com o hospedeiro.

# Capítulo VI

Discussão geral e perspectivas futuras

---



## VI- DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento de *Plasmodium* no mosquito hospedeiro tem sido cada vez mais encarado como uma fase com grande potencial para o desenvolvimento de métodos de controlo da malária. Nas 24 horas iniciais, desta fase de desenvolvimento, o parasita passa por grandes processos de transformação. Os gametócitos têm que produzir os gâmetas, que por sua vez precisam de se encontrar e fecundar; após a formação do zigoto, este tem que se transformar no oocineto, uma forma móvel, que necessita de sair da refeição sanguínea atravessando a membrana peritrófica, aderir, invadir e atravessar as células epiteliais do intestino médio até chegar à membrana basal onde se imobiliza e transforma em oocisto.

Vários factores tornam esta fase muito interessante em termos de possibilidades de bloqueio de transmissão: 1) É a fase de desenvolvimento que sofre um maior estrangulamento, em termos de perda de número de parasitas, até à formação do oocisto (Alavi *et al.*, 2003; Vaughan, 2007). 2) Esta fase depende não só da interacção do parasita com o mosquito mas também do conteúdo da própria refeição sanguínea e sabe-se que diversos componentes do sangue afectam a transmissão do parasita.

Para a identificação de alvos de bloqueio de transmissão no desenvolvimento esporogónico do parasita é necessário ter um conhecimento profundo do desenvolvimento do parasita e da sua interacção com o meio que o rodeia, quer seja o próprio ambiente do mosquito quer sejam componentes da refeição sanguínea. Nos últimos anos têm sido identificadas moléculas que são essenciais para o desenvolvimento do parasita e para a infecção do mosquito. Essas moléculas parasitárias têm funções importantes em processos cruciais do desenvolvimento de *Plasmodium*, tais como a gametogénese e fecundação (Carter, 2001; Bilker *et al.*, 2004), movimento do oocineto, reconhecimento e invasão de células de mosquito (Dessens *et al.*, 1999; Hirai *et al.*, 2006; Kariu *et al.*, 2006; Ecker *et al.*, 2007), desenvolvimento do oocisto e esporozoítos (Menard, 2000; Arrighi e Hurd *et al.*, 2002; Claudianos *et al.*, 2002). Para além destas moléculas do parasita foram também identificadas moléculas do mosquito que desencadeiam várias transformações neste, como por exemplo a exflagelação e a transformação de oocineto em oocisto (Shahabuddin *et al.*, 1996; Arai *et al.*, 2001; Dinglasan *et al.*, 2007a; Dinglasan *et al.*, 2007b).

Nos últimos anos têm também sido feitos grandes avanços no estudo da imunidade do mosquito em geral e ao *Plasmodium* em particular (Christophides *et al.*, 2002; Osta *et al.*, 2004a; Waterhouse *et al.*, 2007).

Com o objectivo de compreender as interacções que ocorrem durante o ciclo esporogónico do parasita no mosquito e as suas consequências no seu desenvolvimento, o presente trabalho abordou várias perspectivas desta fase, investigando o papel da refeição

sanguínea, a presença de anticorpos anti-malária nesta refeição e a presença de mais do que uma espécie infectante na refeição sanguínea.

No terceiro capítulo desta tese foi estudado o efeito de soro imune na infecção do mosquito. Embora, não haja dúvidas que experimentalmente é possível bloquear a transmissão através de anticorpos presentes na refeição sanguínea, a complexidade do processo levou a que na literatura existam por vezes dados contraditórios e de difícil conciliação. Os anticorpos são um dos mecanismos mais importantes do sistema imunológico adaptativo dos vertebrados e quando presentes na refeição sanguínea atravessam a barreira epitelial do intestino médio para a hemolinfa (Vaughan *et al.*, 1988; Beier *et al.*, 1989). A isto junta-se o facto de os mosquitos poderem realizar várias refeições sanguíneas ao longo da sua vida, de modo que os parasitas podem entrar em contacto com anticorpos em diferentes fases de desenvolvimento, o que poderá afectar o parasita de diferentes formas.

O mecanismo pelo qual afectam a transmissão, provavelmente será diferente de acordo com o tipo de anticorpo produzido pelo hospedeiro vertebrado, sendo o seu efeito variável, desde o bloqueio da transmissão até o aumento da infecção, quando presentes em baixas concentrações. O conhecimento da forma como os anticorpos afectam o desenvolvimento do parasita quando ingeridos em diferentes fases do ciclo esporogónico é importante e deverá ser tomado em consideração aquando da produção de uma vacina.

Neste trabalho verificou-se que uma segunda alimentação sanguínea, 3 dias após a alimentação infecciosa dos mosquitos, levou à detecção de taxas de infecção mais altas quando usado sangue de *R. rattus* e a cargas parasitárias elevadas quando usado sangue quer de *R. rattus* quer de *M. musculus.*, apesar de não se observarem diferenças significativas. Observou-se também que o soro imune usado afectou negativamente a infecção, de forma estatisticamente significativa.

Vários genes foram identificados, quer de *Plasmodium* quer de mosquito, cuja expressão foi alterada quer pela segunda refeição sanguínea quer pela presença de soro imune. No entanto o número de genes estudado foi baixo. Métodos mais abrangentes, que permitissem o estudo simultâneo de um maior número de genes, como *microarrays*, poderiam clarificar melhor o processo pelo qual a segunda alimentação sanguínea e o soro imune afectam a infecção.

Os mecanismos pelos quais alguns anticorpos que podem bloquear a transmissão têm o efeito contrário em baixas concentrações continuam por resolver, assim futuras experiências direccionadas para compreender este fenómeno deveriam ser desenhadas. Para tal, anticorpos purificados, mono ou policlonais, deveriam ser usados de forma a analisar o seu efeito isoladamente, diminuindo a variabilidade resultante de outros factores do soro imune. Além disso o uso de anticorpos monoclonais tornaria mais simples caracterizar o seu efeito no desenvolvimento, identificando os seus alvos específicos e percebendo o seu modo de actuação.

Outras técnicas deveriam complementar este estudo, tal como o uso de microscopia de forma a identificar quais os locais de ligação específica dos anticorpos.

Outro objectivo deste trabalho passou por otimizar um método de cultura de oocinetos de *P. falciparum* (capítulo IV), de modo a poder estudar esta fase de desenvolvimento na espécie causadora de malária mais perigosa para o Homem. O estabelecimento deste método permitiria o estudo específico de diversos factores sobre o parasita. No entanto, a dificuldade em produzir grandes quantidades de oocinetos e a possibilidade de avançar com outro trabalho (capítulo V) fez com que esta parte do projecto fosse abandonada.

Apesar de este trabalho ter sido abandonado, na perspectiva desta tese, o estabelecimento de um método eficiente de cultura de oocinetos de *P. falciparum*, *in vitro*, seria de grande utilidade para o estudo do desenvolvimento esporogónico desta espécie. A possibilidade de culturas de oocinetos de *P. falciparum* em cultura em conjunto com a existência de um insectário de segurança, onde pudessem ser efectuadas infecções de mosquitos com *P. falciparum*, forneceria condições únicas de estudo na área da malária.

O trabalho do quinto capítulo apresenta como novidade o estabelecimento de infecções experimentais mistas de *P. falciparum* e *P. vivax*. A informação existente sobre o efeito de um parasita sobre o outro é ainda muito escassa, no entanto infecções mistas são comuns na natureza. Menos estudado ainda é o efeito de infecções mistas na transmissão e desenvolvimento do parasita no mosquito. Como este trabalho foi o primeiro a ser realizado com infecções experimentais mistas de mosquito, com *P. falciparum* e *P. vivax*, pretendia-se em primeiro lugar estabelecer o método, obter dados preliminares acerca da dinâmica de infecção no mosquito e nomeadamente como cada uma das espécies seria afectada. Estudou-se a expressão de alguns genes do sistema imunológico de *A. albimanus*, de modo a avaliar a resposta a cada uma das espécies, em separado e em conjunto. Mostramos pela primeira vez que a resposta a *P. vivax* e a infecções mistas poderá ter especificidades colocando desafios acrescidos ao desenho de métodos de controlo destinados a várias espécies.

Este trabalho lançou as bases para que no futuro, possa ser realizado em melhores condições, corrigindo algumas deficiências e adicionando algumas melhorias. As infecções realizadas deverão ser feitas em maior número e se possível com mais mosquitos, de modo estudar a dinâmica de infecção mais detalhadamente e identificar possíveis efeitos positivos ou negativos de uma espécie sobre a outra. Estas melhorias permitiriam conhecer o modo como estas duas espécies de *Plasmodium* interagem e de que forma cada uma delas pode afectar a transmissão da outra. Dados mais conclusivos sobre a dinâmica de infecção seriam também úteis de forma a analisar a resposta imunológica do mosquito a cada uma destas espécies. A análise da expressão génica deverá ser feita sobre um maior número de genes, isto é possível devido a um

aumento de sequências disponíveis nas bases de dados ou uso de métodos que não necessitam de conhecimento prévio das sequências dos genes, tais como DDRT-PCR ou SAGE (análise em série da expressão génica). A caracterização da resposta específica do sistema imunológico a cada uma das espécies seria de grande importância para se compreender melhor a interacção entre o parasita e o mosquito e para identificar quais as armas mais eficazes no controlo da infecção por parte do mosquito.

Como a transmissão do *Plasmodium* a outros hospedeiros vertebrados depende completamente da transmissão pelo mosquito vector, é importante não apenas tratar o doente infectado, como impedir a transmissão do parasita aos mosquitos. Vários métodos para impedir essa transmissão são usados regularmente (WHO, 2006b), e quando usados de forma integrada com o tratamento eficiente dos pacientes, podem ser suficientes para manter a malária sob controlo. No entanto, vários problemas se colocam no controlo desta doença em muitas áreas do mundo: pobreza e sistemas de saúde precários, resistência a fármacos (WHO, 2005c; Greenwood *et al.*, 2008), resistência a insecticidas (Martinez-Torres *et al.*, 1998) e a incapacidade de até ao momento, produzir uma vacina eficaz contra o parasita (Doolan e Stewart, 2007; Greenwood *et al.*, 2008; Sanderson *et al.*, 2008). Como tal impõe-se o desenvolvimento de novos métodos de controlo da transmissão do *Plasmodium* ao mosquito.

Avanços recentes na área da genética têm permitido o estudo detalhado do parasita e da sua relação com o mosquito de forma a identificar novos alvos do parasita para implementação de métodos de controlo. Para o avanço observado nos últimos anos muito contribuiu a publicação das sequências genómicas de *P. falciparum* (Gardner *et al.*, 2002a; Gardner *et al.*, 2002b; Hall *et al.*, 2002; Jeffares *et al.*, 2007; Mu *et al.*, 2007; Volkman *et al.*, 2007) e *P. yoelii yoelii* (Carlton *et al.*, 2002), assim como de *A. gambiae* (Holt *et al.*, 2002) cuja anotação foi extremamente facilitada pela comparação com o genoma de *Drosophila melanogaster* (Christophides *et al.*, 2002; Zdobnov *et al.*, 2002) e de *Ae. aegypti* (Nene *et al.*, 2007). Outros métodos têm sido muito importantes, tais como *microarrays* que permitem o estudo simultâneo da expressão de milhares de genes (Christophides *et al.*, 2002; Dimopoulos *et al.*, 2002; Vlachou *et al.*, 2005), métodos de genética reversa, usando RNAi (Blandin *et al.*, 2002), transfecção de parasitas (Wu *et al.*, 1995; van Dijk *et al.*, 1995; Pfahler *et al.*, 2006) e de mosquitos (Jasinskiene *et al.*, 1998; Coates *et al.*, 1998; Grossman *et al.*, 2001).

Vários alvos do parasita têm sido considerados para a produção de vacinas de bloqueio de transmissão mas também antigénios de mosquito mostraram ser um alvo possível, afectando não só a viabilidade e fecundidade do mosquito como a própria infecção.

O uso de fármacos capazes de bloquear a transmissão é também de crucial importância na terapêutica de pacientes infectados. É também importante continuar o estudo e desenvolvimento

nesta área, de modo a produzir compostos mais eficientes e baratos, especialmente considerando o fenómeno de aquisição de resistência por parte do *Plasmodium* (WHO, 2005c).

Outra hipótese para o bloqueio de transmissão, para a qual o estudo detalhado da resposta imunológica tem uma importância crucial, passa pelo uso de mosquitos refractários à infecção. O objectivo seria produzi-los em grande escala e libertá-los em zonas de alta transmissão da malária. Esses mosquitos poderão ser seleccionados na natureza ou transfectados (Jasinskiene *et al.*, 1998; Coates *et al.*, 1998; Grossman *et al.*, 2001) de forma a serem capazes de bloquear o desenvolvimento do parasita (Ito *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2008).

Todos estes novos métodos de controlo de transmissão necessitam ainda ser bem desenvolvidos e testados no campo, no entanto por si só dificilmente serão suficientes para controlar a malária. No entanto, poderão ter muita utilidade se aplicados em programas bem organizados e continuados no tempo, com capacidade financeira para integrar estes métodos com outros já disponíveis para controlo quer do parasita, quer do mosquito.

O trabalho realizado nesta tese visava ajudar a esclarecer alguns assuntos menos considerados na transmissão da malária, tal como o efeito da segunda alimentação sanguínea com e sem anticorpos anti-*Plasmodium* ou o efeito de infecções mistas, neste caso com as duas espécies clinicamente mais importantes, na transmissão da malária humana. Apesar de os resultados obtidos não apresentarem consequências práticas imediatas para o desenvolvimento de métodos de controlo da doença, contribuem para um maior conhecimento da transmissão do *Plasmodium* ao mosquito, chamando à atenção para possíveis impactos de diferentes métodos de controlo na transmissão e abrem novas vias de estudo nestas áreas. Isto é especialmente relevante no trabalho realizado com infecções mistas de *P. falciparum* e *P. vivax*, pois apesar da sua importância clínica e de ocorrerem naturalmente em infecções mistas, este é o primeiro trabalho experimental que visa estudar o efeito de uma espécie sobre a outra, na transmissão.



# Capítulo VII

## Referências Bibliográficas

---



## VII.1- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham EG, Islam S, Srinivasan P, Ghosh AK, Valenzuela JG, Ribeiro JM, Kafatos FC, Dimopoulos G e Jacobs-Lorena M (2004). Analysis of the *Plasmodium* and *Anopheles* transcriptional repertoire during ookinete development and midgut invasion. *J. Biol. Chem.*, **279** (7), 5573-5580.
- Abraham EG, Pinto SB, Ghosh A, Vanlandingham DL, Budd A, Higgs S, Kafatos FC, Jacobs-Lorena M e Michel K (2005). An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**(45), 16327-16332.
- Abrantes P, Lopes LF, do Rosario V e Silveira H (2005). Effect of chloroquine on the expression of genes involved in the mosquito immune response to *Plasmodium* infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **35**(10), 1124-1132.
- Adini A e Warburg A (1999). Interaction of *Plasmodium gallinaceum* ookinetes and oocysts with extracellular matrix proteins. *Parasitology*, **119** (Pt 4) 331-336.
- Agjanian B, Lesch C, Loseva O e Dushay MS (2007). Preliminary characterization of hemolymph coagulation in *Anopheles gambiae* larvae. *Dev. Comp Immunol.*, **31**(9), 879-888.
- Akompong T, Eksi S, Williamson K e Haldar K (2000). Gametocytocidal activity and synergistic interactions of riboflavin with standard antimalarial drugs against growth of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**(11), 3107-3111.
- Al Olayan EM, Beetsma AL, Butcher GA, Sinden RE e Hurd H (2002). Complete development of mosquito phases of the malaria parasite *in vitro*. *Science*, **295**(5555), 677-679.
- Alavi Y, Arai M, Mendoza J, Tufet-Bayona M, Sinha R, Fowler K, Billker O, Franke-Fayard B, Janse CJ, Waters A e Sinden RE (2003). The dynamics of interactions between *Plasmodium* and the mosquito: a study of the infectivity of *Plasmodium berghei* and *Plasmodium gallinaceum*, and their transmission by *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Int. J. Parasitol.*, **33**(9), 933-943.
- Almeida AP e Billingsley PF (1998). Induced immunity against the mosquito *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): effects on mosquito survival and fecundity. *Int. J. Parasitol.*, **28**(11), 1721-1731.
- Almeida AP e Billingsley PF (2002). Induced immunity against the mosquito *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae): effects of cell fraction antigens on survival, fecundity, and *plasmodium berghei* (Eucoccidiida: Plasmodiidae) transmission. *J. Med. Entomol.*, **39**(1), 207-214.
- Arai M, Billker O, Morris HR, Panico M, Delcroix M, Dixon D, Ley SV e Sinden RE (2001). Both mosquito-derived xanthurenic acid and a host blood-derived factor regulate gametogenesis of *Plasmodium* in the midgut of the mosquito. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **116**(1), 17-24.
- Arakawa T, Tsuboi T, Kishimoto A, Sattabongkot J, Suwanabun N, Rungruang T, Matsumoto Y, Tsuji N, Hisaeda H, Stowers A, Shimabukuro I, Sato Y e Torii M (2003). Serum antibodies induced by intranasal immunization of mice with *Plasmodium vivax* Pvs25 co-administered with cholera toxin completely block parasite transmission to mosquitoes. *Vaccine*, **21**(23), 3143-3148.
- Arevalo-Herrera M, Solarte Y, Yasnot MF, Castellanos A, Rincon A, Saul A, Mu J, Long C, Miller L e Herrera S (2005). Induction of transmission-blocking immunity in *Aotus* monkeys by vaccination with a *Plasmodium vivax* clinical grade PVS25 recombinant protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **73**(5 Suppl), 32-37.
- Arez AP, Pinto J, Palsson K, Snounou G, Jaenson TG e do Rosario V (2003). Transmission of mixed *Plasmodium* species and *Plasmodium falciparum* genotypes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **68**(2), 161-168.
- Arrighi RB e Hurd H (2002). The role of *Plasmodium berghei* ookinete proteins in binding to basal lamina components and transformation into oocysts. *Int. J. Parasitol.*, **32**(1), 91-98.
- Barillas-Mury C, Han YS, Seeley D e Kafatos FC (1999). *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J.*, **18**(4), 959-967.

