

**Regulação da interação de simbiose entre os embriões do
mosquito *Aedes fluviatilis* e a bactéria *Wolbachia pipientis* pelo
metabolismo**

MARIANA DA ROCHA FERNANDES



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

AGOSTO-2013

Regulação da interação de simbiose entre os embriões do mosquito *Aedes fluviatilis* e a bactéria *Wolbachia pipientis* pelo metabolismo

MARIANA DA ROCHA FERNANDES

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal”.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Logullo

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

AGOSTO – 2013

Regulação da interação de simbiose entre os embriões do mosquito *Aedes fluviatilis* e a bactéria *Wolbachia pipientis* pelo metabolismo

MARIANA DA ROCHA FERNANDES

Comissão examinadora:

Prof. Luciano Andrade Moreira (Laboratório de Malária– Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ-MG)

Membro Externo da Banca

Prof. Alessandro Coutinho Ramos (Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos– CBB – UENF)

Membro da Banca

Prof^a Sirlei Pereira Daffre (Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia-USP)

Membro da Banca

Carlos Logullo (Prof. Associado do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos - CBB – UENF)

Orientador

Confia no SENHOR de todo teu
coração e não te estribes no teu
próprio entendimento. Reconhece-
o em todos os teus caminhos, e ele
endireitará as tuas veredas.

Provérbios 3: 5,6

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria José da Rocha Fernandes e Cláudio Claret Fernandes.
Pelo amor e pelos sacrifícios deles, que permitiram que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo suporte;

Ao meu marido Jorge, pelo apoio incondicional nessa caminhada que compreende muito mais do que a minha formação acadêmica;

Ao Carlos pelo estímulo e pela liderança e principalmente por apostar e acreditar no meu trabalho, o que se tornou fundamental para que eu progredisse;

Aos integrantes do laboratório, que na convivência diária desenvolveram um ótimo ambiente de trabalho com a cooperação e amizade: Danielle, Bárbara, Camila, Evenilton, Jorge, Cristiano, Jhenifer, Yolanda, Josias, Daniela, Newton, Leonardo;

A Adriana e Claudinha por todas as ajudas nas horas de desespero;

Ao professor Luciano Moreira por todas as ajudas e colaborações e ainda por acreditar no meu trabalho sem mesmo me conhecer;

Ao professor Itabajara pelas enormes ajudas durante o meu trabalho;

Aos membros da banca;

E a Deus, que me ajudou a encontrar ânimo nesse trabalho para seguir tocando em frente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. A família Culicidae	11
1.2. Embriogênese de Culicídeos	15
1.3. O mosquito <i>Aedes fluviatilis</i>	17
1.4. <i>Wolbachia</i>	18
1.5. Metabolismo em embriões de Artrópodes	19
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Manutenção dos mosquitos	25
3.2. Postura sincronizada dos ovos de <i>Aedes fluviatilis</i>	25
3.3. PCR convencional do gene WSP	26
3.4. Determinação do tempo de duração da embriogênese	26
3.5. Obtenção de homogeneizados de ovos	26
3.6. Quantificação de glicose	26
3.7. Quantificação de glicogênio	27
3.8. Atividade de Hexoquinase	27
3.9. Atividade de Piruvato quinase	28
3.10. Clarificação da casca dos ovos de mosquito	28
3.11. Extração de RNA total dos embriões de <i>Ae. fluviatilis</i>	28
3.12. Síntese de cDNA	29
3.13. Clonagem e sequenciamento da GSK3 de <i>Ae. fluviatilis</i>	29
3.14. Construção da dupla fita de RNA (dsRNA)	29
3.15. Silenciamento da GSK3 por dsRNA	30
3.16. Quantificação relativa da <i>Wolbachia</i> por PCR em tempo real (qPCR)	30
3.17. Determinação da largura do abdômen de mosquitos adultos	31
3.18. Viabilidade de ovos de fêmeas silenciadas	31
4. RESULTADOS	31
4.1. Análise do tempo de embriogênese nos mosquitos com e sem <i>wolbachia</i>	32

4.2.	Desenvolvimento embrionário de <i>Aedes fluviatilis</i>	32
4.3.	Destino preferencial da glicose 6-fosfato durante a embriogênese de <i>A. fluviatilis</i> wol+ e wol-	33
4.4.	Clonagem e sequenciamento da enzima GSK3 de <i>A. fluviatilis</i>	37
4.5.	Desenho dos primers para qPCR e silenciamento gênico	39
4.6.	Silenciamento gênico da enzima GSK3 e seu efeito na morfologia dos adultos de <i>A. fluviatilis</i>	40
4.7.	Efeito do silenciamento gênico da GSK3 nos embriões de <i>A. fluviatilis</i>	43
4.8.	Efeito da Wolbachia no embrião de <i>Aedes aegypti</i>	48
5.	DISCUSSÃO	48
6.	CONCLUSÕES	56
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Ciclo de vida do mosquito <i>A. aegypti</i>	10
2. Fases iniciais da embriogênese em Díptera	12
3. Desenvolvimento embrionário inicial de <i>Culex tarsalis</i>	13
4. Desenvolvimento embrionário tardio de <i>Culex tarsalis</i>	14
5. Fases finais do desenvolvimento embrionário de <i>Culex tarsalis</i>	14
6. Desenvolvimento embrionário de <i>A. aegypti</i>	14
7. Representação esquemática da GSK3 α e GSK3 β de mamíferos	20
8. Via de insulina	21
9. Atividade e expressão relativa da GSK3 de embriões de <i>A. aegypti</i>	22
10. Envolvimento da GSK3 na via Wnt	23
11. Taxa de eclosão dos ovos de <i>A. fluviatilis</i> com e sem wolbachia	32
12. Desenvolvimento embrionário de <i>A. fluviatilis</i>	33
13. Nível de glicose nos embriões wol+ e wol-	34
14. Atividade de Hexoquinase	35
15. Conteúdo de glicose 6-fosfato	35
16. Atividade de piruvato quinase	36
17. Concentração de glicogênio	37
18. Reação de clivagem PGEM-GSK	38
19. Confirmação de clonagem	39
20. Desenho de <i>primers</i>	40
21. Confirmação de silenciamento usando 400ng de dsRNA	40
22. Fenótipo gerado pelo silenciamento usando 400ng de dsRNA	41
23. Tamanho do abdômen de fêmeas injetadas com 400ng de dsRNA	41
24. Confirmação de silenciamento usando 200ng de dsRNA	42
25. Fenótipo gerado pelo silenciamento usando 200ng de dsRNA	43
26. Tamanho do abdômen de fêmeas injetadas com 200ng de dsRNA	43

Resumo

O metabolismo de glicose desempenha um papel essencial no desenvolvimento e na fisiologia de todos os organismos vivos e suas interações. Para entender melhor a natureza da simbiose entre microrganismos e hospedeiros eucarióticos, é útil estudar os micro-organismos que participam em diversas interações de simbiose e seus respectivos hospedeiros. *Wolbachia* são membros da ordem Rickettsiales, um grupo diversificado de bactérias intracelulares que compreende espécies com relações parasitas, mutualistas e comensais com os seus hospedeiros. Aqui é relatado a caracterização preliminar da simbiose metabólica entre wflu, a *Wolbachia* nativa do neotropical mosquito *A. fluviatilis*, e embriões de *A. fluviatilis*. Usando uma linhagem de *A. fluviatilis* curadas de sua *Wolbachia* nativa com o tratamento com antibióticos, mostra-se que o metabolismo da glicose do hospedeiro é alterado com a presença da bactéria e ainda é visto, através do silenciamento da GSK, que o principal modulador dessa relação simbiótica parece estar sendo o glicogênio. Também foi verificado que o silenciamento gênico de GSK afeta significativamente a formação destes embriões. Além disso, as análises morfológicas evidenciaram que mudanças no metabolismo de glicose ocorrem de acordo com a fase embrionária de desenvolvimento. É necessário mais estudos para desvendar em detalhes esta relação de simbiose, o que pode contribuir para futuros trabalhos sobre o uso de *Wolbachia* como controle de doenças transmitidas por artrópodes.

Abstract

The glucose metabolism plays an essential role in the physiology and development of all living organisms and their interactions. To better understand the nature of microbial symbioses with eukaryotic hosts, it is useful to study microorganisms that participate in diverse symbiont–host interactions. *Wolbachia* are members of the order *Rickettsiales*, a diverse group of intracellular bacteria that comprises species with parasitic, mutualistic and commensal relationships with their hosts. Here we report preliminary characterization of the metabolic symbiosis between wflu, a native *Wolbachia* from the neotropical mosquito *A. fluviatilis*, and *A. fluviatilis* embryos. Using an aposymbiotic strain of *A. fluviatilis* cured of its native *Wolbachia* with antibiotic treatment, we show that glucose metabolism is changed with the presence of bacteria and yet seen, through the silencing of GSK, that the main modulator of this symbiotic relationship may be in glycogen. Morphological analysis with embryos in distinct stages showed that silencing of GSK affect embryo development. Also we have seen with the morphological that glucose metabolic rate changes according to developmental embryonic stages. Further work is needed to unravel in detail this relationship which may contribute to future work on the use of *Wolbachia* to control diseases transmitted by arthropodes.

1. Introdução

1.1. A família Culicidae

Os mosquitos pertencem à Classe Insecta, Ordem Díptera e Família Culicidae, sendo popularmente conhecidos como muriçocas ou carapanãs. Seu corpo é dividido em cabeça, tórax e abdome. Eles também possuem um par de antenas sensível ao tato; um par de asas; outro par transformado em balancins; e aparelho bucal picador-sugador. São insetos holometábolos que possuem um ciclo biológico composto por quatro estágios: ovo, quatro instares larvais, pupa e adulto (figura 1) (Consoli & Lourenço de Oliveira *et al.*, 1994).

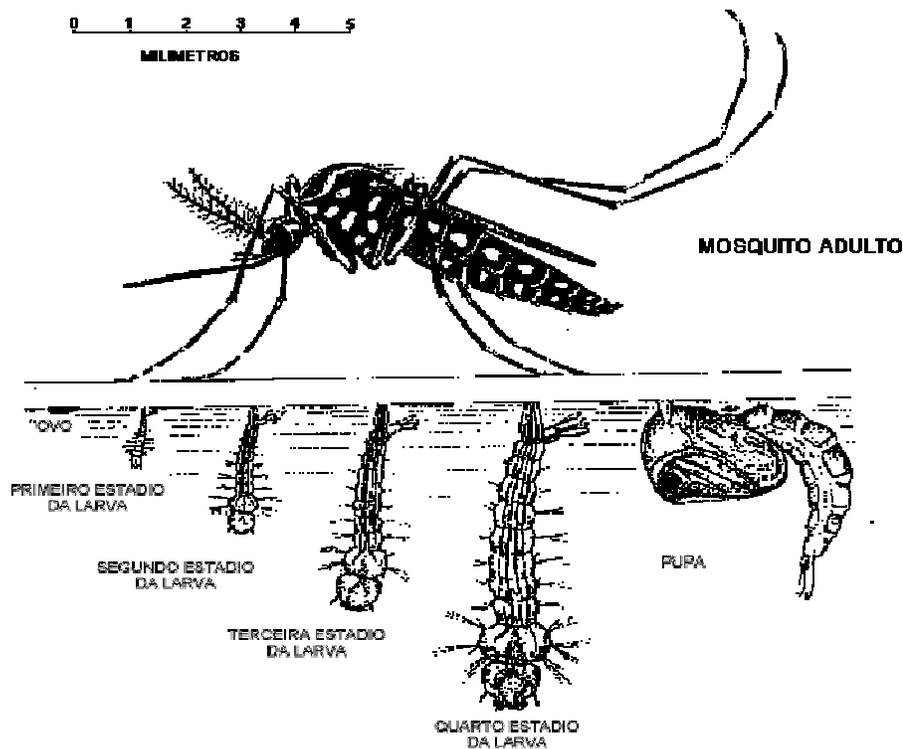


Figura 1: Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti* (Adaptado de UNICAMP, 2009)

Os culicídeos são fundamentalmente aquáticos, ganhando o ambiente terrestre somente na fase adulta, onde fazem sua reprodução e dispersão. As larvas se alimentam de matéria orgânica dissolvida e de micro-organismos contidos no criadouro alagado e as pupas não se alimentam (BORROR E COLS *et al.*, 1989; FORATTINI *et al.*, 1996). Os adultos desses animais

invertebrados possuem hábitos variáveis, alimentando-se geralmente de sangue, sendo por isso chamados de hematófagos. Esse hábito alimentar se restringe apenas às fêmeas, que também se alimentam de seiva e néctar (Consoli & Oliveira *et al.*, 1994). As formas adultas são dioicas (sexos separados), aladas, e só estão prontas para realizar a cópula após o endurecimento do tegumento corporal e, no caso dos machos, após o giro de 180° da genitália externa, que ocorre 24 horas após a emergência. Em geral apresentam dimorfismo sexual acentuado: os machos apresentam antenas plumosas e as fêmeas apresentam antenas pilosas e são muito mais corpulentas (FORATTINI *et al.*, 1996). Após o acasalamento, elas se alimentam de sangue, pois esse alimento fornece proteínas e ferro, substâncias necessárias para o desenvolvimento de seus ovos. Os machos se alimentam apenas de néctar de flores e suco de frutas. Há diversas espécies que são transmissoras de patógenos, como os animais do gênero *Aedes*, transmissores da dengue e febre amarela; e os do gênero *Culex*, transmissores da filariose e dentre outros a transmissão de patógenos se dá devido ao hábito hematofágico destes mosquitos (Christophers *et al.*, 1960).

1.2. Embriogênese de culicídeos

A embriogênese em mosquitos se inicia com a fertilização do ovócito pelo espermatozoide. No corpo da fêmea, os espermatozoides ficam armazenados em uma estrutura que se conecta com o oviduto central, a espermateca. Os espermatozoides saem deste reservatório na medida em que os ovócitos se aproximam, durante o processo de saída do corpo da fêmea. Assim, o ovo é fecundado imediatamente antes da postura. Por este motivo, a oviposição é considerada o momento do início da embriogênese (Chapman *et al.*, 1998). Uma vez depositados no ambiente, ovos de mosquitos se desenvolvem por conta própria, sem qualquer necessidade de atenção ou proteção materna, o que caracteriza os mosquitos como animais ovíparos (Gilbert & Raunio *et al.*, 1997; Zeh *et al.*, 1989). Dependendo do gênero, ovos de mosquitos podem ser depositados diretamente sobre a superfície da água (gêneros *Culex* e *Anopheles*, por exemplo) ou em local úmido, bem próximo da água (gênero *Aedes*) (Clements *et al.*, 1992).

No início da embriogênese de culicídeos, o embrião ocupa todo o espaço físico do ovo, e os núcleos (energídeos) se dividem em um ambiente acelular (Figura 2a). Posteriormente, os energídeos começam a migrar para a periferia do ovo e as células polares são formadas (Figura 2b). Quando todos os energídeos alcançam a periferia do ovo, forma-se o blastoderma sincicial (Figura 2c). Subsequentemente são constituídos os limites celulares, formando o blastoderma celular, claramente visível no córtex do embrião (Figura 2d, 3a) Nesta fase existem dois tipos celulares distintos em tamanho: células maiores, concentradas no polo posterior do embrião (células polares) e células menores, que permeiam todo o resto do embrião. As células menores correspondem às células somáticas que formarão os compartimentos do embrião e as células polares são as precursoras da linhagem germinativa (RAMINANI & CUPP *et al.*, 1975; BATE & ARIAS *et al.*, 1993).

A próxima fase do desenvolvimento embrionário é chamada gastrulação, em que o embrião desenvolve uma invaginação ventral (fenda ventral), que dará origem ao sistema nervoso e uma fenda cefálica, que separa os limites aproximados da cabeça e do tronco. Logo após o início da gastrulação, ocorre a extensão da banda germinal (figura 3b, 3c), que estende dorsalmente para o polo anterior (figura 3d) (MONNERAT *et al.*, 2002).

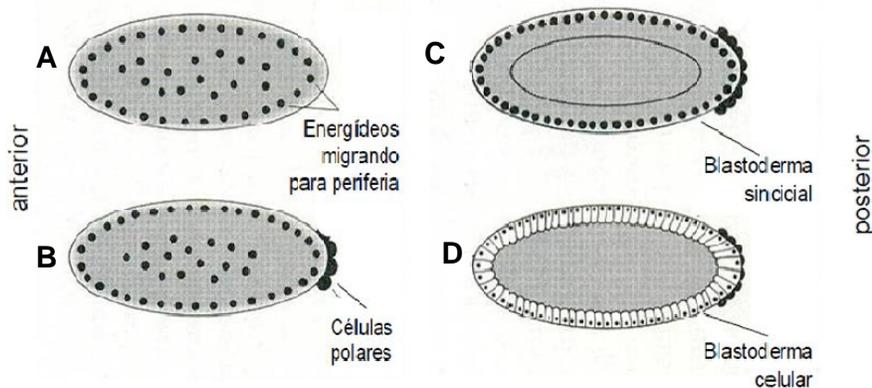


Figura 2 - Fases iniciais da embriogênese em Díptera (Adaptado de BATE E ARIAS, 1993). (A) núcleos migrando para periferia, (B) formação das células polares do embrião, (C) blastoderma celular se formando e (D) blastoderma celular formado.

