

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA SUPERIOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA,
CULICIDAE) EM CONDIÇÕES NATURAIS E NO LABORATÓRIO SOB ESTRESSE
PRODUZIDO PELO PETRÓLEO**

MARLA RAQUEL PONTES DA ROCHA

MANAUS
2012

MARLA RAQUEL PONTES DA ROCHA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Anopheles darlingi* (DIPTERA,
CULICIDAE) EM CONDIÇÕES NATURAIS E NO LABORATÓRIO SOB ESTRESSE
PRODUZIDO PELO PETRÓLEO**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado do Amazonas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei

Co-Orientador: Dr. Sérgio Ricardo Nozawa

MANAUS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

R672a	Rocha, Marla Raquel Pontes da
	Análise da expressão gênica de <i>Anopheles darlingi</i> (Diptera, Culicidae) em condições naturais e no laboratório sob estresse produzido pelo petróleo / Marla Raquel Pontes da Rocha. -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2012.
	70f. : il.
	Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2012. Orientador: Dr. Wanderli Pedro Tadei. Co-orientador: Dr. Sergio Ricardo Nozawa.
	1. <i>Anopheles darlingi</i> . 2. Expressão gênica 3. Sequenciamento 4. Sanger - CE 5. NGS - RNAseq 5. Petróleo I. Título
	CDU: 604

Dedico este trabalho a minha mãe, pois com a força de uma guerreira enfrentou as dificuldades do cotidiano. E pode ainda assim, oferecer-me incentivo e suporte para finalizar o Mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Providência Divina pela força concedida nos momentos difíceis e ainda por guiar-me no caminho certo, mesmo eu achando estar errado!

Expresso os meus agradecimentos as pessoas envolvidas " neste caso " conforme a ocorrência dos fatos, independente de quem sejam.

Aos meus pais, Cristina e Hércules. Sou grata especialmente a minha mãe pelo extremo apoio durante a minha jornada, sendo um exemplo de superação diante dos momentos críticos!

A minha irmã Victória pelas conversas de incentivo.

As minhas tias Lelé e Linda por sempre estarem prontas a ajudar.

A minha amiga Joyce, pela amizade leal e sempre disposta a ajudar-me.

Aos amigos de turma do Mestrado, em destaque para os químicos Auricélia, Lorena e Manuel durante a disciplina de química orgânica e biológica.

A Dra. Sandra Zanotto por buscar a resolução da minha "desorientação".

Ao Dr. Adalberto Luis Val pela ajuda prestada na minha fase de "desorientada" e como não pode orientar-me, trilhou o meu caminho junto ao Dr. Wanderli Pedro Tadei.

Ao meu orientador Dr. Tadei, sem sua ajuda não seria possível a realização deste trabalho. Sempre transmitindo-me otimismo e confiança, seus ensinamentos foram essenciais na minha

vida de Pós-Graduanda e pessoal. Apesar da minha relutância em alguns momentos, só tenho a agradecer-lo!

Ao Alex e Muana, pelo processamento logístico das solicitações estabelecidas pelo Dr. Tadei.

Ao grupo técnico do Laboratório de Vetores da Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LVMD-INPA): Bosco, Gervi, Carlos, Rosely (Identificação dos mosquitos) Elias, Silvano, Catita - Antônio, Gláudio, Raimundo, Acelino (Coleta dos mosquitos adultos), Nonato, Henrique, Bastos (Transporte), Juraci (Laboratório), Adelina, Zilé (Confecção dos copos de desovas), Maria (Insetário).

A Rejane (Criação das larvas e adultos de *Anopheles darlingi*), Waléria, Ketlen e Joaquim (Biologia molecular), as meninas Marly, Érika, Rochelly, Lorena e ao Rodrigo pelas manifestações de ajuda.

Dra. Iléa Brandão Rodrigues, pela ajuda na formulação dos bioensaios.

Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza, pelos primeiros auxílios na área de expressão gênica

A Nazaré Paula do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LEEM - INPA), pelo auxílio durante o meu percurso no LEEM, levando-me a Katherine, Nayara, Carol, Daniel, Ramon e Carlos Henrique.

A Dra. Vera Almeida Val, pelas críticas construtivas do projeto de qualificação.

Ao Dr. Osvaldo Marinotti, pelo envio do artigo "chave" para iluminar minha mente no desenvolvimento do estudo.

A Noêmia Damasceno, pelo apoio durante a minha "mudança" para a Universidade Nilton Lins (UNL).

Ao meu co-orientador Dr. Sérgio Ricardo Nozawa (Sérgio), considerei-o meu outro orientador. Ajudou-me na parte de expressão gênica, tendo disponibilizado todo seu laboratório para a realização do trabalho. Devo salientar o extremo aprendizado com o seu método de ensino, e confesso às vezes ter sido muito difícil! Sou grata pela oportunidade dos aprendizados adquiridos.

Aos amigos do laboratório do UNL: Luís, Felipi, Kácio, Felipe Jules, Diogo, Samir, Igor, Amanda, Cabral, Moacyr e a breve presença da Frida e das "meninas do Pará" - Fátima e Luciana. Agradeço as ajudas de última hora e discussão dos procedimentos teimosos em querer não funcionar! E também dos momentos filosóficos e descontraídos!

A Dra. Mônica Nozawa, por disponibilizar-se quando necessitei de auxílio nos procedimentos de clonagem molecular.

E ainda não podendo deixar de mencionar os órgãos financiadores: CNPq, FAPEAM, Rede Malária, Fundação Amazônica de Defesa da Biosfera, CTPETRO, PIATAM e ADAPTA

Agradeço a todos os responsáveis em ajudar-me direta e indiretamente. Não podendo deixar de agradecer inclusive aqueles descrentes na minha capacidade de desenvolver este estudo, pois suas manifestações negativas serviram apenas para fortalecer-me mais!!!

Obrigada!!!

"Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão e bússula, nunca tendo certeza do seu caminho"
(Leonardo Da Vinci)

"As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo o dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos, lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos"
(Paulo Belêki)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Áreas de risco na transmissão da malária.	18
Figura 2: Distribuição dos casos de malária confirmados a cada 1000 habitantes.	19
Figura 3: Representação do ciclo biológico de <i>Anopheles darlingi</i> .	21
Figura 4: Fotografia de <i>Anopheles darlingi</i> no 4º estágio de desenvolvimento larval e esquema ilustrativo de identificação.	22
Figura 5: Imagem de satélite dos pontos de coleta.	28
Figura 6: Fotografias das coletas de larvas de <i>Anopheles darlingi</i> .	29
Figura 7: Fotografias da manutenção das larvas de <i>Anopheles darlingi</i> no insetário.	30
Figura 8: Representação esquemática dos bioensaios de toxicidade aguda.	31
Figura 9: Representação esquemática do delineamento experimental.	32
Figura 10: Fotografias da avaliação das amostras de RNA total.	33
Figura 11: <i>HiSeq™ Sequencing Systems</i> .	39
Figura 12: Alinhamento com o genoma de referência <i>Anopheles gambiae</i> para a obtenção dos <i>reads</i> .	40
Figura 13: Anotação funcional dos <i>reads</i> obtidos com o genoma de referência <i>Anopheles gambiae</i> contra o banco de dados <i>EBI</i> .	41
Figura 14: Gráfico da análise de próbit expressa em linhas de regressão.	44
Figura 15: Aspecto macroscópico da água com as larvas (L4) de <i>Anopheles darlingi</i> expostas ao petróleo.	45
Figura 16: Integridade do RNA total das amostras utilizadas no sequenciamento <i>Sanger - CE</i> a partir das bandas de rRNAs 28S e 18S, visualizadas em uma eletroforese em gel de agarose 1%.	46
Figura 17: Amostras de cDNA Controle e Tratamento utilizadas na clonagem molecular, visualizadas em eletroforese em gel de agarose 1%.	47
Figura 18: Perfil dos clones recombinantes das amostras Controle e Tratamento, visualizados em eletroforese em gel de agarose 1%.	47

- Figura 19:** Integridade das amostras de RNA total utilizadas no sequenciamento de *EST's pela tecnologia NGS – RNAseq* a partir das bandas de rRNA 28S e 18S, visualizadas em uma eletroforese em gel de agarose 1%. 51
- Figura 20:** Genes super expressos na biblioteca Tratamento em comparação com a biblioteca Controle. 58
- Figura 21:** Genes com níveis de expressão inibida na biblioteca Tratamento em comparação com a biblioteca Controle. 58
- Figura 22:** Genes de referência expressos nas bibliotecas Controle e Tratamento. 59
- Figura 23:** Genes expressos na biblioteca Tratamento não observados na biblioteca Controle. 59

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Mortalidade das larvas de <i>Anopheles darlingi</i> em diferentes concentrações de petróleo.	43
Tabela 2: Teste de hipótese.	44
Tabela 3: Dados da análise de próbit.	44
Tabela 4: Valores de próbit.	45
Tabela 5: <i>EST's</i> de <i>Anopheles darlingi</i> das bibliotecas Controle e Tratamento analisadas pelo software <i>BLAST2GO</i> .	50
Tabela 6: <i>EST's</i> de <i>Anopheles darlingi</i> das bibliotecas Tratamento analisadas pelo software <i>BLAST2GO</i> .	51
Tabela 7: Controle de qualidade das bibliotecas gerado pelo software <i>FastQC</i> .	52
Tabela 8: Anotação das <i>EST's</i> de <i>Anopheles darlingi</i> geradas da biblioteca Controle analisadas pelo banco de dados <i>EBI</i> .	54
Tabela 9: Anotação das <i>EST's</i> de <i>Anopheles darlingi</i> geradas da biblioteca Controle analisadas pelo banco de dados <i>EBI</i> .	55
Tabela 10: Anotação das <i>EST's</i> de <i>Anopheles darlingi</i> geradas da biblioteca Tratamento analisadas pelo banco de dados <i>EBI</i> .	56
Tabela 11: Anotação das <i>EST's</i> de <i>Anopheles darlingi</i> geradas da biblioteca Tratamento analisadas pelo banco de dados <i>EBI</i> .	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossomal
<i>EST's</i>	<i>Expressed Sequence Tags</i>
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>BLAST</i>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<i>e – Value</i>	<i>Extreme Value Distribution</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
<i>NCBI</i>	<i>Nacional Center for Biotechnology Information</i>
<i>EBI</i>	<i>European Bioinformatics Institute</i>
<i>NGS</i>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<i>API</i>	<i>American Petroleum Institute</i>
ppm	partes por milhão
°C	Graus Celsius
CL ₅₀	Concentração Letal Mediana
L4	larvas no quarto estágio de desenvolvimento
L3	larvas no terceiro estágio de desenvolvimento
LVMD- INPA	Laboratório de Vetores da Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LEG-CUNL	Laboratório de Expressão Gênica do Centro Universitário Nilton Lins
mL	Mililitros
mg	Miligramas
DEPC	Dietil Pirocarbonato
µL	Microlitro

µg	Micrograma
ng	Nanograma
v/v	volume por volume
m/v	Massa por volume
RNAse (s)	Ribonuclease (s)
Etbr	Brometo de etídeo
Pb	Pares de base
rpm	rotação por minuto
TAE	Tris-Acetato-EDTA
X	Vezes
<i>IPTG</i>	<i>Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside</i>
<i>X-gal</i>	<i>5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside</i>
LB	Lúria-Bertane

RESUMO

Estudos da expressão gênica em mosquitos têm proporcionado informações relevantes para a implementação de estratégias de controle vetorial. O perfil da expressão gênica pode ser alterado por fatores ambientais e um exemplo é o petróleo que apresenta compostos orgânicos tóxicos em sua composição, tornando-se um agente estressor. A exploração de petróleo na região amazônica está em franca expansão e no município de Coari-AM está situada a Base Petrolífera de Urucu, onde ocorre intensa atividade de extração e também de refino. Neste trabalho analisou-se o petróleo como um agente estressor para *Anopheles darlingi* Root, 1926, principal vetor da malária humana na Amazônia. Para tanto, utilizaram-se larvas de *Anopheles darlingi* coletadas em criadouros situados na periferia de Manaus, na Zona Leste. O efeito da ação estressante do petróleo foi avaliado pela análise da expressão gênica em larvas de *A. darlingi*, em condições naturais e por exposição ao estresse em laboratório. Desta forma, foram realizados bioensaios de toxicidade com o objetivo de estabelecer a CL₅₀ para compor o delineamento experimental e assim prosseguir com a análise molecular. Em continuidade, na avaliação da expressão gênica foram construídas bibliotecas de cDNA e os sequenciamentos destes cDNAs foram realizados pelas tecnologias de Sanger - CE e NGS - RNAseq para a obtenção de EST's (*Expressed Sequence Tags*). Os dados dos perfis da expressão gênica das bibliotecas de cDNA controle (larvas em condições naturais) e tratamento (larvas sob estresse pelo petróleo) foram analisados pelo programa de bioinformática BLAST2GO. Nos bioensaios realizados a CL₅₀ foi determinada em 0,32 ppm e 0,06 ppm a concentração, na qual as larvas de *A. darlingi* foram submetidas ao estresse para as análises de expressão gênica. Os resultados obtidos demonstraram a representatividade das EST's das bibliotecas controle e tratamento. Dentre os genes diferencialmente expressos no tratamento observou-se a família *hsp* conhecida por codificar proteínas envolvidas no choque térmico, o grupo enzimático *tps* responsável pela biossíntese de terpenos e *ctnb* relacionados com a biossíntese de oxidoredutases, sendo estes intimamente envolvidos com o estresse causado pelo petróleo. Esses genes relacionam-se ao metabolismo de detoxificação do organismo, sendo importantes indicadores dos processos de resistência aos inseticidas e ainda pode-se destacar o *tps*, no qual pode ser considerado um marcador de exposição para o petróleo. Além dos genes diferencialmente expressos no tratamento, cita-se também o gene *gly* ligado a transcrição do grupo das Proteínas Ricas em Glicina – GRPs, e como foi expresso nas duas bibliotecas tem a possibilidade de ser um gene normalizador das duas condições. Com isso, os parâmetros de expressão gênica observado em larvas de *A. darlingi* estabelecem novas perspectivas à genômica funcional da espécie.

Palavras-chave: *Anopheles darlingi*; Expressão gênica; Sanger-CE; NGS-RNAseq; Petróleo; Estresse ambiental

ABSTRACT

Gene expression studies in mosquitoes have given relevant information on the implementation of vector control strategies. The profile of gene expression can be modified by environmental factors and one example is the petroleum which has toxic organic compounds in its composition being therefore a stressor agent. Petroleum exploration in the Amazon region is growing and in the municipality of Coari-AM is located the Urucu petroliferous province with intense oil exploration and refined petroleum products. In this work, the petroleum was analyzed as a stressor agent to *Anopheles darlingi* Root, 1926, the main vector of human malaria in the Amazon. For this, larvae of *A. darlingi* were collected from riverine habitats near the east zone of Manaus town. The stress effects of petroleum were evaluated by gene expression analyzes in larvae of *A. darlingi* under natural conditions and stress exposure. Toxic bioassays were developed with the objective to establish an experimental design of CL₅₀ and then proceed to the molecular analyzes. For gene expression evaluation cDNA libraries were constructed and sequencing was established by Sanger sequencing and Transcriptome Sequencing (RNA-seq) to obtain Expressed Sequence Tags (ESTs). The data from the gene expression profiles of cDNA libraries from control (larvae in natural conditions) and treatment (larvae under petroleum stress) were analyzes by the bioinformatic program *BLAST2GO*. In the bioassays of CL₅₀ the concentrations were determined at 0.32 ppm and 0.06 ppm which the larvae of *A. darlingi* was subjected to stress for further gene expression analyzes. The obtained results showed the representativity of ESTs from the control and treatment libraries. Among the differentially expressed genes in the treatment were the family *hsp* known by encoding proteins involved in thermal shock, the enzymatic group *tps* responsible by the terpene biosynthesis and the *ctnb* related to the oxidoreductase biosynthesis, being all related to stress caused by petroleum. These genes are related to detoxification of organism metabolism indicating important processes of pesticide resistance and the *tps* can be considered as a marker of exposure to petroleum. In addition to the genes differentially expressed in the treatment, the *gly* gene was observed and is related to the transcription of glycine-rich proteins (GRPs), and as it was expressed in both libraries it has the possibility of being a normalize for both conditions. Therefore, the observed parameters of gene expression in larvae of *A. darlingi* establish new perspectives to the species functional genomics.

Key-words: *Anopheles darlingi*; Gene expression; Sanger-CE; NGS-RNAseq; Petroleum; Environmental stress

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Malária	18
1.2 <i>Anopheles darlingi</i>	
1.3 Expressão Gênica	19
1.4 Petróleo: Estresse Ambiental	23
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivos Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Área de Amostragem	29
3.2 Manutenção das Larvas no Laboratório	30
3.3 Identificação do Material Coletado	31
3.4 Bioensaios de Toxicidade Aguda	31
3.5 Delineamento Experimental	32
3.6 Tecnologias de sequenciamento das <i>EST's</i>	
3.6.1 Sequenciamento <i>Sanger – CE</i>	33
3.6.1.1 Extração de RNA total	34
3.6.1.2 Síntese de cDNA	35
3.6.1.3 Construção das bibliotecas de cDNA	35
3.6.1.4 Extração de DNA plasmidial	36
3.6.1.5 Sequenciamento	37
3.6.1.6 Bioinformática	37
3.6.2 Sequenciamento <i>NGS – RNAseq</i>	37
3.6.2.1 Extração de RNA total	38
3.6.2.2 Construção das bibliotecas de cDNA	38
3.6.2.3 Sequenciamento	39
3.6.2.4 Bioinformática	40
4. RESULTADOS	42
4.1 Bioensaios de Toxicidade Aguda	42
4.2 Tecnologias de Sequenciamento das <i>EST's</i>	
4.2.1 Sequenciamento <i>Sanger – CE</i>	45
4.2.2 Sequenciamento <i>NGS – RNAseq</i>	51

5. DISCUSSÃO	59
5.1 Bioensaios de Toxicidade Aguda	59
5.2 Sequenciamento de <i>Sanger</i> – <i>CE</i> e <i>NGS</i> – <i>RNAseq</i>	60
6. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária humana ainda consiste em uma importante doença infecto-parasitária transmitida por mosquitos de grande problemática na saúde pública, estima-se a ocorrência de 216 milhões de novos casos e 600 mil mortes anuais. Mais de 109 países e territórios são atingidos, onde 30% dos óbitos registrados referem-se ao continente africano e em 2010 aproximadamente 3 bilhões de pessoas estiveram sob o risco de contrair a doença (Figura 1). A malária acomete ambos os sexos nas diferentes faixas etárias, porém, os principais grupos suscetíveis a infecção inclui as crianças menores de 5 anos de idade, gestantes, idosos e imunosuprimidos (WHO, 2011).

