



**UAAlg**  
UNIVERSIDADE DO ALGARVE



DESDE 1902  
INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Universidade do Algarve/Departamento de Ciências Biomédicas  
e Medicina**

**Universidade Nova de Lisboa / Instituto de Higiene e  
Medicina Tropical /Unidade de Parasitologia Médica**

**Alterações à fisiologia e infeção por *Plasmodium berghei* do  
mosquito *Anopheles gambiae* mediadas pela ativação de  
recetores GPCR**

**Ronise Eneide Almeida Silva**

**Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências  
Biomédicas**

**Trabalho realizado sob orientação do Professor Doutor  
Henrique Silveira**

**2015**

**Universidade do Algarve/Departamento de Ciências Biomédicas  
e Medicina**

**Universidade Nova de Lisboa / Instituto de Higiene e  
Medicina Tropical /Unidade de Parasitologia Médica**

**Alterações à fisiologia e infeção por *Plasmodium berghei* do  
mosquito *Anopheles gambiae* mediadas pela ativação de  
recetores GPCR**

**Ronise Eneide Almeida Silva**

**Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências  
Biomédicas**

**Orientador: Professor Doutor Henrique Silveira**

**Co - orientador: Professora Doutora Deborah Power**

**2015**

**Alterações à fisiologia e infecção por *Plasmodium berghei* do mosquito *Anopheles gambiae* mediadas pela ativação de recetores GPCR**

**Declaração de autoria de trabalho**

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

© A universidade do algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Deus do impossível pela sua misericórdia e amor eterno para comigo, por ter respondido as minhas orações e me socorrido em momentos de aflições. Por me ter abençoado com a sua palavra em Salmos 32:8 que diz “ Instruir-te-ei e ensinar-te-ei o caminho que deves seguir, guiar-te-ei com os meus olhos” e eu creio que nos momentos de alegria e de tristeza que caracterizaram a realização desta tese sempre estiveste comigo. Obrigado meu pai amado pela tua fidelidade.

Agradeço ao Professor Doutor Henrique Silveira por me ter dado a oportunidade de realizar a minha tese sobre a sua orientação, e por todo o apoio dado ao longo da sua realização.

Agradeço a Catarina Alves, Joana Gomes, a Rosa Santana e a todos aqueles que Deus colocou na minha caminhada e que serviram de base para a realização do meu trabalho.

Agradeço aos meus pais Mário e Lili Silva, ao meu irmão Rúben e ao Gil por me terem ajudado a levantar nos dias maus e me darem força para seguir em frente.

Por fim agradeço a todos os meus familiares e irmãos em cristo pelas orações ao meu favor e ao apoio.

## RESUMO

### **Alterações à fisiologia e infecção por *Plasmodium berghei* do mosquito *Anopheles gambiae* mediadas pela ativação de recetores GPCR**

**Ronise Eneide Almeida Silva**

**Palavras-chave:** Malária, Hormona da Paratiroide Humana, Oogénese, Vitelogenina, Crescimento folicular, Deposição de lípidos

A malária é uma doença tropical causada por picada de mosquitos do género *Anopheles gambiae* infetados por parasitas do género *Plasmodium*.

A malária consiste é prioridades na saúde pública internacional, e graças às metodologias utilizadas para o combate à infecção, controlo da doença e da transmissão, tem-se observado uma redução da taxa de mortalidade pela malária.

O relatório anual “Malária Report 2015” previu uma redução da taxa de mortalidade em crianças de 5 anos de idade na ordem dos 61% globalmente e 67% na região africana da OMS. No entanto, ainda existe uma percentagem significativa da população em risco de ser infetada.

O presente estudo vem no seguimento de trabalhos anteriores do grupo, sobre o recetor GPCR da hormona da paratiroide humana (PTH) no mosquito e visa analisar o efeito da PTH na oogénese/vitelogénese de mosquitos *Anopheles gambiae*.

A deposição de lípidos e o crescimento folicular em mosquitos alimentados e injetados com PTH comparativamente com mosquitos alimentados com sangue, glucose e injetados com solução salina em diferentes pontos temporais (3, 6, 18, 24 horas pós-alimentação/pós-injeção) foram analisados. A comparação entre os grupos mostrou que o PTH possui um efeito similar à refeição sanguínea nas primeiras horas analisadas, sendo assim um fator iniciador da oogénese/vitelogénese em mosquitos *A. gambiae*.

Esses resultados em conjunto com o aumento da expressão de genes associados à oogénese/vitelogénese em mosquitos injetados com PTH às 6h pós-injeção semelhante ao observado nos mosquitos alimentados com sangue, indicam que o PTH é um fator sanguíneo essencial na regulação da oogénese e reprodução em mosquitos *A. gambiae*.

## ABSTRACT

### **Changes in the physiology and *Plasmodium berghei* infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes mediated by activation of GPCR receptors**

**Ronise Eneide Almeida Silva**

**Keywords:** Malaria, Human Parathyroid Hormone, Oogenesis, Vitellogenin, Follicular growth, Lipid deposition

Malaria is a tropical disease caused by the bite of *Anopheles gambiae* mosquitoes infected by *Plasmodium* parasite.

Malaria is an international health priority and thanks to the methodologies used to fight infection and control the disease and transmission has led to malaria mortality reduction worldwide.

The annual “Malaria Report 2015”, estimated a reduction of 61% global and 67% in the African region of WHO mortality rate in children under 5 years old.

However, there’s still a significant percentage of population at risk of being infected.

This study follows previous work of the group on GPCR receptor of human parathyroid hormone (PTH) in the mosquito and aims to analyze the effect of PTH on oogenesis/vitellogenesis of *A. gambiae* mosquitoes.

Lipid deposition and follicular growth in ovaries was analyzed on mosquitoes fed or injected with PTH and compared to mosquitoes fed on blood, glucose or injected with saline solution at different time intervals (3, 6, 18, 24 hours post-feed or post-injection). The comparison showed that PTH treatment has similar effects as blood meal at the early hours of oogenesis and thus is an initiator factor of oogenesis/vitellogenesis in *A. gambiae*.

These results together with increased expression of genes associated with oogenesis/vitellogenesis in mosquitoes injected with PTH at 6h post-injection similar to what is observed in blood fed mosquitoes indicates that PTH is a key factor in the regulation of oogenesis and reproduction of *A. gambiae* mosquitoes.

## ÍNDICE GERAL

|   |           |
|---|-----------|
| AGRADECIMENTOS.....   | 4         |
| RESUMO .....  | 5         |
| ABSTRACT .....  | 6         |
| ÍNDICE GERAL .....  | 7         |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | 10        |
| ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS .....   | 13        |
| LÍSTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....  | 15        |
| <b>I. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>17</b> |
| 1. Malária.....   | 18        |
| 1.1. Contextualização .....   | 18        |
| 1.2. Definição .....  | 19        |
| 1.3. Distribuição geográfica.....   | 19        |
| 1.4. Classificação da malária .....   | 20        |
| 1.5. Biologia do parasita da malária <i>Plasmodium spp.</i> .....                   | 21        |
| 1.5.1. Ciclo de vida.....   | 22        |
| 1.5.1.1. Hospedeiro vertebrado – Homem.....   | 22        |
| 1.5.1.2. Hospedeiro Invertebrado – Mosquito .....                                   | 23        |
| 1.6. Biologia do mosquito <i>A. gambiae</i> .....                                   | 24        |
| 1.6.1. Ciclo de vida do mosquito <i>A. gambiae</i> .....                            | 24        |
| 1.6.2. Anatomia externa do mosquito Adulto .....                                    | 26        |
| 1.6.3. Anatomia interna do mosquito .....   | 26        |
| 1.6.4. Oogénese do mosquito <i>A. gambiae</i> .....                                 | 31        |
| 1.6.5. Vitelogénese do mosquito <i>A. gambiae</i> .....                             | 32        |
| 1.6.6. Caracterização do ciclo ovário dos mosquitos .....                           | 34        |
| 1.6.7. Fatores determinantes na reprodução do vector <i>Anopheles gambiae</i> ..... | 37        |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.7. Hormona da paratiroide Humana .....   | 43        |
| 1.8. Objectivo .....   | 45        |
| <b>II. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>   | <b>46</b> |
| 2. Materiais .....   | 47        |
| 2.1. Materiais biológicos .....  | 47        |
| 2.1.1. Mosquitos <i>Anopheles gambiae</i> fêmeas .....   | 47        |
| 2.1.2. Ratinhos CD1 fêmeas.....  | 47        |
| 2.2. Métodos.....  | 47        |
| 2.2.1. Atlas de desenvolvimento folicular.....   | 47        |
| 2.2.2. Efeito da PTH no desenvolvimento folicular de mosquitos <i>A. gambiae</i> .....   | 49        |
| 2.2.3. Efeito da injeção de PTH no desenvolvimento folicular de mosquitos<br><i>A.gambiae</i> .....                                | 51        |
| 2.2.5. Análise do efeito da alimentação com diferentes soluções na expressão da<br>vitelogenina do recetor de PTH AGAP003654 ..... | 54        |
| 2.2.6. Silenciamento do recetor GPCR .....   | 59        |
| <b>III. RESULTADOS .....</b>   | <b>62</b> |
| 3.1. Desenvolvimento folicular .....   | 63        |
| 3.2. PTH é o fator sanguíneo necessário para o desencadear da oogénese nos mosquitos<br><i>Anopheles gambiae</i> .....             | 65        |
| 3.2.1. Crescimento folicular .....   | 66        |
| 3.3. Injeção de PTH induz a ativação do recetor e induz a produção de Vitelogenina .....   | 69        |
| 3.4. Injeção de PTH induz a deposição de lípidos e o início da oogénese em mosquitos ....  | 70        |
| 3.5. Silenciamento do recetor de PTH inibe o efeito indutor de oogénese.....   | 73        |
| 3.6. PTH afeta a infeção por <i>Plasmodium berghei</i> em mosquitos <i>Anopheles gambiae</i> .....                                 | 75        |
| <b>IV. DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....</b>   | <b>76</b> |
| 4.1. Refeição contendo PTH desencadeia o processo de oogénese de modo semelhante ao<br>observado após a refeição sanguínea.....    | 77        |
| 4.2. Efeito do PTH na infeção com <i>Plasmodium berghei</i> e ovoposição .....   | 79        |

|  |    |
|--|----|
| 4.3. Análise da expressão dos genes de vitelogenina e recetor de PTH e Silenciamento do recetor intramebranar do PTH – GPCR..... | 80 |
| <b>V. CONCLUSÃO</b> .....  | 81 |
| <b>VI. BIBLIOGRAFIA</b> .....  | 83 |
| <b>VII. ANEXOS</b> .....   | 89 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.1:</b> Países com transmissão contínua da malária em 2013. ....   | 18 |
| <b>Figura 1.2:</b> Fatores que influenciam o quadro clínico e distribuição geográfica da malária..  | 20 |
| <b>Figura 1.3:</b> Ciclo de vida do parasita .....  | 22 |
| <b>Figura 1.4:</b> Ciclo de vida do parasita .....  | 23 |
| <b>Figura 1.5:</b> Fases do desenvolvimento do mosquito <i>Anopheles</i> . 1 e 4 Ovos com estrutura elicoidal com flutuadores na parte lateral; 2 e 5 divisão estrutural da larva em cabeça, tórax e abdómen; 3 e 6 Pupa com estrutura em forma de vírgula; 7 adulto fêmea. ....    | 25 |
| <b>Figura 1.6:</b> Anatomia interna do mosquito <i>Anopheles gambiae</i> .....  | 26 |
| <b>Figura 1.7:</b> Sistema reprodutor da fêmea de mosquito <i>Anopheles</i> adaptado de Forattini, 1995. ....   | 29 |
| <b>Figura 1.8:</b> Ilustração da síntese de folículos ovários a partir de clones de citoblastos no <i>germarium</i> e o seu desenvolvimento no vitelário. Adaptado de <a href="https://cellbiol2061.wordpress.com/">https://cellbiol2061.wordpress.com/</a> (Engelmann, 2015). .... | 31 |
| <b>Figura 1.9:</b> Processo de incorporação de vitelogenina nos oócitos e a sua acumulação como vitelina nos corpos vitelogénicos (Klowden, 2013) .....   | 33 |
| <b>Figura 1.10:</b> Síntese e ação da hormona juvenil .....   | 37 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.11:</b> Ilustração da tiroide e as quatro glândulas da paratiroide que lhe estão adjacentes<br>.....  | 43 |
| <b>Figura 2.1:</b> Esfregaço sanguíneo de <i>Mus musculos</i> infetado com <i>Plasmodium berghei</i> . .....  | 52 |
| <b>Figura 2.2:</b> Esquema ilustrativo do protocolo de inactivação de DNA (a) e síntese de cDNA<br>(b). .....   | 56 |
| <b>Figura 2.3:</b> Esquema ilustrativo do mecanismo de acção do SYBR Green I <i>Dye</i> durante o<br>processo de PCR em tempo real. Adaptado de <a href="http://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx">http://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx</a> . .....   | 57 |
| <b>Figura 2.4:</b> Esquema ilustrativo do processo de silenciamento de genes através da síntese de<br>dsRNA. Obtido de <a href="https://lifescience.roche.com/shop/en/us/products/PrintView?langId=-1&amp;storeId=15016&amp;articleId=68022">https://lifescience.roche.com/shop/en/us/products/PrintView?langId=-1&amp;storeId=15016&amp;articleId=68022</a> . .....  | 59 |
| <b>Figura 3.1:</b> Desenvolvimento folicular de mosquitos <i>Anopheles gambiae</i> alimentados em<br>ratinhos <i>Mus musculos</i> da estirpe CD1 e dissecados nos intervalos de tempo de: (a, g) 0h; (b,<br>h) 3h; (c, i) 6h; (d, j) 18h; (e, k, m) 24h; (f, l, n) 48h após a refeição sanguínea. Folículos não<br>corados, folículos corados com Nile red, para visualização de inclusões lipídicas verde<br>emissão 636 nm; excitação 552 nm; (m, n) Folículos corados com Hoechst 33342 para<br>visualização do núcleo (azul) excitação 350 nm e emissão 401 nm..... | 63 |
| <b>Figura 3.2:</b> Desenvolvimento folicular de mosquitos <i>Anopheles gambiae</i> : (a) a (d)<br>alimentados com solução de PTH e dissecados em intervalos de tempo de 3, 6, 18 e 24 horas<br>após a refeição respectivamente e; (e) a (h) alimentados com solução de glucose e dissecados<br>em intervalos de tempo de 3, 6, 18 e 24 horas após a refeição respectivamente; Corados com<br>Nile red e visualizados no microscópio de fluorescência (emissão 482nm; excitação 536nm),<br>ampliação 10X.....  | 65 |

**Figura 3.3:** Variação do crescimento folicular de mosquitos *Anopheles gambiae* alimentados com diferentes soluções e dissecados em diferentes intervalos de tempo 3, 6, 18 e 24 horas após as refeições..... 67

**Figura 3.4:** Efeito da PTH na expressão génica do recetor de PTH e da vitelogenina. Níveis de expressão às 3, 6 e 24 horas após a injeção. Os resultados representam a média e desvio padrão de 3 réplicas biológicas. A expressão relativa foi determinada através do método  $\Delta\Delta t$ . Para analisar a diferença entre os diferentes tempos estudados foi utilizado o teste t- student (\*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ ). (Dados gerados no projeto PTDC/BIA-BCM/114395/2009 não publicados). ..... 69

**Figura 3.5:** Folículos de mosquitos *Anopheles gambiae* as: (a) a (c) injetados com 69nl de PTH 100 $\mu$ M nos intervalos de tempo de 3, 6 e 24hpi respectivamente. (d) a (f) injetados com solução salina nos intervalos de tempo de 3, 6 e 24hpi respectivamente. Corados om Nile red, ampliação 10x, (emissão 482nm/excitação 536nm). ..... 70

**Figura 3.6:** Aumento relativo do tamanho folicular em relação aos mosquitos alimentados com glucose (sangue e PTH) ou injetados com solução salina (PTHinj). A linha tracejada = 1 e representa sem alterações em relação ao controlo.....72

**Figura 3.7:** Gel de agarose 2% para identificação do produto da reação de PCR para o estudo da expressão do gene do recetor de PTH (A) 1e 4 - marcadores de peso molecular; 2 – ds\_β2m com a banda esperada de 500bp; 3- ds\_3654 com banda de aproximadamente 100bp. (B) 1e 4 - marcadores de peso molecular, 2- cDNA novo, 3- produto de PCR do cDNA novo, com banda fraca mas visível nos 600bp. (C) 1 e 7 - marcador de peso molecular, 2 e 3 – mix de cDNA purificado, 4, 5 e 6 – produto de PCR purificado.....73

## ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS

|  |         |
|--|---------|
| <b>Tabela 1.1:</b> Características e distribuição geográfica das espécies de <i>Plasmodium</i> causadoras da malária humana. Adaptado de (Guerra M, 2012).....   | 21 e 22 |
| <b>Tabela 2.1:</b> Condições cíclicas otimizadas para a realização da reação de PCR quantitativo em tempo real.....  | 58      |
| <b>Tabela 3.1:</b> Valores de significância para o teste t-student comparando o crescimento folicular de mosquitos alimentados com glucose e com PTH .....   | 68      |
| <b>Tabela 3.2:</b> Valores de significância para o teste t-student comparando o crescimento folicular de mosquitos alimentados com glucose e com PTH .....   | 68      |
| <b>Tabela 3.3:</b> Valor de significância para o teste t-student comparando o crescimento folicular de mosquitos Injetados com PTH com mosquitos injetados com solução salina e alimentados com PTH..... | 71      |
| <b>Tabela 7.1:</b> Análise comparativa da variação do crescimento folicular de mosquitos alimentados com diferentes soluções e analisados às 3 horas após o tratamento.....                              | 97      |
| <b>Tabela 7.2:</b> Análise comparativa da variação do crescimento folicular de mosquitos alimentados com diferentes soluções e analisados às 6 horas após o tratamento. ....                             | 97 e 98 |
| <b>Tabela 7.3:</b> Análise comparativa da variação do crescimento folicular de mosquitos alimentados com diferentes soluções e analisados às 18 horas após o tratamento. ....                            | 98      |
| <b>Tabela 7.4:</b> Análise comparativa da variação do crescimento folicular de mosquitos alimentados com diferentes soluções e analisados às 24 horas após o tratamento. ....                            | 99      |

|  |    |
|--|----|
| <b>Quadro 2.1:</b> Preparação do <i>template</i> para PCR e condições de amplificação dos genes de $\beta$ 2m e AGAP003465 ..... | 60 |
| <b>Quadro 7.2:</b> <i>Primers</i> utilizados e respectivas sequências.....   | 96 |

## LÍSTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Anopheles

AGAP003654- Recetor da família 2 GPACR nos invertebrados

CA- Corpora Allata

cAMP- Ampicilina cíclica

E – Ecdisona

EcR- Recetor de ecdisona

EP- Epitélio folicular

GPCR – Recetor acoplado a proteína G

Hpa- Horas após a refeição

Hpi – Horas após a injeção

Hpa/phi - Horas após alimentação/ horas após injeção

IHMT- Instituto de Higiene e Medicina Tropical

ILP- Peptido like insuline

INR- Recetor de péptido like insuline

IP- intraperitoneal

JH- hormona Juvenil

LDL- lipotroteína de baixa densidade

Lp- Lipoforina

MAG- Glândula acessória

MISO- Estimulador de oogénese induzida pelo acasalamento

MNC- Células neurosecretoras mediais

OEH – Hormona ecdiesteroidogénico

OMS- Organização Mundial de Saúde

P- Plasmodium

PBS- Tampão fosfato salino

PTH- Hormona da paratiroide humana

PTHr- Recetor da hormona da paratiroide humana

PTTH- Hormona cerebral ecdisiotropico

P13K- Fosfatidilinositol 3 cinase

RXR- Homologo do recetor retinoide X

RER- Reticulo endoplasmático rugoso

RISC – *RNA induced silencing complex*

RT-PCR- Polymerase chain reaction em tempo real

SVP- Seven-up

S6k- p70 S6 cinase

S7- Gene normalizador

TOR- Alvo da rapamicina cinase

USP- Ultra spiracle

Vg- Vitelogenina

Vgr- Recetor de vitelogenina

20E- Hormona 20-hidroxiectdisone

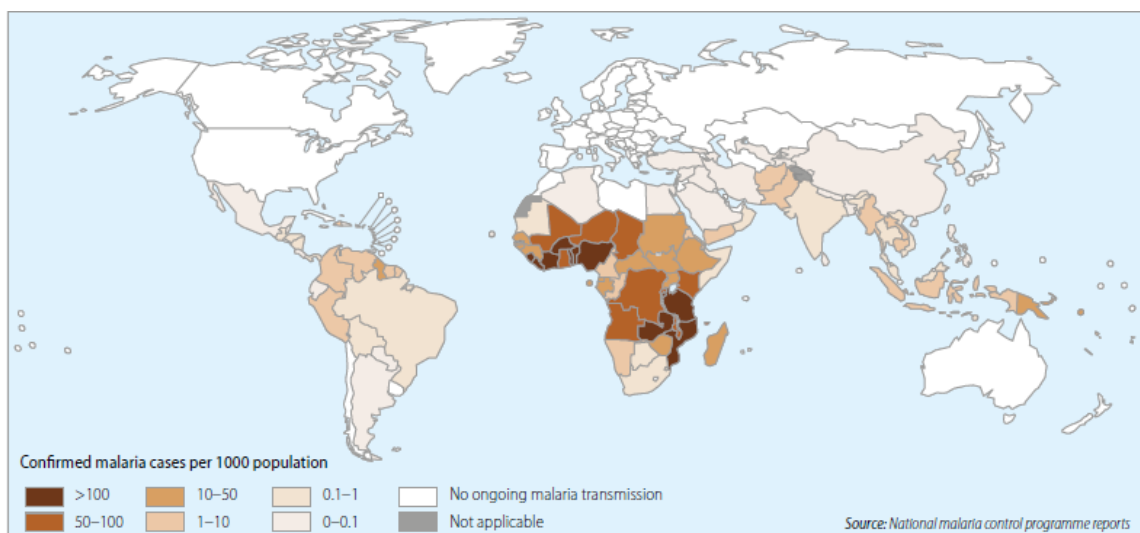
# **I. INTRODUÇÃO**

## 1. Malária

### 1.1. Contextualização

A malária, também designada por paludismo ou febre palustre é uma doença milenar conhecida desde 2700 AC como sendo de grande impacto na saúde e na história da humanidade (Monteiro M, 2011).