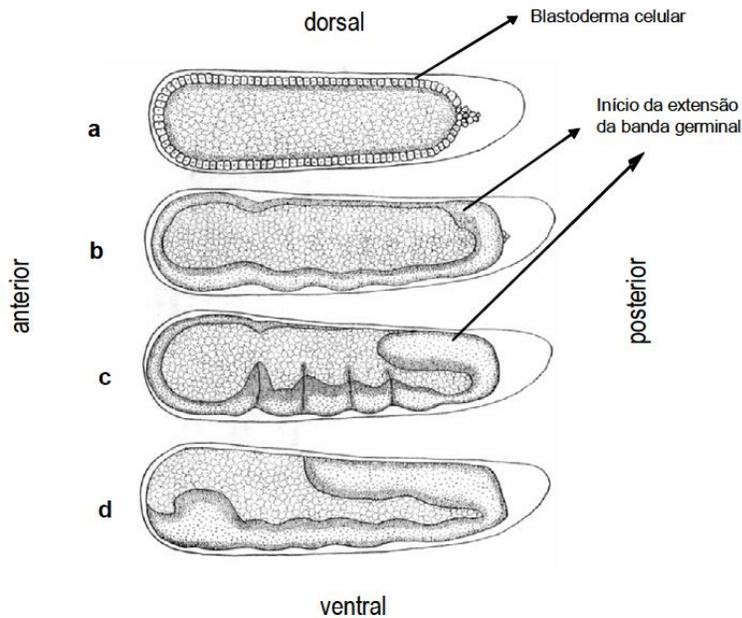


Figura 3 - Desenvolvimento embrionário de *Culex tarsalis* (Adaptado de ROSAY, 1959). (A) Blastoderma celular formado, (B) início da extensão da banda germinal, (C) extensão da banda germinal propriamente dita e (D) final da extensão da banda germinal.

Os primeiros sinais externos de segmentação ocorrem quando o embrião se encontra no estágio máximo da extensão da banda germinal (Figura 4a). Após se estender, a banda germinal sofre retração, com conseqüente aprofundamento dos sulcos entre os segmentos. É durante esta fase de retração que ocorre o movimento, típico de embriões de mosquito, de rotação de 180° ao longo do seu eixo longitudinal (VALLE & COLS *et al.*, 1999) (figura 4b). Quando a retração da banda germinal se completa, os segmentos cefálicos e torácicos são claramente diferenciados e a segmentação torna-se mais evidente (figura 4c; 4d) (MONNERAT & COLS *et al.*, 2002).

Após a conclusão da retração da banda germinal (figura 4d) ocorre o fechamento dorsal do embrião. Este processo começa por ambas as extremidades simultaneamente, e as últimas células a se fechar são aquelas que pertencem aos segmentos embrionários centrais (figura 4e) (RAMINANI & CUPP *et al.*, 1975). Ao final da embriogênese, depois do fechamento dorsal (figura 5a), um pequeno saco de vitelo ainda é remanescente. Nesta fase final, os três segmentos torácicos estão fundidos e os oito segmentos abdominais já podem ser visualizados (figura 5b). Tornam-se evidentes os apêndices caudais.

No final da embriogênese, diversas estruturas se projetam do corpo do embrião: cerdas, escova oral, antena e espinho de eclosão (figura 5c) (ROSAY *et al.*, 1959).

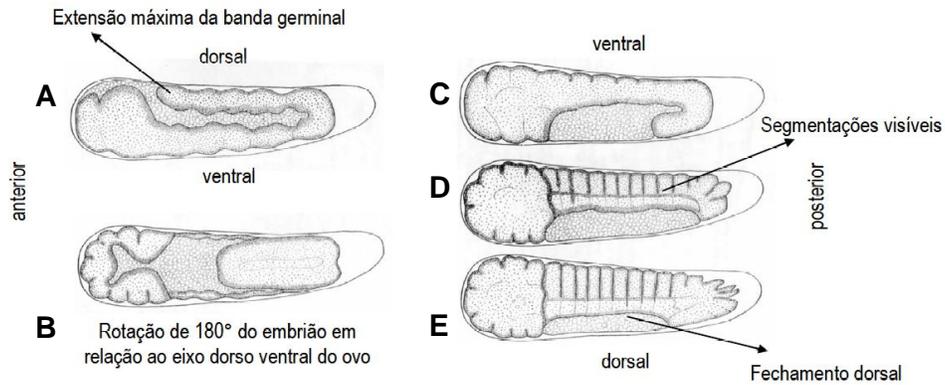


Figura 4- Desenvolvimento embrionário de *Culex tarsalis* (Adaptado de ROSAY, 1959). (A) extensão máxima da banda germinal, (B) rotação do embrião em torno do seu eixo dorso ventral, (C) retração da banda germinal, (D) início da segmentação do embrião e (E) fechamento dorsal do embrião.

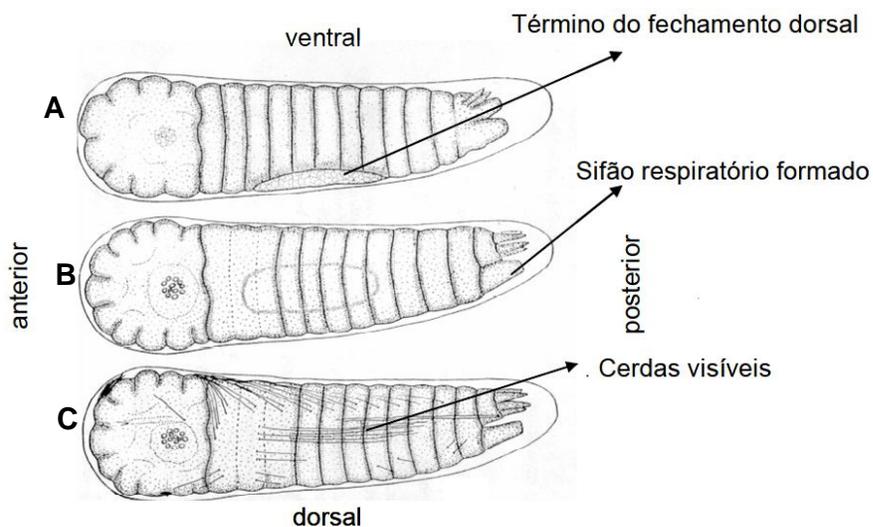


Figura 5- Fases finais do desenvolvimento embrionário de *Culex tarsalis* (Adaptado de ROSAY, 1959). (A) término do fechamento dorsal do embrião, (B) sifão respiratório formado e (C) embrião totalmente formado com cerdas já visíveis.

A duração da embriogênese em *Ae. aegypti* é dependente da temperatura em que os ovos se desenvolvem. Quando mantidos úmidos a 25°C, os embriões têm seu desenvolvimento completado com 77,4 horas, e a 28°C com 61,6 horas (Farnesi *et al.*, 2009). Após três dias da postura os embriões entram em diapausa e podem permanecer viáveis por meses e até anos (Silva & Silva *et al.*, 1999). Recentemente pode-se observar, através da clarificação do exocórtion, o desenvolvimento morfológico do embrião, em 10h verifica-se que a banda germinal sofre expansão, seguida de retração em 24h de desenvolvimento (Vital *et al.*, 2010).

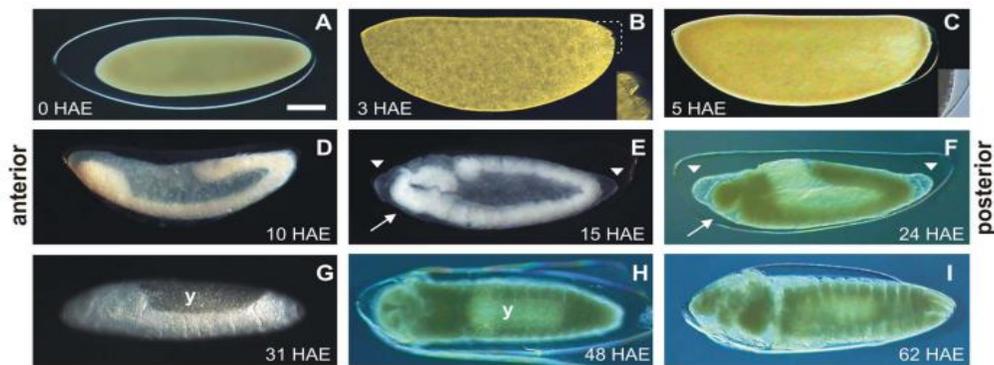


Figura 6- Desenvolvimento embrionário de *A. aegypti*. (A) 0h depois da oviposição. (B) 3h depois da oviposição, formação do blastoderma sincicial. (C) 5h de desenvolvimento, formação do blastoderma celular. (D) 10h depois da oviposição. (E) 15h depois da oviposição, extensão da banda germinal. (F) 24h depois da oviposição, retração da banda germinal. (G) 31h depois da oviposição, início da segmentação embrionária. (H) 48h depois da oviposição, embrião praticamente formado. (I) 62h depois da oviposição, embrião pronto para eclosão (Vital *et al.*, 2010).

1.3. O mosquito *Aedes fluviatilis*

São mosquitos de cor parda escura, caracterizam-se por uma mancha dourada na parte superior da cabeça e patas com anéis brancos. É raramente encontrado dentro das casas. Os locais preferenciais para desova são as

cavidades das pedras e as margens dos rios, mas, recentemente, tem sido encontrado ovipondo na parte externa das casas nos mesmos depósitos em que se encontra o *Aedes aegypti* (Superintendência de Campanhas de Saúde Pública- Brasília: 1989).

É uma espécie neotropical, doméstica ou semidoméstica encontrada no Brasil, no México e na Argentina, não tem sido implicada na transmissão de doença em condições naturais. Constitui, assim, um excelente modelo experimental, podendo, em muitos casos, ser criada em substituição ao *Ae. aegypti* ou *Ae. albopictus*, sem os riscos que a colonização destes envolve (Consoli & Williams *et al.*, 1978). Possuem acasalamento estenogâmico, ou seja, são capazes de se acasalar em pequenos espaços, durante o voo ou pousadas sobre uma superfície (Cambournac & Hill, 1940, in Bates, 1949). Os ovos são depositados diretamente sobre a água de forma isolada, estes resistem à dessecação por no máximo trinta dias em laboratório (Consoli & Williams, 1981).

O mosquito *Ae. fluviatilis* tem sido muito utilizado como modelo experimental em laboratório para estudos da malária aviária através da infecção de aves domésticas (galinhas) com *Plasmodium gallinaceum*. Utilizando este modelo é possível obter considerável quantidade de esporozoítos infectantes. No entanto, esta espécie não se infecta com plasmódios que transmitem a malária humana nem tampouco pode ser vetor dos vírus da dengue e da febre amarela (Garnham, 1966). O modelo de malária aviária oferece algumas outras vantagens que são o baixo custo, a facilidade de manutenção das galinhas e a reprodutibilidade deste sistema (Collins *et al.*, 1986). Além disso, diversas pesquisas têm demonstrado a proximidade evolutiva entre o *P. gallinaceum* e o *P. falciparum* através de análises filogenéticas dos genes que codificam a proteína circunsporozoíta (CSP) e a proteína relacionada à trombospondina (TRAP) (McCutchan *et al.*, 1996; Templeton *et al.*, 1997; Polley *et al.*, 2005).

Ae. fluviatilis possui muitas características biológicas semelhantes com as do *Ae. aegypti*, vetor da febre amarela e dengue, e tem sido demonstrado um modelo útil para estudos biológicos de infecções experimentais e testes de suscetibilidade a inseticidas. Apesar de um número considerável de estudos

envolvendo a capacidade vetorial do *Ae. fluviatilis* para algumas doenças muito pouco é conhecido sobre a embriogênese deste mosquito.

1.4. *Wolbachia*

Bactérias do gênero *Wolbachia* são membros da ordem *Rickettsiales*, um grupo diversificado de bactérias intracelulares que compreende espécies com relações parasitas, mutualistas e comensais com os seus hospedeiros que infectam apenas invertebrados. Os gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* e *Rickettsia*, geralmente, possuem ciclos de vida que incluem um invertebrado 'vetor' e mamíferos como hospedeiros, embora estes gêneros de bactérias sejam encontrados estritamente em certas espécies de invertebrados (Werren.,1994). No entanto, ao contrário de membros desses outros gêneros, *Wolbachia* não infecta vertebrados. *Wolbachia* têm atraído um interesse considerável na última década, principalmente, por causa da sua grande abundância, fascinante efeitos sobre os hospedeiros, que são na maioria das vezes a manipulação reprodutiva (Bourtzis., 2008). Esta bactéria foi primeiramente identificada em 1924 por Hertig e Wolbach no mosquito *Culex pipiens*. Constitui um simbionte natural intracelular obrigatório que se encontra em 20 % da população de artrópodes (Baldo *et al.*, 2007).

Insetos são comumente infectados com viroses, e, considerando sua localização intracelular, é possível que *wolbachia* possa estar influenciando no resultado da infecção viral no seu hospedeiro. Infecções com *Wolbachia* podem limitar a transmissão da dengue por meio de dois mecanismos distintos. O primeiro é através da introdução de estirpes de *Wolbachia* que reduzem a taxa de sobrevivência e capacidade vetorial associada da população de mosquitos (O'Neill *et al.*, 2000 e 2008). O segundo mecanismo depende da capacidade de algumas estirpes *Wolbachia* para interferir com a capacidade de vírus de RNA em acarretar infecções produtivas em insetos (Hedges *et al.*; 2008; Teixeira *et al.*; 2008) e, potencialmente, modular a competência do vetor *Ae. aegypti* para vírus da dengue.

A *Wolbachia pipiens* é um endosimbionte para o *Aedes fluviatilis* e, aparentemente, esta bactéria não interfere no desenvolvimento deste mosquito (Baton., 2013). Já em *Aedes aegypti* tem sido demonstrado que infecções com

esta bactéria podem influenciar no desenvolvimento embrionário do mosquito (McMeniman., 2011). Ainda em *Aedes aegypti* foi demonstrado que a mudança no padrão do metabolismo de glicose ocorre em uma etapa crucial para a formação destes embriões (Vital *et al.*, 2010). A fim de avançar a compreensão da interação hospedeiro / simbiote alguns estudos têm contemplado o entendimento de vias metabólicas como a via de insulina e também a via de formação de ecdisteroides, as quais iram influenciar no crescimento e na fecundidade do hospedeiro (Negri., 2012 & Tomoatsu., 2009).

1.5. Metabolismo em embriões de artrópodes

O ovo tem uma estrutura física peculiar e composição química extremamente complexa. A sua complexidade está em consonância com seu papel de proteção e manutenção do desenvolvimento embrionário em um sistema energeticamente fechado. A energia concentrada nos ovos é usada para as biossínteses, necessárias para o crescimento do embrião e para a manutenção dos tecidos que virão a ser formados. Após a eclosão, a sobrevivência das larvas é determinada pela quantidade de vitelo remanescente e pelo início do repasto (Sahoo *et al.*, 1998). Uma abordagem muito recorrente na literatura é a quantificação do conteúdo de vitelo nos ovos durante a embriogênese. Em *Musca domestica* foi mostrado que a ninfa eclode com 20% do vitelo ainda preservado (Ribolla & Bianchi, 1995). No caso de *Rhodnius prolixus* este percentual é maior, com a ninfa retendo 40% do vitelo (Oliveira *et al.* 1986). No carrapato bovino *B. microplus* o nosso grupo demonstrou que sua prole eclode com cerca de 60% de vitelo preservado (Logullo *et al.*, 2002). Acredita-se que o conteúdo de vitelo esteja relacionado à estratégia adaptativa de cada uma dessas espécies em função da disponibilidade de alimento na natureza (Weston & Cols., 1984).

O custo metabólico no desenvolvimento embrionário pode ser definido como a quantidade total de energia consumida pelo embrião durante o desenvolvimento, incluindo o gasto para o crescimento, a biossíntese e a manutenção dos tecidos (Thompson & Stewart, 1997). Durante a embriogênese de *Ae. aegypti* foi registrado altos níveis de glicose em

momentos relativos à segmentação, entre 15h e 20h, sugerindo ser uma importante fonte energética nesta etapa da embriogênese. Também foi observado, neste mosquito, um acúmulo de glicogênio nos ovos até 15h de embriogênese, seguido da diminuição do conteúdo deste metabólito nos ovos até o fim deste estágio (Vital *et al.*, 2010). Durante as sucessivas divisões nucleares anteriores à formação do blastoderma sincicial, nas primeiras horas de embriogênese de *Aedes aegypti*, a glicose pode estar sendo direcionada preferencialmente para síntese de nucleotídeos. Após a celularização (15h), a glicose parece ser usada preferencialmente como substrato energético pela via glicolítica, até o fim da embriogênese (Vital *et al.*, 2010).