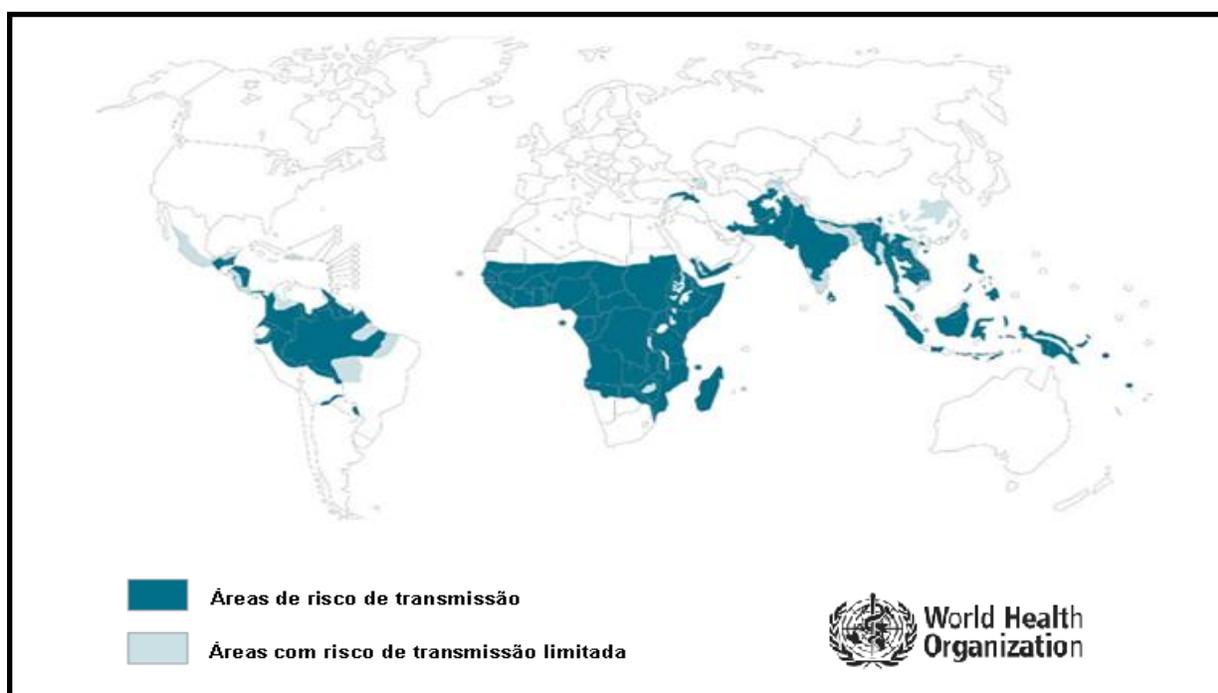


Figura 1: Áreas de risco na transmissão da malária. **Fonte:** <http://www.who.int>

No Brasil, a malária é uma doença endêmica da região amazônica (Figura 2), em 2010 acometeu 263.323 pessoas e a maioria dos casos concentraram-se nos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima (OMS, 2011).

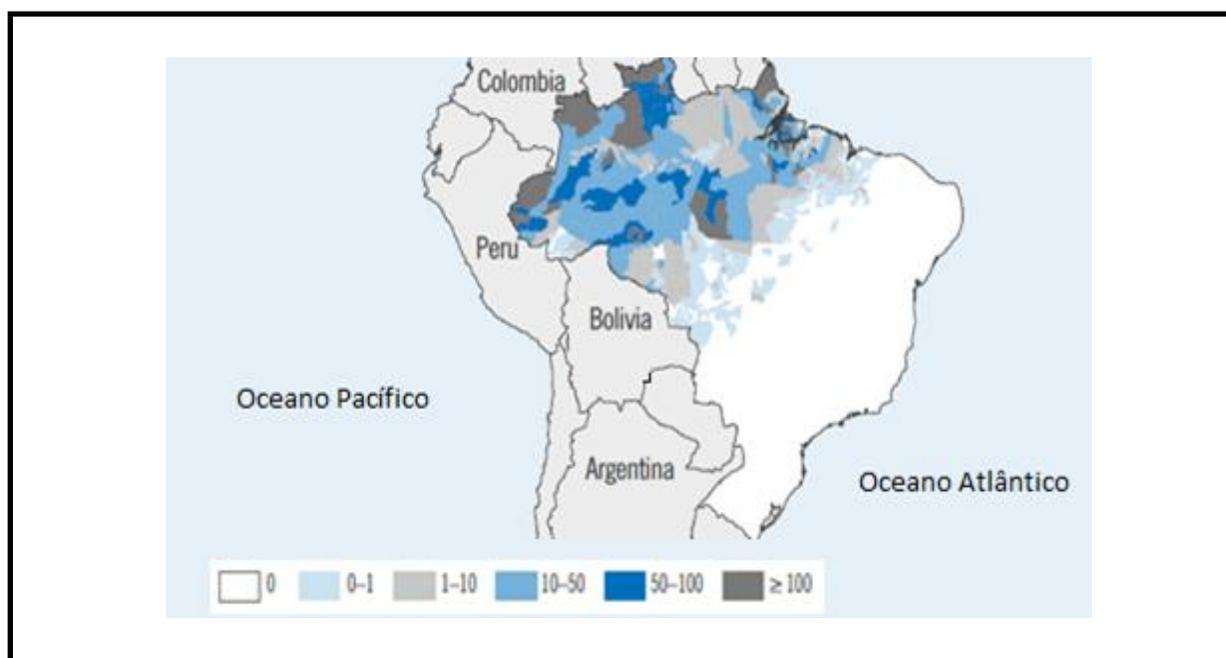


Figura 2: Distribuição dos casos de malária confirmados a cada 1000 habitantes. **Fonte:** OMS

Os agentes etiológicos constituem os protozoários do gênero *Plasmodium*, as espécies relacionadas as infecções humanas incluem os *Plasmodium vivax* (GRASSI e FELETI, 1890), *Plasmodium falciparum* (WELCH, 1897), *Plasmodium malariae* (LAVERAN, 1881), *Plasmodium ovale* (STEPHENS, 1922) e *Plasmodium knowlesi* (LEE et al., 2009).

1.2 *Anopheles darlingi*

O *A. darlingi* representa o principal vetor da malária no Brasil e focaliza-se especialmente na região amazônica, onde concentra 99,5% dos casos da doença (ARRUDA et al., 1986; TADEI et al., 1998; TADEI; DUTARY-TATCHER 2000).

A Amazônia brasileira abrange os estados da região Norte, Mato Grosso e parte do Maranhão, a permanência da doença nessas áreas decorre da interação favorável do plasmódio com o vetor anofelino. Essa relação ocorre em virtude do meio ambiente ser propício à reprodução dos anofelinos e do intenso contato homem / vetor na região (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; TADEI et al., 1988, 1998).

As características geológicas dos ecossistemas amazônicos proporcionam condições favoráveis ao desenvolvimento e proliferação do mosquito vetor. Já o contato humano resulta dos parâmetros de capacidade vetorial da espécie, esta utilizada nos estudos epidemiológicos para estimar a velocidade da infecção parasitária capaz de disseminar-se em uma população de hospedeiros suscetíveis graças a ação do vetor biológico (FORATTINI, 2002). A capacidade vetorial evidencia os comportamentos de: hematofagia, antropofilia, endofilia, exofilia, sazonalidade, desenvolvimento e transmissão de plasmódios ao homem (TADEI et.al, 1993,1998).

- Hematofagia - como aspecto geral, apresenta atividade crepuscular e noturna caracterizada por um padrão bimodal com registro contínuo de uma atividade crepuscular acentuada nas primeiras horas da noite (TADEI et al., 1988; TADEI; DURATY-THATCHER, 2000)
- Antropofilia – tem preferência de realizar hematofagia no homem, essa característica relaciona o seu potencial vetorial a população humana (TADEI et.al, 1998)
- Endofilia e Exofilia – reporta o hábito do mosquito realizar hematofagia fora e dentro dos domicílios, esse parâmetro evidencia o mecanismo de transmissão da malária (TADEI et.al, 1993)
- Sazonalidade - engloba as zonas tropicais caracterizadas pela alternância de um período chuvoso e seco ao longo do ano. Durante as chuvas no início do ano a densidade é baixa, aumentando a partir de abril/maio, com o pico mais elevado no mês de junho, reduções surgem nos meses subsequentes até o mês de setembro (TADEI et.al, 1993; 1998)
- Desenvolvimento e transmissão de plasmódios - esse mosquito foi encontrado infectado por três plasmódios que causam a malária humana nas Américas – *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (RACHOU, 1958; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

A distribuição geográfica do mosquito abrange desde o sul do México ao norte da Argentina, no Brasil está estreitamente vinculado à região amazônica. A espécie foi descrita em 1926 pelo entomologista Francis Metcaff Root, da Universidade de Johns Hopkins, durante os seus trabalhos na baixada Fluminense (RJ) em homenagem ao professor titular de Higiene da Faculdade de Medicina de São Paulo entre 1918 e 1922, Dr. Samuel Taylor Darling (DEANE, 1989).

Taxonomicamente pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, família *Culicidae*, subfamília *Anophelinae*, gênero *Anopheles* do subgênero *Nyssorhynchus*. São insetos holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa em seu ciclo biológico (Figura 3) passando pelos estágios de ovo, larva (quatro estádios larvais), pupa e adulto alado (FORATTINI, 2002).

As fases de ovo, larva e pupa (formas imaturas) desenvolvem-se nos criadouros. Estes configurados por grandes coleções hídricas de águas limpas, profundas parcialmente sombreadas e pobres em sais e matéria orgânica (TADEI et al., 1998; FORATTINI, 2002). Em ocasiões de intensa produtividade, pode ser encontrado em outros tipos de coleções, escavações, depressões de terreno, valas alagadiços (DEANE et. al., 1948; FORATTINI, 1962).

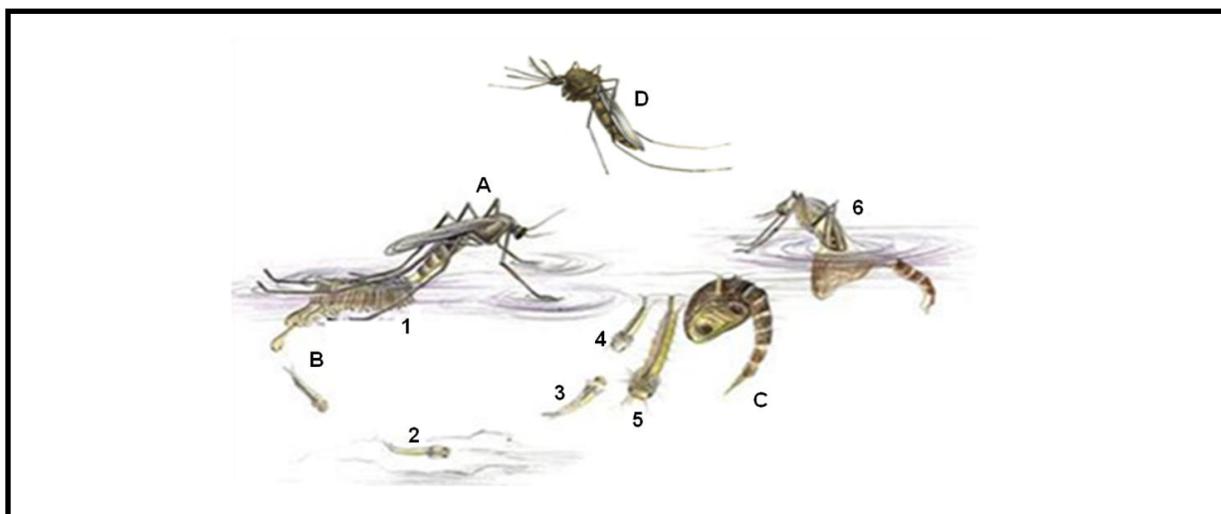


Figura 3: Representação do ciclo biológico de *Anopheles darlingi*. **A)** Oviposição – **1)** Ovos ; **B)** Eclosão – **2)** 1º estágio larval, **3)** 2º estágio larval, **4)** 3º estágio larval, **5)** 4º estágio larval; **C)** Pupa – **6)** Emergência ; **D)** Adulto alado. **Fonte:** Google Imagens.

Considerando as larvas de *A. darlingi* (Figura 4), estas são caracterizadas pela presença da cerda 13-S no lobo espiracular. A cerda possui morfologia simples, longa de comprimento e maior em relação ao dorso do comprimento da sela (FORATTINI, 2002).

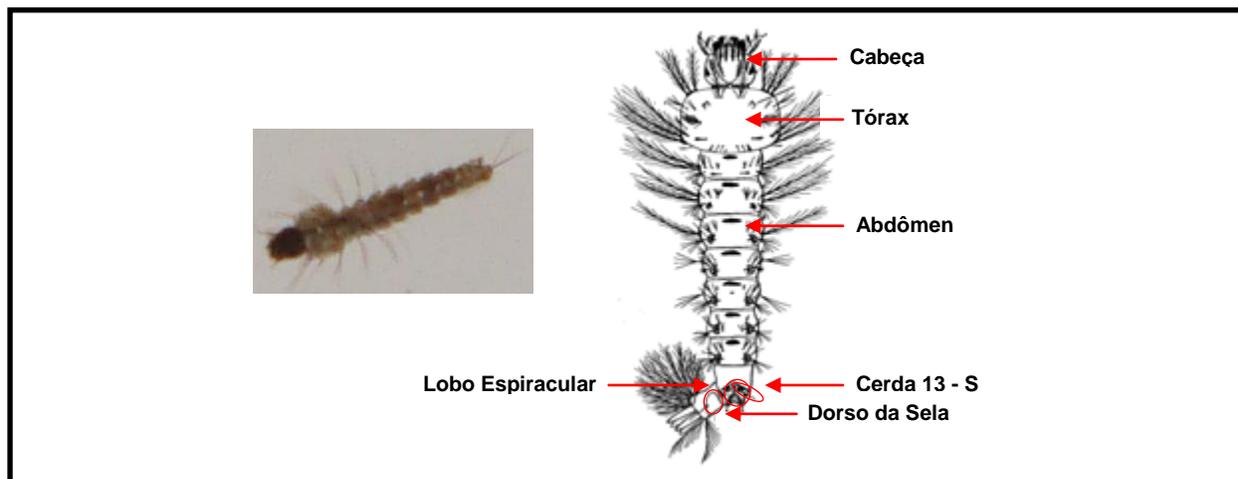


Figura 4: Fotografia de *Anopheles darlingi* no 4º estágio de desenvolvimento larval e esquema ilustrativo de identificação.

1.3 Expressão Gênica

O conhecimento gerado pelo sequenciamento do genoma de *Anopheles gambiae* s.s Giles, 1902 proporcionou importantes informações para colaborar nos avanços do desenvolvimento das pesquisas com o gênero *Anopheles*. Dentre esses estudos, os trabalhos desenvolvidos na área de expressão gênica com mosquitos abordam uma temática promissora para a compreensão da complexa biologia do inseto (HOLT et al., 2002).

Também denominada de genômica funcional e transcriptoma, a expressão gênica refere-se ao conjunto dos RNAs de uma célula ou um organismo expressos em função de uma determinada condição fisiológica, inclui, portanto RNA codificante - mRNA e não codificante - rRNA, tRNA, microRNAs e outros tipos de RNAs (SEVIGNANI et al., 2006).

Os estudos do transcriptoma englobam uma forma de análise para a identificação da função gênica, compreensão dos mecanismos moleculares relacionados aos

processos biológicos e a possibilidade da descoberta de novos genes (VEDOY et al., 1999).

A abordagem de análise realizada através das *EST's* (*Expressed Sequence Tags*) têm fornecido dados significantes a respeito da estrutura e função dos genes. As *EST's* representam cópias do mRNA de origem e caracterizam-se por pequenas sequências expressas (100 – 800 pb), das quais são originadas a partir do sequenciamento das extremidades 3' ou 5' de clones tomados aleatoriamente de uma biblioteca de DNA complementar – cDNA, sendo esta molécula oriunda da conversão do mRNA pela reação enzimática RT-PCR (ADAMS et al., 1991; VETTORE et al., 2001).

A análise das *EST's* pode ser realizada pelas tecnologias do sequenciamento de *Sanger – CE* e com as novas plataformas denominada por *NGS – RNAseq*.

A tecnologia de *Sanger – CE* é o sequenciamento automatizado por eletroforese de capilaridade baseado na metodologia manual de *Sanger*. Neste tipo de análise faz-se a construção das bibliotecas de cDNA por meio da clonagem molecular *in vivo*, onde estas moléculas são inseridas em um vetor plasmidial e incorporadas em células bacterianas competentes, em seguida sequenciadas as extremidades 5' ou 3' (BIRREN et al., 1999).

A tecnologia *NGS – RNAseq* refere-se na segunda geração dos sequenciadores automáticos denominados de *Next Generation Sequencing* - NGS para as análises transcriptômicas a partir das amostras de mRNA, nestas plataformas é possível o sequenciamento de *EST's* sem a necessidade da clonagem molecular *in vivo* utilizado para a construção das bibliotecas de cDNA. A inovação desta ferramenta é a realização da clonagem molecular *in vitro* diretamente do mRNA capaz de proporcionar uma análise em larga escala do transcriptoma (MARDIS, 2008; WANG et al., 2009).

