

Rafaella Sayuri Ioshino

**Mecanismo da redução de fertilidade
em *Aedes aegypti* infectado por
*Plasmodium gallinaceum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno – Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2013

Rafaella Sayuri Ioshino

**Mecanismo da redução de fertilidade
em *Aedes aegypti* infectado por
*Plasmodium gallinaceum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da relação Patógeno – Hospedeiro.

Orientadora: Prof Dra Margareth de Lara Capurro Guimarães.

Versão original

São Paulo

2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ioshino, Rafaella Sayuri.

Mecanismo da redução de fertilidade em *Aedes aegypti* infectados por *Plasmodium gallinaceum* / Rafaella Sayuri Ioshino. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro Guimarães.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Fisiologia de mosquitos *Aedes aegypti*.

Versão do título para o inglês: Mechanism of fecundity reduction in *Aedes aegypti* infected by *Plasmodium gallinaceum*.

1. *Aedes aegypti* 2. Células foliculares 3. Morte celular
4. Vitelogênese 5. Ovários 6. *Plasmodium gallinaceum* I.
Guimarães, Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB028/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rafaella Sayuri Ioshino.

Título da Dissertação: Mecanismo da redução de fertilidade em *Aedes aegypti*
infectados por *Plasmodium gallinaceum*.

Orientador(a): Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro Guimarães.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **129** nas fls. **93** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Margareth de Lara Capurro-Guimarães, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Mecanismo da redução de fertilidade em Aedes aegypti infectados por Plasmodium gallinaceum ou dengue vírus sorotipo 2** do qual participam o(s) alunos **Rafaella Sayuri Ioshino**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **23.11.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 25 de novembro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário-suplente
CEUA - ICB/USP

Dedico essa nova conquista aos meus pais, Iwaho e Aparecida, e aos meus queridos irmãos, Yuiti e Shody. Obrigada pela compreensão, confiança e por acreditarem em mim, SEMPRE! Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

É muito difícil expressar em palavras os sentimentos que estão no coração, pois para alguns as palavras ainda não foram criadas! Sendo assim... deixo claro que meus agradecimentos serão simples, porém de coração!!

Há 14 anos nos separamos! Foi duro deixar o conforto do lar e encarar a vida, sozinha na cidade grande!!! Chorava antes de dormir e contava nos dedos quantos dias faltavam para o próximo feriado, pois a saudade já sufocava a garganta! Hoje esses sentimentos já estão sob controle! Sim, continuo chorona (piora um pouco com a TPM) mas com vocês aprendi a ser forte e lutar para alcançar meus objetivos na vida! Obrigada pai (**Iwaho Ioshino**) e mãe (**Aparecida Ioshino**) por proporcionar, a mim e aos meus irmãos, o amor incondicional! Já disse uma vez a vocês o que é amor e volto a repetir: amar é abrir mão da sua felicidade para ver o outro feliz e evoluir! E não teve maior prova de amor do que deixar seus filhos voarem, suportando a dor da saudade e preocupação! Obrigada meus eternos amores, pois sem vocês nada disso seria possível!

Falar dos irmãos é muito complicado! Pessoas queridas que podemos confiar e contar para o resto da vida! Meu caso não é diferente! Os presentes que a vida nos deu fez com que nossos laços de irmãos ficassem mais fortes e hoje somos muito mais que isso: AMIGOS! Amigos que estão presentes nos momentos bons e ruins, que saem para balada, que cuidam um do outro e, mesmo de longe, se preocupam! Obrigada meus queridos (**Yuiti** e **Shody**) pela confiança, pela força, pelas conversas e apoio que foram essenciais para eu alcançar esse título! Amo vocês e nossos pais!

Só quem namora uma pessoa que faz pós-graduação sabe o quão difícil é, não é mesmo **Norio Takara**?!?. Alterações de humor, insônia, discutir experimentos que não deram certo (detalhe: você fez administração!!!), assistir dezenas de vezes a mesma apresentação e aprender sobre os mosquitos, não ter espaço na mesa da sala para um simples jantar, pois ela esta lotada de papers, livros, anotações e computador. É.. não é fácil, eu reconheço. Mas o mais engraçado de tudo isso é que você NUNCA reclamou, muito pelo contrario: me apoiou, escutou, me ajudou no que você podia ajudar, SEMPRE

esteve comigo nessa batalha mesmo não tendo ideia do que eu estava falando! Obrigada por pegar na minha mão e caminhar, juntos, por essa estrada que tanto me encanta que é a pesquisa! Sem você e minha família NADA disso seria possível, pois vocês são o meu porto seguro!

Costumo dizer que “os amigos são a família que Deus nos permitiu escolher”! E por isso, formei uma “família” no laboratório!!!

André Silva (Andrezinho) eu nem sei como agradecer você!!!! Quando tudo parecia perdido no meu mestrado você surgiu e mostrou que só estava faltando um pouco de organização nas idéias e atitudes!! Quantas vezes ficamos até tarde dissecando os mosquitos... conversando sobre os artigos e resultados... quantas ideias malucas de novos experimentos que podemos fazer.... e quantas vezes vocês escutou eu falar: “André eu não nasci pra isso.. vou fazer Direito, Medicina ou Engenharia!!! Quero ganhar dinheiro!” ou então “Déh, já sei! Vou abrir um restaurante!!” E você com tooda paciência veio e conversou comigo sobre a vida acadêmica sempre me mostrando o melhor caminho!! Não sei o que deixei de bom pra você... mas de você levo os sentimentos mais simples que, na minha opinião, glorificam o homem: a humildade, a alegria, o bom caráter, a paciência e muito mas muito aprendizado. Obrigada por me ajudar nessa jornada e pelos ensinamentos do mundo científico. Com certeza serei eternamente grata! Muito obrigada Deh!!

Essa grande família é formada por poucos homens. Entao.. além do André temos o Diego!!! Esse me surpreendeu! Era tão quietinho mas depois que se matriculou no mestrado mudou!!! Como todo bom mineirinho... ele come quieto! Fica observando, escutando e quando fala alguma coisa faz todo mundo rir! Obrigada **Diego Azevedo** por tornar o ambiente de trabalho um lugar cativante e animado!

E coitado desses meninos que tem que conviver com tantas mulheres! Não sei como aguentam, não é mesmo **Karina, Flávia, Desirée e “Thaís (es)”**!!!! Acho que formamos o grupo de mulheres que mais falam e ri no departamento!! Obrigada meninas pelo apoio nessa fase final do mestrado!! Aprendi muito com vocês, inclusive nas reuniões de laboratório! Muito obrigada!

Porém nada seria do nosso laboratório se não fosse nossa equipe de apoio!!! **Neuzinha**, muito obrigada pelos ensinamentos!!!! Quando cheguei não sabia como funcionava o insetário e a senhora com toda paciência me ensinou e hoje sou muito grata!!! Muito obrigada!

Isabel Marques (Bel)!!!! Quantas conversas, dicas, sugestões, ensinamentos de trabalho e de vida, ein? Chegou há pouco tempo mas consegui compartilhar tantas coisas contigo! Sempre disposta a ajudar e corpo mole, NUNCA! Admiro sua força de vontade, seu carisma e sua bondade!!! Agradeço de coração a amizade, o “suporte técnico”, sugestões e, principalmente, por me cativar!!!