A gliconeogênese parece atuar como uma possível via metabólica de reabastecimento de glicose para a célula-ovo, servindo como substrato para a síntese de glicogênio e nucleotídeos (Vital *et al.*, 2010). O glicogênio é sintetizado a partir de UDP-glicose, principalmente, derivado de carboidratos ou de aminoácidos da dieta. UDP-glicose pode ser utilizada para a síntese de glicogênio ou de trealose, o açúcar circulante na hemolinfa (Thompson *et al.*, 2003). Quando a trealose no corpo gorduroso atinge uma determinada concentração, a sua síntese é inibida e UDP-glicose é utilizada para a síntese de glicogênio. A síntese de glicogênio ocorre pela glicogênio sintase (GS), cuja atividade é regulada pela glicogênio-sintase-quinase-3 (GSK-3) (Arrese *et al.*, 2010) em *Musca domestica*.

1.6. Glicogênio Sintase Kinase 3: uma ligação entre vias de sinalização durante a embriogênese

Glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) é uma serina/treonina quinase que foi, inicialmente, isolada e purificada como uma enzima capaz de fosforilar e inativar a enzima glicogênio sintase (GS) (Bradley and Woodgett, 2003). Atualmente, é sabido que, além desse papel no metabolismo do glicogênio, a GSK3 atua como reguladora de vias de sinalização importantes para o desenvolvimento embrionário como a via de Wnt, iniciadas por diversos estímulos como por exemplo alguns tipos de adversidades (Frame & Cohen, 2001; Bradley & Woodgett, 2003). Numerosos substratos de GSK3 têm sido

descritos depois da GS: β -catenina, c-jun, APC, inibidor 2 de proteína fosfatase 1, ciclina D1, Tau, eIF2B, etc. Estes substratos atuam em vias de sinalização de sobrevivência celular, apoptose, desenvolvimento embrionário, aumento de síntese proteica e etc. Mais de 40 enzimas são fosforiladas pela GSK3, incluindo 12 fatores de transcrição (Jope & Johnson, 2004).

Em mamíferos existem duas isoformas de GSK3 expressas por diferentes genes: GSK3 α e GSK3 β (Mukai *et al.*, 2002). Estas isoformas são expressas distintamente de acordo com o tecido em que são encontradas (Lau *et al.*, 1999). As duas isoformas possuem alto grau de similaridade, cerca de 97% em seus domínios catalíticos, mas diferem substancialmente em outras regiões. Homólogos de GSK3 existem em todos os eucariotos investigados até o momento e apresentam alta homologia entre eles. Isoformas de espécies distantes como *Musca domestica* e *Homo sapiens sapiens* apresentam similaridade superior a 90% em seu domínio quinase (Ali *et al.*, 2001). A GSK3 α possui um peso molecular de 51 kDa e a GSK3 β de 47kDa. A diferença entre os pesos moleculares é devido à presença de uma cauda N-terminal rica em glicina presente somente na GSK3 α (Woodgett *et al.*, 1990) (figura. 7).

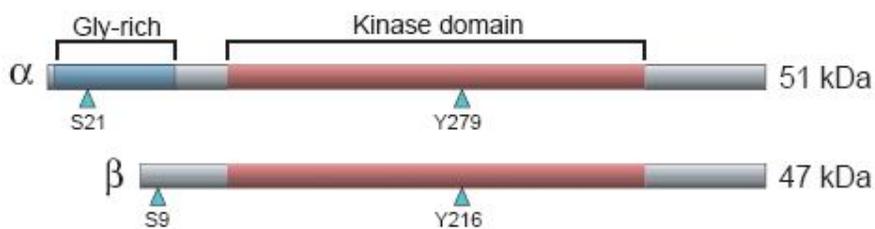


Figura 7: Representação esquemática da GSK3 α e GSK3 β de mamíferos. Sítios de fosforilação nos resíduos de serina e tirosina estão indicados pela seta azul. O domínio N-terminal rico em glicina é somente encontrado na GSK3 α (adaptado de Bradley and Woodgett, 2003).

Essas duas isoformas possuem funcionalidades distintas. Isto se torna óbvio quando a deleção de GSK3 β em ratos resulta em um fenótipo embrionário letal. A deleção em embriões provoca a degeneração do fígado causada por aumento na apoptose dos hepatócitos. A inabilidade da GSK3 α em reverter esse quadro, mostra a especificidade de função das isoformas

(Hoefflich et al., 2000). Nessa via a insulina se liga ao seu receptor ativando uma cascata de fosforilação resultando na inativação de GSK3 dependente de fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K). PI3K induz ativação de Akt resultando na fosforilação de ambas as isoformas de GSK3 (S9 na GSK3 β e S21 na GSK3 α) inibindo sua atividade. Isto induz a desfosforilação de substratos incluindo GS e o fator iniciador de síntese de proteína eucariótica 2B (eIF2B) levando sua ativação e, conseqüente, aumento na síntese de glicogênio e de proteína (Cohen, 1999; Cross et al., 1995) (figura 8).

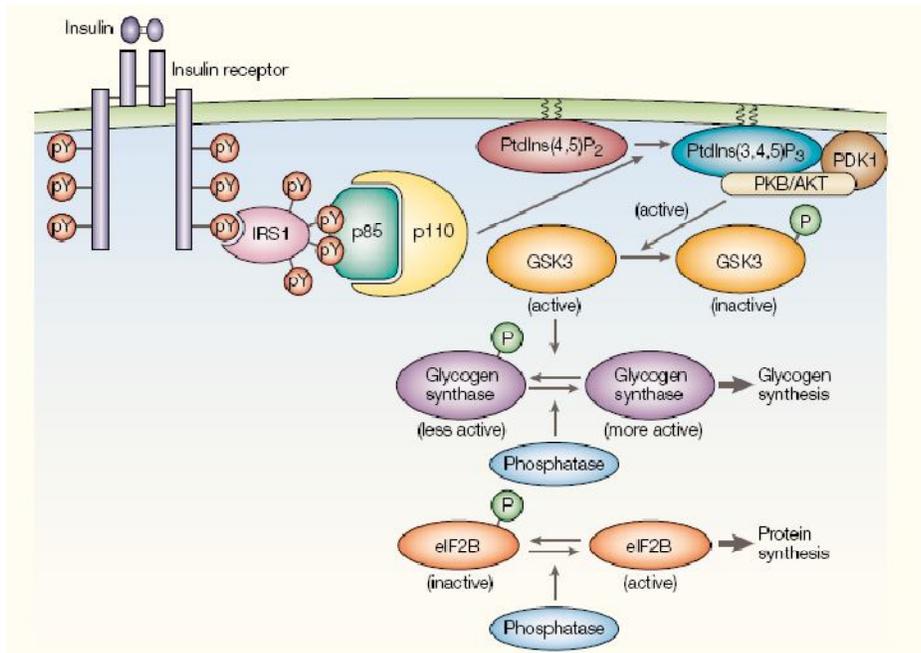


Figura 8: Insulina estimula a síntese de glicogênio e proteína via inibição de GSK-3 (Frame and Cohen, 2001).

Em um trabalho publicado pelo grupo foi visto o perfil da atividade e de transcrição da GSK3 durante a embriogênese do *Ae. aegypti*, bem como a transcrição durante oogênese. A atividade e transcrição de GSK3 na embriogênese seguiram um perfil semelhante, com maiores níveis de transcritos no princípio da embriogênese seguido de queda. Na oogênese a

transcrição de GSK3 foi ativada mediante alimentação sanguínea (Vital *et al.*,2010).

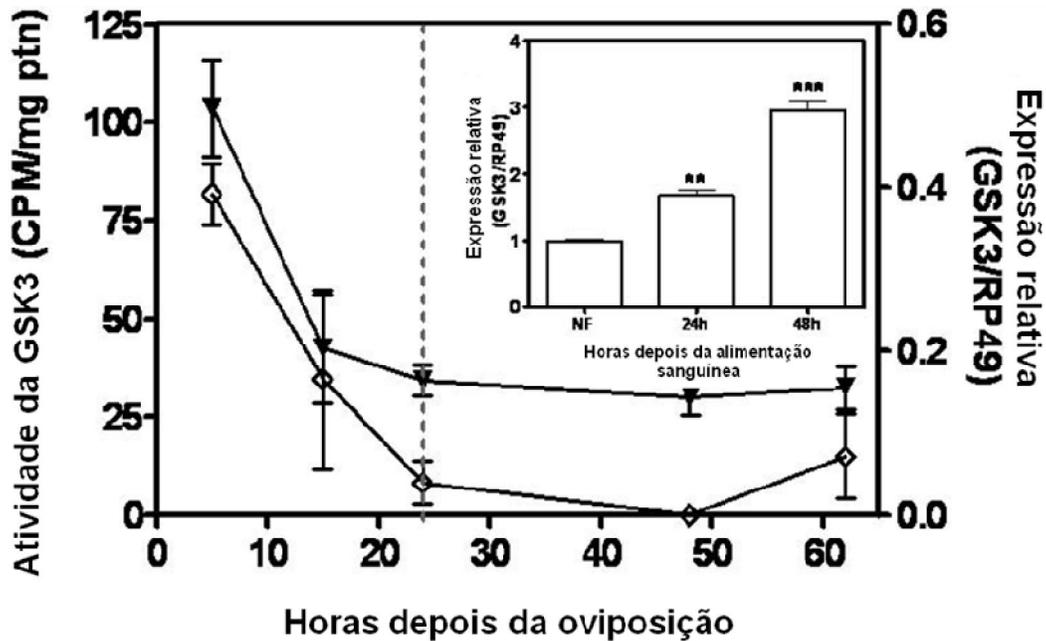


Figura 9: Atividade (\diamond) e expressão relativa (\blacktriangle) da GSK3 de embriões de *Ae. aegypti*. No *insert* mostra a expressão relativa de GSK3 em ovários de *Ae. aegypti* antes e após alimentação sanguínea (Vital *et al.*, 2010).

A GSK-3 não está apenas envolvida em reações metabólicas, mas também participa na via Wnt. A via Wnt é altamente conservada entre *Drosophila*, *Xenopus* e vertebrados. GSK3 atua sobre o crescimento e a diferenciação celular em mamíferos, bem como define a direção do eixo embrionário em *Drosophila* e *Xenopus*. Na via de Wnt a GSK3 participa da formação de um complexo proteico que tem a função de fosforilar a β -catenina, promovendo sua ubiquitinação e posterior degradação. Quando a célula é estimulada pela interação da Wnt com seu ligante ocorre a ativação da via, o complexo proteico se desfaz e a β -catenina não é mais fosforilada acumulando-se no citoplasma. (Dajani *et al.*, 2001; Ferkey e Kimelman, 2000).

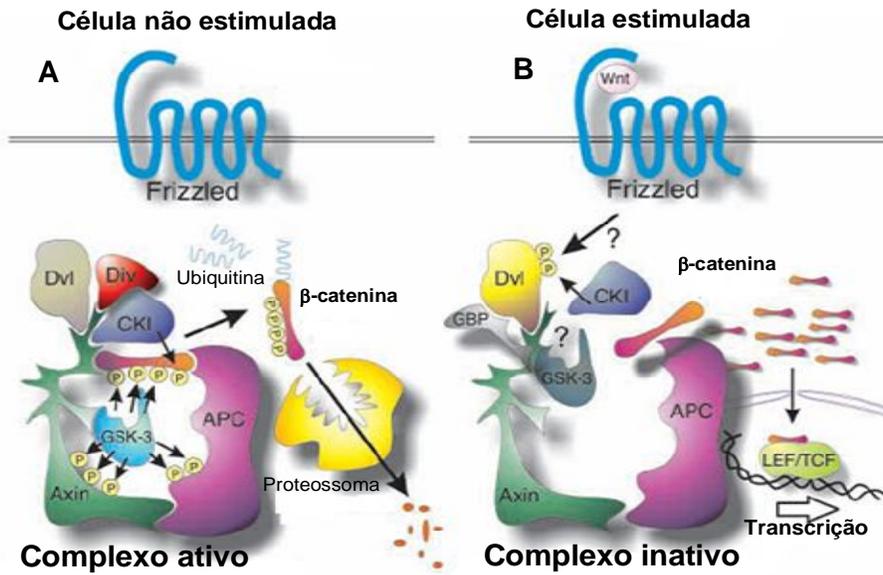


Figura 10: Envolvimento da GSK3 na via Wnt. **A)** Quando não há a ligação do Wnt no receptor transmembrana há a formação de um complexo proteico envolvendo a GSK3, que fosforila a APC, Axina e β -catenina. A β -catenina é então degradada no proteossoma por causa de sua fosforilação. **B)** A ligação do Wnt desfaz o complexo de proteínas, a β -catenina não é fosforilada pela GSK3 e é acumulada, passando para o núcleo ativando fatores de transcrição (figura adaptada Doble e Woodgett, 2003).

Nesta dissertação, se demonstra que o mosquito *Aedes fluviatilis* na presença do endossimbionte (*Wolbachia pipiens*) apresenta uma alteração no metabolismo de glicogênio no embrião. Observou-se, através de silenciamento mediado por RNA, que a GSK-3 está envolvida com este processo.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo geral: Investigar o metabolismo de glicose e a morfologia do mosquito *Aedes fluviatilis* durante a embriogênese sobre a influência de *Wolbachia*.

2.2. Objetivos específicos

Objetivo 1: Caracterizar os aspectos relacionados à via glicolítica pelo monitoramento da atividade de enzimas chave:

- 1º) hexoquinase;
- 2º) piruvato quinase.

Objetivo 2: Avaliar o destino preferencial da glicose durante a embriogênese através da quantificação de:

- 1º) Glicose total;
- 2º) Glicose-6-fosfato;
- 3º) Glicogênio.

Objetivo 3: Caracterizar os eventos morfológicos durante a embriogênese do mosquito *Ae. fluviatilis*.

Objetivo 4: Obter a sequência de nucleotídeos da GSK3 de *Ae. fluviatilis*.

- Clonagem do gene da GSK3;
- Sequenciamento do gene da GSK3;
- RT-PCR do gene da GSK3.

Objetivo 5: Avaliar a influência do silenciamento mediado por RNA da GSK3 na oviposição e na morfologia do embrião ao longo da embriogênese.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Manutenção dos mosquitos

Mosquitos *Ae. fluviatilis* são mantidos, constantemente, no insetário da Unidade de Experimentação Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Os adultos são mantidos continuamente em solução de sacarose 10%. Para a produção de ovos, fêmeas de mosquitos foram alimentadas com sangue de camundongos. Linhagens de mosquitos, na presença ou ausência de *Wolbachia*, foram cedidas pelo professor Dr. Luciano Moreira (FIOCRUZ-MG). Durante todo o trabalho estas linhagens foram designadas como wol+ (mosquitos naturalmente com *Wolbachia*) e wol- (mosquitos tratados com antibiótico para a retirada da *Wolbachia*).

3.2. Postura sincronizada de ovos de *Aedes fluviatilis*

Este método foi adaptado de Valencia et al. (1996). Três a quatro dias após a alimentação sanguínea, fêmeas de *Ae. fluviatilis* foram coletadas e colocadas em um tubo em contato com gelo por 1 min ou até que adormecessem. Em seguida, foram rapidamente colocadas em um disco de papel filtro sobre a tampa invertida de uma placa de Petri (90 x 15 mm or 150 x 15 mm). A tampa foi então coberta com a base da placa. Permite-se a recuperação dos mosquitos dentro da placa de Petri por, aproximadamente, 5 min. Neste momento, água destilada (o suficiente para encharcar o papel) foi introduzida dentro de placas de Petri. Os mosquitos iniciaram imediatamente a postura dos ovos sob umidade e na escuridão. Após um período de 20 min de oviposição a 28°C em uma câmara úmida B.O.D. no escuro, as placas de Petri foram abertas em uma gaiola grande para liberar os mosquitos. Os ovos sincronizados de 20 min foram mantidos a 28°C e 80% de umidade relativa do ar até o fim da embriogênese. A idade atribuída à amostra foi marcada do fim do período de 1 hora de postura dos ovos como horas após oviposição (HAO). As alíquotas foram tomadas a diferentes HAO, e o desenvolvimento embrionário foi interrompido por congelamento das amostras em nitrogênio líquido. Os homogeneizados de ovos foram preparados por homogeneização

mecânica em solução tampão apropriada, centrifugados a 200 x g for 10 min e o sobrenadante foi usado nas análises.

3.3. PCR convencional do gene WSP

Para todas as novas gerações de mosquito obtidas na colônia foram feitos PCR, nos quais foram usados os *primers* :5'-ATCTTTTATAGCTGGTGGTGGT-3' para o *forward* e 5'-GGAGTGATAGGCATATCTTCAAT-3' para o *reverse*. Fragmentos amplificados com 200 pares de bases que codificam para uma Proteína de Superfície de *Wolbachia* (WSP) altamente conservada em bactérias deste gênero.