Dentre as plataformas de sequenciamento utilizadas tem-se a *PCR* em emulsão - *emPCR* com os sequenciadores *454 Life Science-Roche* e *SOLID - Applied Biosystems* e a *PCR* de ponte em fase sólida *Solexa Illumina* (SHENDURE; JI, 2008). Embora essas plataformas sejam bem distintas na química e forma de sequenciamento, o fluxo de trabalho é conceitualmente similar. As sequências (*reads*) possuem, geralmente, de 30 a 400 pb, dependendo da tecnologia de sequenciamento utilizada. Após o

sequenciamento as *reads* produzidas são alinhadas a um genoma ou transcriptoma de referência ou agrupadas *de novo*, o número de *reads* mapeadas são contadas para determinar o nível de expressão gênica (MALONE; OLIVER, 2011; WANG et al., 2009).

Com os dados do sequenciamento gerado é preciso saber a representatividade dessas sequências nucleotídicas, nomeando e associando com as suas prováveis funções. No sentido de tratar essas sequências, o uso das ferramentas de bioinformática são essenciais para a sua caracterização e interpretação em relação ao organismo de estudo (PRODOSCIMI, 2003). O sequenciamento de *EST's* é cada vez mais utilizado para anotações das sequências de organismos eucariotos, pois podem dar evidências biológicas para a previsão de centenas de genes previamente conhecidos em outros organismos ou ainda indicar a presença de novos (VEDOY et al., 1999; VETTORE et al., 2001).

Constantemente estudos de expressão gênica vêm sendo realizados com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos no processo de transcrição (TANG et al., 2009). Uma vez detectada as alterações nos níveis de expressões gênicas, estas estão diretamente relacionadas às modificações fisiológicas, metabólicas, processo de adaptação celular e os estudos de expressão gênica com mosquitos vetores proporcionam um novo enfoque na busca de respostas entre a tríade vetor-parasita-hospedeiro (HILLENMEYER, 2007).

1.4 Petróleo: Estresse Ambiental

Os eventos provenientes do meio ambiente produzem um estresse que apresenta-se na expressão gênica do organismo. O estresse pode ser definido como uma alteração do equilíbrio dinâmico ou homeostase decorrente da ação de estímulos denominados agentes estressores (IWAMA et al., 1999).

Dentre os agentes estressores tem-se o estresse ambiental resultante das atividades exercidas pela ação humana, gerando uma alteração gradativa no meio ambiente provocando alterações parciais ou totais nos ecossistema. A Amazônia brasileira em virtude de a sua vasta biodiversidade torná-se alvo de importantes empreendimentos socioeconômicos e essas atividades refletem diretamente no

ecossistema, ocasionando o surgimento do estresse ambiental. Os estressores originados de ação antrópica destacam-se as construções de usinas hidrelétricas, abertura de estradas, projetos de irrigação, exploração de minérios ou combustíveis fósseis como o petróleo (TADEI et al., 1998).

O petróleo possui importância econômica de escala mundial, porém, é um agente estressante de preocupação nos diferentes ecossistemas. A exploração de petróleo na região amazônica iniciou-se em 1986 com a descoberta de uma jazida situada no rio Urucu, município de Coari no Estado do Amazonas a 650 km de Manaus (Petrobrás, 1994). O petróleo extraído é transportado por meio de um oleoduto ao terminal de Coari, na margem do rio Solimões e segue em balsas até as refinarias de Manaus (PETROBRÁS, 2005).

O petróleo é uma substância originada pela decomposição incompleta de material orgânico ao longo de milhares de anos. A sua composição química caracteriza-se pela formação da mistura complexa de hidrocarbonetos constituída por três fases: gasosa ou volátil denominada gás natural, sólida ou semi-sólida conhecida como asfalto e líquida chamada de óleo cru (KINGSTON, 2002).

A fase líquida é constituída de uma fração insolúvel, o óleo cru em si e uma fração hidrossolúvel composta por hidrocarbonetos poliaromáticos e alifáticos extremamente tóxicos (COSTA et al., 1996; VAL e ALMEIDA-VAL, 1999).

De acordo com as normas da *American Petroleum Institute* (API), o petróleo classifica-se segundo a sua densidade, em leve (menos denso) ou pesado (mais denso). Também conhecido como grau API essa classificação considera o petróleo leve quando possui grau API 32°, quanto maior esse valor é melhor o valor de mercado e a produção dos seus derivados (ANP, 2008).

O petróleo da Amazônia brasileira explorado na Província Petrolífera de Urucu, possui a classificação leve de alta qualidade com grau API 46,8 (ANP, 2008). Esse tipo de petróleo do Urucu pode ser facilmente absorvido pelas plantas ou ainda estender-se para outros grupos de organismos, resultando em danos imediatos à vegetação (PEZESHKI; DELAUNE, 1993).

Por conta do transporte dos barris de petróleo nos estágios de produção, transporte e refino, o risco de contaminação no ambiente aquático é constante. A contaminação aquática é um problema ambiental mundial, os organismos aquáticos expostos podem exibir respostas bioquímicas, fisiológicas e/ou comportamentais adversas (O'CONNOR; PAUL, 2000; KINGSTON, 2002).

As respostas aos agentes estressores podem ser classificadas em primárias, secundárias e terciárias. As primárias ocorrem imediatamente após a percepção do estímulo pelo organismo, às secundárias representam as mudanças metabólicas, fisiológicas e estruturais como resultado da persistência do agente estressor no seu ambiente, e a terciária refere-se a exposição com níveis crônicos ao agente estressor (IWAMA et al., 1999).

As mudanças metabólicas expressam os processos de detoxificação do organismo em resposta a ação do agente estressor. É importante considerar esse tipo de abordagem, considerando a ocorrência da resistência de mosquitos vetores aos inseticidas ter uma relação com a detoxificação (OPPENORTH et al., 1985)

A OMS define resistência como a habilidade de uma população de insetos tolerar uma dose de inseticida, quando em condições normais causaria a sua morte. A resistência de uma população de insetos aos inseticidas, possui características genéticas, das quais permitem sua sobrevivência sob doses de inseticidas normalmente letais. O próprio inseticida não produz essa mudança, o seu uso continuado permite a seleção de indivíduos resistentes (FERRARI, 1996).

O estudo de uma espécie na região, onde a malária apresenta-se endêmica é importante para o direcionamento das medidas de combate e os dados entomológicos constituem de importantes fontes no suporte para as tomadas de decisões (TADEI et.al., 2007).

O desenvolvimento de estudos voltados para o diagnóstico da resistência de mosquitos vetores a inseticidas utilizando as análises da expressão gênica tem proporcionado o conhecimento do perfil gênico expresso em diferentes condições (KOSIAN et al., 2007). No enfoque de colaborar na formulação de estratégias para o controle vetorial, o presente trabalho propôs analisar a expressão gênica em larvas de

A. darlingi sob as condições naturais e por exposição no laboratório ao estresse produzido pelo petróleo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a expressão gênica em larvas de *Anopheles darlingi* sob condições naturais e no laboratório sob estresse produzido pelo petróleo.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar bioensaios para determinar a concentração letal mediana - CL_{50} , bem como a CL_{90} em larvas expostas ao petróleo.
- ✓ Sequenciar *EST's* através de bibliotecas de cDNA a partir de larvas em condições naturais - Controle e sob estresse produzido pelo petróleo – Tratamento, utilizando duas metodologias de sequenciamento.
- ✓ Avaliar o padrão de genes expressos a partir das bibliotecas Controle e Tratamento sequenciadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Vetores da Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LVMD – INPA), Laboratório de Expressão Gênica, Genética Química, Bioinformática do Centro Universitário Nilton Lins (LEGGQB – UNL) e no Departamento de Zoologia da Escola Agrícola Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ - USP). Os seguintes procedimentos foram realizados: Manutenção, Identificação, Bioensaios de toxicidade aguda e Delineamento experimental (LVMD – INPA); Sequenciamento de *EST's* pelas tecnologias do sequenciamento de *Sanger – CE* (LEGGQB – UNL) e *NGS - RNAseq* (ESALQ - USP).

3.1 Área de Amostragem

A área de amostragem foi realizada em dois pontos de coleta (IM01= 03°03'04" S e 59°53'36" W; IM02 = 03°02'46" S e 59°52'53" W), ambos localizados na Zona Leste do município de Manaus, no Estado do Amazonas (Figura 5).



Figura 5: Imagem de satélite dos pontos de coleta. IM01- Portela; IM02 – Carlão. **Fonte:** Google Earth.

Nos pontos de coleta as larvas foram capturadas nas margens dos criadouros (Figura 6), para isso, imergiu-se uma concha superficialmente na lâmina d'água e com o auxílio de uma pipeta plástica tipo *Pauster* para a captura das larvas de terceiro estágio (L3) e do quarto estágio (L4). Posteriormente, as larvas foram transferidas para baldes plásticos contendo água do próprio criadouro e, ao término das coletas, encaminhadas ao LVMD-INPA.

As larvas (L3) foram utilizadas nos bioensaios de toxicidade aguda, enquanto que as larvas (L4) foram utilizadas para compor o delineamento experimental.



Figura 6: Fotografias das coletas de larvas de *Anopheles darlingi*.

3.3 Manutenção das Larvas no Laboratório

A manutenção das larvas coletadas foi realizada no insetário sob condições controladas de temperaturas ($26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa (70% a 80%) e fotoperíodo (12 C/ 12 E).

Inicialmente as larvas foram separadas de acordo com o estágio de desenvolvimento (L4 e L3) e, em seguida, transferidas para cubas esmaltadas e/ou bandejas plásticas contendo água de poço artesiano. Diariamente foi fornecido alimento constituído pela mistura de ração para peixe (*Tetramin*[®] e *Goldfish*[®]) e a cada dois dias efetuada a limpeza da água (Figura 7).



Figura 7: Fotografias da manutenção das larvas de *Anopheles darlingi* no insetário: **A)** Cubas esmaltadas; **B)** Bandeja plástica.

3.4 Identificação do Material Coletado

A identificação dos exemplares coletados foi realizada pelas características morfológicas das espécies, utilizando-se as chaves dicotômicas de Gorhan et al., (1967), Fahran (1980), Consoli e Oliveira (1994) e Forattini (2002).

3.5 Bioensaios de Toxicidade Aguda

Na montagem dos bioensaios de toxicidade aguda seguiram-se os critérios estabelecidos por Dulmage et al. (1990), com algumas adaptações (Figura 8). O petróleo utilizado foi proveniente da Base Petrolífera de Urucu – Coari/AM, e as concentrações aplicadas foram: 1 ppm, 0,5 ppm, 0,25 ppm, 0,12 ppm e 0,06 ppm.

Os bioensaios foram montados no laboratório sendo a temperatura de 26°C +/- 2°C, umidade relativa de 80% - 90% e fotoperíodo de 12 C / 12 E. Para cada concentração, montaram-se 5 réplicas em copos descartáveis contendo 100 mL de água destilada, 20 larvas no terceiro estágio (L3) e alimento na proporção 1:1 (ração para peixe – *Tetramin*[®] e *Goldfish*[®]), as leituras de mortalidade das larvas foram realizadas entre os períodos de 24 e 48 horas. O controle de cada concentração também consistiu de 5 réplicas montados em copos descartáveis contendo 100 mL de água destilada, 20 larvas no terceiro estágio de desenvolvimento (L3) e alimento na proporção 1:1 (ração para peixe – *Tetramin*[®] e *Goldfish*[®]). Os bioensaios foram realizados em 3 repetições em dias alternados, sendo utilizadas 3000 larvas (L3) em todo o experimento.

Os bioensaios são descartados quando no controle a mortalidade atinge acima de 10%. Os percentuais de mortalidade foram corrigidos pela fórmula de Abbott (Finney, 1981), quando no controle esta ocorreu entre 5% e 10%. Este procedimento torna-se importante pois permite separar a mortalidade natural da mortalidade decorrente do manuseio das larvas, no preparo de cada bioensaio.

$$\text{Fórmula de Abbott} = \frac{\% \text{ de mortalidade no tratamento} - \% \text{ de mortalidade do controle}}{100 \% - \% \text{ de mortalidade do controle}}$$

A análise dos dados foi avaliada estatisticamente por meio de retas de regressão linear para todos os intervalos de leitura, usando os valores de próbit esperados e obtidos através do programa POLO-PC (*LeOra Software*, 1987). Os valores de próbit observados foram calculados pela tabela de Finney (1981). A concentração letal mediana – CL₅₀ e a CL₉₀ também foram obtidas com auxílio do programa POLO – PC.

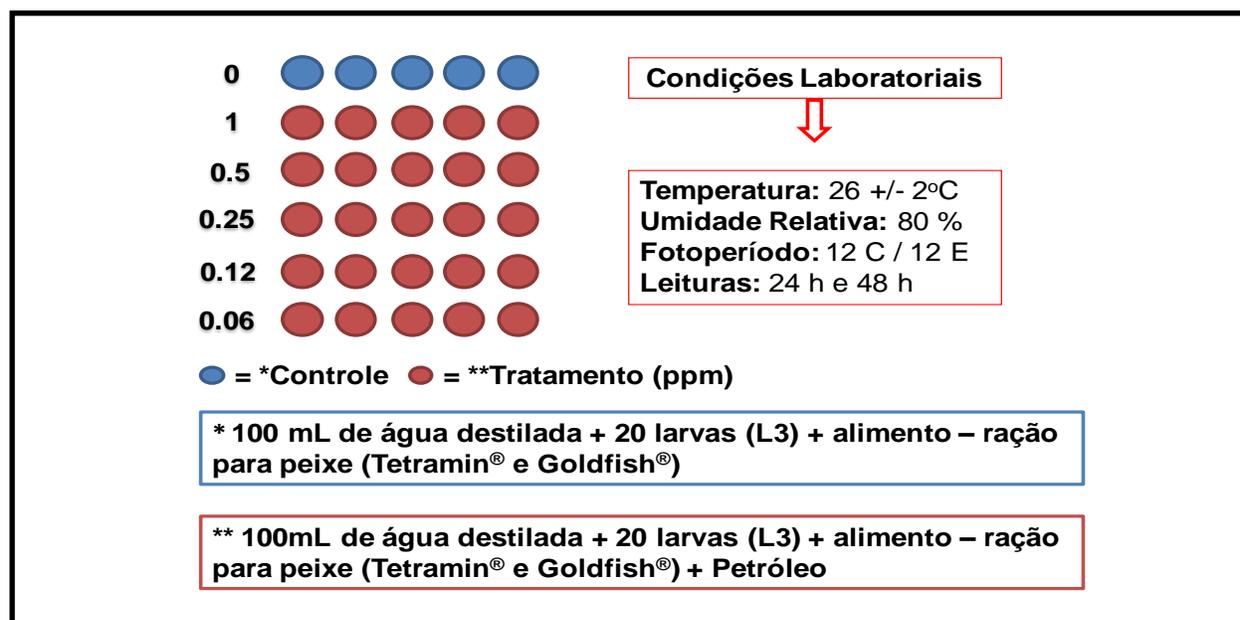


Figura 8: Representação esquemática dos bioensaios de toxicidade aguda.

3.5 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi formado por dois conjuntos de "pool" de 10 larvas (L4) de *A. darlingi*, coletadas na natureza. No primeiro, que constituiu o "Controle", as larvas foram mantidas por 24 horas no laboratório e, em seguida, foram congeladas para análise. O segundo conjunto no entanto, que constituiu o "Tratamento", as larvas foram expostas ao estresse produzido pelo petróleo, em condições de laboratório.

Para produzir em laboratório o estresse pelo petróleo, realizou-se um experimento em que as larvas foram expostas à menor concentração encontrada nos bioensaios para o cálculo da CL_{50} . Assim, as larvas foram expostas a esta concentração - 0,06 ppm durante duas horas e, em seguida, congeladas para a análise da expressão gênica. No armazenamento das larvas, tanto do Controle como do Tratamento, as larvas foram colocadas em solução aquosa de *RNA Later*, em microtubos criogênicos de 1,5 mL, a - 80°C.

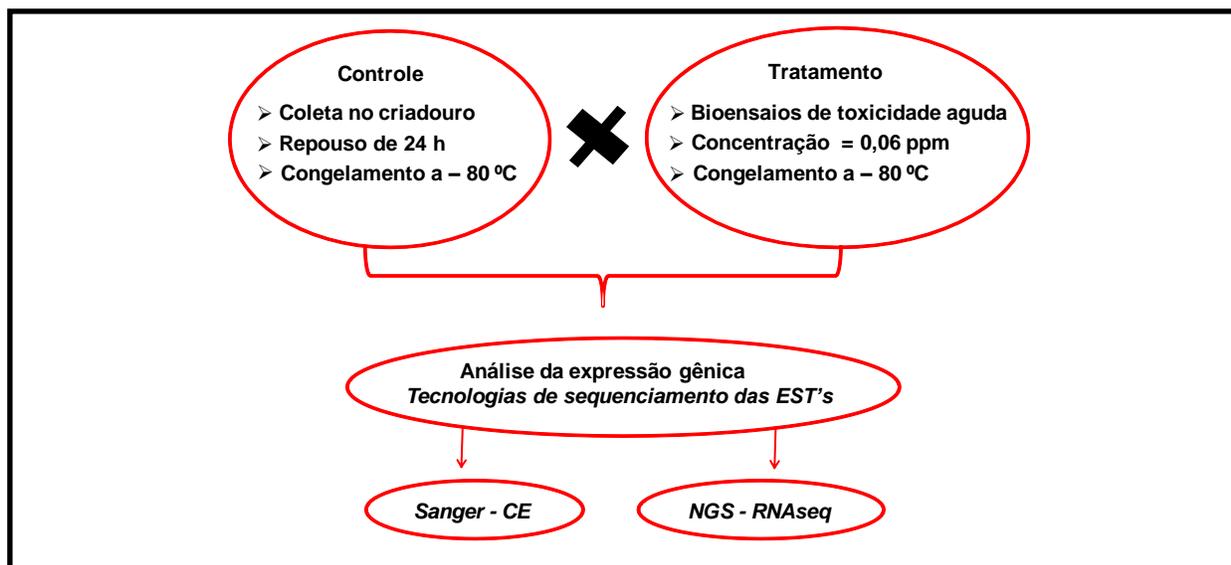


Figura 9: Representação esquemática do delineamento experimental.