- Barillas-Mury C (2007). CLIP proteases and *Plasmodium* melanization in *Anopheles gambiae*. *Trends Parasitol.*, **23**(7), 297-299.
- Barnes KI e White NJ (2005). Population biology and antimalarial resistance: The transmission of antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop.*, **94**( 3), 230-240.
- Barnish G, Maude GH, Bockarie MJ, Erunkulu OA, Dumbuya MS e Greenwood BM (1993). Malaria in a rural area of Sierra Leone. II. Parasitological and related results from pre- and post-rains clinical surveys. *Ann. Trop Med Parasitol.*, **87**(2), 137-148.
- Barr PJ, Green KM, Gibson HL, Bathurst IC, Quakyi IA e Kaslow DC (1991). Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. *J. Exp. Med.*, **174**(5), 1203-1208.
- Baton LA e Ranford-Cartwright LC (2004). *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut epithelium of *Anopheles stephensi* is consistent with the Time Bomb model. *Parasitology*, **129**(Pt 6), 663-676.
- Baum J, Richard D, Healer J, Rug M, Krnajski Z, Gilberger TW, Green JL, Holder AA e Cowman AF (2006). A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *J Biol. Chem.*, **281**(8), 5197-5208.
- Beier JC, Oster CN, Koros JK, Onyango FK, Githeko AK, Rowton E, Koech DK e Roberts CR (1989). Effect of human circumsporozoite antibodies in *Plasmodium*-infected *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, **26**(6), 547-553.
- Beier JC (1998). Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.*, **43** 519-543.
- Bhattacharyya MK e Kumar N (2001). Effect of xanthurenic acid on infectivity of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles stephensi*. *Int. J. Parasitol.*, **31**(10), 1129-1133.
- Billingsley PF e Rudin W (1992). The role of the mosquito peritrophic membrane in bloodmeal digestion and infectivity of *Plasmodium* species. *J. Parasitol.*, **78**(3), 430-440.
- Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, Rogers M, Sinden RE e Morris HR (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*, **392**(6673), 289-292.
- Billker O, Dechamps S, Tewari R, Wenig G, Franke-Fayard B e Brinkmann V (2004). Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell*, **117**(4), 503-514.
- Black J, Hommel M, Snounou G e Pinder M (1994). Mixed infections with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae* and fever in malaria. *Lancet*, **343**(8905), 1095.
- Blandin S, Moita LF, Kocher T, Wilm M, Kafatos FC e Levashina EA (2002). Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the *defensin* gene. *EMBO Rep.*, **3** (9), 852-856.
- Blandin S, Shiao SH, Moita LF, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC e Levashina EA (2004). Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell*, **116**(5), 661-670.
- Bousema JT, Schneider P, Gouagna LC, Drakeley CJ, Tostmann A, Houben R, Githure JI, Ord R, Sutherland CJ, Omar SA e Sauerwein RW (2006). Moderate effect of artemisinin-based combination therapy on transmission of *Plasmodium falciparum*. *J. Infect. Dis.*, **193**(8), 1151-1159.
- Brennan JD, Kent M, Dhar R, Fujioka H e Kumar N (2000). *Anopheles gambiae* salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**(25), 13859-13864.
- Buckling AG, Crooks L e Read AF (1999). *Plasmodium chabaudi*: effect of antimalarial drugs on gametocytogenesis. *Exp. Parasitol.*, **93**(1), 45-54.

- Buckling AG, Taylor LH, Carlton JM e Read AF (1997). Adaptive changes in *Plasmodium* transmission strategies following chloroquine chemotherapy. *Proc. Biol. Sci.*, **264**(1381), 553-559.
- Buckling AG e Read AF (1999). The effect of chloroquine treatment on the infectivity of *Plasmodium chabaudi* gametocytes. *Int. J. Parasitol.*, **29**(4), 619-625.
- Cao YM, Tsuboi T e Torii M (1998a). Nitric oxide inhibits the development of *Plasmodium yoelii* gametocytes into gametes. *Parasitology International*, **47**(2), 157-166.
- Cao YM, Tsuboi T, Liu YJ e Torii M (1998b). Infected host serum blocks transmission of *Plasmodium yoelii* via a nitric oxide-dependent mechanism. *Parasitology International*, **47**(3), 225-232.
- Carlton JM, Angiuoli SV, Suh BB, Kooij TW, Perteza M, Silva JC, Ermolaeva MD, Allen JE, Selengut JD, Koo HL, Peterson JD, Pop M, Kosack DS, Shumway MF, Bidwell SL, Shallom SJ, van Aken SE, Riedmuller SB, Feldblyum TV, Cho JK, Quackenbush J, Sedegah M, Shoaibi A, Cummings LM, Florens L, Yates JR, Raine JD, Sinden RE, Harris MA, Cunningham DA, Preiser PR, Bergman LW, Vaidya AB, van Lin LH, Janse CJ, Waters AP, Smith HO, White OR, Salzberg SL, Venter JC, Fraser CM, Hoffman SL, Gardner MJ e Carucci DJ (2002). Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature*, **419**(6906), 512-519.
- Carter EH, Suhrbier A, Beckers PJ e Sinden RE (1987). The *in vitro* cultivation of *P. falciparum* ookinetes, and their enrichment on Nycodenz density gradients. *Parasitology*, **95** ( Pt 1) 25-30.
- Carter R e Miller LH (1979). Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum* in continuous culture. *Bull. World Health Organ*, **57** Suppl 1 37-52.
- Carter R, Graves PM, Keister DB e Quakyi IA (1990). Properties of epitopes of Pfs 48/45, a target of transmission blocking monoclonal antibodies, on gametes of different isolates of *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol.*, **12**(6), 587-603.
- Carter R (2001). Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine*, **19**(17-19), 2309-2314.
- Chavalitsheewinkoon-Petmitr P, Pongvilairat G, Auparakkitanon S e Wilairat P (2000). Gametocytocidal activity of pyronaridine and DNA topoisomerase II inhibitors against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Parasitol. Int.*, **48**(4), 275-280.
- Chege GM, Pumpuni CB e Beier JC (1996). Proteolytic enzyme activity and *Plasmodium falciparum* sporogonic development in three species of *Anopheles* mosquitoes. *J. Parasitol.*, **82**(1), 11-16.
- Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Muller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, von Mering C, Xu J, Zheng L, Bork P e Kafatos FC (2002). Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*, **298**(5591), 159-165.
- Christophides GK, Vlachou D e Kafatos FC (2004). Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol. Rev.*, **198** 127-148.
- Claudianos C, Dessens JT, Trueman HE, Arai M, Mendoza J, Butcher GA, Crompton T e Sinden RE (2002). A malaria scavenger receptor-like protein essential for parasite development. *Mol. Microbiol.*, **45**(6), 1473-1484.
- Claverie JM e Makalowski W (1994). Alu alert. *Nature*, **371**(6500), 752.
- Clements, A.N. (1992). *The biology of mosquitoes*. Chapman & Hall, London.
- Coates CJ, Jasinskiene N, Miyashiro L e James AA (1998). Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**(7), 3748-3751.
- Coleman RE, Polsa N, Eikarat N, Kollars TM, Jr. e Sattabongkot J (2001). Prevention of sporogony of *Plasmodium vivax* in *Anopheles dirus* mosquitoes by transmission-blocking antimalarials. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **65**(3), 214-218.

Collins WE, Barnwell JW, Sullivan JS, Nace D, Williams T, Bounngaseng A, Roberts J, Strobert E, McClure H, Saul A e Long CA (2006). Assessment of transmission-blocking activity of candidate Pvs25 vaccine using gametocytes from chimpanzees. *Am J Trop Med Hyg*, **74**(2), 215-221.

Contamin H e Michel JC (1999). Haemobartonellosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*): antagonism between *Haemobartonella* sp. and experimental *Plasmodium falciparum* malaria. *Exp. Parasitol.*, **91**(4), 297-305.

Corpet F (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.*, **16**(22), 10881-10890.

Danielli A, Barillas-Mury C, Kumar S, Kafatos FC e Loukeris TG (2005). Overexpression and altered nucleocytoplasmic distribution of *Anopheles* ovalbumin-like SRPN10 serpins in *Plasmodium*-infected midgut cells. *Cell Microbiol.*, **7**(2), 181-190.

de Roode JC, Read AF, Chan BH e Mackinnon MJ (2003). Rodent malaria parasites suffer from the presence of conspecific clones in three-clone *Plasmodium chabaudi* infections. *Parasitology*, **127**(Pt 5), 411-418.

de Roode JC, Culleton R, Cheesman SJ, Carter R e Read AF (2004). Host heterogeneity is a determinant of competitive exclusion or coexistence in genetically diverse malaria infections. *Proc. Biol. Sci.*, **271**(1543), 1073-1080.

de Roode JC, Pansini R, Cheesman SJ, Helinski ME, Huijben S, Wargo AR, Bell AS, Chan BH, Walliker D e Read AF (2005). Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**(21), 7624-7628.

Dessens JT, Beetsma AL, Dimopoulos G, Wengelnik K, Crisanti A, Kafatos FC e Sinden RE (1999). CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *EMBO J.*, **18**(22), 6221-6227.

Dessens JT, Sinden-Kiamos I, Mendoza J, Mahairaki V, Khater E, Vlachou D, Xu XJ, Kafatos FC, Louis C, Dimopoulos G e Sinden RE (2003). SOAP, a novel malaria ookinete protein involved in mosquito midgut invasion and oocyst development. *Mol. Microbiol.*, **49**(2), 319-329.

Dimopoulos G, Richman A, della TA, Kafatos FC e Louis C (1996). Identification and characterization of differentially expressed cDNAs of the vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**(23), 13066-13071.

Dimopoulos G, Richman A, Muller HM e Kafatos FC (1997). Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**(21), 11508-11513.

Dimopoulos G, Seeley D, Wolf A e Kafatos FC (1998). Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle 141. *EMBO J.*, **17**(21), 6115-6123.

Dimopoulos G, Christophides GK, Meister S, Schultz J, White KP, Barillas-Mury C e Kafatos FC (2002). Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**(13), 8814-8819.

Dinglasan RR, Fields I, Shahabuddin M, Azad AF e Sacci JB, Jr. (2003). Monoclonal antibody MG96 completely blocks *Plasmodium yoelii* development in *Anopheles stephensi*. *Infect. Immun.*, **71**(12), 6995-7001.

Dinglasan RR, Kalume DE, Kanzok SM, Ghosh AK, Muratova O, Pandey A e Jacobs-Lorena M (2007a). Disruption of *Plasmodium falciparum* development by antibodies against a conserved mosquito midgut antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**(33), 13461-13466.

Dinglasan RR, Alaganan A, Ghosh AK, Saito A, van Kuppevelt TH e Jacobs-Lorena M (2007b). *Plasmodium falciparum* ookinetes require mosquito midgut chondroitin sulfate proteoglycans for cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**(40), 15882-15887.

do Rosario V, Appiah A, Vaughan JA e Hollingdale MR (1989). *Plasmodium falciparum*: administration of anti-sporozoite antibodies during sporogony results in production of sporozoites which are not neutralized by human anti-circumsporozoite protein vaccine sera. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **83**(3), 305-307.

- Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E e Dimopoulos G (2006). *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog.*, **2**(6), e52.
- Doolan DL e Stewart VA (2007). Status of malaria vaccine R&D in 2007. Malaria Vaccines for the World 2007, September 17-19th, 2007, London, UK. *Expert. Rev. Vaccines.*, **6**(6), 903-905.
- Dunyo S, Milligan P, Edwards T, Sutherland C, Targett G e Pinder M (2006). Gametocytaemia after drug treatment of asymptomatic *Plasmodium falciparum*. *PLoS Clin. Trials*, **1**(4), e20.
- Dziarski R e Gupta D (2006). The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.*, **7**(8), 232.
- Ecker A, Pinto SB, Baker KW, Kafatos FC e Sinden RE (2007). *Plasmodium berghei*: *plasmodium* perforin-like protein 5 is required for mosquito midgut invasion in *Anopheles stephensi*. *Exp. Parasitol.*, **116**(4), 504-508.
- Eggleston P, Lu W e Zhao Y (2000). Genomic organization and immune regulation of the *defensin* gene from the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, **9**(5), 481-490.
- Eksi S, Czesny B, van Gemert GJ, Sauerwein RW, Eling WM e Williamson KC (2006). Malaria transmission-blocking antigen, Pfs230, mediates human red blood cell binding to exflagellating male parasites and oocyst production. *Mol. Microbiol.*, **61**(4), 991-998.
- Enosse SM, Butcher GA, Margos G, Mendoza J, Sinden RE e Hogg B (2000). The mosquito transmission of malaria: the effects of atovaquone-proguanil (Malarone) and chloroquine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **94**(1), 77-82.
- Fang FC (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.*, **99**(12), 2818-2825.
- Feldmann AM, Billingsley PF e Savelkoul E (1990). Bloodmeal digestion by strains of *Anopheles stephensi* liston (Diptera: Culicidae) of differing susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, **101 Pt 2** 193-200.
- Fleck SL, Butcher GA e Sinden RE (1994). *Plasmodium berghei*: serum-mediated inhibition of infectivity of infected mice to *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Exp. Parasitol.*, **78**(1), 20-27.
- Foy BD, Magalhaes T, Injera WE, Sutherland I, Devenport M, Thanawastien A, Ripley D, Cardenas-Freytag L e Beier JC (2003). Induction of mosquitocidal activity in mice immunized with *Anopheles gambiae* midgut cDNA. *Infect. Immun.*, **71**(4), 2032-2040.
- Gakhar SK, Jhamb A, Gulia M e Dixit R (2001). Anti-mosquito ovary antibodies reduce the fecundity of *Anopheles stephensi* (Diptera:Insecta). *Jpn. J Infect. Dis.*, **54**( 5), 181-183.
- Gakhar SK, Suneja A e Adak T (2005). Midgut antibodies reduce the reproductive capacity of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Indian J Exp. Biol.*, **43**(4), 330-334.
- Gallup JL e Sachs JD (2001). The economic burden of malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **64**(1-2 Suppl), 85-96.
- Gamage-Mendis AC, Rajakaruna J, Carter R e Mendis KN (1992). Transmission blocking immunity to human *Plasmodium vivax* malaria in an endemic population in Kataragama, Sri Lanka. *Parasite Immunol.*, **14**(4), 385-396.
- Gamage-Mendis AC, Rajakaruna J, Weerasinghe S, Mendis C, Carter R e Mendis KN (1993). Infectivity of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* to *Anopheles tessellatus*; relationship between oocyst and sporozoite development. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **87**(1), 3-6.
- Garcia GE, Wirtz RA, Barr JR, Woolfitt A e Rosenberg R (1998). Xanthurenic acid induces gametogenesis in *Plasmodium*, the malaria parasite. *J. Biol. Chem.*, **273**(20), 12003-12005.
- Gardner MJ, Shallom SJ, Carlton JM, Salzberg SL, Nene V, Shoaibi A, Ciecko A, Lynn J, Rizzo M, Weaver B, Jarrahi B, Brenner M, Parvizi B, Tallon L, Moazzez A, Granger D, Fujii C, Hansen C, Pederson J, Feldblyum T, Peterson J, Suh B, Angiuoli S, Perteau M, Allen J, Selengut J, White O, Cummings LM, Smith HO, Adams MD, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL e Fraser CM (2002). Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14. *Nature*, **419**(6906), 531-534.

- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shalloom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM e Barrell B (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **419**(6906), 498-511.
- Gonzalez-Ceron L, Rodriguez MH, Santillan F, Chavez B, Nettel JA, Hernandez-Avila JE e Kain KC (2001). *Plasmodium vivax*: ookinete destruction and oocyst development arrest are responsible for *Anopheles albimanus* resistance to circumsporozoite phenotype VK247 parasites. *Exp. Parasitol.*, **98**(3), 152-161.
- Gorman MJ, Andreeva OV e Paskewitz SM (2000a). Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. *Gene*, **251**(1), 9-17.
- Gorman MJ, Andreeva OV e Paskewitz SM (2000b). Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph  
5. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **30**(1), 35-46.
- Gorman MJ e Paskewitz SM (2001). Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **31**(3), 257-262.
- Gouagna LC, Bonnet S, Gounoue R, Verhave JP, Eling WM, Sauerwein RW e Boudin C (2004). Stage-specific effects of host plasma factors on the early sporogony of autologous *Plasmodium falciparum* isolates within *Anopheles gambiae*. *Trop. Med. Int. Health*, **9**(9), 937-948.
- Gouagna LC, van der Kolk M, Roeffen W, Verhave JP, Eling WM, Sauerwein RW e Boudin C (2007). Role of heat-labile serum factor or host complement in the inhibition of *Plasmodium falciparum* sporogonic stages in *Anopheles stephensi* by gametocyte carriers' serological factors. *Parasitology*, **134**(Pt 10), 1315-1327.
- Graham AL, Lamb TJ, Read AF e Allen JE (2005). Malaria-filaria coinfection in mice makes malarial disease more severe unless filarial infection achieves patency. *J. Infect. Dis.*, **191**(3), 410-421.
- Graves PM, Carter R, Burkot TR, Quakyi IA e Kumar N (1988). Antibodies to *Plasmodium falciparum* gamete surface antigens in Papua New Guinea sera  
8. *Parasite Immunol.*, **10** (2), 209-218.
- Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SH, Alonso PL, Collins FH e Duffy PE (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin. Invest*, **118**(4), 1266-1276.
- Grossman GL, Rafferty CS, Clayton JR, Stevens TK, Mukabayire O e Benedict MQ (2001). Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the piggyBac transposable element. *Insect Mol. Biol.*, **10**(6), 597-604.
- Grotendorst CA, Carter R, Rosenberg R e Koontz LC (1986). Complement effects on the infectivity of *Plasmodium gallinaceum* to *Aedes aegypti* mosquitoes. I. Resistance of zygotes to the alternative pathway of complement. *J. Immunol.*, **136**(11), 4270-4274.
- Grotendorst CA e Carter R (1987). Complement effects of the infectivity of *Plasmodium gallinaceum* to *Aedes aegypti* mosquitoes. II. Changes in sensitivity to complement-like factors during zygote development. *J. Parasitol.*, **73**(5), 980-984.
- Gulia M, Suneja A e Gakhar SK (2002). Effect of anti-mosquito hemolymph antibodies on fecundity and on the infectivity of malarial parasite *Plasmodium vivax* to *Anopheles stephensi* (Diptera:Insecta). *Jpn. J. Infect. Dis.*, **55**(3), 78-82.
- Gupta L, Kumar S, Han YS, Pimenta PF e Barillas-Mury C (2005). Midgut epithelial responses of different mosquito-*Plasmodium* combinations: the actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**(11), 4010-4015.
- Gyan B, Troye-Blomberg M, Perlmann P e Bjorkman A (1994). Human monocytes cultured with and without interferon-gamma inhibit *Plasmodium falciparum* parasite growth *in vitro* via secretion of reactive nitrogen intermediates. *Parasite Immunol.*, **16**(7), 371-375.

Haghdoust AA e Alexander N (2007). Systematic review and meta-analysis of the interaction between *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in humans. *J Vector. Borne. Dis.*, **44**(1), 33-43.

Hall N, Pain A, Berriman M, Churcher C, Harris B, Harris D, Mungall K, Bowman S, Atkin R, Baker S, Barron A, Brooks K, Buckee CO, Burrows C, Cherevach I, Chillingworth C, Chillingworth T, Christodoulou Z, Clark L, Clark R, Corton C, Cronin A, Davies R, Davis P, Dear P, Dearden F, Doggett J, Feltwell T, Goble A, Goodhead I, Gwilliam R, Hamlin N, Hance Z, Harper D, Hauser H, Hornsby T, Holroyd S, Horrocks P, Humphray S, Jagels K, James KD, Johnson D, Kerhornou A, Knights A, Konfortov B, Kyes S, Larke N, Lawson D, Lennard N, Line A, Maddison M, McLean J, Mooney P, Moule S, Murphy L, Oliver K, Ormond D, Price C, Quail MA, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutter S, Rutherford KM, Sanders M, Simmonds M, Seeger K, Sharp S, Smith R, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Tivey A, Unwin L, Whitehead S, Woodward J, Sulston JE, Craig A, Newbold C e Barrell BG (2002). Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 1, 3-9 and 13. *Nature*, **419**(6906), 527-531.

Han YS, Thompson J, Kafatos FC e Barillas-Mury C (2000). Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *EMBO J.*, **19**(22), 6030-6040.

Healer J, McGuinness D, Hopcroft P, Haley S, Carter R e Riley E (1997). Complement-mediated lysis of *Plasmodium falciparum* gametes by malaria-immune human sera is associated with antibodies to the gamete surface antigen Pfs230. *Infect. Immun.*, **65**( 8), 3017-3023.

Heiss K, Nie H, Kumar S, Daly TM, Bergman LW e Matuschewski K (2008). Functional characterization of a redundant *Plasmodium* TRAP-family invasin, TRAP-like protein (TLP), by aldolase binding and a genetic complementation test. *Eukaryot. Cell.*, **7**(6),1062-70.

Hirai M, Arai M, Kawai S e Matsuoka H (2006). PbGCbeta is essential for *Plasmodium* ookinete motility to invade midgut cell and for successful completion of parasite life cycle in mosquitoes. *J. Biochem.*, **140**(5), 747-757.

Hoffmann JA e Reichhart JM (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.*, **3**(2), 121-126.

Hogh B, Gamage-Mendis AC, Butcher GA, Thompson R, Begtrup K, Mendis C, Enosse SM, Dgedge M, Barreto J, Eling WM e Sinden RE (1998). The differing impact of chloroquine and pyrimethamine/sulfadoxine upon the infectivity of malaria species to the mosquito vector. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58**(2), 176-182.

Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM, Wides R, Salzberg SL, Loftus B, Yandell M, Majoros WH, Rusch DB, Lai Z, Kraft CL, Abril JF, Anthouard V, Arensburger P, Atkinson PW, Baden H, de B, V, Baldwin D, Benes V, Biedler J, Blass C, Bolanos R, Boscus D, Barnstead M, Cai S, Center A, Chaturverdi K, Christophides GK, Chrystal MA, Clamp M, Cravchik A, Curwen V, Dana A, Delcher A, Dew I, Evans CA, Flanigan M, Grundschober-Freimoser A, Friedli L, Gu Z, Guan P, Guigo R, Hillenmeyer ME, Hladun SL, Hogan JR, Hong YS, Hoover J, Jaillon O, Ke Z, Kodira C, Kokoza E, Koutsos A, Letunic I, Levitsky A, Liang Y, Lin JJ, Lobo NF, Lopez JR, Malek JA, McIntosh TC, Meister S, Miller J, Mobarry C, Mongin E, Murphy SD, O'Brochta DA, Pfannkoch C, Qi R, Regier MA, Remington K, Shao H, Sharakhova MV, Sitter CD, Shetty J, Smith TJ, Strong R, Sun J, Thomasova D, Ton LQ, Topalis P, Tu Z, Unger MF, Walenz B, Wang A, Wang J, Wang M, Wang X, Woodford KJ, Wortman JR, Wu M, Yao A, Zdobnov EM, Zhang H, Zhao Q, Zhao S, Zhu SC, Zhimulev I, Coluzzi M, della TA, Roth CW, Louis C, Kalush F, Mural RJ, Myers EW, Adams MD, Smith HO, Broder S, Gardner MJ, Fraser CM, Birney E, Bork P, Brey PT, Venter JC, Weissenbach J, Kafatos FC, Collins FH e Hoffman SL (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, **298**(5591), 129-149.

Hsu DY e Geiman QM (1952). Synergistic effect of *Haemobartonella muris* on *Plasmodium berghei* in white rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1**(5), 747-760.

Hurd H, Al Olayan E e Butcher GA (2003). *In vitro* methods for culturing vertebrate and mosquito stages of *Plasmodium*. *Microbes. Infect.*, **5**(4), 321-327.

Hurtado S, Salas ML, Romero JF, Zapata JC, Ortiz H, Arevalo-Herrera M e Herrera S (1997). Regular production of infective sporozoites of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in laboratory-bred *Anopheles albimanus*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **91**(1), 49-60.

- Ichimori K, Curtis CF e Targett GA (1990). The effects of chloroquine on the infectivity of chloroquine-sensitive and -resistant populations of *Plasmodium yoelii nigeriensis* to mosquitoes. *Parasitology*, **100 Pt 3** 377-381.
- Ito J, Ghosh A, Moreira LA, Wimmer EA e Jacobs-Lorena M (2002). Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, **417(6887)**, 452-455.
- Jacobs P, Radzioch D e Stevenson MM (1995). Nitric oxide expression in the spleen, but not in the liver, correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *J. Immunol.*, **155(11)**, 5306-5313.
- Jacobs P, Radzioch D e Stevenson MM (1996). *In vivo* regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice. *Infect. Immun.*, **64(1)**, 44-49.
- Janse CJ, Mons B, Rouwenhorst RJ, van der Klooster PF, Overdulve JP e van der Kaay HJ (1985). *In vitro* formation of ookinetes and functional maturity of *Plasmodium berghei* gametocytes. *Parasitology*, **91 ( Pt 1)** 19-29.
- Jasinskiene N, Coates CJ, Benedict MQ, Cornel AJ, Rafferty CS, James AA e Collins FH (1998). Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the Hermes element from the housefly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95(7)**, 3743-3747.
- Jeffares DC, Pain A, Berry A, Cox AV, Stalker J, Ingle CE, Thomas A, Quail MA, Siebenthal K, Uhlemann AC, Kyes S, Krishna S, Newbold C, Dermitzakis ET e Berriman M (2007). Genome variation and evolution of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Genet.*, **39(1)**, 120-125.
- Jesuino BS, Casimiro C, do Rosario V e Silveira H (2006). Effect of antibodies on the expression of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein gene. *Int. J. Med. Sci.*, **3(1)**, 7-10.
- Jovani R e Sol D (2005). How predictable is the abundance of double gametocyte infections? *Parasitol. Res.*, **97(1)**, 84-86.
- Kadota K, Ishino T, Matsuyama T, Chinzei Y e Yuda M (2004). Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101(46)**, 16310-16315.
- Kaplan RA, Zwiens SH e Yan G (2001). *Plasmodium gallinaceum*: ookinete formation and proteolytic enzyme dynamics in highly refractory *Aedes aegypti* populations. *Exp. Parasitol.*, **98 (3)**, 115-122.
- Kariu T, Ishino T, Yano K, Chinzei Y e Yuda M (2006). CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Mol. Microbiol.*, **59(5)**, 1369-1379.
- Karunaweera ND, Carter R, Grau GE, Kwiatkowski D, Del Giudice G e Mendis KN (1992). Tumour necrosis factor-dependent parasite-killing effects during paroxysms in non-immune *Plasmodium vivax* malaria patients. *Clin. Exp. Immunol.*, **88(3)**, 499-505.
- Kim W, Koo H, Richman AM, Seeley D, Vizioli J, Klocko AD e O'Brochta DA (2004). Ectopic expression of a *cecropin* transgene in the human malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): effects on susceptibility to *Plasmodium*. *J. Med. Entomol.*, **41(3)**, 447-455.
- Korenromp EL, Williams BG, de Vlas SJ, Gouws E, Gilks CF, Ghys PD e Nahlen BL (2005). Malaria attributable to the HIV-1 epidemic, sub-Saharan Africa  
1. *Emerg. Infect. Dis.*, **11(9)**, 1410-1419.
- Kubler-Kielb J, Majadly F, Wu Y, Narum DL, Guo C, Miller LH, Shiloach J, Robbins JB e Schneerson R (2007). Long-lasting and transmission-blocking activity of antibodies to *Plasmodium falciparum* elicited in mice by protein conjugates of Pfs25. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104(1)**, 293-298.
- Kumar S, Gupta L, Han YS e Barillas-Mury C (2004). Inducible peroxidases mediate nitration of *anopheles* midgut cells undergoing apoptosis in response to *Plasmodium* invasion. *J. Biol. Chem.*, **279(51)**, 53475-53482.
- Lal AA, Schriefer ME, Sacci JB, Goldman IF, Louis-Wileman V, Collins WE e Azad AF (1994). Inhibition of malaria parasite development in mosquitoes by anti-mosquito-midgut antibodies. *Infect. Immun.*, **62(1)**, 316-318.

- Lal AA, Patterson PS, Sacci JB, Vaughan JA, Paul C, Collins WE, Wirtz RA e Azad AF (2001). Anti-mosquito midgut antibodies block development of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in multiple species of *Anopheles* mosquitoes and reduce vector fecundity and survivorship. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **98**(9), 5228-5233.
- Langer RC, Li F e Vinetz JM (2002). Identification of novel *Plasmodium gallinaceum* zygote- and ookinete-expressed proteins as targets for blocking malaria transmission. *Infect. Immun.*, **70**(1), 102-106.
- Lavazec C, Boudin C, Lacroix R, Bonnet S, Diop A, Thiberge S, Boisson B, Tahar R e Bourgoignie C (2007). Carboxypeptidases B of *Anopheles gambiae* as targets for a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine. *Infect. Immun.*, **75**(4), 1635-1642.
- Lensen AH, Bolmer-Van de Vegte M, van Gemert GJ, Eling WM e Sauerwein RW (1997). Leukocytes in a *Plasmodium falciparum*-infected blood meal reduce transmission of malaria to *Anopheles* mosquitoes. *Infect Immun.*, **65**(9), 3834-3837.
- Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M e Kafatos FC (2001). Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*, **104**(5), 709-718.
- Li F, Templeton TJ, Popov V, Comer JE, Tsuboi T, Torii M e Vinetz JM (2004). *Plasmodium* ookinete-secreted proteins secreted through a common micronemal pathway are targets of blocking malaria transmission. *J. Biol. Chem.*, **279**(25), 26635-26644.
- Ligoxygakis P, Pelte N, Hoffmann JA e Reichhart JM (2002). Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science*, **297**(5578), 114-116.
- Lopes LF, Abrantes P, Silva AP, do Rosario V e Silveira H (2007). *Plasmodium yoelii*: the effect of second blood meal and anti-sporozoite antibodies on development and gene expression in the mosquito vector, *Anopheles stephensi*. *Exp. Parasitol.*, **115**(3), 259-269.
- Lowenberger CA, Kamal S, Chiles J, Paskewitz S, Bulet P, Hoffmann JA e Christensen BM (1999). Mosquito-*Plasmodium* interactions in response to immune activation of the vector. *Exp. Parasitol.*, **91**(1), 59-69.
- Luckhart S, Vodovotz Y, Cui L e Rosenberg R (1998). The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **95**(10), 5700-5705.
- Luckhart S, Li K, Dunton R, Lewis EE, Crampton AL, Ryan JR e Rosenberg R (2003). *Anopheles gambiae* immune gene variants associated with natural *Plasmodium* infection. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **128**(1), 83-86.
- Luty AJ, Perkins DJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Herbich K, Schmid D, Weinberg JB e Kremsner PG (2000). Low interleukin-12 activity in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect. Immun.*, **68**(7), 3909-3915.
- Luxemburger C, Ricci F, Nosten F, Raimond D, Bathet S e White NJ (1997). The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand. *Trans. R. Soc. Trop Med Hyg*, **91**(3), 256-262.
- Lyke KE, Dabo A, Sangare L, Arama C, Daou M, Diarra I, Plowe CV, Doumbo OK e Sztein MB (2006). Effects of concomitant *Schistosoma haematobium* infection on the serum cytokine levels elicited by acute *Plasmodium falciparum* malaria infection in Malian children. *Infect. Immun.*, **74**(10), 5718-5724.
- Maitland K, Williams TN, Bennett S, Newbold CI, Peto TE, Viji J, Timothy R, Clegg JB, Weatherall DJ e Bowden DK (1996). The interaction between *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in children on Espiritu Santo island, Vanuatu. *Trans. R. Soc. Trop Med Hyg*, **90**(6), 614-620.
- Malkin EM, Durbin AP, Diemert DJ, Sattabongkot J, Wu Y, Miura K, Long CA, Lambert L, Miles AP, Wang J, Stowers A, Miller LH e Saul A (2005). Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine*, **23**(24), 3131-3138.
- Margos G, Navarette S, Butcher G, Davies A, Willers C, Sinden RE e Lachmann PJ (2001). Interaction between host complement and mosquito-midgut-stage *Plasmodium berghei*. *Infect Immun.*, **69**(8), 5064-5071.

- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N e Pauron D (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.*, **7**(2), 179-184.
- Matuschewski K, Nunes AC, Nussenzweig V e Menard R (2002a). *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *EMBO J.*, **21**(7), 1597-1606.
- Matuschewski K, Ross J, Brown SM, Kaiser K, Nussenzweig V e Kappe SH (2002b). Infectivity-associated changes in the transcriptional repertoire of the malaria parasite sporozoite stage. *J. Biol. Chem.*, **277**(44), 41948-41953.
- Mazzacano CA, Vargas JC, Mackay AJ e Beier JC (1998). *Plasmodium gallinaceum*: effect of insect cells on ookinete development *in vitro*. *Exp. Parasitol.*, **88**(3), 210-216.
- McKenzie FE e Bossert WH (1997). Mixed-species *Plasmodium* infections of humans. *J Parasitol.*, **83**(4), 593-600.
- McKenzie FE e Bossert WH (1999). Multispecies *Plasmodium* infections of humans. *J Parasitol.*, **85**(1), 12-18.
- McKenzie FE, Jeffery GM e Collins WE (2002). *Plasmodium malariae* infection boosts *Plasmodium falciparum* gametocyte production. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **67**(4), 411-414.
- Meister S, Kanzok SM, Zheng XL, Luna C, Li TR, Hoa NT, Clayton JR, White KP, Kafatos FC, Christophides GK e Zheng L (2005). Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**(32), 11420-11425.
- Menard R, Sultan AA, Cortes C, Altszuler R, van Dijk MR, Janse CJ, Waters AP, Nussenzweig RS e Nussenzweig V (1997). Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. *Nature*, **385**(6614), 336-340.
- Menard R (2000). The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. *Microbes. Infect.*, **2**(6), 633-642.
- Michel K, Budd A, Pinto S, Gibson TJ e Kafatos FC (2005). *Anopheles gambiae* SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep.*, **6**(9), 891-897.
- Michel K, Suwanchaichinda C, Morlais I, Lambrechts L, Cohuet A, Awono-Ambene PH, Simard F, Fontenille D, Kanost MR e Kafatos FC (2006). Increased melanizing activity in *Anopheles gambiae* does not affect development of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**(45), 16858-16863.
- Michon P, Cole-Tobian JL, Dabod E, Schoepflin S, Igu J, Susapu M, Tarongka N, Zimmerman PA, Reeder JC, Beeson JG, Schofield L, King CL e Mueller I (2007). The risk of malarial infections and disease in Papua New Guinean children. *Am J Trop Med Hyg.*, **76**(6), 997-1008.
- Miura K, Keister DB, Muratova OV, Sattabongkot J, Long CA e Saul A (2007). Transmission-blocking activity induced by malaria vaccine candidates Pfs25/Pvs25 is a direct and predictable function of antibody titer. *Malar. J.*, **6**, 107.
- Moreira CK, Templeton TJ, Lavazec C, Hayward RE, Hobbs CV, Kroeze H, Janse CJ, Waters AP, Sinnis P e Coppi A (2008). The *Plasmodium* TRAP/MIC2 family member, TRAP-Like Protein (TLP), is involved in tissue traversal by sporozoites. *Cell Microbiol.*
- Moreira LA, Ito J, Ghosh A, Devenport M, Zieler H, Abraham EG, Crisanti A, Nolan T, Catteruccia F e Jacobs-Lorena M (2002). Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. *J. Biol. Chem.*, **277**(43), 40839-40843.
- Mu J, Awadalla P, Duan J, McGee KM, Keebler J, Seydel K, McVean GA e Su XZ (2007). Genome-wide variation and identification of vaccine targets in the *Plasmodium falciparum* genome. *Nat. Genet.*, **39**(1), 126-130.
- Mwangi TW, Bethony JM e Brooker S (2006). Malaria and helminth interactions in humans: an epidemiological viewpoint. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **100**(7), 551-570.