3.4. Determinação do tempo de duração da embriogênese

Para este experimento 150 ovos foram contados a partir de zero horas após a oviposição e estes foram separados de 50 em 50 ovos e colocados em diferentes placas de Petri e em seguida os ovos foram cobertos com água destilada e após 30 horas de contato com a água foram contadas larvas eclodidas de 2 em duas horas. Foi considerado o fim da embriogênese, quando 50% dos ovos postos na água eclodiram em larvas.

3.5. Obtenção de homogeneizados de ovos

Todos os homogeneizados de ovos de *Ae. fluviatilis* foram obtidos por ruptura mecânica (com auxílio de um homogeneizador manual do tipo “Potter”) sob baixa temperatura (no gelo) em microtubos de 1,5 mL na presença de um coquetel de inibidores de proteases contendo leupeptina (50 µM), pepstatina (2 µM) e PMSF (0,5 mM). A quantidade de ovos e soluções utilizadas, bem como a adição de outros tipos de inibidores está especificada na metodologia respectiva.

3.6. Quantificação de glicose

Foram homogeneizados 1000 ovos (5mg) nos tempos de 0,6,12,24 e 48 horas de desenvolvimento em 250 µL de tampão PBS 100 mM, pH 7,4. Os ovos homogeneizados foram submetidos à centrifugação a 200 X g por 10 minutos e recolheu-se 5,0 µL do sobrenadante. Avolumou-se ate 250 µL com PBS pH 7,4 e reagiu-se com 250 µL de glucox (15 mg/mL de PBS pH 7,4).

Incubou-se este meio reacional a 37°C por 10 minutos. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível-1240) a 510 nm. Calculou-se o conteúdo de glicose contida nos ovos com base em uma curva padrão de glicose. (Kit enzimático glucox para dosagem de glicose – registro MS 10231810011).

3.7. Quantificação de glicogênio

Foram homogeneizados 1000 ovos (5mg) nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas de desenvolvimento, em 250 µL de tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,8. Os homogeneizados de ovos foram submetidos à centrifugação a 200 X g por 10 minutos e 5,0 µL do sobrenadante foram recolhidos. 20 µL da enzima α-amiloglucosidase (1,0 mg/mL) foram adicionados e incubou-se este meio de reação a 40°C por 4 horas. Os tubos foram avolumados com PBS pH 7,4 até 250 µL. 250 µL de glucox (15 mg/mL de PBS pH 7,4) foram adicionados e incubados a 37°C por 10 minutos. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível-1240) a 510 nm. Calculou-se o conteúdo de glicogênio nos ovos com base em uma curva padrão de glicogênio submetida às mesmas condições do ensaio.

3.8. Quantificação de glicose-6-fosfato

20 mg de ovos sincronizados foram homogeneizados em 250 µL tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos e recolhido 10,0 µL do sobrenadante. Foram adicionados 385 µL de meio de reação contendo MgCl₂ 5 mM, NAD 2mM e glicose 6-fosfato desidrogenase 3 unidades/mL. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível 1240) a 340 nm em intervalos de 1 minuto, durante 10 minutos de reação. A velocidade da reação foi determinada pela detecção da formação de β-NADH O experimento foi realizado em triplicata para o cálculo da média ± desvio padrão da quantificação do metabólito.

3.9. Atividade de Hexoquinase

20 mg de ovos sincronizados foram homogeneizados em 250 μ L tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos e recolhido 10,0 μ L do sobrenadante. Foram adicionados 385 μ L de meio de reação contendo $MgCl_2$ 6 mM, ATP 0,5 mM e β -NAD⁺ 0,5 mM e glicose 6-fosfato desidrogenase 3 unidades/mL. A reação foi disparada com 5,0 μ L de glicose 2 mM. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível-1240) a 340nm em intervalos de 1 minuto, durante 10 minutos de reação. A atividade total HK foi determinada indiretamente pela oxidação de β -NADH, acoplada ao consumo de glicose pela glicose 6-fosfato desidrogenase. O método fundamenta-se na detecção da formação de β -NADH a 340 nm, que é proporcional à velocidade de formação de glicose 6-fosfato no meio (Galina Filho *et al.*, 1999). A atividade específica foi obtida pela razão entre a atividade total, proporcional à formação de β -NADH, pela quantidade de proteínas (em mg) na amostra.

3.10. Atividade de Piruvato Quinase

20 mg de ovos foram homogeneizados em 250 μ L de tampão TRIS-HCl 20 mM, pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos e recolhido 10,0 μ L do sobrenadante. Foram adicionados 380 μ L de meio de reação contendo ADP 0,8 mM, $MgCl_2$ 5 mM, β -NADH 0,4 mM e lactato desidrogenase 5 unidades/mL. Disparou-se a reação com 10,0 μ L de fosfoenolpiruvato (PEP) 15 mM. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível-1240) a 340nm em intervalos de 1 minuto, durante 10 minutos de reação. A atividade de PK foi medida indiretamente pela oxidação de β -NADH acoplada ao consumo de PEP pela lactato desidrogenase. O método fundamenta-se na detecção do consumo de β -NADH a 340 nm, que é proporcional à velocidade de formação de piruvato no meio (Worthington, 1998). A atividade específica foi obtida pela razão entre a atividade total, proporcional ao consumo de β -NADH, pela quantidade de proteínas (em mg) na amostra.

3.11. Clarificação da casca dos ovos de mosquito

Para preparar 100 mL da solução de clarificação usa-se 0,335g de NaClO₂, 8,7mL de ácido acético e água ultrapura o suficiente para completar 100mL. A solução foi adicionada aos ovos a serem clarificados e a mistura foi protegida da luz com papel alumínio. A solução foi trocada depois de 24 horas em contato com os ovos e então após 48 horas os ovos estavam clarificados. Os ovos clarificados foram visualizados em um estereoscópio com captação de imagem utilizando somente o campo claro.

3.12. Extração do RNA total dos embriões de *Ae. fluviatilis*

Foram pesados 20 mg de ovos de *Ae. fluviatilis*, em todos os tempos trabalhados, e congelados com nitrogênio líquido e em seguida homogeneizados usando pistilo. Após isso foi adicionado 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen) e os passos seguintes foram realizados seguindo as recomendações do fabricante. Finalmente, o precipitado referente ao RNA total obtido foi ressuspenso em 20 µL de água DEPC estéril e depois estimados a sua quantidade e qualidade por espectrofotômetro (Shimadzu U1240) a 260 nm e pela relação 260/280 nm, respectivamente.

3.13. Síntese do cDNA

Após a sua quantificação, 4 µg do RNA total foram transcritos reversamente usando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Ao fim desta etapa, o cDNA produzido foi mensurado como descrito no item 3.11.

3.14. Clonagem e sequenciamento da GSK-3 de *Ae. fluviatilis*

Foram usados primers degenerados designados por Emily-Fenouil (1998) para amplificar os cDNA da GSK-3 de embriões do mosquito *Aedes fluviatilis* com 24h de desenvolvimento, cujas sequências são 5'-GTIGCIATHAARAARGTIYTICARGAY-3' para o forward e 5'-YTTRWRYTCIRTRTARTTIGGRTTCAT-3' para o reverse. Fragmentos amplificados com 600 pares de bases que codificam para GSK-3 foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega-USA) produzindo as construções plasmidiais: pGEM-GSK-3. Os plasmídios recombinantes foram

propagados em *E. coli* Top10 através de choque térmico e em seguida selecionados em meio de cultivo Luria-Bertani (LB) com ágar e o agente selecionador Ampicilina (100 µg/mL). Todas as construções obtidas foram confirmadas por PCR, restrição enzimática e análise das sequências *in silico*. Os clones positivos da construção foram sequenciados em ambas as direções pelo menos 3 vezes usando o Genetic Analyzer 3500 (Life Technologies).

3.15. Construção da dupla fita de RNA (dsRNA)

Primeiramente, foi necessário a obtenção dos produtos de PCR para síntese de dsRNA com a utilização de *primers* para GSK3 contendo a região promotora T7. O produto de PCR do gene não relacionado (β -galactosidase de *E. coli*) foi amplificado utilizando o *primer* que reconhecia sua porção T7. Os *primers* utilizados para GSK3 foram 5'-**TAATACGACTCACTATAGGG**AGTTCCGGCTAGTACGCATCC-3' (*Forward*) e 5'-**TAATACGACTCACTATAGGG**GTGGCGATTAAGAAGGTGCTGC-3' (*reverse*) ambos com a porção do promotor T7 já inserida (em negrito). O *primer* de GSK3 gera um fragmento com 600pb. Ao final da reação o produto foi purificado a partir do gel de agarose com o auxílio do kit Invisorb Fragment Cleanup (Invitek). A síntese da dsRNA foi realizada com o kit T7 RiboMAX Express RNAi System (Promega) utilizando 1µg de *template*. Para verificação da integridade da dsRNA foi realizado uma eletroforese com gel de agarose 1,5% e quantificado em espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível-1240) a 260nm e 280nm.

3.16. Silenciamento da GSK3 por dsRNA

Mosquitos de até três dias foram injetados com o microinjetor Nanoject II-Automatic Nanoliter injector (Drummond) com uma solução de dsRNA a 2 µg/µL para GSK3 e beta-galactosidase. Os mosquitos foram injetados no tórax com 3 injeções consecutivas de 69 nL. Para confirmação do silenciamento as fêmeas injetadas com dsRNA foram utilizadas em ensaio por PCR em tempo real. Como a taxa de silenciamento foi bem alta as fêmeas não oviporaram, por

isso foi diminuída a concentração de dupla fita injetada para 1µg/µl, visto que um dos objetivos é avaliar o efeito do silenciamento nos embriões.

Para confirmação do silenciamento nos ovos, as fêmeas injetadas com dsRNA foram alimentadas com sangue após dois dias da injeção. Quatro dias após o repasto foi induzida a postura em papel filtro. As fêmeas foram deixadas por 1 hora em contato com o papel filtro e então retiradas, a partir desse tempo foram contados os tempos de 48 horas e estes ovos nestes tempos foram coletados separadamente e armazenados no freezer a -70° C até a realização da extração de RNA e síntese de cDNA.

3.17. Quantificação relativa de *Wolbachia* por PCR em tempo real (qPCR)

A quantificação relativa do gene WSP de *Wolbachia* foi realizada utilizando os mesmos *primers* acima para o PCR convencional do gene WSP (WSPqPCR), enquanto os seguintes *primers* foram usados para a amplificação de um fragmento de 80 pb a partir do gene de referência do mosquito actin-1 gene: forward: 5'- ACCGAGCGTGGCTACTCCTT-3'; e reverse: 5'- AGCGACGTA GCACAGCTTCTC - 3'. Diluições seriadas de cDNA foram usadas para a preparação da curva de calibração. Eficiências de reação entre 85 e 100% foram determinadas a partir de curvas de calibração para cada conjunto de *primers* em reações de 10 uL. Ovos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a oviposição foram utilizados para a quantificação relativa de *Wolbachia*. Isso foi feito nos ovos normais e silenciados.

3.18. Determinação da largura do abdômen de mosquitos adultos

As fêmeas de 3 dias de idade foram injetadas com a dupla fita não relacionada (Bgal) e a dupla fita para GSK. Após dois dias ambos os grupos foram alimentados com sangue. Os tamanhos dos de fêmeas silenciadas e não silenciadas para GSK foram avaliados 3 dias após a alimentação com sangue (estas medidas foram obtidas com o programa Axio Visão Rel.4.8 Zeiss). As medições foram efetuadas na região central do abdome. Foi medido os abdomens de mosquitos injetados com dsBgal e dsGSK tanto na maior concentração de dupla fita como na menor concentração de dupla fita utilizadas para o silenciamento.

3.19. Viabilidade de ovos de fêmeas silenciadas

Para a realização do experimento fêmeas silenciadas foram induzidas a ovipor em placas de Petri 4 dias após o repasto sanguíneo. A placa de Petri foi forrada com papel filtro umedecido. 150 ovos foram contados a partir de zero horas após a oviposição e estes foram separados em 50 e 50 ovos em diferentes posições de placas de Petri e, em seguida, cobertas com água destilada, 24 horas após o término da duração do tempo de embriogênese (48 horas) contou-se o número total de larvas eclodidas.

4. Resultados

4.1. Análise do tempo de embriogênese nos mosquitos na presença ou ausência de *Wolbachia*

O tempo de duração da embriogênese do *Aedes fluviatilis* foi avaliado considerando, como fim da embriogênese, quando 50% das larvas estavam eclodidas. Dessa forma, foi realizada a coleta dos ovos em diferentes tempos, conforme mostrado na figura 11. Estes foram observados, em estereomicroscópio, para contagem dos que eclodiram. Foi observado que não há diferença estatística entre os mosquitos com e sem *Wolbachia*.

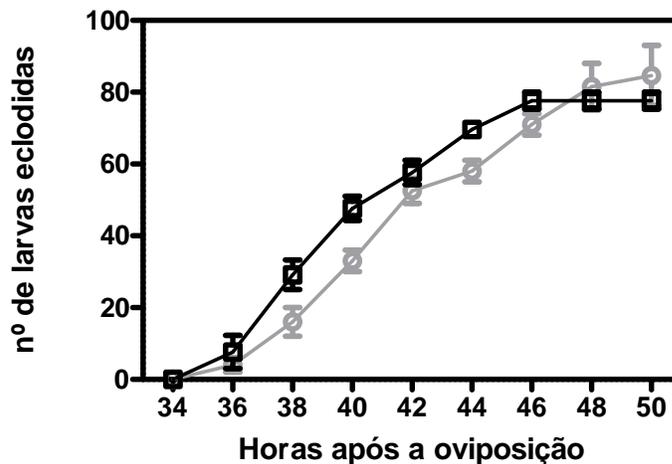


Figura 11. Taxa de eclosão de ovos de *Aedes fluviatilis* na presença (wol+) ou ausência (wol-) de *Wolbachia*. Larvas eclodidas foram contadas de duas em duas horas até que 50% dos ovos terminassem a eclosão. A linha preta refere-se aos embriões wol+ e a linha cinza aos embriões wol-.

5.2. Desenvolvimento embrionário do *Aedes fluviatilis*

Com intuito de monitorar os eventos morfológicos durante a embriogênese foi avaliado o desenvolvimento embrionário do mosquito *Aedes fluviatilis* nos diferentes tempos da sua embriogênese. Foi observado que o embrião com 6 horas de desenvolvimento encontra-se na fase de blastoderma sincicial, apresentando vários núcleos espalhados pelo ovo (figura 12a). Ao analisar o embrião de 12 horas (12h) de desenvolvimento observa-se o início da extensão da banda germinal e da segmentação (figura 12b). O embrião com 24 horas (24h) de desenvolvimento observa-se que atingiu a extensão máxima

da banda germinal e já inicia o processo de retração da mesma (figura 12c). Para o embrião com 48 horas (48h) de desenvolvimento observa-se que o processo de segmentação da larva está completo, pronto para eclodir, etapa considerada como ponto final da embriogênese (figura 12d).

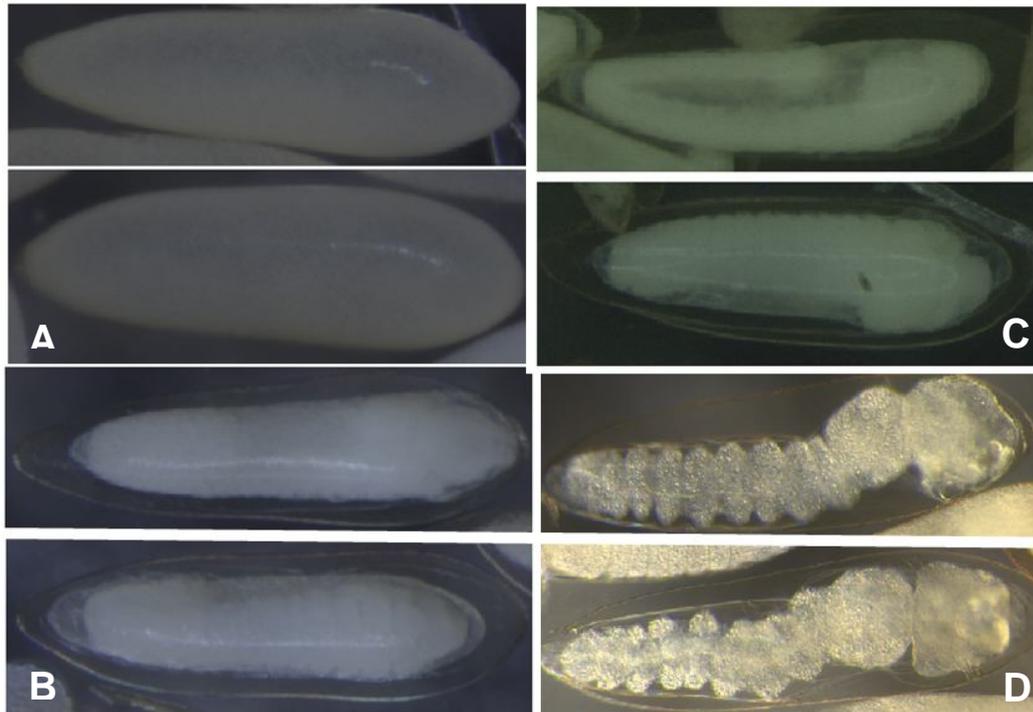


Figura 12. Desenvolvimento embrionário de *Aedes fluviatilis*. Ovos obtidos através de oviposição sincronizada foram fixados e clarificados de acordo com Trpis (1970). Microscopia óptica de campo claro (161 X) A) embrião com 6 horas de desenvolvimento, B) embrião com 12 horas de desenvolvimento, C) embrião com 24 horas de desenvolvimento, D) embrião com 48 horas de desenvolvimento.