3.6 Tecnologias de sequenciamento das *EST's*

As *EST's* foram sequenciadas por duas metodologias de sequenciamento, uma referente a primeira geração de sequenciadores automáticos baseando-se no princípio

manual de *Sanger* e a outra relacionada com a segunda geração de sequenciadores automáticos caracterizado como sequenciamento de larga escala.

3.6.1 Sequenciamento de *Sanger* - CE

A geração de *EST's* por essa metodologia correspondeu basicamente em cinco etapas: 1) Extração de RNA total, 2) Síntese de cDNA, 3) Construção das Bibliotecas de cDNA 4) Extração de DNA plasmidial e 5) Bioinformática.

3.6.1.1 Extração de RNA total

O RNA total das amostras Controle e Tratamento foram isolados utilizando o reagente *Trizol* (*Invitrogen Life Technologies*). As larvas (L4) foram descongeladas para a retirada da solução aquosa de *RNA Later* e colocadas em tubos de 1,5 mL contendo 250 μ L de *Trizol*. Depois da primeira maceração foi adicionado mais 250 μ L de *Trizol*, macerado novamente e posteriormente centrifugou-se a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante a outro tubo de 1,5 mL para a adição de 100 μ L de clorofórmio 100% (v/v) seguido de uma vortexação e centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (RNA) foi transferida a um novo tubo, adicionou-se 350 μ L de isopropanol 100% (v/v) e misturou-se por inversão acompanhada de uma centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Descartou-se o isopropanol 100% (v/v), os pellets resultantes foram lavados com 1 mL de etanol 75% (v/v) e centrifugados a 9000 rpm por 3 minutos a 4 °C). Removeu-se o etanol 75% (v/v) e aguardou-se secar os pellets de RNA, nos quais foram ressuspensos em 20 μ L de água destilada autoclavada.

Ao término das extrações as amostras de RNA total foram avaliadas (Figura 9) quantitativamente em aparelho espectrofotômetro *NanoDrop®* (*Thermo Scientific*) e qualitativamente a partir de uma eletroforese a 70 V por 40 minutos em gel de agarose não desnaturante 1.3% (m/v), corridas em tampão TAE (1X), EtBr (0,5 μ g / mL). O gel foi visualizado em transiluminador de luz U.V e a seguir as amostras armazenadas em freezer a - 80 °C.

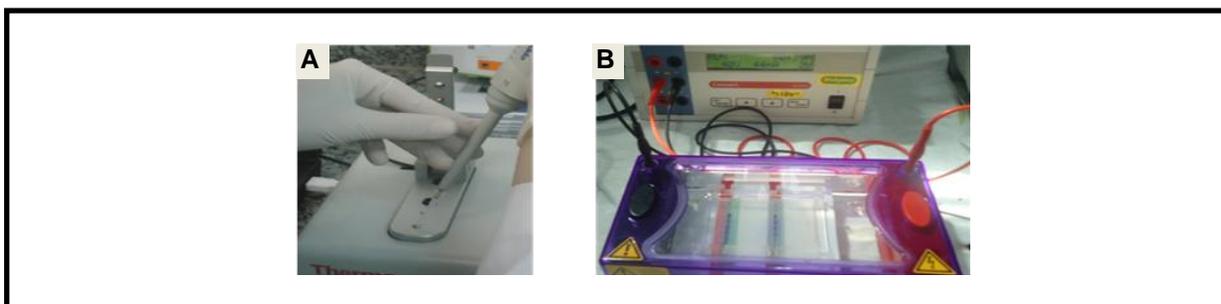


Figura 10: Fotografias da avaliação das amostras de RNA total. **A)** Nanodrop; **B)** Eletroforese em gel de agarose.

3.6.1.2 Síntese de cDNA

As amostras de RNA total foram convertidas em cDNA pela reação de RT-PCR, onde primeiro sintetizou-se a fita simples e depois a fita dupla de cDNA.

A síntese da fita simples de cDNA ocorreu na mistura em um tubo 0.2 mL nas seguintes etapas: RNA total 4 μL (2 μg), 2 μL de oligonucleotídeo dT e 9 μL de água destilada estéril

As amostras foram aquecidas a 70°C durante 5 minutos, depois colocadas no gelo por 1 minuto, centrifugadas a 5000 rpm por 1 minuto a 4 °C e em seguida adicionado: 5 μL do tampão 5X MMLV – RT, 1 μL da dNTP mix (10 mM), 1 μL de proteinase K (40 U/ μL), 1 μL da enzima *M-MLV transcriptase reversa* (200 U/ μL) e água destilada, obtendo um volume final de 25 μL por amostra.

Após a mistura por pipetagem, incubou-se no termociclador a 42°C durante 60 minutos e ao final desse processo as amostras foram quantificadas no *NanoDrop®* (*Thermo Scientific*) para verificar a concentração adequada e seguir com a síntese da fita dupla de cDNA.

A reação da fita dupla de cDNA ocorreu em uma PCR de 40 ciclos (1° estágio 1X - 96 °C, 2 minutos; 2° estágio 38X - 95 °C, 30 segundos; 50 °C, 50 segundos; 3° estágio 1X - 72 °C, 1 minuto). A reação de síntese da fita dupla correspondeu na adição dos seguintes componentes: cDNA fita simples (500 ng/ μL), 2 μL de tampão Taq Polimerase 10X, 1 μL de Taq Polimerase, 1 μL de MgCl_2 , 1 μL de dNTP mix (10 mM), 1

μL de oligonucleotídeo dT, 1 μL de primer hexâmero (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) - 5'(NNNNNN 3', onde N = G, A, T ou C), e água destilada autoclavada para um volume final de 20 μL .

Na finalização da síntese de cDNA realizou-se uma eletroforese (70 Volts/ 300 mA/ 40 minutos) em gel de agarose 1% (m/v), utilizando o tampão TAE (1X), *GelRedTM*, posteriormente o gel foi visualizado em transiluminador de luz U.V e a seguir as amostras foram armazenadas a - 20 °C.

3.6.1.3 Construção das Bibliotecas de cDNA

A construção das bibliotecas de cDNA correspondeu na clonagem molecular *in vivo* composta pelas etapas de ligação do cDNA ao vetor plasmidial e a sua multiplicação através da transformação genética em células bacterianas competentes. A primeira reação utilizou: 6 μL do tampão 5X de ligação, 1 μL da T4 DNA ligase, 3 μL do vetor pTZ57R/T (55 ng/ μL – Fermentas[®]), 3 μL de cDNA (100 ng/ μL), água destilada para o volume final de 30 μL e em seguida a reação de ligação foi incubada durante 2 horas em temperatura ambiente.

Após a ligação, as amostras foram transformadas utilizando células competentes da linhagem *E.coli Mos Blue* preparadas com cloreto de cálcio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O volume de total de cada ligação foi adicionado a uma alíquota de 200 μL da bactéria competente. As bactérias permaneceram no gelo por 30 minutos, seguido de um choque térmico de 42°C por 40 segundos e em seguida colocada no gelo durante dois minutos. Após o choque térmico foram adicionados em cada tubo 800 μL de meio LB líquido sem antibiótico, levados a estufa 37 °C e incubados por 1 hora. Decorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos a 25° C, o excesso do meio de cultura foi descartado e o precipitado foi estriado em placas de Petri contendo 30 mL de LB sólido com tetraciclina (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e carbenicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Além dos antibióticos, adicionou-se em cada placa 30 μL de IPTG (1M) e X-Gal (20 mg/mL) para seleção de colônias transformadas (vetores com inserto) das não-transformadas (vetores sem inserto) e a seguir as placas foram incubadas a 37° C durante 18 a 22 horas.

3.6.1.4 Extração de DNA plasmidial

Foram selecionadas as colônias brancas (transformadas) de cada amostra e isoladas individualmente em tubos *Falcon* de 15 mL, contidos de meio LB líquido com carbenicilina (50 µg/mL) e colocados sob agitação de 220 rpm a 37° C por 22 horas.

As células cultivadas em tubo de 15 mL foram transferidas para tubos de 1,5 mL no gelo e centrifugadas (12000 rpm por 3 minutos a 25 °C). Em seguida, o meio foi removido deixando o precipitado seco. O pellet foi ressuscitado em 100 µL de solução I gelada (Glicose 50mM; Tris-HCl 25mM, pH 8,0; EDTA 10mM) utilizando o vortex e incubadas por 5 minutos. Feito isto, adicionou-se 200 µL da solução II (0,2N NaOH; SDS 1% (m/v)) misturada por inversão e incubada por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 150 µL de solução III (60 mL de acetato de potássio 5M; 11,5 mL de ácido acético; água para um volume final de 100 mL), misturado por inversão e incubado no gelo por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas (12000 rpm por 10 minutos a 25 °C) e o sobrenadante transferido para um tubo limpo.

O sobrenadante foi lavado com etanol 100% (v/v), incubado por 5 minutos e centrifugado (12000 rpm por 10 minutos a 25 °C). O etanol foi removido e o pellet lavado com etanol 70% (v/v) seguido de uma centrifugação (9000 rpm por 5 minutos a 25 °C). Foi descartado o álcool e colocado para secar, em seguida ressuscitado com 40 µL de água destilada estéril.

Ao término das extrações foram quantificadas no Nanodrop e verificadas em uma eletroforese (70 Volts/ 300 mA/ 40 minutos) em gel de agarose 1% (m/v) corado com GelRed™, corrido em tampão TAE 1X por 30 minutos e visualizado sob luz ultravioleta.

Os clones recombinantes foram purificados com o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega®) de acordo com as instruções do fabricante, e em seguida estocados a - 20 °C para serem sequenciados.

3.6.1.5 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pelo sequenciador automático de 4 capilares (*ABI 3130 Sequence Analyzer - Applied Biosystems*) usando o kit *Big Dye Terminator v3.1*,

primeiro fez-se a reação de sequenciamento em uma PCR e posteriormente a precipitação da placa.

A reação de sequenciamento consistiu na adição de 1,0 μL de Big Dye v3.1 (*Applied Biosystems*), 1 μL de tampão Big Dye 2X, 2 μL DNA plasmidial (100 ng) e 1 μL do primer M13 PUC forward 5' (GTAAAACGACGGCCAGT) 3' (10 pmol/ μL) em placa de 96 poços. As condições termociclagem foram: 96° C por 2 minutos e 39 ciclos de 96° C por 30 segundos, 50° C por 20 segundos e 60° C por 4 minutos.

Ao final da reação realizou-se a precipitação da placa, adicionando 40 μL de isopropanol 65% (v/v), deixando 15 minutos protegida da luz e em gelo. Centrifugou-se (45 minutos a 4000 rpm à 25° C). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e em cada poço adicionado 80 μL de etanol 60% (v/v) seguida de uma centrifugação (5 minutos a 4000 rpm à 25° C). O sobrenadante foi descartado e as amostras secas por 30 minutos a 37° C, protegido da luz.

As amostras foram ressuspendidas em 10 μL de formamida *Hi-Di* (*Applied Biosystems*), aquecida a 95° C por 5 minutos, levadas ao gelo por mais 2 minutos e colocadas para sequenciar.

3.6.1.6 Bioinformática

As sequências obtidas foram analisadas nos diferentes softwares para atribuições de qualidade (*Phred*), agrupamento (*Phrap*) e geração de *contigs* (*CAP3*). Na atribuição da qualidade das sequências foram considerados apenas os valores de qualidade superior a 20 - *Phred* >20, ou seja, foi considerado no máximo um erro a cada 100 bases sequenciadas (PROSDOCIMI, 2006).

Os *contigs* foram enviados para o programa *BLAST2GO* (Disponível no site <http://www.blast2go.com/b2glaunch>) por meio da ferramenta *BLASTn* através da busca de homologia e similaridade das sequências e *BLASTx* para a anotação funcional e submissão automática das sequências no GO.

3.6.2 Sequenciamento NGS – RNAseq

O sequenciamento das *EST's* pela tecnologia *NGS-RNA-seq* utilizou a plataforma *Illumina*, sendo constituído por quatro etapas básicas: 1) Extração de RNA total, 2) Construção das Bibliotecas de cDNA, 3) Sequenciamento e 4) Bioinformática.

As etapas de extração de RNA total foi realizada no LEGGQB-UNL e as amostras extraídas foram enviadas ao ESALQ – USP para a realização dos procedimentos de construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento. Após a geração dos dados do sequenciamento, as análises de bioinformática foram realizadas no LEGGQB-UNL.

3.6.2.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total das amostras utilizadas nesta tecnologia de sequenciamento de *EST's*, foi realizada conforme os procedimentos descritos no protocolo de extração de RNA total para as amostras do sequenciamento de *Sanger – CE*.

3.6.2.2 Construção das Bibliotecas de cDNA

A inovação dessa plataforma consiste na construção das bibliotecas de cDNA através da clonagem *in vitro* dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, processo também conhecido como *PCR* de fase sólida (FEDURCO et al., 2006; TURCATTI et al., 2008). A superfície de clonagem (*flow cells*) é dividida em oito linhas, podendo ser utilizadas para o sequenciamento de até oito bibliotecas. Em cada linha, adaptadores são fixados à superfície pela extremidade 5', deixando a extremidade 3' livre para servir na iniciação da reação de sequenciamento dos fragmentos imobilizados no suporte por hibridização.

Os fragmentos de DNA da amostra são também ligados aos adaptadores em ambas as extremidades, permitindo sua fixação ao suporte de sequenciamento por hibridização a um dos adaptadores fixados. No primeiro ciclo de amplificação, nucleotídeos não marcados são fornecidos para iniciar a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado no suporte. A alta densidade de adaptadores no suporte facilita a hibridização do adaptador livre dos fragmentos imobilizados a sua sequência complementar fixa perto do clone inicial durante o ciclo de anelamento. Após o ciclo de

anelamento, o fragmento forma uma estrutura em “ponte” na superfície de sequenciamento e a extensão ocorre, formando a fita complementar também em “ponte”. No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. Esses ciclos são repetidos 35 vezes e assim cerca de mil cópias geradas de cada fragmento nessa PCR de fase sólida permanecem próximas umas das outras, formando um *cluster* de sequenciamento. As etapas de desnaturação são necessárias para a separação dos duplex formados e, nos próximos ciclos de amplificação, nucleotídeos terminadores marcados são fornecidos para as reações de sequenciamento ocorridas dentro de cada *cluster*.

A alta densidade dos *clusters* de sequenciamento possibilita o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata. Até 50 milhões de *clusters* podem ser produzidos por linha, correspondendo a uma representação satisfatória da biblioteca. Após a incorporação de cada nucleotídeo no fragmento em síntese, a leitura do sinal de fluorescência é realizada. Em seguida, ocorre uma etapa de lavagem para remoção dos reagentes excedentes e remoção do terminal 3' bloqueado e do fluoróforo do nucleotídeo incorporado no ciclo anterior para que a reação de sequenciamento prossiga. A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo de sequenciamento. Em geral, leituras de 25-35 bases são obtidas de cada *cluster* (SHENDURE; JI, 2008).

3.6.2.3 Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado no Departamento de Zoologia da ESALQ/ USP, onde utilizaram a plataforma de sequenciamento *HiSeq™ Sequencing Systems* (Illumina®).



Figura 11: *HiSeq™ Sequencing Systems*. Fonte: www.illumina.com

3.6.2.3 Bioinformática

As sequências geradas do sistema de sequenciamento *HiSeq (Illumina®)* foram transformadas em arquivos *FastQC* para avaliar o controle de qualidade das bibliotecas Controle e Tratamento. Cada biblioteca construída foi transformada em arquivos *SAM* e *BAM* usando o software *GALAXY*. O formato *SAM* foi utilizado no software *ARTEMIS* para visualizar o alinhamento com o genoma de referência *A. gambiae*, também foi utilizado para obter os *reads* com o auxílio do software *TABLET* e fazer a contagem destes no genoma (Figura 12).

Após as análises dos *reads* realizou-se o processo de anotação via internet http://metazoa.ensembl.org/Anopheles_gambiae/Gene/ (Figura 13).