Segundo a World Malaria Report 2014, a transmissão da malária ocorre nas seis regiões da Organização Mundial de Saúde (OMS) (África, América, Sudeste Asiático, Europa, Mediterrâneo Ocidental e Pacífico Ocidental). Estima-se que globalmente 3.2 milhares de milhões de pessoas em 97 países e territórios estão em risco de serem infectados e desenvolverem a doença (**Figura 1.1**), e 1.2 milhar de milhões estão em grande risco, com uma probabilidade maior do que 1 em 1000 de se infectarem por *Plasmodium* num ano (WHO 2014 e Burchard, 2014).



**Figura 1.1:** Países com transmissão contínua da malária em 2013.

(World Malaria Report 2014).

## 1.2. Definição

A malária é uma doença infecciosa transmitida por via sanguínea através da picada de mosquitos fêmea do género *Anopheles* infetados com parasitas unicelulares do género *Plasmodium* (“WHO | Malaria,” n.d.). Afeta sobretudo indivíduos com baixa imunidade, crianças com menos de 5 anos de idade e grávidas (Laishram et al., 2012 e Neves, et al., 2005)

É uma doença cuja sintomatologia principal consiste em episódios de febre elevada. A sua gravidade varia consoante a espécie do parasita, pelo que os métodos terapêuticos utilizados, especialmente o uso de anti-maláricos estão dependentes da espécie do parasita. (Mendis, et al., 2001e Neves, et al., 2005).

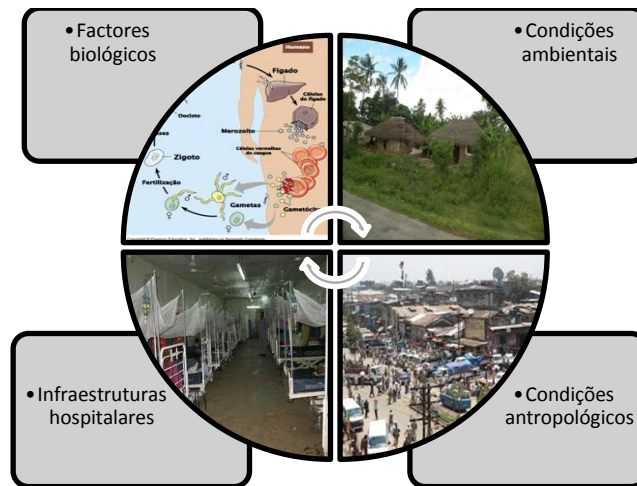
## 1.3. Distribuição geográfica

A malária tal como a leishmaniose, a doença de Chagas, a tripanossomíase humana Africana e a dengue é uma doença cuja distribuição geográfica é característica de regiões de climas tropicais e subtropicais, com altitudes inferiores a 2000 metros e temperaturas entre 16°C e 33°C (Guerra M, 2012).

De acordo com as estimativas de 2013 (WHO, 2014), ocorreram 198 milhões de casos de malária em todo o mundo e a doença matou cerca de 584000 pessoas, o que representa uma diminuição dos casos de incidência e taxa de mortalidade de 30% e 47% desde o ano 2000, respetivamente (Burchard, 2014).

Contudo na região africana onde a WHO atua, estima-se que 90% das mortes ocorrem devido a malária sendo os mais afetados, 78%, as crianças com menos de 5 anos de idade (Burchard, 2014).

Como esquematizado na **figura 1.2** para além do clima propício, as regiões tropicais e subtropicais são caracterizadas como sendo regiões ainda em desenvolvimento e apresentam outros fatores que acentuam a incidência da malária, tais como as condições ambientais e habitacionais que favorecem uma maior distribuição geográfica das várias espécies de *Plasmodium*, o nível antropológico, sociocultural e económico-político (De Silva & Marshall, 2012).



**Figura 1.2:** Fatores que influenciam o quadro clínico e distribuição geográfica da malária.

A junção desses fatores em regiões de elevado empobrecimento, com fracas infraestruturas de apoio à saúde influenciam o grau de transmissão da doença e conseqüentemente o quadro clínico dos doentes.

#### 1.4. Classificação da malária

De acordo com a incidência numa determinada região, a malária pode ser classificada como sendo endêmica, quando ocorre uma incidência de casos constantes durante vários anos consecutivos, ou epidêmica quando ocorre agravamento súbito, ocasional ou periódico da incidência dos casos (WHO, 2008 e Mendis, *et al.*, 2009).

### 1.5. Biologia do parasita da malária *Plasmodium spp.*

O parasita do género *Plasmodium* é o responsável pela malária. Estes pertencem ao Filo Apicomplexa, Classe Haematozoa, Ordem Haemosporida e Família Plasmodiidae (Ayala *et al.*, 1998).

Existem mais de 120 parasitas do género *Plasmodium*, mas apenas 5 são capazes de provocar a infeção nos humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e o mais recentemente identificado, o *P. knowlesi* (Dhangadamajhi, *et al.*, 2010 e Kantele, *et al.*, 2011).

Estas espécies causadoras da malária humana divergem na sua distribuição geográfica e no seu grau de gravidade. (**tabela 1.1**). O ciclo de vida destes parasitas é semelhante, diferindo relativamente ao período e duração do ciclo de vida e em algumas espécies a presença de formas hepáticas latentes. A espécie de parasita com maior taxa de mortalidade é o *P. falciparum* que tem uma distribuição global embora seja mais incidente no continente africano (Prakash *et al.*, 2006).

**Tabela 1.1:** Características e distribuição geográfica das espécies de *Plasmodium* causadoras da malária humana. Adaptado de (Guerra M, 2012).

| Espécies e Características     | <i>Plasmodium falciparum</i>   | <i>Plasmodium Vivax</i>                            | <i>Plasmodium malariae</i>   | <i>Plasmodium ovale</i> | <i>Plasmodium Knowlese</i> |
|--------------------------------|--|--|--|-------------------------|----------------------------|
| <b>Distribuição geográfica</b> | Regiões tropicais e subtropicais, África, América central e do sul, sudeste Asiático | América central e do sul, Índia e sudeste Asiático | Regiões tropicais e subtropicais, África, América central e do sul, sudeste Asiático | África subsariana       | Málasia e áreas adjacentes |
| <b>Risco de vida</b>           | Elevada  | Sim  | Não  | Nao                     | Sim                        |

|  |            |            |              |        |             |
|--|------------|------------|--------------|--------|-------------|
| <b>Duração do ciclo de vida (hepanozoitos)</b> | 5 a 7 dias | 6 a 8 dias | 12 a 16 dias | 9 dias | -----       |
| <b>Ocorrência de latência no fígado</b>        | Não        | Sim        | Não          | Sim    | Não se sabe |

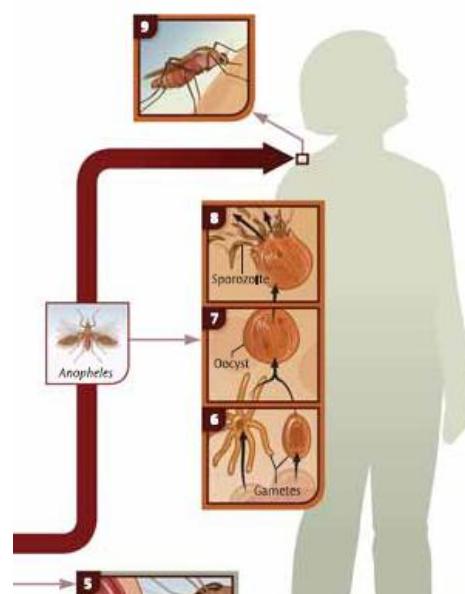
### 1.5.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida do parasita *Plasmodium* envolve a interação com os hospedeiros vertebrados e invertebrados. O desenvolvimento do parasita nesses hospedeiros ocorre em duas fases reprodutivas: fase assexuada ou esquizogônica que ocorre no fígado e sangue do hospedeiro vertebrado e a fase sexuada ou esporogônica que ocorre no intestino médio do hospedeiro invertebrado (Despommier, *et al.*, 2005 e Neves, *et al.*, 2005).

#### 1.5.1.1. Hospedeiro vertebrado – Homem

A fase sexuada no humano divide-se em duas subfases:

a fase exoeritrocitária que ocorre a nível do fígado e a fase eritrocitária que ocorre nos eritrócitos (**figura 1.3**).



**Figura 1.3:** Ciclo de vida do parasita *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado – humano (CDC, 2007)

Quando uma fêmea do mosquito *Anopheles* infectada com o parasita *Plasmodium* se alimenta num humano, inocula cerca de 15 a 200 esporozoítos para a corrente sanguínea. No fígado invadem os hepatócitos onde se diferenciam em trofozoítos que por mitoses sucessivas se transforma em esquizontes hepáticos. Este quando maduro, contém milhares de merozoítos,

que são libertados do hepatócito agregados em merossomas e entram na circulação sanguínea. Já nos capilares ocorre a libertação de diversos merozoítos, os quais invadem os eritrócitos.

Os merozoítos recém libertados penetram nos eritrócitos onde se desenvolvem assexuadamente formando inicialmente estruturas em forma de anel que posteriormente se multiplicam formando esquizontes com merozoítos prontos para serem libertados na corrente sanguínea. Alguns dos merozoítos ao invadirem os eritrócitos desenvolvem-se em gametócitos, que são a forma parasitária responsável por infectar os mosquitos durante a refeição sanguínea (CDC, 2007).

### 1.5.1.2. Hospedeiro Invertebrado – Mosquito

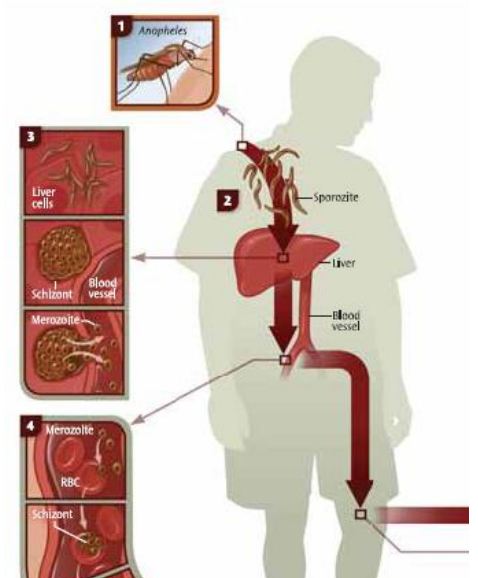
A refeição sanguínea num humano infectado com o parasita *Plasmodium* leva à infecção do mosquito através da ingestão de gametócitos masculinos e femininos.

Uma vez no mosquito, o processo de gametogénese ocorre no intestino médio, com formação dos gametas masculinos (microgametas) e feminino (macrogametas). Após a gametogénese, dá-se a fecundação dando origem ao zigoto.

O zigoto diferencia-se numa estrutura celular móvel e alongada com capacidade de invadir a camada epitelial do estômago – o oocineto.

Após invasão do epitélio do intestino médio, na lâmina basal os oocinetos originam os oocistos, estrutura celular onde ocorre o processo de divisão mitótica com formação da forma infetante para os humanos – os esporozoítos.

Uma vez maduros, os esporozoítos provocam a rutura da parede do oocisto sendo disseminados para o hemocélio do mosquito e transportados para as glândulas salivares através da hemolinfa. Durante a refeição sanguínea, o parasita é inoculado no hospedeiro vertebrado conduzindo à transmissão da doença e ao desencadeamento de novo ciclo de vida dos parasitas (CDC, 2007).



**Figura 1.4:** Ciclo de vida do parasita *Plasmodium* no hospedeiro invertebrado – Mosquito ( CDC, 2007).

## 1.6. Biologia do mosquito *A. gambiae*

Os mosquitos do género *Anopheles* são os principais vectores envolvidos na transmissão da malária humana. Apenas as fêmeas dos mosquitos são vectores da malária, uma vez que necessitam de refeição sanguínea para fins reprodutivos (Consoli & Oliveira, 1994).

Os mosquitos vectores da malária pertencem ao reino Animália, filo Arthropoda, classe Insecta, subclasse Pterigota, ordem Diptera, subordem Nematóceras, família Culicidae, subfamília Anophelinae e género *Anopheles* (Meigen, 1830).

### 1.6.1. Ciclo de vida do mosquito *A. gambiae*

O ciclo de vida do mosquito *A. gambiae* (**figura 1.5**) compreende duas fases, uma fase aquática que abrange os estádios de ovos, larva e pupa. E uma fase terrestre, o mosquito adulto (Consoli & Oliveira, 1994).

Os ovos têm uma estrutura elíptica ou ovalada (Consoli & Oliveira, 1994 e Clements, 2008). São revestidos por uma camada rígida e impermeável – o cório. Nos anofelinos, o exocório apresenta estruturas designadas por flutuadores que impedem a submersão dos ovos.

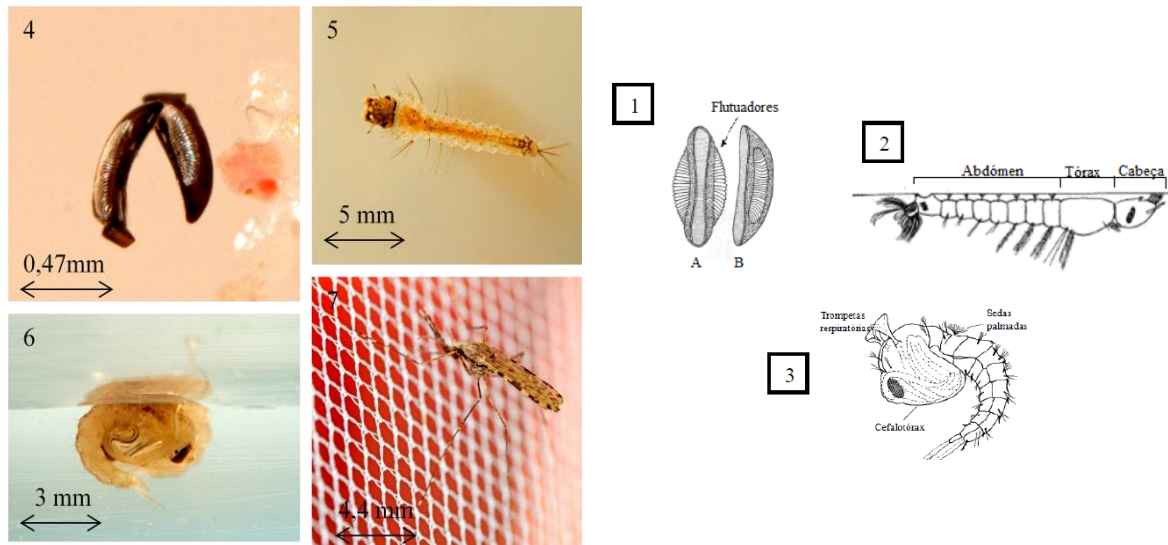
Passados 2 a 3 dias após a oviposição, dependendo da temperatura, os ovos eclodem libertando larvas.

As larvas apresentam uma forma vermiforme, com corpo nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdómen ainda em formação. As larvas de *Anopheles* não têm um sifão respiratório e permanecem paralelas a superfície da água para respirarem.

A fase larvar dura cerca de 7 dias em regiões tropicais podendo em regiões temperadas durar de 2 a 4 semanas. As larvas passam por 4 estádios larvares designados por ínstaes durante o seu desenvolvimento. Após atingir o 4º estadio larvar convertem-se em pupas (Pires; 2012). As pupas têm uma estrutura em forma de vírgula com a cabeça e tórax fundidos no cefalotórax e flutuam na superfície da água. A fase pupar compreende um estágio móvel não alimentar.

O período de pupa demora cerca de 2 a 3 dias em regiões tropicais e 1 a 2 semanas em regiões temperadas. A eclosão do mosquito adulto dura cerca de alguns minutos.

Quando a eclosão é bem-sucedida, o mosquito emerge com capacidade de se alimentar, apresentando um aparelho bucal do tipo picador/sugador, consegue endurecer as asas e voar (Consoli & Oliveira, 1994 e Clements, 2008).



**Figura 1.5:** Fases do desenvolvimento do mosquito *Anopheles*. 1 e 4 Ovos com estrutura elicoidal com flutuadores na parte lateral; 2 e 5 divisão estrutural da larva em cabeça, tórax e abdômen; 3 e 6 Pupa com estrutura em forma de vírgula; 7 adulto fêmea (Adaptado de Service, 1980).

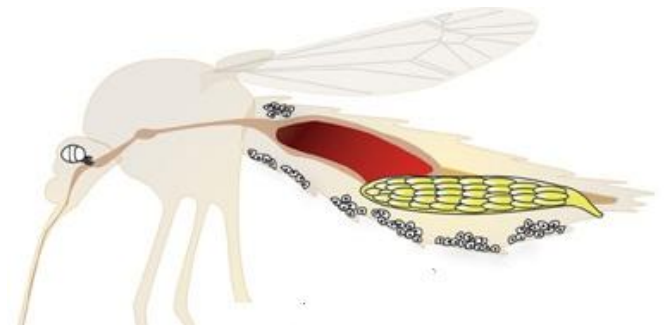
### 1.6.2. Anatomia externa do mosquito Adulto

Os mosquitos apresentam uma estrutura corporal constituída por segmentos revestidos pelo exosqueleto formado essencialmente por quitina. Tais segmentos endurecidos e as membranas que os unem englobam uma cavidade chamada hemocélio preenchida com hemolinfa, que é um líquido bombeado pelo coração e que banha os órgãos dos mosquitos (Consoli & Oliveira, 1994).

No mosquito adulto, é possível distinguir três divisões corporais, a cabeça, o tórax e o abdómen.

### 1.6.3. Anatomia interna do mosquito

Os órgãos dos mosquitos encontram-se na cavidade geral ou cavidade celômica, preenchida pela hemolinfa (**figura 1.6**).



**Figura 1.6:** Anatomia interna do mosquito *Anopheles gambiae* (Hansen et al., 2014)

#### 1.6.3.1. Aparelho digestivo

O tipo de refeição do mosquito adulto vai influenciar em parte a estrutura e ultraestrutura do aparelho digestivo do mosquito.