- Myung JM, Marshall P e Sinnis P (2004). The *Plasmodium* circumsporozoite protein is involved in mosquito salivary gland invasion by sporozoites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **133**(1), 53-59.
- Nacer A, Underhill A e Hurd H (2008). The microneme proteins CTRP and SOAP are not essential for *Plasmodium berghei* ookinete to oocyst transformation *in vitro* in a cell free system. *Malar. J.*, **7** 82.
- Naotunne TS, Karunaweera ND, Del Giudice G, Kularatne MU, Grau GE, Carter R e Mendis KN (1991). Cytokines kill malaria parasites during infection crisis: extracellular complementary factors are essential. *J. Exp. Med.*, **173**(3), 523-529.
- Naotunne TS, Karunaweera ND, Mendis KN e Carter R (1993). Cytokine-mediated inactivation of malarial gametocytes is dependent on the presence of white blood cells and involves reactive nitrogen intermediates. *Immunology*, **78**(4), 555-562.
- Neimark H, Barnaud A, Gounon P, Michel JC e Contamin H (2002). The putative *Haemobartonella* that influences *Plasmodium falciparum* parasitaemia in squirrel monkeys is a haemotrophic mycoplasma. *Microbes. Infect.*, **4**(7), 693-698.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M, Ren Q, Zdobnov EM, Lobo NF, Campbell KS, Brown SE, Bonaldo MF, Zhu J, Sinkins SP, Hogenkamp DG, Amedeo P, Arensburger P, Atkinson PW, Bidwell S, Biedler J, Birney E, Bruggner RV, Costas J, Coy MR, Crabtree J, Crawford M, Debruyne B, DeCaprio D, Eiglmeier K, Eisenstadt E, El Dorry H, Gelbart WM, Gomes SL, Hammond M, Hannick LI, Hogan JR, Holmes MH, Jaffe D, Johnston JS, Kennedy RC, Koo H, Kravitz S, Kriventseva EV, Kulp D, Labutti K, Lee E, Li S, Lovin DD, Mao C, Mauceli E, Menck CF, Miller JR, Montgomery P, Mori A, Nascimento AL, Naveira HF, Nusbaum C, O'leary S, Orvis J, Pertea M, Quesneville H, Reidenbach KR, Rogers YH, Roth CW, Schneider JR, Schatz M, Shumway M, Stanke M, Stinson EO, Tubio JM, Vanzee JP, Verjovski-Almeida S, Werner D, White O, Wyder S, Zeng Q, Zhao Q, Zhao Y, Hill CA, Raikhel AS, Soares MB, Knudson DL, Lee NH, Galagan J, Salzberg SL, Paulsen IT, Dimopoulos G, Collins FH, Birren B, Fraser-Liggett CM e Severson DW (2007). Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*, **316**(5832), 1718-1723.
- Noden BH, Kent MD e Beier JC (1995). The impact of variations in temperature on early *Plasmodium falciparum* development in *Anopheles stephensi*. *Parasitology*, **111** ( Pt 5) 539-545.
- Noland GS, Graczyk TK, Fried B, Fitzgerald EJ e Kumar N (2005). Exacerbation of *Plasmodium yoelii* malaria in *Echinostoma caproni* infected mice and abatement through anthelmintic treatment. *J. Parasitol.*, **91**(4), 944-948.
- Noland GS, Graczyk TK, Fried B e Kumar N (2007). Enhanced malaria parasite transmission from helminth co-infected mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **76**(6), 1052-1056.
- Nudelman S, Renia L, Charoenvit Y, Yuan L, Miltgen F, Beaudoin RL e Mazier D (1989). Dual action of anti-sporozoite antibodies *in vitro*. *J. Immunol.*, **143**(3 ), 996-1000.
- Oduol F, Xu J, Niare O, Natarajan R e Vernick KD (2000). Genes identified by an expression screen of the vector mosquito *Anopheles gambiae* display differential molecular immune response to malaria parasites and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**(21), 11397-11402.
- Okech BA, Gouagna LC, Kabiru EW, Walczak E, Beier JC, Yan G e Githure JI (2004). Resistance of early midgut stages of natural *Plasmodium falciparum* parasites to high temperatures in experimentally infected *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J. Parasitol.*, **90**(4), 764-768.
- Osgood SM, Eisen RJ e Schall JJ (2002). Gametocyte sex ratio of a malaria parasite: experimental test of heritability. *J. Parasitol.*, **88**(3), 494-498.
- Osgood SM e Schall JJ (2004). Gametocyte sex ratio of a malaria parasite: response to experimental manipulation of parasite clonal diversity. *Parasitology*, **128**(Pt 1), 23-29.
- Osta MA, Christophides GK, Vlachou D e Kafatos FC (2004a). Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *J. Exp. Biol.*, **207**(Pt 15), 2551-2563.
- Osta MA, Christophides GK e Kafatos FC (2004b). Effects of mosquito genes on *Plasmodium* development. *Science*, **303**(5666), 2030-2032.

- Ott KJ e Stauber LA (1967). *Eperythrozoon coccoides*: influence on course of infection of *Plasmodium chabaudi* in mouse. *Science*, **155**(769), 1546-1548.
- Outchkourov N, Vermunt A, Jansen J, Kaan A, Roeffen W, Teelen K, Lasonder E, Braks A, van d, V, Qiu LY, Sauerwein RW e Stunnenberg HG (2007). Epitope analysis of the malaria surface antigen pfs48/45 identifies a subdomain that elicits transmission blocking antibodies. *J Biol. Chem.*, **282**(23), 17148-17156.
- Outchkourov NS, Roeffen W, Kaan A, Jansen J, Luty A, Schuiffel D, van Gemert GJ, van d, V, Sauerwein RW e Stunnenberg HG (2008). Correctly folded Pfs48/45 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**(11), 4301-4305.
- Pascoa V, Oliveira PL, Dansa-Petretski M, Silva JR, Alvarenga PH, Jacobs-Lorena M e Lemos FJ (2002). *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **32**(5), 517-523.
- Paskewitz SM, Andreev O e Shi L (2006). Gene silencing of serine proteases affects melanization of Sephadex beads in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **36**(9), 701-711.
- Paul RE, Coulson TN, Raibaud A e Brey PT (2000). Sex determination in malaria parasites. *Science*, **287**(5450), 128-131.
- Paul RE, Nu VA, Kretzli AU e Brey PT (2002). Interspecific competition during transmission of two sympatric malaria parasite species to the mosquito vector. *Proc. Biol. Sci.*, **269**(1509), 2551-2557.
- Peiris JS, Premawansa S, Ranawaka MB, Udagama PV, Munasinghe YD, Nanayakkara MV, Gamage CP, Carter R, David PH e Mendis KN (1988). Monoclonal and polyclonal antibodies both block and enhance transmission of human *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **39**(1), 26-32.
- Peterson TM, Gow AJ e Luckhart S (2007). Nitric oxide metabolites induced in *Anopheles stephensi* control malaria parasite infection. *Free Radic. Biol. Med.*, **42**(1), 132-142.
- Pfähler JM, Galinski MR, Barnwell JW e Lanzer M (2006). Transient transfection of *Plasmodium vivax* blood stage parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **149**(1), 99-101.
- Pinto J, Sousa CA, Gil V, Gonçalves L, Lopes D, do Rosario V e Charlwood JD (2000). Mixed-species malaria infections in the human population of São Tomé island, west Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, **94**(3), 256-257.
- Ponsa N, Sattabongkot J, Kittayapong P, Eikarat N e Coleman RE (2003). Transmission-blocking activity of tafenoquine (WR-238605) and artemisinic acid against naturally circulating strains of *Plasmodium vivax* in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **69**(5), 542-547.
- Price RN, Nosten F, Luxemburger C, van Vugt M, Phaipun L, Chongsuphajaisiddhi T e White NJ (1997). Artesunate/mefloquine treatment of multi-drug resistant falciparum malaria. *Trans. R. Soc. Trop Med Hyg.*, **91**(5), 574-577.
- Pukrittayakamee S, Chotivanich K, Chantra A, Clemens R, Looareesuwan S e White NJ (2004). Activities of artesunate and primaquine against asexual- and sexual-stage parasites in falciparum malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**(4), 1329-1334.
- Puri SK e Dutta GP (2005). *Plasmodium cynomolgi*: gametocytocidal activity of the anti-malarial compound CDRI 80/53 (elubaquine) in rhesus monkeys. *Exp. Parasitol.*, **111**(1), 8-13.
- Putra C e Manyando C (1997). Enhanced gametocyte production in Fansidar-treated *Plasmodium falciparum* malaria patients: implications for malaria transmission control programmes. *Trop. Med. Int. Health*, **2**(3), 227-229.
- Raberg L, de Roode JC, Bell AS, Stamou P, Gray D e Read AF (2006). The role of immune-mediated apparent competition in genetically diverse malaria infections. *Am. Nat.*, **168**(1), 41-53.
- Ramasamy MS e Ramasamy R (1990). Effect of anti-mosquito antibodies on the infectivity of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* to *Anopheles farauti*. *Med Vet. Entomol.*, **4**(2), 161-166.

- Ramasamy MS, Srikrishnaraj KA, Wijekoone S, Jesuthasan LS e Ramasamy R (1992). Host immunity to mosquitoes: effect of antimosquito antibodies on *Anopheles tessellatus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.*, **29**(6), 934-938.
- Ramasamy R, Wanniarachchi IC, Srikrishnaraj KA e Ramasamy MS (1997). Mosquito midgut glycoproteins and recognition sites for malaria parasites. *Biochim. Biophys. Acta*, **1361**(1), 114-122.
- Rangarajan R, Bei AK, Jethwaney D, Maldonado P, Dorin D, Sultan AA e Doerig C (2005). A mitogen-activated protein kinase regulates male gametogenesis and transmission of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep.*, **6**(5), 464-469.
- Read D, Lensen AH, Begarnie S, Haley S, Raza A e Carter R (1994). Transmission-blocking antibodies against multiple, non-variant target epitopes of the *Plasmodium falciparum* gamete surface antigen Pfs230 are all complement-fixing. *Parasite Immunol.*, **16**(10), 511-519.
- Reece SE, Duncan AB, West SA e Read AF (2005). Host cell preference and variable transmission strategies in malaria parasites. *Proc. Biol. Sci.*, **272**(1562), 511-517.
- Reece SE, Drew DR e Gardner A (2008). Sex ratio adjustment and kin discrimination in malaria parasites. *Nature*, **453**(7195), 609-614.
- Reininger L, Billker O, Tewari R, Mukhopadhyay A, Fennell C, Dorin-Semlat D, Doerig C, Goldring D, Harmse L, Ranford-Cartwright LC, Packer J e Doerig C (2005). A NIMA-related protein kinase is essential for completion of the sexual cycle of malaria parasites. *J. Biol. Chem.*, **280**(36), 31957-31964.
- Ribeiro JM (2003). A catalogue of *Anopheles gambiae* transcripts significantly more or less expressed following a blood meal. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **33**(9), 865-882.
- Richman AM, Dimopoulos G, Seeley D e Kafatos FC (1997). *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *EMBO J.*, **16**(20), 6114-6119.
- Robert V, Awono-Ambene HP, Le Hesran JY e Trape JF (2000). Gametocytemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria attacks treated with chloroquine or sulfadoxine plus pyrimethamine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **62**(2), 210-216.
- Robert V, Sokhna CS, Rogier C, Arief F e Trape JF (2003). Sex ratio of *Plasmodium falciparum* gametocytes in inhabitants of Dielmo, Senegal. *Parasitology*, **127**(Pt 1), 1-8.
- Rodrigues FG, Santos MN, de Carvalho TX, Rocha BC, Riehle MA, Pimenta PF, Abraham EG, Jacobs-Lorena M, Alves de Brito CF e Moreira LA (2008). Expression of a mutated phospholipase A2 in transgenic *Aedes fluviatilis* mosquitoes impacts *Plasmodium gallinaceum* development. *Insect Mol. Biol.*, **17**(2), 175-183.
- Rodriguez MC, Martinez-Barnette J, Alvarado-Delgado A, Batista C, Argotte-Ramos RS, Hernandez-Martinez S, Gonzalez CL, Torres JA, Margos G e Rodriguez MH (2007). The surface protein Pvs25 of *Plasmodium vivax* ookinetes interacts with calreticulin on the midgut apical surface of the malaria vector *Anopheles albimanus*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **153**(2), 167-177.
- Rosenberg R e Koontz LC (1984). *Plasmodium gallinaceum*: density dependent limits on infectivity to *Aedes aegypti*. *Exp. Parasitol.*, **57**(3), 234-238.
- Rosenberg R e Rungsiwongse J (1991). The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *Am J Trop Med Hyg.*, **45**(5), 574-577.
- Rudin W e Hecker H (1989). Lectin-binding sites in the midgut of the mosquitoes *Anopheles stephensi* Liston and *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.*, **75**(4), 268-279.
- Sachs J e Malaney P (2002). The economic and social burden of malaria. *Nature*, **415**(6872), 680-685.
- Sanders HR, Evans AM, Ross LS e Gill SS (2003). Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **33**(11), 1105-1122.

- Sanderson F, Andrews L, Douglas AD, Hunt-Cooke A, Bejon P e Hill AV (2008). Blood-stage challenge for malaria vaccine efficacy trials: a pilot study with discussion of safety and potential value. *Am J Trop Med Hyg*, **78**(6), 878-883.
- Sattabongkot J, Tsuboi T, Hisaeda H, Tachibana M, Suwanabun N, Rungruang T, Cao YM, Stowers AW, Sirichaisinthop J, Coleman RE e Torii M (2003). Blocking of transmission to mosquitoes by antibody to *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 despite antigenic polymorphism in field isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **69**(5), 536-541.
- Saul A, Hensmann M, Sattabongkot J, Collins WE, Barnwell JW, Langermans JA, Wu Y, Long CA, Dubovsky F e Thomas AW (2007). Immunogenicity in rhesus of the *Plasmodium vivax* mosquito stage antigen Pvs25H with Alhydrogel and Montanide ISA 720. *Parasite Immunol.*, **29**(10), 525-533.
- Schneider P, Bousema JT, Gouagna LC, Otieno LA, van de Vegte-Bolmer M, Omar SA e Sauerwein RW (2007). Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am J Trop Med Hyg*, **76**(3), 470-474.
- Schroeder AA, Lawrence CE e Abrahamsen MS (1999). Differential mRNA display cloning and characterization of a *Cryptosporidium parvum* gene expressed during intracellular development. *J. Parasitol.*, **85**(2), 213-220.
- Shahabuddin M, Criscio M e Kaslow DC (1995). Unique specificity of *in vitro* inhibition of mosquito midgut trypsin-like activity correlates with *in vivo* inhibition of malaria parasite infectivity. *Exp. Parasitol.*, **80**(2), 212-219.
- Shahabuddin M, Lemos FJ, Kaslow DC e Jacobs-Lorena M (1996). Antibody-mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsins blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*. *Infect. Immun.*, **64**(3), 739-743.
- Shahabuddin M, Fields I, Bulet P, Hoffmann JA e Miller LH (1998). *Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin. *Exp. Parasitol.*, **89**(1), 103-112.
- Shahabuddin M (2002). Do *Plasmodium* ookinetes invade a specific cell type in the mosquito midgut? *Trends Parasitol.*, **18**(4), 157-161.
- Shekalaghe S, Drakeley C, Gosling R, Ndaro A, van Meegeren M, Enevold A, Alifrangis M, Mosha F, Sauerwein RW e Bousema JT (2007). Primaquine Clears Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Gametocytes that Persist after Treatment with Sulphadoxine-Pyrimethamine and Artesunate. *PLoS One*, **2**(10), e1023.
- Shiao SH, Whitten MM, Zachary D, Hoffmann JA e Levashina EA (2006). Fz2 and cdc42 mediate melanization and actin polymerization but are dispensable for *Plasmodium* killing in the mosquito midgut. *PLoS. Pathog.*, **2**(12), e133.
- Siden-Kiamos I, Vlachou D, Margos G, Beetsma A, Waters AP, Sinden RE e Louis C (2000). Distinct roles for pbs21 and pbs25 in the *in vitro* ookinete to oocyst transformation of *Plasmodium berghei*. *J. Cell Sci.*, **113 Pt 19** 3419-3426.
- Siden-Kiamos I, Ecker A, Nyback S, Louis C, Sinden RE e Billker O (2006). *Plasmodium berghei* calcium-dependent protein kinase 3 is required for ookinete gliding motility and mosquito midgut invasion. *Mol. Microbiol.*, **60**(6) , 1355-1363.
- Sinden RE e Smalley ME (1976). Gametocytes of *Plasmodium falciparum*: phagocytosis by leucocytes *in vivo* and *in vitro*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **70**(4), 344-345.
- Sinden RE, Butcher GA, Billker O e Fleck SL (1996). Regulation of infectivity of *Plasmodium* to the mosquito vector. *Adv. Parasitol.*, **38** 53-117.
- Sinden, R.E. (1997). Infection of mosquitoes with rodent malaria. In Louis, C., Crampton, J.M., and Beard, C.B. (Eds.), *Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A methods manual*, . Chapman and Hall, London, pp. 67-91.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario V, Thaithong S e Brown KN (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **61**(2), 315-320.
- Srikrishnaraj KA, Ramasamy R e Ramasamy MS (1995). Antibodies to *Anopheles* midgut reduce vector competence for *Plasmodium vivax* malaria. *Med Vet. Entomol.*, **9**(4), 353-357.