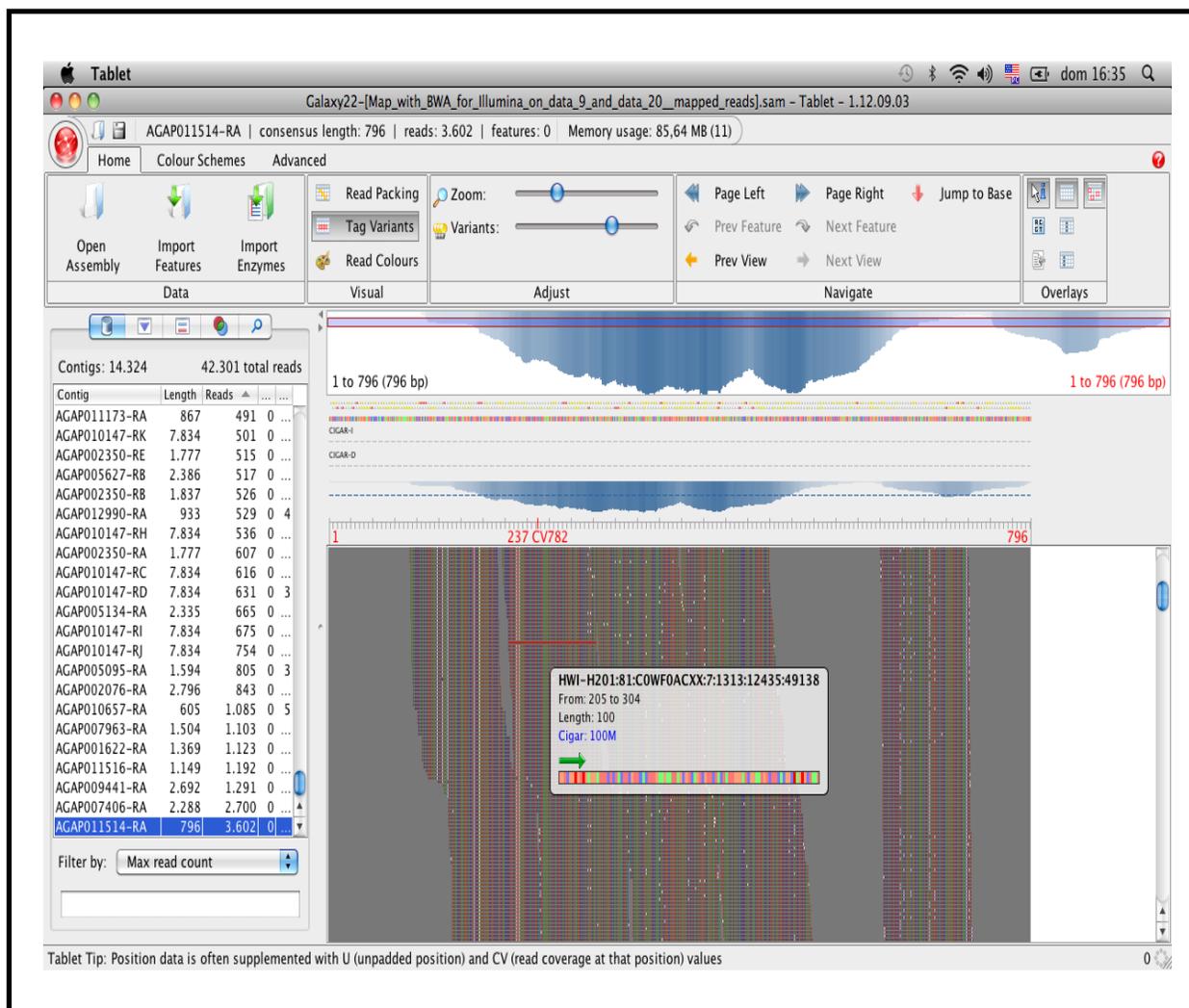


Figura 12: Alinhamento com o genoma de referência *Anopheles gambiae* para a obtenção dos *reads*.

The screenshot shows the Ensembl Metazoa interface for the transcript AGAP007406-RA. The browser address bar shows the URL: http://metazoa.ensembl.org/Anopheles_gambiae/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=AGAP007406;r=2L:463374. The page title is "Ensembl genome browser 15: Anopheles gambiae - Protein summary - Transcript: AGAP007406-RA".

The main content area displays the following information:

- Transcript: AGAP007406-RA**
- Location:** Chromosome 2L: 46,337,490-46,341,061 forward strand.
- Gene:** This transcript is a product of gene [AGAP007406](#) - This gene has 1 transcript

A table lists the protein products:

Name	Transcript ID	Length (bp)	Protein ID	Length (aa)	Biotype
Novel	AGAP007406-RA	2288	AGAP007406-PA	463	Protein coding

The "Protein summary" section shows the Ensembl version as AGAP007406-PA.1. It displays a protein domain architecture with the following domains and their associated databases:

- TIGRFAM domain:** [Transl_elong_EF1A_euk/arc](#) (TIGR00483 (TIGRfam))
- Superfamily domain:** [52540](#) (View record [TIGR00483](#))
- Prints domain:** [PR00315 \(Prints\)](#) (View record [IPR004539](#))
- Pfam domain:** [View record \[PR00315\]\(#\)](#) (View [IPR004539](#) InterPro)
- PROSITE pattern:** [View InterPro \[IPR000795\]\(#\)](#) (View record [PS00301 \(Prosite_patterns\)](#))
- Sequence variants (a...):** Description [ProtSyn_GTP-bd](#) (Description [Transl_elong_EF1A_euk/arc](#))
- Scale bar:** Position 9-22 aa (Position 1-446 aa)
- Variation Legend:** ■ Synonymous variant

Figura 13: Anotação funcional dos *reads* obtidos com o genoma de referência *Anopheles gambiae* contra o banco de dados EBI.

4. RESULTADOS

4.1 Bioensaios de Toxicidade Aguda

Os bioensaios de toxicidade aguda realizados em condições de laboratório estabeleceram a CL_{50} e a CL_{90} em larvas de *A. darlingi* no terceiro estágio (L3) expostas ao petróleo, a partir das concentrações 1 ppm, 0,5 ppm, 0,25 ppm, 0,12 ppm e 0,06 ppm com os tempos de leitura de 24 e 48 horas.

A tabela 1 apresenta o número de larvas (L3) mortas e sua transformação em porcentagem de mortalidade observada, a CL_{50} e a CL_{90} calculadas nos intervalos de confiança (IC) de $IC_{99\%}$ para 24 horas e $IC_{95\%}$ para 48 horas respectivamente, em cada período de exposição tóxica. No período de 24 horas pode-se observar a concentração dos maiores índices de mortalidade, estando 1 ppm, 0,5 ppm e 0,25 ppm nas concentrações relacionadas aos altos níveis de toxicidade e as concentrações de 0,12 ppm e 0,06 ppm associadas com os níveis baixos de toxicidade.

Tabela 1: Mortalidade das larvas de *Anopheles darlingi* em diferentes concentrações de petróleo.

Concentração de petróleo (ppm)	Nº de larvas expostas	Mortalidade Observada		CL_{50} (ppm)		CL_{90} (ppm)			
		Leituras – Horas							
		24		48		24	48	24	48
		Nº	%	Nº	%	$IC_{99\%}$	$IC_{95\%}$	$IC_{99\%}$	$IC_{95\%}$
1	300	294	98	300	100				
0,5	300	282	94	300	100				
0,25	300	228	76	282	94	0,32	0,13	2,69	0,39
0,12	300	82	27,3	156	52				
0,06	300	14	4,6	80	26,6				

Considerando a comparação da mortalidade nas leituras de 24 e 48 horas, em cada concentração de petróleo, na tabela 2 constam os dados referentes ao teste de hipótese para cada concentração de acordo com os tempos de leituras. A hipótese de igualdade foi rejeitada, enquanto, a hipótese de paralelismo aceita, onde os valores de

qui-quadrado ($X^2 = 141,88$) foram significativos para o primeiro teste e não significativos para o segundo ($X^2 = 1,02$). Desse modo, os dados possuem aderência ao modelo de próbit.

Tabela 2: Teste de hipótese.

Leituras (Horas)	Concentração (ppm)	Hipótese de igualdade	X^2	g.l	P
24 / 48	1	Rejeita	141,88	2	$P < 0,000$
	0,5				
	0,25				
	0,12				
	0,06				
Leituras (Horas)	Concentração (ppm)	Hipótese de paralelismo	X^2	g.l	P
24 / 48	1	Aceita	1,02	1	$P > 0,312$
	0,5				
	0,25				
	0,12				
	0,06				

Nas tabelas 3 e 4 constam os dados da análise de próbit necessários para a construção do gráfico da figura 11, calculados no programa POLO PC e pela transformação em próbit da porcentagem de mortalidade observada em cada concentração de petróleo de acordo com a tabela de Finney (1972). Tem-se a equação de regressão geral, a log dose, a verossimilhança e o coeficiente angular. Na tabela 4, estão os valores de observado e esperado. O próbit observado oriundo da tabela de Finney (1971) e o esperado calculado a partir da equação de regressão geral apresentado na tabela 3.

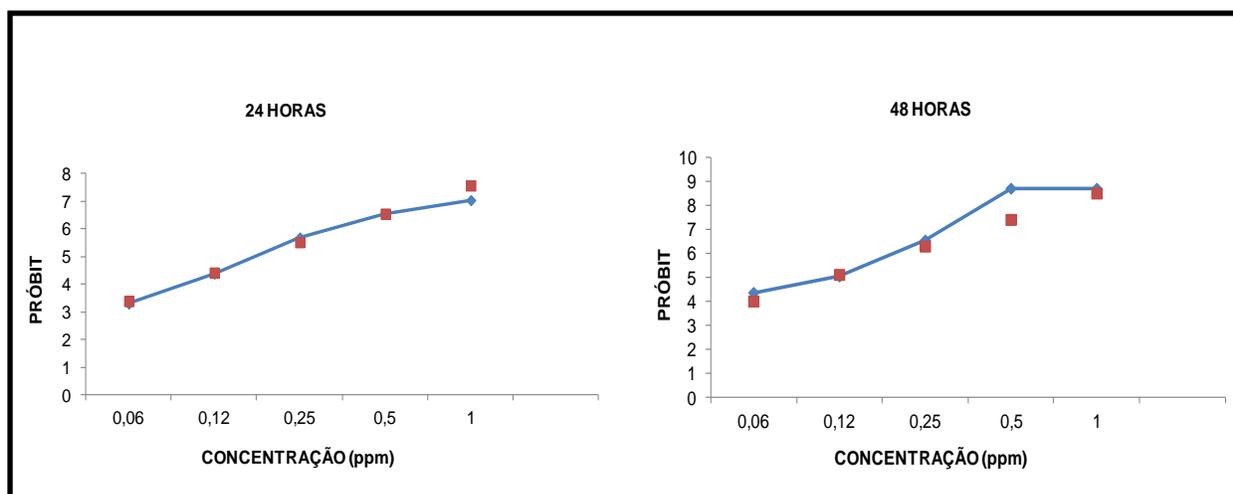
Tabela 3: Dados da análise de próbit.

Concentração de petróleo (ppm)	Equação de regressão geral	Log dose (x)		Verossimilhança (a)		Coeficiente angular (b)	
		Leituras - Horas					
		24	48	24	48	24	48
1		0	0				
0,5	$y = 5 + a + bx$	-0,3	-0,3	2,58	3,61	3,43	3,69
0,25		-0,6	-0,6				
0,12		-0,92	-0,92				
0,06		-1,22	-1,22				

Tabela 4: Valores de próbit.

Leituras - Horas	24		48	
Concentração de petróleo (ppm)	Próbit observado	Próbit esperado	Próbit observado	Próbit esperado
1	7,05	7,58	8,71	8,51
0,5	6,55	6,56	8,71	7,41
0,25	5,7	5,53	6,55	6,3
0,12	4,39	4,43	5,05	5,12
0,06	3,31	3,4	4,37	4,01

A figura 14 representa o gráfico da análise de próbit, onde demonstra através das linhas de regressão a ausência da hipótese de igualdade e a presença da hipótese de paralelismo. Com isso, os coeficientes angulares das regressões não são significativamente diferentes e as concentrações de petróleo são qualitativamente iguais, porém quantitativamente diferentes.

**Figura 14:** Gráfico da análise de próbit expressa em linhas de regressão.

Além das observações de mortalidade, verificaram-se algumas características sintomatológicas das larvas (L3) quando expostas a alta toxicidade de petróleo (1 ppm, 0,5 ppm e 0,25 ppm). Foi considerado principalmente o movimento das larvas na água e as alterações na coloração do tegumento, (Figura 13). Após os primeiros instantes da aplicação do petróleo, notou-se a presença de leves espasmos no lobo abdominal, a

paralisação gradual dos movimentos na água e o enegrecimento do tegumento na cor de carvão.

Vale ressaltar ainda na figura 15 o aspecto visual formado pelo petróleo, apresentado sob a forma de película dispersa na camada laminar da água dificultando a respiração das larvas.

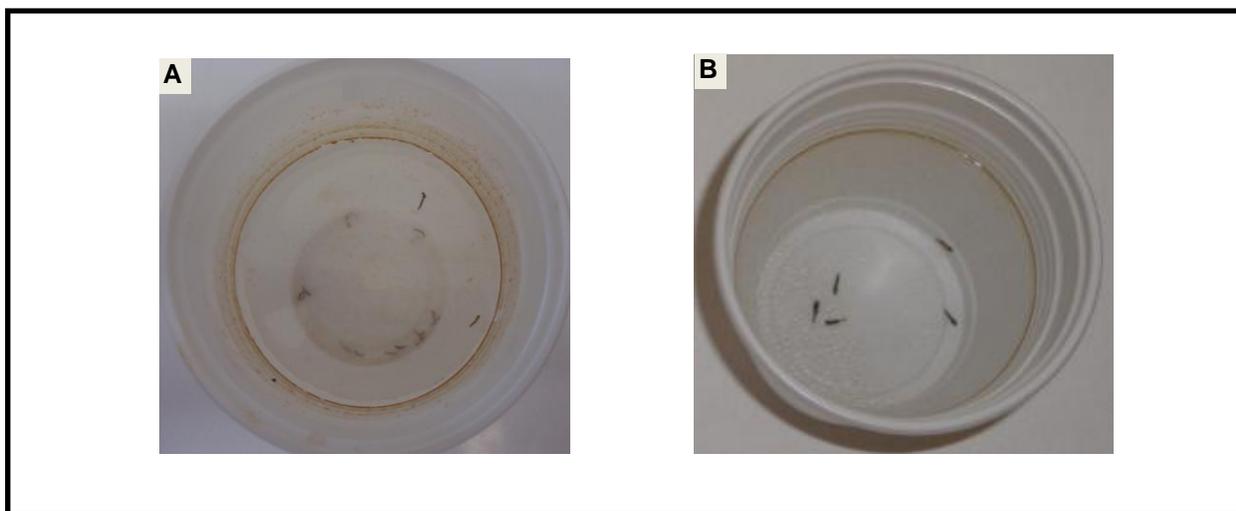


Figura 15: Aspecto macroscópico da água com as larvas (L4) de *Anopheles darlingi* expostas ao petróleo. **A)** L4 mortas; **B)** Película de petróleo formada.

A concentração 0,06 ppm por demonstrar a menor mortalidade (4,6%) foi selecionada para compor as amostras sob estresse produzido pelo petróleo (Tratamento) utilizadas no delineamento experimental para a análise da expressão gênica.

4.2 Tecnologias de Sequenciamento das *EST's*

No total foram sequenciadas quatro bibliotecas de cDNA para a análise de *EST's* em larvas (L4) de *A. darlingi* nas condições naturais (Controle) e sob estresse produzido pelo petróleo (Tratamento). Destas bibliotecas de cDNA construídas, duas

foram provenientes do sequenciamento de *Sanger - CE* e as duas demais pela tecnologia de sequenciamento *NGS - RNAseq*.

4.2.1 Sequenciamento de *Sanger - CE*

Das duas bibliotecas sequenciadas, uma foi das larvas em condições naturais (Biblioteca - Controle) e a outra sob estresse pelo petróleo (Biblioteca - Tratamento).

O RNA total extraído apresentou boa qualidade e a concentração média obtida em 1000 ng/μL, esses parâmetros de avaliação qualitativa e quantitativa foram realizados respectivamente através da integridade das bandas de rRNA - 28S e 18S por meio de uma eletroforese de gel de agarose (Figura 16) e a razão de 1,9 a 2,0 na absorbância visualizadas nos picos de espectrofotometria.

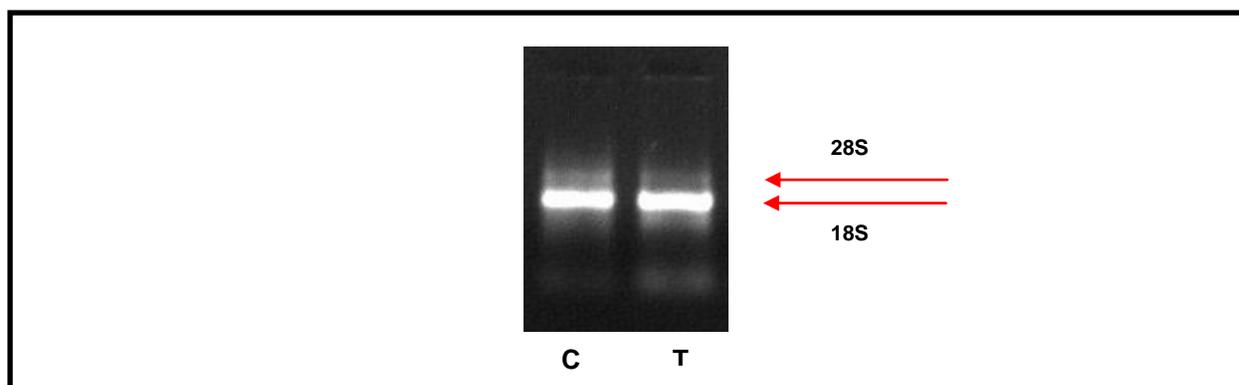


Figura 16: Integridade do RNA total a partir das bandas de rRNAs das amostras utilizadas no sequenciamento de *Sanger - CE*, em eletroforese em gel de agarose 1%. **C)** Controle; **T)** Tratamento.

Para a síntese de cDNA é necessária uma concentração média de 0,5 μg/μL a 1 μg/μL de RNA total. O RNA total das amostras extraídas apresentaram boas concentrações, e com isso, obteve-se aproximadamente 800 ng/μL de cDNA nas condições Controle e Tratamento. A qualidade foi observada em eletroforese em gel de agarose e pela razão 1,8 a 1,9 no espectrofotômetro (Figura 17).

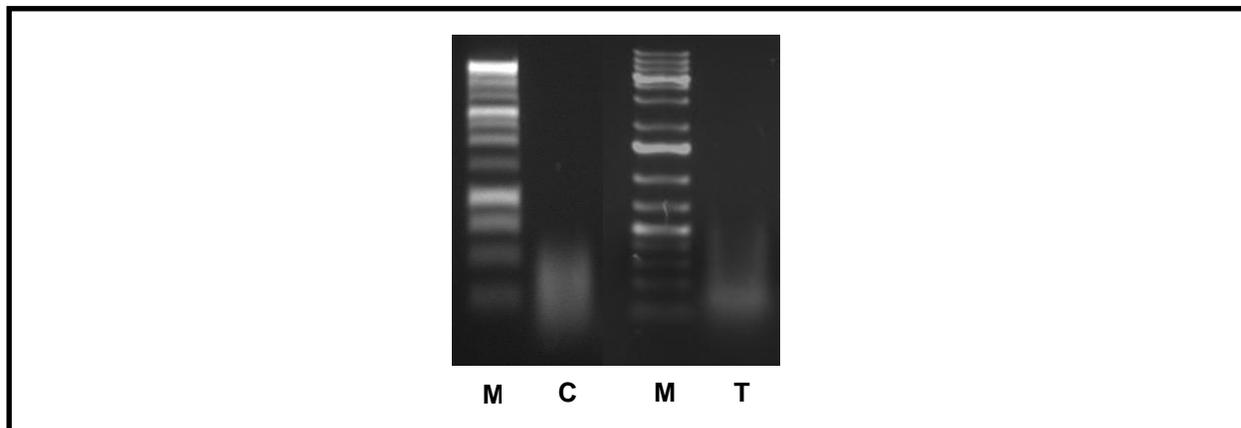


Figura 17: Amostras de cDNA Controle e Tratamento utilizadas na clonagem molecular, visualizadas em eletroforese em gel de agarose 1%. **M)** Marcador molecular 1kb; **C)** Controle; **T)** Tratamento.