Ediane Saraiva! Aah minha querida!! Quando cheguei fiquei com um pouco de medo, porque você era uma pessoa séria! Depois de um tempo percebi que era só fachada!! Quantos dias ficamos no insetário catando as pupas de *aquasalis*, tentando aumentar a colônia dos seus “filhos”, ein?!?!? Você compartilhou comigo tudo sobre esses mosquitos, sobre os insetários e também se tornou uma grande amiga! Alguém presente nos momentos bons, mais ou menos e ruins!!! Muuito obrigada Dih!!!

Durante todo o desenvolvimento do laboratório pessoas chegam e outras vão mas sempre deixam um pedacinho de si!

Agradecimentos a doutora **Bianca kojín** que me ajudou no projeto inicial! Eu estava com tanto medo, pois era a primeira vez que escrevia algo sobre os mosquitos! Ainda bem que não estava tão ruim! Obrigada!!

Mestre **Danilo Carvalho**... esse foi embora e deixou o bonequinho de presente (sempre me identifico com ele, obrigada viu?!?!?)!!! Brincadeiras a parte o Danilinho é uma pessoa que mesmo longe estava ali “pertinho” disposto a me ajudar com novas idéias e sugestões!!! Agradeço com todo meu coração a sua ajuda, sempre!!!

Outra pessoa que não poderia deixar de agradecer é você, doutora **Ceres Maciel**!!! Foi com você que aprendi boa parte do meu projeto: glândula salivar, ciclo do *Plasmodium gallinaceum in vivo* e no hospedeiro invertebrado, plotar dados nos gráficos, como cuidar dos materiais de bancada, enfim!

Obrigada por ser meu primeiro degrau dentro da USPI!! Espero não te decepcionar!!!

Alexandre Moura (quase mestre), com você aprendi a questionar mais os meus resultados!! Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, ajudas nos experimentos e pela companhia em Macaé e Rio de Janeiro! Acho que foi o Curso que mais marcou a minha pós graduação! Doutor **André Cardoso** foi um imenso prazer te conhecer e obrigada pelos debates, pela ajuda na qualificação e conversas pelo ICB! Sem mencionar as risadas que me deixavam menos estressada com os experimentos cansativos! Que essas amizades continuem por muito e muito tempo!

E por essa longa caminhada, pessoas de outras áreas também nos ajudam com novas idéias e interpretações!

Por isso meus sinceros agradecimentos ao mestre **Mauricio Scavassini**! Quantas vezes você teve que aturar meus “choros” por causa dos experimentos que por algum motivo não deram certos??? E foi em uma dessas que você me deu a grande idéia: adequar o MTT para o ovário de mosquito!! No início, eu confesso que fiquei com preguiça, pois é muito trabalhoso padronizar as técnicas ainda mais quando ela nunca foi utilizada para tal. No final tudo deu certo! Por isso deixo aqui meu MUITO OBRIGADA pela ajuda e dicas nessa etapa! Além disso, obrigada pelas ajuda nas interpretações dos resultados! Valeu pela paciência, idéias, ajuda nos experimentos e conversas pelos corredores do ICB!!

Não posso esquecer de agradecer os Professores que contribuíram nesse estudo:

Professor **Cláudio Marinho** por disponibilizar o microscópio (não, não é um simples microscópio! É O microscópio!!!). Confesso que eu tinha muito medo de mexer nesse equipamento mesmo depois de ter uma “aulinha” com o Renato e Rodrigo Medeiros! Obrigada meninas pela força!

À professora **Tania Bijovsky de Katzin** que, por muitas vezes, me recebeu em seu laboratório de braços abertos!! Obrigada por tirar minhas dúvidas sobre microscopia e por ser tão atenciosa comigo pelos corredores do ICB!

Professora **Sílvia Boscardin** por disponibilizar o “aparelho de Elisa” por confiar e permitir que eu realizasse as leituras fora dos horários padrões dos seu laboratório.

À professora **Beatriz Stolf** que sempre deixou as portas abertas para eu tirar qualquer dúvida e, também, por me ajudar com os reagentes do MTT!

Meus sinceros agradecimentos ao professor **Carlos Winter** pelas conversas, risadas, ajudas no projeto e, principalmente, por deixar o microscópio a minha disposição! Sem o seu equipamento alguns experimentos importantes não estariam aqui! Obrigada!

E não posso deixar de mencionar um professor que me ensinou algo simples, porém que fez toda diferença durante meus estudos: tudo tem uma explicação, seja um reagente em uma solução ou até um experimento que não deu certo! Obrigada professor **Alejandro Katzin** por despertar, ainda mais, a minha vontade de saber os porquês da ciência!

Um muito obrigado especial a secretária da pós, **Silvia Camargo** pela paciência e amizade! Mil desculpas pelas minhas trapalhadas e valeu pela atenção durante todo o mestrado!

Essa última etapa da tese me proporcionou um sentimento de muita felicidade! Organizar a tese final é muito cansativo, mas quando encontramos uma pessoa alegre / animada, humilde, atenciosa, carismática e que entende muito das normas (ABNT) tudo fica maravilhoso! Portanto, obrigada **Tereza** pelas correções na biblioteca! Suas dicas foram ótimas!! Muito Obrigada, de coração!

E tudo isso (aprendizado, risadas, amigos, colegas) só foi possível, pois alguém muito especial me acolheu!! Professora **Margareth**, muito obrigada por permitir que um sonho se transforme em realidade!! Agradeço com todo meu coração a confiança, as discussões científicas e o apoio durante todo meu mestrado!!! Carregarei eternamente seus ensinamentos!!! Muito obrigada!

Para finalizar, obrigada CNPq pelo apoio financeiro durante a realização desse trabalho!

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

“Nossas dúvidas são traiçoeiras, pois nos fazem perder o que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar”.