- Srinivasan P, Fujioka H e Jacobs-Lorena M (2008). PbCap380, a novel oocyst capsule protein, is essential for malaria parasite survival in the mosquito. *Cell Microbiol.*, **10**(6), 1304-1312.
- Stevenson MM, Tam MF, Wolf SF e Sher A (1995). IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J. Immunol.*, **155**(5), 2545-2556.
- Stewart MJ e Vanderberg JP (1988). Malaria sporozoites leave behind trails of circumsporozoite protein during gliding motility. *J. Protozool.*, **35**(3), 389-393.
- Suneja A, Gulia M e Gakhar SK (2003). Blocking of malaria parasite development in mosquito and fecundity reduction by midgut antibodies in *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **52**(2), 63-70.
- Suwanabun N, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Maneechai N, Rachapaew N, Yim-amnuaychok N, Punkitchar V e Coleman RE (2001). Development of a method for the *in vitro* production of *Plasmodium vivax* ookinetes. *J. Parasitol.*, **87**(4), 928-930.
- Tahar R, Boudin C, Thiery I e Bourgooin C (2002). Immune response of *Anopheles gambiae* to the early sporogonic stages of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *EMBO J.*, **21**(24), 6673-6680.
- Targett G, Drakeley CJ, Jawara M, von Seidlein L, Coleman R, Deen J, Pinder M, Doherty T, Sutherland C, Walraven G e Milligan P (2001). Artesunate reduces but does not prevent posttreatment transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *J. Infect. Dis.*, **183**(8), 1254-1259.
- Taylor LH, Walliker D e Read AF (1997). Mixed-genotype infections of the rodent malaria *Plasmodium chabaudi* are more infectious to mosquitoes than single-genotype infections. *Parasitology*, **115** ( Pt 2) 121-132.
- Taylor LH e Read AF (1998). Determinants of transmission success of individual clones from mixed-clone infections of the rodent malaria parasite, *Plasmodium chabaudi*. *Int. J. Parasitol.*, **28**(5), 719-725.
- Teklehaimanot A, Nguyen-Dinh P, Collins WE, Barber AM e Campbell CC (1985). Evaluation of sporontocidal compounds using *Plasmodium falciparum* gametocytes produced *in vitro*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **34**(3), 429-434.
- Templeton TJ, Keister DB, Muratova O, Procter JL e Kaslow DC (1998). Adherence of erythrocytes during exflagellation of *Plasmodium falciparum* microgametes is dependent on erythrocyte surface sialic acid and glycoporphins. *J. Exp. Med.*, **187**(10), 1599-1609.
- Terzakis JA, Sprinz H e Ward RA (1967). The transformation of the *Plasmodium gallinaceum* oocyst in *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Cell Biol.*, **34**(1), 311-326.
- Tewari R, Rathore D e Crisanti A (2005). Motility and infectivity of *Plasmodium berghei* sporozoites expressing avian *Plasmodium gallinaceum* circumsporozoite protein. *Cell Microbiol.*, **7**(5), 699-707.
- Thathy V, Fujioka H, Gantt S, Nussenzweig R, Nussenzweig V e Menard R (2002). Levels of circumsporozoite protein in the *Plasmodium* oocyst determine sporozoite morphology. *Embo Journal*, **21**(7), 1586-1596.
- Trager W e Jensen JB (1977). Cultivation of erythrocytic stages. *Bull. World Health Organ*, **55**(2-3), 363-365.
- Tsuboi T, Cao YM, Torii M, Hitsumoto Y e Kanbara H (1995). Murine complement reduces infectivity of *Plasmodium yoelii* to mosquitoes. *Infect. Immun.*, **63**(9), 3702-3704.
- Tzou P, De Gregorio E e Lemaitre B (2002). How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.*, **5**(1), 102-110.
- van Dijk MR, Waters AP e Janse CJ (1995). Stable transfection of malaria parasite blood stages. *Science*, **268**(5215), 1358-1362.
- Vaughan JA e Azad AF (1988). Passage of host immunoglobulin G from blood meal into hemolymph of selected mosquito species (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, **25**(6), 472-474.

- Vaughan JA, do Rosario V, Leland P, Adjepong A, Light J, Woollett GR, Hollingdale MR e Azad AF (1988). *Plasmodium falciparum*: ingested anti-sporozoite antibodies affect sporogony in *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Exp. Parasitol.*, **66**(2), 171-182.
- Vaughan JA, Wirtz RA, do Rosario V e Azad AF (1990). Quantitation of antisporozoite immunoglobulins in the hemolymph of *Anopheles stephensi* after bloodfeeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **42**(1), 10-16.
- Vaughan JA, Noden BH e Beier JC (1992). Population dynamics of *Plasmodium falciparum* sporogony in laboratory-infected *Anopheles gambiae*. *J. Parasitol.*, **78**(4), 716-724.
- Vaughan JA, Noden BH e Beier JC (1994). Sporogonic development of cultured *Plasmodium falciparum* in six species of laboratory-reared *Anopheles* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **51**(2), 233-243.
- Vaughan JA (2007). Population dynamics of *Plasmodium* sporogony. *Trends Parasitol.*, **23**(2), 63-70.
- Vizioli J, Bulet P, Hoffmann JA, Kafatos FC, Muller HM e Dimopoulos G (2001). Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**(22), 12630-12635.
- Vlachou D, Lycett G, Siden-Kiamos I, Blass C, Sinden RE e Louis C (2001). *Anopheles gambiae* laminin interacts with the P25 surface protein of *Plasmodium berghei* ookinetes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **112**(2), 229-237.
- Vlachou D, Schlegelmilch T, Christophides GK e Kafatos FC (2005). Functional genomic analysis of midgut epithelial responses in *Anopheles* during *Plasmodium* invasion. *Curr. Biol.*, **15**(13), 1185-1195.
- Vodovotz Y (1997). Control of nitric oxide production by transforming growth factor-beta1: mechanistic insights and potential relevance to human disease. *Nitric. Oxide.*, **1**(1), 3-17.
- Volkman SK, Sabeti PC, DeCaprio D, Neafsey DE, Schaffner SF, Milner DA, Jr., Daily JP, Sarr O, Ndiaye D, Ndir O, Mboup S, Duraisingh MT, Lukens A, Derr A, Stange-Thomann N, Waggoner S, Onofrio R, Ziaugra L, Mauceli E, Gnerre S, Jaffe DB, Zainoun J, Wiegand RC, Birren BW, Hartl DL, Galagan JE, Lander ES e Wirth DF (2007). A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat. Genet.*, **39**(1), 113-119.
- Volz J, Osta MA, Kafatos FC e Muller HM (2005). The roles of two clip domain serine proteases in innate immune responses of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *J. Biol. Chem.*, **280**(48), 40161-40168.
- von Seidlein L, Jawara M, Coleman R, Doherty T, Walraven G e Targett G (2001). Parasitaemia and gametocytaemia after treatment with chloroquine, pyrimethamine/sulfadoxine, and pyrimethamine/sulfadoxine combined with artesunate in young Gambians with uncomplicated malaria. *Trop. Med. Int. Health*, **6**(2), 92-98.
- Wang Q, Fujioka H e Nussenzweig V (2005). Mutational analysis of the GPI-anchor addition sequence from the circumsporozoite protein of *Plasmodium*. *Cell Microbiol.*, **7**(11), 1616-1626.
- Warburg A e Miller LH (1991). Critical Stages in the Development of *Plasmodium* in Mosquitos. *Parasitology Today*, **7**(7), 179-181.
- Warburg A e Schneider I (1993). *In vitro* culture of the mosquito stages of *Plasmodium falciparum*. *Exp. Parasitol.*, **76**(2), 121-126.
- Warr E, Lambrechts L, Koella JC, Bourgooin C e Dimopoulos G (2006). *Anopheles gambiae* immune responses to Sephadex beads: involvement of anti-*Plasmodium* factors in regulating melanization. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **36**(10), 769-778.
- Warr E, Das S, Dong Y e Dimopoulos G (2008). The Gram-negative bacteria-binding protein gene family: its role in the innate immune system of *anopheles gambiae* and in anti-*Plasmodium* defence. *Insect Mol. Biol.*, **17**(1), 39-51.
- Waterhouse RM, Kriventseva EV, Meister S, Xi Z, Alvarez KS, Bartholomay LC, Barillas-Mury C, Bian G, Blandin S, Christensen BM, Dong Y, Jiang H, Kanost MR, Koutsos AC, Levashina EA, Li J, Ligoxygakis P, Maccallum RM, Mayhew GF, Mendes A, Michel K, Osta MA, Paskewitz S, Shin SW, Vlachou D, Wang L, Wei W, Zheng L, Zou Z, Severson DW, Raikhel AS, Kafatos FC, Dimopoulos G, Zdobnov EM e Christophides GK (2007). Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science*, **316**(5832), 1738-1743.

- Weber SM e Levitz SM (2000). Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF-alpha gene expression by a nonlysosomotropic mechanism. *J. Immunol.*, **165**(3), 1534-1540.
- Weber SM, Chen JM e Levitz SM (2002). Inhibition of mitogen-activated protein kinase signaling by chloroquine. *J. Immunol.*, **168**(10), 5303-5309.
- Wengelnik K, Spaccapelo R, Naitza S, Robson KJ, Janse CJ, Bistoni F, Waters AP e Crisanti A (1999). The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *EMBO J.*, **18** (19), 5195-5204.
- Wetzel DM, Hakansson S, Hu K, Roos D e Sibley LD (2003). Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Mol. Biol. Cell*, **14**(2), 396-406.
- WHO (2005d). Frequently asked questions on DDT use for disease vector control. WHO/HTM/RBM/2004.54.
- WHO (2005a). World malaria report. WHO/HTM/MAL/2005.1102.
- WHO (2005c). Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring: 1996-2004. WHO/HTM/MAL/2005.1103.
- WHO (2005b). Malaria and HIV interactions and their implication for public health policy. Report of a Technical Consultation Geneva, Switzerland, 23-25 June 2004.
- WHO (2006b). Malaria vector control and personal protection: report of a WHO study group. WHO technical report series; no. 936.
- WHO (2006a). Guidelines for the treatment of malaria. WHO/HTM/MAL/2006.1108.
- Wills-Karp M (2007). Complement activation pathways: a bridge between innate and adaptive immune responses in asthma. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, **4**(3), 247-251.
- Wiser MF, Jennings GJ, Uparanukraw P, van Belkum A, van Doorn LJ e Kumar N (1996). Further characterization of a 58 kDa *Plasmodium berghei* phosphoprotein as a cochaperone. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **83**(1), 25-33.
- Wu Y, Sifri CD, Lei HH, Su XZ e Wellems TE (1995). Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**(4), 973-977.
- Yoshimoto T, Yoneto T, Waki S e Nariuchi H (1998). Interleukin-12-dependent mechanisms in the clearance of blood-stage murine malaria parasite *Plasmodium berghei* XAT, an attenuated variant of *P. berghei* NK65. *J Infect. Dis.*, **177**(6), 1674-1681.
- Yuda M, Sakaida H e Chinzei Y (1999). Targeted disruption of the *plasmodium berghei* CTRP gene reveals its essential role in malaria infection of the vector mosquito. *J. Exp. Med.*, **190**(11), 1711-1716.
- Zdobnov EM, von Mering C, Letunic I, Torrents D, Suyama M, Copley RR, Christophides GK, Thomasova D, Holt RA, Subramanian GM, Mueller HM, Dimopoulos G, Law JH, Wells MA, Birney E, Charlab R, Halpern AL, Kokoza E, Kraft CL, Lai Z, Lewis S, Louis C, Barillas-Mury C, Nusskern D, Rubin GM, Salzberg SL, Sutton GG, Topalis P, Wides R, Wincker P, Yandell M, Collins FH, Ribeiro J, Gelbart WM, Kafatos FC e Bork P (2002). Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science*, **298**(5591), 149-159.
- Zieler H, Keister DB, Dvorak JA e Ribeiro JM (2001). A snake venom phospholipase A(2) blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *J Exp. Biol.*, **204**(Pt 23), 4157-4167.



# Anexos

---





## Consentimiento Informado para inclusión en los estudios “Infecciones simples y mixtas de *Plasmodium* sp. en mosquitos *Anopheles*: Dinámica de transmisión y evasión inmune.”

### Propósito del estudio

La malaria mata más de 1 millón de personas por año en el mundo, principalmente niños. Para el desarrollo de nuevos métodos de control de malaria, es esencial el conocimiento de su comportamiento en la comunidad. Para esto, necesitamos información y muestras sanguíneas de algunos individuos de esta comunidad.

El Centro internacional de Vacunas/Universidad del Valle en colaboración con lo CMDT/IHMT/Universidade Nova de Lisboa están realizando una investigación con el fin de estudiar la dinámica de las infecciones mixtas y la evasión inmune de *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* en *Anopheles albimanus*.

Esta investigación permitirá un mayor conocimiento de los mecanismos de desarrollo del parásito, lo que en el futuro podría contribuir para la investigación de métodos de control más eficientes contra la malaria.

### ¿Qué pasará durante el estudio?

Queremos solicitarle muy comedidamente nos autorice la toma de 20 ml de sangre, la cual será tomada por una persona debidamente entrenada y autorizada para este fin.

La muestra de sangre será dividida en dos fracciones: una de ellas se usará para realizar experimentos con el mosquito vector y la otra fracción se usará para llevar a cabo estudios inmunológicos y genéticos relacionados con el parásito.

### Riesgos y beneficios

Si usted decide participar, deberá tener presente la siguiente información:

- La toma de las muestras de sangre en el antebrazo causan un dolor leve.
- Las muestras de sangre se tomarán luego de limpiar adecuadamente la zona con alcohol antiséptico. Para el sangrado se utilizarán agujas y jeringas nuevas, estériles y desechables con el fin de evitar infecciones cumpliendo con normas de bio-seguridad de laboratorio.
- Antes del procedimiento, usted deberá responder a las preguntas consignadas en la encuesta que se adjuntan, relacionadas con la malaria.
- La sangre restante de estos estudios será almacenada en laboratorio podría ser utilizada en estudios inmunológicos y genéticos.

### Derechos

Si usted decide participar, tiene los siguientes derechos:

- Los registros que lo puedan identificar serán mantenidos confidencialmente de acuerdo a las leyes colombianas y a las buenas prácticas clínicas en investigación.
- Su participación en esta investigación es completamente voluntaria.

Con su firma Usted certifica que ha leído o alguien le ha leído el presente formato de consentimiento informado y que le han sido resueltas todas sus preguntas satisfactoriamente y además que acepta voluntariamente participar en el estudio denominado: “Infecciones simples y mixtas de *Plasmodium* sp. en mosquitos *Anopheles*: Dinámica de transmisión y evasión inmune.”

---

Lugar y fecha

---

Nombre del voluntario  
Cédula

---

Firma/huella

---

Nombre del testigo I  
Cédula

---

Firma

---

Nombre del testigo II  
Cédula

---

Firma

# *Plasmodium yoelii*: The effect of second blood meal and anti-sporozoite antibodies on development and gene expression in the mosquito vector, *Anopheles stephensi*

L.F. Lopes\*, P. Abrantes, A.P. Silva, V.E. doRosario, H. Silveira

Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa,  
Rua da Junqueira 96, 1349-008 Lisboa, Portugal

Received 19 May 2006; received in revised form 2 August 2006; accepted 8 September 2006  
Available online 2 November 2006

## Abstract

The sporogonic development of the malaria parasite takes place in the mosquito and a wide range of factors modulates it. Among those, the contents of the blood meal can influence the parasite development directly or indirectly through the mosquito response to the infection. We have studied the effect of a second blood meal in previously infected mosquitoes and the effect of anti-sporozoite immune serum on parasite development and mosquito response to the infection. The prevalence and intensity of infection and gene expression of both *Plasmodium yoelii* and *Anopheles stephensi* was analyzed. We verified that a second blood meal and its immune status interfere with parasite development and with *Plasmodium* and mosquito gene expression.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Index Descriptors and Abbreviations:** Malaria; Apicomplexa; *Plasmodium yoelii*; Immune serum; Sporogonic development; *Anopheles stephensi*; DNA, deoxyribonucleic acid; RNA, ribonucleic acid; tRNA, transport RNA; QT-PCR, quantitative real time PCR analysis; DDRT-PCR, differential display reverse transcriptase PCR; IFA, indirect fluorescent antibody; IgG, immunoglobulin G; CS, circumsporozoite protein; DTT, dithiothreitol; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; RFLP, restriction fragment length polymorphism; PCR, polymerase chain reaction; IHMT, Instituto de Higiene e Medicina Tropical; PABA, 4-aminobenzoic acid; IFN- $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; NO, nitric oxide; TGF- $\beta$ 1, Tumor necrosis factor  $\beta$  one;  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]dATP, deoxyadenosine, 5'-[ $\alpha$ ,  $^{32}$ P] triphosphate; MMLV-RT, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase

## 1. Introduction

Malaria is a disease caused by a parasite of the *Plasmodium* genus that is transmitted by a mosquito. The sporogonic cycle takes place when a female mosquito feeds on infective blood. This infective blood meal is a complex mixture and its composition can determine the outcome of infection. Constituents of the blood meal such as molecules of the vertebrate immune system, anti-malarial metabolites and the presence of other parasite species or genotypes can affect the development of the *Plasmodium* in the mosquito.