Na figura 18, observa-se o perfil eletroforético dos clones recombinantes obtidos das bibliotecas de cDNA sequenciados.

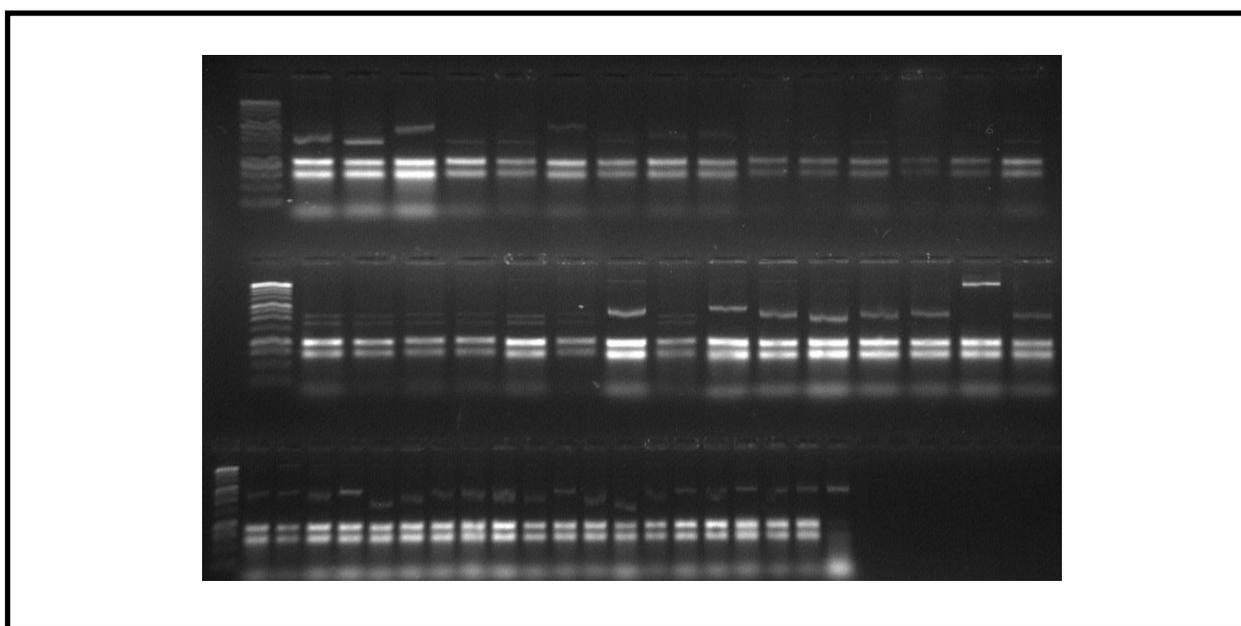


Figura 18: Perfil dos clones recombinantes Controle e Tratamento, visualizados em eletroforese em gel de agarose 1%.

Os dados de expressão gênica obtidos através das *EST's* com o sequenciamento de *Sanger – CE* estão apresentados nas tabelas 16 e 17, onde tem-se a identificação

das *EST's* do trabalho em correspondência com a descrição de similaridade contida no banco de dados *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. A tabela 5 apresenta as *EST's* comuns (Biblioteca – Controle e Tratamento), enquanto, a tabela 6 apresenta as *EST's* expressas na condição de estresse pelo petróleo (Biblioteca – Tratamento).

Tabela 5: EST's de *Anopheles darlingi* das bibliotecas Controle e Tratamento analisadas pelo software BLAST2GO.

Identificação	Descrição	Hits	e-Value	Similaridade (%)
MRPS-C1	<i>entamoeba histolytica hm-1:imss wh2 motif domain contaning mrna</i>	1	0.28646	88.0
MRPS-C2	<i>atraxaxis irtyschensis trna-leu partial sequence trnl-trnf intergenic complete sequence and trna-phe partial sequence chloroplast</i>	19	3,94E+01	88.0
MRPS-C3	<i>mus musculus targeted ko- conditional lacz-tagged mutant allele atp2b2:tm1a wtsi transgenic</i>	4	0.65962	77.5
MRPS-C4	<i>glycine max ein3-binding f-box protein 1- transcript variant 1 mrna</i>	2	0.186995	83.5
MRPS-C5	<i>buchnera aphidicola 5a (acyrthosiphon pisum) complete genome clostridium botulinum b eklund 17b complete chromosome</i>	19	9,59E+00	81.3
MRPS-C6	<i>sequence</i>	18	0.0115176	81.3

Tabela 6: EST's de *Anopheles darlingi* das bibliotecas Tratamento analisadas pelo software BLAST2GO.

Identificação	Descrição	Hits	e-Value	Similaridade (%)
MRPS-T7	<i>dacus demmerezi nadh dehydrogenase subunit 1 partial cds mitochondrial</i>	3	0.0550188	79.3
MRPS-T8	<i>bombus terrestris pecanex-like protein 1-like mrna</i>	19	0.0570706	82.4
MRPS-T9	<i>bombus impatiens phenoloxidase subunit a3-like mrna</i>	20	2,57E+00	87.65
MRPS-T10	<i>brugia malayi mak16 protein partial mrna</i>	1	0.605461	86.0
MRPS-T11	<i>pan troglodytes obg-like atpase transcript variant 2 mrna</i>	1	0.194024	86.0
MRPS-T12	<i>brachypodium distachyon heat stress transcription factor a-4d-like mrna</i>	6	0.0591224	85.3
MRPS-T13	<i>picea sitchensis genotype q903 (+)-3-carene synthase (tps-3car3) tps-3car3 complete cds</i>	5	0.972997	86.6
MRPS-T14	<i>mus musculus procollagen- 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase) alpha polypeptide iii mrna</i>	12	0.100651	89.9
MRPS-T15	<i>paracoccidioides brasiliensis pb01 atp-citrate- mrna</i>	3	0.590649	83.3
MRPS-T16	<i>homo sapiens nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein numatrin) pseudogene on chromosome 15</i>	14	0.00444448	80.8
MRPS-T17	<i>homo sapiens isolate scnn1b-vi-t amiloride-sensitive sodium channel subunit complete alternatively spliced</i>	20	0.0178097	81.45
MRPS-T18	<i>mus musculus pleckstrin homology-like family member 2 transcript variant mrna</i>	18	1,23E-17	80.0
MRPS-T19	<i>homo sapiens suppression of tumorigenicity 5 transcript variant mrna</i>	20	0.702206	85.35
MRPS-T20	<i>medicago truncatula salt-tolerance protein complete cds</i>	5	0.0180384	81.0
MRPS-T21	<i>leptosphaeria maculans jn3 citrinin biosynthesis oxydoreductase () complete cds</i>	5	0.0550568	80.6

4.2.2 Sequenciamento *NGS-RNAseq*

Na figura 18 tem-se a integridade das amostras de RNA total utilizadas pelo sistema de sequenciamento *RNAseq da Illumina*, também obteve-se a concentração média de 1000 ng/μL com a razão entre 1,9 a 2,0 da absorbância nos picos de espectrofotometria.

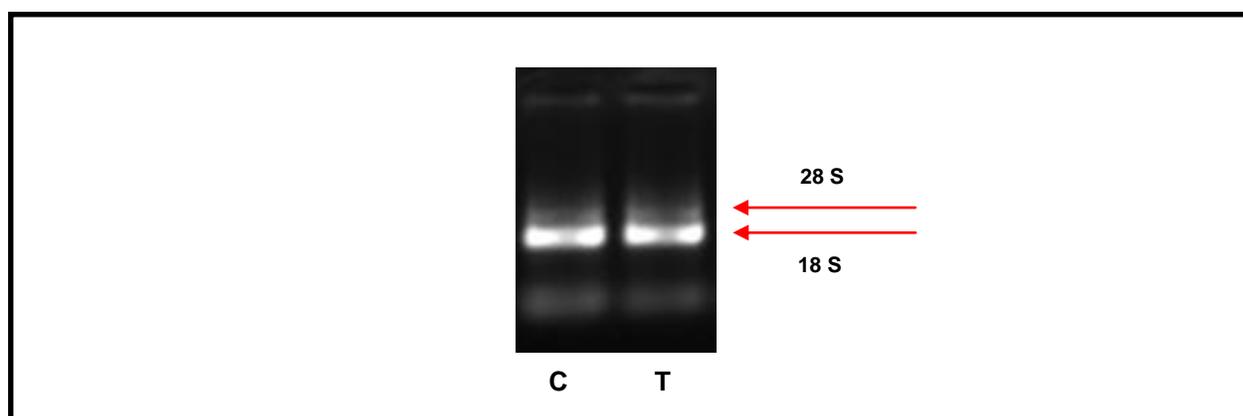


Figura 19: Integridade das amostras de RNA total utilizadas no sequenciamento *NGS - RNAseq* a partir das bandas de rRNA 28S e 18S, visualizadas em uma eletroforese em gel de agarose 1%.
C) Controle; **T)** Tratamento.

As bibliotecas de cDNA sequenciadas pela tecnologia *RNAseq Illumina* gerou 4.180.000 (Biblioteca - Controle) e 4.136.000 (Biblioteca - Tratamento) *reads* válidos, ambas sequenciadas nos sentidos *forward* e *reverse*. Os dados de controle de qualidade das bibliotecas encontram-se na tabela 7.

Tabela 7: Controle de qualidade das bibliotecas gerado pelo software *FastQC*.

Biblioteca	Total de seqüências	Tamanho da seqüência (pb)	Conteúdo de GC (%)
Controle - INPA 01	6137281	100	52
Tratamento - INPA 02	5859359	100	49

A identificação e validação dos genes expressos a partir das *EST's* do sequenciamento *NGS – RNAseq* estão apresentados nas tabelas 8, 9, 10 e 11. As tabelas apresentam as identificações dos *contigs* com suas respectivas funções, nas quais encontram-se anotadas no banco de dados *European Bioinformatics Institute (EBI)*.

As tabelas 8 e 9 apresentam os genes expressos das larvas de *A. darlingi* em condições normais (Biblioteca - Controle), enquanto, as tabelas 10 e 11 constam os genes expressos das larvas sob condições de estresse produzido pelo petróleo (Biblioteca - Tratamento).

Tabela 8: Anotação das *EST's* de *Anopheles darlingi* geradas da biblioteca Controle analisada pelo banco de dados *EBI*.

Identificação	Contig	N° de Reads	Código EBI	Função
MRPNC - 01	AGAP011173-RA	491	IPR022803	<i>Ribosomal protein</i>
	AGAP012990-RA	529	IPR005680	
	AGAP009441-RA	1291	IPR020568	
	AGAP003532-RA	713	IPR001593	
	AGAP002921-RA	587	IPR000509	
	AGAP002921-RB	599	IPR000509	
	AGAP002921-RB	599	IPR000509	
	AGAP011298-RA	468	IPR023674	
	AGAP007157-RA	581	IPR011332	
AGAP009441-RA	623	IPR009000		
MRPNC - 02	AGAP002350-RB	526	IPR000533	<i>Tropomyosin</i>
	AGAP002350-RA	607	IPR000533	
MRPNC - 03	AGAP010147-RK	501	IPR009053	<i>Prefoldin</i>
	AGAP010147-RH	536	IPR009053	
	AGAP010147-RC	616	IPR009053	
	AGAP010147-RD	631	IPR009053	
	AGAP010147-RI	675	IPR009053	
	AGAP010147-RJ	754	IPR009053	
	AGAP010147-RK	501	IPR009053	
	AGAP010147-RJ	735	IPR009053	
	AGAP010147-RD		IPR009053	
	AGAP010147-RG	593	IPR009053	
	AGAP010147-RI	619	IPR009053	
	AGAP010147-RB	586	IPR009053	
MRPNC - 04	AGAP005095-RA	805	IPR004000	<i>Actin Like</i>
	AGAP011516-RA	1192	IPR004000	
	AGAP007406-RA	2700	IPR004000	
	AGAP002350-RD	913	IPR004000	
	AGAP011515-RA	901	IPR004000	
MRPNC - 05	AGAP005134-RA	665	IPR005294	<i>ATPase</i>
	AGAP006186-RE	817	IPR001757	
	AGAP006186-RD	755	IPR001757	
	AGAP006186-RC	740	IPR001757	
	AGAP005134-RA	724	IPR000793	
	AGAP006186-RA	716	IPR005782	

Tabela 9: Anotação das *EST's* de *Anopheles darlingi* geradas da biblioteca Controle analisadas pelo banco de dados *EBI*.

Identificação	Contig	N° de Reads	Código EBI	Função
MRPNC - 06	AGAP007963-RA	1103	IPR002048	<i>Calcium-binding EF-hand</i>
	AGAP001622-RA	1123	IPR002048	
MRPNC - 07	AGAP011514-RA	3602	IPR016024	<i>Armadillo-Type fold</i>
	AGAP002350-RE	515	IPR016024	
MRPNC – 08	AGAP001218-RA	770	IPR003008	<i>Tubulin</i>
	AGAP001219-RA	752	IPR003008	
MRPNC - 09	AGAP002076-RA	843	IPR013126	<i>Heat shock protein – Hsp 70</i>
	AGAP002076-RA		IPR013126	
MRPNC – 10	AGAP005627-RB	517	IPR022413	<i>ATP:guanido phosphotransferase</i>
MRPNC – 11	AGAP010657-RA	1085	IPR005204	<i>Hemocyanin</i>
MRPNC – 12	AGAP005947-RA	741	IPR009068	<i>RNA-binding</i>
MRPNC – 13	AGAP001799-RA		IPR005827	<i>Potassium channel</i>
MRPNC – 14	AGAP0133742-RA	760	IPR000626	<i>Ubiquitin</i>

Tabela 10: Anotação das *EST's* de *Anopheles darlingi* geradas da biblioteca Tratamento analisadas pelo banco de dados *EBI*.

Identificação	Contig	Nº de Reads	Código EBI	Função
MRPNT – 15	AGAP011514-RA	11788	IPR004000	<i>Actin-like</i>
	AGAP011516-RA	5644	IPR004000	
	AGAP005095-RA	3880	IPR004000	
	AGAP011515-RA	901	IPR004000	
	AGAP005095-RA	1379	IPR004000	
	AGAP011516-RA	2132	IPR004000	
MRPNT – 16	AGAP011514-RA	6891	IPR004000	<i>ATP:guanido phosphotransferase</i>
	AGAP005627-RC	1141	IPR022413	
	AGAP005627-RA	1131	IPR022413	
	AGAP005627-RD	1117	IPR022413	
	AGAP005627-RB	1101	IPR022413	
	AGAP005627-RA	932	IPR022413	
	AGAP005627-RC	938	IPR022413	
MRPNT – 17	AGAP002350-RA	1595	IPR000533	<i>Tropomyosin</i>
	AGAP002350-RB	1387	IPR000533	
	AGAP002350-RB	1006	IPR000533	
	AGAP002350-RA	1159	IPR000533	
	AGAP002350-RB	1006	IPR000533	
MRPNT – 18	AGAP002350-RC	925	IPR016024	<i>Armadillo-type fold</i>
	AGAP002350-RD	913	IPR016024	
	AGAP002350-RE	958	IPR016024	
	AGAPOO2350-RE	1150	IPR016024	
MRPNT – 19	AGAP010147-RH	984	IPR001609	<i>Myosin head, motor domain</i>
	AGAP010147-RD	1173	IPR001609	
	AGAP010147-RC	1174	IPR001609	
	AGAP010147-RI	1265	IPR001609	
	AGAP010147-RJ	1528	IPR001609	
MRPNT – 20	AGAP001218-RA	595	IPR003008	<i>Tubulin/FtsZ, GTPase domain</i>
	AGAP001219-RA	614	IPR003008	
MRPNT – 21	AGAP001622-RA	5258	IPR002048	<i>Calcium-binding EF-hand</i>
	AGAP007963-RA	3216	IPR002048	
MRPNT – 22	AGAP002076-RA	1580	IPR013126	<i>Heat shock protein</i>
	AGAP006958-RA	548	IPR020575	

Tabela 11: Anotação das *EST's* de *Anopheles darlingi* geradas da biblioteca Tratamento analisadas pelo banco de dados *EBI*.