William Shakespeare

RESUMO

IOSHINO, R. S. **Mecanismo da redução de fertilidade em *Aedes aegypti* infectados por *Plasmodium gallinaceum***. 2013. 65 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O ciclo reprodutivo dos mosquitos *Aedes aegypti* inicia-se após o repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas, pois é através do sangue que os mosquitos adquirem nutrientes e ativam hormônios que irão iniciar e regular a síntese e armazenamento de proteínas precursoras de vitelo que, por fim, resultará na produção dos ovos (CLEMENTS, 1992). Fêmeas do mosquito *Ae. aegypti*, quando realizam repasto sanguíneo infectado (RSI) por *Plasmodium gallinaceum*, apresentam uma redução na produção de ovos (ARAÚJO, 2011). Uma das explicações para essa redução é a morte por apoptose das células foliculares (CF) que envolvem os folículos ovarianos, como foi observado em fêmeas de *Anopheles stephensi* infectadas por *P. yoelii nigeriensis* (HOPWOOD, et al., 2001). Por isso, o objetivo do estudo foi confirmar se a redução da fecundidade dos mosquitos *Ae. aegypti* infectados por *P. gallinaceum* ocorre por morte das CF caso essa característica seja conservada entre os culicídeos. Foram feitas novas posturas individuais com fêmeas sadias e infectadas (n = 35; triplicata experimental) que confirmaram a redução significativa do número de ovos produzidos por mosquitos infectados. Em seguida, foi determinada a viabilidade das células que compõe os ovários através de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Após realizar a padronização da técnica para o tecido, foi observado que os ovários sofrem uma redução da viabilidade celular 18, 22 e 24 horas após o RSI. Sendo assim, foram feitas marcações em ovários nesses mesmos intervalos utilizando o reagente *acridine orange* que identifica células mortas através da acidez celular. Não foi possível observar a morte das células no intervalo de 18 horas, porém 22 e 24 horas após o RSI as CF apresentaram cor laranja indicando que elas estão em morte em relação ao mesmo intervalo do repasto sanguíneo controle (RSC). Para determinar se essas células apresentam morte celular do tipo apoptose, foi utilizado o kit DeadEnd Colorimetric TUNEL System (Promega) que realiza marcação do DNA fragmentado, uma das características da apoptose. Os resultados para essa técnica, utilizando os ovários de 22 e 24 horas após RSC e RSI foram negativos, ou seja, não há evidências de DNA fragmentado nas células foliculares nas regiões dos cortes histológicos examinados. Sendo assim, podemos concluir que, utilizando esses ensaios foi possível identificar a morte das CF como uma resposta a redução da fecundidade, porém não foi possível determinar que o tipo de morte é apoptose. Estes resultados apontam para aplicação de métodos moleculares como, por exemplo, medição da atividade da caspase-3 e realização de hibridação *in situ* fluorescente (ROEKRING; SMITH, 2010) para concluirmos se a apoptose é o mecanismo chave na redução da fertilidade em mosquitos *Ae. aegypti* infectados com *P. gallinaceum*.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Células foliculares. Morte celular. Vitelogenese. Ovários. *Plasmodium gallinaceum*.

ABSTRACT

IOSHINO, R. S. **Mechanism of fecundity reduction in *Aedes aegypti* infected by *Plasmodium gallinaceum***. 2013. 65 p. Dissertation (Masters thesis in Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Aedes aegypti mosquito is an arthropod belonging to the Culicidae family and Diptera order. The reproductive cycle of these insects begins post blood meal (PBM) ingestion by females. Through the blood mosquitoes acquire nutrients and activate hormones that will initiate and regulate the synthesis and storage of yolk precursor proteins. This cascade will culminate in eggs production (CLEMENTS, 1992). Previous experiments showed that when *Ae. aegypti* female mosquito uptakes *Plasmodium gallinaceum*-infected blood meal there is a decline in egg production (ARAÚJO, 2011). One explanation is the death by apoptosis of follicular cells that surround the ovarian follicles, as observed in *Anopheles stephensi* females infected by *P. yoelii nigeriensis* (HOPWOOD, et al., 2001). Therefore, the objective of this study was to confirm the hypothesis that the fertility reduction in *P. gallinaceum*-infected *Ae. aegypti* occurs by follicular cells death if this characteristic is conserved among the Culicidae family. Initial experiments were performed to count the total number of oviposited eggs by control and infected females individually (n = 35, three independent experiments). A significant reduction in the number of eggs laid by infected mosquitoes was confirmed. The next step was to evaluate the ovary cell viability by MTT (3 - [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide). After performing the technique standardization for the tissue, it was observed a reduction of viable cells in 18, 22 and 24 hours PBM infected. The reduction of fecundity and ovary cell viability by infection led us to mark the ovaries using acridine orange reagent as indicator of cell death through intracellular pH acidification. It was not possible to observe cell death in ovary tissue section 18 hours PBM infected, but the follicular cells showed orange color 22 hours indicating they are in death in relation to the same interval of PBM control. To determine if these cells exhibit apoptosis, we use the TUNEL kit DeadEnd Colorimetric System (Promega) which mark the fragmented DNA, a characteristic of the apoptosis process. Ovaries 22 and 24 hours PBM infected and control were negative for TUNEL marker. This result indicates no evidence of fragmented DNA in the follicular cells from ovary histological preparations. Thus, we conclude that fecundity reduction occurs as a response to follicular cells death caused by *P. gallinaceum* infection. It was not possible to affirm if the type of follicular cells death is apoptosis. Altogether, these results suggest the application of molecular methods, for example, measurement of caspase-3 activity and performing fluorescence *in situ* hybridization (ROEKRING & Smith, 2010) to confirm if apoptosis is a key mechanism in fertility reduction of *P. gallinaceum*-infected *Ae. aegypti* mosquitoes.

Keyword: *Aedes aegypti*. Follicular cells. Cell death. Vitellogenesis. Ovaries. *Plasmodium gallinaceum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Ciclo de desenvolvimento do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro invertebrado	23
Figura 02 – Ovários e ovariolos de mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	24
Figura 03 – Esquema do folículo ovariano primário	24
Figura 04 – Hormônios envolvidos no processo da vitelogênese em mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	26
Figura 05 – Transcrição de genes das proteínas precursoras de vitelo em mosquitos <i>Aedes aegypti</i> infectados por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	27
Figura 06 – Quantificação do hormônio ecdisona no mosquito <i>Aedes aegypti</i>	28
Figura 07 – Esquema de um tubo de oviposição individual	36
Figura 08 – Produção de ovos por mosquitos <i>Aedes aegypti</i> (RED)	43
Figura 09 - Produção de ovos por mosquitos <i>Aedes aegypti</i> (HIGGS)	43
Figura 10 – Esquema representativo da técnica adaptada do teste MTT	46
Figura 11 – Viabilidade do controle positivo da técnica do MTT	47
Figura 12 – Viabilidade das células dos ovários de mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	47
Figura 13 – Lâmina adaptada	48
Figura 14 – Morte das células foliculares observadas em ovariolos de fêmeas <i>Aedes aegypti</i> infectadas por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	49
Figura 15 – Identificação do DNA fragmentado nos ovariolos de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> utilizando o TUNEL (DeadEnd Colorimetric TUNEL System - Promega).....	51
Figura 16 – Quantificação de proteína total na hemolinfa e ovários após a alimentação sanguínea	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Produção de ovos de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> (linhagem RED) sadios e infectados por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	41
Tabela 02 – Produção de ovos de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> (linhagem HIGGS) sadios e infectados por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	41
Tabela 03 – Fecundidade dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> (linhagem RED) sadio e infectado	44
Tabela 04 – Fecundidade dos mosquitos <i>Aedes aegypti</i> (linhagem HIGGS) sadio e infectado	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

20E: 20-hidroxiecdisona

µm: Micrômetros

µmol: Micromol

AO: Acridine Orange

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MTT: Sal brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

