



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CAMPUS MACAÉ

CURSO DE FARMÁCIA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS CONTROLADORAS DO
METABOLISMO ENERGÉTICO DURANTE A EMBRIOGÊNESE DO MOSQUITO**

Aedes aegypti

Marcela Viana Faria

MACAÉ/RJ

2014

MARCELA VIANA FARIA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS CONTROLADORAS DO
METABOLISMO ENERGÉTICO DURANTE A EMBRIOGÊNESE DO MOSQUITO
*Aedes aegypti***

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio de Janeiro como
requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca

MACAÉ/RJ

2014

MARCELA VIANA FARIA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS CONTROLADORAS DO
METABOLISMO ENERGÉTICO DURANTE A EMBRIOGÊNESE DO MOSQUITO
*Aedes aegypti***

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio de Janeiro como
requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca

Aprovação em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes
UFRJ/Macaé

Prof. Dr. José Luciano Nepomuceno
UFRJ/Macaé

Prof^a. Dra. Helga Fernandes Gomes
UFRJ/Macaé

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar saúde e força para seguir em frente em todos os momentos difíceis.

À minha mãe Lídia, Antônio e Mariana, que me acompanharam diariamente durante essa trajetória, me oferecendo um lar com estrutura e conforto para meus estudos e descanso. Agradeço ao meu pai Marcelo, Soraya, João, minhas avós e madrinha e aos meus amigos e familiares, a compreensão pela ausência nos momentos de estudo, pelas orações e incentivos que me fizeram chegar até aqui.

Ao meu orientador Dr. Jorge Moraes, pela oportunidade e apoio na elaboração desse trabalho, pelos ensinamentos, paciência e dedicação durante os anos que estive no LIBHM, por ter acreditado em mim e me incentivado a superar os obstáculos e seguir em frente.

À UFRJ, por oferecer professores competentes e estrutura de qualidade.

A FUNEMAC e a FAPERJ pela concessão da bolsa de iniciação científica durante parte da realização desse trabalho.

Aos companheiros de graduação, Brunos, Kamila, Luana, Raquel e Stephanie, que me acompanharam durante esses anos, pela parceria, pelos ótimos momentos vividos e pela ajuda nos mais difíceis.

À Rafa, que mesmo longe se fez tão presente, e ao Wesley, pela paciência e confiança, que a todo o momento acreditaram em mim e me fizeram criar forças para terminar esse trabalho.

Aos professores que aceitaram fazer parte da minha banca examinadora.

A todos que de forma direta ou indireta me ajudaram a concluir essa etapa, o meu muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Distribuição dos casos de dengue no mundo

Figura 2: Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.

Figura 3: Embriogênese do *Aedes aegypti* a 28°C

Figura 4: Glicólise

Figura 5: Atividade da HK (A) e PK(B) durante a embriogênese

Figura 6: Síntese de glicogênio

Figura 7: Níveis de glicose e glicogênio durante a embriogênese do *A. aegypti*

Figura 8: Atividade e expressão relativa da GSK3 durante o desenvolvimento do embrião do *A. aegypti*

Figura 9: Síntese de ácidos graxos

Figura 10: Deficiência de ACC nos ovos do *A. aegypti*

Figura 11: β -oxidação

Figura 12: Gliconeogênese

Figura 13: Gliconeogênese durante a embriogênese do *A. aegypti*

Figura 14: Catabolismo de aminoácidos

Figura 15: Degradação de proteínas

Figura 16: Expressão relativa da PFK1

Figura 17: Expressão relativa da glicogênio sintase

Figura 18: Expressão relativa da acetil-CoA carboxilase

Figura 19: Expressão relativa da glicose-6-fosfatase

Figura 20: Expressão relativa da acil-CoA desidrogenase

Figura 21: Expressão relativa da alanina aminotransferase

Figura 22: Expressão relativa da isoforma A da enzima glutamato desidrogenase

Figura 23: Expressão relativa da isoforma B da enzima glutamato desidrogenase

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise da expressão em tempo real.

LISTA DE ABREVIações

ACC: Acetil-CoA carboxilase
AChE: Acetilcolinesterase
ALT: Alanina aminotransferase
DDT: Dicloro-difenil-tricloroetano
DEPC: Dicarbonato de dietila
FUNASA: Fundação Nacional de Saúde
G6Pase: Glicose-6 fosfatase
G6PDH: Glicose-6 fosfato desidrogenase
GSK3: Glicogênio sintase quinase
HK: Hexoquinase
NCBI: National Center for Biotechnology Information
OMS: Organização Mundial da Saúde
OP: Organofosforados
OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde
PFK-1: Fosfofrutoquinase-1
PK: Piruvato quinase
PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PNCD: Programa Nacional de Controle da Dengue
SES: Secretaria de Estado e Saúde
SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TM: Temperatura de anelamento

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti*, encontrou no Brasil condições favoráveis à sua expansão, como altas temperaturas, muita chuva e falta de saneamento básico, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública do país. Um dos maiores desafios relacionados ao controle da dengue é a resistência dos ovos do *Aedes aegypti* à dessecação, sobrevivendo, em dormência, durante meses em locais secos, até que encontrem as condições favoráveis para eclodirem. Sabe-se que a retração da banda germinal na 24^a hora da embriogênese é o marco no metabolismo deste mosquito. O objetivo desse projeto foi analisar a expressão de genes das principais vias metabólicas durante a embriogênese do *Aedes aegypti*, usando pontos antes, durante e depois da retração da banda germinal. Enzimas chave do metabolismo de carboidratos, degradação de proteínas e do metabolismo de lipídios foram selecionadas para analisarmos sua expressão através de PCR em tempo real. Os procedimentos realizados consistiram na extração do RNA, com o reagente TRIzol®, dos ovos nos horários desejados, quantificação do RNA por espectrofotometria, síntese do cDNA através do kit SuperScript™ III. Para a análise do PCR em tempo real foram utilizados os cDNAs obtidos dos ovos, reagente SYBR® Green e os oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada enzima. Os resultados obtidos mostraram uma significativa variação da expressão gênica ao longo da embriogênese do *Aedes aegypti*. Esse estudo proporcionará uma maior compreensão das bases metabólicas dos embriões desse artrópode, vetor de doenças de grande importância em nosso país.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, embriogênese, metabolismo energético, expressão gênica.

ABSTRACT

The mosquito *Aedes aegypti*, found in Brazil positive conditions for its expansion such as high temperatures, lots of rain and lack of basic sanitation, becoming one of the major public health problems of the country. One of the biggest challenges related to controlling dengue is the resistance of *A. aegypti* eggs to desiccation, surviving dormant for months in a dry location, until they find the right conditions to hatch. It is known that the germ band retraction at the 24th hour of embryogenesis is the landmark in the metabolism of this mosquito. The goal of this project was to analyze the genes expression of the major metabolic pathways during embryogenesis of *Aedes aegypti*, using points before, during and after the germ band retraction. Key enzymes of carbohydrate metabolism, protein degradation and lipid metabolism were selected to analyze their expression by real-time PCR. The procedures performed consisted of RNA extraction with TRIzol® reagent, eggs at the desired time, RNA quantification by spectrophotometry, cDNA synthesis using the SuperScript™ III kit. For the real-time PCR analysis were used egg cDNAs, SYBR® Green reagent and primers specific for each enzyme was used. The results showed a significant variation in gene expression during embryogenesis of *Aedes aegypti*. This study will provide a greater understanding about the metabolic basis of these arthropod embryos, vector of diseases of major importance in our country.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÃO	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. A dengue

A dengue é, hoje, a mais importante arbovirose (doença transmitida por artrópodes) que afeta o homem e constitui-se em um sério problema de saúde pública no mundo, especialmente nos países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor (BRASIL, 2002). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, anualmente, entre 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas pela dengue, em mais de 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da doença. O Brasil é responsável por quase 80% do total de casos notificados da doença nas Américas e, 61% dos casos no mundo (GUBLER, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2009). Entre os anos de 1990 e 2013 o Brasil teve um milhão quatrocentos e setenta mil e quatrocentos e oitenta e sete (1.470.487) casos de dengue notificados (SES/SINAN).

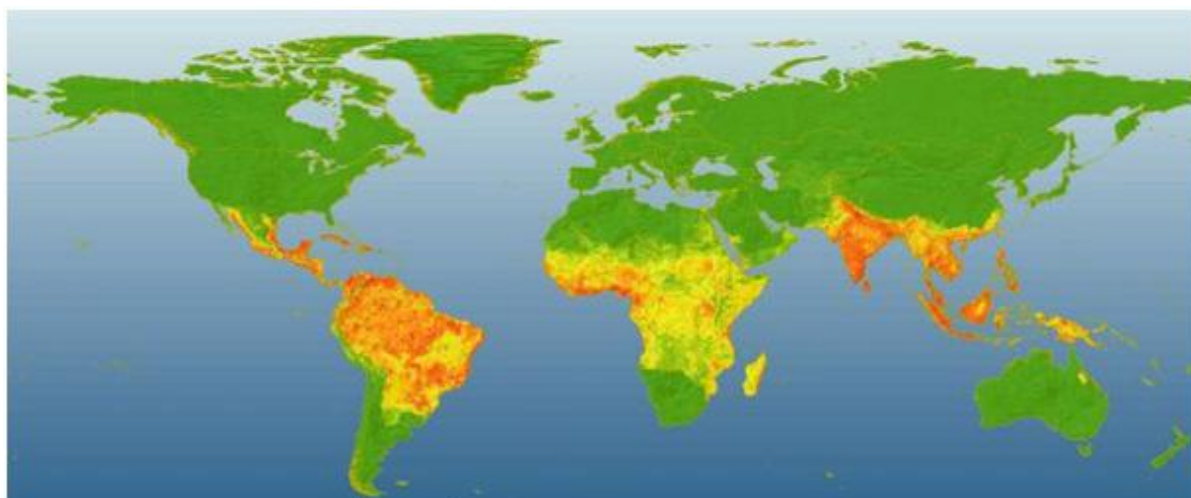


Foto: Jane Messina/Nature/Divulgação. Disponível em: <http://www.7comnews.com.br/2013/04/incidencia-de-dengue-no-mundo-pode-ser.html> Acesso: 20/06/2014

Figura 1: Distribuição dos casos de dengue no mundo: Mapa produzido por pesquisadores da Universidade de Oxford, áreas em vermelho representam o maior risco da infecção e, em verde, o menor risco.

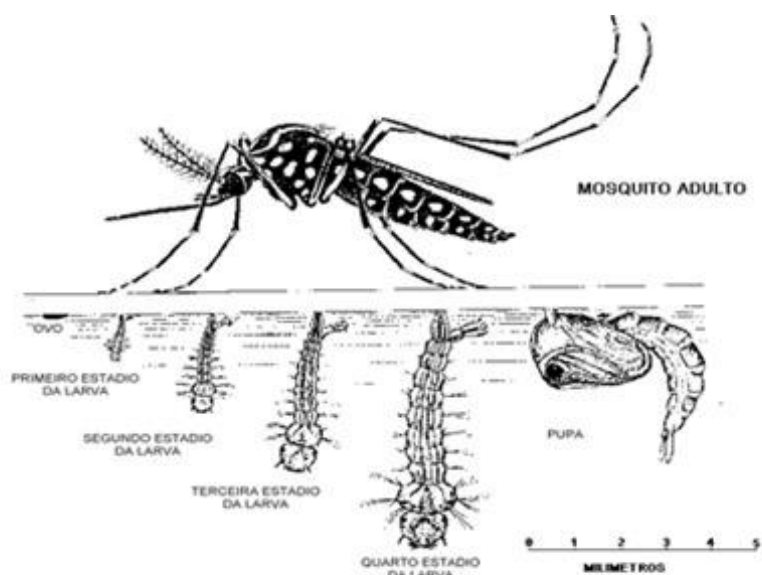
A dengue se manifesta como uma doença febril aguda de evolução benigna na forma clássica, e grave, quando se apresenta na forma hemorrágica. O agente etiológico da dengue é um arbovírus, do gênero *Flavivirus*, pertencente à família

Flaviviridae. São conhecidos quatro sorotipos do vírus da dengue: Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4 (MS, 2002).