O aparelho digestivo do mosquito pode ser dividido em três partes, uma porção anterior que engloba o aparelho bucal, o esôfago e as glândulas salivares, uma porção central, ou intestino médio onde ocorre a digestão e uma porção posterior composta pelo íleo, reto e o ânus (Consoli & Oliveira, 1994).

Anexas à porção anterior do tubo digestivo, estão um par de glândulas salivares. Estas são trilobuladas, organizadas em três ácinos, dois laterais maiores e um central, com estruturas em sacos digitiformes (Clements, 2013).

O intestino médio é altamente elástico, revestido internamente por um epitélio adaptado à secreção e à absorção, é composto por três tipos celulares sendo a maioria do tipo colunar que varia consoante o grau de extensão do estômago, pequenas células regenerativas indiferenciadas e células endócrinas (Consoli & Oliveira, 1994 e Clements, 2008).

Associado ao epitélio que reveste o intestino médio, na parte interna está uma lâmina basal e uma rede de células musculares circulares e longitudinais inervadas.

A porção posterior do aparelho digestivo, é constituído por uma válvula pilórica com estrutura bulbosa de onde os túbulos de Malpighi drenam, pelo reto e canal anal. Toda a porção externa do intestino grosso encontra-se revestido por epitélio muscular enquanto a porção lumiar tem um revestimento cuticular. (Consoli & Oliveira, 1994 e Clements, 2008).

### **1.6.3.2. Corpo adiposo**

O Corpo adiposo é o maior órgão de armazenamento e de metabolismo intermediário nos insectos. É o responsável pela síntese e suplemento de substâncias da hemolinfa e reservas energéticas.

Trata-se de uma massa de células acastanhadas localizadas debaixo da epiderme próximo do nervo dorsal ou em alguns insectos localizados ao redor dos órgãos digestivos e reprodutivos (Martins *et al.*, 2011).

As células funcionais do corpo adiposo são os trofócitos, são células poligonais com núcleos irregulares deslocados para a periferia com muitos nucléolos e presença de proteínas, polissacarídeos neutros e lípidos distribuídos por todo o seu citoplasma. Os trofócitos formam agrupamentos através de uma fina lâmina basal, uma mesoderme rica em lípidos, proteínas e glicogénio que providenciam energia e nutrientes para a locomoção e reprodução dos insectos (Chapman, 1998 e Martins *et al.*, 2011).

Uma vez que o corpo adiposo atua de forma análoga ao fígado dos vertebrados, também desempenha funções semelhantes, atuando como órgão endócrino na síntese de péptidos antimicrobianos, desintoxicação do metabolismo de nitrogénio e na homeostase dos insectos através do recrutamento e armazenamento de substâncias tóxicas para a hemolinfa e Arrese & Soulages, 2010).

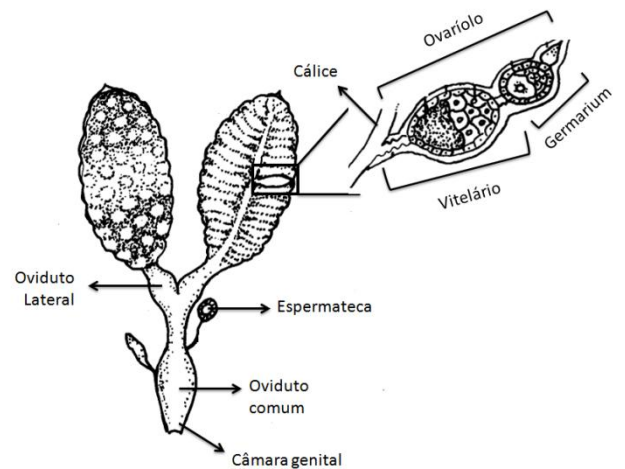
O corpo adiposo esta fortemente relacionado com a função hormonal, uma vez que atua como alvo da ação de diversas cascatas hormonais e funções metabólicas, nomeadamente o metabolismo de lípidos, carboidratos, síntese proteica e metabolismos de amino ácidos e nitrogénios (Arrese & Soulages, 2010).

Através da sua função hormonal e metabólica, controla a síntese e libertação de reservas energéticas (glicogénio e triglicéridos) permitindo a ativação de diversas atividades dos mosquitos como o voo, a reprodução, o crescimento e a defesa imunológica (Arrese & Soulages, 2010).

É o local anatómico de grande importância para o processo de reprodução uma vez que é o órgão onde se dá a produção dos elementos essenciais para a vitelogénese.

### 1.6.3.3. Sistema reprodutor feminino do mosquito *Anopheles*

O aparelho reprodutor da fêmea é composto por um par de ovários localizados na porção dorsolateral da região posterior do abdômen. Os ovários encontram-se conectados através de ovidutos laterais a um oviduto comum que termina ao nível da câmara genital (**figura 1.7**) (Consoli & Oliveira, 1994 e Clements, 2008).



**Figura 1.7:** Sistema reprodutor da fêmea de mosquito *Anopheles* adaptado de Forattini, 1995.

Cada ovário é perfurado por redes de traqueias que terminam em traqueolas dentro dos ovários e nervos que percorrem a massa gânglionica até ao oviduto lateral e para a base do ovário para o oviduto comum.

São atravessados por um canal central revestido por um epitélio contínuo ao oviduto lateral, o cálice, a partir do qual os ovaríolos irradiam.

Os ovaríolos são as unidades funcionais dos ovários. O seu número varia entre os 50 a 200, variando entre espécies, e influenciado pelo tamanho das fêmeas (Consoli & Oliveira, 1994 e Clements, 2008)

Os ovaríolos dividem-se estruturalmente em duas porções, uma porção anterior que consiste no germário, dentro do qual ocorrem divisões mitóticas das células germinais dando origem a oócitos e a porção restante, o vitelário, local onde se dá a incorporação da vitelogenina (Vg) nos oócitos ( Dana et al., 2005; Chapman, 2013).

O ovaríolo é revestido por três camadas membranares, a túnica própria, mais intimamente ligada ao ovaríolo, a bainha ovariolar e uma membrana com estrutura em saco que encapsula todo o ovário e se estende até aos filamentos terminais (Klowden, 2013).

O vitelário é composto por 2 ou 3 folículos, cada um composto por um oócito e sete trofócitos envolvidas pelo epitélio folicular (EF).

As ramificações foliculares fazem a ligação entre os folículos adjacentes com o germário e conectam o primeiro folículo ao cálice.

Adjacente ao oviduto comum localiza-se a espermateca, que consiste num órgão com estrutura em concha esclerotizada usada para armazenamento dos espermatozoides em fêmeas inseminadas.

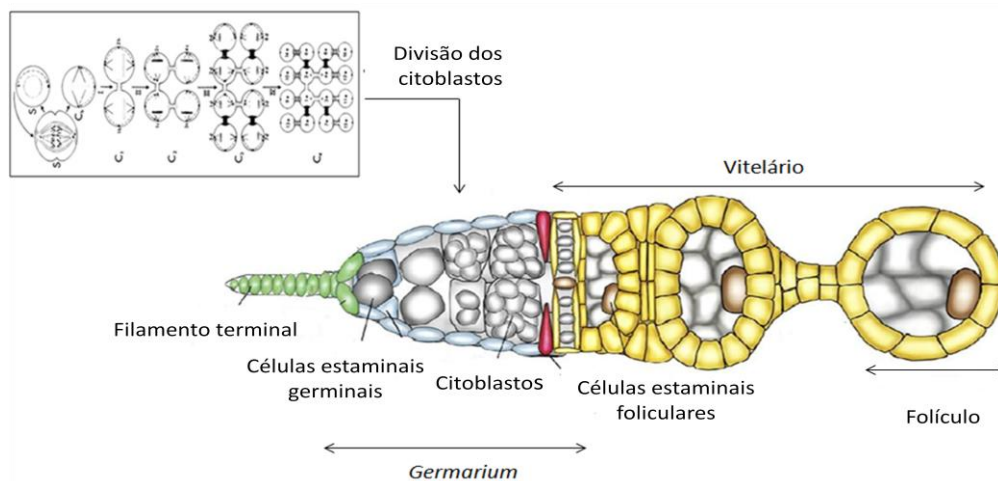
#### 1.6.4. Oogénese do mosquito *A. gambiae*

Os folículos ováricos são as unidades reprodutivas dos ovários dos mosquitos. A sua formação ocorre a nível dos ovaríolos, mais precisamente na porção anterior, no germário, onde, as células estaminais germinais desenvolvem-se de forma a originar citoblastos que por mitoses sucessivas formam um conjunto de clones de células interligadas por pontes intercelulares (**figura 1.8**) (Engelmann, 2015)

Cada conjunto de citoblastos interligados são posteriormente encapsulados por uma camada de células somáticas, epitélio folicular, dando origem ao folículo ovárico.

Os folículos ováricos dos mosquitos são classificados como meroísticos porque dos citoblastos encapsulados no seu interior, um desenvolver-se-á em oócito enquanto que os restantes se desenvolverão em 7 trofócitos.

A produção de oócitos maduros ocorre num processo cíclico onde os folículos de cada lote de ovaríolos se desenvolvem de forma sincronizada através de uma sequência de passos que leva a maturação da totalidade dos oócitos, completando assim o ciclo ovárico (Clements, 2000).



**Figura 1.8:** Ilustração da síntese de folículos ováricos a partir de clones de citoblastos no *germarium* e o seu desenvolvimento no vitelário. Adaptado de <https://cellbiol2061.wordpress.com/> (Engelmann, 2015).

### 1.6.5. Vitelogénese do mosquito *A.gambiae*

A vitelogénese é um processo que ocorre ao nível do vitelário e consiste na síntese e incorporação de vitelogenina (Vg) nos oócitos dos folículos primários (Mishra et al., 2008).

Trata-se de um processo indispensáveis para a reprodução, uma vez que providencia a maior fonte de nutrientes e proteínas essenciais para a sobrevivência nos primeiros instares larvares dos mosquitos.

A vitelogenina é uma glicolipofosfoproteína oligomérica codificada em *A. gambiae* por uma pequena família de genes com potenciais locais de lipidação, glicosilação e fosforilação. É produzida no retículo endoplasmático rugoso (RER) dos trofócitos do corpo adiposo com uma estrutura contendo duas ou mais subunidades e posteriormente é clivada e secretada para a hemolinfa (Klowden, 2013) .

Uma vez na hemolinfa é transportada juntamente com lípidos produzidos no corpo adiposo para os ovários através de moléculas de transporte reutilizáveis denominadas lipoforinas (Lp) também produzidas no corpo adiposo e secretadas para a hemolinfa.

As Lp possuem duas subunidades que juntas moldam a Vg e os lípidos permitindo o seu transporte do local de síntese para os órgãos e tecidos através da hemolinfa.

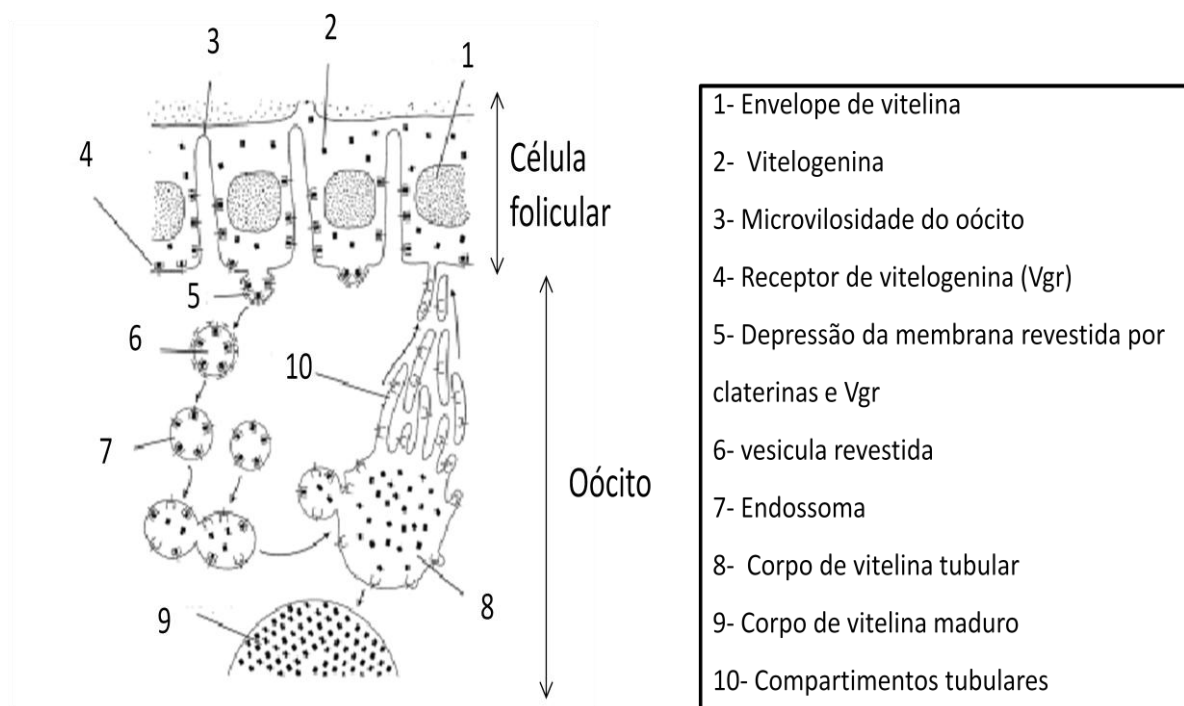
A incorporação dos produtos provenientes da hemolinfa (**figura 1.9**), nomeadamente Vg e lípidos para os oócitos é mediado pela ação de células epiteliais foliculares adjacentes. Isto é, através do aumento da permeabilidade dos oócitos como resultado da abertura de espaços intracelulares das células epiteliais foliculares que permitem a endocitose mediada por recetores específicos.

A absorção de Vg ocorre de forma seletiva devido à presença de recetores específicos (VgR). A internalização do complexo Vg/VgR pelos oócitos dá-se pela internalização de vesículas revestidas por claterinas (Klowden, 2013).

Uma vez encapsulado, a vesícula endossomática perde o revestimento das claterinas, que são recicladas, e funde-se com os corpos vitelogenicos no oócito. No oócito, a Vg dissocia-se do seu recetor e é armazenado como uma estrutura cristalizada não circulante denominado por vitelina e o seu recetor é reciclado (Klowden, 2013).

A vitelogenina compreende entre 60-90% do total de proteínas solúveis presentes no oócito, sendo o restante 40% do peso seco dos oócitos (90% de triacilgliceróis e restantes lípidos como o colesterol, fosfolípidos e ácidos gordos) composto por lípidos, e numa porção bastante inferior também se encontram carboidratos armazenados em forma de glicogénio (Chapman et al., 2013 e Klowden, 2013).

Após o término do processo de vitelogénese, as células epiteliais foliculares retomam a sua estrutura original não permeável e começam a produzir uma membrana acelular a volta do oócito – Cório.



**Figura 1.9:** Processo de incorporação de vitelogenina nos oócitos e a sua acumulação como vitelina nos corpos vitelogénicos (Klowden, 2013)

### 1.6.6. Caracterização do ciclo ovárico dos mosquitos

A fase inicial do desenvolvimento folicular designa-se por **fase pré-vitelogénica**, consiste na fase de regulação do crescimento folicular e preparação para incorporação de vitelogenina.

Corresponde a fase em que os citoblastos ao serem revestidos pelo epitélio folicular estimulam o desenvolvimento sincronizado do lote de folículos primários que se separam do germário começando a sua descida para o vitelário.

Na fase pré-vitelogénica, o oócito pode ser claramente distinguido dos trofócitos, o epitélio folicular também já se encontra maduro e o oócito torna-se competente para receber a vitelogenina. (Clements,2008).

Verifica-se um pequeno crescimento folicular antes da entrada para o repouso pré-vitelogénico.

A fase imediatamente posterior a refeição sanguínea é designada por **fase de iniciação**, fase em que se retoma o crescimento folicular.

É caracterizada pela formação de microvilosidades e depressões, bem como pelo início da síntese de Vg pelo corpo adiposo através da ativação de diversas cascatas enzimáticas e de sinalização responsáveis pela indução da produção de precursores de Vg, estimulação do corpo adiposo e ovários para a libertação de péptidos hormonais do sistema nervoso central associados a promoção do desenvolvimento dos oócitos.

A **fase trófica** do desenvolvimento folicular corresponde às restantes fases em que ocorrem todos os processos fundamentais para que haja o desenvolvimento e sobrevivência das larvas dos mosquitos, uma vez que compreende a continuação da síntese, início do transporte e incorporação de Vg e lípidos nos oócitos.

Ainda nesta fase, dá-se o término da síntese de vitelogenina e torna-se possível observar as estruturas do oócito maduro e a membrana do ovo que começam a desenvolver. Forma-se uma membrana, endocório, entre o oócito e as células foliculares que serve como barreira para evitar a incorporação de Vg.

Posteriormente quando o oócito assume a sua forma madura, dá-se a formação de uma membrana externa o exocório que ao endurecer forma o córion, **fase pós-trófica** (Clements, 2000; Dana et al., 2005 e Clements,2008).

### 1.6.6.1. Estádios de Christopher

Segundo as descrições de Christopher (1911), a fase precoce do desenvolvimento folicular designa-se por **estado gonotrófico** e tem início logo após a emergência da fêmea (Dana et al., 2005).

Este estágio descreve o momento em que o folículo se encontra ainda parcialmente ligado ao *germário* e o revestimento pelo epitélio folicular ainda não esta completa.

Após este estágio inicial, o folículo entra em **repouso gonotrófico**, retomando o desenvolvimento apenas na presença da hormona 20-hidroxiecdisone (20E).

À saída do repouso gonotrófico, o folículo já se encontra separado do *germário* e completamente revestido pelo epitélio folicular, **estádio Ia**. No estágio Ia, tornam-se distintos os tipos celulares do folículo, um oócito e 7 trofócitos. O folículo inicia a sua descida para o vitelário, crescendo consideravelmente até atingir 40-50 µm momento a partir do qual entra no repouso do estágio Ia regulado pela ação da hormona juvenil (JH).

Geralmente, o primeiro folículo desenvolve-se diretamente para os estádios Ib e Iib após a emergência ou permanece em repouso seguindo o desenvolvimento apenas após a refeição sanguínea – **repouso pré-vitelogénico**.

Quando o folículo atinge o **estádio Ib**, o oócito já ocupa cerca de 50% do comprimento do folículo e torna-se possível observar algumas deposições lipídicas de pequenas dimensões no ooplasma. No **estádio Iib**, as deposições lipídicas tornam-se mais consistentes o que dá uma aparência escura ao folículo. A membrana nuclear e os nucléolos do oócito podem continuar ainda indistinguíveis.

Depois da refeição sanguínea, os folículos que se encontram em repouso pré-vitelogénico retomam o ciclo de desenvolvimento entrando no **estádio IIIa** onde o ooplasma apresenta-se turvo devido a presença de inclusões lipídicas. Os núcleos tornam-se visíveis e densos e o oócito passa a ocupar progressivamente cerca de 50% do total do folículo.

No **estadio IIIb**, ainda não são visíveis as alterações estruturais do folículo que continua a crescer consideravelmente. O oócito passa a ocupar cerca de 50% -75% do tamanho do folículo.

Após este estágio, surge uma nova paragem, **repouso do estágio III** onde se pode verificar reabsorção dos folículos ou continuação do seu desenvolvimento rumo a maturação.

Ao continuar o ciclo de desenvolvimento, os folículos atingem o **estádio IVa**, onde continuam o seu crescimento alterando a sua estrutura morfológica de forma a ficar cada vez mais alongada. Nesta fase o oócito preenche 90% do folículo sendo os restantes 10% preenchidos pelos trofócitos.

No **estádio IVb**, o folículo assume a forma de oócito maduro mas sem atingir o comprimento final. Ocorre degeneração e desaparecimento dos trofócitos.

No último estágio do desenvolvimento folicular, **estádio V**, o oócito apresenta o comprimento e forma madura, ocorre degeneração e desaparecimento da camada epitelial e é possível verificar-se a deposição do envelope de vitelina e posterior formação da camada coriônica.

Neste estágio, estando o oócito já maduro, entra no último momento de repouso, repouso **de maturação**, de onde sai apenas após a fecundação do oócito (Clements, 2000).