OEH: Hormônio Ecdisteroidogênico Ovariano

PBS: Salina tamponada com fosfato

WNV: West Nile Virus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 <i>Plasmodium</i> e seu desenvolvimento no hospedeiro invertebrado	22
1.2 Vitelogênese	23
1.3 Alterações proteicas e hormonais em mosquitos infectados	26
1.4 Alteração do fitness reprodutivo em mosquitos infectados por plasmódios	28
1.5 Morte celular nos mosquitos	29
2 OBJETIVOS	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Animais	33
3.1.1 <i>Aedes aegypti</i>	33
3.1.1.1 Colônia de manutenção	33
3.1.1.2 Experimentos	33
3.1.2 <i>Gallus gallus domesticus</i>	34
3.1.3 <i>Plasmodium gallinaceum</i>	34
3.2 Análise da redução do número de ovos em mosquitos <i>Aedes aegypti</i> infectados com <i>Plasmodium gallinaceum</i>	35
3.3 Análise dos ovários de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> infectados por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	36
3.3.1 Caracterização da viabilidade das células dos ovários	36
3.3.2 Detecção da morte celular das células foliculares através do Acridine Orange	37
3.3.3 Análise do DNA fragmentado nas células foliculares	37
3.3.3.1 Inclusão dos ovários em parafina	37
3.3.3.2 Detecção do DNA fragmentado nas células foliculares dos ovários de fêmeas infectadas por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	37
3.4 Análises estatísticos dos experimentos	38
4 RESULTADOS	40
4.1 Redução da fecundidade dos mosquitos fêmeas da linhagem RED de <i>Aedes aegypti</i> infectados por <i>Plasmodium gallinaceum</i>	40

4.2 Viabilidade das células foliculares	44
4.3 Morte das células foliculares	48
4.4 Identificação do DNA fragmentado nas células foliculares	50
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÃO.....	59
7 REFERÊNCIAS	61
ANEXO A – Artigo 1	64

1 Introdução

O início do século XXI está sendo marcado pelo aquecimento global assim como o aumento do impacto ambiental causado pelo homem. Essas mudanças têm elevado o número de doenças causadas por patógenos transmitidos pelos insetos, principalmente em países de clima quente e com boa precipitação ao longo do ano. Alguns artrópodes, conhecidos popularmente como mosquitos ou pernilongos, são os principais vetores responsáveis pela transmissão de patógenos causadores de doenças tropicais como, por exemplo, a febra amarela, dengue e a malária (REITER, 2001). Os mosquitos vetores desses patógenos pertencem à família Culicidae, ordem Diptera e podem ser subdivididos em três gêneros distintos principais: *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*. Uma das características em comum desses gêneros é a existência de fêmeas hematófagas, ou seja, que se alimentam de sangue dos vertebrados.

Algumas doenças veiculadas por patógenos transmitidos por esses mosquitos, por exemplo, a febre amarela, foram controladas durante as décadas de 50 e 60 através de programas para a redução da população dos mesmos, consistindo na aplicação de inseticidas e vigilância epidemiológica nas regiões afetadas. Porém, no final da década de 70, devido a reintrodução dos mosquitos do gênero *Aedes*, ocorreu o ressurgimento dessas doenças. Esse fato se estende até os dias atuais e os principais fatores que contribuíram para isso foram a falta de vacinas efetivas, problemas socioeconômicos e políticos nas áreas afetadas, resistência dos mosquitos aos inseticidas e o aumento do transporte via navios e aviões, que favoreceram a dispersão e reintrodução do vetor nas áreas controladas.

De acordo com a Organização mundial da saúde e Organização Pan Americana de saúde somente em 2008 ocorreram, aproximadamente, 863 mil mortes causadas pela malária no mundo e 682 mil casos de dengue notificados na América do Sul sendo 585 mil registrados apenas no Brasil (WHO, 2009; PAHO, 2009). No ano de 2010 o número de casos de dengue no país preocupou as autoridades públicas que consideram essa doença de caráter endêmico, pois houve um aumento de 109,43% do número de casos quando comparado com a mesma época do ano de 2009 (PAHO, 2009).

1.1 *Plasmodium* e seu desenvolvimento no hospedeiro invertebrado

Existem cinco espécies do protozoário do gênero *Plasmodium* capazes de desenvolver a malária humana: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (MARSHALL, et al., 2009). Além disso, podemos encontrar a espécie *P. gallinaceum* que é o parasito capaz de infectar uma grande variedade de aves e tem sido muito utilizado nos estudos básicos da malária (NAGAO, 2008).

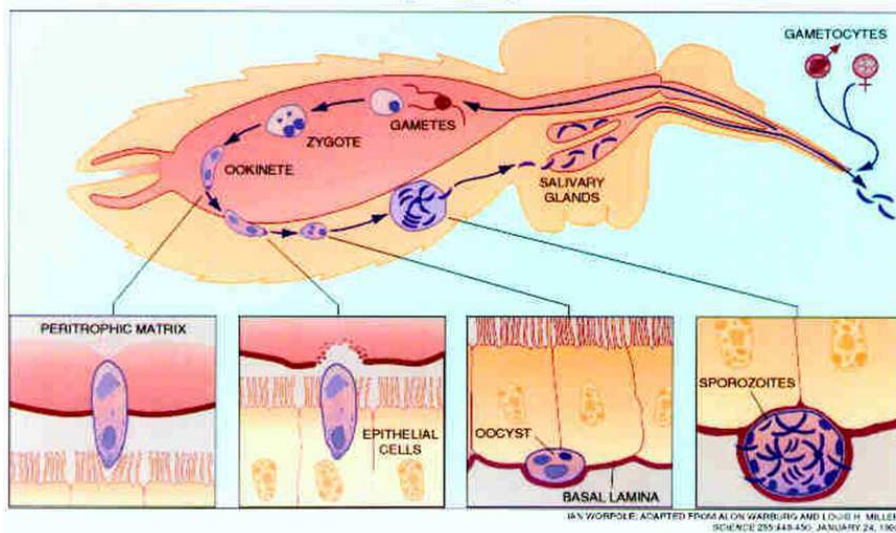
Como já foi dito anteriormente os culicídeos possuem fêmeas hematófagas. Essa característica é importante, pois é através da alimentação sanguínea que a fêmea obtém nutrientes extras para a produção dos seus ovos (CLEMENTS, 1992). Apesar de ter uma grande importância na fisiologia desses insetos, o repasto sanguíneo representa um grande problema de saúde aos homens já que é através desse tipo de alimentação que os mosquitos podem se infectar com vírus (por exemplo, dengue e febre amarela) e parasitos (por exemplo, *Plasmodium*) tornando-os, assim, o vetor transmissor desses patógenos.

Os agentes etiológicos causadores da malária, *Plasmodium* sp. depende de um hospedeiro invertebrado (mosquito) para completar o seu desenvolvimento e reprodução (Figura 01). Após o repasto sanguíneo os gametócitos (masculinos e femininos) presentes no sangue do hospedeiro vertebrado alcançam o intestino médio do mosquito onde realizam a reprodução sexuada. Um zigoto móvel denominado de oocineto é formado e esse, por sua vez, ultrapassa a membrana peritrófica e o epitélio do intestino médio até alcançar a lâmina basal do intestino onde se encista formando o oocisto.

O oocisto é uma das formas mais importantes do parasito, pois é nessa fase que ocorre a reprodução assexuada (esquizogonia) que dará origem aos esporozoítas, forma infectante do parasito da malária. Para que o mosquito se torne vetor transmissor da doença, é necessário que os esporozoítas sejam liberados na hemolinfa e através dessa via eles alcançam a glândula salivar onde são armazenados até o próximo repasto sanguíneo (SOUZA-NETO, et

al., 2009).