A transmissão da dengue ocorre quando a fêmea do *Aedes aegypti* pica um indivíduo infectado, na fase virêmica da doença, tornando-se contaminada após 8 a 12 dias de incubação, e apta a transmitir o vírus através de suas picadas por toda sua vida. Quando o *A. aegypti* está infectado pelo vírus da dengue ou da febre amarela, pode haver transmissão transovariana destes, de maneira que, em variável percentual, as fêmeas filhas de um espécime portador nascem já infectadas (OPAS/OMS).

1.2. O mosquito *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti*, vetor da dengue e da febre amarela, é um animal do filo Arthropoda (pés articulados), sub-filo Hexapoda (três pares de patas), classe *Insecta*, ordem *Diptera* (um par de asas anterior funcional e um par posterior transformado em halteres), subordem *Nematocera*, família *Culicidae* e gênero *Aedes*. Os mosquitos são insetos que se desenvolvem através de metamorfose completa, ou seja, o ciclo de vida do *Aedes aegypti* compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estágios larvários), pupa e adulto.



Disponível em: <http://www.cecom.unicamp.br/dengue/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=54>
Acesso em: 20/06/2014

Figura 2: Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Os ovos são postos fixados milímetros acima da superfície da água. Os quatro estágios larvares assim como a pupa consistem na fase de vida aquática do inseto (BRASIL, 2001).

Os ovos do *Aedes aegypti* medem, aproximadamente, 1mm de comprimento e contorno alongado e fusiforme, são depositados pela fêmea, individualmente, nas paredes internas dos depósitos que servem como criadouros, próximos à superfície da água. No momento da postura os ovos são brancos, mas, rapidamente, adquirem a cor negra brilhante (BRASIL, 2001).

Uma vez completado o desenvolvimento embrionário, os ovos são capazes de resistir a longos períodos de dessecação, que podem prolongar-se por mais de um ano (BRASIL, 2001). Essa capacidade de resistência dos ovos à dessecação é um dos maiores obstáculos para a erradicação do *Aedes aegypti*, pois esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias em recipientes secos por dispersão passiva, tornando-se assim o principal meio de dispersão desse inseto vetor.

A duração da fase larvária depende da temperatura, disponibilidade de material orgânico para se alimentarem e da quantidade das larvas nos criadouros. Em condições ótimas, o período entre a eclosão das larvas e sua transformação em pupa pode ocorrer em cinco dias, já em baixas temperaturas e pouca disponibilidade de alimento, essa transformação pode se prolongar por semanas.

O estágio de pupa é onde ocorre a metamorfose do estágio de larva para o adulto, as pupas não se alimentam e demoram, geralmente de dois a três dias até a emergência do inseto adulto.

O adulto de *Aedes aegypti* é escuro e possui faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais. O macho pode ser identificado macroscopicamente da fêmea por possuir antenas plumosas, entre outras características (BRASIL, 2001).

O macho adulto alimenta-se de néctar das plantas e as fêmeas alimentam-se tanto de carboidratos extraídos dos vegetais quanto de sangue. A maior parte dos animais vertebrados serve como fonte de repasto, mas o *A. aegypti* mostra preferência pelo sangue humano. A alimentação sanguínea é essencial para as fêmeas de *A. aegypti* de fato completarem a ovogênese e conseqüentemente o processo reprodutivo (BURKE, 1976; GRIMES, 1980), pois fornece proteínas necessárias para o desenvolvimento dos ovos.

Em geral, a fêmea faz uma postura a cada repasto sanguíneo. O intervalo entre a alimentação sanguínea e a postura é, em regra, de três dias, em condições de temperatura satisfatórias. Com frequência, a fêmea se alimenta mais de uma vez, entre duas sucessivas posturas, em especial quando perturbada antes de totalmente ingurgitadas. Este fato resulta na variação de hospedeiros, com disseminação do vírus a vários deles. (BRASIL, 2001)

Os adultos de *A. aegypti* podem permanecer vivos em laboratórios durante meses, mas, na natureza, vivem em média de 30 a 35 dias (BRASIL, 2001).

1.3. Embriogênese do mosquito *Aedes aegypti*

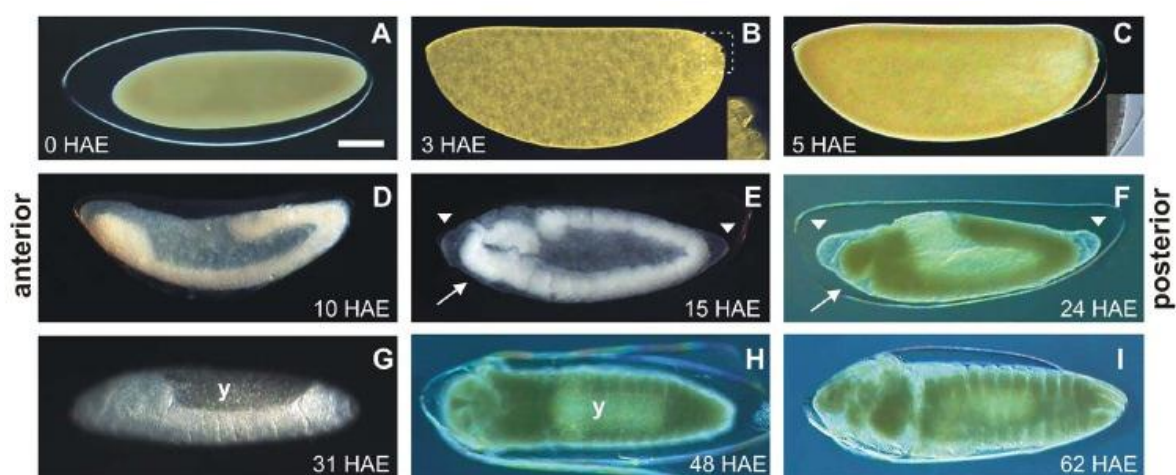


Figura 3: Embriogênese do mosquito *A. aegypti* a 28°C: Barra de escala = 100µm. Em **B-G** o lado dorsal está para cima. **A, B, C, F, H, I:** Microscopia de contraste de interferência diferencial. **C:** Microscopia de campo claro. **D, E, G:** Estereoscopia (Vital *et al.*, 2010).

Em estudo anterior (VITAL *et al.*, 2010), a embriogênese do mosquito *A. aegypti* foi observada a fim de determinar o momento de maior mudança morfológica durante a formação do embrião do mosquito *A. aegypti* a 28°C. Zero hora após a postura, os ovos foram apenas fertilizados e o embrião está isolado do endocório (Figura 3A). Três horas após a postura os embriões estão no estágio blastoderma sincicial, com as células do pólo posicionado fora do blastoderma (Figura 3B), enquanto 5 horas após a postura os embriões estão imediatamente antes ou durante a fase blastoderma celular (Figura 3C). Dez e quinze horas após a postura dos ovos

o embrião está no meio da extensão da banda germinal e no início da retração da banda germinal, respectivamente (Figura 3D, 3E). Vinte e quatro horas após a postura o embrião encontra-se no meio da retração da banda germinal (Figura 3F). Trinta e uma horas após a postura o embrião está no estágio de fechamento dorsal (Figura 3G), enquanto com 48 horas o embrião está em estágio avançado de organogênese, com evidente segmentação larvária (Figura 3H). Com 62 horas o embrião mostra todas as características de larva pronta para eclodir (Figura 3I) (Vital *et al.*, 2010).

1.4. Métodos de controle

Atualmente, muitas doenças contam com vacinas eficazes, caso da febre amarela, ou com medicamentos geralmente eficientes, caso da malária. Todavia, o controle do vetor ainda é imprescindível para prevenir diversas doenças, entre as quais a dengue é o melhor exemplo (BRAGA; VALLE, 2007).

Considerando que nenhuma vacina está disponível para minimizar o impacto da doença, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) tem como uma das principais estratégias o controle do *Aedes aegypti* baseado quase que exclusivamente no uso de inseticidas químicos (PAIVA, 2012). O organofosforado temefós, de instabilidade química e alta toxicidade a vertebrados, é utilizado de forma contínua como larvicida para o tratamento focal de criadouros do mosquito, inclusive aqueles destinados ao armazenamento de água potável (CHAVASSE; YAP, 1997). Já os piretróides deltametrina e cipermetrina são utilizados para o controle de mosquitos adultos (BRAGA; VALLE, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2005). Os principais problemas do uso destes inseticidas são o aparecimento de populações resistentes de mosquitos a esses produtos e os danos ambientais provocados por seu uso intensivo (POLANCZYK *et al.*, 2003; LUNA *et al.*, 2004).

1.5. Inseticidas químicos

O controle químico, com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica, é uma das metodologias mais adotadas como parte do manejo sustentável e integrado para o controle de vetores em Saúde Pública (ROSE, 2001). O desenvolvimento de inseticidas que permanecem ativos por períodos longos foi um dos mais importantes avanços no controle de insetos acontecidos no século XX. O primeiro inseticida de

efeito prolongado, ou propriedade residual, foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), um organoclorado desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial, que, quando aplicado em paredes e tetos de casas, permanecia ativo contra os insetos por vários meses (ROZENDAAL, 1997).

Os outros compostos orgânicos pertencem, principalmente, aos grupos dos organofosforados, carbamatos ou piretróides. Todos esses grupos atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos e têm sido usados nos programas de controle de doenças transmitidas por vetores (MELLON, 1984; PALCHICK, 1996)

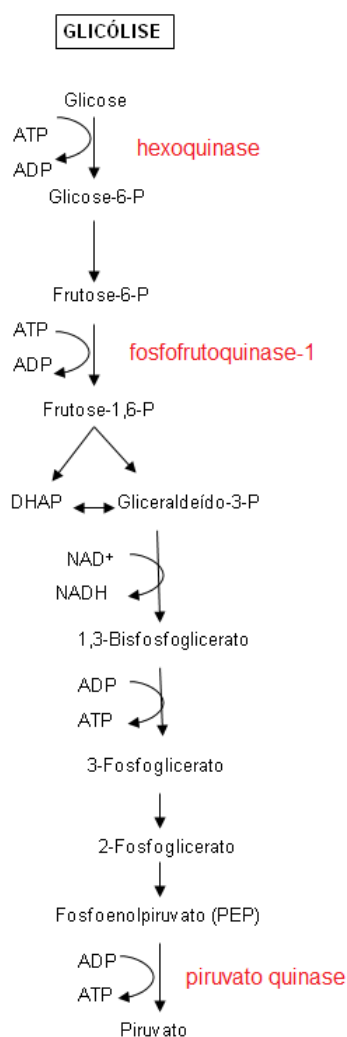
1.6. Resistência a inseticidas

A resistência é definida pela OMS como a habilidade de uma população de insetos tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua morte.

Os inseticidas têm sido bastante usados, tanto na agricultura e agropecuária quanto na área da Saúde Pública. Seu uso continuado tem provocado o aparecimento de populações resistentes e ocasionado problemas para o controle de vetores. Resistência tem sido detectada para todas as classes de inseticidas, afetando, direta e profundamente, a re-emergência das doenças transmitidas por vetores (BROGDON, 1998), pois, apesar dos importantes avanços alcançados no desenvolvimento de métodos alternativos, os inseticidas químicos continuam sendo uma importante ferramenta dos programas integrados de controle (ROSE, 2001). Nesse contexto, o monitoramento e o manejo da resistência, assim como o uso de substâncias com modos de ação diferentes dos inseticidas químicos convencionais, são elementos de suma importância em qualquer programa de controle de vetores (FERRARI, 1996).

1.7. Metabolismo energético

Ao longo da evolução, os seres vivos desenvolveram a capacidade de converter certas moléculas em energia, através de processos bioquímicos. Sugere-se que a primeira via metabólica de obtenção de energia que surgiu na natureza, tenha sido a glicólise, já que nas primeiras fases de adaptação ao nosso planeta não existia oxigênio, ou seu nível era muito baixo (Fothergill – Gilmore & Michels, 1993). A via glicolítica transforma glicose em piruvato gerando ATP durante esse processo.



Adaptado de: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Glic%C3%B3lise#mediaviewer/Ficheiro:Glicolise-gliconeogenese.png>> Acesso em:27/06/2014.

Figura 4: Glicólise. Em vermelho as enzimas regulatórias das etapas irreversíveis da via glicolítica: hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase-1 (PFK1) e piruvato quinase (PK).