Identificação	Contig	N° de Reads	Código EBI	Função
MRPNT – 23	AGAP011173-RA	1203	IPR002132	<i>Ribosomal protein L5</i>
	AGAP012990-RA	979	IPR005680	
	AGAP011173-RA	1008	IPR022803	
	AGAP011298-RA	628	IPR023674	
	AGAP001595-RA	1009	IPR001209	
				<i>ATPase</i>
MRPNT – 24	AGAP005134-RA	1202	IPR005294	
	AGAP006186-RB	2675	IPR001757	
MRPNT – 25	AGAP007406-RA	1431	IPR000795	<i>Protein synthesis factor, GTP-binding</i>
	AGAP009441-RA	2312	IPR000795	
MRPNT – 26	AGAP012990-RA	1326	IPR016027	<i>Nucleic acid-binding</i>
	AGAP005802-RA	928	IPR016027	
MRPNT – 27	AGAP007406-RA	4991	IPR004539	<i>Translation elongation factor EF1A</i>
MRPNT – 28	AGAP010657-RA	1934	IPR005204	<i>Hemocyanin</i>
MRPNT – 29	AGAP001799-RA	549	IPR005827	<i>Potassium channel</i>
MRPNT – 30	AGAP006782-RA	637	IPR023395	<i>Mitochondrial carrier domain</i>

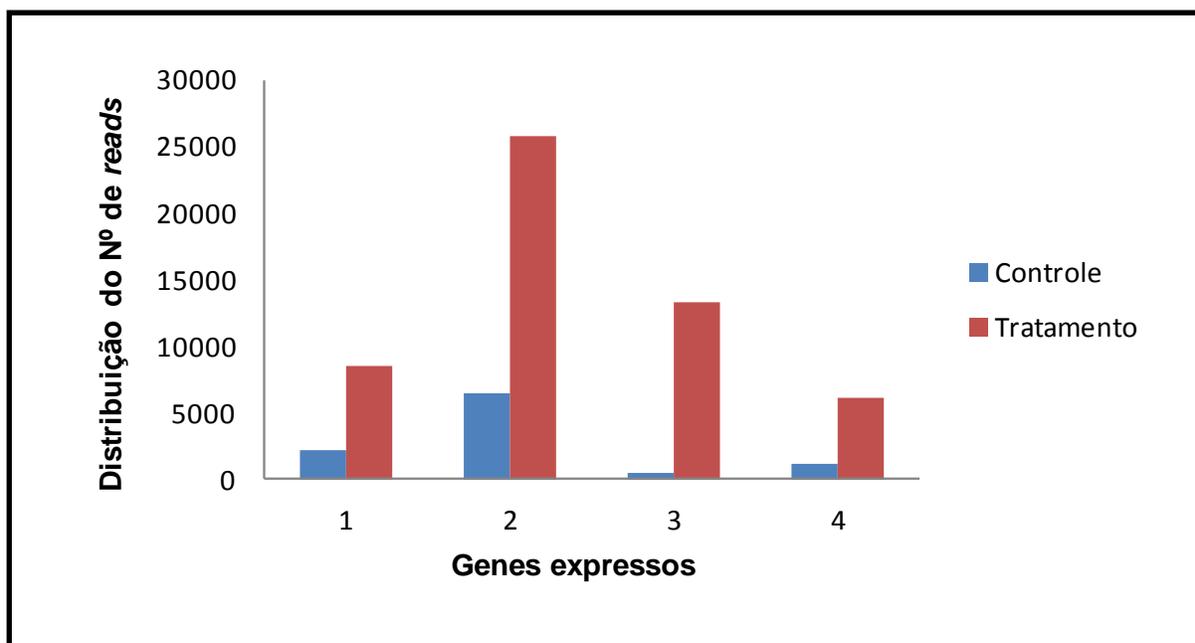


Figura 20: Genes super expressos na biblioteca Tratamento em comparação com a biblioteca Controle. 1) *Calcium binding EF hand* ; 2) *Actin – like*; 3) *ATP guanido phosphotransferase* ; 4) *Tropomyosin*.

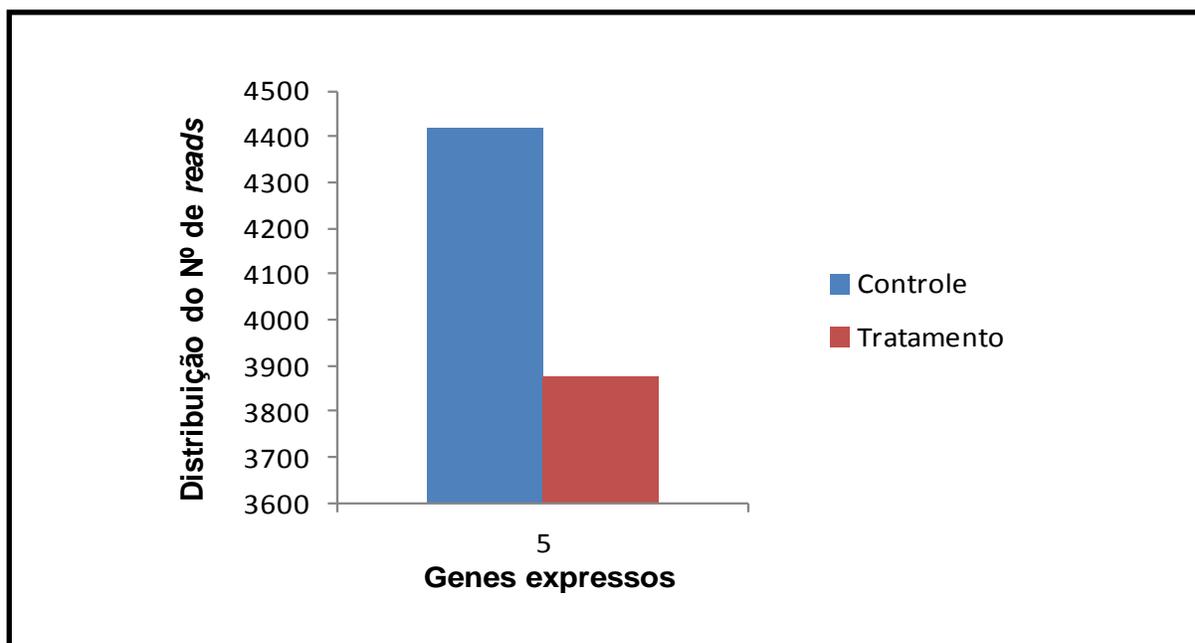


Figura 21: Genes com níveis de expressão inibida na biblioteca Tratamento em comparação com a biblioteca Controle. 5) *ATPase*.

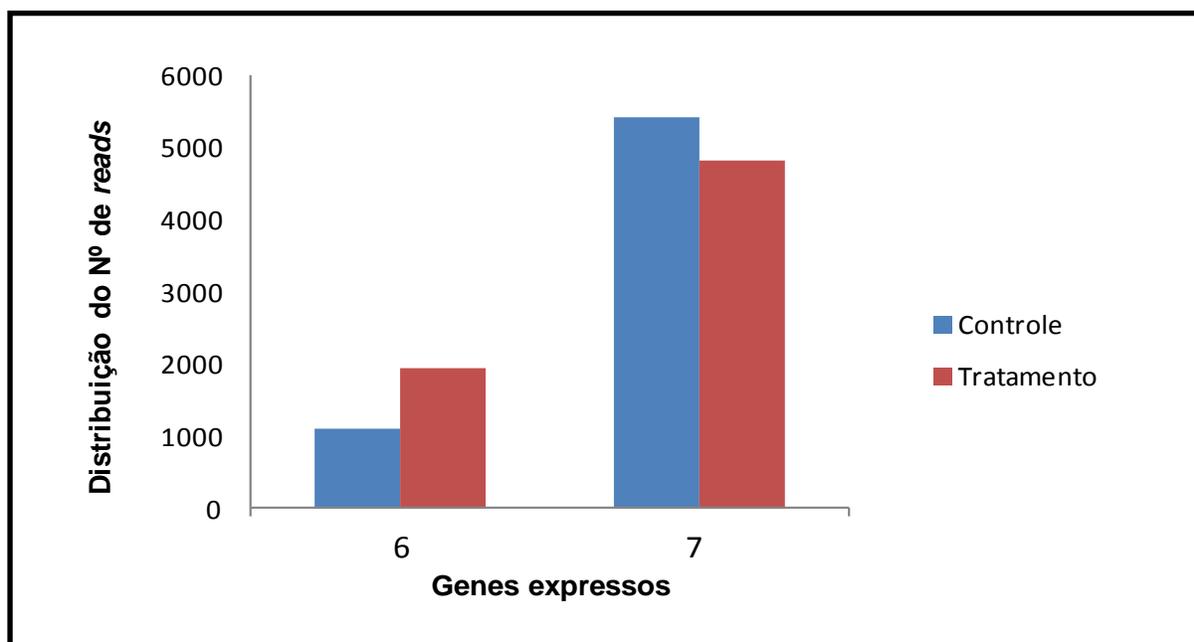


Figura 22: Genes de referência expressos nas bibliotecas Controle e Tratamento. **6)** *Hemocyanin* ; **7)** *Ribossomal protein*.

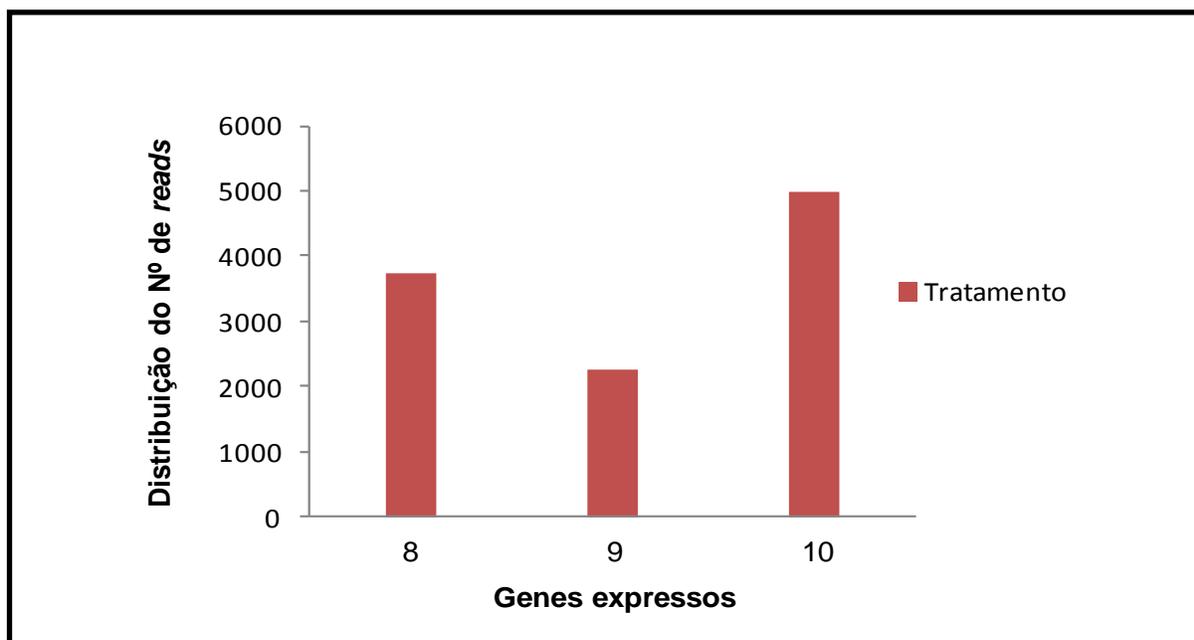


Figura 23: Genes expressos na biblioteca Tratamento não observados na biblioteca Controle. **8)** *Protein synthesis factor GTP binding*; **9)** *Nucleic acid binding*; **10)** *Translation elongation Factor EF 1A*.

5. DISCUSSÃO

5.1 Bioensaios de toxicidade aguda

Neste estudo os bioensaios de toxicidade aguda determinaram a CL_{50} e a CL_{90} de larvas de *A. darlingi* expostas ao petróleo, entre os períodos de 24 e 48 horas. A partir dessa avaliação determinou-se os níveis de toxicidade das concentrações aplicadas para as larvas de *A. darlingi*. Além de determinar as concentrações tóxicas de petróleo às larvas, observou-se também o efeito macroscópico provocado por sua ação tóxica, onde promoveu o surgimento de uma barreira física caracterizada pela película de óleo do petróleo formada na superfície da água.

Os bioensaios de toxicidade aguda estabelecem os limites máximos permissíveis dos agentes tóxicos nos organismos, nos quais geram uma resposta rápida diante ao estímulo, sendo a letalidade observada em intervalos de 0 a 96 horas (BERTOLETTI, 1990).

Entre os estudos dos efeitos do petróleo em organismos aquáticos, citam-se os peixes amazônicos analisados por Val e Almeida (1997). Neste trabalho pode-se observar a adaptação desses animais nas águas com baixa disponibilidade de oxigênio, isso resultava da película do óleo formada entre a interface ar-água de maneira a afetar a difusão natural da oxigenação no ambiente aquático.

Kingston (2002) verificou a variação da toxicidade de petróleo depender conforme a sua composição química, formado pela mistura complexa de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) e alifáticos com a presença de quantidades significativas de metais pesados como chumbo, cádmio, cromo, selênio, cobre entre outros.

Além dos efeitos tóxicos provocados pelo petróleo, os estudos realizados na África por Awolola et al. (2007) e Mireji et al. (2006) verificaram a oviposição de mosquitos anofelinos em ecossistemas impactados com xenobióticos tais como, metais pesados, pesticidas usados na agricultura e produtos de petróleo. As larvas expostas a esses contaminantes apresentaram níveis de susceptibilidade reduzida aos inseticidas empregados no controle vetorial e esta resistência foi observada nos principais vetores da malária, o *A. gambiae* e *Anopheles funestus* Giles, 1900.

A partir dessas informações Djouaka et al. (2007) conduziram experimentos com 15 populações de *A. gambiae* oriundas de criadouros da região sudoeste na Nigéria nos Estados de Ogun, Oyo, Osun, Ondo e Ekiti. Doze destes criadouros estavam contaminados por petróleo e todos eles apresentaram resistência ao inseticida piretróide permetrina. Em seus experimentos com *A. gambiae* percebeu o ciclo de desenvolvimento larval parecer haver uma resistência cruzada relacionada aos inseticidas piretróides quando conseguem sobreviver às exposições por petróleo. No entanto, esses mecanismos ainda não estão claros e outras investigações utilizando técnicas moleculares elucidando a expressão gênica devem ser consideradas.

Nesse cenário de resistência dos anofelinos aos inseticidas piretróides no continente africano, o *A. darlingi* é o principal vetor da malária no Brasil e a crescente exploração de petróleo na região de Urucu torna-se relevante a realização de estudos direcionados aos efeitos provocados pelo petróleo.

Os testes realizados foram aplicados no sentido de avaliar a concentração tóxica de petróleo capaz de manter as larvas de *A. darlingi* vivas e com isso ter um parâmetro de estresse para proceder com as análises em nível molecular.

5.2 Tecnologias de Sequenciamento das EST's: Sequenciamento Sanger – CE e NGS-RNAseq

Neste trabalho analisou-se o perfil de genes expressos em larvas de *A. darlingi* nas condições naturais (Biblioteca – Controle) e sob estresse produzido pelo petróleo (Biblioteca – Tratamento), por meio das tecnologias de sequenciamento de Sanger – CE e NGS –RNASeq para a geração de EST's.

Visto o constante interesse da comunidade científica pela espécie *A. darlingi*, esse tipo de análise é importante no direcionamento de medidas para a busca de novas alternativas de combate entre a relação vetor-parasita-hospedeiro. As análises realizadas em nível de genômica funcional podem contribuir efetivamente no método de controle selecionado, seja, no controle do vetor / mecanismos de resistência a inseticidas ; controle do parasita / infecção do plasmódio no vetor e sua transmissão aos humanos; controle do hospedeiro / mecanismos de resistência aos antimaláricos.

O potencial de identificação de novos genes com os novos sistemas de sequenciamento é especialmente importante quando deseja-se conhecer genes funcionais em tipos celulares restritos. Nesses casos, utilizando os métodos convencionais de sequenciamento, um grande número de bibliotecas devem ser construídas e muitas *EST's* devem ser sequenciadas para maximizar a chance de encontrar os genes de interesse. Já com o sequenciamento livre de clonagem bacteriana, como o *RNAseq* genes de células específicas podem ser facilmente identificados (EMRICH et al., 2007).

Essas novas plataformas possuem como características comuns o poder de gerar maiores informações quando comparadas ao sequenciamento de *Sanger - CE*, contribuindo na grande economia de tempo e custo por base para o sequenciamento. Essa maior eficiência advém do uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, não precisando mais do intensivo trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos.

Os resultados gerados com as *EST's* do sequenciamento de *Sanger - CE* pode-se observar a expressão de genes estáveis presentes nas bibliotecas Controle e Tratamento, como também os genes envolvidos com o estresse expressos na biblioteca Tratamento.

Dentre os genes expressos da biblioteca Controle e Tratamento (Tabela 16) observou-se certa estabilidade na expressão gênica, ou seja, houve uma constante atividade biológica nessas duas condições.

Segundo Czechowski et al. (2005) esses genes podem ser utilizados como genes normalizadores ou de referência para as análises de validação por PCR quantitativa em tempo real (*qPCR*) para a normalização dos dados de expressão gênica obtidos. Estes genes são escolhidos com uma base no conhecimento ou provável papel nos processos celulares básicos como, por exemplo, a manutenção da estrutura celular ou metabolismo primário, onde apresentam transcritos com expressão uniforme na maioria das células do organismo analisado, durante várias fases do desenvolvimento e sob diferentes condições ambientais.

Tendo em vista este parâmetro, sugeriu-se o gene MRP-C4 (Tabela 5) como um potencial gene normalizador de expressão, pois está envolvido na indução da transcrição das proteínas ricas em glicina ligantes de RNA. Estas proteínas são subclasses da classe IV do grupo das Proteínas Ricas em Glicina – GRPs. De acordo com Elliot e Ladomary (2010) essas proteínas exercem funções combinadas em diversos domínios de ligação ao RNA, nos quais podem aumentar a afinidade de interação com o RNA ou promover interações proteína-proteína. Estas proteínas podem empacotar o RNA, protegê-lo, organizá-lo e prepará-lo para os processos pós-transcricionais.

Em contrapartida, o perfil da expressão gênica na biblioteca Tratamento pode apresentar os genes específicos com o estresse, tanto no sentido de possíveis marcadores de contaminantes de petróleo, como em relação às respostas do metabolismo ou detoxificação. Levando isso em conta, os genes expressos MRP-T13 e MRP-T19 (Tabela 6) podem ser sugeridos como marcadores ou biomarcadores de exposição pelo petróleo, pois estão envolvidos na transcrição dos complexos enzimáticos *carene synthase* e *phenoloxidase*.

Estas vias enzimáticas relacionam-se com a biossíntese de terpenos e metabolização de compostos fenólicos, ambas ligadas ao petróleo. A *carene synthase* integra os compostos de origem vegetal e a *phenoloxidase* é relacionada com substâncias fenólicas, estando desta forma voltadas a características de constituição do petróleo.

Walker et al. (2001) destacaram o uso de biomarcadores para avaliar os efeitos tóxicos causados pela presença dos contaminantes de petróleo no ambiente aquático, tendo o princípio de expressão as alterações biológicas em nível molecular, celular e fisiológico.