5.3. Destino preferencial da glicose 6-fosfato durante a embriogênese de *Aedes fluviatilis* wol+ e wol-.

Foi avaliado o conteúdo de glicose total nos embriões wol+ e wol- de 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a oviposição. Foi observado que houve um pico em 24 horas de desenvolvimento com posterior diminuição até o fim da embriogênese. No entanto, não foi observada diferença estatística neste conteúdo comparando os embriões wol+ com wol- (figura 13).

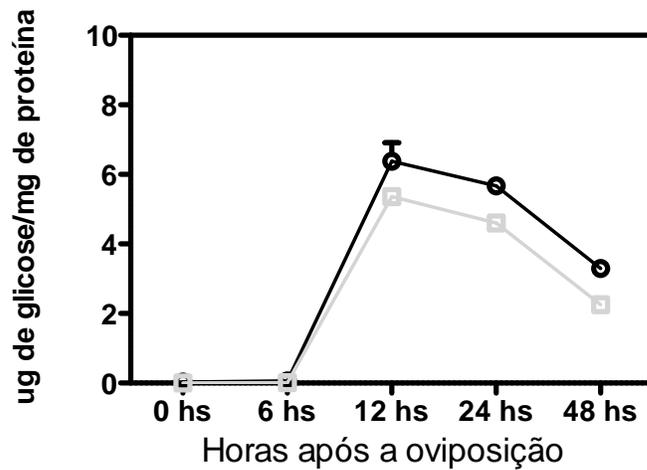


Figura 13. Nível de glicose nos embriões wol+ e wol-. Os ovos foram coletados e macerados nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a oviposição. A glicose foi quantificada usando um kit comercial (GLUCOX), como descrito em materiais e métodos. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Foi realizado teste two-way ANOVA com intervalos de confiança de 95%. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A linha preta refere-se aos embriões wol+ e a linha cinza aos embriões wol-.

A glicose ao entrar na célula é imediatamente fosforilada. Inicialmente avaliou-se a atividade da enzima que fosforila a glicose, a hexoquinase (HK). Foi observada uma maior atividade desta enzima nos embriões com 6 horas de desenvolvimento. Em seguida, esta atividade começa a diminuir até 24 horas, momento em que volta a subir apresentando um novo pico, com menor intensidade, em 48 horas (figura 14). Além disso, os embriões wol+ de 6 horas de desenvolvimento mostraram uma maior atividade de HK quando comparados aos embriões wol-.

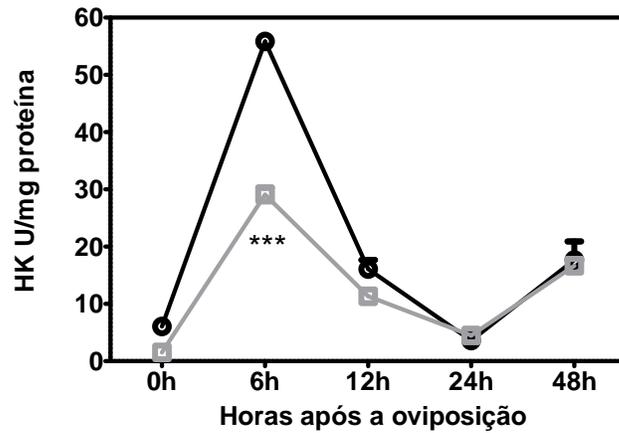


Figura 14. Perfil da atividade da enzima hexoquinase (HK) durante a embriogênese de *Ae. fluviatilis* wol+ e wol-. Foram usados embriões de 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a oviposição. A atividade da HK foi medida de acordo com o consumo de glicose 6-fosfato pela glicose 6-fosfato desidrogenase no meio. A produção de NADH foi quantificada a 340nm em um espectrofotômetro. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Foi realizado teste two-way ANOVA com intervalos de confiança de 95%. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A linha preta refere-se aos embriões wol+ e a linha cinza aos embriões wol-.

A quantificação de glicose-6-fosfato segue um perfil muito similar ao descrito para atividade de HK. Foi observado uma maior quantidade de glicose-6-fosfato em 6 horas de desenvolvimento, com posterior diminuição em 48 horas. Os embriões wol+ de 6 horas de desenvolvimento também mostraram uma maior quantidade de glicose-6-fosfato quando comparados aos embriões wol- (figura 15).

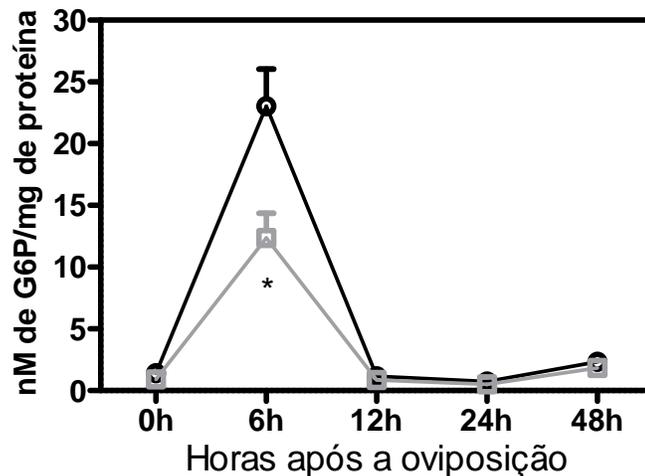


Figura 15. Conteúdo de glicose-6-fosfato nos embriões wol+ e wol-. O conteúdo total de glicose-6-fosfato foi avaliado nos embriões de 0, 6, 12, 24 e 48 horas de desenvolvimento embrionário. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Foi realizado teste two-way ANOVA com intervalos de confiança de 95%. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A linha preta refere-se aos embriões wol+ e a linha cinza aos embriões wol-.

A glicose ao ser fosforilada no carbono seis pode seguir três caminhos dentro da célula (Norman *et al.*,2001). De posse desta informação foi avaliado se a glicose que está sendo fosforilada tem preferência pela via glicolítica. Para isso foi quantificada a atividade da última enzima desta via, a piruvato quinase (PK). Foi mostrado que a atividade da PK segue um perfil semelhante ao já evidenciado para atividade da HK durante a embriogênese. No entanto, o máximo de atividade da PK é, em torno 12 U/mg de proteína, já a HK tem seu máximo em cerca de 55 U/mg de proteína (figura 16). Com isso pode-se sugerir que parte da glicose fosforilada segue o fluxo glicolítico. Ao comparar os ovos wol+ e wol-, observou-se que em 12 e 48 horas os ovos wol+ possuem uma maior atividade de PK em relação aos wol-.

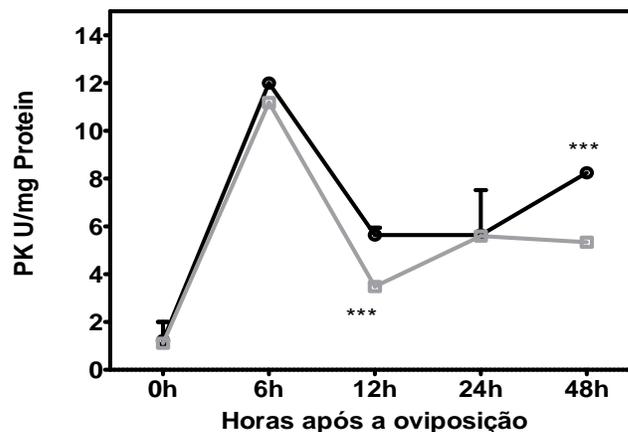


Figura 16. Atividade de piruvato quinase (PK) durante a embriogênese de *Ae. fluviatilis* wol+ e wol-. Foram usados embriões de 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a oviposição. A atividade da PK foi medida de acordo com o consumo de piruvato pela lactato desidrogenase no meio. A produção de NADH foi quantificada a 340nm em um espectrofotômetro. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Foi realizado teste two-way ANOVA com intervalos de confiança de 95%. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A linha preta refere-se aos embriões wol+ e a linha cinza aos embriões wol-.

Como relatado anteriormente, somente uma parte da glicose-6-fosfato está seguindo a via glicolítica. Dessa forma, foi avaliado qual o destino da glicose-6-fosfato que não sendo direcionada para esta via. Para isso foi monitorada a síntese de reserva energética (glicogênio) durante a embriogênese. Como pode ser verificada a concentração de glicogênio é

baixa durante o início da embriogênese (tempos de 0 e 6 horas), mas no tempo de 12 horas observa-se um aumento desta concentração, alcançando um pico máximo no tempo de 24 horas. A quantidade de glicogênio decai, retornando a concentração basal, no tempo de 48 horas. Ao comparar os embriões wol+ e wol- observa-se que nos tempos de 12 e 24 horas a concentração de glicogênio é o dobro em wol+ em relação aos wol- (figura 17).

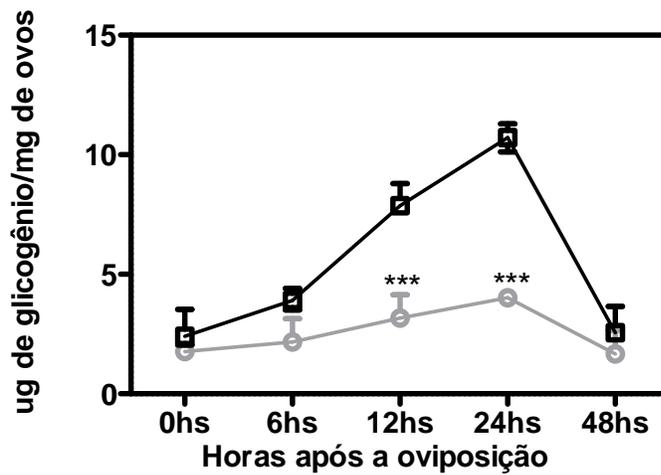


Figura 17. Concentração de glicogênio nos embriões de *Ae. fluviatilis* wol+ e wol-. Os embriões de 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a oviposição foram homogeneizados e incubados com a enzima amiloglucosidase por 30 minutos a 45⁰C e a concentração de glicose foi determinada utilizando o kit comercial Glucox, como descrito em materiais e métodos. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Foi realizado teste two-way ANOVA com intervalos de confiança de 95%. Um valor de p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A linha preta refere-se aos embriões wol+ e a linha cinza aos embriões wol-.

Como observado na figura 17, o conteúdo total de glicogênio é, significativamente, maior em embriões wol+ quando comparados com os embriões wol-. No sentido de avaliar a importância do metabolismo do glicogênio tanto para os embriões quanto para a simbiose, foi focado os

próximos passos no estudo da GSK-3, enzima reguladora da glicogênio sintase.

4.4. Clonagem e sequenciamento da enzima GSK-3 de *Aedes fluviatilis*.

A clonagem foi realizada conforme o item 3.13. A figura 18 mostra a confirmação dos clones feita através de uma reação de digestão usando a enzima de restrição NdeI e EcoRI em que na reação as enzimas cortam exatamente o inserto. A reação ocorre adicionando o DNA de interesse na presença da enzima de restrição a 37°C. Nesta condição a enzima cliva o DNA em sítios de restrição específicos. O fragmento clonado apresenta cerca de 700 pb (figura 18).

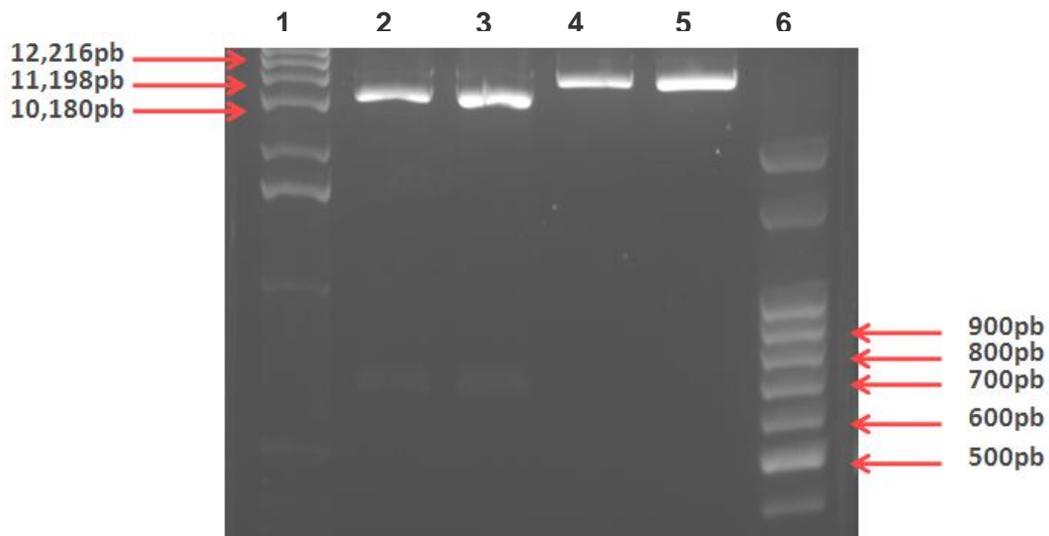


Figura 18. Reação de clivagem da construção plasmidial PGEM-GSK para confirmação da clonagem. 1) marcador de peso molecular de 1 Kb; 2) reação de digestão da colônia 1 com a enzima de restrição NdeI; 3) reação de digestão da colônia 2 com a enzima de restrição NdeI; 4) reação de digestão da colônia 1 com a enzima de restrição EcoRI; 5) reação de digestão da colônia 2 com a enzima de restrição EcoRI e 6) marcador de peso molecular de 100 pb.

A confirmação da clonagem também foi feita através da técnica de PCR utilizando duas colônias brancas (Figura 18 – 2 e 3) e uma azul (Figura 18 – 4)

com *primers* degenerados descritos no item 3.13. Os primers amplificam uma região com, aproximadamente, 700 pb (figura 19).

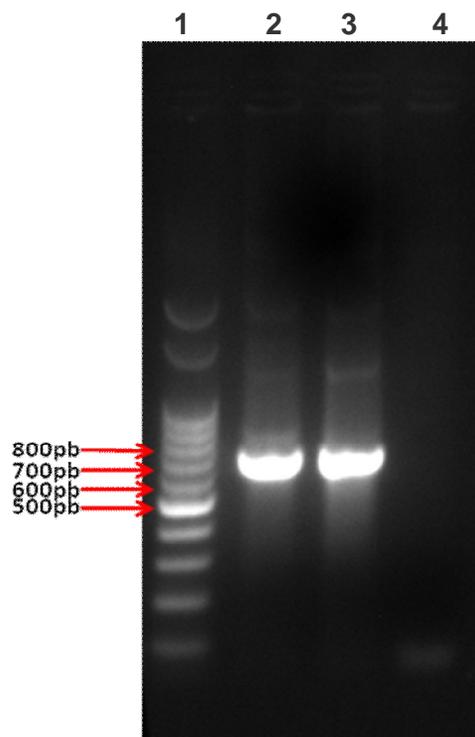


Figura 19. Confirmação da construção plasmidial PGEM-GSK usando os *primers* degenerados. 1) marcador de peso molecular de 1 Kb; 2 e 3) RT-PCR de duas colônias brancas e 4) RT-PCR de uma colônia azul (4) utilizando os primers degenerados descritos no item 3.13.