As atividades enzimáticas da hexoquinase (HK) e piruvato quinase (PK) foram analisadas em estudo anterior mostrando que a via glicolítica é intensificada após a retração da banda germinal na embriogênese do *A. aegypti* (VITAL *et al.*, 2010). As atividades dessas enzimas da glicólise foram baixas durante as quinze primeiras horas da embriogênese e começaram a aumentar a partir da vigésima quarta hora (Figura 5), onde ocorre a retração da banca germinal.

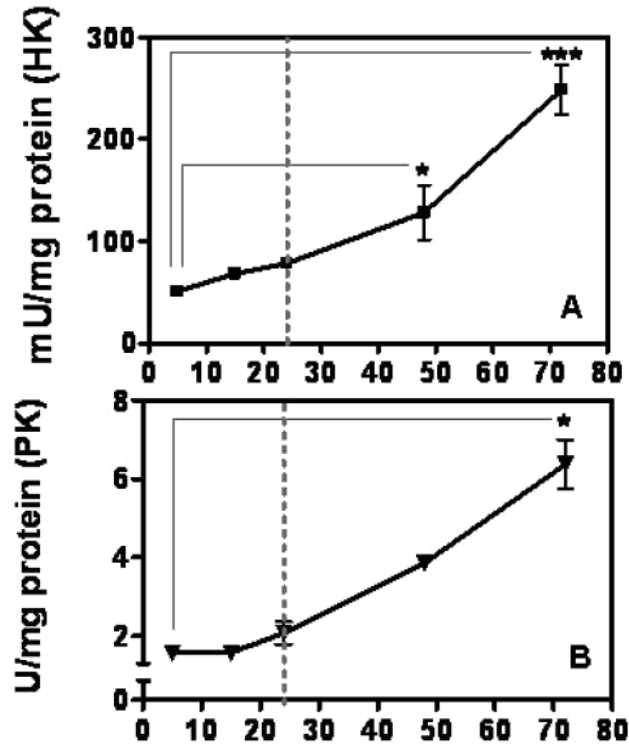


Figura 5: Atividade da HK e PK durante a embriogênese. As atividades de HK (A) e PK (B) foram medidas em homogenato de ovos em diferentes horas do desenvolvimento do embrião. Cada experimento foi realizado em triplicata e as barras de erro representam o desvio padrão das amostras. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, ANOVA). A linha pontilhada indica a retração da banda germinal em 24 horas (Vital *et al.*, 2010).



Adaptado de: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAe2AsAA/metabolismos-glicogenio>> Acesso em 27/06/2014.

Figura 6: Síntese de glicogênio. A glicogênio sintase catalisa a síntese das cadeias de glicogênio incorporando unidades de UDP-glicose na hidroxila do C4 terminal de uma cadeia de glicogênio, formando uma ligação $\alpha 1 \rightarrow 4$.

O metabolismo de glicogênio na embriogênese do *A. aegypti* investigado por Vital e colaboradores, através da determinação do conteúdo de glicogênio e glicose nos ovos (Figura 7) e pela atividade e transcrição da enzima glicogênio sintase quinase (GSK3) (Figura 8). A quantidade total de glicogênio e glicose no ovo aumentou entre 0 e 15 horas após a postura e em seguida diminuiu significativamente até ao final da embriogênese. A atividade da GSK3 diminuiu de 5 até 24 horas, mantendo-se baixa até o final da embriogênese, sendo inversamente correlacionada com a distribuição de glicogênio de 5 a 15 horas. A expressão gênica da GSK3 diminuiu bruscamente entre 0 e 24 horas, permanecendo baixa até o final da embriogênese (VITAL *et al.*, 2010).

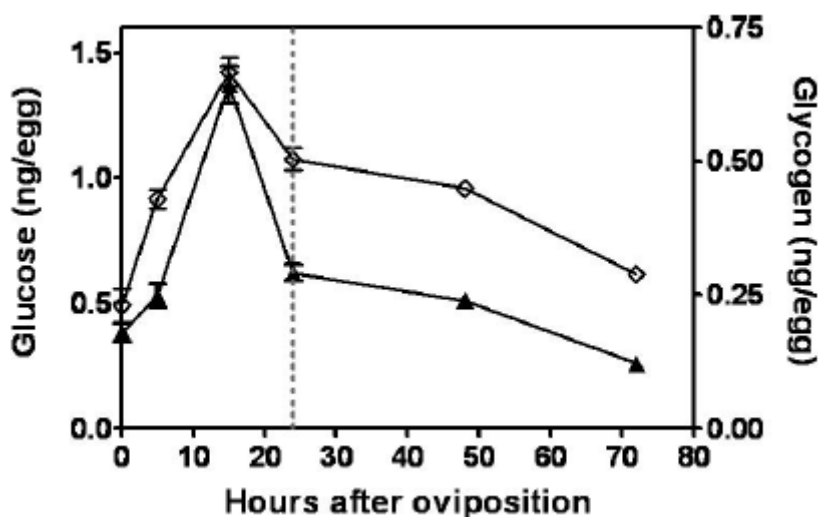


Figura 7: Níveis de glicose e glicogênio durante a embriogênese do *A. aegypti*. A concentração de glicose (losango aberto) e glicogênio (triângulo fechado) foram medidas em homogenatos em diferentes horas do desenvolvimento do embrião. Cada experimento foi replicado seis vezes e a barra de erro representa o desvio padrão das amostras. A linha pontilhada em 24 horas representa o momento da retração da banda germinal (Vital *et al.*, 2010).

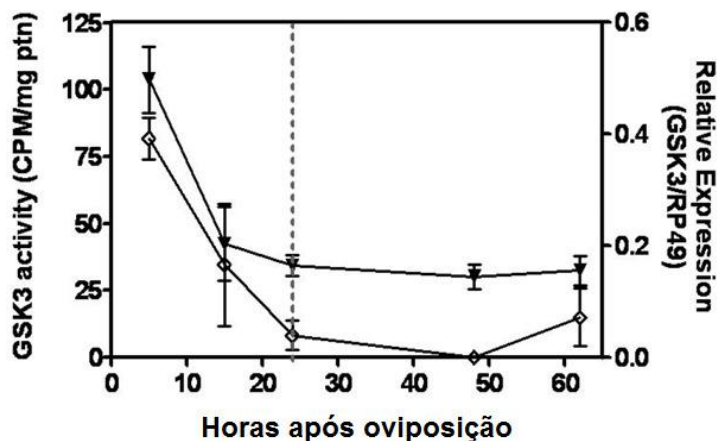
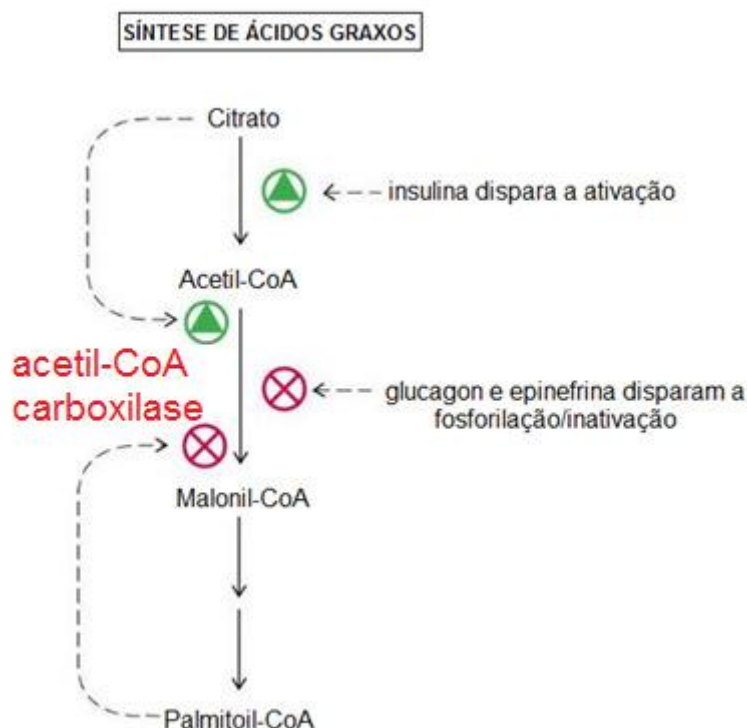


Figura 8: Atividade e expressão relativa da GSK3 durante o desenvolvimento do embrião do *A. aegypti*. A atividade da GSK3 (losango aberto) e os níveis transcricionais da GSK3 (triângulo fechado) (normalizado pelo cDNA *rp49*) foram medidos em diferentes horas da embriogênese. Cada experimento foi realizado em triplicata e as barras de erros representam o desvio padrão das amostras. A linha pontilhada em 24 horas representa o momento da retração da banda germinal (Vital *et al.*, 2010).



Adaptado de: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfb2EAD/aula-sintese-lipideos>> Acesso em:27/06/2014.

Figura 9: Síntese de ácidos graxos. A enzima Acetil-CoA carboxilase adiciona acetato para a síntese de ácidos graxos e é uma etapa limitante dessa via.

Dados de um estudo utilizando RNA de interferência da enzima Acetil-CoA carboxilase (ACC) e analisando a expressão desse gene no corpo gorduroso e nos ovários do *A. aegypti*, mostraram que a deficiência bioquímica da ACC não apenas inibia a síntese de lipídeos em mosquitos alimentados com sangue, como também impactava na formação dos ovos e na digestão do sangue (ALABASTER *et al.*, 2011).