The vertebrate host can produce an immune response that is capable of blocking *Plasmodium* transmission to the

mosquito. Transmission blocking immunity was observed in several studies using blood or serum from immune individuals (Roeffen et al., 1995; Mulder et al., 1999; Boudin et al., 2004; Li et al., 2004), anti-*Plasmodium* antibodies or anti-mosquito antibodies (Peiris et al., 1988; Ranawaka et al., 1988; Snewin et al., 1995; Egan et al., 1999; Gulia et al., 2002; Dinglasan et al., 2003; Suneja et al., 2003; Tsu-boi et al., 2003; Malkin et al., 2005).

Anti-*Plasmodium* antibodies, which are produced by the vertebrate host, can be present in an initial infective blood meal as well as in subsequent blood meals taken by the mosquito. These antibodies cross the midgut epithelia and can be detected in the hemolymph of *Anopheles* mosquitoes (Vaughan and Azad, 1988; Vaughan et al., 1990; Beier et al., 1989). After blood feeding, anti-CS antibodies were detected in the hemolymph up to 24 h in *Anopheles*

\* Corresponding author. Fax: +351 21 362 24 58.  
E-mail address: [filipe@ihmt.unl.pt](mailto:filipe@ihmt.unl.pt) (L.F. Lopes).

*stephensi* (Vaughan and Azad, 1988; Vaughan et al., 1990) and up to 36 h in *Anopheles gambiae*, further these antibodies can also be detected 3 days later, bound to sporozoites (Beier et al., 1989).

However, transmission blocking by antibodies seems to be dose-dependent and the opposite effect has been described when antibodies in low quantity were used. Vaughan et al. (1988) observed that when infected mosquitoes were membrane fed with anti-sporozoite serum, the number of sporozoites recovered from the salivary glands was higher. It was also shown that anti-*Plasmodium* antibodies that could suppress the infection of *Plasmodium vivax* to the mosquito have the opposite effect at low concentration (Peiris et al., 1988), this was also observed with diluted serum of immune individuals in infections with *P. vivax* (Gamage-Mendis et al., 1992) and *Plasmodium falciparum* (Graves et al., 1988). Natural antibodies and vaccine-induced antibodies that can be important for the individual malaria immune response and even transmission blocking can thus have an unwanted enhancing effect, which could have a major impact on malaria control in endemic regions, and could have implications in the implementation of a vaccine.

With this work, we aimed to identify molecular mechanisms by which sequential blood feedings and the presence of serum with high antibody titres alter *Plasmodium* sporogonic development. To do so we used the differential display (DDRT-PCR) method in order to identify genes (Schroeder et al., 1999), of both *Plasmodium* and *Anopheles*, whose expression was affected by the presence of immune serum with anti-sporozoite antibodies. The identification of such genes could help explain differences in development and the molecular mechanism underlying infectivity alterations.

We showed that a second blood meal caused an increase of oocyst number and that when the immune serum was present in the second blood meal the number of oocysts detected was lower. We have identified several transcripts that were differentially displayed when the mosquitoes received a second blood meal with or without immune serum.

## 2. Material and methods

### 2.1. Mosquito rearing and infection

*Anopheles stephensi* were reared at 25 °C, 65% humidity, with a 12-h light/dark cycle. Adults were maintained on 10% glucose and 0.5% PABA solution and females were blood-fed on anesthetized rats.

Adult mosquitoes were infected with *Plasmodium yoelii yoelii* 17XL by direct bite in infected CD1 mice. Non-fed mosquitoes were discarded. CD1 mice infections were obtained by intraperitoneal inoculation of  $10^7$  *P. yoelii* parasitized red blood cells per milliliter. The course of infection was determined by Giemsa-stained blood films prepared from tail blood. When the parasitaemia reached 10–20% and exflagellation was observed, mice were used

to infect mosquitoes. CD1 mice, 5–8 weeks old were purchased from IHMT and kept in the IHMT animal facilities, according to the European Union requirements (86/609/CEE) recognised in Portuguese law (DR DL129/92 and Portaria 1005/92). *P. yoelii yoelii* 17XL was obtained from the Institute of Cell, Animal and Population Biology, University of Edinburgh and maintained by continuous blood passage.

### 2.2. Immune serum production

Rats were subject to infectious bites of *A. stephensi* mosquitoes infected with *P. yoelii yoelii*. The onset of infected erythrocytes in the peripheral blood was monitored by blood smears. Once parasites became patent rats were treated for three days with 20 mg/kg pirimetamine. The same protocol was repeated at least two more times. Peripheral blood was collected by cardiac puncture after the last infection was cleared. The blood was clothed for 30 min on ice, centrifuged and the serum recovered. Anti-sporozoite titre was determined by IFA using fixed sporozoites as antigen and anti-rat IgG conjugated with fluorescein as a secondary antibody for fluorescence.

### 2.3. Second blood meal of infected mosquitoes

Three days post-infection these mosquitoes were subdivided in four groups, from which three were membrane fed according to the following: group 1—fed with naive rat blood; group 2—fed with blood in which plasma was replaced with immune anti-sporozoite rat serum (titre 1:8000 by IFA); group 3—fed with blood in which half of the plasma was replaced with the same volume of the immune anti-sporozoite serum used to feed group 2. Non-fed mosquitoes were discarded. The fourth group was kept as non-fed control (did not receive a second blood meal).

Midguts from each of the four groups were collected two days after the second blood meal (fifth day post-infection) for RNA extraction. At day eight post-infection this procedure was repeated. At the eighth day post-infection midguts were also collected to assess infection rate and determination of infection intensity (oocyst load = number of oocysts per infected midgut). Material was collected 48 h post-second blood meal since at that time the presence of antibodies can no longer be detected in the hemolymph (Vaughan et al., 1990).

### 2.4. RNA extraction

Total cellular RNA was prepared from infected midguts using Trizol (Invitrogen Life Technologies, Spain) according to manufacturer's instructions. RNA was then treated with DNaseI (Promega, France) at 1 U/ $\mu$ g RNA to remove potential chromosomal DNA contamination, further purification was performed by phenol/chloroform method (Abrantes et al., 2005).

### 2.5. Reverse transcription

Total RNA (0.4 µg) was used for reverse transcription in a reaction volume of 20 µl, containing first strand buffer (25 mM Tris–HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM DTT); 10 µM dNTPs; 0.2 µM oligo-d(T)<sub>15</sub> (Roche Molecular Biochemicals, Portugal) or three different anchored oligo-d(T)s (H-T<sub>11</sub>A, H-T<sub>11</sub>G, H-T<sub>11</sub>C) from the GenHunter RNAimage kit (GenHunter, USA) (Table 2) and 100 U MMLV reverse transcriptase (Promega).

### 2.6. DDRT-PCR using radioactive labelling

Complementary DNA was used for PCR amplification, using a radioactive labelling PCR reaction, in a final volume of 10 µl, containing 75 mM Tris–HCl, pH 8.8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.01% Tween 20; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 µM dNTPs; and 0.2 µM of each of the anchored oligo-d(T) previously used for cDNA synthesis, combined with a 13 nucleotide-long primer arranged in several combinations (from the GenHunter RNAimage kit, see Table 1); 1 µl (0.037 MBq) of α-[<sup>32</sup>P]dATP (Amersham Biosciences, Portugal); 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas, Germany). The PCR products were separated by electrophoresis in an acrylamide:bis-acrylamide (19:1) 6% sequencing gel. The gel was then dried and the bands visualised by overnight exposure, at –70 °C, to X-ray film (KODAK). Differential displayed bands were excised from the gel and re-amplified.

### 2.7. Non-radioactive DDRT-PCR

Complementary DNA produced using oligo-d(T)<sub>15</sub> was used for PCR amplification, in a final volume of 25 µl, containing 75 mM Tris–HCl, pH 8.8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.01% Tween 20; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 µM dNTPs; 2 µM of oligo-d(T)<sub>15</sub>, and a 13 bp-long primer from the RNAimage kit (GenHunter); 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas). The PCR product was visualized in a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide. Differential displayed bands were excised. The DNA was isolated from the agarose and was reamplified by PCR.

### 2.8. DNA reamplification and cleanup

The 109 DNA fragments obtained from differential displayed bands were reamplified, using 4 µl of sample, in a final volume of 25 µl, containing 75 mM Tris–HCl pH 8.8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.01% Tween 20; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 µM dNTPs; 2 µM of primers that were previously used to obtain these bands; 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas). The PCR product was then cloned in a TA vector.

### 2.9. cDNA cloning

Thirty re-amplified cDNA fragments were cloned into either pGEM-T vector (Promega) or pCRII vector (Invitrogen, San Diego, CA) according to manufacturer's instruc-

Table 1  
Mosquito infection rate

Treatment	Percentage of infected mosquitoes (number of analyzed mosquitoes)
NF	93.01 (143)
C	95.92 (98)
IS	83.04 (112)*
DIS	84.78 (92)*

Data represents a pool of five independent experiments. NF, mosquitoes that did not receive a second blood meal after infection; C, control, mosquitoes that received a second blood meal of naïve blood, at day three post-infection; IS, mosquitoes that received a second blood meal of blood containing serum with high titre of anti-*P. yoelii* sporozoite antibodies, at day three post-infection; DIS, mosquitoes that received a second blood meal of blood containing serum with high titre of antibodies diluted 1:1 with naïve plasma, at day three post-infection.

\* Statistically significant differences with the non-fed and control groups (Fisher's exact test).

Table 2  
Number of bands isolated with DDRT-PCR using different primer sets

Primer pair (primer sequence)	No. of bands
H-T <sub>11</sub> A(AAGCTTTTTTTTTTTA) + H-AP17(AAGCTTACCAGGT)	7
H-T <sub>11</sub> A(AAGCTTTTTTTTTTTA) + H-AP18(AAGCTTAGAGGCA)	3
H-T <sub>11</sub> A(AAGCTTTTTTTTTTTA) + H-AP19(AAGCTTATCGCTC)	17
H-T <sub>11</sub> G(AAGCTTTTTTTTTTTG) + H-AP17(AAGCTTACCAGGT)	12
H-T <sub>11</sub> G(AAGCTTTTTTTTTTTG) + H-AP18(AAGCTTAGAGGCA)	59
H-T <sub>11</sub> G(AAGCTTTTTTTTTTTA) + H-AP20(AAGCTTGTGTGC)	11
H-T <sub>11</sub> G(AAGCTTTTTTTTTTTA) + H-AP21(AAGCTTCTCTGG)	9
H-T <sub>11</sub> A(AAGCTTTTTTTTTTTG) + H-AP22(AAGCTTTGATCC)	3
Oligo-d(T) <sub>15</sub> + H-AP22(AAGCTTTGATCC)	4
Total	125

tions. The plasmids were then recovered using QIAprep Miniprep kit (Qiagen, Germany) according to manufacturer's instructions. A subset of clones was sequenced (Macrogen, Korea) using M13 primers. To differentiate possible different clones in the same plate, a PCR amplification was done followed by RFLP analysis, using the restriction enzymes *RsaI* and *MspI* (Roche Molecular Biochemicals).

### 2.10. Dot-blot hybridization

In order to determine whether the DNA was from *Anopheles* or *Plasmodium* origin, cloned fragments were immobilized into a nylon membrane and then hybridized with probes produced from whole *A. stephensi* and *P. yoelii yoelii* genomic DNA. The genomic DNA was digested with *RsaI* and was then used to synthesise probes, using the DIG High-Prime kit (Roche Molecular Biochemicals) according to kit instructions.

### 2.11. Sequence analysis

From the set of clones obtained 21 were sequenced. Sequencing was performed by Macrogen (Korea). The sequences obtained were compared with published sequences at Ensembl and TIGR databases using BLASTN and tBLASTX.

### 2.12. Differential expression confirmation

Differential expression of the identified genes was verified by quantitative real-time PCR (QT-PCR), using samples collected at day 5 or eight post-infection, according to the day the differential expression had been visualized by DDRT-PCR. Complementary DNAs from at least three independent experiments were used for QT-PCR. Lactate dehydrogenase (*ldh*) and ribosomal protein S7 genes were used as internal control for *P. yoelii yoelii* and *A. stephensi*, respectively. Real-time PCR was carried out using the qPCR core kit for SYBR Green (Eurogentec, Belgium) using a Gene Amp 5700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Portugal). Final concentrations of reagents were 1× reaction buffer containing ROX, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTP's, 0.3 μM of primer concentrations, 0.025 U/μl of Hot GoldStar enzyme and 1/66,000 of Sybr green for a final volume of 20 μl. One microliter of cDNA was used as template. Cycle conditions were: an initial denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The primers used for the internal controls: S7 As fwd-CGGCTGGTGCCTGAATTGG; S7 As rev-GCGGTCTTCTGCTTGTGG; LDH Py fwd-CCAGGAAAAGTGACAAAGAATG; LDH Py rev-AAA CACCACCTAATCCAACAATC. The primers used to study the expression of the several identified genes were designed using the obtained sequence: Py1 fwd-ATTTCC ATTTTGTTTTATCTATTG; Py1 rev-TATTCCACCCA TTTAAAGCGTCTG; Py2 fwd-AGTGCCGGAGCTGG ATTCTGTATGG; Py2 rev-CGGGCATACCTCCTGG CATAAC; As1 fwd-AGTGCCGGAGCTGGATTCTGT A TGG; As1 rev-CTGAAGTAGCCGACGTCGATGAAA AC; As4 fwd-CACGCGTGCAGCCAGAACATC; As4 rev-CCGATAACGAACGCGACTCAAACAA; As5 fwd-GCGCTGCTGGCCGAGTTGAA; As5 rev-CCGCTTT GGCAGTGGAGGAGTAGTT; As6 fwd-CGGCGTTC GAGGTGATTACA; As6 rev-CAGCGGGCAGGGTGA TTT; As7 fwd-TCCGGGGCGAGAACATC; As7 rev-AC CATCCAGCGCCTTATCCAGTA; As8 fwd-CGCTAA GCCGAAATGAG; As8 rev-GAATAGGACGCGAGCA AACTG; As9 fwd-GCGAGCTCTGCGTGAAGGGATT GA; As9 rev-CCGCCAGCCGCACCGTTTTTA; As10 fwd-GCCGGAGATATTGAGGGTTTGTGC; As10 rev-CATGGTCCCAGGCGGTATTTTTGT.

### 2.13. Statistical analysis

Fisher's exact test (<http://www.matforsk.no/ola/fisher.htm>) was used to compare mosquito infection rates on data

pooled from five independent experiments. Infection intensity (number of oocysts/midgut) and levels of expression were compared for each experiment with the Kruskal–Wallis test using SPSS v 13.0 for Windows (SPSS, Inc.), followed by multiple-comparison test. Statistical significant differences were considered for  $p < 0.05$ . For infection intensity it was only considered experiments that had at least 10 individual in each group.

## 3. Results

### 3.1. Effect of blood meal in mosquito infection

To evaluate the effect of the blood meal composition in the infection, mosquitoes were dissected at day eight post-infection and the oocysts counted. Infection rates were higher in control (naïve serum blood meal) group when compared to the immune serum blood fed groups, diluted or undiluted ( $p = 0.003$ ,  $p = 0.012$ ) (Table 1).

The infection intensity was higher in mosquitoes that had a second naïve blood meal when compared with non-fed controls and or immune-serum-blood meal (Fig. 1). The median number of oocysts was lower in all experiments performed, when infected mosquitoes had a second blood meal containing undiluted immune serum.

### 3.2. Differential display analysis and sequence analysis

In order to identify possible mechanisms behind the alterations of the infection in the mosquitoes, due to the second blood meal with or without immune serum, we used DDRT-PCR to analyse expression at the fifth and eighth day post-infection. Using DDRT-PCR, 125 bands were recovered and re-amplified (Table 2), out of which 30 bands were cloned. Plasmids were obtained from 117 colonies and were differentiated by double digestion with restriction enzymes *RsaI* and *MspI*. From these, 21 clones were selected and sequenced (Table 3).

The obtained sequences were submitted to BLAST searches in order to identify homologues or assign putative function, by comparison with previously annotated sequences (Table 3).

Four fragments were identified as being of *P. yoelii yoelii* origin, both being more expressed in the control group (mosquitoes fed on naïve blood) at the fifth day post-infection. After alignment, these four samples corresponded to only two different sequences. The BLAST analysis (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) of these sequences identified the genes cytochrome C oxidase subunit 1 (*ccoxs1*) and heatshock related protein (*hrp*) (Table 3).

Sequence analysis and BLAST searches performed against *A. gambiae* databases (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>) identified 11 different mosquito sequences, from the 17 samples that were not of *Plasmodium* origin (Table 3).