Figura 01 - Ciclo de desenvolvimento do *Plasmodium* no hospedeiro invertebrado

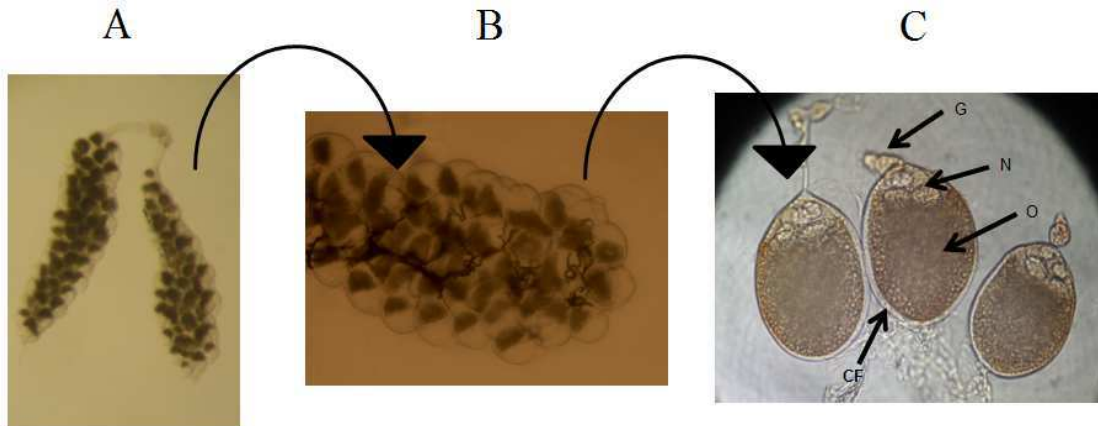


As formas gametocíticas do *Plasmodium*, presentes no sangue do hospedeiro vertebrado infectado, alcançam o intestino médio do mosquito após a alimentação sanguínea. Os gametas por sua vez realizam a reprodução sexuada originando o oocineto. Esse penetra a membrana do intestino médio onde se encista. Após 7 dias inicia-se a liberação dos esporozoítas na hemolinfa e atingem a glândula salivar do hospedeiro invertebrado.

FONTE: Collins (1996)

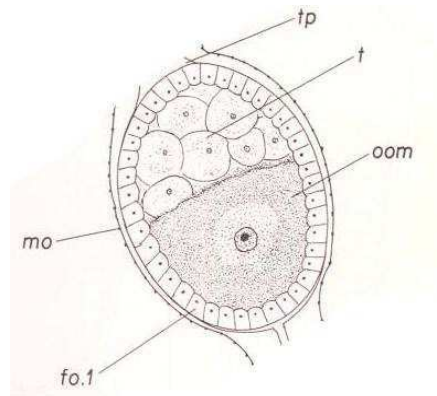
1.2 Vitelogênese

Um dos órgãos mais importantes para a reprodução dos mosquitos são os ovários (Figura 02). Eles estão presentes em pares e cada ovário de mosquito *Ae. aegypti* possui entre 75 a 158 ovariolos unidos pela membrana ovariolar. Cada ovariolo é formado por um germário, folículos primários, secundários e terciários. O folículo ovariano primário é formado por uma túnica própria, células foliculares, sete (7) células acessórias (*nurse*) e um ócito maduro (Figura 03) e será todo esse conjunto que originará o ovo (FORATTINI, 1996).

Figura 02 - Ovários e ovaríolos de mosquitos *Aedes aegypti*

Fotos dos ovários (A e B). Ovaríolos (C) com suas estruturas: G) germário; N) células acessórias (*nurse*); O) oócito maduro com deposição de proteínas; CF) células foliculares.

FONTE: Ioshino (2013)

Figura 03 - Esquema de um folículo ovariano primário

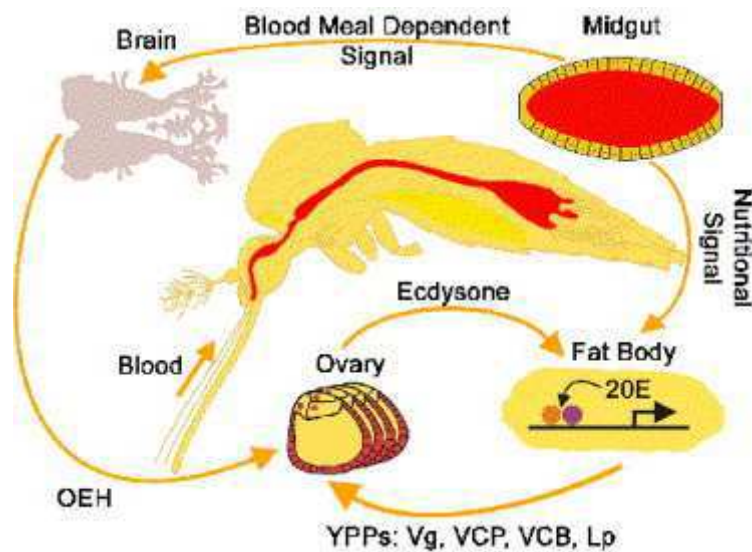
O folículo ovariano é formado por: membrana ovariolar (mo), a túnica própria (tp), folículo primário com células foliculares (fo. 1), sete células nurse ou trofócito (t) e oócito maduro (oom).
FONTE: Forattini (1996)

O processo de formação das proteínas precursoras de vitelo denomina-se vitelogênese (Figura 04) que tem como objetivo produzir fonte de nutrientes para o embrião a partir de proteínas sintetizadas e secretadas pelo corpo gorduroso. Muitos estudos sobre a vitelogênese têm sido realizados em *Ae. aegypti* (CLEMENTS, 1992) e para melhorar o entendimento desse processo, ele foi subdividido em três etapas: pré-vitelogênese, período vitelogênico e o término do período vitelogênico .

A pré-vitelogênese é a fase na qual os tecidos envolvidos são preparados e amadurecidos como, por exemplo, há uma proliferação das organelas biossintéticas nas células do corpo gorduroso e a separação das células foliculares ovarianas para permitir que as moléculas precursoras de vitelo alcancem o oócito maduro. Nessa fase também ocorre a ação do hormônio juvenil III. Ele age sobre o corpo gorduroso e os ovários permitindo uma boa resposta desses órgãos aos hormônios envolvidos no período vitelogênico como o hormônio ecdisteroidogênico e a 20-hidroxiecdisona (RAIKHEL, et al., 2002).

O período vitelogênico inicia-se com a ingestão do sangue pelo mosquito que induz o cérebro a secretar o hormônio ecdisteroidogênico ovariano – OEH (BROWN, et al., 1998). Esse hormônio estimula os ovários a produzir e secretar ecdisona para a hemolinfa que a transportará até o corpo gorduroso onde será convertida em 20-hidroxiecdisona (20E). A 20E por sua vez estimula a síntese das principais proteínas precursoras de vitelo (vitelogenina, carboxipeptidase vitelogênica e catepsina B vitelogênica) que serão secretadas para a hemolinfa pelo corpo gorduroso, endocitadas pelos ovários e armazenadas nos oócitos. Essa fase ocorre entre 0h e 48 horas após o repasto sanguíneo (RAIKHEL; DHADIALLA, 1992; DEITSCH, et al., 1995).

A última fase representa o fim da síntese das proteínas precursoras de vitelo pelo corpo gorduroso e a produção do córion que é uma camada glicoprotéica que, posteriormente, originará a cutícula, camada importante para a proteção do ovo. Essa fase ocorre 48 a 72 horas após a alimentação sanguínea e termina com a deposição dos ovos em uma superfície úmida (RAIKHEL; DHADIALLA, 1992).