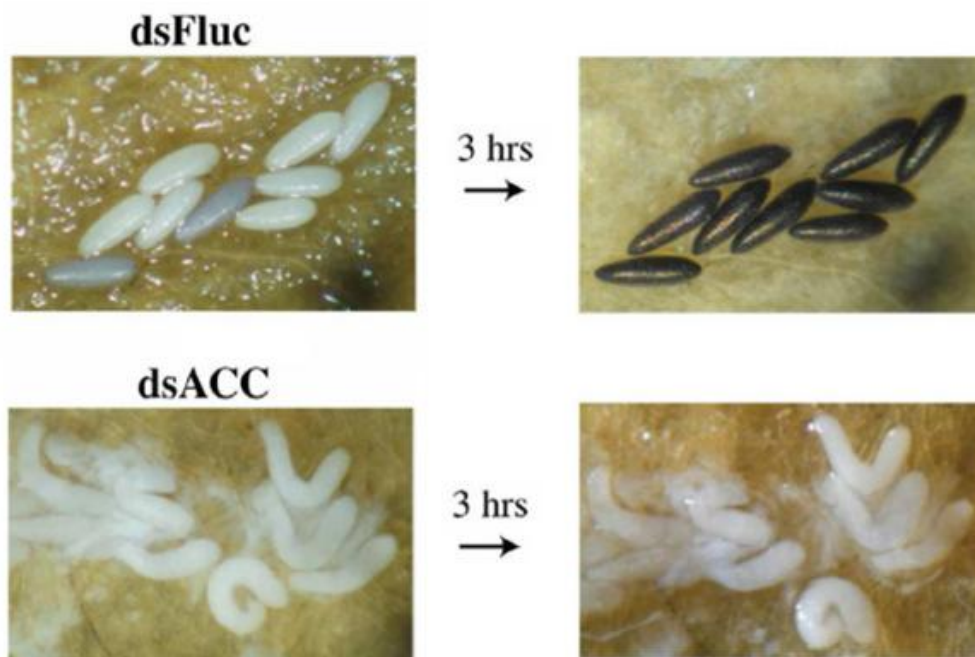
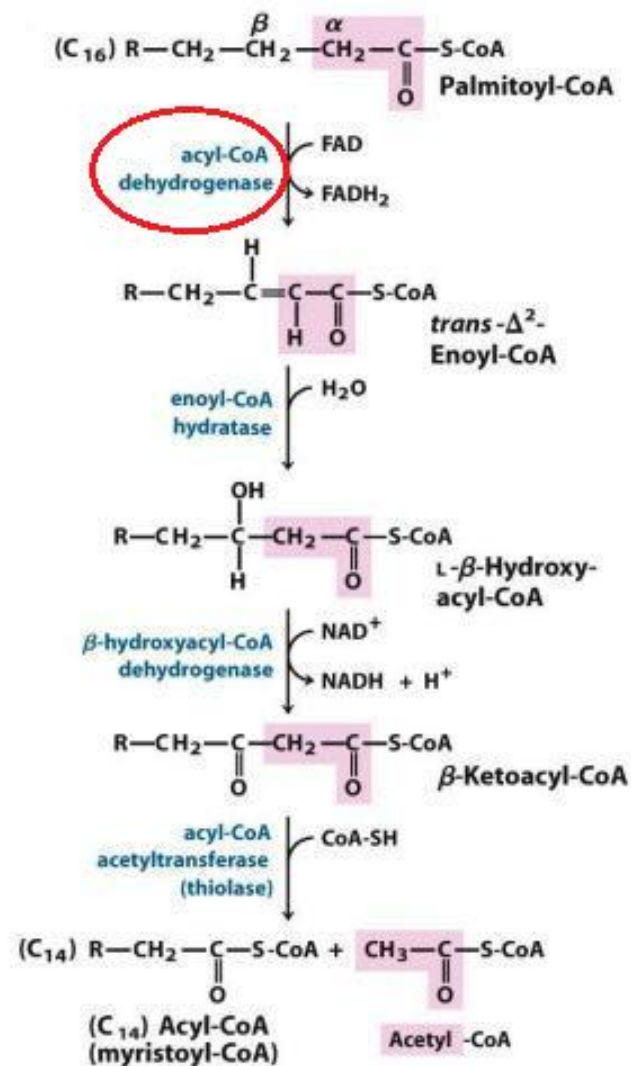
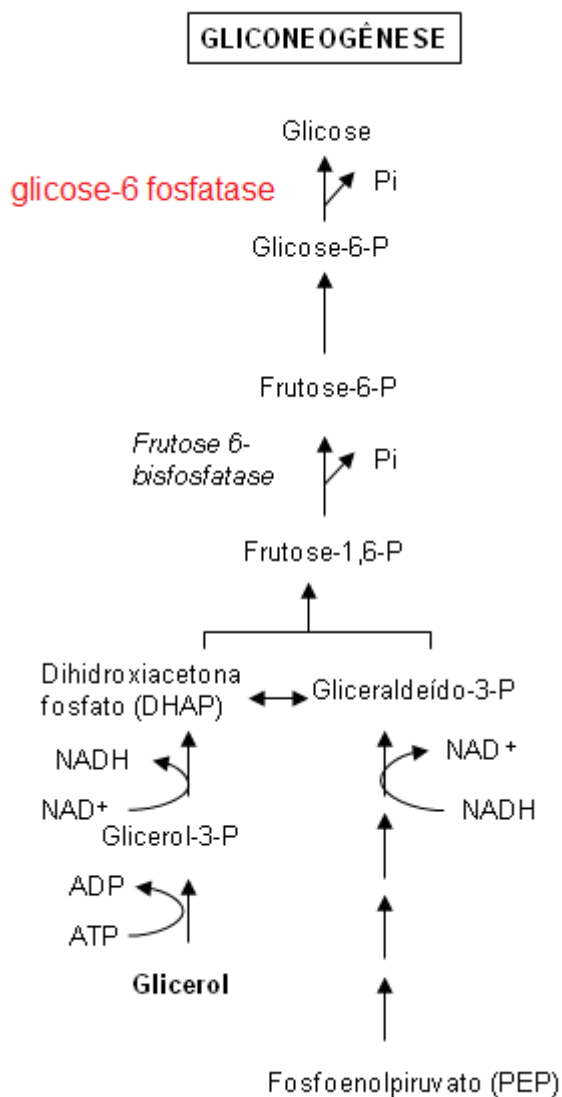


Figura 10: Deficiência de ACC nos ovos do *A. aegypti*. Ovos de mosquitos injetados com dsRNA 3 dias antes da alimentação com sangue. O dsRNA controle utilizado foi o dsFluc. Os ovos mostrados na imagem ao lado esquerdo são de 1 hora após a postura dos ovos e as do lado direito são os mesmos ovos 3 horas depois (Adaptado de: ALABASTER *et al.*, 2011).



Retirado de: <<http://nutrisdoexercicio.wordpress.com/2013/04/13/interrelacoes-das-rotas/>> Acesso em: 01/07/2014.

Figura 11: β -oxidação. A acil-CoA desidrogenase catalisa a primeira etapa da β -oxidação, que tem como resultado a retirada de dois carbonos na cadeia do ácido graxo de cadeia longa na forma de acetil-CoA, gerando também 1NADH e 1FADH₂. O acetil-CoA será destinado ao ciclo de Krebs e o NADH e FADH₂ a cadeia respiratória, ambas resultando na produção de ATP.



Adaptado de: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Glic%C3%B3lise#mediaviewer/Ficheiro:Glicolise-gliconeogenese.png>> Acesso em: 27/06/2014.

Figura 12: Gliconeogênese. A gliconeogênese consiste na formação de glicose a partir de precursores não-carboidrato, tais como produtos de quebras de lipídeos e proteínas.

A avaliação da gliconeogênese durante a embriogênese foi feita anteriormente correlacionando o conteúdo de proteína e glicose dos ovos, e a atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave dessa via e foi observado que há um aumento dessa via após a formação da banda germinal dos embriões de *A. aegypti* (VITAL *et al.*, 2010). O conteúdo de glicose aumentou até as 15 horas, e depois foi reduzindo gradativamente ao longo da embriogênese (Figura 7). O conteúdo total de proteína dos ovos aumentou até as 5 horas e a partir desse momento até a metade da retração da banda germinal, o

conteúdo de proteína foi mantido e depois reduzido drasticamente entre as 24 e 48 horas, permanecendo em baixa quantidade até o final da embriogênese (Figura 13A). A atividade da PEPCK diminuiu continuamente até as 15 horas, sendo inversamente correlacionada com o conteúdo de glicose, e em seguida, sua atividade dobrou entre 24 e 48 horas, permanecendo alta até o final da embriogênese (Figura 13B), concomitantemente com uma significativa diminuição do conteúdo de proteína (Vital *et al.*, 2010)

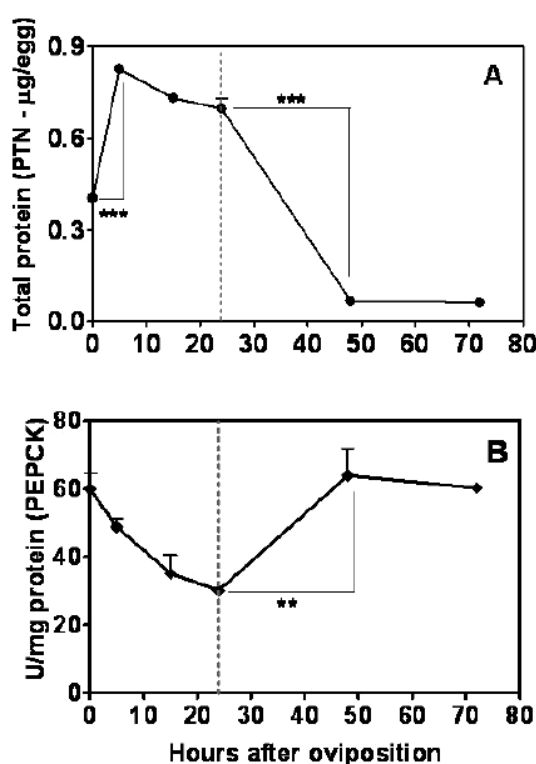
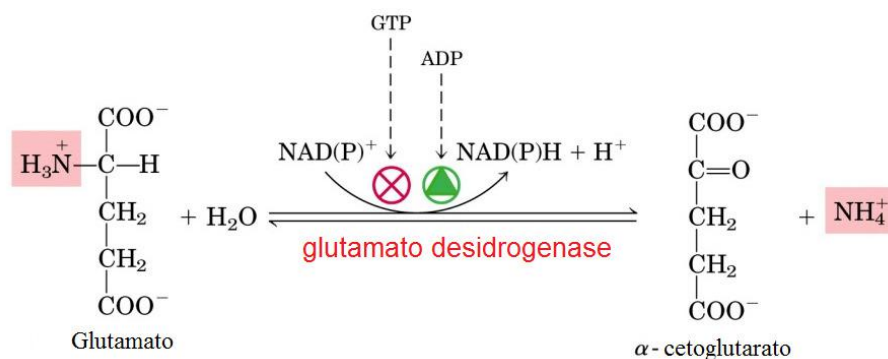


Figura 13 – Gliconeogênese durante a embriogênese do *A. aegypti*. A concentração de proteínas (A) e a atividade da PEPCK (B) foram medidas em homogenatos de ovos. Cada experimento foi realizado em triplicata e as barras de erros representam o desvio padrão das amostras (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ANOVA). A linha pontilhada em 24 horas representa o momento da retração da banda germinal (Vital *et al.*, 2010).

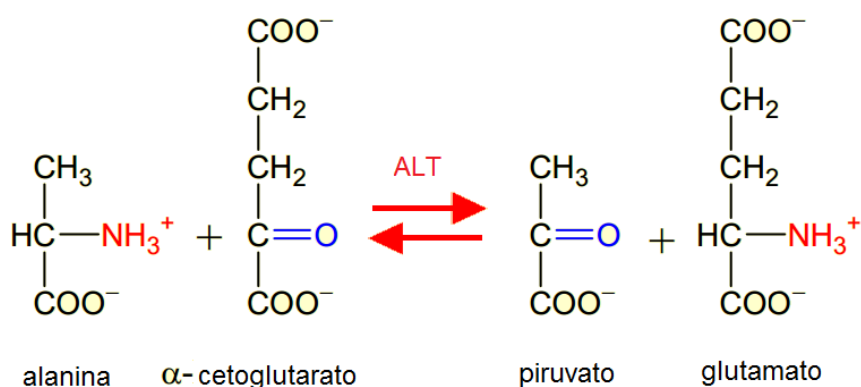
No que diz respeito à participação de aminoácidos no metabolismo energético, em fêmeas de mosquitos após realizarem sua alimentação sanguínea os aminoácidos derivados da digestão de proteínas podem ser usados para síntese de proteínas e de lipídeos dos ovos ou ainda, em situações de equilíbrio energético

desfavorável, serem oxidados pelos tecidos da fêmea para produção de energia (VITAL, 2006). O ovo fertilizado de inseto é um sistema fechado dependente do conteúdo do vitelo para a embriogênese e para nutrição do embrião.



Adaptado de: <<http://www.rc.unesp.br/ib/bioquimica/catabolismo.pdf>> Acesso em: 30/06/2014

Figura 14: Catabolismo de aminoácidos. A glutamato desidrogenase (GD) catalisa a incorporação de amônia, como grupo amino, no alfa-cetoglutarato gerando glutamato e utiliza NADPH como coenzima, sendo regulado pelo ADP. A reação reversa é catalisada pela mesma enzima utilizando NAD como coenzima, sendo regulada pelo GTP.



Adaptado de: <<http://www2.iq.usp.br/docente/henning/sinteseaminoacidos.pdf>> Acesso em: 30/06/2014

Figura 15: Degradação de proteínas. A alanina aminotransferase (ALT) catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o α-cetoglutarato, resultando na formação de piruvato e glutamato.

A literatura atual não fornece muitas informações sobre os eventos metabólicos durante o desenvolvimento do embrião do *Aedes aegypti*. Dados como atividade e expressão de vias metabólicas centrais ou determinação das reservas energéticas tem sido negligenciadas.

2. JUSTIFICATIVA

Com a falta de vacinas eficazes contra a dengue existente no mercado, a forma mais importante de prevenção a essa doença é o combate ao vetor. Alguns estudos já foram feitos em larvas e adultos do *Aedes aegypti*, mas pouco se conhece sobre a embriogênese desse vetor. Uma estratégia para o desenvolvimento de novos métodos de controle pode depender da caracterização das vias metabólicas existentes nesses insetos, a fim de se identificar alvos presentes neles que não estejam presentes no ser humano.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Monitorar a transcrição de genes controladores das principais vias metabólicas durante a formação dos embriões do mosquito *Aedes aegypti*, usando pontos antes (5^a hora e 15^a hora), durante (24^a hora) e depois (48^a hora e 62^a hora) da retração da banda germinal.