Four of the sequences were found to be similar to the clone G15 submitted by Dimopoulos (GenBank Accession

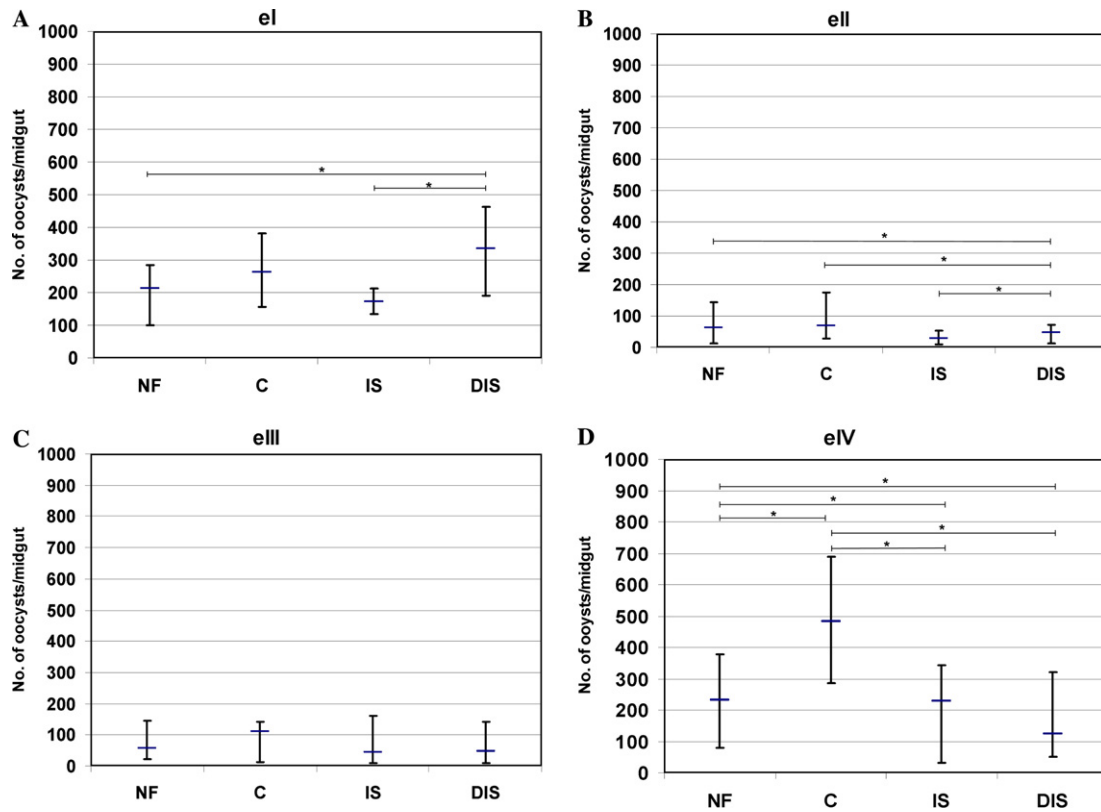


Fig. 1. Effect of anti-*Plasmodium* immune serum on *A. stephensi* midgut oocyst load. Data represents the median, upper and lower quartile of oocyst counts of four independent experiments (eI, eII, eIII, and eIV). \*Statistically significant differences. NF, mosquitoes that did not receive a second blood meal after infection; C, control, mosquitoes that received a second blood meal of naïve blood, at day three post-infection; IS, mosquitoes that received a second blood meal of blood containing serum with high titre of anti-*Plasmodium yoelii* sporozoite antibodies, at day three post-infection; DIS, mosquitoes that received a second blood meal of blood containing serum with high titre of antibodies diluted 1:1 with naïve plasma, at day three post-infection. (A) experiment I, (B) II, (C) III and (D) IV.

No. Z699567), that contained an ALU-like repetitive sequence warning (Claverie and Makalowski, 1994) and were not considered for further analysis.

According to the differential display results the As1 was more expressed at the fifth day post infection in the control group, and is homologue to an *A. gambiae* trypsin precursor. The As2 (showed very weak similarity to a  $K^+$  channel with a Myb binding domain), the As3 (weak sequence identity to a *A. gambiae* Na/K ATPase-dependent channel) and the As6 (similar to the maltase gene *agm-1*) were more expressed at day five post infection, in the group of mosquitoes that were fed on blood containing undiluted immune serum. The As5 sequence was similar to a cell cycle control protein and was more expressed at the fifth day post-infection in the group fed with diluted immune serum.

Three sequences were found to be similar (As4) and corresponded to a ribosomal protein (60S ribosomal L26), the expression of this gene was enhanced at day five post-infection due to treatment with undiluted immune serum and at eight day post-infection due to treatment with diluted or undiluted immune serum.

The As7 gene sequence is highly similar to an *A. gambiae* gene annotated as ambiguous, with unknown function, and in this experiment was less expressed, at the eight day post-infection, in the groups that received a sec-

ond blood meal. The As8 corresponded to a component of the spliceosome (*spc22*) in *A. gambiae* and was up-regulated at the eight day post-infection in the unfed and control groups. The sequence of the As9 gene was similar to an *A. gambiae* ribosomal protein (40S ribosomal S25) and was more expressed at the eight day post-infection in the control (fed on naïve blood). The sequence of As10 was homologous to a serine protease precursor and was over expressed at the eight day post-infection after feeding in blood with diluted and undiluted immune serum. Finally, the As11 sequence was highly similar to an *A. gambiae* gene annotated as ambiguous, but that contains several identified domains (InterPro Nos. IPR004365, OB-fold tRNA; IPR004364, tRNA-synt\_2; IPR002312; tRNA-synth\_asp; and IPR006195, tRNA\_ligase\_2) suggesting that it is involved in the protein production machinery at the level of the tRNA.

### 3.3. Real-time quantitative PCR analysis

To confirm the results obtained by the DDRT-PCR method we analysed their expression by real-time quantitative PCR, in at least three independent experiments. Statistically significant differences were only observed in some of the genes and are indicated in Figs. 2 and 3.

Table 3  
Results of the BLAST analysis performed with the sequences obtained from the differentially displayed bands

Reference name	Number of clones	Differential expression day	Putative function/description	
			<i>Plasmodium yoelii</i> database	GenBank Accession No. Score (e-value)
Py1	2	D5	Cytochrome C oxidase subunit 1 ( <i>ccoxs1</i> )	AABL01000208.1 3787(1.7e–166)
Py2	2	D5	58 kDa Phosphoprotein (heatshock related protein) ( <i>hrp</i> )	AABL01000112.1 2031 (5.9e–87)
			<i>Anopheles gambiae</i> database homologue (Ensembl)	Ensembl Accession No. Score (e-value)
As1	1	D5	Trypsin precursor	ENSANGP00000021065 1975 (4.8e–84)
As2	1	D5	K + channel_pore. Myb DNA-binding domain	ENSANGP00000017598 155 (0.23)
As3	1	D5	Na/K_ATPase_beta	ENSANGP00000022705 141 (1.1e–11)
As4	3	D5 and D8	60S Ribosomal L26	ENSANGP00000022122 1517 (4.0e–64)
As5	1	D5	Cwf15/Cwc15 cell cycle control protein	ENSANGP00000016945 1485 (1.7e–62)
As6	1	D5	Maltase-like protein AGM1	ENSANGP00000011672 1339 (9.3e–56)
As7	1	D8	Ambiguous	ENSANGP00000022242 1698 (1.0e–71)
As8	1	D8	Microsomal signal peptidase SPC22	ENSANGP00000018480 2432 (1.8e–39)
As9	1	D8	40S Ribosomal S25	ENSANGP00000017618 906 (3.4e–36)
As10	1	D8	Serine protease precursor	ENSANGP00000013861 1906 (8.4e–82)
As11	1	D8	Ambiguous*	ENSANGP00000018448 1531 (6.6e–65)
			Other	GenBank Accession No. Score (e-value)
	4		ALU type repetitive sequence <sup>a</sup>	Z69957 611 (3.1e–22)

<sup>a</sup> Similar to clone G15 isolated by differential display by Dimopoulos, contains a ALU-like repetitive sequence alert (Claverie and Makalowski, 1994).

\* Contains the InterPro domains: IPR004365 (OB-fold tRNA); IPR004364 (tRNA-synt\_2); IPR002312 (tRNA-synt\_asp); IPR006195 (tRNA\_ligase\_II).

The two *Plasmodium* genes studied had similar expression patterns at the fifth day post-infection. For both genes the expression was higher in the non-fed and diluted immune serum fed groups (NF and DIS), when comparing to the control and the immune serum groups (C and IS). For the *ccoxs1* there were no significant differences, however for the *hrp* gene showed significant differences between treatments (Fig. 2).

For the mosquito genes analysed, a general trend was observed where the second blood meal in naïve blood resulted in similar or increased expression when compared to the non-fed group (Fig. 3). In some cases, the expression increment was further enhanced or reverted by the presence of immune serum in the second blood meal. The expression of the genes As2, As3, and As11 was not analysed by QT-PCR and the expression of As4 was analysed only for the eight day post-infection time point as at this time point it was differentially expressed by DDRT-PCR.

The expression of the As1 gene was higher in the control compared to the non-fed group. The presence, in the second blood meal, of immune serum enhanced this effect and the presence of diluted immune serum had an opposite effect.

The expression of the As4 gene was higher at the control group, being the difference between the control and the diluted immune serum fed groups statistically significant.

The As5 gene expression was up-regulated by the presence of immune serum in a quantity-dependent manner. This gene was 4.94 times more expressed in the group fed with undiluted immune serum when compared to the control group.

The QT-PCR analysis of the As6 showed 6.41 to 7.27-fold increases of expression in all groups that received a second blood meal when compared to the non-fed group, regardless of the immune status of the blood meal, being these differences significant.

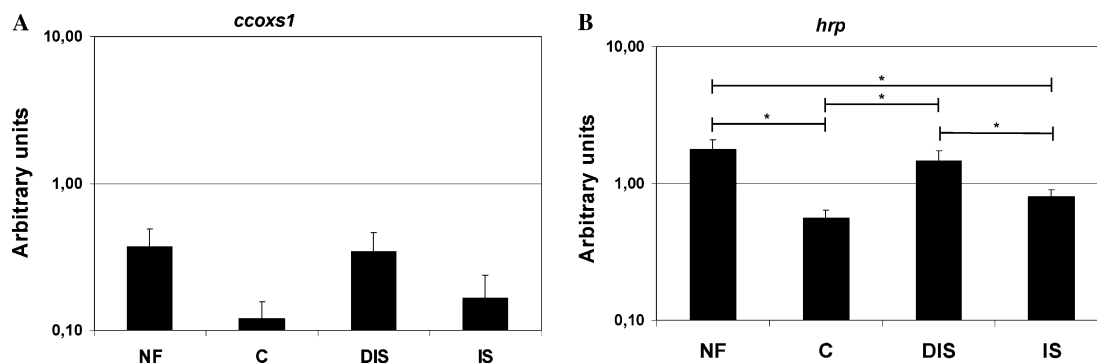


Fig. 2. Expression profiles by QT-PCR of *P. yoelii* genes isolated by DDRT-PCR. \*Statistically significant differences. The values represent the mean and standard error of at least three independent experiments. C, control; second blood meal on naïve blood; DIS, second blood meal containing diluted immune serum; IS, second blood meal containing immune serum; NF, did not had a second blood meal. (A) Gene *ccoxs1* (B) *hrp*.

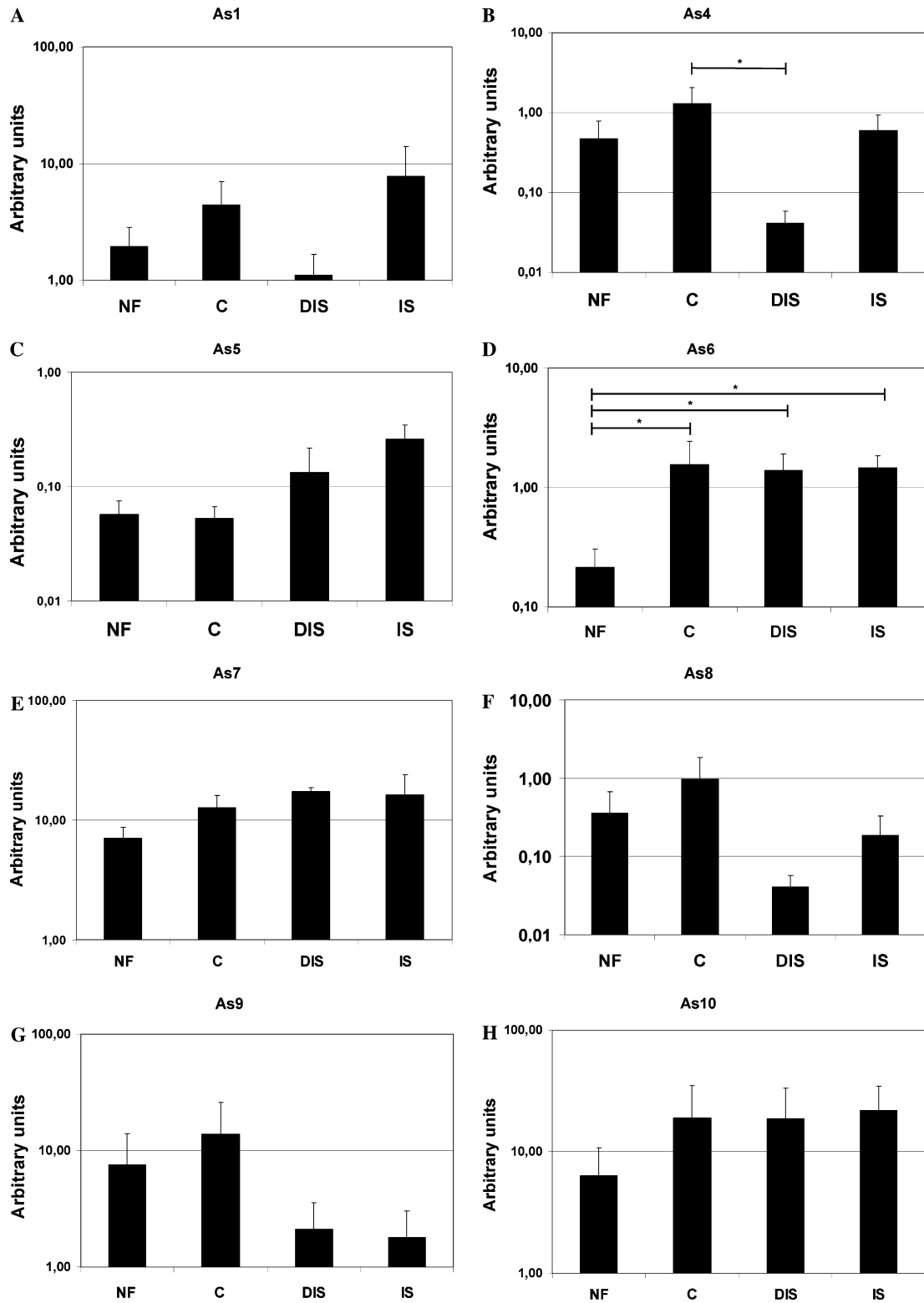


Fig. 3. Expression profiles by QT-PCR of *A. stephensi* genes isolated by DDRT-PCR. \*Statistically significant differences. The values represent the mean and standard error of at least three independent experiments. C, control; second blood meal on naïve blood; DIS, second blood meal containing diluted immune serum; IS, second blood meal containing immune serum, NF- did not had a second blood meal. (A) Gene *As1*, (B) *As4*, (C) *As5*, (D) *As6*, (E) *As7*, (F) *As8*, (G) *As9*, and (H) *As10*.

The expression of the *As7* showed only a slight increase due to a second blood meal (maximum fold increase of the diluted immune serum group compared to the non fed group).

The QT-PCR analysis of the *As8* gene displayed an up-regulation in the control at the eight day post-infection compared to the non fed group (2.72-fold

increase), the presence of immune serum in the second blood meal have modified this pattern causing a decrease of expression.

The expression of the As9 was slightly increased in the control group in relation to all the other groups, as observed by the DDRT-PCR method. This difference was higher when compared to the experimental groups that were fed with blood containing immune serum, being their expression 6.51 and 7.65 times lower in the groups receiving diluted and undiluted immune serum blood fed, respectively.

Finally the analysis by QT-PCR of the As10 gene, showed higher expression in the groups that received a second blood meal, being the fold increases in relation to the non fed group between 2.95 and 3.95.

The presence of vertebrate immune factors in the blood meal had an impact on infectivity of *P. yoelii* to the mosquito and influenced the expression of some genes that were isolated by DDRT-PCR.

#### 4. Discussion

The blood meal is a complex mixture containing several constituents of vertebrate host origin that have been shown to influence the sporogonic development of the malaria parasite and modulate the infection outcome. Some components of the vertebrate immunity can display from transmission blocking to infection enhancement properties. The mechanism of action by which the immune serum displays these characteristics is very complex due to the interaction of several factors from the vertebrate host, the parasite and the mosquito.

The immune status of the vertebrate host can vary, altering the outcome of the infection in the mosquito. The presence of vertebrate immune factors on this second blood meal have not been paid much attention and some contradictory data has been published on the effect of antibodies in a second blood meal on the outcome of the infection (Vaughan et al., 1988; Beier et al., 1989; doRosario et al., 1989), this probably being a consequence of different methodologies used, like the mosquito/*Plasmodium* species combination or antibody/immune sera used.