Já os genes codificantes da detoxificação devem ser considerados frente a compreensão dos mecanismos de resistência aos inseticidas, entre eles sugerem-se os genes expressos MRP-T17, MRP-12, e MRP-T21 (Tabela 6). Por estarem envolvidos na via de transcrição de detoxificação, a expressão desses genes é importante para a

busca do entendimento nos diferentes mecanismos de resistência aos inseticidas químicos.

De acordo com Fukuto e Mallipudi (1983), este mecanismo permite ao inseto modificar o inseticida a uma taxa suficiente o bastante para prevenir a ação no sítio alvo. E a degradação do inseticida podendo ocorrer por vários processos metabólicos, nos quais o produto é convertido em uma forma não tóxica ou mesmo eliminado rapidamente do corpo do inseto.

Por outro lado, as *EST's* geradas do sequenciamento da tecnologia *NGS - RNAseq*, com a plataforma *Illumina* proporcionou a análise do transcriptoma em larvas de *A. darlingi* nas condições naturais (Biblioteca - Controle) e sob estresse produzido pelo petróleo (Biblioteca - Tratamento), de forma acurada e quantificada. Levando em conta a extensão dos resultados e a insuficiência de tempo para analisar todo o conjunto de expressão gerada, os dados apresentados tratam-se de um esboço selecionado da expressão gênica observada para cumprir com os objetivos deste trabalho. O agrupamento destes perfis de expressão demonstrou a formação de grupos de genes envolvidos principalmente aos processos de ligação molecular, desenvolvimento estrutural e metabolismo da espécie *A. darlingi*.

De maneira geral, foi observado uma super expressão de genes na biblioteca Tratamento comparada a biblioteca Controle. Dentre eles, citam-se os genes MRPNT-19, MRPNT- 20, MRPNT – 21 e MRPNT – 25 (Tabela 10). Estes grupos de transcritos estão intimamente ligados aos mecanismos de contração muscular e evidenciam desta forma o efeito do estresse promovido pelo petróleo nas larvas de *A. darlingi*, pois a maior parte de sua constituição morfológica é formada por músculo. No mecanismo de defesa, em resposta ao estresse, as larvas consomem mais energia e isto reflete na intensidade dos seus movimentos na água.

Considerando ainda os genes da biblioteca Tratamento em comparação com a biblioteca Controle, foi observado a expressão gênica inibida do gene MRPNT - 28 (Tabela 11). Este transcrito está envolvido na codificação de enzimas transportadoras de íons na membrana celular, e sua inibição na biblioteca Tratamento relaciona-se com os danos gerados pelos produtos tóxicos do petróleo.

Também foram expressos os genes na biblioteca Tratamento não observados na biblioteca Controle relacionados a genes de fatores de transcrição, dos quais citam-se os genes MRPNT – 29, MRPNT – 30 e MRPNT – 31 (Tabela 11). Esse grupo provoca a indução na alteração dos níveis de expressão, onde interage nas complexas rotas metabólicas em resposta ao estresse. Esses genes expressos respondem o perfil aumentado de expressão dos genes MRPNT- 19, MRPNT- 20, MRPNT – 21 e MRPNT – 25 (Tabela 10) nas larvas estressadas pelo efeito do petróleo.

Ressaltam-se ainda, os genes de referência MRPNT – 27 e MRPNT- 32, estes envolvidos na transcrição de proteínas ribossomais e transportadoras de oxigênio na circulação de invertebrados, onde expressaram-se em níveis normais na biblioteca Tratamento e Controle.

Os resultados observados permitiram constatar a complementação dos perfis de genes expressos entre as tecnologias de sequenciamento *Sanger – CE* e *NGS-RNAseq* para a geração de *EST's* de *A. darlingi*.

6. CONCLUSÃO

- Com os bioensaios realizados foi obtido a CL_{50} e CL_{90} para as larvas de *A. darlingi* entre o período de 24 horas e 48 horas.
- O sequenciamento de *EST's* pela tecnologia de *Sanger - CE* mostrou-se em uma técnica bastante laboriosa e economicamente inviável mas, apesar disso, foram gerados bons resultados. Já pela tecnologia *RNA-seq* obteve o transcriptoma de *A. darlingi* em larga escala e o custo-benefício viável para este tipo de análise, possibilitando outros tipos de estudos como, por exemplo, relacionar os processos entre a tríade vetor-parasita-hospedeiro voltado para o diagnóstico e tratamento da malária.
- O sistema de sequenciamento *RNAseq* permitiu simultaneamente a identificação e validação das *EST's*, sendo capaz de proporcionar novas alternativas de busca para colaborar na elucidação dos mecanismos moleculares do mosquito *A. darlingi*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S. A Method of computing the effectiveness of an insecticide. **J Econ Entomol**, v. 18, p. 265-267, 1925.

ADAMS, M.D.; KELLEY, J.M.; GOCAYNE, J.D.; DUBNICK, M.; POLYMEROPOULOS, M.H.; XIAO, H.; MERRIL, C.R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R.; KERLAVAGE, A.R.; MCCOMBIE, W.R.; VENTER, J.C.. Complementary DNA sequencing: “expressed sequence tags” and the human genome project. **Science**, v. 252, p. 1651-1656, 1991.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Despacho do Diretor-Geral nº 683, Anexo II: relação de tipos de petróleo nacional**. p.13, 2008.

ARRUDA, M.; CARVALHO, M.B.; NUSSENZWEIG, R.S.; MARACIC, M.; FERREIRA, A.W.; COCHRANE, A.H.. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Northern Brazil identified by immunoassay. **Am J Trop Med Hyg**, v. 35, n.5, p. 873-881, 1986.

AWOLOLA, T. S.; ODUOLA, A. O.; OBANSA, J. B.; CHUKWURAR, N. J.; UNYIMADU, J. P. “Anopheles gambiae s.s. breeding in polluted water bodies in urban Lagos, southwestern Nigeria,” **J Vector Borne Dis**, v. 44, n.4, p. 241–244, 2007.

BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. **Cien Cult**, v.42, p. 271-227, 1990.

BIRREN, B.; GREEN, E.D.; MYERS, R.M.. **Genome analysis: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor. Laboratory Press, v. 2, p. 528, 1999.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis.. **Plant Physiol**, v. 139, p. 5-17, 2005.

CADERNOS PETROBRAS. **Amazônia, o caminho da energia no coração da floresta**. n.5, 2005.

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

COSTA, O.T.F.; PEDRAÇA, E.B.; VAL, A.L.. Efeito do petróleo sobre o consumo de oxigênio tissular e níveis de eletrólitos plasmáticos de *Colossoma macropomum* (*Caraciformes, Serrasalminidae*). **Rev Ciên Biol**, v. 1, n. 1, p. 85-95, 1996.

DJOUAKA, R.F.; BAKARE, A.A.; BANKOLE, H.S.; DOANNIO, J.M.C.; KOSSOU, H.; AKOGBETO, M.C.. Quantification of the efficiency of treatment of *Anopheles gambiae* breeding sites with petroleum products by local communities in areas of insecticide resistance in the Republic of Benin. **Malar J**, v. 6, n. 56, p. 1-6, 2007.

DJOUAKA, R. F.; BAKARE, A. A.; BANKOLE, H.S..“Does the spillage of petroleum products in *Anopheles* breeding sites have an impact on the pyrethroid resistance?” **Malar J**, v. 6, n.159, p. 1-10, 2007.

DEANE, L.M.. Notas sobre a distribuição e a biologia dos Anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil.. **Rev Serv Esp Saúde Publ**, v. 1, p. 827-965, 1948.

DEANE, L.M.. A Cronologia da Descoberta dos transmissores da malária na Amazônia brasileira.. Rio de Janeiro, **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 84, n.4, p. 149-156, 1989.

DULMAGE, H.T.; YOUSTEN, A.A.; SINGER, S.; LACEY, L.A..Guidelines for Production of Bacillus thuringiensis H-14 and Bacillus sphaericus. **UNDP/World Bank/WHO - Steering Committee to Biological Control of Vetores**, Geneva, p. 59, 1990.

ELLIOT, D.; LADOMARY, M.. **Molecular Biology of RNA**. Oxford University Press, USA. 2010.

EMRICH, S.J.; LI, L.; BARBAZUK, W.B.; SCHNABLE, P.S..Gene discovery and annotation using LCM- 454 transcriptome sequencing. **Genome Res**, v. 17, n. 1, p. 69-73, 2007.

FAHRAN, M.E. Mosquito studies (Diptera: Culicidae). XXXIV. A revision of the *albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. **Contribution of the American Entomology Institute**, v. 15, p. 1-215, 1980.

FEDURCO, M.; ROMIEU, A.; WILLIAMS, S.; LAWRENCE, I.; TURCATTI, G.. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. 3, p. 22, 2006.

FERRARI, J.A. **Insecticide resistance In: The biology of disease vectors**. Colorado: University Press of Colorado, 1996.

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. 3. ed. New Delhi: S. Chand e Company Ltd, p. 333, 1981.

FORATTINI, O.P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: EDUSP, 2002.

FORATTINI, O.P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, p. 622, 1962.

FUKUTO, T.R.; MALLIPUDI, N. M. Supression of metabolic resistance through chemical structure modification In: G. P. Georghiou; T. Saito (ed.). Pest resistance to pesticides: challenges and prospects. **New York: Plenum Press**, p. 557-578, 1983.

GOHAN, J.R.; STOJANOVICH, C.J.; SCOTT. H,G.. **Clave ilustrada para los mosquitos anofelinos de Sudamerica Oriental**. Atlanta: Departamento of Health, Education, and Welfare, p. 64, 1967.

HILLENMEYER, M.E.; BRUGGNER, R.V.; BIRNEY, E.; COLLINS, F.H.. Update of the *Anopheles gambiae* PEST genome assembly. **Genome Biol**, v. 8, p. 1-13, 2007.

HOLT, R.A.; SUBRAMANIAN, G.M.; HALPERN, A.; SUTTON, G.G.; CHARLAB, R.; NUSSKERN, D.R.; WINCKER, P.; CLARK, A.G.; RIBEIRO, J.M.; WIDES, R.; SALZBERG, S.L.; LOFTUS, B.; YANDELL, M.; MAJOROS, W.H.; RUSCH, D.B.; LAI, Z.; KRAFT, C.L.; ABRIL, J.F.; ANTHOUARD, V.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P.W.; BADEN, H.; DE BERARDINIS, V.; BALDWIN, D.; BENES, V.; BIEDLER, J.; BLASS, C.; BOLANOS, R.; BOSCUS, D.; BARNSTEAD, M.; CAI, S.; CENTER, A.; CHATURVERDI, K.; CHRISTOPHIDES, G.K.; CHRYSTAL, M.A.; CLAMP, M.; CRAVCHIK, A.; CURWEN, V.; DANA, A.; DELCHER, A.; DEW, I.; EVANS, C.A.; FLANIGAN, M.; GRUNDSCHOBER-FREIMOSER, A.; FRIEDLI, L.; GU, Z.; GUAN, P.; GUIGO, R.; HILLENMEYER, M.E.; HLADUN, S.L.; HOGAN, J.R.; HONG, Y.S.; HOOVER, J.; JAILLON, O.; KE, Z.; KODIRA, C.; KOKOZA, E.; KOUTSOS, A.; LETUNIC, I.; LEVITSKY, A.; LIANG, Y.; LIN, J.J.; LOBO, N.F.; LOPEZ, J.R.; MALEK, J.A.; MCINTOSH, T.C.; MEISTER, S.; MILLER, J.; MOBARRY, C.; MONGIN, E.; MURPHY, S.D.; O'BROCHTA, D.A.; PFANNKOCH, C.; QI, R.; REGIER, M.A.; REMINGTON, K.; SHAO, H.; SHARAKHOVA, M.V.; SITTER, C.D.; SHETTY, J.; SMITH, T.J.; STRONG, R.; SUN, J.; THOMASOVA, D.; TON, L.Q.; TOPALIS, P.; TU, Z.; UNGER, M.F.; WALENZ, B.; WANG, A.; WANG, J.; WANG, M.; WANG, X.; WOODFORD, K.J.; WORTMAN, J.R.; WU, M.; YAO, A.; ZDOBNOV, E.M.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHAO, S.; ZHU, S.C.; ZHIMULEV, I.; COLUZZI, M.; DELLA TORRE, A.; ROTH, C.W.; LOUIS, C.; KALUSH, F. MURAL RJ, MYERS EW, ADAMS MD, SMITH HO, BRODER S, GARDNER MJ, FRASER CM, BIRNEY E.; BORK, P.; BREY, P.T.; VENTER, J.C.; WEISSENBACH, J.; KAFATOS, F.C.; COLLINS, F.H.; HOFFMAN, S.L..The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Science**, v. 298, p. 129-149, 2002.

IWAMA, G.K.; VIJAYAN, M.M.; MORGAN, J.D. The Stress Response in Fish. In: Saksena, D.N. (Ed). **Ichthyology: Recent Res Advances**, p. 47-57, 1999.

MALONE, G.; ZIMMER, P.D.; MENEGHELLO, G.E.; BINNECK, E.; PESKE, S.T. Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. **Rev Bras Agrociênc**, v. 12, n. 1, p. 07-13, 2006.

MIREJI, P.O.; KEATING, J.; KENYA, E.; MBOGO, C.; NYAMBAKA, H.; OSIR, E.; GITHURE, J.; BEIER, J.; "Differential induction of proteins in *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae) larvae in response to heavy metal selection," **Int J Trop Insect Sci**, v. 26, n. 4, p. 214–260, 2006.

KINGSTON, P.F. Review Paper: Long-term Environmental Impact of Oil Spills. **Spill Sci Technol Bull**, v.7, p. 53–61, 2002.

KOSIAN, D.H.; KIRSCHBAUM, B.J. Comparative gene-expression analysis. **Trends Biotech**, v.17, p. 73-77, 1999.

MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 9, n. 1, p. 387–402, 2008.

O'CONNOR, T.P.; PAUL, J.P. Misfit Between Sediment Toxicity and Chemistry. **Mar Pollut Bull**, v. 40, p. 59-64, 2000.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **Informe Malária**. 2011.

OPPENORTH, F. J. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, In: G.A. Kerkut & L. I. Gilbert (ed.). Pergamon Press, Oxford, United Kingdom, p. 731–773, 1985.

PEZESHKI, S.R.; DELAUNE, R.D. Effect of crude oil on gas exchange functions of *Juncus roemerianus* and *Spartina alterniflora*. **Water, Air, and Soil Pollut**, v. 68, p. 461– 468, 1993.

PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G.C.; BINNEC, E. ; SILVA, A.; REIS, A.N.; JUNQUEIRA, A.C.M.; SANTOS, A.C.F.; JÚNIOR, A.N.; WUST, C.I.; FILHO, F.C.; KESSEDJIAN, J.L.; PETRETSKI, J.H.; CAMARGO, L.P.; FERREIRA, R.G.M.; LIMA, R.P.; PEREIRA, R.M.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V.S; FLATSCHART, F.A.V. Bioinformática: Manual do usuário. **Bioteχνolog Cienc Desenvolv**, v. 29, p. 12-25, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: **A laboratory manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, v.11, v.8, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SHENDURE, J.; JI, H.. Next-generation DNA sequencing. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 10, p. 1135-1145, 2008.

TANG, F.; TANG, F.; BARBACIORU, C.; WANG, Y.; NORDMAN, E.; LEE, C.; XU, N.; WANG, X.; BODEAU, J.; TUCH, B.B.; SIDDIQUI, A.; LAO, K.; SURANI, M.A..

mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. **Nat Methods**, v. 6, n.5, p. 377-382, 2009.

TADEI, W.P.; RODRIGUES, I.B.; SANTOS, J.M.M.; RAFAEL, M.S.; PASSOS, R.A.; COSTA, F.M.; PINTO, R.C.; OLIVEIRA, A.E.M. O Papel da Entomologia no Controle da Malária. **Rev Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, 2007.

TADEI, W.P.; SANTOS, J.M.M.; COSTA, W.L.S.; SCARPASSA, V.M. Biologia de anofelinos amazônicos. XII. Ocorrência de espécies de *Anopheles*, dinâmica da transmissão e controle da Malária na zona urbana de Ariquemes (Rondônia). **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 221- 251, 1988.

TADEI, W.P.; SANTOS, J.M.M.; SCARPASSA, V.M.; RODRIGUES, I.B. Incidência, distribuição e aspectos ecológicos de espécies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae), em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia brasileira. In: FERREIRA, E.J.G; SANTOS, G.M; LEÃO, E.L.M; OLIVEIRA, L.A (Eds) (1993) Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia. **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**, Manaus, v.2, p. 167-196, 1993.

TADEI, W.P.; THATCHER, D.B.; SANTOS, J.M.M.; SCARPASSA, V.M.; RODRIGUES I.B; RAFAEL, M.S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the brasilian Amazon. **Am J Trop Med**, v. 59, n. 2, p. 325-335, 1998.

TADEI, W.P.; THATCHER, B.D. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 42, p. 87-94, 2000.

VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon. In: Val, A. L., Almeida-Val, V. M. F. (eds.), Biology of Tropical Fishes. **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**, Manaus, p. 277-291, 1999.

TURCATTI, G.; ROMIEU, A.; FEDURCO, M.; TAIRI, A.P.. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. 4, p. 2-13, 2008.

VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Efeitos do petróleo sobre a respiração de peixes da Amazônia. In: Martos, H.L.; Maia, N.B. (Eds.) Indicadores Ambientais. **Pontifícia Universidade Católica**, Sorocaba, p. 109-119, 1997.

VEDOY, C. G.; BENGSTON, M. H.; SOGAYAR, M. C. Hunting for differentially expressed genes. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, p. 877-884, 1999.

VETTORE, AL.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P..The libraries that made SUCEST. **Genet Mol Biol**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 101-107, 2001.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of**

Ecotoxicology. 2. ed. Londres: Taylor & Francis, p. 309, 2001.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M.. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev**, v.10, p. 57-63, 2009.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report Malaria**, 2011.