3.2. Objetivos específicos

- I. Monitorar, através de qRT-PCR em tempo real, a transcrição de genes de enzimas do metabolismo de carboidratos: glicose-6-fosfatase, glicogênio sintase e fosfofrutoquinase-1.
- II. Monitorar, através de qRT-PCR em tempo real, a transcrição dos genes de enzimas que participam da degradação de proteínas: alanina aminotransferase e glutamato desidrogenase
- III. Monitorar, através de qRT-PCR em tempo real, a transcrição de genes de enzimas do metabolismo de lipídeos: acetil-CoA carboxilase e acil-Coa desidrogenase

4. METODOLOGIA

4.1. Manutenção da colônia de *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller)

A manutenção foi feita diariamente pelos alunos do laboratório. As larvas foram mantidas em uma bandeja com água e ração triturada. Eventualmente quando a água da bandeja estava suja, trocávamos a água e colocávamos ração nova.

Quando as larvas da bandeja entravam no estágio de pupa, o último antes de virarem adultos, foram coletadas com uma pipeta e colocadas em um pote plástico pequeno com água destilada. Os potes com as pupas foram colocados dentro de gaiolas onde tornavam-se adultos. Um erlenmeyer contendo 50 ml de solução de sacarose a 10% foi colocado dentro da gaiola com um rolo de gaze dentro dele com a ponta pra fora, para que os mosquitos adultos pudessem se alimentar, até que houvesse a alimentação com o sangue.

4.2. Coleta de ovos para manutenção da colônia

As gaiolas foram alimentadas com sangue animal quinzenalmente. Eram utilizados camundongos alternados entre as alimentações, os animais eram imobilizados em um saquinho feito de tela e colocados sobre a gaiola durante 15 minutos. Após a alimentação, as fêmeas foram mantidas dentro das gaiolas com os machos para serem fecundadas. Dentro da gaiola foi colocado um pote plástico forrado com papel filtro e água até a metade para que as fêmeas pudessem fazer a postura dos ovos no papel úmido.

4.3. Coleta sincronizada de ovos

Para a obtenção dos ovos nos tempos desejados para os experimentos, as gaiolas de mosquitos a serem alimentadas foram reservadas com antecedência. Os mosquitos utilizados tinham em torno de uma semana de vida, contando a partir do dia em que as pupas foram coletadas, pois nesse período as fêmeas já estavam férteis. No dia anterior ao repasto sanguíneo, a sacarose foi retirada da gaiola para que as fêmeas se alimentassem melhor de sangue e fizessem uma postura de ovos mais farta. As gaiolas foram alimentadas com sangue de camundongo, como descrito no item 4.2. e em seguida a sacarose foi recolocada na gaiola em um algodão pelo lado de fora da tela, para que as fêmeas não fizessem a postura de

ovos na solução, pois a coleta dos ovos só foi realizada quatro dias após o repasto sanguíneo.

Para a coleta dos ovos, os machos foram retirados das gaiolas para que não atrapalhasse na oviposição, para isto, a gaiola foi colocada durante dois minutos no congelador, os mosquitos entravam em dormência e em seguida os machos foram retirados com uma pinça e descartados. Em seguida, cerca de 20 fêmeas foram colocadas, ainda adormecidas, no meio de uma placa de petri forrada com papel filtro e enroladas com fita crepe para que não acontecesse nenhum acidente e os mosquitos não escapassem. Após as fêmeas saírem da dormência, o papel filtro foi umedecido com água destilada e as placas colocadas em estufa sob temperatura e umidade controladas por 30 minutos a 26°C com a luz apagada para ser realizada a oviposição. Passados os 30 minutos, a placa foi aberta dentro da gaiola para que as fêmeas saíssem. A sincronização foi feita determinando-se a hora zero como 15 minutos após o início da oviposição. A umidade do papel das placas foram frequentemente monitoradas até que se atingisse o horário desejado, para que não houvesse interrupção da embriogênese.

Após os ovos serem retirados das placas, foram transferidos para microtubos de 1,5ml, macerados com TRIzol® e armazenados no freezer a -80°C até que fosse feita a extração do RNA.

4.4. Extração de RNA

Inicialmente, o pistilo foi colocado de molho em um microtubo de 1,5ml contendo água DEPC e esterilizado em luz ultravioleta por 15 minutos para eliminação de possíveis RNAses. Cerca de 20mg de ovos armazenadas nos microtubos foram macerados, com o pistilo, em cinquenta microlitros (50µl) do reagente TRIzol®, após os ovos terem sido devidamente macerados, o volume de TRIzol® foi completado para 1 mililitro (1ml). A amostra foi centrifugada a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O material insolúvel descartado e o sobrenadante foi deixado descansando por 5 minutos em temperatura ambiente e depois adicionado duzentos microlitros (200µl) de clorofórmio. O microtubo foi agitado vigorosamente para desfazer as fases e em seguida ficava em repouso em temperatura ambiente por 4 minutos. A amostra foi novamente centrifugada a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A fase transparente, superior separada em outro microtubo e a ela foram adicionados

duzentos e cinquenta microlitros (250 μ L) de isopropanol e duzentos e cinquenta microlitros (250 μ L) de solução de alto sal. A amostra foi agitada e deixada no -20 $^{\circ}$ C de um dia para o outro para precipitar melhor. No dia seguinte, foi realizada a centrifugação da amostra a 12.000g por 10 minutos a 4 $^{\circ}$ C. O sobrenadante descartado e adicionado 1 mililitro (1ml) de etanol 75% ao precipitado formado, o microtubo foi então agitado vigorosamente, centrifugado a 10.000g por 10 minutos a 4 $^{\circ}$ C. O etanol foi descartado, com cuidado para o precipitado não escorrer, o microtubo foi deixado de cabeça para baixo em uma toalha de papel, para que o precipitado secasse.

4.5. Quantificação do RNA

Após diluir a amostra de RNA cem vezes para um volume final de 1ml foi feita a leitura em espectrofotômetro na função multi λ (260nm – 280nm), onde A1 é a absorbância a 260nm e A2 é a absorbância a 280nm. A razão A1/A2 ideal é entre 1,8 e 2,0 que indica que o RNA não foi degradado. Para calcular a concentração do RNA foi utilizada a fórmula: $A1 (260nm) \times 0,04 \times 100 = [RNA] \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Pois sabemos que:

A 260nm do RNA (simples fita) = 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = 0,040 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

4.6. Síntese da primeira fita de cDNA

O precipitado de RNA foi ressuspenso em 20 μL de água ultra pura estéril. Em outro tubo próprio para PCR, foram adicionados 2 μL de oligo(dT)12-18 e em seguida 2 μg do RNA (calculada a concentração do RNA e o volume necessário para se obter 2 μg). A amostra foi aquecida a 70 $^{\circ}$ C por 10 minutos e imediatamente incubada em gelo por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado 4 μL do tampão (*first strand buffer*) fornecido pelo fabricante para a enzima transcriptase reversa SUPERScript II (GibcoBRL cat n $^{\circ}$ 18064-014), 2 μL de DTT 0,1 M e 2 μL de dNTP 10 mM (10 mM de dATP, 10 mM de dCTP, 10 mM de dGTP e 10 mM de dTTP). A amostra foi homogeneizada por inversão e incubada no termociclador a 42 $^{\circ}$ C por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 μL da enzima SUPERScript II (200 unidades) e o material incubado a 42 $^{\circ}$ C por 1 hora. A enzima foi inativada por aquecimento a 70 $^{\circ}$ C por 15 minutos.

4.7. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Foi feita uma busca no banco de dados do NCBI, na sessão de nucleotídeos através do nome da enzima em inglês seguida pela palavra “*Aedes aegypti*”, para se obter a sequência de nucleotídeos para as enzimas desejadas. Essa sequência foi copiada para o programa Primer 3 Design (Steve Rozen, Helen J. Skaletsky (1998) Primer3. Disponível em: http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html.) e o tamanho do produto desejado foi definido (aproximadamente 120 pares de bases), a temperatura de anelamento (TM) em torno de 60°C e o programa nos sugeriu o par de iniciadores que melhor se adaptava as exigências. Os iniciadores foram encomendados na empresa IDT.

	INICIADOR SENSO	INICIADOR ANTI-SENSO	TAMANHO DO PRODUTO
Alanina Aminotransf.	GAATTCGGTGTTCCTCACTCGT TM: 59,97	AATACCGCATTACCCATGT TM: 60,08	118
Acetil-CoA Carboxilase	CGTTTCTTCATCCGTTTCGAT TM: 60,07	GCAACTTCCAATTCGTCCAT TM: 59,94	122
Acil-CoA desidrogenase	TTCGTTTCATGCTGGCAGATA TM: 60,37	ATTTGGCAATCGAGGCATAG TM: 60,06	119
PFK	ATTCACGACGGTATCGAAGG TM: 59,96	CTGGAAGGGTACGCTTGGTA TM: 60,12	118
Glicose-6-fosfatase	GAAGATGGCGTTCAAATGGT TM: 59,94	TCAGAACAGGTCCAACAACG TM: 59,72	122
Glicogênio Sintase	GAAGATGGCGTTCAAATGGT TM: 60,11	TCAGAACAGGTCCAACAACG TM: 59,876	120
Glutamato Desid. (Isoforma A)	CAGGGCACGGAATAATGACT TM: 59,96	GATAATCCTGCGCCTTCGTA TM: 60,20	118
Glutamato Desid. (Isoforma B)	TGCTGACAAGATCCTCATCG TM: 59,94	CGTACGAGACGTGGTTCAGA TM: 59,90	119

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise da expressão em tempo real: Sequência, temperatura de anelamento e tamanho dos produtos dos iniciadores utilizados na análise no qRT-PCR.

4.8. Amplificação do cDNA por PCR

Para a reação de amplificação do fragmento de cDNA por PCR foram adicionados em um tubo (0,5 mL) 10 μ L de tampão para PCR (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4 contendo 500 mM de KCl), 3 μ L de MgCl₂ (50 mM), 2 μ L de dNTP`s (10 mM), 1,0 μ L do iniciador "Forward" (10 μ M), 1,0 μ L do Iniciador Reverso (10 μ M), 1,0 μ L de Taq (5 U/ mL) , 5 μ L do cDNA e 80 μ L DE água estéril. O programa utilizado foi o seguinte: 94 °C – 5 min; 30 ciclos de (94 °C – 40 s; 59,8 °C – 1 min; 72 °C – 2 min) e 1 ciclo (72 °C – 5 min).

4.9. Eletroforese em gel de agarose

A solução de agarose 1 % (p/v) em TAE (tampão Tris-acetato 40 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) foi aquecida em forno de micro-ondas até completa dissolução da agarose. Em seguida, a agarose foi colocada na cuba e após completa solidificação, as amostras foram aplicadas e submetidas a uma voltagem de 100 V por 30 minutos. Os géis foram retirados da cuba, incubados em solução de brometo de etídio (10 mg / mL) por aproximadamente 1 minuto.

4.10. Análise quantitativa (qRT-PCR)

Antes do início do experimento no equipamento StepOne Plus da Applied Biosystems, foi feito um esboço da placa de PCR no Microsoft Excel 2007. A placa possuía 96 poços, onde foram aplicadas as amostras em triplicata. Na reação do qRT-PCR para análise dos níveis transcricionais das enzimas foi utilizado o kit *FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche)* da Applied Biosystems, o par de polinucleotídeos iniciadores para o gene desejado com concentração de 10 μ M e o cDNA dos diferentes estágios da embriogênese 20x diluído. Em cada poço da placa foi colocado dez microlitros (10 μ l) do mix de SYBR e polinucleotídeos iniciadores e cinco microlitros (5 μ l) da amostra. A quantidade relativa de mRNA das enzimas foi normalizada pelo gene ribossomal constitutivo o *rp49* (GENTILE; LIMA; PEIXOTO, 2005).

5. RESULTADOS

5.1. Análise da expressão gênica da Fosfofrutoquinase-1 durante a embriogênese do *Aedes aegypti*.

A enzima PFK-1 apresentou expressão gênica significativa apenas nos momentos iniciais da embriogênese, decrescendo drasticamente até a vigésima quarta hora da embriogênese, onde ocorre a retração da banda germinal. Após 24 horas há um pequeno aumento até o final do desenvolvimento do embrião.