Figura 04 - Hormônios envolvidos na vitelogênese no mosquito *Aedes aegypti*

Após a alimentação sanguínea alguns hormônios são ativados para iniciar a síntese das proteínas pelo corpo gorduroso. Inicialmente o cérebro envia um sinal (hormônio ecdisteroidogênico ovariano – OEH) ao ovário que libera a ecdisona na hemolinfa. Esse hormônio, por sua vez, atinge o corpo gorduroso onde é convertido em 20-hidroxiecdisona (20E). Dessa forma inicia-se a síntese das proteínas precursoras de vitelo (YPPs): carboxipeptidase vitelogênica (VCP), vitelogenina (Vg) e catepsina B vitelogênica (VCB).

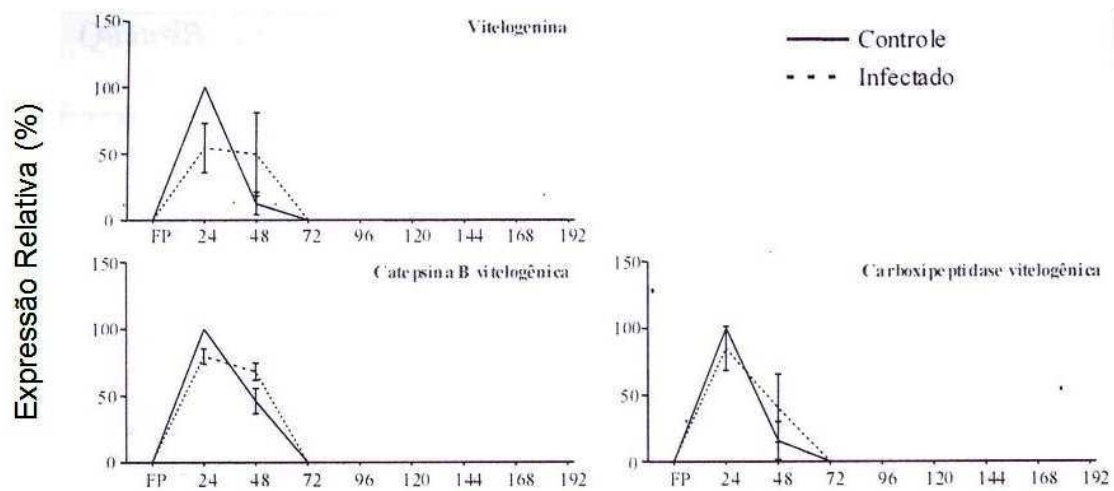
FONTE: Attardo e D'Amico (2005)

1.3 Alterações proteicas e hormonais em mosquitos infectados

Hogg e colaboradores (1997) demonstraram que fêmeas *Anopheles stephensi* alimentadas com sangue infectado por *P. yoelii nigeriensis* apresentaram ovários com quantidades menores de proteína total. Durante o primeiro ciclo gonadotrófico (24 – 48 horas) ocorre uma redução significativa de vitelina nos ovários, porém a concentração de vitelogenina na hemolinfa estava aumentada (JAHAN; HURD, 1998). Esse resultado foi reforçado com as análises do perfil transcricional de vitelogenina durante os dois ciclos gonadotróficos (após a primeira e segunda alimentação sanguínea, respectivamente) no qual o segundo ciclo, 24 horas após a alimentação sanguínea sadia, apresentou uma redução de 32,75% dos níveis de mRNA de vitelogenina (AHMED, et al., 2001).

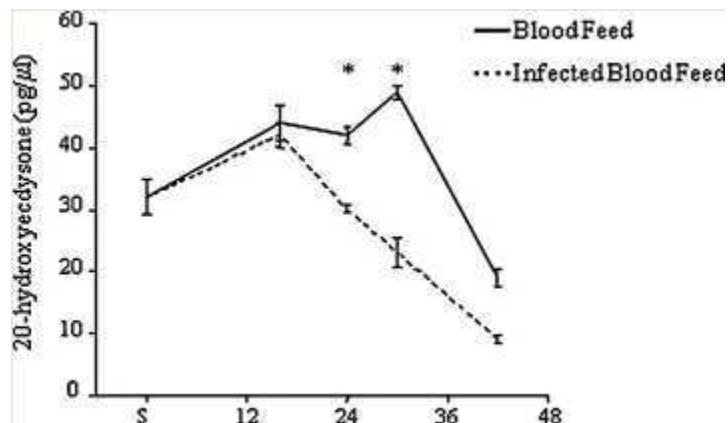
Em mosquitos *Ae. aegypti* infectados por *P. gallinaceum* também foi demonstrado uma alteração no perfil transcricional das três proteínas importantes na vitelogenese de *Ae. aegypti*: vitelogenina, catepsina B vitelogênica e carboxipeptidase vitelogênica. Após 24 horas do repasto sanguíneo infectado com plasmódio ocorreu uma redução na transcrição dos genes que codificam estas proteínas como podemos observar na figura 05 (ARAÚJO, 2011). Além disso, os mosquitos infectados apresentaram uma redução dos níveis do hormônio ecdisona na hemolinfa (Figura 06) (ARAÚJO, 2011).

Figura 05 - Transcrição dos genes das proteínas precursoras de vitelo em mosquitos *Aedes aegypti* infectados por *Plasmodium gallinaceum*



Comparação do perfil de transcrição de genes da vitelogenina, catepsina B vitelogênica e carboxipeptidase vitelogênica de *Aedes aegypti* sadios e infectados por *Plasmodium gallinaceum*.

FONTE: Araújo (2011)

Figura 06 - Quantificação do hormônio ecdisona no mosquito *Aedes aegypti*

Quantificação do hormônio ecdisona na hemolinfa de mosquito *Aedes aegypti* após alimentação sanguínea sadia e infectada com *Plasmodium gallinaceum*.

FONTES: Araújo (2011)

1.4 Alteração do *fitness* reprodutivo em mosquitos infectados por plasmódios

Além dessas alterações na síntese de proteínas há, durante a infecção, mudanças fisiológicas do inseto vetor como a redução da capacidade reprodutiva observada em anofelinos infectados por plasmódios, ou seja, os mosquitos infectados produzem menos ovos quando comparado aos mosquitos saudáveis. Esse fato foi observado tanto em mosquitos da espécie *Ae. aegypti* infectados por *P. gallinaceum* quanto em *An. stephensi* e *An. gambiae* infectados por *P. yoelii nigeriensis* (HACKER, 1971; HOGG; HURD, 1995; AHMED; HURD, 2006; AHMED, et al., 1999). Fêmeas de *Culex tarsalis* infectados com vírus do Nilo Ocidental (WNV) também apresentaram uma redução de, aproximadamente, 50 ovos por jangadas (38,5%), além de reduzir 20% da taxa de eclosão dos mesmos quando comparado aos mosquitos *Culex tarsalis* não infectados (HACKER, 1971; HOGG; HURD, 1995; AHMED, et al., 1999; STYER, et al., 2007).