### 1.6.7. Fatores determinantes na reprodução do vector *Anopheles gambiae*

A reprodução nos mosquitos consiste num processo complexo que engloba a ativação de diversas vias hormonais indispensáveis para que haja o cumprimento de todas as etapas do ciclo de vida. Compreende 4 etapas principais, a fase pré- vitelogénica, o acasalamento, a refeição sanguínea e a fase pós- vitelogénica, que juntos desencadeiam a ativação de vias hormonais com especial importância na reprodução.

#### 1.6.7.1. Fase pré-vitelogénica

##### Hormona juvenil

É um fator hormonal muito importante na regulação endócrina da reprodução dos mosquitos, a sua ação precoce estimula a separação dos folículos ovários ao *germário* e limita o crescimento folicular conduzindo para o estágio de repouso pré-vitelogénico (Dana et al., 2005).

A JH pertence à classe das sesquiterpenoides produzidos pelo *corpora allata* (CA) localizado no complexo retrocerebral endócrino dos mosquitos (figura 1.10).

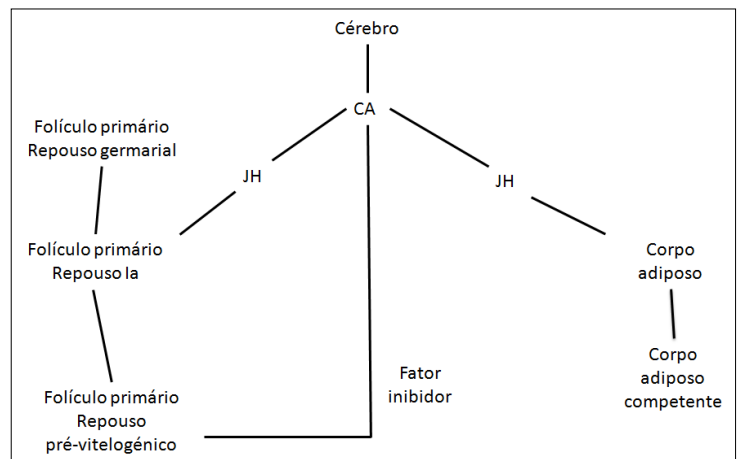


Figura 1.10: Síntese e ação da hormona juvenil

De entre as isoformas de JH, a mais prevalente nos mosquitos é a JH III que tem como finalidade tornar os folículos ovários competentes para a vitelogenese após a refeição sanguínea (Badisco, Van Wielendaele, & Broeck, 2013; Hartfelder, 2000)

A JH exerce a sua função reguladora quer a nível central no eixo neuroendócrino como também a nível dos tecidos periféricos como a epiderme e o corpo adiposo (Hartfelder, 2000).

A nível central tem a função precoce de inibir a libertação da hormona cerebral ecdisiotrófica (PTTH) e consequentemente a síntese de ecdisona (E) prevenindo a evolução do mosquito para a fase adulta (Hartfelder, 2000).

Nas células do corpo adiposo, a JH regula a síntese de Vg nas etapas pré e pós refeição através da ativação de um recetor nuclear AHR38 que ao interagir com o ultra spiracle (USP) interrompe a capacidade deste em ligar-se ao DNA reprimindo consequentemente a expressão do gene de Vg na ausência de 20E antes da refeição sanguínea. Após a refeição sanguínea, a JH induz a formação do dímero de seven-up (Svp) com USP reprimindo novamente a síntese de Vg até que se complete a maturação do ovo (Klowden, 2013).

A nível periférico e no corpo adiposo, a JH atua na reprodução das fêmeas como responsável pela regulação do processo de vitelogénese, na medida em que atua diretamente no corpo adiposo e ovários capacitando-os para a absorção da hormona ecdiosteroidogénica (OEH) após a refeição sanguínea conduzindo a produção da hormona 20E que ao ligar-se ao seu recetor EcR e ao USP leva a transcrição do gene de Vg (Klowden, 2013).

Para além de ser fundamental a síntese de Vg, a JH atua ainda na capacitação dos folículos para a incorporação de Vg após a refeição sanguínea através do aumento da actividade dos canais  $Na^+/K^+$  que conduzem ao aumento da permeabilidade das células foliculares permitindo maior absorção (Hartfelder, 2000).

#### **1.6.7.2. Acasalamento**

##### **Complexo 20E-EcR-MISO**

O acasalamento ocorre geralmente durante a estação crepuscular em enxames de grandes agregações de machos onde as fêmeas ao entrarem são capturadas pelos machos formando casais que deixam o enxame em cópula.

Todo o processo de encontro macho-fêmea é dirigido por marcadores específicos como a frequência de batimentos das asas e as interações acústicas específicas de cada espécie (Baldini *et al.*, 2012).

As fêmeas *A.gambiae* são classificadas como monoandrico, isto é, copulam apenas com um único macho e apenas uma vez ao longo do seu ciclo de vida.

Este fenómeno de acasalamento único, resulta das inúmeras alterações sofridas pela fêmea após a cópula, nomeadamente alterações fisiológicas e comportamentais que levam ao bloqueio do *atrium* da fêmea promovendo perda irreversível da recetividade para mais acasalamento (Baldini *et al.*, 2012).

No entanto, esta característica das fêmeas não é prejudicial à vida reprodutiva da fêmea, uma vez que durante o acasalamento os mosquitos machos transferem esperma que é armazenado na espermateca, de onde é libertado de forma gradual após cada refeição sanguínea para inseminar os oócitos maduros (Baldini et al., 2012).

Nos mosquitos *A.gambiae*, o acasalamento não serve apenas como fonte para a obtenção do esperma, mas também providencia a deposição de secreções seminais da glândula acessória (MAG) que se encontra acoplada a um tampão de acasalamento gelatinoso que coagula durante a cópula – tampão de acasalamento (Baldini et al., 2012)

Estudos revelam que este tampão de acasalamento proveniente do macho é o responsável por modular o comportamento e a fisiologia da fêmea depois do acasalamento, bem como por promover o correto transporte do esperma para a espermateca através da ligação de péptidos do MAG aos seus flagelos (Rogers et al., 2008).

A análise da sua composição revelou em grande parte a presença de proteínas redox, particularmente oxidases. Muitas das quais envolvidas na síntese da hormona 20E também transferido para a fêmea durante o acasalamento (Pondeville et al., 2008; Rogers et al., 2008; Baldini et al., 2012 e Gabrieli et al., 2014).

Em *A. gambiae*, este tampão é digerido no *atrium* da fêmea 1 a 2 dias após o acasalamento por ação de proteases da fêmea (Gabrieli et al., 2014). Uma dessas proteases femininas responsáveis pela digestão do tampão de acasalamento, é um estimulador da oogénese induzida pelo acasalamento (MISO) (Baldini et al., 2013).

O MISO é um regulador da oogénese dependente do acasalamento. A sua síntese após o acasalamento é induzida pela presença de 20E no tampão de acasalamento e a sua ligação ao recetor de ecdisone (EcR) (Baldini et al., 2013).

Ao ser produzido, o MISO liga-se ao complexo 20E-EcR e juntos conduzem a transcrição de uma variedade de genes oogénicos incluindo a regulação da expressão da lipoforina no corpo adiposo para a potenciação da acumulação de lípidos no oócito e promoção do desenvolvimento do ovo (Baldini et al., 2013).

Existe portanto uma relação estrita entre MISO e 20E, onde o MISO é regulado pela ligação do 20E ao seu recetor EcR e ao digerir o tampão permite a libertação de 20E (Baldini et al., 2013).

A 20E transferida pelo macho durante o acasalamento atua como chave reguladora do comportamento monoandrico e da oviposição em mosquitos *A. gambiae*. Após a sua libertação é secretada para a hemolinfa da fêmea e enviada especificamente para os ovários onde potencia o processo de vitelogénese (Gabrieli et al., 2014).

### **1.6.7.3. Refeição sanguínea**

Os mosquitos *A. gambiae* são mosquitos anautógenos, isso é, requerem uma refeição sanguínea obrigatória para produzir o seu primeiro conjunto de ovos (Hansen *et al.*, 2014).

As cascatas de eventos desencadeadas pela refeição sanguínea são conduzidas para o corpo adiposo, onde ocorre a produção de componentes essenciais à vitelogénese. No entanto, para que ocorra uma ótima expressão dos componentes da vitelogénese no corpo adiposo, é necessário o envolvimento de duas vias fundamentais, a via de sinalização do alvo da rapamicina cinase (TOR) e a via de sinalização de insulina/OEH que levam a produção de 20E (Rono *et al.*, 2010).

#### **1.6.7.3.1. Sinalização TOR**

Uma vez tomada a refeição sanguínea, sucede-se o transporte de aminoácidos e lípidos das células do intestino médio para a hemolinfa e ativação da via de sinalização TOR (Target of Rapamycin), um membro da superfamília fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) responsável pela regulação da expressão dos genes, biossíntese proteica e diferenciação celular através de vias de regulação transcrição e tradução (Arsic & Guerin, 2008).

A via de sinalização TOR atua como sensor nutricional celular responsável por ceder energia e nutrientes para o crescimento e divisão celular ou para o armazenamento de energia quando não é necessário.

Na presença de nutrientes e amino ácidos, é estimulada pela cinase S6K, pertencente a família AGC das proteínas cinases que conduz à tradução da informação nutricional para o desenvolvimento do ciclo ovárico do mosquito.

A sua ação reguladora no ciclo folicular ocorre através da regulação da expressão de Vg no corpo adiposo e na potenciação do crescimento folicular através da síntese de transportadores de nutrientes. (Rono et al., 2010).

#### **1.6.7.3.2. Síntese da Hormona 20E**

Por outro lado, os nutrientes provenientes da refeição sanguínea estimulam a via de sinalização da insulina que atua como sensor sistêmico do estado nutricional do organismo (Badisco et al., 2013).

Nesta via, o péptido semelhante a insulina (ILPs) que codifica genes nas células neurosecretoras mediais (MNC) ao ligar-se ao seu recetor (INR) leva a fosforilação do seu recetor e induz a produção de ecdisona.

Esta via atua em concordância com a via TOR uma vez que ambos são essenciais no controlo da síntese de vitelogenina no mosquito por atuarem como sensor de nutrientes e na promoção da vitelogénese pela indução da síntese da JH e Vg (Badisco et al., 2013).

Ainda desencadeado pela chegada de nutrientes da refeição sanguínea, as células neurosecretoras cerebrais produzem e libertam a hormona ecdisteroidogênica ovárica (OEH) que atua em paralelo com a via de sinalização da insulina na indução da secreção da ecdisona pelos ovários e o seu transporte para o corpo adiposo onde é hidroxilada a 20E (Badisco et al., 2013; Dana et al., 2005; Dhara et al., 2013). No corpo adiposo, a 20E produzida estimula a transcrição da Vg através da ligação ao complexo do recetor heterodimérico nuclear da hormona ecdisona (EcR) com o homólogo do recetor retinoide X (RXR), Ultra spiracle (USP) num processo que potencia a transcrição de Vg e do seu transportador lp (Zhu et al., 2003; Pondeville et al., 2008; Baldini et al., 2013; Ioshino, 2013).

Uma vez que nos insectos fêmea, a 20E desempenha o um papel principal na ativação da vitelogénese (Pondeville et al., 2008), a junção da ecdisona produzida pelas diferentes etapas de ativação hormonal e posterior conversão a 20E no corpo adiposo potenciam grandemente todo o processo de vitelogénese e consequentemente todo o processo reprodutivo.

#### **1.6.7.4. Fase pós-vitelogénica**

A última fase do desenvolvimento folicular envolve diversas vias de degradação com vista ao bloqueio da síntese e incorporação de Vg.

Um dos processos essenciais consiste na autofagia da maquinaria de síntese de Vg no corpo adiposo por ação de lisossomas (Badisco et al., 2013 e Dana et al., 2005).

A hormona oostática produzida e secretada pelos ovário durante a fase pós-vitelogénica promove o termino da vitelogénese através da inibição da expressão de genes da Vg . A sua produção e pico durante a fase pós-vitelogénica estão associados á concentração de edisona (Clements, 2000).

Um fator descrito como responsável pela regulação da expressão de genes de Vg é a USP, na medida em que na presença de 20E forma um heterodimero com o EcR permitindo a ligação de 20E que induz a expressão do gene da Vg (Zhu et al., 2003).

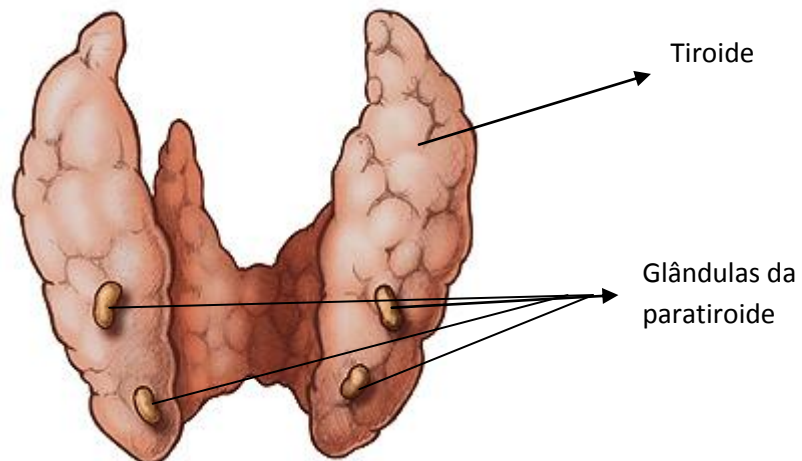
Durante a fase pós-vitelogénica, identificou-se um fator antagonista do recetor EcR, seven-up (Svp) que na ausência de 20E liga-se ao USP impedindo a ligação do EcR, levando a inativação da expressão de genes de vg e consequentemente ao término da vitelogénese (Zhu et al., 2003).

Outro mecanismo associado à finalização do processo de vitelogénese, consiste no bloqueio dos canais intercelulares do epitélio folicular por desmossomas e deposição de proteínas na superfície do oócito, envelope de vitelina, de forma a prevenir a captação de mais vitelogenina (Zhu et al., 2003).

## 1.7. Hormona da paratiroide Humana

A hormona da paratiroide humana (PTH) é a maior reguladora dos níveis de cálcio no sangue e da homeostasia dos ossos nos humanos (Mierke et al., 2007).

Consiste numa hormona secretada pelas quatro glândulas da paratiroide adjacentes à tiroide (**figura 1.11**).



**Figura 1.11:** Ilustração da tiroide e as quatro glândulas da paratiroide que lhe estão adjacentes.

A PTH é sintetizada inicialmente como uma pró-hormona, proparatiroide, que é posteriormente convertida na forma glandular ou de armazenamento que consiste numa proteína com 84 aminoácidos (Brewer et al., 1972). Ao ligar-se ao seu recetor PTH1r, pertencente à família de recetores acoplados a proteína G (GPCR's), são ativadas as funções a nível da homeostasia do cálcio (Mierke et al., 2007).

Os recetores GPCR fazem parte de uma grande família de recetores em vertebrados mas que permanecem desconhecidos em invertebrados.

Trabalhos recentes do grupo sobre a caracterização funcional do recetor órfã da família 2 GPCR em modelos de vectores da malária permitiram obter dados indicativos da estimulação de recetores da família 2 GPCR dos invertebrados por péptidos de vertebrados.

Do estudo de possíveis candidatos responsáveis pela ativação do recetor homólogo GPCR nos mosquitos, verificou-se que o PTH de vertebrados é capaz de estimular a ativação do recetor e levar a produção de cAMP.

Tendo conhecimento dessa interação entre o PTH humano e o recetor dos mosquitos, foi feito um estudo para determinar a influência do PTH na fisiologia do mosquito, nomeadamente o seu efeito na oogénese.

Do estudo feito, verificou-se que ao injetar PTH humano no mosquito, ocorre aumento da expressão do recetor e ativação de uma cascata semelhante à desencadeada aquando da refeição sanguínea o que parece induzir a síntese de vitelogenina e conseqüentemente a oogénese.

## 1.8. Objectivo

Muitos têm sido os desafios e conquistas na área de combate à malária. Um dos mecanismos utilizados para a erradicação da malária consiste na identificação de metodologias que afetam a normal fisiologia e comportamento reprodutivo dos vectores da malária.

Crê-se que reduzindo a população de vectores da malária através da manipulação de vias essenciais à sua reprodução se consiga de forma mais eficaz controlar a propagação da doença. Assim a presente tese tem como objectivo:

- Confirmar se o PTH é o fator sanguíneo capaz de desencadear a vitelogénese/oogénese do mosquito.

Objetivos específicos:

- Analisar a incorporação de vitelogenina nos oócitos de mosquitos alimentados com sangue, refeições de glucose e refeições de glucose contendo apenas PTH;

- Avaliar o perfil de expressão da vitelogenina em mosquitos alimentados com sangue, solução açucarada, solução açucarada contendo PTH;

- Comprovar o efeito do PTH através do silenciamento do recetor de PTH em mosquitos.

- Analisar o efeito do PTH no desenrolar da infeção por *Plasmodium berghei* em mosquitos *Anopheles gambiae*.

## **II. MATERIAIS E MÉTODOS**

## **2. Materiais**

### **2.1. Materiais biológicos**

#### **2.1.1. Mosquitos *Anopheles gambiae* fêmeas**

Os mosquitos utilizados para a presente tese foram obtidos no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT). Foram criados e mantidos em salas com temperatura de 25-27 °C e 70-80 % de umidade. Os mosquitos adultos foram mantidos em gaiolas e alimentados com solução de glicose a 10%.

#### **2.1.2. Ratinhos CD1 fêmeas**

*A.gambiae* fêmeas foram alimentadas diretamente em murganhos fêmeas *Mus musculus* da estirpe CD1 mantidos no biotério do IHMT.

Os murganhos usados na alimentação foram anestesiados com 1,5 ml da solução de ketamina + silazina (protocolo de preparação em anexo 3. 1.1) administrados por via intraperitoneal (IP) e quando anestesiados foram colocados por cima da gaiola contendo os mosquitos adultos fêmeas.

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Atlas de desenvolvimento folicular**

Mosquitos *A. gambiae* com 3 dias de idade foram alimentados diretamente em *Mus musculus* CD1 fêmeas anestesiadas durante cerca de 30 a 40 minutos.

Os mosquitos foram dissecados para obtenção de ovários em intervalos de tempo de 3, 6, 18, 24 e 48 horas após a alimentação (hpa).

Os mosquitos foram dissecados e os ovários colocados em gotas de tampão fosfato salino 10% (PBS) de seguida fixados com 10ul de formaldeído a 4% durante 5 minutos (protocolo de síntese em anexo 3. 1.2).

Após a fixação, retirou-se o formaldeído, lavou-se a amostra com PBS e montou-se entre lâmina e lamela no meio de montagem para fluorescência *Vector shield* (vector laboratories, inc).

A amostra foi visualizada em microscópio óptico acoplado ao computador contendo o programa ProgRescapture Pro 2.1 com câmara fotográfica (JENOPTIK microscopic camera) que permite a realização de fotos e a medição dos folículos ovários.

Os folículos foram medidos na sua secção longitudinal. As medidas foram inseridas numa folha de cálculo excel e as comparações estatísticas efetuadas através do teste ANOVA (excel 2007) de modo a verificar as variações no crescimento dos folículos dentro e fora do mesmo grupo e nos diferentes intervalos de tempo.

### 2.2.2. Efeito da PTH no desenvolvimento folicular de mosquitos *A. gambiae*

Realizaram-se 3 ensaios utilizando 3 tipos de refeição, nomeadamente a refeição sanguínea e murganhos, a refeição com uma mistura de glucose e PTH e uma refeição apenas com glucose.

Foram utilizados para cada ensaio 150 mosquitos com 3 dias de idade.

Realizaram-se para cada grupo 3 ensaios. Os mosquitos da refeição sanguínea foram alimentados através do mesmo procedimento descrito no ponto 2.2.

Aos mosquitos do grupo de alimentação de glucose e glucose + PTH retirou-se a glucose 3 horas antes do início do ensaio e separaram-se em dois grupos de 50 mosquitos colocados em copos de alimentação.

A alimentação dos grupos de mosquitos alimentados com glucose e glucose + PTH foi feita através de algodões embebidos com a solução de alimentação, nomeadamente com glucose a 10% para o grupo alimentado com glucose, e com glucose a 10% + PTH a 10  $\mu$ M de forma a mimetizar a concentração de PTH no sangue periférico humano.

As alimentações dos grupos de glucose e glucose + PTH foram feitas com intervalos de 30 minutos de modo a evitar sobreposição nos intervalos de tempo.