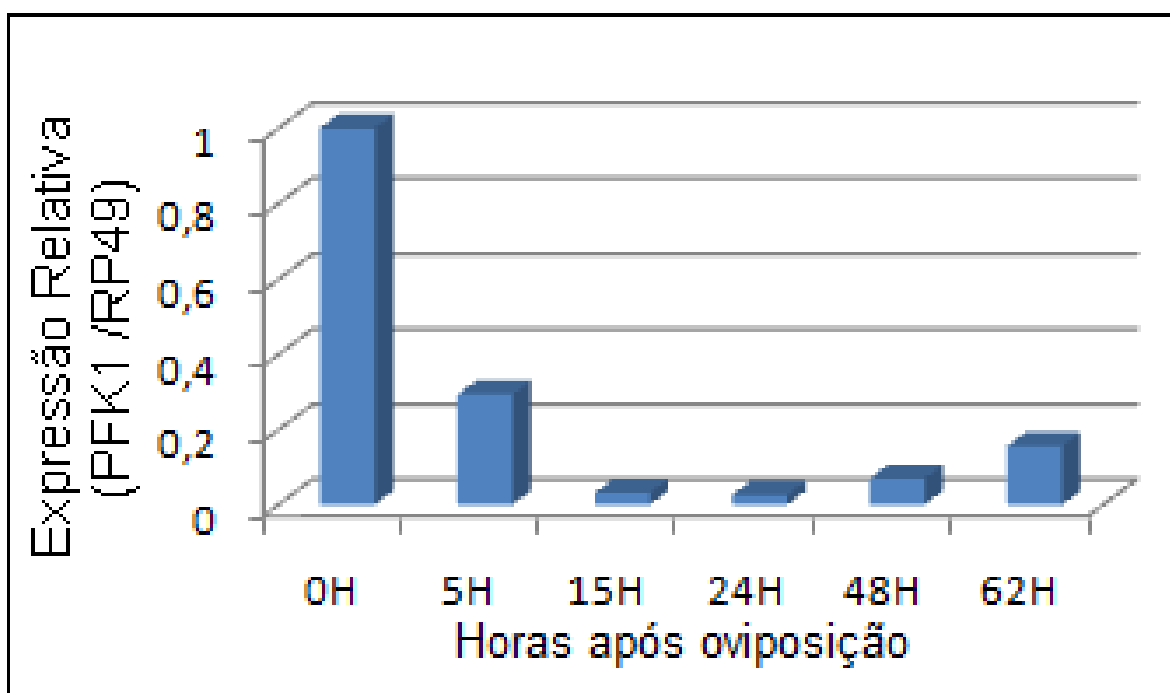


Figura 16 – Expressão relativa da PFK-1: Os ovos foram coletados de forma sincronizada como descrito na metodologia, foram utilizados ovos com 0h, 5h, 15h, 24h, 48h e 62h de desenvolvimento. O RNA foi extraído com o reagente TRIzol®, o cDNA sintetizado utilizando a enzima transcriptase reversa II. A análise dos níveis transcricionais foi realizada no equipamento Step One Plus da Applied Biosystems utilizando o reagente SYBR Green.

5.2. Análise da expressão gênica da enzima Glicogênio sintase durante a embriogênese do *Aedes aegypti*.

A enzima glicogênio sintase apresentou expressão gênica significativa apenas no momento seguinte a oviposição, reduzindo significativamente já na quinta hora após a postura dos ovos e a partir da décima quinta hora já não são observados níveis significativos.

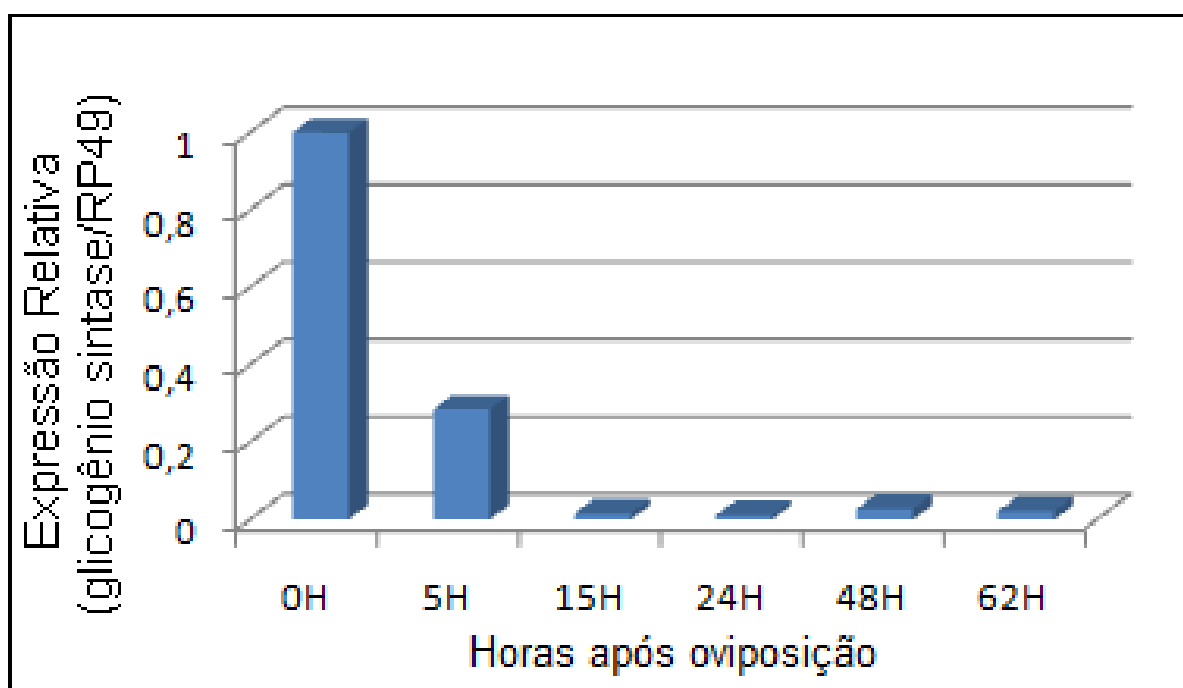


Figura 17: Expressão relativa da Glicogênio sintase: Os ovos foram coletados de forma sincronizada como descrito na metodologia, foram utilizados ovos com 0h, 5h, 15h, 24h, 48h e 62h de desenvolvimento. O RNA foi extraído com o reagente TRIzol®, o cDNA sintetizado utilizando a enzima transcriptase reversa II. A análise dos níveis transcricionais foi realizada no equipamento Step One Plus da Applied Biosystems utilizando o reagente SYBR Green.

5.3. Análise da expressão gênica da enzima Acetil-CoA carboxilase durante a embriogênese do *Aedes aegypti*.

A enzima acetil-CoA carboxilase apresentou uma expressão decrescente até a retração da banda germinal na vigésima quarta hora após a oviposição, voltando a aumentar em 48h, sendo cerca de 6 vezes maior em 0h e 4 vezes maior em 48h, em relação a 24h.

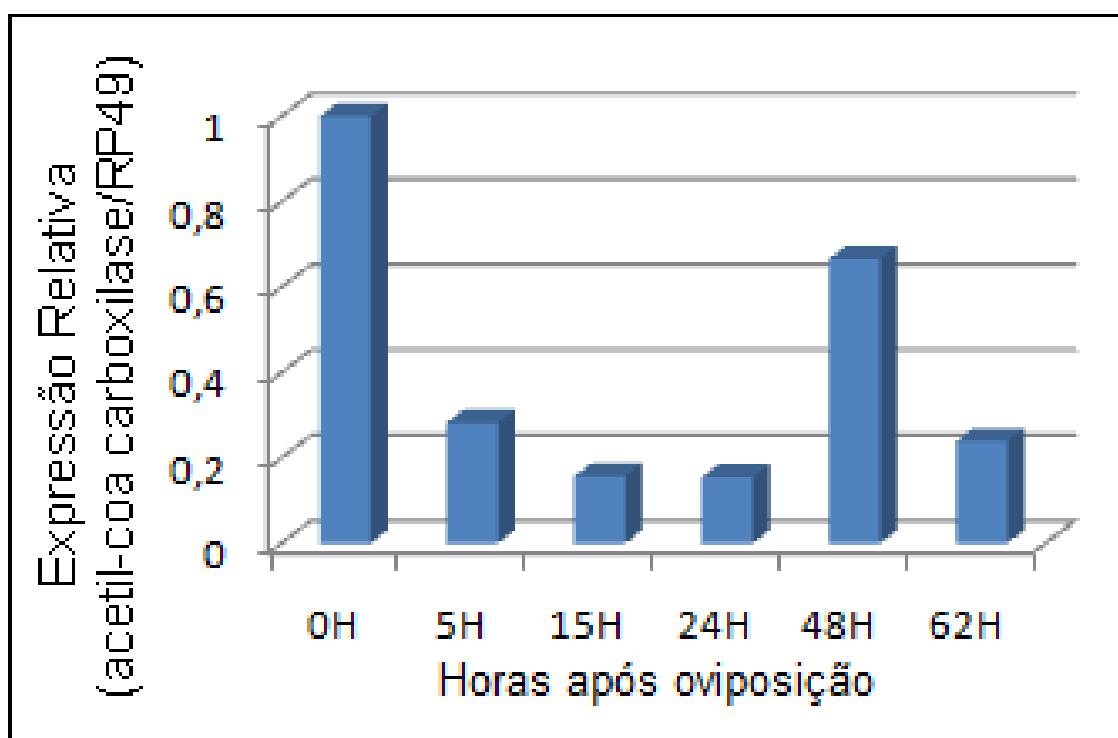


Figura 18 - Expressão relativa da Acetil-CoA carboxilase: Os ovos foram coletados de forma sincronizada como descrito na metodologia, foram utilizados ovos com 0h, 5h, 15h, 24h, 48h e 62h de desenvolvimento. O RNA foi extraído com o reagente TRIzol®, o cDNA sintetizado utilizando a enzima transcriptase reversa II. A análise dos níveis transcricionais foi realizada no equipamento Step One Plus da Applied Biosystems utilizando o reagente SYBR Green.

5.4. Análise da expressão gênica da enzima Glicose-6 fosfatase durante a embriogênese do *Aedes aegypti*.

A enzima glicose 6-fosfatase apresentou expressão baixa com 5h, 15h e 24h de desenvolvimento. E observamos uma expressão crescente após a retração da banda germinal, sendo cerca de 40 vezes mais expressa nos momentos iniciais da embriogênese em relação à 24h.

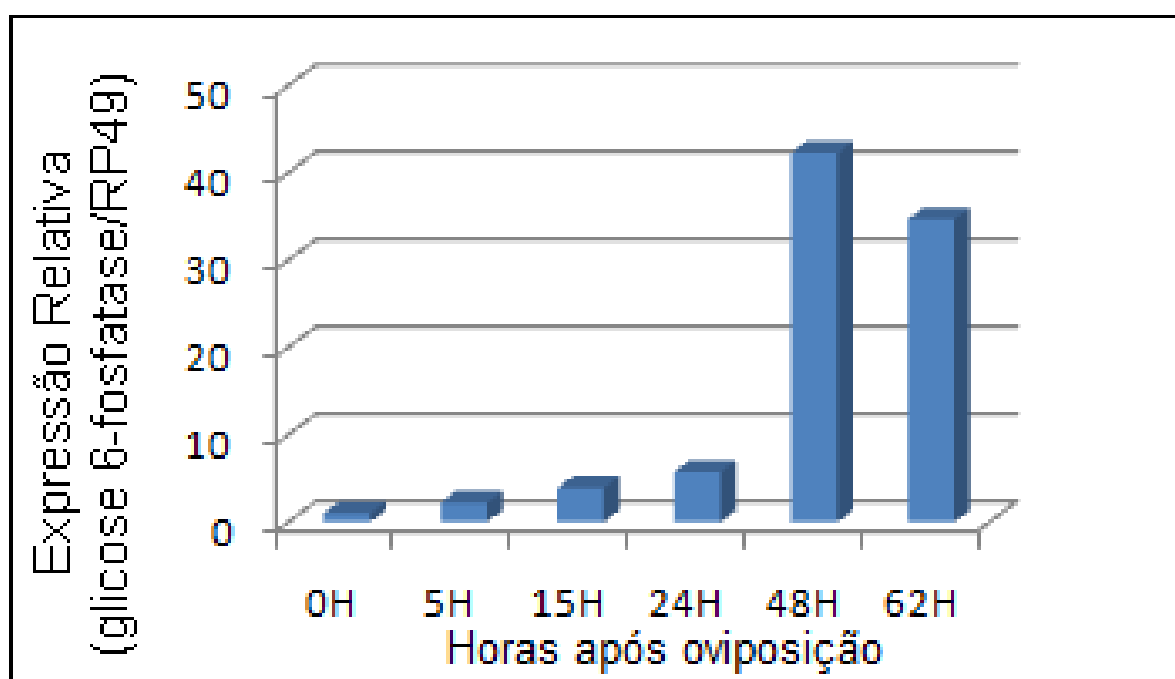


Figura 19 – Expressão relativa da Glicose-6 fosfatase: Os ovos foram coletados de forma sincronizada como descrito na metodologia, foram utilizados ovos com 0h, 5h, 15h, 24h, 48h e 62h de desenvolvimento. O RNA foi extraído com o reagente TRIzol®, o cDNA sintetizado utilizando a enzima transcriptase reversa II. A análise dos níveis transcricionais foi realizada no equipamento Step One Plus da Applied Biosystems utilizando o reagente SYBR Green.