4.5. Desenho de *primers* para qPCR e silenciamento gênico.

Com a sequência de 619 pb obtida no sequenciamento foram desenhados *primers* específicos, utilizando o programa Primer 3 versão 4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000), para os ensaios de qPCR e silenciamento gênico. Os primers para qPCR amplificam um fragmento de 74 pb (figura 20). Para a síntese de dsRNA foi necessário realizar um RT-PCR para amplificação do fragmento de GSK-3 contendo uma cauda do promotor T7 (conforme descrito

em materiais e métodos). O *primer* utilizado para a síntese de dsGSK-3 amplifica um fragmento de 546 pb (figura 20).

```
TGACTTCCCTCTAGTTGGGGTTCATTTCCCTTGATCTGTTCCCGGGTCCGCGGTTCCGAGCACTTTCATGATT  
TCTACCAGCTGATCGACGCCAGAGTCGCCGGGGAAGATCGGCTGTCCCAGGAGCAGTTCCGGCTAGTACGCCA  
TCCCGGGCTCCAGACGTCGATCTTCGTTGGTATAGTTTATGGCGCCAAATATCAACTCCGGTGCCTCGGTAGT  
ATCGCGAGCAGATGTACGACACATTCGGTTCCCCATGCAGAAGTTGCTTGGCGCTGCCAAAATCGCACAGC  
TTCAGTACGGCCGTTTCCGAAATCCAGCAGCAGGTTCTGGGGTTTGTATGTCGCGATGGCAGATACCGAGTGA  
GTGGTTGTAAGCGAGACTTCTGAACAGTTGGTACATGTAAAGCCTGATGAAATTGATTGGTATCGTTTGT  
TGTTTTTAGCATAGTAACGAGCCACTTTGTAAACGGTTTCTGGAATATATTCGAGCACTAGGTTGAGATAA  
ACTTCGTCTTTCTTATCACCCTGGAGTAGAAGAAATATTTAGTTTAAACGATATTACAATGTTCTAGCCG  
TCGCATTATCTGTAGTTCTCGGTTCTTAAATCTTTTATCTTSCAGCACCTTCTTAATCGCCAC
```

Figura 20. Sequência parcial de nucleotídeos do cDNA de GSK-3 de *Ae. fluviatilis* utilizada para desenho de primers para qPCR e dsGSK-3. Sequência de nucleotídeos utilizada para o desenho de primers específicos para qPCR (amarelo) e Sequência de nucleotídeos utilizada para o desenho de primers para síntese da dsRNA (verde).

4.6. Silenciamento gênico da enzima GSK3 e seu efeito na morfologia dos mosquitos adultos de *Aedes fluviatilis*

Com objetivo de avaliar o metabolismo de glicogênio foi silenciada a GSK em fêmeas adultas de *Ae. fluviatilis*. Inicialmente foi injetada no tórax de fêmeas de até três dias uma concentração de 400ng de dsRNA (conforme descrito no item 3.15). Dois dias após a microinjeção as fêmeas foram capturadas para extração de RNA e, concomitante, ensaio de qPCR para confirmação do silenciamento. Foi observado um silenciamento de, aproximadamente, 95% (figura 21).

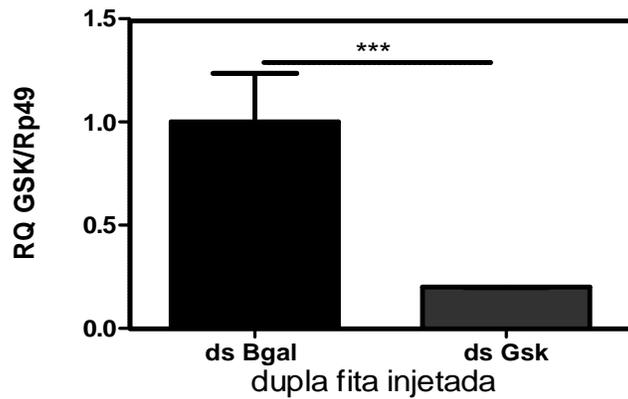


Figura 21. Expressão relativa do gene da GSK-3 por qPCR em fêmeas adultas de *Ae. fluviatilis* por injeção de: dsBgal (dupla fita não relacionada) ou dsGsk (dupla fita específica para GSK-3). As fêmeas foram injetadas com um total de 400 ng de dsRNA e, após 2 dias, submetidas a extração de RNA e ensaio de qPCR para confirmação do silenciamento, conforme descrito em materiais e métodos. O gene ribossomal rp49 foi utilizado como controle endógeno. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Os insetos injetados com dsGsk foram significativamente diferentes do grupo injetado com dsBgal * test T ($p < 0,05$).

Com esta alta taxa de silenciamento começou a monitorar o perfil de oviposição destes mosquitos. Observou-se que as fêmeas injetadas com dsGsk não conseguiam ovipor (dados não mostrados). Além disso, dois dias após a alimentação sanguínea as fêmeas injetadas com dsBgal apresentaram uma distensão no abdômen característica do crescimento do ovário e o mesmo não foi observado nas fêmeas injetadas com dsGSK (figura 22 A). Dessa forma, foi medida a largura do abdômen dos mosquitos para fins quantitativos de comparação e observou-se que os mosquitos injetados com dsGSK apresentaram uma redução de cerca de 97% na largura do abdômen em comparação aos injetados com a dupla fita não relacionada (figura 22 B).

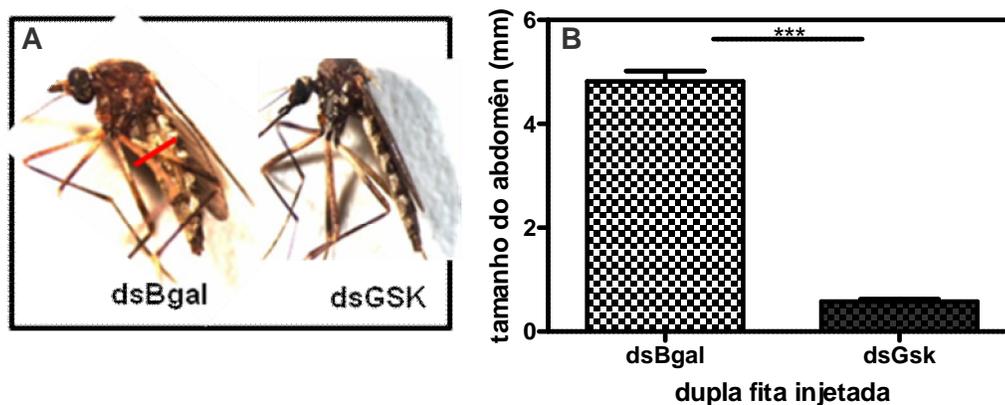


Figura 22. Aspecto do abdômen após silenciamento gênico de GSK-3 em fêmeas adultas de *Ae. fluviatilis*. A) A medida da largura do abdômen foi realizada na região da linha vermelha. B) A largura do abdômen foi medida com a ajuda do programa Axio Vision da Zeiss e foi feita em estereoscópio. Taxa de silenciamento de, aproximadamente, 95%.

Com o objetivo de avaliar melhor a formação dos embriões foram realizados ensaios utilizando menores concentrações de dsRNA. Para isso foi utilizada uma concentração de 200ng de dsRNA. A partir desta quantidade de dupla fita observou-se uma taxa de silenciamento de, aproximadamente, 30% (figura 23).

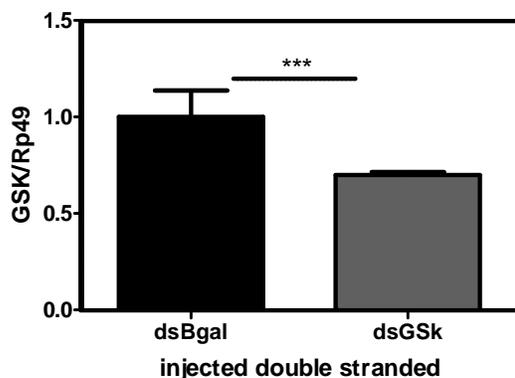


Figura 23. Expressão relativa do gene da GSK-3 por qPCR em fêmeas adultas de *Ae. fluviatilis* por injeção de: dsBgal (dupla fita não relacionada) ou dsGsk (dupla fita específica para GSK-3). As fêmeas foram injetadas com 200 ng de dsRNA e, após 2 dias, submetidas a extração de RNA e ensaio de qPCR para confirmação do silenciamento, conforme descrito em materiais e métodos. O gene ribossomal rp49 foi utilizado como controle endógeno. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Os insetos injetados com dsGsk foram significativamente diferentes do grupo injetado com dsBgal * test T ($p < 0,05$).

Utilizando esta mesma concentração de dsRNA (1 μ g) foram avaliados os parâmetros já mencionados para a concentração de 2 μ g de dsRNA. O fenótipo referente à largura do abdômen foi realizado através de medições na

região central do abdômen como mostrado pela linha vermelha (figura 24 A). Em relação à largura do abdômen foram utilizadas fêmeas de dois dias após a alimentação. No entanto, não foram observadas diferenças expressivas entre os mosquitos injetados com dsBgal quando comparados com os mosquitos injetados com dsGSK (figura 24 B).

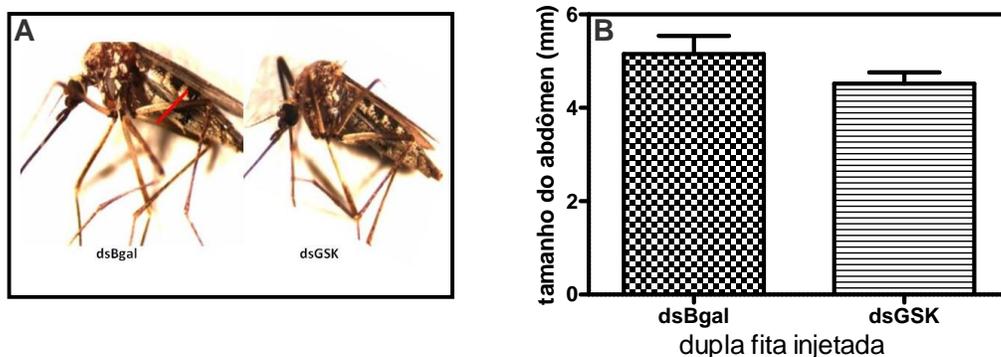


Figura 24. Aspecto do abdômen após silenciamento gênico de GSK-3 em fêmeas adultas de *Ae. fluviatilis*. A) A medida da largura do abdômen foi realizada na região da linha vermelha. B) A largura do abdômen foi medida com a ajuda do programa Axio Vision da Zeiss e foi feita em estereoscópio. Taxa de silenciamento de, aproximadamente, 30%.

4.7. Efeito do silenciamento gênico da GSK-3 em embriões de *Ae. fluviatilis*

Como mostrado anteriormente, ao utilizar uma menor concentração de dsRNA foi possível observar uma menor taxa de silenciamento. A viabilidade das fêmeas injetadas foi maior, havendo uma maior taxa de oviposição e, dessa forma, permitindo a análise de alguns parâmetros nestes embriões silenciados. Inicialmente, monitorou a quantidade de glicogênio produzida nos diferentes tempos do desenvolvimento embrionário (0, 6, 12, 24 e 48 horas após a oviposição). De acordo com a figura 25 pode-se sugerir que a GSK é capaz de regular a síntese de glicogênio nos embriões, visto que, em todos os tempos avaliados, foi observado que a concentração de glicogênio é bem superior (2X) quando se compara os embriões obtidos de fêmeas injetadas com dsGSK em relação aos embriões de fêmeas injetadas com dsBGal. O

silenciamento nos embriões foi confirmado utilizando ovos com 48 horas de desenvolvimento (figura 27).

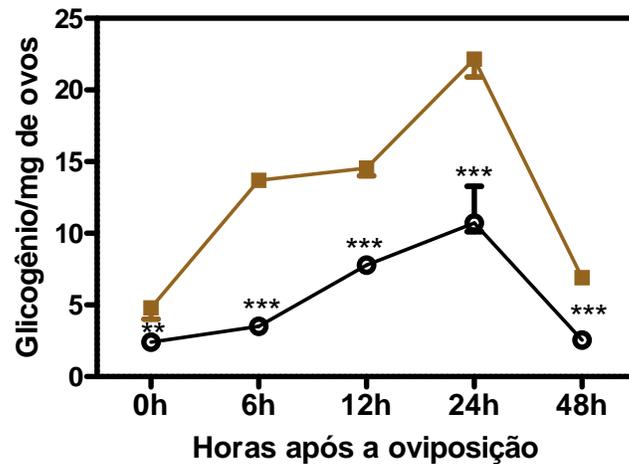


Figura 25. Concentração de glicogênio nos embriões de *Ae. fluviatilis* silenciados (■) e não silenciados (○) para GSK. Os ovos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a oviposição foram homogeneizados e incubados com a enzima amiloglucosidase por 30 minutos a 45⁰C. A concentração de glicose foi determinada com o kit comercial Glucox, conforme descrito em materiais e métodos. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Foi realizado teste two-way ANOVA com intervalos de confiança de 95%. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Um outro parâmetro analisado foi o conteúdo de proteína total, visto que a GSK -3 regula um fator que estimula a síntese proteica. Com isso foi visto que o silenciamento desta enzima é capaz de diminuir a concentração de proteína total. No entanto, não foram observadas variações significativas durante a embriogênese (figura 26).

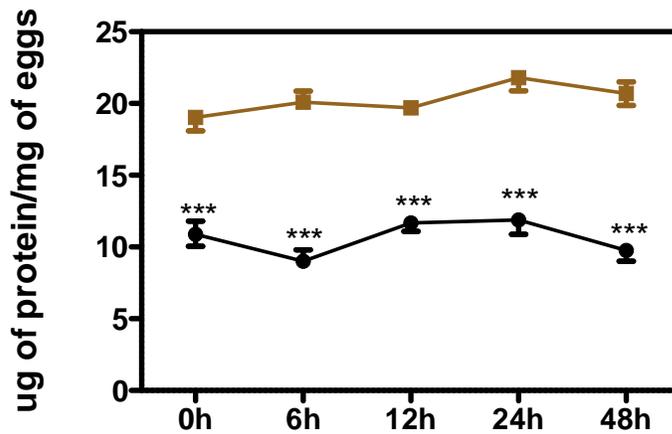


Figura 26. Conteúdo de proteína total nos embriões de *Ae. fluviatilis* silenciados (■) e não silenciados (○) para GSK. Foram utilizados os ovos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a oviposição. O conteúdo de proteína total foi feito pelo método de Bradford (1976). Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Foi realizado teste two-way ANOVA com intervalos de confiança de 95%. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

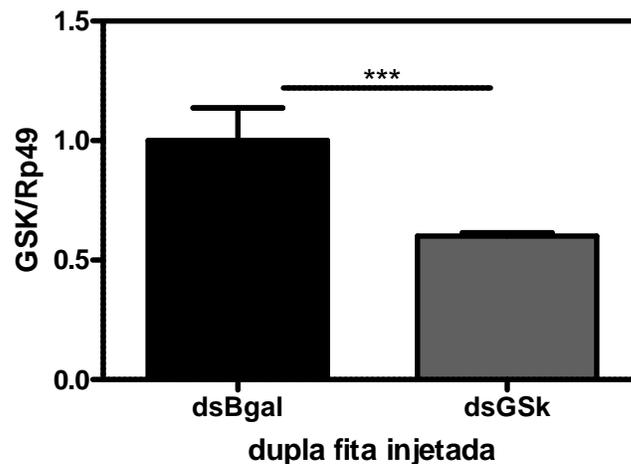


Figura 27. Expressão relativa do gene da GSK-3 por qPCR em embriões de 48 h após injeção de fêmeas de *Ae. fluviatilis* com: dsBgal (dupla fita não relacionada) ou dsGsk (dupla fita específica para GSK-3). Foram coletados ovos de 48 horas de desenvolvimento para a confirmação do silenciamento por qPCR. O gene ribossomal rp49 foi utilizado como controle endógeno. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Os ovos obtidos de fêmeas injetadas com dsGsk foram significativamente diferentes do grupo injetado com dsBgal * test T ($p < 0,05$).

Na figura 28 é mostrada a expressão relativa do gene WSP como forma de monitorar a taxa de *Wolbachia* durante a embriogênese de ovos silenciados e não silenciados para GSK-3. Ao comparar os embriões de fêmeas injetadas com dsGSK com aqueles de fêmeas injetadas com dsBgal observou-se que todos os embriões silenciados para GSK mostraram o dobro de *Wolbachia* em

relação aos embriões de fêmeas injetadas para dsBgal, exceto o tempo de 0h do desenvolvimento embrionário.

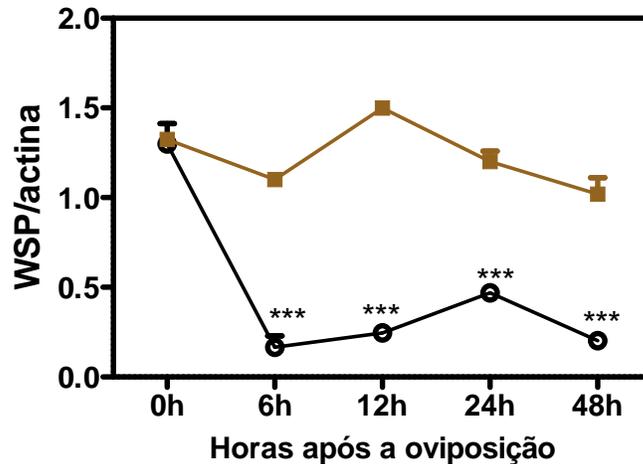


Figura 28. Expressão relativa de WSP para monitoramento da presença de *Wolbachia* em embriões silenciados (■) e não silenciados (○) para GSK-3. Foi feito qPCR de ovos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas silenciados e não silenciados para GSK. O gene actina foi utilizado como controle endógeno. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Foi realizado teste two-way ANOVA com intervalos de confiança de 95%. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Para avaliar o efeito direto da GSK sobre a embriogênese de *Aedes fluviatilis* foi quantificado a viabilidade dos ovos silenciados e a morfologia dos mesmos. A viabilidade foi avaliada quantificando-se o número total de larvas eclodidas 24 horas após o término do tempo de embriogênese. Foi visto que a quantidade de larvas eclodidas diminuiu aproximadamente 70% no grupo silenciado para GSK (Figura 29). Já com relação à morfologia foram avaliados embriões de 24 e 48 horas de desenvolvimento. Ao comparar os embriões de fêmeas injetadas com dsGSK com os embriões de fêmeas injetadas com dsBgal constatou-se que o silenciamento dos embriões bloqueou o desenvolvimento em 50% dos embriões avaliados. Além disso, em relação ao restante dos embriões o silenciamento da GSK-3 acarretou um retardo no seu desenvolvimento quando comparados aos embriões de fêmeas injetadas com a dupla fita não relacionada (Figura 30).