Dos três grupos de alimentação retiraram-se 10 mosquitos para dissecar a cada intervalo de tempo de 3, 6, 18 e 24 hpa.

De forma a manter os mosquitos até o fim do estudo, os mosquitos das 18h e 24h foram mantidos *overnight* com solução de glucose após a refeição inicial até serem dissecados.

Os ovários obtidos foram submetidos a ação da tripsina (tripsina 0,05% + EDTA 0,02% - Sigma) por cerca de 10 minutos numa tentativa de separação dos folículos ovários.

Posteriormente foram fixados com 4% formaldeído durante 5 minutos, lavados com PBS e corados com *Nile red* (MP Biomedicals, LLC), preparação em anexo 3. 1.3, e *Hoechst 33342* (Thermo fisher scientific) durante 10 minutos de forma a cobrir a totalidade da amostra.

Depois de corados, retirou-se o excesso do corante, colocou-se vector *shield* e cobriu-se a amostra com lamela para posterior visualização no microscópio de fluorescência acoplado ao computador contendo o programa de fluorescência *NIS-Elements BR 3,2* e câmara fotográfica

*Nikon* que permite a realização de fotos e a medição dos folículos ovários a cada intervalo de tempo.

Tiraram-se fotos dos diversos grupos e nos diferentes intervalos de tempo para a análise e visualização da estrutura e incorporação de vitelogenina nos folículos em desenvolvimento utilizando o microscópio de fluorescência e fizeram-se as medições dos diâmetros dos folículos utilizando o programa *ProgRescapture Pro 2.1* com câmara fotográfica (JENOPTIK *microscopic camera*).

### **2.2.3. Efeito da injeção de PTH no desenvolvimento folicular de mosquitos**

#### ***A.gambiae***

##### **2.2.3.1. Preparação de PTH**

A solução de PTH utilizado para a injeção em mosquitos *A. gambiae* foi produzido através da diluição de 1.0 mg de PTH humano (Bachem;H4835) em 2,43 µl de solução de soro fisiológico.

##### **2.2.3.2. Microinjeção de PTH**

Para a microinjeção de PTH, mosquitos fêmeas de 3 dias de idade mantidas com glucose 10% a partir do momento da eclosão foram anestesiadas através da exposição ao frio e injetadas com 69nl da solução de PTH (100 µM) utilizando o sistema de microinjeção (Nanoject II;Drummond Scientific). Os mosquitos foram injetados em diferentes horas de forma a ter melhor controlo sobre os respetivos intervalos após a injeção para a dissecação.

Mosquitos com a mesma idade foram injetados com soro fisiológico de modo a constituir o controlo do ensaio.

Uma vez injetados, os mosquitos foram dissecados e recolhidos os ovários nos intervalos de tempo de 3, 6 e 24 horas após a injeção. Procedeu-se à realização da mesma metodologia, separação, fixação, coloração e visualização dos folículos ováricos utilizada nos pontos anteriores 2.2.1 e 2.2.2.

##### **2.2.3.3. Análise dos resultados**

A análise dos resultados obtidos dos mosquitos *A. gambiae* injetados com PTH e o grupo de controlo foi feita através da análise das fotos feitas as diferentes lâminas fazendo a comparação da morfologia dos folículos ováricos obtidos e quantificação do tamanho dos folículos ováricos.

## 2.2.4. Efeito do PTH na infecção com *Plasmodium bergi*

### 2.2.4.1. Infecção de ratinhos *Mus musculus* da estirpe CD1 fêmea

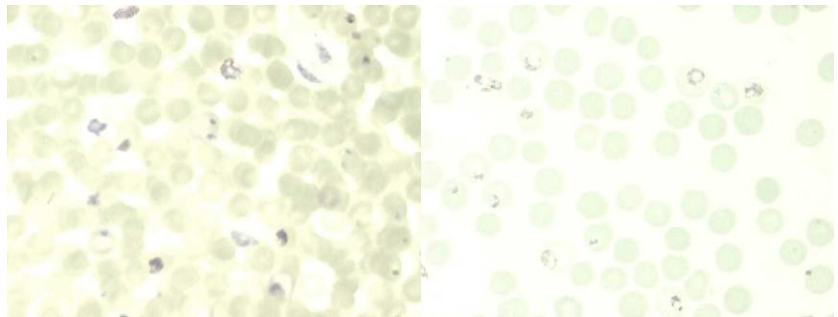
A infecção de ratinhos *Mus musculus* da estirpe CD1 fêmea foi efetuada por responsáveis do biotério do IHMT através da passagem de sangue obtido de ratinhos CD1 infetados pelo parasita *P. bergi*.

### 2.2.4.2. Confirmação da infecção

Cinco dias após a inoculação, fez-se um esfregaço sanguíneo que foi fixado com metanol durante 40 segundos, corado com 20% de Giemsa em água tamponada pH 7.2 durante 20 minutos sendo de seguida lavados em água para retirar o excesso do corante.

### 2.2.4.3. Contagem da parasitêmia

A contagem da parasitêmia foi feita no microscópio utilizando a objetiva de imersão e um contador manual a partir do qual se estimaram o número de parasitas nos diferentes campos de



observação (figura 2.1).

**Figura 2.1:** Esfregaço sanguíneo de *Mus musculos* infetado com *Plasmodium berghei*.

### 2.2.4.4. Alimentação com glucose e glucose + PTH

Para a comparação do efeito do PTH na infecção dos mosquitos *A.gambiae* com 3 dias de idade obtidos e criados como descrito no ponto 2.1.1 por *P. bergi*, foram separados dois grupos de alimentação como relatados nos ponto 2.2.2 e a alimentação foi feita de igual modo, um grupo alimentado com glucose e o outro com glucose + PTH durante 1 hora. De seguida os dois grupos de mosquitos foram expostos aos ratinhos CD1 infetados e deixados a alimentar durante 30 minutos.

Os restantes mosquitos de cada grupo foram mantidos com glucose a 10% durante 8 dias, para verificar se ocorreu uma infecção eficiente dos mosquitos através da observação da presença de oócistos no intestino médio dos mosquitos.

Ao longo desse período após a refeição sanguínea foi efetuado o cálculo do número de ovos depositados em cada grupo.

#### **2.2.4.5. Confirmação da infecção e análise dos resultados**

Para a observação da presença de oocistos no intestino médio de mosquitos *A.gambiae* infectados, os mosquitos foram anestesiados no frio e dissecados para a obtenção dos intestinos médios. Os intestinos médios foram colocados em lâminas e visualizados no microscópio óptico acoplado ao computador contendo o programa ProgRescapture Pro 2.1 com câmara fotográfica (JENOPTIK microscopic camera).

Pela divergência dos resultados e pela ausência de uma infecção viável, voltou-se a realizar o ensaio de infecção, procedendo de igual forma ao realizado anteriormente mas desta vez utilizando ratinhos Balb/c.

## **2.2.5. Análise do efeito da alimentação com diferentes soluções na expressão da vitelogenina do recetor de PTH AGAP003654**

### **2.2.5.1. Manutenção, alimentação e dissecação dos mosquitos**

Os mosquitos *A.gambiae* utilizados neste ensaio foram criados e mantidos como descrito no ponto 1.1.1. de onde foram retirados 120 mosquitos com cerca de 3 dias de idade e divididos em 3 grupos de alimentação.

A alimentação destes grupos de mosquitos foi realizada de igual modo ao realizado para o estudo do efeito da alimentação com diferentes soluções no desenvolvimento folicular. A dissecação da totalidade dos mosquitos para obtenção dos órgãos em estudo foram feitas num único intervalo de tempo correspondente as 3hpa tendo o cuidado de utilizar materiais devidamente esterilizados de modo a evitar contaminações com DNAses e armazenados a -20°C em tubos com 100µl de *RNA later* (Ambion) até a extração de RNA

### **2.2.5.2. Extração de RNA**

A extração de RNA fez-se seguindo 5 passos: Homogeinização, separação das fases, precipitação do RNA, lavagem do RNA e redissolução do RNA.

Descongelaram-se os tubos contendo as amostras de corpos adiposos de mosquitos alimentados com diferentes soluções à temperatura ambiente e quando totalmente descongelados, retirou-se todo o *RNA later* tendo atenção de não retirar a amostra.

De seguida adicionou-se 100ul de TriReagent (Sigma) a cada tubo e procedeu-se à homogeneização da amostra utilizando um homogeneizador. Após macerar a amostra, adicionou-se mais 900ul de TriReagent e deixou-se incubar durante 5 minutos de forma a permitir a dissociação completa dos complexos nucleoproteicos.

Passados os 5 minutos adicionou-se 200ul de clorofórmio (V.P), misturou-se as amostras no vortex por 15 segundos e de seguida incubou-se a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos.

Centrifugaram-se os tubos com as amostras a 12 000g durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a mistura passa a apresentar uma fase inferior avermelhada contendo fenol-clorofórmio, uma interfase esbranquiçada e uma fase superior incolor (separação das fases).

Uma vez que o RNA está presente exclusivamente na fase superior incolor. Transferiu-se a fase incolor para um novo tubo com o cuidado de não transferir outras fases e precipitou-se o RNA adicionando 500ul de isopropanol (MERCK). Depois de adicionar o isopropanol, misturou-se a amostra e incubou-se à temperatura ambiente durante 10 minutos. De seguida centrifugou-se a amostra a 12 000g durante 10 minutos a 4°C da qual se obteve o precipitado (*pellet*) de RNA que forma uma estrutura semelhante a gel na parede inferior do tubo.

Para a obtenção do *pellet* de RNA, removeu-se o sobrenadante e lavou-se o RNA uma vez com 1000ul de etanol a 75 %, levou-se os tubos ao vortex e centrifugou-se a amostra a 8 000 durante 5 minutos a 4°C.

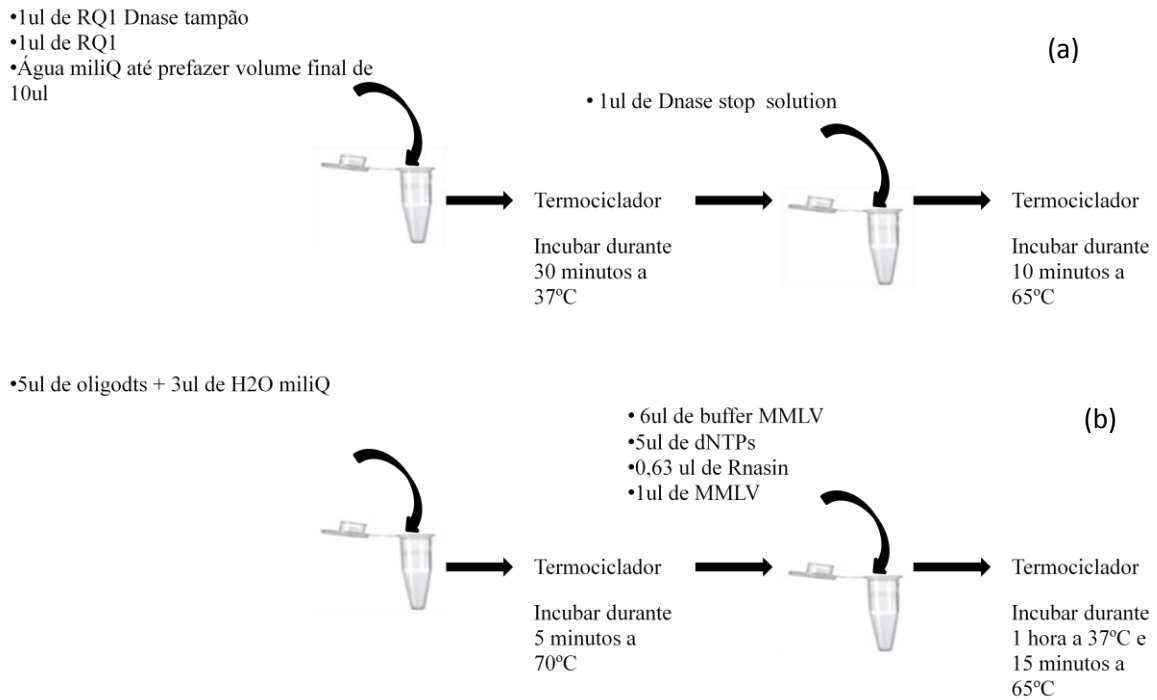
Terminada a centrifugação, retirou-se todo o excesso de etanol e secou-se o *pellet* de RNA durante cerca de 5 a 10 minutos na incubadora e dissolveu-se o RNA em 35ul de água miliQ autoclavada (Redissolução do RNA).

Incubou-se o RNA dissolvido em água miliQ durante 10 minutos no termobloco a 55°C, colocaram-se os tubos em gelo e de seguida procedeu-se a determinação da concentração da solução de RNA no Nanodrop.

Armazenou-se o RNA a -80°C na sala do frio até a sua utilização para a síntese de cDNA.

### 2.2.5.3. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada para um volume de reação de 30 µl de forma a obter um volume de 1,5µl de RNA seguindo os esquemas das figuras 2.1 em que inicialmente procedeu-se a inativação do DNA (a) e de seguida a síntese de cDNA (b) (**figura 2.2 a e b**).



**Figura 2.2:** Esquema ilustrativo do protocolo de inativação de DNA (a) e síntese de cDNA (b).

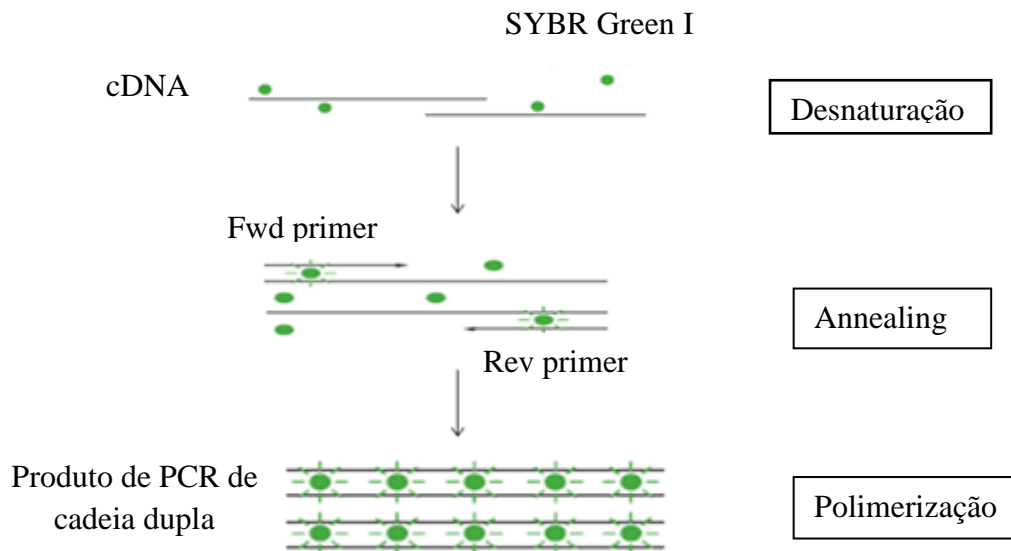
Depois de completo a de síntese de cDNA, os tubos contendo o cDNA foram armazenados a -20°C até à sua utilização.

### 2.2.5.4. Desenho dos *primers*

Os *primers* utilizados na presente tese foram desenhados recorrendo ao site Primer3, as respectivas sequências são apresentadas no anexo 4.

### 2.2.5.5. PCR quantitativo em tempo real

Para a quantificação da expressão dos genes em estudo, nomeadamente vitelogenina e o recetor de PTH, no corpo adiposo dos mosquitos fêmeas alimentados com diferentes soluções, utilizou-se RT-PCR semi quantitativo em tempo real (RT-PCR), utilizando o fluoróforo *SYBR Green I Dye* cujo mecanismo de ação esta esquematizado na **figura 2.2**.



**Figura 2.3:** Esquema ilustrativo do mecanismo de ação do SYBR Green I *Dye* durante o processo de PCR em tempo real. Adaptado de <http://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx>.

A mistura da reação de RT-PCR foi feita para um volume de 20  $\mu$ l.

A cada tubo adicionou-se um volume total de 7,76 $\mu$ l de água miliQ autoclavada, 10,00  $\mu$ l da mastermix de SyberGreen (SensiFAST™SYBR LO-ROX Kit, Biorline) e 0,12  $\mu$ l de cada *primer* dos genes em estudo, *reverse e forward* (50 $\mu$ M).

Fizeram-se diluições seriadas (1:10) do cDNA dos grupos de mosquitos alimentados com sangue, glucose + PTH e glucose em água miliQ e foram utilizados como *template* para a reação.

A placa (MicroAmp Fast 96-well reaction plate-applied biosystems) foi preenchida em triplicados de cada amostra, selado com um plástico adesivo (Opti-Seal Optical Disposable Adhesive) e levado a centrífuga a 12000 g, durante 1 minuto a 4 °C.

As condições cíclicas optimizadas utilizadas são as descritas na **tabela 2.1**.

**Tabela 2.1:** Condições cíclicas otimizadas para a realização da reação de PCR quantitativo em tempo real

| Temperatura | Tempo | Número de repetições |
|-------------|-------|----------------------|
| 50°C        | 2m    | 1x                   |
| 95°C        | 15m   | 1x                   |
| 95°C        | 30s   | 40x                  |
| 62°C        | 30s   |                      |
| 72°C        | 30s   |                      |
| 60°C        | 5m    |                      |
| 95°C        | 30s   |                      |
| 60°C        | 15s   |                      |

Também foi realizado uma reação normalizadora utilizando o gene de referência subunidade ribossomal S7 (AGAP010592) e os cDNA´s anteriores utilizando as mesmas condições. Após os ciclos de amplificação foi efetuado como recomendado pelo fabricante uma curva de dissociação.

## 2.2.6. Silenciamento do recetor GPCR

### 2.2.6.1. Síntese de dsRNA

O processo de silenciamento de gene utilizado na presente tese inicia-se com a síntese de dsRNA.

O dsRNA não fazendo parte da constituição molecular das células somáticas, quando injetada nos mosquitos, desencadeia um processo de defesa celular levando a sua clivagem (**figura 2.4**).

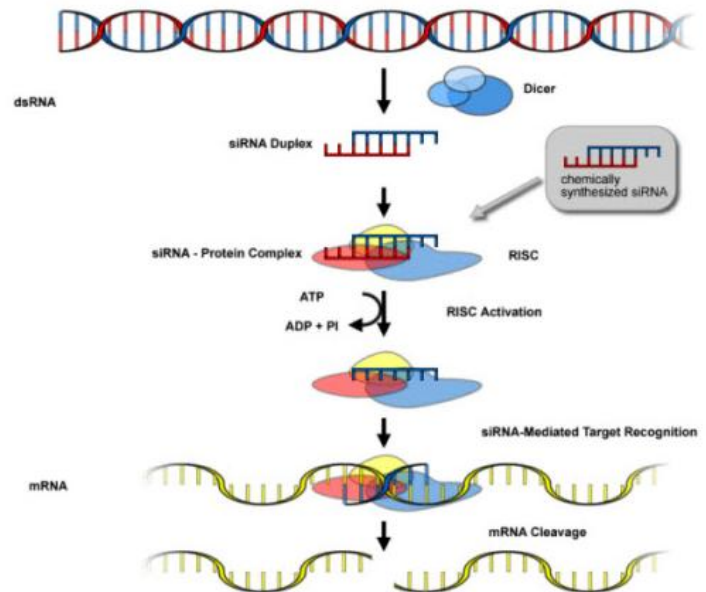
Uma vez na célula, o dsRNA é degradada

pela ação de uma RNase designada por DICER dando origem a pequenos oligoribonucleotidos - siRNA.

Os siRNA por sua vez ao ligar-se ao complexo multimolecular, *RNA induced silencing complex* (RISC) leva a sua fosforilação e consequente ativação.

Durante essa ligação a siRNA de cadeia dupla é convertida em siRNA de cadeia simples que forma um complexo com o RISC.

O complexo RISC- siRNA ao encontrar um RNA mensageiro (mRNA) complementar liga-se a este e promove a sua clivagem levando ao silenciamento do gene codificado por este.



**Figura 2.4:** Esquema ilustrativo do processo de silenciamento de genes através da síntese de dsRNA.

Obtido de

<https://lifescience.roche.com/shop/en/us/products/PrintView?langId=-1&storeId=15016&articleId=68022>

### 2.2.6.2. Preparação do template de PCR

Para a preparação de dsRNA seguiu-se o protocolo em que o DNA alvo foi amplificado numa mistura de PCR num volume final de 26,0  $\mu$ l tendo-se realizado o PCR segundo o programa de termociclador descrito na **tabela 2.2**.