5.5. Análise da expressão gênica da enzima Acil-CoA desidrogenase durante a embriogênese do *Aedes aegypti*.

A enzima acil-CoA desidrogenase apresentou expressão decrescente até a retração da banda germinal, sendo até cinco vezes mais expressa no início da embriogênese, em relação a 24h.

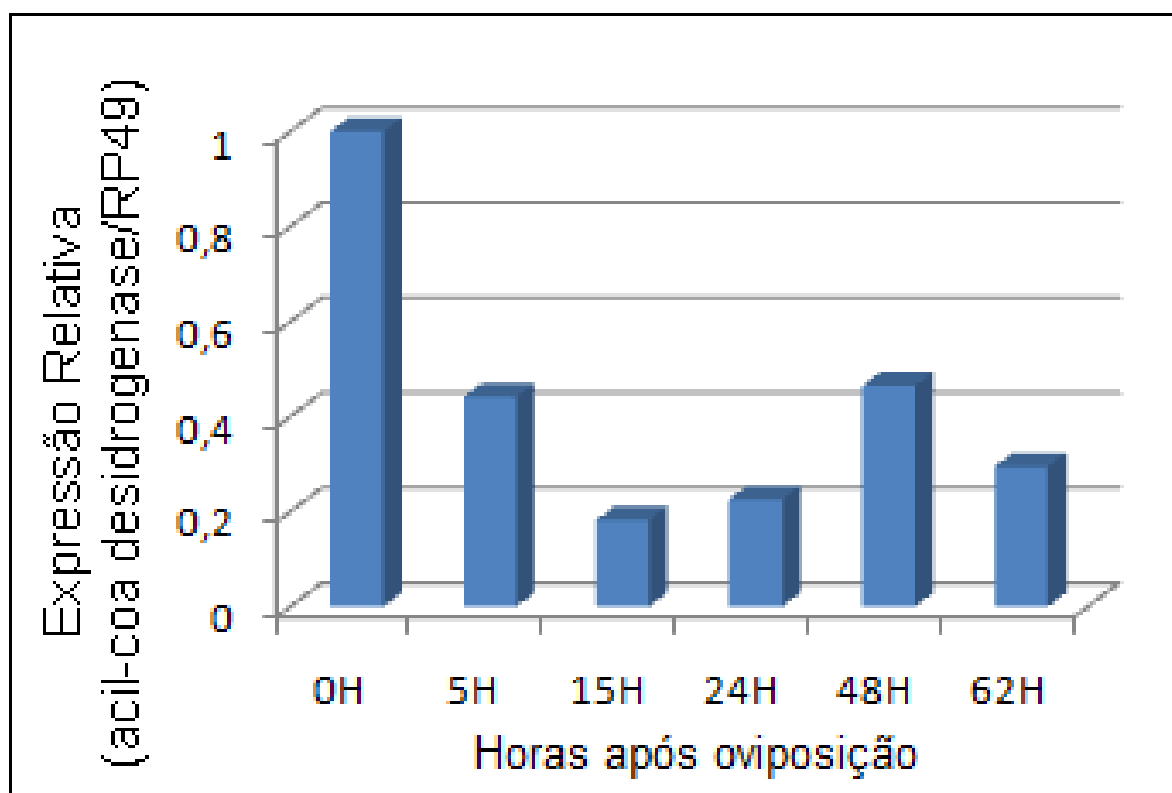


Figura 20 – Expressão relativa da Acil-CoA desidrogenase: Os ovos foram coletados de forma sincronizada como descrito na metodologia, foram utilizados ovos com 0h, 5h, 15h, 24h, 48h e 62h de desenvolvimento. O RNA foi extraído com o reagente TRIzol®, o cDNA sintetizado utilizando a enzima transcriptase reversa II. A análise dos níveis transcricionais foi realizada no equipamento Step One Plus da Applied Biosystems utilizando o reagente SYBR Green.

5.6. Análise da expressão gênica da enzima Alanina aminotransferase durante a embriogênese do *Aedes aegypti*.

A enzima alanina aminotransferase apresentou uma expressão bastante variada, sendo mais expressa em 0h, 15h e 24h.

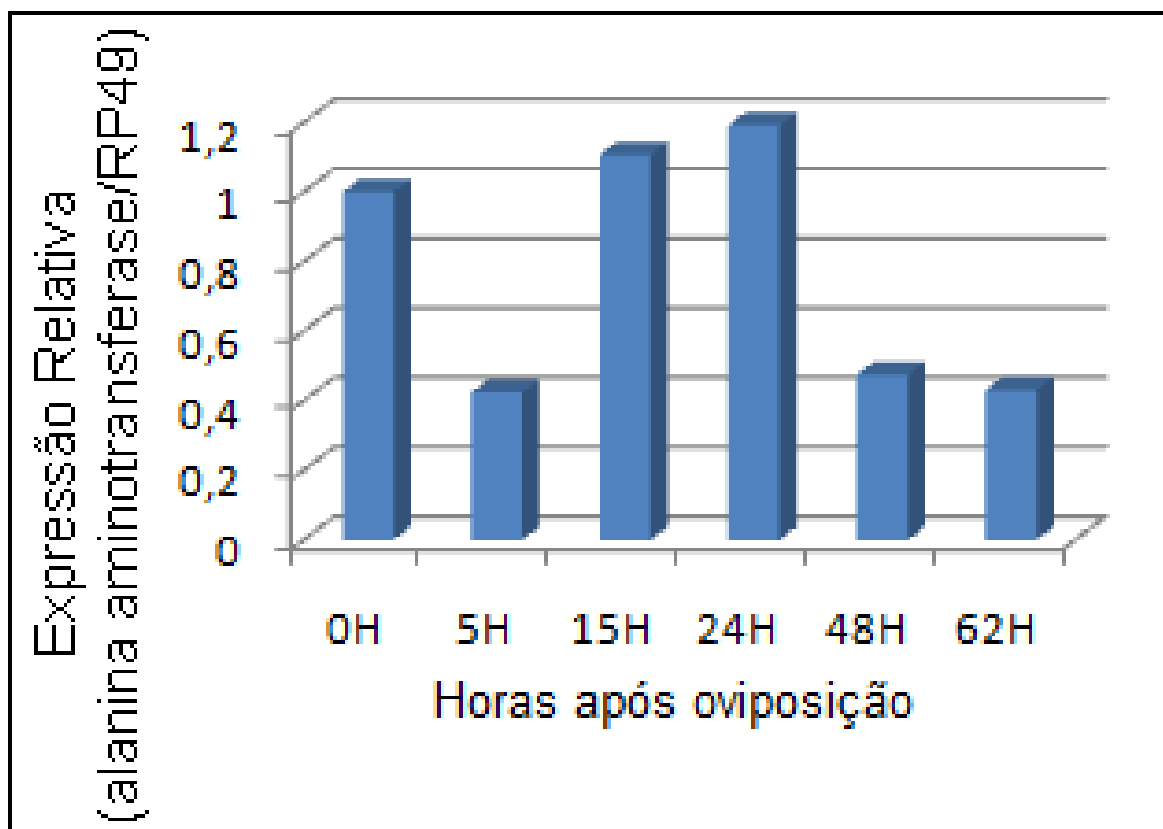


Figura 21 – Expressão relativa da Alanina aminotransferase: Os ovos foram coletados de forma sincronizada como descrito na metodologia, foram utilizados ovos com 0h, 5h, 15h, 24h, 48h e 62h de desenvolvimento. O RNA foi extraído com o reagente TRIzol®, o cDNA sintetizado utilizando a enzima transcriptase reversa II. A análise dos níveis transcricionais foi realizada no equipamento Step One Plus da Applied Biosystems utilizando o reagente SYBR Green.

5.7. Análise da expressão gênica da isoforma A da enzima Glutamato desidrogenase durante a embriogênese do *Aedes aegypti*.

A isoforma A da enzima glutamato desidrogenase apresentou expressão bem variada ao longo do desenvolvimento do embrião, sendo mais expressa na quinta hora da embriogênese e menos expressa nos momentos iniciais.

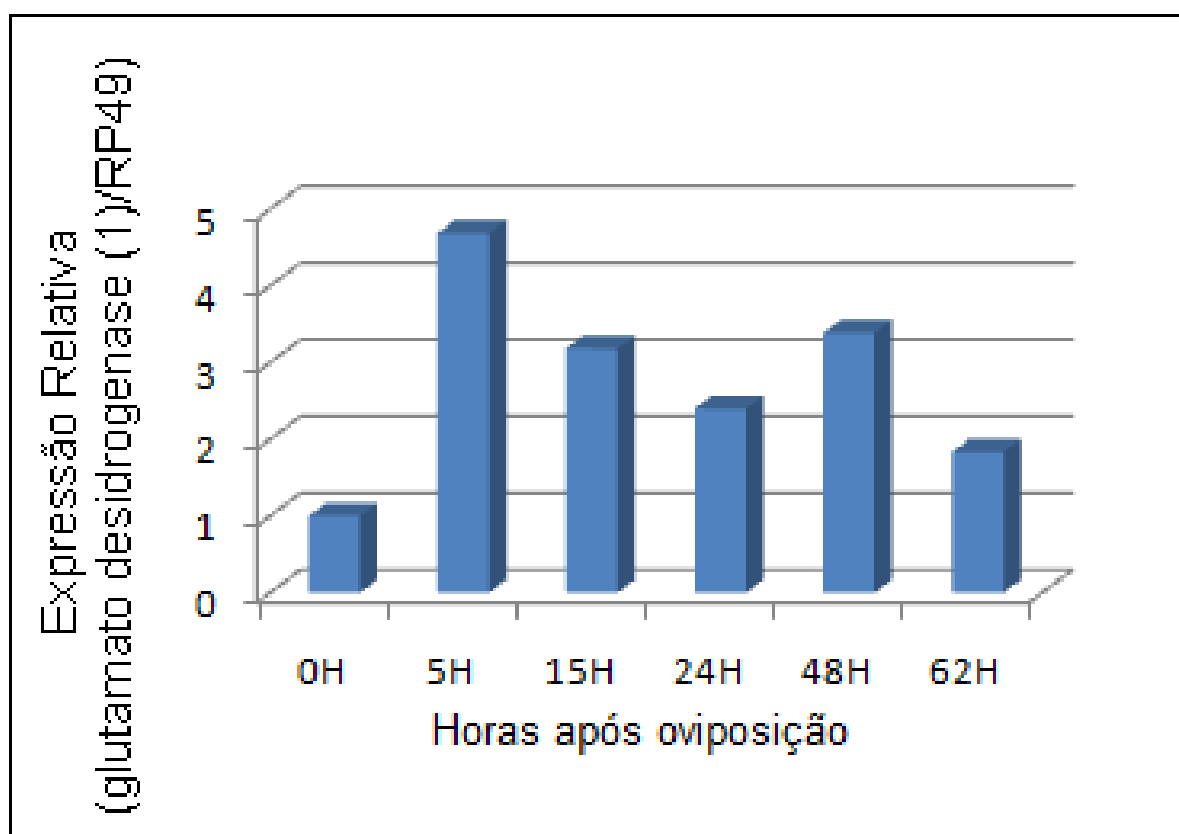


Figura 22: Expressão da Glutamato desidrogenase (isoforma A) Os ovos foram coletados de forma sincronizada como descrito na metodologia, foram utilizados ovos com 0h, 5h, 15h, 24h, 48h e 62h de desenvolvimento. O RNA foi extraído com o reagente TRIzol®, o cDNA sintetizado utilizando a enzima transcriptase reversa II. A análise dos níveis transcricionais foi realizada no equipamento Step One Plus da Applied Biosystems utilizando o reagente SYBR Green.