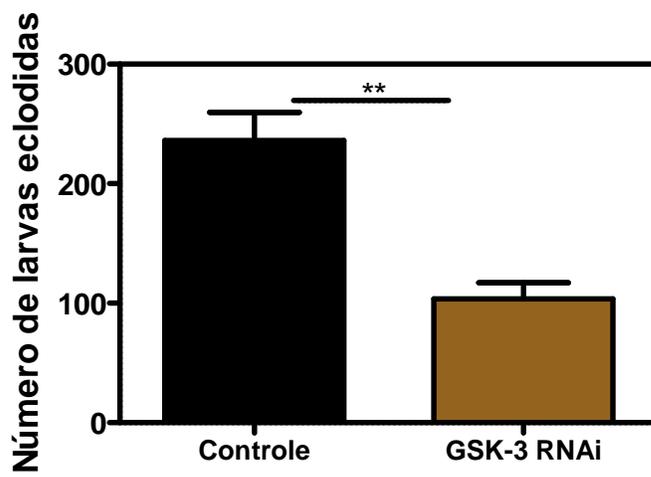


Figura 29. Viabilidade dos embriões silenciados para GSK. Larvas totais foram contadas 24 horas após o término do tempo de embriogênese. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Os insetos injetados com dsGsk foram significativamente diferentes do grupo injetado com dsBgal * test T ($p < 0,05$).

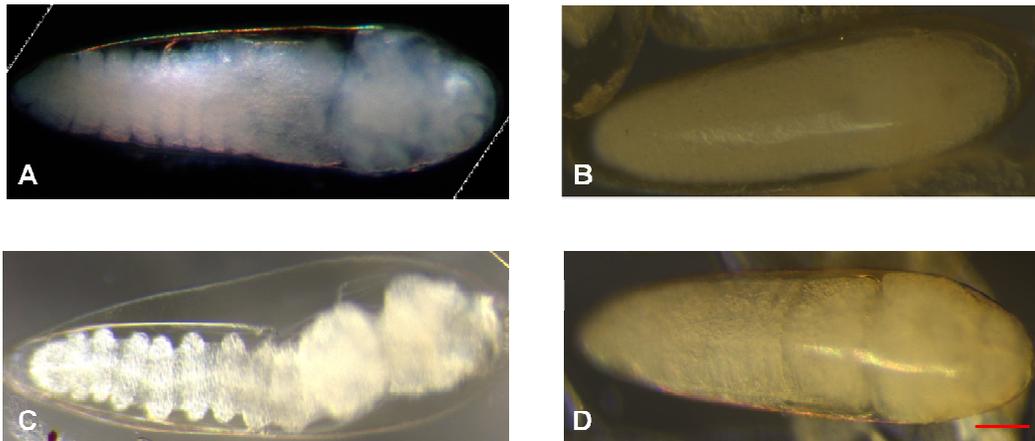


Figura 30. Fenótipo dos embriões de *Ae. fluviatilis* gerado pelo silenciamento de GSK. Embriões de 24 horas (A) e 48 horas (C) de fêmeas injetadas com dsBgal; embriões de 24 horas (B) e 48 horas (D) de fêmeas injetadas com dsGSK. Todos os embriões foram fixados e clarificados segundo Trpis. Microscopia óptica de campo claro (161 X).

4.8. Efeito da *Wolbachia* em embriões de *Aedes aegypti*.

Visto que a *Wolbachia* parece modular o metabolismo do embrião que a tem como hospedeiro natural, foi avaliado como esta bactéria se comporta com um hospedeiro não natural, o *Aedes aegypti*. Com isso foi avaliada a concentração de glicogênio durante a embriogênese de *Aedes aegypti* natural e infectado com uma cepa de *Wolbachia* denominada wmel. Foi visto que na presença da bactéria os embriões apresentam um perfil inverso de concentração de glicogênio quando comparados com os embriões sem a bactéria (figura 31).

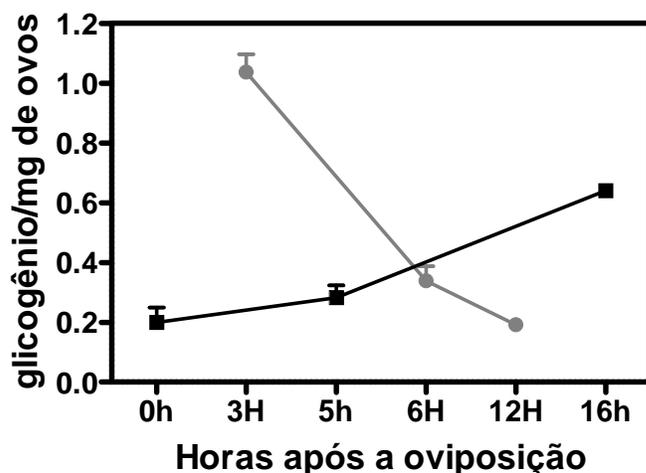


Figura 31. Concentração de glicogênio em embriões de *Aedes aegypti* na ausência (■) e presença (●) de *Wolbachia* da cepa wmel. Os ovos de 0, 3, 5, 6, 12 e 16 h após a oviposição foram homogeneizados e incubados com a enzima amiloglucosidase por 30 minutos a 45⁰C. A concentração de glicose foi determinada com o kit comercial Glucox, conforme descrito em materiais e métodos. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

5. Discussão

Bactérias do gênero *Wolbachia* constituem um grupo comum de microorganismos intracelulares obrigatórios, maternalmente herdados que se encontra em simbiose e com ampla distribuição nos artrópodes. Em mais de um milhão de espécies de insetos, aracnídeos, crustáceos, e em alguns nematódeos, esses parasitas apresentam preferência por células do tecido gonadal e atuam diretamente na manipulação do ciclo reprodutivo de seus hospedeiros causando drásticas desordens, entre elas a incompatibilidade citoplasmática e a indução da partenogênese. Tais alterações garantem à bactéria uma incrível habilidade em se espalhar rapidamente pelas populações (Werren, 2008).

Atualmente trabalhos têm mostrado que a *Wolbachia* pode ser uma ótima forma de controle biológico contra a dengue (Walker *et al.*, 2011) e de outras arboviroses transmitidas por insetos (Moreira *et al.*, 2009; Brownstein *et al.*, 2003; Cook *et al.*, 2008; Rasgon *et al.*, 2003; Sinkins e O'Neill, 2000). Estudos relacionados à introdução artificial de *Wolbachia* em *Ae. aegypti* mostraram que esta bactéria pode afetar o desenvolvimento do embrião (McMeniman, 2011). No presente trabalho foi observado que a infecção por *Wolbachia* da cepa wmel em *Ae. aegypti* provocou uma inversão na concentração de glicogênio durante a embriogênese. Além disso, foi observado que no embrião normal há um aumento gradativo de glicogênio, sendo que no embrião na presença de *Wolbachia* há um decréscimo gradativo desta concentração (Figura 31). Em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo, demonstraram que durante a embriogênese do *Ae. aegypti* a retração da banda germinal está correlacionada com o aumento da glicólise (Vital *et al.*, 2010). Em *Ae. fluviatilis* foi observado que a glicólise, avaliada através da atividade das enzimas hexoquinase e piruvato quinase, apresenta maior atividade em 6 horas de desenvolvimento embrionário, período que coincide com a formação do blastoderma sincicial (Figura 12). Este perfil foi observado tanto nos embriões na presença quanto na ausência de *Wolbachia* (Figura 14 e 16).

Durante a embriogênese do carrapato *Rhipicephalus Boophilus microplus* ocorre o consumo total de glicogênio nos primeiros dias de desenvolvimento até a formação do blastoderma sincicial, no quinto dia. Os mesmos autores verificaram que após o quinto dia de desenvolvimento ocorre

intensa gliconeogênese provocando acúmulo de glicose e de glicogênio, estendendo-se até a eclosão das larvas (Moraes *et al.*, 2006). Esse evento foi intrigante visto que o embrião, em um sistema fechado, é capaz de ressintetizar glicose e ainda acumular glicogênio, provavelmente a partir da gliconeogênese (Moraes *et al.*, 2006). Situação similar foi observada durante a embriogênese de *Ae. fluviatilis*. Este modelo possui sua embriogênese com duração de 48 horas (Figura 11) e, foi mostrado que no início da embriogênese (6 e 12 h) há uma menor concentração de glicogênio quando comparado com 24 h de desenvolvimento embrionário (Figura 17). Ainda em relação à concentração de glicogênio nos embriões, o resultado mais intrigante se dá quando compara embriões *wol+* e *wol-*, visto que os embriões *wol+* apresentam o dobro de concentração de glicogênio nos tempos de 12 e 24 horas de embriogênese (Figura 17). Frente a este resultado voltou o estudo para o entendimento do metabolismo de glicogênio através de avaliações nos embriões silenciados para a enzima GSK3. Logullo *et al.*, (2009) mostraram que a GSK3 é a enzima reguladora da síntese de glicogênio na embriogênese do carrapato *R. microplus*, já Vital e Cols. (2010) mostraram que a análise do perfil da atividade e transcrição de GSK3 durante a embriogênese de *Ae. aegypti* revelou que existe o mesmo padrão de distribuição nesta fase do desenvolvimento, sendo contrário ao verificado anteriormente para carrapato (Vital *et al.*, 2010; Logullo *et al.* 2009).

O primeiro indicativo demonstrando que o controle da síntese de glicogênio é mediado pela GSK-3 em mosquitos foi descrito por Vital *et al.*, (2010). É sabido que o decréscimo na atividade de GSK3 coincide com o aumento da concentração de glicogênio durante a embriogênese do *Ae. Aegypti*, sugerindo que esta enzima esteja envolvida no controle do metabolismo de glicogênio durante a embriogênese deste mosquito e que haja um controle por regulação de atividade enzimática (Vital *et al.*, 2010). Dessa forma, para uma melhor compreensão do controle da síntese de glicogênio pela GSK-3 no *Ae. fluviatilis* utilizou a técnica de silenciamento gênico mediado por RNA. Silenciamento gênico pela utilização de RNA de interferência (RNAi), um fenômeno evolutivamente conservado, disparado pela presença de dsRNAs, é uma poderosa ferramenta para o estudo da função de genes em diferentes organismos (Fire *et al.*, 1998). A introdução de dsRNA induz

silenciamento gênico específico em organismos vivos produzindo um bloqueio na produção da proteína correspondente (Hammond *et al.*, 2001). Como consequência, RNAi mediado por dsRNA tem emergido como uma das técnicas mais promissoras para estudo da função gênica em diversos sistemas experimentais, particularmente em organismos não-modelos onde outros métodos de investigação são frequentemente limitados (Fraser *et al.*, 2000; Gonczy *et al.*, 2000). Muito deste sucesso deriva do fato de a técnica constituir-se em um método simples, conveniente e barato de produzir e introduzir dsRNA dentro dos organismos. RNAi tem subsequentemente sido adaptado para uso em insetos, incluindo *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta*, *Periplaneta americana*, *Oncopeltus fasciatus* (Blandin *et al.*, 2002; Hughes & Kaufman, 2000; Kennerdell & Carthew, 1998; Marie *et al.*, 2000; St. Johnston, 2002). A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo de silenciamento gênico conservado em plantas e animais (Hannon, 2002). Para trabalhar com a técnica de RNAi faz-se necessário ter como base uma sequência bem específica da proteína a ser trabalhada, pois existe a possibilidade de silenciar outras proteínas similares com a proteína alvo (Elbashir *et al.*, 2001). O mosquito *Ae. fluviatilis* não possui seu genoma sequenciado, neste contexto foi necessário clonar e sequenciar a enzima alvo. Para a clonagem foram usados *primers* degenerados descritos por Emily-Fenouil, (1998) que amplificaram a GSK de *Ae. fluviatilis* a partir de cDNA de ovos de 24 horas de desenvolvimento, então este *amplicon* obtido foi inserido no vetor de clonagem e os clones positivos (Figura 18 e 19) foram sequenciados.

De acordo com dados da literatura para realização do silenciamento gênico é necessário ajustar a quantidade de dsRNA inserida e isso pode variar de gene para gene. No caso do silenciamento de PTEN (inibidor da via de insulina) foram injetados 2 µg de dsRNA, em contrapartida, para o silenciamento gênico do gene Dual oxidase (Duox) foram utilizados 200 ng de dsRNA (Riehle *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011). Inicialmente para o silenciamento usou 400ng de dsRNA, o silenciamento obtido com esta concentração foi de aproximadamente 95% (Figura 21 A). No entanto, com esta taxa de silenciamento observou que as fêmeas não põem ovos e, 3 dias após a alimentação sanguínea, parecem não ter desenvolvido o ovário (Figura

21 B). O não desenvolvimento do ovário foi quantificado pela distensão no abdômen das fêmeas 3 dias após a alimentação e a largura do abdômen foi 3 vezes maior nos mosquitos injetados com dsBgal (Figura 23). Como o objetivo foi de analisar o efeito do silenciamento no embrião teve que ajustar a concentração de dupla fita injetada. A segunda concentração usada foi de 200ng e, com esta concentração, foi observado um silenciamento de aproximadamente 30% (Figura 24). Então foi possível avaliar o fenótipo gerado pelo silenciamento nos adultos e foi visto que não houve diferença significativa entre a largura do abdômen quando comparado com os mosquitos injetados com dsBgal em relação aos mosquitos silenciados para GSK (Figura 25 e 26).

No intuito de avaliar o metabolismo de glicogênio em resposta ao silenciamento da GSK3, foi decidido avaliar a prole das fêmeas injetadas com dsRNA tanto para Bgal quanto para GSK3. Observou-se que em embriões de *Ae. fluviatilis* silenciados para GSK ocorre um aumento na concentração de glicogênio total (Figura 25) e também de proteína total (Figura 26) quando comparados com embriões de fêmeas injetadas com dsBgal. *Fraga et al.*, (2013), ao estudarem embriões do besouro *Tribolium castaneum*, mostraram que o silenciamento gênico para GSK3 aumentou a concentração total de glicogênio, e este silenciamento foi capaz de afetar a taxa de oviposição e a viabilidade dos ovos deste besouro. No caso do nosso modelo de estudo, embriões de *Ae. fluviatilis*, observamos que embriões silenciados para GSK3 apresentaram uma alta redução na viabilidade (Figura 29).

A GSK3 está envolvida em diversos processos fundamentais para a célula, como ciclo celular, transcrição gênica e integridade do citoesqueleto. Isso ocorre devido ao fato dessa proteína ser capaz de fosforilar enzimas chaves que coordenam esses processos (Grimes and Jope, 2001). A GSK3 se encontra constitutivamente ativa em células não estimuladas, sendo inativada por várias cascatas de sinalização intracelular. Ela é capaz de fosforilar mais de 40 substratos e por causa dessa ação múltipla deve ser muito bem controlada (Jope & Johnson 2004). Esta enzima está envolvida também na via Wnt (Dianqing_, 2009). Wnt ou Wingless são proteínas conservadas evolutivamente responsáveis por diversos processos durante o desenvolvimento embrionário e a homeostase do indivíduo adulto. Sabe-se que esta família de proteínas é secretada de forma parácrina ou autócrina,

possuindo um raio de ação restrito, e regulando processos celulares variados em seus alvos principalmente os processos de definição dos eixos embrionários (Clevers, 2006; Toledo *et al.*, 2008; Verheyen & Gottardi, 2010). Em *Ae. fluviatilis* foi mostrado, através de observações da morfologia, que os embriões silenciados para GSK3 apresentam um grande atraso no desenvolvimento quando comparados aos embriões de fêmeas injetadas com dsBgal (Figura 30). Além disso, dos 165 embriões com 24 horas de desenvolvimento 92 não se desenvolvem corroborando o resultado da viabilidade (Figura 29). Nos embriões com 48 horas de desenvolvimento o resultado foi semelhante, com mais de 50% dos embriões não se desenvolvendo e o restante apresentando um retardo no desenvolvimento quando comparado ao controle (Figura 30).