Os *primers* usados foram o ds\_β2m e ds\_3654 desenhados recorrendo ao site Primer3 (sequências em anexo 4) utilizando como template, cDNA de ratinho e cDNA de mosquito *A.gambiae* respetivamente.

**Quadro 2.1:** Preparação do *template* para PCR e condições de amplificação dos genes de β2m e AGAP003465

| Componentes       | Concentração stock | Volume por amostra ( $\mu$ l) | ds_β2m e ds_3654                |      |        |        |
|-------------------|--------------------|-------------------------------|---------------------------------|------|--------|--------|
|                   |                    |                               | Fases                           | °C   | Tempo  | Ciclos |
| H <sub>2</sub> O  | -----              | 15                            | Desnaturação inicial            | 94°C | 4min   | 1x     |
| PCR buffer        | 10X                | 5                             | Desnaturação                    | 94°C | 30 sec | 34x    |
| MgCl <sub>2</sub> | 50 $\mu$ M         | 3                             | Hibridação dos oligonucleotidos | 62°C | 45 sec |        |
| dNTP              | 2 $\mu$ M          | 4                             | Extensão                        | 72°C | 1min   |        |
| Primer fwd        | 50 $\mu$ M         | 0,4                           | Extensão final                  | 72°C | 10 min | 1x     |
| Primer rev        | 50 $\mu$ M         | 0,4                           | Manutenção                      | 4°C  |        |        |
| Taq DNA pol       | -----              | 0,2                           |                                 |      |        |        |
| cDNA              | -----              | 1                             |                                 |      |        |        |
| Total             |                    | 26 $\mu$ l                    |                                 |      |        |        |

### **2.2.6.3. Eletroforese em gel de agarose**

Para a visualização e confirmação do tamanho dos produtos de PCR efetuou-se uma eletroforese em gel de agarose a 10% onde se carregaram 10µl de amostra para 5 µl de *loading buffer*.

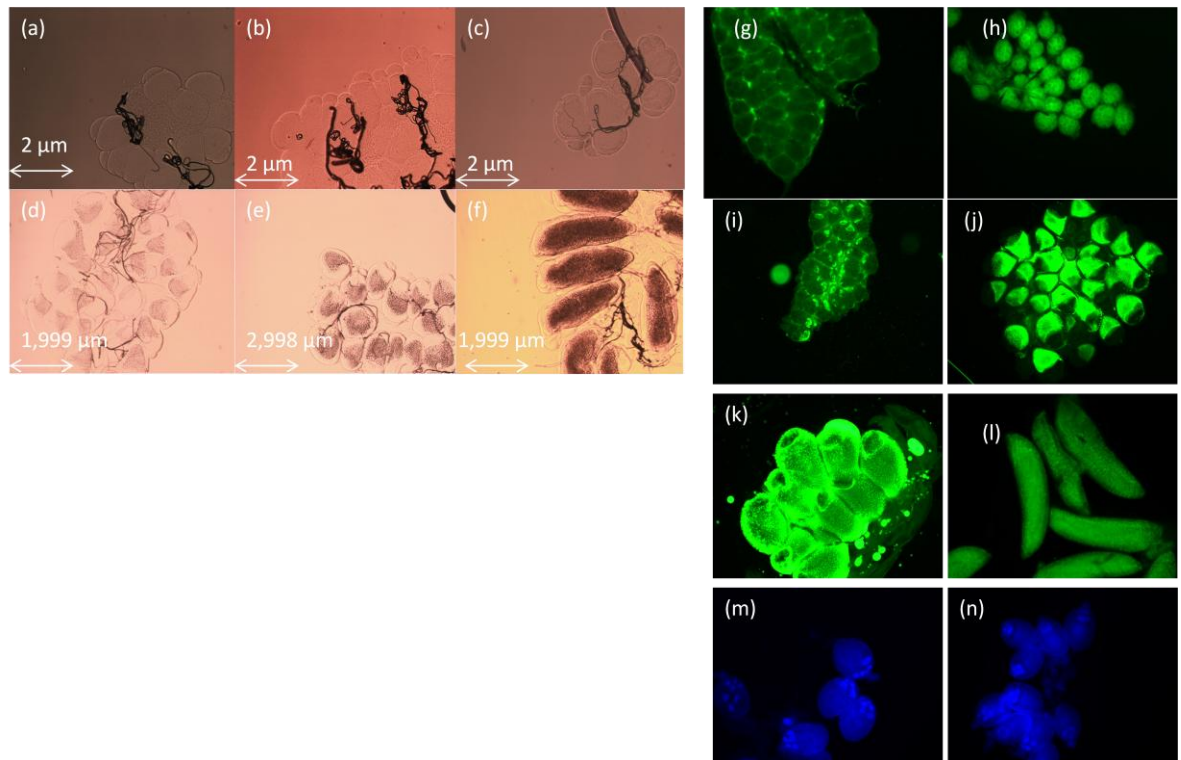
Não se obtendo uma banda com o tamanho desejado, prosseguiu-se a utilização de diversos cDNA's de trabalhos posteriores como *template*, bem como métodos de purificação de cDNAs e produtos de PCR (protocolos em anexo 1.4) de forma a averiguar possíveis causas da impossibilidade de obter o resultado desejado.

A contínua impossibilidade de alcançar a banda de interesse resultou na impossibilidade de prosseguir com o ensaio para a produção de dsRNA e conseqüentemente o impedimento da realização do ensaio de silenciamento do gene do recetor de PTH em mosquitos fêmeas.

### **III. RESULTADOS**

### 3.1. Desenvolvimento folicular

Do ensaio realizado com vista á caracterização das alterações morfológicas que ocorrem ao longo do desenvolvimento folicular dos mosquitos *A.gambiae* após a refeição sanguínea, verificaram-se padrões semelhantes aos descritos por Christopher (Clements, 2000) ao longo dos diferentes intervalos de tempo (**figura 3.1**).



**Figura 3.1:** Desenvolvimento folicular de mosquitos *Anopheles gambiae* alimentados em ratinhos *Mus musculus* da estirpe CD1 e dissecados nos intervalos de tempo de: (a, g) 0h; (b, h) 3h; (c, i) 6h; (d, j) 18h; (e, k, m) 24h; (f, l, n) 48h após a refeição sanguínea. (a-f) Folículos não corados, (g-l) folículos corados com Nile red, para visualização de inclusões lipídicas (verde) (excitação 552 nm; emissão 636 nm); (m, n) Folículos corados com Hoechst33342 para visualização do núcleo (azul) (excitação 350 nm e emissão 401 nm).

Após a emergência do mosquito, antes da refeição sanguínea, é possível verificar os estádios Ia, IIa e IIb de Christopher (Clements, 2000), que são visíveis às 0 horas (**figura 3.1 a, g**), onde os folículos que já saíram do estágio gonótrofico e se separam do germário. Estes folículos crescem consideravelmente entre 40 a 50  $\mu\text{m}$  apresentando oócitos visíveis mas sem presença de lípidos e entram no repouso do estágio I de onde passam para o repouso pré-vitelogénico, onde atingem cerca de 100  $\mu\text{m}$  e passam a possuir uma fina camada de lípidos no oócito.

Apesar dos mosquitos terem efetuado a refeição sanguínea, 3 horas após a mesma, (**figura 3.1 b e h**), os folículos não são distinguíveis dos folículos obtidos as 0 horas e aparentam estar nos estádios IIa e IIb onde apresentam oócitos com uma fina camada de lípidos.

Seis e 18 horas após a refeição sanguínea, os folículos aparentam estar nos estádios IIIa e IIIb onde se verifica um crescimento gradual do oócito que inicialmente contém uma pequena deposição lipídica (**Figura 3.1 c e i**) que progressivamente vai ocupando entre 50 – 75% do tamanho do folículo (**Figura 3.1 d e j**).

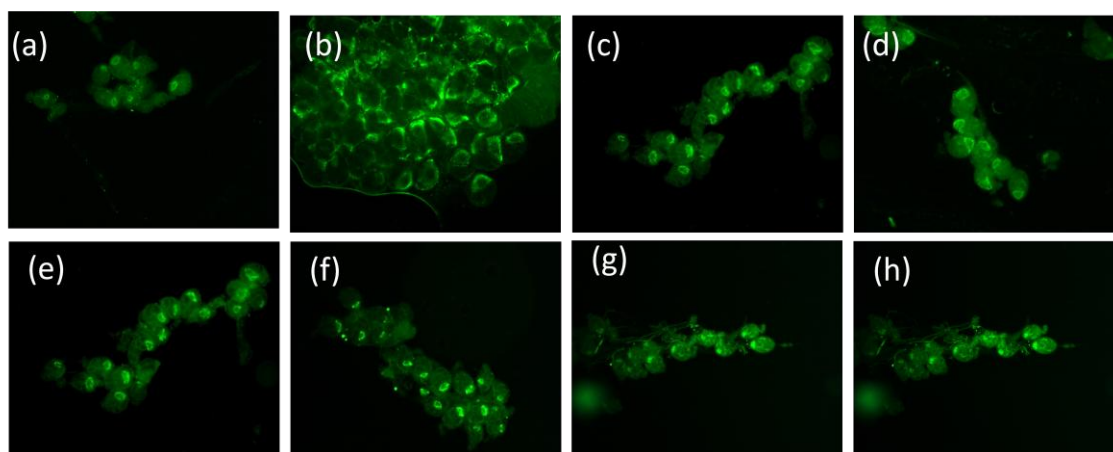
Vinte e quatro horas após a refeição sanguínea (**figura 3.1 k**), que corresponde aos estádios IVa e IVb onde os folículos começam a assumir o formato de oócito maduro, ocupando 90% o tamanho do folículo sendo os restantes 10% preenchidos pelos trofócitos (**figura 3.1 m**) que começarão a degenerar para posteriormente desaparecerem.

Pelas 48h é visível pela estrutura ovalada, que o folículo esta no estágio V onde atinge o seu tamanho final (**figura 3.1 e 3.2 l**), acompanhado pela degeneração do epitélio folicular e aparecimento de estruturas coriônicas e flutuadores.

Nesta fase os folículos entram na fase de maturação até que se dê a fecundação dos folículos levando a atividade rítmica condutora da ovulação e oviposição.

### 3.2. PTH é o fator sanguíneo necessário para o desencadear da oogénese nos mosquitos *Anopheles gambiae*

Tendo em conta a base do desenvolvimento folicular de mosquitos *A. gambiae*, e com o objetivo de responder a hipótese de que o PTH pode ser o fator responsável por desencadear a oogénese após a refeição sanguínea, estudou-se o efeito da alimentação da solução de glucose contendo PTH no desenvolvimento dos folículos ovários dos mosquitos *A. gambiae* em comparação com o desenvolvimento folicular destes mosquitos quando alimentados apenas com glucose.



**Figura 3.2:** Desenvolvimento folicular de mosquitos *Anopheles gambiae*: (a) a (d) alimentados com solução de PTH e dissecados em intervalos de tempo de 3, 6, 18 e 24 horas após a refeição respectivamente e; (e) a (h) alimentados com solução de glucose e dissecados em intervalos de tempo de 3, 6, 18 e 24 horas após a refeição respectivamente; Corados com Nile red e visualizados no microscópio de fluorescência (emissão 482nm; excitação 536nm), ampliação 10X.

Verificou-se que 3 horas após a refeição com PTH 100 $\mu$ M os folículos apresentaram uma fina camada de lípidos no oócito (**figura 3.2 a**) semelhante aos observados nos folículos de mosquitos alimentados apenas com glucose às 3, 6, 18 e 24 horas após a alimentação.

Seis horas após a refeição com PTH (**figura 3.2 b**) os folículos apresentam aumento da deposição de lípidos no oócito apresentando uma estrutura semelhante ao descrito nos

estádios IIIa e IIIb de Christopher, onde os folículos assumem cerca de 50% do tamanho do folículo.

No entanto, após as 6hpa não se verifica aumento da deposição como observado nos mosquitos alimentados com sangue às 18 e 24hpa. Embora os folículos aparentem possuir maior deposição lipídica que às 3hpa e superior ao observável no grupo alimentado com glucose não se assemelha aos alimentados com sangue.

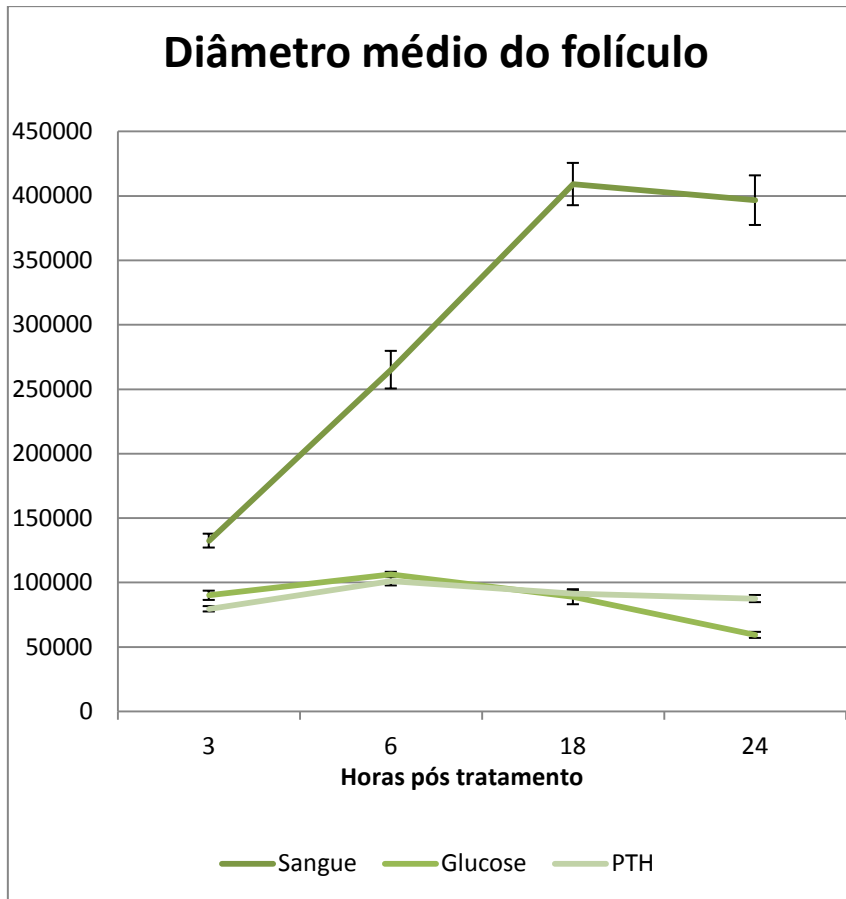
Os folículos de mosquitos alimentados com glucose não apresentaram alterações consideráveis na deposição de lípidos ao longo dos intervalos de tempo estudados. Aparentam permanecer nos estádios Ia, IIa e IIb, característicos da fase pré-vitelogénica antes da refeição sanguínea.

### 3.2.1. Crescimento folicular

O efeito das diferentes refeições no diâmetro dos folículos de *A. gambiae* foi comparado nos diferentes tempos estudados (3, 6, 18 e 24h) utilizando a análise de variância simples (ANOVA). Em todos os tempos testados, observamos um efeito significativo das diferentes refeições – Sangue, Glucose e PTH ( $P < 0,0001$  [3h:F (2,285) = 60,12,  $p < 0,0001$ ; 6h:F (2,300) = 144,08,  $p < 0,0001$ ; 18h:F (2,244) = 468,9,  $p < 0,0001$ ; 24h:F (2,208) = 395,15  $p < 0,0001$ ] (**anexo 7.3**).

O efeito do PTH no crescimento folicular em comparação ao efeito da alimentação com sangue e com glucose foi feito do através teste *t- student*. Onde se verificou que o crescimento folicular de mosquitos alimentados com sangue difere significativamente dos alimentados com PTH ( $p < 0,0001$  para todas as comparações) (**tabela 3.1**).

Quando comparamos a alimentação com glucose com a alimentação com PTH observamos diferenças no diâmetro folicular médio (**figura 3.4**) as quais diferem significativamente apenas às 3 e 24hpa (**tabela 3.2**).



**Figura 3.3:** Variação temporal no crescimento folicular de mosquitos *Anopheles gambiae* alimentados com sangue, glucose e PTH analisados às 3, 6, 18 e 24 horas após a refeição. As linhas verticais representam o erro padrão.

**Tabela 3.1:** Valor de significância para o teste t-student comparando o crescimento folicular de mosquitos alimentados com sangue e com PTH

|              |               | <b>Observação</b> | <b>Média</b> | <b>Variância</b> | <b>Valor p</b> |
|--------------|---------------|-------------------|--------------|------------------|----------------|
| <b>3hpa</b>  | <b>Sangue</b> | 74                | 1,32E+05     | 2,14E+09         | 9,49E-15       |
|              | <b>PTH</b>    | 127               | 7,96E+04     | 5,49E+08         |                |
| <b>6hpa</b>  | <b>Sangue</b> | 101               | 2,65E+05     | 2,15E+10         | 2,18E-19       |
|              | <b>PTH</b>    | 117               | 1,01E+05     | 1,24E+09         |                |
| <b>18hpa</b> | <b>Sangue</b> | 64                | 4,09E+05     | 1,73E+10         | 1,168E-28      |
|              | <b>PTH</b>    | 143               | 9,15E+04     | 7,68E+08         |                |
| <b>24hpa</b> | <b>Sangue</b> | 49                | 3,97E+05     | 1,81E+10         | 3,56E-21       |
|              | <b>PTH</b>    | 122               | 8,78E+04     | 9,49E+08         |                |

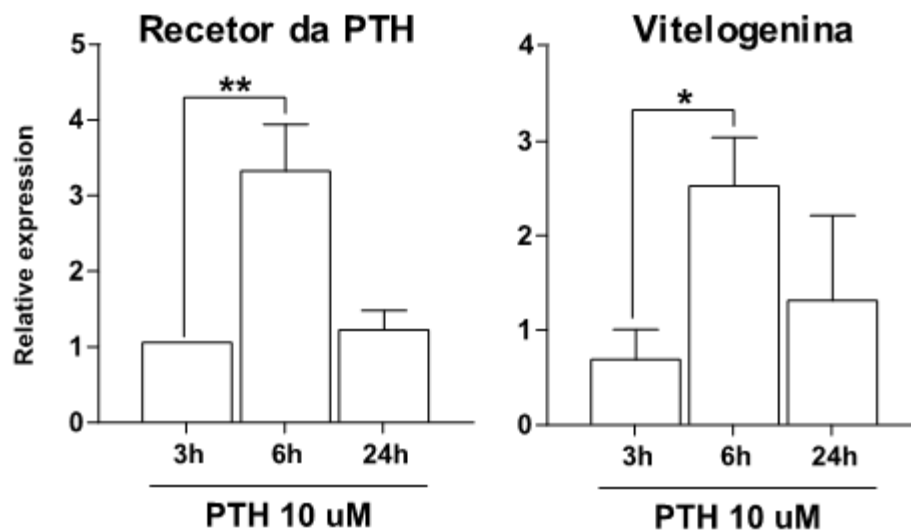
**Tabela 3.2:** Valor de significância para o teste t-student comparando o crescimento folicular de mosquitos alimentados com glucose e com PTH

|              |                | <b>Observação</b> | <b>Média</b> | <b>Variância</b> | <b>Valor p</b> |
|--------------|----------------|-------------------|--------------|------------------|----------------|
| <b>3hpa</b>  | <b>Glucose</b> | 87                | 90073,0      | 1,12E+09         | 1,26E-02       |
|              | <b>PTH</b>     | 127               | 79594,5      | 5,49E+08         |                |
| <b>6hpa</b>  | <b>Glucose</b> | 85                | 106249,0     | 3,53E+08         | 1,72E-01       |
|              | <b>PTH</b>     | 117               | 100985,3     | 1,24E+09         |                |
| <b>18hpa</b> | <b>Glucose</b> | 40                | 88961,6      | 1,36E+09         | 6,91E-01       |
|              | <b>PTH</b>     | 143               | 91469,5      | 7,68E+08         |                |
| <b>24hpa</b> | <b>Glucose</b> | 40                | 59352,1      | 2,20E+08         | 1,37E-12       |
|              | <b>PTH</b>     | 122               | 87771,8      | 9,49E+08         |                |

### 3.3. Injeção de PTH induz a ativação do recetor e induz a produção de Vitelogenina

Trabalhos anteriores não publicados do grupo de investigação mostraram que mosquitos *A.gambiae* injetados com uma solução 100 $\mu$ M PTH têm um pico de expressão dos genes que codificam o recetor da PTH e o precursor da vitelogenina às 6hpi, não havendo alterações às 3 e 24 hpi.