Uma das hipóteses levantadas para essa redução foi que a quantidade de sangue infectado sugado pelas fêmeas era menor e conseqüentemente o conteúdo de lipídeos, carboidratos e taxa metabólica eram modificados

havendo, assim, uma redução do número de ovos. Entretanto experimentos utilizando *Ae. aegypti* infectado por *P. gallinaceum* revelaram que a queda do número de ovos nesses mosquitos não ocorre por diferenças nutricionais do sangue contendo parasitos. Isso reforça a ideia de que há uma alteração fisiológica quando o parasito invade o organismo do vetor (GRAY; BRADLEY, 2005).

1.5 Morte celular nos mosquitos

A morte celular é uma resposta celular fundamental que apresenta um papel importante no desenvolvimento de organismos e na regulação da homeostase nos tecidos eliminando as células indesejáveis. Um tipo de morte celular é a apoptose uma via de morte celular regulada na qual está envolvida uma sequência de caspases apoptóticas que podem ser classificadas como iniciadoras ou executoras (DEGTEREV; YUAN, 2008; BOATRIGT; SALVESEN, 2003).

Estudos celulares foram capazes de observar a indução da morte celular por apoptose em células foliculares circundantes aos ovócitos em *An. stephensi* 16 horas após alimentação com sangue contendo *P. yoelii nigeriensis*. Essa atividade celular tem como consequência a diminuição do número de ovos produzidos (HOPWOOD et al., 2001).

Em nosso laboratório alguns estudos já foram realizados utilizando o mosquito *Ae. aegypti* infectado por *P. gallinaceum*. Resultados mostraram que ocorre a diminuição da fecundidade em mosquitos infectados quando comparados aos mosquitos não infectados (ARAÚJO, 2007). Esses resultados levam a hipótese de que essa redução pode ser uma consequência do processo de apoptose do folículo ovariano, se essa característica for conservada entre os culicídeos.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos que podem estar envolvidos na redução do número de ovos produzidos pelos mosquitos *Ae. aegypti* quando infectados por *P. gallinaceum*.

2 Objetivos

Objetivo Geral

Identificar se a morte celular programada é o principal mecanismo desencadeador da reabsorção folicular e consequente diminuição da fecundidade de *Aedes aegypti* quando infectados por *Plasmodium gallinaceum*.

Objetivos específicos

- 1) Caracterizar a redução da fecundidade dos mosquitos *Aedes aegypti* (linhagem RED e linhagem HIGGS) infectados por *Plasmodium gallinaceum*;
- 2) Analisar a viabilidade das células foliculares presente nos ovários de fêmeas *Ae. aegypti* sadias e infectadas por *P. gallinaceum*;
- 3) Observar se há morte das células foliculares dos mosquitos infectados;
- 4) Caracterizar a morte celular por apoptose nas células foliculares dos ovários de fêmeas.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais

3.1.1 *Aedes aegypti*

3.1.1.1 Colônia de manutenção

Os mosquitos *Aedes aegypti* (linhagem RED ou Rexville D e linhagem HIGGS) foram mantidos em colônias no insetário do Departamento de Parasitologia do Instituto Ciências Biomédicas - USP, em temperatura média de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 80% de umidade relativa do ar e fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro).

Para iniciar a montagem da colônia de mosquitos, ovos aderidos a um papel filtro foram mergulhados em um frasco de vidro (fechado hermeticamente) contendo água autoclavada para a eclosão das larvas L1. Em torno de 250 larvas L1 foram distribuídas em caixa plástica (37 cm x 25 cm x 13,5 cm) contendo 4 litros de água destilada e 0,09 g a 1,80 g (dependendo dos estádios larvais) de ração de peixe moída Tetramin® (Tetra, Melle, Osnabrück, Alemanha) até a formação das pupas.

As pupas foram separadas das larvas e também entre machos e fêmeas, utilizando um separador vertical (FOCKS, 1980), colocadas em recipientes plásticos (800 mL) contendo 170 mL de água, fechadas com um filó e mantidas no insetário até a emergência dos mosquitos adultos (machos e fêmeas). Após a emergência dos mosquitos alados as colônias foram montadas na proporção de 1 macho para 3 fêmeas (1:3) e mantidos com solução de sacarose 10% (p/v) *ad libitum*.

Para a produção de ovos, a colônia foi alimentada com camundongo Balb/c anestesiado com injeção subcutânea de cloridrato de xilanzina 3 ng/Kg e acepromazina 0,3 ng/Kg. Esse permanecia sobre a colônia por 1 hora ou até que a maioria das fêmeas estivesse ingurgitadas.

3.1.1.2 Experimentos

Após 2 dias de emergência, uma proporção de 1 macho para 3 fêmeas (1:3) de mosquitos alados foram separados nos recipientes plásticos (800 mL)

fechados com filó por 4 dias com solução de sacarose 10% (p/v) *ad libitum*. Em seguida foram alimentados com pintainhos sadios ou infectados com *Plasmodium gallinaceum*.

3.1.2 *Gallus gallus domesticus*

Foram utilizados pintainhos (*Gallus gallus domesticus*) fornecidos pela granja Kunitomo (Mogi das Cruzes, SP, Brasil). Esses foram mantidos no biotério de aves do Departamento de Parasitologia do Instituto Ciências Biomédicas - USP e alimentados com ração (sem antiparasíticos e antibióticos na sua composição) e água *ad libitum*. As condições de temperatura foram de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa do ar em 60% e sem fotoperíodo regular.

3.1.3 *Plasmodium gallinaceum*

No nosso laboratório utilizamos o modelo *Ae. aegypti* infectado por *P. gallinaceum* devido a sua capacidade de produzir um alto índice de parasitemia, fator esse muito importante nos estudos celular e bioquímico, além de ser um ciclo fácil e barato para manter dentro do laboratório. Além disso, é possível visualizar a malária cerebral nas aves infectadas, patologia que também ocorre nos mamíferos (NAGAO, 2008).

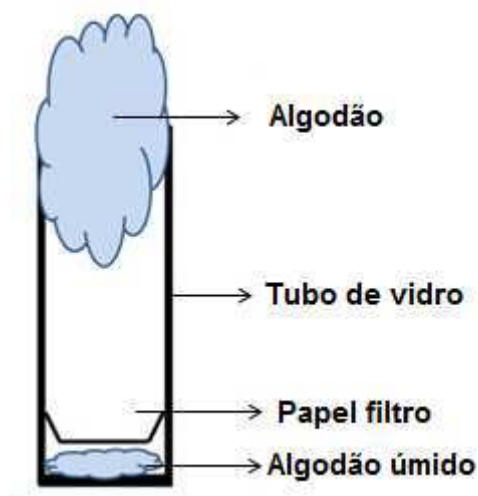
A parasitemia dos pintainhos infectados foi determinada em esfregaços de sangue obtidos a partir do 7º dia após os pintainhos serem picados por mosquitos infectados. As lâminas de esfregaço de sangue foram coradas com giemsa (0,076%, glicerol 50% e metanol 50% por 10 minutos), depois foram lavadas, secas a temperatura ambiente e analisadas por microscopia óptica, usando aumento de 1000x. Após a contagem de células infectadas e cálculo da porcentagem de parasitemia, os animais com parasitemia variando de 5 a 10% foram anestesiados com injeção anestésica subcutânea de cloridrato de xilanzina 3 ng/Kg e acepromazina 0,3 ng/Kg por 30 minutos (componentes e concentração como nos camundongos) para a realização dos experimentos. Após esse tempo, os mosquitos foram anestesiados com CO₂ e mantidos no gelo para a separação das fêmeas alimentadas das não alimentadas. Sete dias

após o repasto sanguíneo, foram dissecados de 5 a 10 tratos digestivos em PBS 1x (NaHPO₄ 7 mM, NaH₂PO₄ 2 mM, pH 7,0 contendo NaCl 140 mM). Esse material foi analisado por microscopia (Axio Photo – Zeiss) de contraste de fase para a contagem de oocistos. As fêmeas infectadas foram utilizadas para inocular pintainhos saudáveis.