Para melhor compreensão dos eventos morfológicos que ocorrem durante a embriogênese de *Ae. fluviatilis* foram observados embriões em diferentes tempos após a oviposição. Na literatura já é bem descrito a embriologia de vários insetos. Em *Anopheles albitarsis* a formação do blastoderma celular ocorre no período de 6 horas de desenvolvimento (Monnerat, 2002), que coincide com o perfil observado em *Ae. fluviatilis*, visto que com 6 horas de desenvolvimento o embrião apresenta seus núcleos espalhados pelo ovo (Figura 12). Com 12 horas de desenvolvimento foi mostrado o início da extensão da banda germinal dos embriões de *Ae. fluviatilis* (Figura 12). No caso de *Anopheles albitarsis* a extensão da banda germinal ocorre com 10-12 horas de desenvolvimento (Monnerat, 2002) e em *Ae. aegypti* com 15 horas de desenvolvimento (Vital *et al.*, 2010). Em *Ae. fluviatilis* foi observado que o início da retração da banda germinal ocorre com 24 horas de desenvolvimento (Figura 12), padrão similar ao que já foi mostrado por Vital *et al.*, (2010) para *Ae. aegypti*. Finalmente em 48 horas de desenvolvimento o embrião já se mostra completamente formado, pronto para eclodir (Figura 12).

Na via da insulina a GSK3 regula a síntese de glicogênio e de proteína por controlar a ativação da Glicogênio Sintase (GS) e do fator de transcrição eIF2B, respectivamente (Frame & Cohen, 2001). A consequência da ativação da via da insulina é a fosforilação da GSK3 tornando-a inativa. Essa fosforilação é catalizada pela Akt no seu resíduo Serina na região N-terminal (Serina 21 na GSK3 α e Serina 9 em GSK3 β) (Cross *et al.*, 1995). Portanto, quando a via de

sinalização da insulina está ativa pela ligação da insulina ao seu receptor, a GSK3 é fosforilada pela Akt que a inibe. Quando essa enzima se encontra inibida, seus substratos são desfosforilados pela ação de fosfatases e tornam-se ativos. Desse modo, a insulina contribui para o estímulo da síntese de glicogênio e proteína. Tomoatsu *et al.* (2009) demonstraram que em *Drosophila melanogaster*, uma das consequências de ser ter a *Wolbachia* como endossimbionte natural é o aumento da via de sinalização de insulina. Evolutivamente considerações sugerem que o mecanismo pelo qual a *Wolbachia* interage com a via de insulina do hospedeiro tem origem na maneira como estes endossimbiontes são transmitidos. Seus habitats dentro do citoplasma das células, e a transmissão materna através da infecção dos ovos (Stouthamer *et al.*, 1999). Neste trabalho foi visto que a concentração de glicogênio aumenta nos embriões de *Ae. fluviatilis* na presença da bactéria (Figura 17) e foi visto ainda que quando silencia a GSK3 a quantidade relativa de bactéria nos embriões dobra em relação aos embriões de fêmeas injetadas com dsBgal (Figura 28). Durante a embriogênese inicial de *Drosophila simulans* foi visto que a quantidade de *Wolbachia* está relacionada com o crescimento e o desenvolvimento do embrião, visto que durante divisões celulares do embrião esta bactéria interage com os microtúbulos (Kose, 1995). Na embriogênese de *Ae. fluviatilis* foi mostrado que a bactéria *Wolbachia* pode estar influenciando no metabolismo de glicogênio do hospedeiro, pois há uma mudança geral no metabolismo de glicose dos embriões quando na presença desta bactéria.

Analisando o genoma de algumas espécies de *Wolbachia* foi observado que não apresentam as enzimas de síntese ou de degradação de glicogênio (dados não mostrados). Sendo assim, sugeri que esta bactéria possa ser capaz de internalizar piruvato do hospedeiro, pois este endossimbionte possui uma enzima chamada piruvato fosfato diquinase, responsável por usar o piruvato como substrato, principalmente, para a geração de frutose-6-fosfato, como foi suposto por Foster (2005) quando ele avaliou o genoma da *Wolbachia* endossimbionte de *Brugia malayi*. O piruvato ocupa uma posição central na regulação do metabolismo de carbono, como é o produto final da glicólise e um substrato importante para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) em mitocôndrias. Além disso, o piruvato está na interseção destas vias catabólicas com vias anabólicas para a síntese *de novo* de glicose (gliconeogênese), biossíntese de

lipídios e aminoácidos (Bricker *et al.*, 2012). Ao avaliar a concentração de glicose-6-fosfato foi observado que esta concentração segue um padrão muito similar da atividade de hexoquinase e piruvato quinase, apresentando maiores concentrações nos embriões na presença de *Wolbachia* quando comparados àqueles na ausência de *Wolbachia* (Figura 15). A glicose total apresenta um perfil contrário ao da glicose fosforilada com seu maior pico no final da embriogênese (Figura 13). Estes dados reforçam a hipótese de que esta glicose está sendo direcionada para a geração de piruvato.

Assim, os resultados deste trabalho corroboram que a presença do endossimbionte natural pode afetar o metabolismo normal do hospedeiro e que esta relação de simbiose (embriões de *Ae. fluviatilis* na presença de *Wolbachia*) pode ser modulada pelo metabolismo de glicogênio, apontando para o envolvimento da enzima GSK3 neste processo. Trabalhos futuros tornam-se necessários para evidenciar em maiores detalhes esta relação, sendo uma contribuição relevante para o uso da *Wolbachia* no controle de doenças transmitidas por artrópodes.

6. Conclusões

- Foi possível evidenciar que a via glicolítica está mais ativa no início da embriogênese de *Aedes fluviatilis*;
- Constatou-se que o destino preferencial da glicose 6-fosfato nos embriões de *A. fluviatilis* está preferencialmente sendo destinado para a formação de glicogênio;
- Evidenciou-se que o padrão de desenvolvimento dos embriões de *A. fluviatilis* se desenvolve obedecendo um padrão equivalente ao da mosca *D. melanogaster*;
- A GSK foi clonada, sequenciada e validada através de alinhamento de aminoácidos com outros dípteras;
- Observa-se que o silenciamento gênico da GSK3 afeta a morfologia normal do adulto e depois de alimentado em baixa concentração somente afeta o desenvolvimento normal dos embriões;
- Conclui-se também que o simbionte natural do *A. fluviatilis* depende do metabolismo de glicogênio do hospedeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali A., Hoefflich K. P. and Woodgett J. R. (2001). Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem. Rev.* 101, 2527-2540.
- Baldo, L. & Werren, J. H. Revisiting Wolbachia supergroup typing based on WSP: spurious lineages and discordance with MLST. *Curr. Microbiol.* 55, 81–87 (2007).
- Bate, M., Marquardt, W.C. (1993), *The development of Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Borror DJ, Tripleton CA, Jonson NF 1989. *An introduction to the study of insect*. 6ª ED. Saunders College Publishing.
- Bourtzis, K. Wolbachia-based technologies for insect pest population control. *Adv. Exp. Med. Biol.* 627, 104–113 (2008).
- Bradford, M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bradley W. D. and Woodgett (2003). GSK3: tricks of the trade for a multi-tasking Kinase. *Journal of Cell Science* 116, 1175 – 1186.
- Bricker, Daniel; Taylor, Eric; Schell, John; Orsak, Thomas; Boutron, Audrey; Chen, Yu-chan; Cox, James; Cardon, Caleb; Vranken, Jonathan; Dephoure, Noah; Redin, Claire; Boudina, Sihem; Gygi, Steven; Brivet, Michèle; Thummel, Carl; Rutter, Jared. (2012). A Mitochondrial Pyruvate Carrier Required for Pyruvate Uptake in Yeast, Drosophila, and Humans. *Science* vol 337.
- Chapman RF 1988. *The insects. Structure and Function*. 4ª ED. Cambridge University Press.

- Christophers S. R. (1960) *Aedes aegypti*- The Yellow Fever Mosquito. Its Life History, Bionomics and Structure. Cambridge: Cambridge University.
- Clements, A.N. 1992. The biology of mosquitoes. Development, nutrition and reproduction. London; Chapman and Hall.
- Cohen, P. (1999). The development and therapeutic potential of protein kinase inhibitors *Curr. Opin. Chem. Biol* 3, 459±465
- Consoli R, Lourenço-de-oliveira R 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz.
- Cook PE, McMeniman CJ, O'Neill SL (2008) Modifying insect population age structure to control vector-borne disease. *Adv Exp Med Biol* 627: 126–140.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen Andjelkovich, M., Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785 – 789
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15(2):188-200.
- Emily-Fenouil, F., Ghiglione, C., Lhomond, G., Lepage, T. and Gache, C. (1998) GSK-3 β /shaggy mediates patterning along the animal-vegetal axis of the sea urchin embryo. *Development.* 125, 2489–2498.
- Ferkey DM , Kimelman D . GSK-3: new thoughts on an old enzyme. *Dev Biol.* 15 de Setembro de 2000; 225 (2): 10985864
- Forattini OP. *Entomologia Médica* 4^o Volume: Psychodidae. Phlebotominae. Leishmanioses. Bartonelose. São Paulo: E Blücher; 1996.

- Foster J, Ganatra M, Kamal I, Ware J, Makarova K, et al. (2005) The Wolbachia genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biol* 3: e121. doi:10.1371/journal.pbio.0030121.
- Frame, S. and Cohen, P (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem.J.* 359, 1-16.
- Garnham, P.; 1966, *Malaria Parasites and other haemosporidia*, Blackwell Scientific publications, Oxford, pp1114.
- Gilbert, S. F., Raunio, A. M., 1997. *Embryology: Constructing the Organism*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Grimes, C. A. & Jope, R. S. (2001) *Prog. Neurobiol.* 65, 391–426.
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN (2008) Wolbachia and virus protection in insects. *Science* 322: 702.
- HERTIG, M., WOLBACH, S., 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in *Hiroiyuki Kosea*, Timothy L. Karrib'c .Organization of Wolbachia pipientis in the *Drosophila* fertilized egg and embryo revealed by an anti-Wolbachia monoclonal antibody. *Mechanisms of Development* 51 (1995) 275-2888.
- Hoeflich, K. P., Luo, J., Rubie, E. A., Tsao, M.S., Jin, O., Woodgett, J.R., 2000. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406: 86–90.
- http://www.prefeitura.unicamp.br/prefeitura/ca/DENGUE/3dengue_unicamp.htm
- Ikeya,T;Broughton,S; Alic,N; Grandison,R;Partridge,L.(2009) The endosymbiont wolbachia increases insulin/IGF-like signalling in *Drosophila*.*Proc.R.Soc.B* 276,3799-3807.insects. *J Med Res*, 44: 329-374.
- Jope, R. S., Johnson, G. V. G. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3, *Trends in Biochemical Sciences* 29, 95-102.

- Lau, K. F., Miller, C. C. J., Anderton, B. H., and Shaw, P. C. (1999). Expression analysis of glycogen synthase kinase-3 in human tissues. *J. Peptide Res.* 54, 85–91.
- Logullo, C.; Moraes, J.; Dansa-Petretski, M.; Vaz Jr., I. S.; Masuda, A.; Sorgine, M.H.F.; Braz, G. R.; Masuda H.; Oliveira P. L. (2002) Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Insect Bioch. Mol. Biol.* 32: 1805-1811.
- Luciano A. Moreira In˜ aki Iturbe-Ormaetxe, Jason A. JefferyGuangjin Lu,Alyssa, T. Pyke Lauren M. Hedges,Bruno C. Rocha, Sonja Hall-Mendelin,Andrew Day, Markus Riegler, Leon E. Hugo, Karyn N. Johnson,Brian H. Kay,Elizabeth A. McGraw,Andrew F. van den Hurk,Peter A. Ryan,and Scott L. O'Neill1.,2009. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell Press*. DOI 10.1016/j.cell.2009.11.042.
- McCutchan, F. E., Artenstein, A. W., Sanders-Buell, E., Salminen, M. O., Carr, J. K., Mascola, J. R., Yu, X. F., Nelson, K. E., Khamboon- ruang, C., Schmitt, D., Kieny, M. P., McNeil, J. G. & Burke, D. S. (1996). Diversity of the envelope glycoprotein among human immuno- deficiency virus type 1 isolates of clade E from Asia and Africa. *Journal of Virology* 6, 3331–3338.
- Monnerat, A. T., et al., 2002. *Anopheles albitarsis* embryogenesis: morphological identification of major events. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97, 589-96.
- Moraes J., Galina A., Alvarenga P.H., Rezende G.L., Masuda A., da Silva Vaz I.Jr. & Logullo C. 2007. Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology.* 146(4): 528-533.

- Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y. and Fujita, S. C. (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem.* 81, 1073-1083.
- Norman R. Pace. (2001). The universal nature of biochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. University of Colorado, Boulder, CO 80309-0347.
- O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A., and Werren, J.H. (1997). Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction (Oxford University Press).
- Oliveira, J.H.M.; Gonçalves, R. L. S.; Lara, F. A.; Dias, F.A.; Gandara, A.C.P.; Menna-Barreto, R.F.S.; Edwards, M.C.; Laurindo, F.R.M.; Silva-Neto, M.A C.; Sorgine, M.H.F.; Oliveira, P.L.. (2011) Blood Meal-Derived Heme Decreases ROS Levels in the Midgut of *Aedes aegypti* and Allows Proliferation of Intestinal Microbiota. *PLoS Pathogens*, v. 7, p. e1001320.
- Oliveira, P. L.; Gondin, K. C.; Guedes, D. M.; Masuda, H. (1986) Uptake of yolk proteins in *Rhodnius prolixus*, *J. Insect. Physiol.* 32: 859-866.
- Polley, S.D., Weedall, G.D., Thomas, A.W., Golightly, L.M., Conway, D.J., 2005. Orthologous gene sequences of merozoite surface protein 1 (MSP1) from *Plasmodium reichenowi* and *P. gallinaceum* confirm an ancient divergence of *P. falciparum* alleles. *Molecular and Biochemical Parasitology* 142, 25–31.
- Raminani LN, Cupp EW. Early embryology of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) *Int J Insect Morphol Embryol.* 1975;4:517–528.
- Raminani, L. N., Cupp E. W. (1978), Embryology of *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE): Organogenesis. *Int. J. Morphol. & Embriol.*, 7(3): 273-296.
- Ribolla, P.E.M., Bianchi, A.G. (1995), Processing of procathepsin from *Musca domestica* eggs, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25(9): 1011-1017.

- Rosay, B., 1959. Gross external morphology of embryos of *Culex tarsalis* Coquillett (Diptera:Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 52, 481-484.
- Rozen, S & Skaletsky, HJ (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
- Sahoo, G., Sahoo, R.K., Mohanty–Hejmadi, P. (1998), Calcium metabolism in olive ridley turtle eggs during embryonic development, *Comp. Bioch. Phys. Part A* 121: 91-97.
- Sinkins SP, O'Neill SL (2000) *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In: Handler AM, James AA, eds. *Insect Transgenesis: Methods and Applications*. London, UK: CRC Press. pp 271–287.
- Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M (2008) The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* 6:e1000002.
- Templeton, N.S., Lasic, D.D., Frederik, P.M., Streey, H., Roberts, D.D., and Pavlakis, G.N., 1997. Improved DNA:liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nature Biotechnology* 15:647.
- Thompson M.B., Stewart, R.J., 1997. Embryonic metabolism and growth in lizards of the genus *Eumeces*. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A, 647–654.
- Trpiš M: A new bleaching and decalcifying method for general use in zoology. *J. Zool.* 1970, 48: 892–893
Valencia, M.D.P., Miller, L.H., Mazur, P., 1996. Permeability of Intact and Dechorionated Eggs of the *Anopheles* Mosquito to Water Vapor and Liquid Water: A Comparison with *Drosophila*. *Cryobiology* 33, 142–148.

- Vital, W. Rezende G. L., Abreu, L., Moraes, J., Lemos, F.J.A, Vaz Jr, I. S., Logullo, C., 2010. Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. *BMC Developmental Biology*. 10:25.
- Werren, H.J. BIOLOGY OF WOLBACHIA. *Annu. Rev. Entomol.* 1997. 42:587–609.
- Werren, J. H. et al. Rickettsial relative associate with male-killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). *J. Bacteriol.* 176, 388–394 (1994).
- Weston, K. M.; O'brien, R. W.; Prichard, R. K. (1984) Respiratory metabolism and thiabendazole susceptibility in development eggs *Haemonchu contortus*. *Int. J. Parasitol.* 14: 159-164.
- Worthington CC (1988) Worthington enzyme manual: enzymes and related biochemicals Worthington Biochemical Corporation,. New Jersey: Freehold.
- Zeh, D. W., et al., 1989. Ovipositors, amnions and eggshell architecture in the diversification of terrestrial arthropods. *Quarterly Review of Biology.* 64, 147-168.