Com estes resultados, o grupo levantou a hipótese de que a injeção de PTH em mosquitos *A.gambiae* tem efeito semelhante ao observado após a refeição sanguínea, induzindo a síntese de vitelogenina e consequentemente sugerindo a hipótese que o PTH esteja bioativo no mosquito.



**Figura 3.4:** Efeito da PTH na expressão génica do recetor de PTH e da vitelogenina. Níveis de expressão às 3, 6 e 24 horas após a injeção. Os resultados representam a média e desvio padrão de 3 réplicas biológicas. A expressão relativa foi determinada através do método  $\Delta\Delta t$ . Para analisar a diferença entre os diferentes tempos estudados foi utilizado o teste t- student (\*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ ). (Dados gerados no projeto PTDC/BIA-BCM/114395/2009 não publicados).

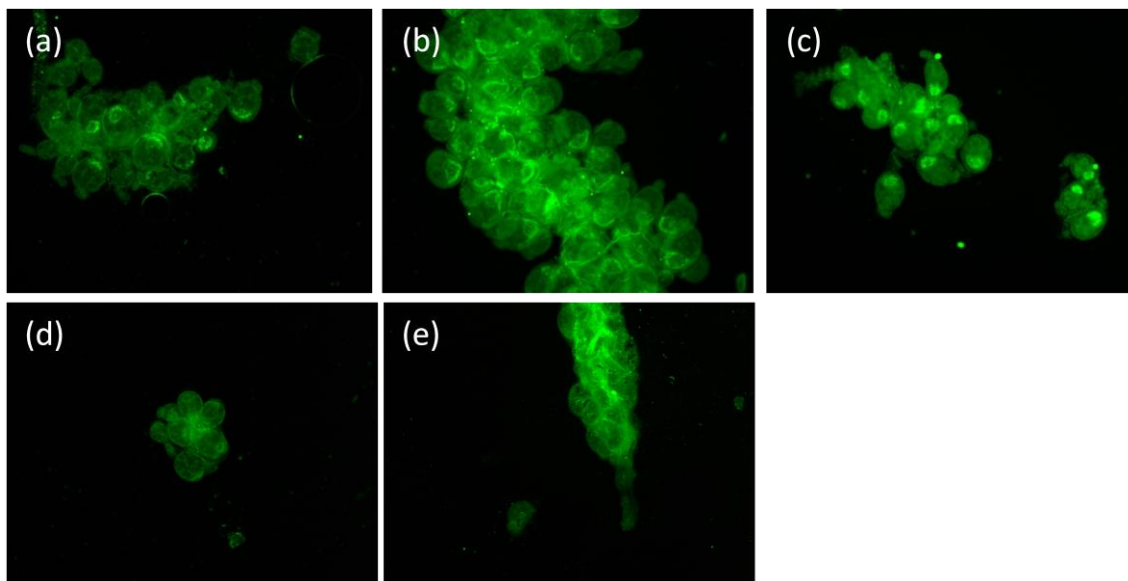
### 3.4. Injeção de PTH induz a deposição de lípidos e o início da oogénese em mosquitos

#### *Anopheles gambiae*

Tendo em conta que a ingestão de PTH leva ao acumulo lipídico nos oócitos e que a injeção de PTH promove a expressão do gene que codifica a vitelogenina, fomos estudar a morfologia dos folículos ovários nos mesmos intervalos de tempo estudados para a análise da expressão de genes.

Verificou-se que os resultados têm paralelo com os resultados observados na análise da expressão dos genes do recetor de PTH e da vitelogenina em mosquitos injetados com PTH, bem como com os ensaios de alimentação com PTH. Onde se obteve um pico da deposição lipídica às 6hpi (**figura 3.5 b**) e maior deposição lipídica as 24 horas (**figura 3.5 c**) que as 3 horas (**figura 3.5 a**) após injeção e alimentação com PTH.

Ao injetar mosquitos com solução salina com a mesma idade e mantidos em condições similares, verificou-se que os folículos apresentam uma morfologia idêntica à observada antes da refeição sanguínea (0h) (**figura 3.5 d, e**).



**Figura 3.5:** Folículos de mosquitos *Anopheles gambiae* as: (a-c) injetados com 69nl de PTH 100µM nos intervalos de tempo de 3, 6 e 24hpi respectivamente. (d-e) injetados com solução salina nos intervalos de tempo de 3 e 6 hpi respectivamente. Corados om Nile red, ampliação 10x, (excitação 536nm; emissão 482nm).

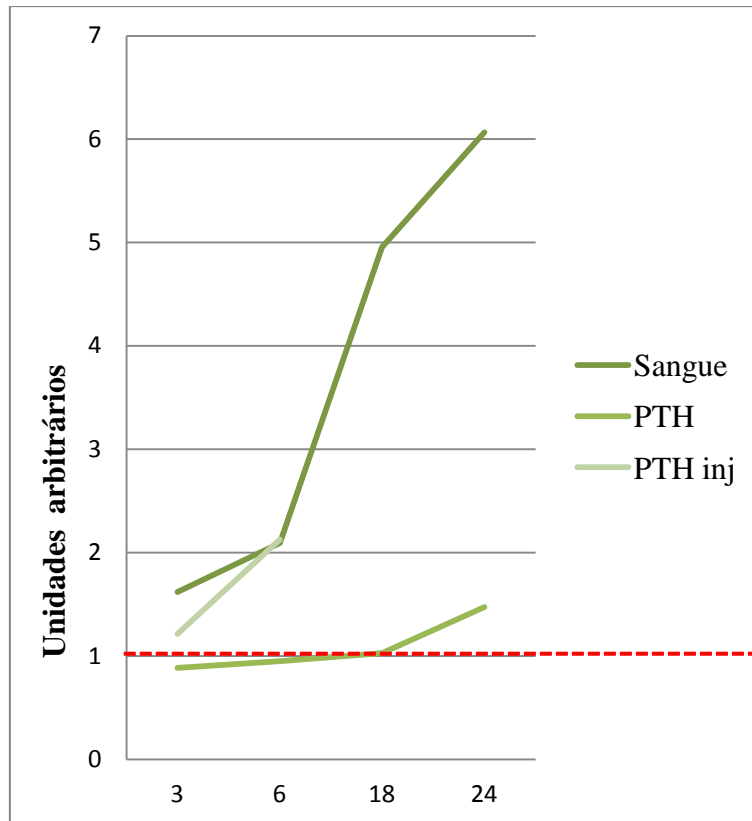
Quando normalizamos a média dos mosquitos alimentados com PTH e sangue, e injetados com PTH pelos respectivos controlos observamos que o PTH tem um efeito eu é mas visível nos mosquitos injetados do que os alimentados com PTH. Maior número de repetições são necessários para confirmar esta observação.

A análise estatística comparativa do crescimento folicular em mosquitos injetados com 69 nl de uma solução PTH 100µM e solução salina (**tabela 3.3**) mostrou que o grupo de mosquitos injetados com solução salina apresentou diferenças significativas do diâmetro folicular nos intervalos de tempo analisados em comparação com os mosquitos injetados com PTH.

Quando comparado com os mosquitos alimentados com PTH, a injeção do PTH apenas apresentou diferenças significativas do diâmetro folicular as 24hpi (**tabela 3.3**).

**Tabela 3.3:** Valor de significância para o teste t-student comparando o crescimento folicular de mosquitos Injetados com PTH com mosquitos injetados com solução salina e alimentados com PTH.

|     |          | Observação | Média    | Variância | Valor p  |
|-----|----------|------------|----------|-----------|----------|
| 3h  | PTHi     | 40         | 7,79E+04 | 9,87E+08  | 2,68E-02 |
|     | S.salina | 26         | 6,43E+04 | 3,04E+08  |          |
| 6h  | PTHi     | 30         | 1,11E+05 | 1,88E+09  | 3,43E-08 |
|     | S.salina | 12         | 5,21E+04 | 7,24E+07  |          |
| 3h  | PTHi     | 40         | 7,79E+04 | 9,87E+08  | 7,58E-01 |
|     | PTH      | 127        | 7,96E+04 | 5,49E+08  |          |
| 6h  | PTHi     | 30         | 1,11E+05 | 1,88E+09  | 2,56E-01 |
|     | PTH      | 117        | 1,01E+05 | 1,24E+09  |          |
| 24h | PTHi     | 28         | 7,02E+04 | 1,02E+09  | 1,18E-02 |
|     | PTH      | 122        | 8,78E+04 | 9,49E+08  |          |



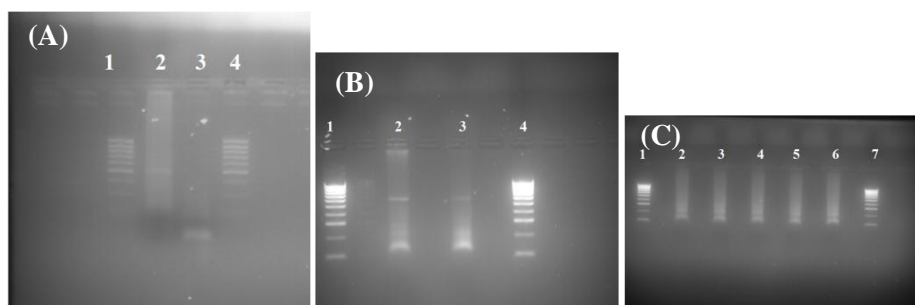
**Figura 3.6:** Aumento relativo do tamanho folicular em relação aos mosquitos alimentados com glucose (sangue e PTH) ou injetados com solução salina (PTHinj). A linha tracejada = 1 e representa sem alterações em relação ao controlo.

### 3.5. Silenciamento do recetor de PTH inibe o efeito indutor de oogénese

O template para a elaboração do PCR foi realizado consoante apresentado nos materiais e métodos para o primer ds $\beta$ 2m e para o recetor de PTH utilizando cDNA de ratinho e *pool* de cDNA de mosquito *A.gambiae* respetivamente. Não tendo sido obtido um produto de PCR com o tamanho esperado (**figura 3.7 a**).

Numa tentativa de se verificar a razão pela qual não se obteve a amplificação desejada para o gene que codifica o recetor de PTH, realizou-se uma nova reação de PCR utilizando um novo cDNA diferente do anteriormente utilizado e o produto de PCR do mesmo foi utilizado como template, da qual obteve-se os resultados (**figura 3.7 b**) em que se verifica que surgem uma banda em ambos os *Templates* utilizados correspondente a aproximadamente 600bp que poderá ser a banda desejada para o gene que codifica o recetor de PTH.

Ao purificar-se a mix de cDNA e o produto de PCR utilizados anteriormente, através do protocolo de purificação com sure clean, não se obteve os mesmos resultados como seria de prever, sendo que as bandas passaram a ser de 100bp (**figura 3.7 c**).



**Figura 3.7:** Gel de agarose 2% para identificação do produto da reação de PCR para o estudo do gene do recetor de PTH (A) 1e 4 - marcadores de peso molecular; 2 – ds $\beta$ 2m com a banda esperada de 500bp; 3- ds $\beta$ 3654 com banda de aproximadamente 100bp. (B) 1e 4 - marcadores de peso molecular, 2- cDNA novo, 3- produto de PCR do cDNA novo, com banda fraca mas visível nos 600bp. (C) 1 e 7 - marcador de peso molecular, 2 e 3 – mix de cDNA purificado, 4, 5 e 6 – produto de PCR purificado.

Foram realizados diversas experiencias de PCR utilizando diferentes cDNA *template* e diversas condições do programa do termociclador na tentativa de obter os resultados

desejados, no entanto os resultados foram muito similares, sem o aparecimento da amplificação esperada.

Assim sendo, e devido a impossibilidade na obtenção do amplificação desejado para o gene que codifica o recetor de PTH correspondente a 520bp, foi-me impossível prosseguir o protocolo para a obtenção de dsRNA e consequentemente, não consegui prosseguir para a realização do silenciamento do gene do recetor de PTH nos mosquitos.

### **3.6. PTH afeta a infecção por *Plasmodium berghei* em mosquitos *Anopheles gambiae***

A infecção dos mosquitos *A.gambiae* por *P.berghei* não foi consistente nos ensaios realizados. Embora se tenha verificado a presença de oocistos de pequenas dimensões comparados ao observado normalmente não se pode considerar que se tenha obtido infecção dos mosquitos porque não ocorreu em todos os ensaios realizados do mesmo modo.

Sendo que no primeiro ensaio não se observou infecção e nos restantes ensaios verificou-se presença de oocistos de pequenas dimensões nos grupos de PTH e glucose respetivamente, mas nunca nos dois da mesma forma.

Por outro lado, através da realização do ensaio de infecção observou-se que mosquitos alimentados com PTH durante 1 hora antes da refeição sanguínea apresentaram deposição de ovos precoce em comparação aos mosquitos alimentados apenas com glucose antes da refeição sanguínea embora passados os 8 dias após a refeição sanguínea se observe maior número de ovos no grupo de mosquitos alimentados com glucose antes da refeição sanguínea.

## **IV. DISCUSSÃO DE RESULTADOS**

#### **4.1. Refeição contendo PTH desencadeia o processo de oogénese de modo semelhante ao observado após a refeição sanguínea**

Tendo o conhecimento que a alimentação de mosquitos *A. gambiae* com diferente teor nutricional e composição, conseguiam evocar o processo de vitelogenese (Arsic & Guerin, 2008) e a identificação de que a interação entre PTH e o seu recetor no mosquito conduz a alterações na fisiologia. Foi analisado na presente tese as alterações morfológicas dos folículos, nomeadamente a deposição de lípidos no oócito nos grupos de mosquitos alimentados com solução de glucose PTH e sangue de *Mus musculos*.

Os mosquitos alimentados com sangue e alimentados ou injetados com PTH apresentaram às 3h uma morfologia folicular semelhante aos controlos (alimentados com glucose ou injetados com solução salina respetivamente) e similar à observada nos mosquitos sem refeição, o que esta de acordo com o início da síntese de vitelogenina pelo corpo adiposo que ocorre 3-4 horas após a refeição sanguínea (Raikhel, 1992). O que implica uma diferença temporal entre a síntese, o seu transporte para os ovários e a deposição nos oócitos.

Por outro lado, verificou-se que o padrão morfológico detetado nos mosquitos alimentados com PTH bem como os injetados com PTH, vão de encontro com resultados obtidos em trabalhos anteriores do grupo em que se verificou que a ação de PTH leva a ativação do seu recetor e ao aumento da expressão de vitelogenina às 6h após a injeção de PTH.

As alterações morfológicas às 6 horas após a alimentação e injeção são semelhantes ao observado em mosquitos alimentados com sangue de *Mus musculos*, onde se verifica um aumento gradual da deposição de lípidos nos oócitos.

No entanto, após a alimentação ou injeção com PTH, desenvolvimento folicular não consegue prosseguir comparativamente aos mosquitos alimentados com sangue, permanecendo aparentemente com o padrão observado às 6hpa/i com sangue ou com uma ligeira diminuição da deposição lipídica comparativamente ao observado às 6hpa e hpa/i.

A incapacidade destes em prosseguir o desenvolvimento levanta a hipótese da ocorrência do processo de reabsorção folicular.

Na ausência de uma reserva nutricional suficiente para segurar todos os processos que requerem energia após a refeição sanguínea leva a que ocorra uma deficiente vitelogenese

caracterizada pela ocorrência do processo de reabsorção observado pela diminuição da deposição de lípidos às 6hpa/i. Sendo este processo dependente da relação entre nutrientes, hormona juvenil e reabsorção folicular (Sambasivarao, 2013; Clifton & Noriega, 2012).

Por outro lado, tendo em conta os trabalhos de (Arsic & Guerin, 2008) que demonstraram que a alimentação de mosquitos *A. gambiae* com albumina e albumina + aminoácidos conseguiram evocar o processo de vitelogénese, sugere que o PTH embora seja essencial para a oogénese, sozinho não consegue desencadear todo o processo de reprodução, sendo necessário a ação de outros componentes sanguíneos.

Tendo em conta a importância da refeição açucarada para a sobrevivência, desenvolvimento e reprodução dos mosquitos por consistir no mecanismo fundamental para a obtenção de reservas e suprimento energéticas (Foster, 1995), e sabendo que as reservas armazenadas após a refeição com açúcares (néctares) consistem essencialmente em lípidos, glicogénio e aminoácidos (Kaufmann, 2015) vem identificar a possível fonte de lípidos observados às 3hpa/i e confirmar que a refeição açucarada logo após a emergência é um fator essencial para a sobrevivência e capacitação dos folículos para o desenvolvimento após refeição sanguínea.

O crescimento folicular corresponde ao observado na deposição lipídica, e tendo em conta que a deposição de lípidos no oócito é o responsável pelo aumento do tamanho dos folículos, nenhuma outra solução com exceção de sangue levou ao crescimento folicular até atingir o tamanho do folículo maduro.

Alimentação ou a injeção de mosquitos *Anopheles gambiae* com PTH permitiu a observação de folículos com um padrão de desenvolvimento semelhante ao observado nas primeiras horas após a refeição com sangue. Contudo o desenvolvimento oogónio não se conseguiu completar. O fenómeno observado nesses resultados sugere a necessidade da ação complementar de outros fatores sanguíneos responsáveis pela potenciação de outras vias condutoras da reprodução que juntamente com o efeito do PTH conseguem desencadear o processo completo da reprodução.

#### **4.2. Efeito do PTH na infecção com *Plasmodium berghei* e ovoposição**

Segundo (Olayemi I. K. 2013) a reprodução, a fecundidade e o fitness são afetados em mosquitos *A. gambiae* alimentados com sangue infetado, nomeadamente o fato de se verificar a extensão do período pré-oviposição após a refeição com sangue infetado, isto é o período que decorre da refeição sanguínea à deposição de ovos é atrasada por cerca de 2 dias após a refeição com sangue infetado.

Embora os resultados da infecção obtidos na presente tese não tenham sido consistentes, isto é não se conseguiu verificar a presença de oocistos no intestino médio dos mosquitos infetados em todos os ensaios realizados, provavelmente devido a idade avançada dos ratinhos infetados.

Nos ensaios realizados, verificou-se que a deposição dos ovos ocorre de forma precoce em mosquitos alimentados com PTH antes da refeição sanguínea, comparativamente aos alimentados apenas com glucose antes da refeição sanguínea.

Estes resultados levantam a hipótese de que o PTH pode inverter o efeito da infecção na reprodução de mosquitos infetados. No entanto, a falta de uma infecção eficiente em ambos os grupos não se pode tirar conclusões exatas, sendo necessário um desenho diferente do ensaio bem como a compreensão da razão da falha da infecção nos grupos analisados.

### **4.3. Análise da expressão dos genes de vitelogenina e recetor de PTH e Silenciamento do recetor intramebranar do PTH – GPCR**

Ambos os ensaios de análise da expressão e a realização da síntese de dsRNA para o silenciamento do recetor de PTH não foram bem-sucedidos, sugerindo que a falha possa advir do cDNA utilizado em ambos os ensaios.

A pequena dimensão das amostras e os produtos utilizados para a síntese de cDNA poderá ser a possível razão dos erros que levam a ineficiência do produto final da síntese bem como a perda do material genético.

É portanto, necessário a execução de novos ensaios bem como a verificação da razão da falha destes para se poder confirmar o efeito do PTH na expressão dos genes associados á reprodução bem como a inibição do seu efeito através do silenciamento do seu recetor.

## **V. CONCLUSÃO**

PTH é um componente sanguíneo essencial a iniciação do processo de vitelogénese em mosquitos *A. gambiae*. No entanto a incapacidade de completar o desenvolvimento folicular para a maturação dos ovos sugere a necessidade de outros componentes sanguíneos que em conjunto com o sinal inicial regulado pela ligação do PTH ao seu recetor conduzam ao desenvolvimento e maturação dos ovos.