5.8. Análise da expressão gênica da isoforma B da enzima Glutamato desidrogenase durante a embriogênese do *Aedes aegypti*.

A isoforma B da enzima glutamato desidrogenase apresentou expressão variada ao longo da embriogênese, sendo mais expressa nas cinco primeiras horas da embriogênese.

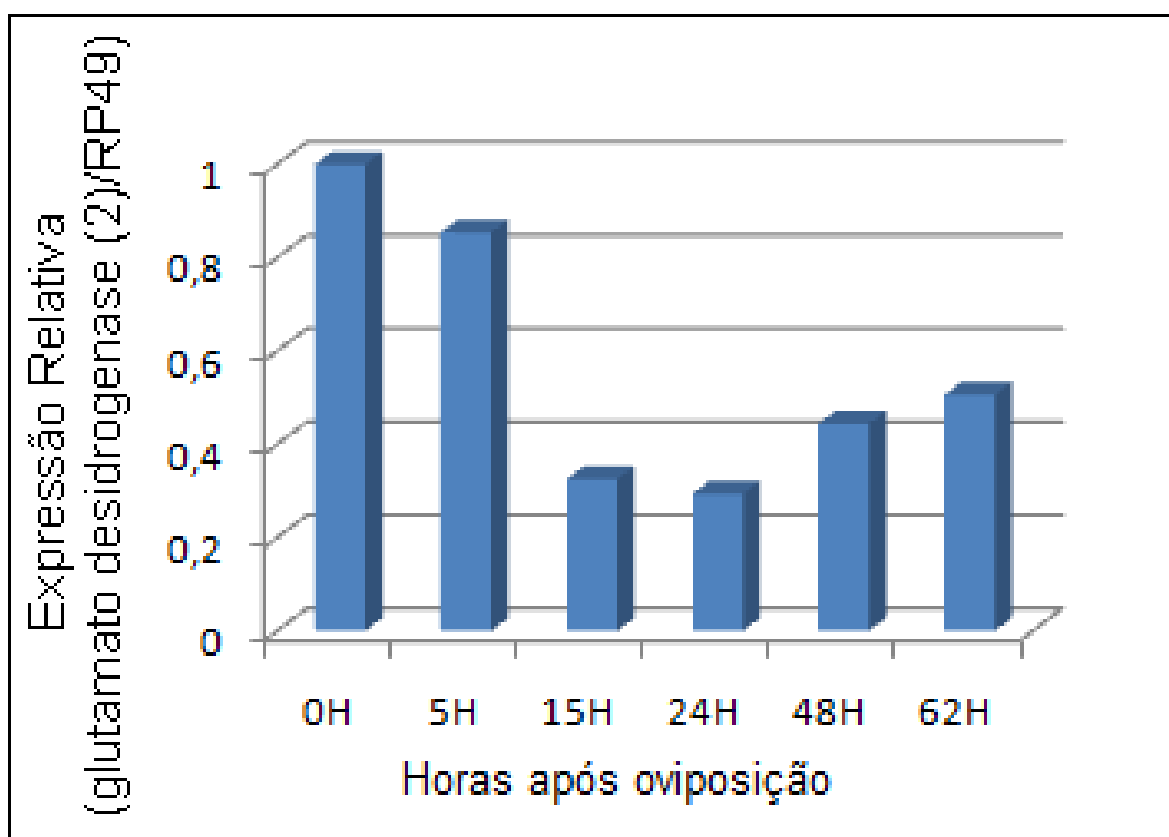


Figura 23 - Expressão da Glutamato desidrogenase (isoforma B): Os ovos foram coletados de forma sincronizada como descrito na metodologia, foram utilizados ovos com 0h, 5h, 15h, 24h, 48h e 62h de desenvolvimento. O RNA foi extraído com o reagente TRIzol®, o cDNA sintetizado utilizando a enzima transcriptase reversa II. A análise dos níveis transcricionais foi realizada no equipamento Step One Plus da Applied Biosystems utilizando o reagente SYBR Green.

6. DISCUSSÃO

Um estudo anterior envolvendo a análise de expressão gênica em RT-PCR semi-quantitativo durante o desenvolvimento do embrião do bicho da seda *Bombyx mori* em ovos em diapausa e não-diapausa (PONNUVEL *et al.*, 2010), revelou que a expressão da PFK começou em um nível superior na fase inicial (6h após a oviposição) nos ovos não-diapausa, assim como observado para a PFK1 na embriogênese do *A. aegypti* que apresentou níveis de mRNA mais elevados nos momentos iniciais do desenvolvimento do embrião, além disso, após a 24^a hora os níveis voltam a aumentar, corroborando os resultados anteriores de outro estudo (VITAL *et al.*, 2010) que, através da análise da atividade de enzimas chave dessa via, afirma que a glicólise é intensificada após a retração da banda germinal (Figura 5). A PFK facilita a utilização das reservas de carboidratos que são fundamentais para o desenvolvimento do embrião.

Os níveis de mRNA da GS apresentam-se elevados apenas nos momentos iniciais da embriogênese. Essa enzima participa da síntese do glicogênio, é ativada quando os níveis de glicose estão elevados e é inibida pela GSK3. Vital e colaboradores (2010) sugeriram que o aumento nos níveis de transcrição da GSK3 observados (Figura 8) pode significar sua ativação como um mecanismo para inibir a atividade da GS e regular a cinética de incorporação do glicogênio no desenvolvimento, podendo explicar o perfil similar entre as duas enzimas.

A importância da participação da ACC na formação dos ovos de *A. aegypti* já foi comprovada em estudo anterior utilizando RNA de interferência nas fêmeas alimentadas (ALABASTER *et al.*, 2011), mostrando que a deficiência bioquímica dessa enzima não apenas inibia a síntese de lipídeos em mosquitos alimentados com sangue, como também impactava na formação dos ovos (Figura 10). Os níveis altos de mRNA da ACC em zero hora após a oviposição corrobora esse resultado, já que esse nível acentuado logo no início da embriogênese pode ser proveniente da transferência do material genético da mãe para o embrião.

Os níveis do mRNA da G6Pase mantiveram-se baixos durante as 24 primeiras horas da embriogênese e a partir daí aumentaram cerca de 40 vezes mantendo-se elevados até o fim do desenvolvimento do embrião, concomitantemente com uma consistente redução dos níveis de proteínas (Figura 5), o principal substrato da gliconeogênese, corroborando os resultados anteriores (VITAL *et al.*, 2010) de que a gliconeogênese é intensificada após a retração da banda germinal.

O perfil de transcrição da enzima acil-CoA desidrogenase já foi analisado durante a diapausa dos ovos do mosquito *Aedes albopictus* (REYNOLDS *et al.*, 2012), e foi sugerido que os padrões de expressão dessa enzima exerce um papel importante na regulação do catabolismo de lipídios durante a diapausa. Os níveis de mRNA dessa enzima variaram ao longo do desenvolvimento do embrião do *A. aegypti*, sendo mais elevado em zero hora do desenvolvimento. A acetil-CoA desidrogenase catalisa a primeira etapa da β -oxidação, que é a via primária de degradação de ácidos graxos em eucariotos, e tem envolvimento no processo de diapausa dos ovos, que é uma característica importante relacionada à resistência dos ovos do *A. aegypti*.

A alanina aminotransferase, enzima envolvida com a degradação de proteínas apresenta os níveis de mRNA mais elevados em 15 e 24 horas do desenvolvimento do embrião, e em seguida esses níveis diminuem, concomitantemente, os níveis de proteína observados por Vital e colaboradores (2010) sofrem uma drástica redução em seus níveis a partir da 24^a hora (Figura 13), onde os níveis de ALT são altos.

Como visto nas Figuras 22 e 23, as duas isoformas da glutamato desidrogenase, enzima que participa do catabolismo de aminoácidos, se comportaram de maneira bastante variada ao longo da embriogênese e distintamente entre si. Essa diferença entre as isoformas pode ser devido à localização das mesmas nos compartimentos dentro do ovo, a existência de diferentes isoformas da mesma enzima permite o ajuste do metabolismo para satisfazer as necessidades particulares de um determinado tecido ou etapa do desenvolvimento.

7. CONCLUSÃO

Os resultados mostrados nesse estudo são de grande importância para levar a uma maior compreensão sobre o metabolismo energético durante o desenvolvimento do embrião do mosquito *Aedes aegypti*, sendo de grande significância para o desenvolvimento de métodos de controle mais eficazes contra esse vetor de grande impacto na saúde pública.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALABASTER et al. Deficiencies in acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase 1 differentially affect eggshell formation and blood meal digestion in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Arizona, v.41, n.12, p. 946–955, dez. 2011.

BARRETO, C. *Aedes aegypti* - Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos*, Goiás, v.1, n.2, p. 62-73, nov. 2005.

BRAGA, I.M.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v.16, n.4, p. 279-293, out-dez 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas – 3ª ed., rev., Brasília, abr. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. *Série A. Normas e Manuais Técnicos*, Brasília, n. 176, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de informação de agravos de notificação/ Sistema de informação da dengue. Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990-2013. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/27/Casos-e-incid-dengue-ate-2013.pdf>. Acesso em: 19 jun 2014.

BROGDON W.G., McALLISTER J.C. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, vol.4, n.4 p. 605-613, dez. 1998.

BURKE, S.R. *The Composition and Function of Body Fluids*. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1976. 208 p.

CHAVASSE, D. C.; YAP, H. H. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. *OMS*, Geneva, v.97, n.2, out. 1997.

FERRARI J.A. Insecticide resistance. *The Biology of Disease Vectors*, Colorado - University Press of Colorado, 1996.

FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; MICHELS, P. A. Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, v. 59, n.2, p. 105-235, 1993.

GENTILE C., LIMA J.B., PEIXOTO A.A. Isolation of a fragment homologous to the *rp49* constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.100, n.6, p. 645-647, out. 2005.

GRIMES, A.J. Human Red Cell Metabolism. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, UK, 1980.

GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Tropical Medicine and Health*, Oxford, v. 39, n. 4 Suppl, p. 3-11, ago. 2011.

LUNA, J. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 38, n.6, p. 842-843, dez. 2004.

MELLON RB, GEORGHIOU GP. Rotational use of insecticides in mosquito control programs. *Proceedings and papers of the fifty-second annual Conference of the California and Vector Control Association*, Califórnia, p. 65-67, jan-fev.1984

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. Diretrizes relativas à prevenção e ao controle da dengue e da dengue hemorrágica nas Américas. *Relatório da Reunião sobre Diretrizes para Dengue*, Washington, dez. 1991.

PAIVA, M. Caracterização molecular da resistência a inseticidas químicos em *Aedes aegypti*. 2012. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

PALCHICK S. Chemical Control of Vectors In: *The Biology of Disease Vectors*. Colorado- University Press of Colorado, 1996.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M.O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 37, N.6, p. 813-816, dez. 2003.

PONNUVEL *et al.* Differential gene expression during early embryonic development in diapause and non-diapause eggs of multivoltine silkworm *Bombyx mori*. *Indian J Exp Biol.*, vol.48, n.11, p. 1143-1151, nov. 2010.

REYNOLDS *et al.* Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus*. *J Insect Physiol.*, Columbus, v.58, n. 7, p. 966–973, jul. 2012.

REZENDE *et al.* Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. *BMC Developmental Biology*, v.8, n.1, p. 82-96, set. 2008.

ROSE, R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 7, n. 1, p. 17-23, jan-fev. 2001.

ROZENDAAL, J. A. Vector control methods for use by individuals and communities. *World Health Organization*, Geneve, out. 1997. 425 p.

TEIXEIRA, M. G. *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences?. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 21, n. 5, p. 1307-1315, set-out 2005.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C. N.; BARRETO, F.; BARRETO, M. L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 25, sup. 1, p. 7-18, 2009.

VITAL *et al.* Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. *BMC Developmental Biology*, Campos dos Goytacazes, v.10, p. 25-37, fev. 2010.

VITAL, W. Metabolismo de Glicose Durante a embriogênese do Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). 2006. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, mar. 2006.