There was a statistically significant reduction in the infection rate in mosquitoes that received a second blood meal with immune serum, which might mean that immune serum could affect the oocyst development. Oocyst load was higher in the mosquitoes that were membrane fed at the third day post-infection with naïve blood. This was also observed by Beier et al. (1989) that reported that a second blood feeding leads to a faster maturation of the oocysts. This is probably due to the higher availability of nutrients but other hypothesis could explain the higher number of oocysts like the diversion of energy from the immune response against *Plasmodium* to other physiological processes like digestion and protein production for egg development. This observation has implications in the life history of the

parasite/mosquito since during their adult life female mosquitoes take several blood meals that can alter infection outcome in the mosquito.

The oocyst load was higher in the group that received a second blood meal but this effect was blocked when the blood meal contained rat immune serum. This was still observed, though less evident, even when the immune serum was diluted with an equal quantity of naïve plasma. The immune serum had high titres of anti-sporozoite antibodies and only a 1:1 dilution was used, so we cannot compare this work with others that have reported infection enhancement due to low quantity of immune serum or antibodies. In addition to the effect of antibodies, several other components of the serum in the infective blood meal have been related to transmission blocking, such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and NO that affect mostly the transmission capacity of gametocytes (Naotunne et al., 1991; Karunaweera et al., 1992; Cao et al., 1998) and also complement and cells of the immune system in the blood meal (Tsuboi et al., 1995; Healer et al., 1997; Lensen et al., 1997). The cytokine TGF- $\beta$ 1 was also shown to modulate mosquito immunity to bacteria and *Plasmodium* (Luckhart et al., 2003).

Our experiments did not yield enough mosquitoes to follow the infection until salivary gland invasion, therefore it was not possible to verify if this lower oocyst load corresponded to lower sporozoite numbers in the salivary glands or if their infectivity to the vertebrate host was altered. A linear relationship has been shown between the number of oocysts and sporozoites produced (Gamage-Mendis et al., 1993; Vaughan et al., 1992). However, Vaughan et al. (1988) reported that when exposed to rat anti-sporozoite immune sera, at the fifth day of infection, there was an increase of sporozoite production in the oocyst and sporozoites were more infective to cultured hepatoma cells. Their results were based on low number of counts and similar effect was not observed by Beier et al. (1989) when immune serum was fed to mosquitoes at day 10 post-infection. The differences observed in different studies, implies that to fully assess transmission blocking properties of immune sera, it is fundamental to study the full sporogonic cycle and transmission to vertebrate host.

To better understand how the second blood meal, with or without immune serum, affects the parasite development in the mosquitoes, we set to isolate parasite and host genes that could be involved in this phenomenon using DDRT-PCR. Most of the obtained fragments, by DDRT-PCR, were from mosquito origin, which was expected since the *Anopheles/Plasmodium* tissue ratio used for RNA extraction was very high and no enrichment method was used.

Two *P. yoelii* genes were isolated by this method: *ccoxs1* and *hrp*. The sequence of the *hrp* gene shares 95% identity with a 58 kDa *Plasmodium berghei* phosphoprotein that was identified as a cochaperone able to interact with HSP70 to assist in the proper folding of substrate proteins (Wiser et al., 1996). The very active metabolism during oocyst development together with mosquito immune system

attack could generate stress requiring other functions for these proteins. For both genes it was observed high variability between experiments, which could be a result of differences in oocyst maturation from experiment to experiment, since slight variations in environmental conditions such as temperature can result in time alterations of development (Noden et al., 1995).

Among the mosquito genes identified some of the probable functions represented were: digestion, protein production (transcription, translation, and splicing), and membrane transport.

The *As1* gene is homologue to a trypsin precursor of *A. gambiae* that has been described as being specifically expressed at the gut and upregulated after a blood meal (Ribeiro, 2003), suggesting its involvement in blood digestion. Another protease isolated was the *As10* gene, that is homologue to a *A. gambiae* serine protease precursor and could be involved in either digestion or in immune response, even though this gene has never been previously associated to mosquito immunity. It is known that many serine proteases are involved in immunity (Christophides et al., 2002). However, most of the serine proteases shown to be involved in immunity present a common CLIP motif (Gorman et al., 2000), which is not present in this gene. Gene knockdown experiments could clarify its possible role in immunity and confirm its role in digestion. The gene *As6* (highly similar to *A. gambiae*'s maltase like *agm-1*) is probably involved in sugar digestion and is more expressed, after a second blood meal, independent of the immune status. The *A. gambiae agm-1* gene expression was reported as being down regulated 24 h post-blood meal by Dimopoulos et al. (1996), which was explained by the authors as a consequence of changes in the type of digestion, from sugar based feeding to a blood meal with high protein content. Our results probably reflect the necessity to replenish the stock of maltase that was depleted in the previous days or due to change of nutrient intake from blood to maintenance sugared water.

Several of the isolated genes could be involved in protein production. Two genes coding for ribosomal proteins were identified (*As4*, *As9*); the *As5* and *As8* are similar to *A. gambiae* genes coding for proteins that are part of the spliceosome and the signal peptidase complex, respectively, the *As11* gene is probably involved in translation at tRNA level. The *As4*, *As8*, and *As9* genes were all up-regulated by the second blood meal but down-regulated when that blood meal contained immune serum. The higher availability of amino acids for the protein production, due to the intake allowed by the second blood meal (Sanders et al., 2003) may justify this up regulation. The *As5* gene shows a different pattern, where the second blood meal in naïve blood does not cause an up-regulation but the presence of immune serum does. It is not clear how the immune serum affects the expression of these genes. The immune serum used could affect the protein production in the mosquito, thus affecting mosquito ferti-

ty and fecundity and even nutrient availability to the parasite. It would be interesting to measure the effect of the immune serum in the mosquito egg production.

Membrane transport is another function that is probably represented by the identified genes that showed some weak similarity with *A. gambiae* membrane channels. These genes were identified as up regulated at day five post-feeding by DDRT-PCR. The higher expression of membrane channels has been described by Sanders et al. (2003), after blood feeding, and is probably a response to allow intake of the high quantity of nutrients acquired.

The analysis of all these genes showed that the presence of immune serum seems to affect several different mosquito functions, and mainly genes associated to protein production: five out of eleven isolated genes were involved in protein production, which may be interfering with the *Anopheles/Plasmodium* interaction, affecting mosquito response and parasite development. Determining to what extent, protein production and the other physiological processes are affected by immune serum would require a wider transcriptome analysis.

Although the useful information gained by this approach, it has some drawbacks that must be taken into consideration when analysing the results. The immune serum is a complex mixture that contains components other than antibodies and could therefore be responsible for modulating the effect observed on infected mosquitoes receiving a second blood meal with high antibody titres, further mosquito infection can vary between experiments as seen in infection rates and infection intensity. It would be of interest to access the effect of antibodies specific to sporozoite antigens, this approach could give a clearer picture and together with assays to determine sporozoite-infectivity to the vertebrate host would give a better understanding of transmission blocking mechanisms.

Our work shows that the presence of immune serum in the blood meal can reverse the oocyst load enhancement effect of a second blood meal and this is associated with alterations of expression profiles of some genes associated with digestion and protein production. Therefore, the immune status of the blood meal can interfere with parasite development at the mosquito or the *Plasmodium* level in an intricate set of events that can interfere with interventions for malaria control.

## Acknowledgments

We thank Ana Catarina Alves for rearing the mosquitoes. This work was supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia project Grant (POCTI/MGI/35815/00), and grants to L.F. Lopes (SFRH/BD/10202/2002) and P. Abrantes (SFRH/BD/6346/2001).

## References

- Abrantes, P., Lopes, L.F., do Rosario, V.E., Silveria, H., 2005. Effect of chloroquine on the expression of genes involved in the mosquito

- immune response to *Plasmodium* infection. Insect Biochemistry and Molecular Biology 35, 1124–1132.
- Beier, J.C., Oster, C.N., Koros, J.K., Onyango, F.K., Githeko, A.K., Rowton, E., Koech, D.K., Roberts, C.R., 1989. Effect of human circumsporozoite antibodies in *Plasmodium*-infected *Anopheles* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology 26, 547–553.
- Boudin, C., Van Der Kolk, M., Tchuinkam, T., Gouagna, C., Bonnet, S., Safeukui, I., Mulder, B., Meunier, J.Y., Verhave, J.P., 2004. *Plasmodium falciparum* transmission blocking immunity under conditions of low and high endemicity in Cameroon. Parasite Immunology 26, 105–110.
- Cao, Y.M., Tsuboi, T., Torii, M., 1998. Nitric oxide inhibits the development of *Plasmodium yoelii* gametocytes into gametes. Parasitology International 47, 157–166.
- Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N.T., Hoffmann, J.A., Kanzok, S.M., Letunic, I., Levashina, E.A., Loukeris, T.G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L.F., Muller, H.M., Osta, M.A., Paskewitz, S.M., Reichhart, J.M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K.D., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P., Kafatos, F.C., 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. Science 298, 159–165.
- Claverie, J.-M., Makalowski, W., 1994. ALU alert. Nature 371, 752.
- Dimopoulos, G., Richman, A., della Torre, A., Kafatos, F.C., Louis, C., 1996. Identification and characterization of differentially expressed cDNAs of the vector mosquito, *Anopheles gambiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 13066–13071.
- Dinglasan, R.R., Fields, I., Shahabuddin, M., Azad, A.F., Sacchi Jr., J.B., 2003. Monoclonal antibody MG96 completely blocks *Plasmodium yoelii* development in *Anopheles stephensi*. Infection and Immunity 71, 6995–7001.
- Egan, A.F., Burghaus, P., Druihe, P., Holder, A.A., Riley, E.M., 1999. Human antibodies to the 19 kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro. Parasite Immunology 21, 133–139.
- Gamage-Mendis, A.C., Rajakaruna, J., Carter, R., Mendis, K.N., 1992. Transmission blocking immunity to human *Plasmodium vivax* malaria in an endemic population in Kataragama, Sri Lanka. Parasite Immunology 14, 385–396.
- Gamage-Mendis, A.C., Rajakaruna, J., Weerasinghe, S., Mendis, C., Carter, R., Mendis, K.N., 1993. Infectivity of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* to *Anopheles tessellatus*; relationship between oocyst and sporozoite development. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 87, 3–6.
- Gorman, M.J., Andreeva, O.V., Paskewitz, S.M., 2000. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph. Insect Biochemistry and Molecular Biology 30, 35–46.
- Graves, P.M., Wirtz, R.A., Carter, R., Burkot, T.R., Looker, M., Targett, G.A., 1988. Naturally occurring antibodies to an epitope on *Plasmodium falciparum* gametes detected by monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Infection and Immunity 56, 2818–2821.
- Gulia, M., Suneja, A., Gakhar, S.K., 2002. Effect of anti-mosquito hemolymph antibodies on fecundity and on the infectivity of malarial parasite *Plasmodium vivax* to *Anopheles stephensi* (Diptera: Insecta). Japanese Journal of Infectious Diseases. 55, 78–82.
- Healer, J., McGuinness, D., Hopcroft, P., Haley, S., Carter, R., Riley, E., 1997. Complement-mediated lysis of *Plasmodium falciparum* gametes by malaria-immune human sera is associated with antibodies to the gamete surface antigen Pfs230. Infection and Immunity 65, 3017–3023.
- Karunaweera, N.D., Carter, R., Grau, G.E., Kwiatkowski, D., del Giudice, G., Mendis, K.N., 1992. Tumour necrosis factor-dependent parasite-killing effects during paroxysms in non-immune *Plasmodium vivax* malaria patients. Clinical and Experimental Immunology 88, 499–505.
- Lensen, A.H., Bolmer-Van de Vegte, M., van Gemert, G.J., Eling, W.M., Sauerwein, R.W., 1997. Leukocytes in a *Plasmodium falciparum*-infected blood meal reduce transmission of malaria to *Anopheles* mosquitoes. Infection and Immunity 65, 3834–3837.
- Li, F., Templeton, T.J., Popov, V., Comer, J.E., Tsuboi, T., Torii, M., Vinetz, J.M., 2004. *Plasmodium* ookinete-secreted proteins secreted through a common micronemal pathway are targets of blocking malaria transmission. The Journal of Biological Chemistry 279, 26635–26644.
- Luckhart, S., Crampton, A.L., Zamora, R., Lieber, M.J., dos Santos, P.C., Peterson, T.M., Emmith, N., Lim, J., Wink, D.A., Vodovotz, Y., 2003. Mammalian transforming growth factor beta1 activated after ingestion by *Anopheles stephensi* modulates mosquito immunity. Infection and Immunity 71, 3000–3009.
- Malkin, E.M., Durbin, A.P., Diemert, D.J., Sattabongkot, J., Wu, Y., Miura, K., Long, C.A., Lambert, L., Miles, A.P., Wang, J., Stowers, A., Miller, L.H., Saul, A., 2005. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. Vaccine 23, 3131–3138.
- Mulder, B., Lensen, T., Tchuinkam, T., Roeffen, W., Verhave, J.P., Boudin, C., Sauerwein, R., 1999. *Plasmodium falciparum*: membrane feeding assays and competition ELISAs for the measurement of transmission reduction in sera from Cameroon. Experimental Parasitology 92, 81–86.
- Naotunne, T.S., Karunaweera, N.D., del Giudice, G., Kularatne, M.U., Grau, G.E., Carter, R., Mendis, K.N., 1991. Cytokines kill malaria parasites during infection crisis: extracellular complementary factors are essential. The Journal of Experimental Medicine 173, 523–529.
- Noden, B.H., Kent, M.D., Beier, J.C., 1995. The impact of variations in temperature on early *Plasmodium falciparum* development in *Anopheles stephensi*. Parasitology 111, 539–545.
- Peiris, J.S., Premawansa, S., Ranawaka, M.B., Udagama, P.V., Munasinghe, Y.D., Nanayakkara, M.V., Gamage, C.P., Carter, R., David, P.H., Mendis, K.N., 1988. Monoclonal and polyclonal antibodies both block and enhance transmission of human *Plasmodium vivax* malaria. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 39, 26–32.
- Ranawaka, M.B., Munasinghe, Y.D., de Silva, D.M., Carter, R., Mendis, K.N., 1988. Boosting of transmission-blocking immunity during natural *Plasmodium vivax* infections in humans depends upon frequent reinfection. Infection and Immunity 56, 1820–1824.
- Ribeiro, J.M., 2003. A catalogue of *Anopheles gambiae* transcripts significantly more or less expressed following a blood meal. Insect Biochemistry and Molecular Biology 33, 865–882.
- Roeffen, W., Geeraedts, F., Eling, W., Beckers, P., Wizel, B., Kumar, N., Lensen, T., Sauerwein, R., 1995. Transmission blockade of *Plasmodium falciparum* malaria by anti-Pfs230-specific antibodies is isotype dependent. Infection and Immunity 63, 467–471.
- doRosario, V.E., Appiah, A., Vaughan, J.A., Hollingdale, M.R., 1989. *Plasmodium falciparum*: administration of anti-sporozoite antibodies during sporogony results in production of sporozoites which are not neutralized by human anti-circumsporozoite protein vaccine sera. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 83, 305–307.
- Sanders, H.R., Evans, A.M., Ross, L.S., Gill, S.S., 2003. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 33, 1105–1122.
- Schroeder, A.A., Lawrence, C.E., Abrahamson, M.S., 1999. Differential mRNA display cloning and characterization of a *Cryptosporidium parvum* gene expressed during intracellular development. The Journal of Parasitology 85, 213–220.
- Snewin, V.A., Premawansa, S., Kapilananda, G.M., Ratnayaka, L., Udagama, P.V., Mattei, D.M., Khouri, E., del Giudice, G., Peiris, J.S., Mendis, K.N., David, P.H., 1995. Transmission blocking immunity in *Plasmodium vivax* malaria: antibodies raised against a peptide block parasite development in the mosquito vector. The Journal of Experimental Medicine 181, 357–362.
- Suneja, A., Gulia, M., Gakhar, S.K., 2003. Blocking of malaria parasite development in mosquito and fecundity reduction by midgut antibodies in *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology 52, 63–70.

- Tsuboi, T., Cao, Y.M., Torii, M., Hitsumoto, Y., Kanbara, H., 1995. Murine complement reduces infectivity of *Plasmodium yoelii* to mosquitoes. *Infection and Immunity* 63, 3702–3704.
- Tsuboi, T., Tachibana, M., Kaneko, O., Torii, M., 2003. Transmission-blocking vaccine of *vivax* malaria. *Parasitology International* 52, 1–11.
- Vaughan, J.A., Azad, A.F., 1988. Passage of host immunoglobulin G from blood meal into hemolymph of selected mosquito species (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 25, 472–474.
- Vaughan, J.A., Noden, B.H., Beier, J.C., 1992. Population dynamics of *Plasmodium falciparum* sporogony in laboratory-infected *Anopheles gambiae*. *The Journal of Parasitology* 78, 716–724.
- Vaughan, J.A., do Rosario, V.E., Leland, P., Adjepong, A., Light, J., Woollett, G.R., Hollingdale, M.R., Azad, A.F., 1988. *Plasmodium falciparum*: ingested anti-sporozoite antibodies affect sporogony in *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Experimental Parasitology* 66, 171–182.
- Vaughan, J.A., Wirtz, R.A., do Rosario, V.E., Azad, A.F., 1990. Quantitation of anti-sporozoite immunoglobulins in the hemolymph of *Anopheles stephensi* after blood feeding. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42, 10–16.
- Wiser, M.F., Jennings, G.J., Uparanukraw, P., van Belkum, A., van Doorn, L.-J., Kumar, N., 1996. Further characterization of a 58 kDa *Plasmodium berghei* phosphoprotein as a cochaperone. *Molecular and Biochemical Parasitology* 83, 25–33.