É portanto indispensável a continuação do estudo deste fator, nomeadamente no que respeita ao efeito do silenciamento do seu recetor que não se conseguiu elaborar na presente tese, a regulação da sua concentração quer na alimentação como na injeção de forma a ver o seu efeito a diferentes concentrações, estudar outros intervalos de tempo, especificamente entre as 6 horas e 24 horas após o tratamento de forma a acompanhar o início da deposição de lípidos bem como o momento em que começa a ocorrerem a reabsorção folicular.

Tendo o conhecimento do recetor de PTH nos mosquitos é também interessante conseguir descrever as cascatas moleculares ativadas após a refeição com PTH através de análises de expressão de gene.

Os resultados obtidos no presente trabalho bem como os obtidos em trabalhos de grupo anteriores são pontos cruciais para a continuação do estudo deste péptido cujas funções endócrinas são ainda pouco conhecidas no mosquito.

## **VI. BIBLIOGRÁFIA**

- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55, 207–25. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085356
- Arsic, D., & Guerin, P. M. (2008). Nutrient content of diet affects the signaling activity of the insulin/target of rapamycin/p70 S6 kinase pathway in the African malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Insect Physiology*, 54(8), 1226–1235. doi:10.1016/j.jinsphys.2008.06.003
- Badisco, L., Van Wielendaele, P. V., & Broeck, J. Vanden. (2013). Eat to reproduce: A key role for the insulin signaling pathway in adult insects. *Frontiers in Physiology*, 4 AUG(August), 1–16. doi:10.3389/fphys.2013.00202
- Baldini, F., Gabrieli, P., Rogers, D. W., & Catteruccia, F. (2012). Function and composition of male accessory gland secretions in *Anopheles gambiae*: a comparison with other insect vectors of infectious diseases. *Pathogens and Global Health*, 106(2), 82–93. doi:10.1179/2047773212Y.0000000016
- Baldini, F., Gabrieli, P., South, A., Valim, C., Mancini, F., & Catteruccia, F. (2013). The Interaction between a Sexually Transferred Steroid Hormone and a Female Protein Regulates Oogenesis in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Biology*, 11(10). doi:10.1371/journal.pbio.1001695
- Brewer, H. B., Fairwell, T., Ronan, R., Sizemore, G. W., & Arnaud, C. D. (1972). Human parathyroid hormone: amino-acid sequence of the amino-terminal residues 1-34. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(12), 3585–3588. doi:10.1073/pnas.69.12.3585
- Burchard, G. D. (2014). *Malaria*, 55(2), 165–176. doi:10.1007/s00108-013-3390-9
- CARDOSO, Y. M. V. R. (2007). Departamento de biologia animal resistência “ knockdown ” a insecticidas em populações de anopheles gambiae giles , 1902 de resistência “ knockdown ” a insecticidas em populações de anopheles gambiae giles , 1902 de.
- CDC - DPDx - Malaria. (n.d.). Retrieved September 14, 2015, from <http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/>
- Chapman, R. F. (1998). *The Insects: Structure and Function* (Vol. 12). Cambridge University Press. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=jHUCdbgW4MAC&pgis=1>

- Chapman, R. F., Simpson, S. J., & Douglas, A. E. (2013). *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=NXJEi8fo7CkC&pgis=1>
- Clements, A. N. (2013). *The Physiology of Mosquitoes: International Series of Monographs on Pure and Applied Biology: Zoology, Volume 17*. Elsevier Science. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=I8zYBAAAQBAJ&pgis=1>
- Clifton, M. E., & Noriega, F. G. (2012). The fate of follicles after a blood meal is dependent on previtellogenic nutrition and juvenile hormone in *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 58(7), 1007–19. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.05.005
- Consoli, R. A. G. B., & Oliveira, R. L. De. (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*.
- Dana, A. N., Hong, Y. S., Kern, M. K., Hillenmeyer, M. E., Harker, B. W., Lobo, N. F., ... Collins, F. H. (2005). Gene expression patterns associated with blood-feeding in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, 6, 5. doi:10.1186/1471-2164-6-5
- De Silva, P. M., & Marshall, J. M. (2012). Factors contributing to urban malaria transmission in sub-saharan Africa: A systematic review. *Journal of Tropical Medicine*, 2012. doi:10.1155/2012/819563
- Dhara, A., Eum, J.-H., Robertson, A., Gulia-Nuss, M., Vogel, K. J., Clark, K. D., ... Strand, M. R. (2013). Ovary ecdysteroidogenic hormone functions independently of the insulin receptor in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(12), 1100–8. doi:10.1016/j.ibmb.2013.09.004
- Engelmann, F. (2015). *The Physiology of Insect Reproduction: International Series of Monographs in Pure and Applied Biology: Zoology*. Elsevier Science. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=4bXYBAAAQBAJ&pgis=1>
- Fernanda, M., & Dias, A. (2011). Universidade Nova de Lisboa.
- Forattini, O. P. (1995). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Cadernos de Saúde Pública* (Vol. 11). doi:10.1590/S0102-311X1995000100027
- Foster, W. a. (1995). Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annual Review of Entomology*, 40, 443–474. doi:10.1146/annurev.ento.40.1.443

- Gabrieli, P., Kakani, E. G., Mitchell, S. N., Mameli, E., Want, E. J., Mariezcurrena Anton, A., ... Catteruccia, F. (2014). Sexual transfer of the steroid hormone 20E induces the postmating switch in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(46), 16353–16358. doi:10.1073/pnas.1410488111
- Hansen, I. a., Attardo, G. M., Rodriguez, S. D., & Drake, L. L. (2014). Four-way regulation of mosquito yolk protein precursor genes by juvenile hormone-, ecdysone-, nutrient-, and insulin-like peptide signaling pathways. *Frontiers in Physiology*, *5* MAR(March), 1–8. doi:10.3389/fphys.2014.00103
- Hartfelder, K. (2000). Insect juvenile hormone: From “status quo” to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *33*(2), 157–177. doi:10.1590/S0100-879X2000000200003
- Ioshino, R. S. (2013). Mecanismo da redução de fertilidade em *Aedes aegypti* infectado por *Plasmodium gallinaceum*.
- Kaufmann, C., Mathis, A., & Vorburger, C. (2015). Sugar-feeding behaviour and longevity of European *Culicoides* biting midges. *Medical and Veterinary Entomology*, *29*, 17–25. doi:10.1111/mve.12086
- Klowden, M. J. (2013). *Physiological Systems in Insects*. Academic Press. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=CABp1YL0F8gC&pgis=1>
- Laishram, D. D., Sutton, P. L., Nanda, N., Sharma, V. L., Sobti, R. C., Carlton, J. M., & Joshi, H. (2012). The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malaria Journal*, *11*(1), 29. doi:10.1186/1475-2875-11-29
- malaria. (2014).
- Martins, G. F., Serrão, J. E. S., Ramalho-Ortigão, J. M., & Pimenta, P. F. P. (2011). A comparative study of fat body morphology in five mosquito species. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *106*(6), 742–747. doi:S0074-02762011000600015 [pii]
- Mierke, D. F., Mao, L., Pellegrini, M., Piserchio, a, Plati, J., & Tsomaia, N. (2007). Structural characterization of the parathyroid hormone receptor domains determinant for ligand binding. *Biochemical Society Transactions*, *35*(Pt 4), 721–723. doi:10.1042/BST0350721

- Mishra, S. K., Jha, A., Steinhäuser, A. L., Kokoza, V. a, Washabaugh, C. H., Raikhel, A. S., ... Traub, L. M. (2008). Internalization of LDL-receptor superfamily yolk-protein receptors during mosquito oogenesis involves transcriptional regulation of PTB-domain adaptors. *Journal of Cell Science*, *121*(Pt 8), 1264–1274. doi:10.1242/jcs.025833
- Plasmodium Parasite-infection in the Malaria Vector Mosquito , *Anopheles gambiae* ( Diptera : Culicidae ). (2013), *1*(2), 6–11.
- Pondeville, E., Maria, A., Jacques, J.-C., Bourgoïn, C., & Dauphin-Villemant, C. (2008). *Anopheles gambiae* males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-hydroxyecdysone to females during mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(50), 19631–19636. doi:10.1073/pnas.0809264105
- Prakash, D., Fesel, C., Jain, R., Cazenave, P.-A., Mishra, G. C., & Pied, S. (2006). Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of Central India. *The Journal of Infectious Diseases*, *194*(2), 198–207. doi:10.1086/504720
- Rogers, D. W., Whitten, M. M. a, Thailayil, J., Soichot, J., Levashina, E. a, & Catteruccia, F. (2008). Molecular and cellular components of the mating machinery in *Anopheles gambiae* females. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(49), 19390–19395. doi:10.1073/pnas.0809723105
- Rono, M. K., Whitten, M. M. a, Oulad-Abdelghani, M., Levashina, E. a., & Marois, E. (2010). The major yolk protein vitellogenin interferes with the anti-plasmodium response in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Biology*, *8*(7). doi:10.1371/journal.pbio.1000434
- Sambasivarao, S. V. (2013). NIH Public Access, *18*(9), 1199–1216. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate
- Susana, M., & Guerra, C. (2012). Universidade Nova de Lisboa Instituto de Higiene e Medicina Tropical Pesquisa de assinaturas de seleção de malária na região do gene humano TPI ( triosefosfato isomerase ) Pesquisa de assinaturas de seleção de malária na região do gene humano TPI ( triose.
- WHO | Malaria. (n.d.). Retrieved from <http://www.who.int/topics/malaria/en/>

Zhu, J., Miura, K., Chen, L., & Raikhel, A. S. (2003). Cyclicality of mosquito vitellogenic ecdysteroid-mediated signaling is modulated by alternative dimerization of the RXR homologue Ultraspiracle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(2), 544–549. doi:10.1073/pnas.0235695100

## **VII. ANEXOS**

## **7. Anexo 1 – Protocolos**

### **7.1.1. Produção do anestésico**

#### **Reagentes:**

Ketamina (imalgene)

Discilasina (rompunt )

PBS

#### **Materiais:**

Falcon de 50 ml

Micropipetas

Pontas

#### **Procedimentos:**

Preparar um volume final da solução de 1,5 ml numa concentração de 2:1 de imalgene e rompom.

Fazer uma diluição de 1:3 da mistura em PBS

Fazer alíquota e armazenar a -20°C

### **7.1.2. Protocolo de preparação de formaldeído 4%**

#### **Materiais:**

Tubo falcon 50ml

Microtubos 1,5ul

Pontas p1000

Micropipeta p1000

Balança

Medidor de pH

Pipeta de Pasteur

Filtro

Recipiente de vidro e barra de agitação

Luvas e óculos de proteção

Placa de aquecimento e magneto

Termómetro

Hotte ventilado

Reagentes

Nile red (10 mg; MP Biomedicals, LLC)

DMSO ()

Água desionizada

HLC diluído

NaOH (1N)

Paraformaldeido em pó

1x PBS: 0,137 M NaCl, 0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4

**Procedimento:**

Para um volume final de 250 ml de formaldeído 4% , adicionar 200 ml de 1x PBS para o recipiente de vidro colocado sobre a placa de aquecimento dentro da hotte. Aquecer até aproximadamente 60°C tendo o cuidado de não deixar atingir o ponto de ebulição.

Adicionar 8g de paraformaldeido em pó para a solução de PBS aquecida.

O pó não se dissolve imediatamente na solução. Aumentar lentamente o pH da solução adicionando gotas de 1 N de NaOH com auxílio de uma pipeta até a solução clarear.

Uma vez que o paraformaldeido se encontra dissolvido na solução, a solução deve ser arrefecida e filtrada

Ajustar o volume da solução com PBS até obter o volume de 250 ml

Reavaliar o pH e ajustar com pequenas quantidades de HCL diluído para obter um Ph de aproximadamente 6.9

Fazer alíquotas da solução e congelar entre 2-8°C durante cerca de um mês.

**7.1.3. Preparação de Nile red e procedimento para a coloração****Preparação de Nile red**

Dissolver 10mg de Nile red em 31,4ml de DMSO, fazer alíquotas para microtubos de 1,5 ul e armazenar protegido da luz a -20°C.

**Procedimento de coloração**

Dissecar os mosquitos e retirar os ovários para uma gota de PBS sobre a lâmina

Retirar o PBS com atenção para não perder as amostras

Cobrir a amostra na lamina com 4% formaldeído, deixar fixar por 5 minutos

Lavar a amostra com PBS

Cobrir a amostra com Nile red e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos

Remover o Nile red

Cobrir a amostra corada com vector shield e colocar uma lamela por cima da amostra

Visualizar no microscópio de fluorescência

#### **7.1.4. Protocolo de purificação de cDNA e produto de PCR utilizados**

##### **7.1.4.1. Protocolo *sure clean***

Adicionar igual quantidade de *sure clean* e da amostra a purificar

Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos

Centrifugar a velocidade máxima 14000g durante 10 minutos

Retirar o sobrenadante e manter o *pellet*

Lavar o *pellet* com o dobro do volume da amostra inicial com etanol 80%

Centrifugar a velocidade máxima 14000g durante 10 minutos

Retirar o sobrenadante

Secar o *pellet* a temperatura ambiente

Ressuspender o *pellet* em 50 µl de H<sub>2</sub>O miliQ autoclavada.

Armazenar a -20°C

#### **7.1.4.2. Protocolo de purificação de DNA de uma solução ou uma reação enzimática (GE Healthcare)**

##### **Captura da amostra**

Adicionar 500µl de *capture buffer type 3* a 100µl da amostra

Mexer completamente

Verificar se a mix *capture buffer type 3+* amostra apresenta uma cor amarela ou alaranjada (se a mix apresentar cor rosa escura ou vermelha, adicionar pequeno volume aproximadamente 10 µl de acetato de sódio 3M pH 5,0 e misturar).

Para cada purificação a ser feita, colocar uma coluna *GFX Microspin* num tubo coletor.

##### **Ligação da amostra**

Centrifugar brevemente a mix *capture buffer type 3+* amostra para colher o líquido no fundo do tubo coletor.

Colocar a mix na coluna *GFX microspin* e tubo coletor

Centrifugar a coluna + tubo coletor com a mix a 16000xg por 30 segundos

Descartar o líquido, esvaziando o tubo coletor. Colocar a coluna *GFX microspin* novamente no tubo coletor.

##### **Lavagem e secagem**

Adicionar 500µl de *Wash buffer type 1* na coluna *GFX microspin*

Centrifugar a coluna + o tubo coletor a 16000x g durante 30 segundos

Descartar o tubo coletor e transferir a coluna *GFX microspin* para um tubo de 1,5ml microcentrifuga livre de DNase (fornecido pelo kit).

##### **Eluição**

Adicionar 10-50µl (30 µl) de *elution buffer type 4* ou *type 6* (usei o *type 4*) ao centro da membrana na ligação entre a coluna *GFX microspin* e o tubo coletor.

Incubar a coluna e o tubo coletor por 16000x g durante 1 minuto para recuperar o DNA purificado

Proceder a aplicações ajusante, armazenar o cDNA purificado a -20°C

## 7.2. Anexo 2- Sequência dos genes em estudo

### *Primers utilizados e respectivas sequências*

| RT_ <i>primers</i> | Sequências                      |
|--------------------|---------------------------------|
| Vitelogenina (vg)  | Rev-5'-CTTGGCACGGATCACCAAAT-3'  |
|                    | Fwd- 5'-ACGAAAACCATGACCGCTCT-3' |
| AGAP003654         | Rev- 5'-TCAAAATTTCGCTTCGTCGT-3' |
|                    | Fwd- 5'GACCAACTATACGCCCTGCT-3'  |
| S7                 | Rev-5'GCTTGCCGACCACTTCC-3'      |
|                    | Fwd- 5'- CGCTCCCGAACCCCTGAC-3'  |

| ds_ <i>primer's</i> | Sequências  |
|---------------------|---|
| B2m                 | Rev- 5'-TAATACGACTCACTATAGGCT-3'                            |
|                     | Fwd- 5'- TAATACGACTCACTATAGGCT-3'                           |
| AGAP003654          | Ver-5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGATCC<br>CTTAAACGCTAGGCTCA-3'   |
|                     | Fwd- 5'- TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGAGG<br>AGCACAACACACA-3' |
|                     |   |

### 7.3. Anexo 3 – Testes ANOVA

**Tabela 7.1:** Análise comparativa da variação do crescimento folicular de mosquitos alimentados com diferentes soluções e analisados às 3 horas após o tratamento.

Anova: fator único

#### SUMÁRIO

| <i>Grupos</i>  | <i>Contagem</i> | <i>Soma</i> | <i>Média</i> | <i>Variância</i> |
|----------------|-----------------|-------------|--------------|------------------|
| 3hpa (sangue)  | 74              | 9804427     | 132492,3     | 2,14E+09         |
| 3hpa (glucose) | 87              | 7836354     | 90073,03     | 1,12E+09         |
| 3hpa (PTH)     | 127             | 10108515    | 79594,61     | 5,49E+08         |

#### ANOVA

| <i>Fonte de variação</i> | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>valor P</i> | <i>F crítico</i> |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|------------------|
| Entre grupos             | 1,36E+11  | 2         | 6,79E+10  | 60,12133 | 1,64E-22       | 3,027443         |
| Dentro de grupos         | 3,22E+11  | 285       | 1,13E+09  |          |                |                  |
| Total                    | 4,57E+11  | 287       |           |          |                |                  |

**Tabela 7.2:** Análise comparativa da variação do crescimento folicular de mosquitos alimentados com diferentes soluções e analisados às 6 horas após o tratamento.

Anova: fator único

#### SUMÁRIO

| <i>Grupos</i> | <i>Contagem</i> | <i>Soma</i> | <i>Média</i> | <i>Variância</i> |
|---------------|-----------------|-------------|--------------|------------------|
| 6hpa          | 101             | 26778287    | 265131,6     | 2,15E+10         |
| 6hpa          | 85              | 9031162     | 106249       | 3,53E+08         |
| 6pha          | 117             | 11815282    | 100985,3     | 1,24E+09         |

## ANOVA

| <i>Fonte de<br/>variação</i> | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>valor P</i> | <i>F crítico</i> |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|------------------|
| Entre grupos                 | 1,77E+12  | 2         | 8,83E+11  | 114,0776 | 1,43E-37       | 3,025847         |
| Dentro de<br>grupos          | 2,32E+12  | 300       | 7,74E+09  |          |                |                  |
| Total                        | 4,09E+12  | 302       |           |          |                |                  |

**Tabela 7.3:** Análise comparativa da variação do crescimento folicular de mosquitos alimentados com diferentes soluções e analisados às 18 horas após o tratamento.

Anova: fator único

## SUMÁRIO

| <i>Grupos</i> | <i>Contagem</i> | <i>Soma</i> | <i>Média</i> | <i>Variância</i> |
|---------------|-----------------|-------------|--------------|------------------|
| 18hpa         | 64              | 26186133    | 409158,3     | 1,73E+10         |
| 18hpa         | 40              | 3558465     | 88961,63     | 1,36E+09         |
| 18hpa         | 143             | 13080131    | 91469,45     | 7,68E+08         |

## ANOVA

| <i>Fonte de<br/>variação</i> | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>valor P</i> | <i>F crítico</i> |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|------------------|
| Entre grupos                 | 4,8E+12   | 2         | 2,4E+12   | 468,9122 | 2,57E-84       | 3,032816         |
| Dentro de<br>grupos          | 1,25E+12  | 244       | 5,12E+09  |          |                |                  |
| Total                        | 6,05E+12  | 246       |           |          |                |                  |

**Tabela 7.4:** Análise comparativa da variação do crescimento folicular de mosquitos alimentados com diferentes soluções e analisados às 24 horas após o tratamento.

Anova: fator único

SUMÁRIO

| <i>Grupos</i> | <i>Contagem</i> | <i>Soma</i> | <i>Média</i> | <i>Variância</i> |
|---------------|-----------------|-------------|--------------|------------------|
| 24hpa         | 49              | 19436347    | 396660,1     | 1,81E+10         |
| 24hpa         | 40              | 2374085     | 59352,13     | 2,2E+08          |
| 24hpa         | 122             | 10708154    | 87771,75     | 9,49E+08         |

ANOVA

| <i>Fonte de variação</i> | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>valor P</i> | <i>F crítico</i> |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|------------------|
| Entre grupos             | 3,78E+12  | 2         | 1,89E+12  | 395,1508 | 1,43E-71       | 3,039296         |
| Dentro de grupos         | 9,95E+11  | 208       | 4,78E+09  |          |                |                  |
| Total                    | 4,77E+12  | 210       |           |          |                |                  |