3.2 Análise do número de ovos em mosquitos *Aedes aegypti* infectados com *Plasmodium gallinaceum*

Para os experimentos de fecundidade as fêmeas realizaram um repasto sanguíneo em pintainhos infectados (com *Plasmodium gallinaceum*) ou saudáveis anestesiados. Após esse tempo, os mosquitos foram anestesiados com CO₂ e mantidos no gelo para a separação das fêmeas alimentadas. A infecção foi confirmada pela presença de oocistos nos tratos digestivos, como descrito acima (item 3.1.3.).

No terceiro dia após o repasto sanguíneo, os mosquitos foram novamente anestesiados e colocados em um tubo de oviposição individuais. O aparato consiste de um tubo de vidro de 2 cm de diâmetro por 8 cm de altura. No fundo do tubo foi colocado algodão embebido em água e por cima desse algodão, cobrindo toda a superfície, um círculo de papel - de - filtro para servir como superfície úmida para as fêmeas depositarem seus ovos (Figura 07). Os tubos foram então cobertos com algodão e mantidos no insetário por 24 horas. Após esse período, as fêmeas foram anestesiadas no gelo e retiradas dos tubos. Os ovos depositados no papel filtro foram contados e os ovários das fêmeas anestesiadas foram dissecados para observar a presença e contagem de ovos retidos nos ovários. Ao final da análise, foram gerados três dados: número de ovos depositados, número de ovos retidos nos ovários e número total de ovos por fêmea.

Figura 07 - Esquema de um tubo de oviposição individual

O tubo de oviposição é formado por um recipiente de vidro e um papel filtro sobre o algodão úmido formando, assim, um ambiente favorável para os mosquitos fêmeas *Aedes aegypti* realizar a oviposição. Para evitar a saída dos mosquitos foi utilizado um chumaço de algodão.
 FONTE: Ioshino (2013)

3.3 Análise dos ovários de mosquitos *Aedes aegypti* infectados por *Plasmodium gallinaceum*

3.3.1 Caracterização da viabilidade das células dos ovários

Para analisar se houve redução do número de células viáveis nos ovários entre os grupos controle e infectado foi utilizado a técnica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Como é uma técnica utilizada para cultura de células, foram feitas algumas adaptações com intuito de determinar o número de células viáveis nos ovários (tecidos) de mosquitos fêmeas 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas após o repasto sanguíneo sadio e infectado. Para cada análise foram dissecados cinco (5) pares de ovários e esses foram, em seguida, rompidos para separar as células foliculares. Cada amostra ficou 24 horas na presença do substrato MTT (5 mg/mL), em seguida foi adicionado DMSO (100%) e por fim foram analisadas em espectrofotômetro para microplacas de cultura BioTek ELx800 (Biotek., Winooski, VT, USA) com leitura de absorvância definida em 595 nm. Para o controle positivo de morte celular, os ovários foram previamente incubados com peróxido de hidrogênio (10 mM).

3.3.2 Detecção da morte celular das células foliculares através do *Acridine Orange*

Inicialmente os ovários (22 e 24 horas após o repasto sanguíneo infectado e sadio) foram dissecados em solução de PBS (1x) e, em seguida, foi adicionado *Acridine Orange* (AO) (50 $\mu\text{mol/l}$ em PBS 1x) que, em contato com células mortas (pH ácido), coram o núcleo em laranja. Caso as células estejam vivas (pH básico), o tecido emite uma cor verde (Longthorne; Williams, 1997). Para o controle positivo de morte celular, os ovários foram incubados previamente com peróxido de hidrogênio (10 mM) e então corados com AO. Após a reação os ovários foram observados no microscópio Axio Photo – Zeiss utilizando o filtro de fluorescência para rodamina (560 nm – 580 nm) e aumento de 40x.

3.3.3 Análise do DNA fragmentado nas células foliculares

3.3.3.1 Inclusão dos ovários em parafina

Os ovários foram dissecados, em diferentes tempos após o repasto sanguíneo não infectado ou infectado por *P. gallinaceum*, e incubados em solução fixadora Methacarn (70% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial) por 3 horas. Em seguida os tecidos foram desidratados com etanol 100% e mantidos a 4 °C até o momento da inclusão.

A inclusão em parafina assim como os cortes histológicos foram realizados por uma especialista (Cleusa Pelegrini) em microscopia.

3.3.3.2 Detecção do DNA fragmentado nas células foliculares dos ovários de fêmeas infectadas por *Plasmodium gallinaceum*

As amostras histológicas descritas acima foram analisadas para a presença de DNA fragmentado utilizando a técnica de Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL), com o Kit DeadEnd Colorimetric TUNEL System (Promega) de acordo com os procedimentos do fabricante. Na presença de DNA fragmentado é possível observar, no interior das células, uma porção de coloração marrom. Porém quando não houver DNA fragmentado, o interior das células fica translúcido.

Ao final da marcação as lâminas foram observadas no microscópio Axio Imager M2 e as imagens foram capturadas através da câmera AxionCam HRC utilizando o software Axion Vision 4.2 (Zeiss).

3.4 Análise estatística dos experimentos

A análise estatística dos experimentos foi feita utilizando o programa Prisma (Graph Pad Prism 5.01).

Para análise dos dados referentes ao número de ovos ovipostos por fêmeas sadias e infectadas por *P. gallinaceum*, foi utilizado o teste Mann – Whitney com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Os dados da técnica MTT foram realizados utilizando o teste *one-way* ANOVA com um IC de 95% e valores de probabilidades menores que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados significativos.

4 Resultados

4.1 Redução da fecundidade das fêmeas da linhagem RED de *Aedes aegypti* infectadas com *Plasmodium gallinaceum*

Avaliar o *fitness* (estado funcional) reprodutivo e a resposta fisiológica dos mosquitos exige alguns cuidados na manutenção das larvas e mosquitos adultos. Estudos mostraram que a escassez de comida em qualquer uma dessas etapas de desenvolvimento dos mosquitos *Ae. aegypti* promove a alteração na síntese de hormônios afetando, assim, a vitelogênese nos mosquitos (CLIFTON; NORIEGA, 2011).

Por esse motivo tanto as larvas como os mosquitos alados (adultos) foram rigorosamente alimentadas e mantidas no insetário nas condições já descritas no item 3.

Estudos anteriores demonstraram uma redução de fecundidade de 19 a 33% nas linhagens BANGKOK, GKEP, ROCK, TRINIDAD, TRIN-GKEP E GKEP-TRIN de *Ae. aegypti* após infecção por *P. gallinaceum* (HACKER, 1971; ARAÚJO, 2007). Em nosso laboratório resultados semelhantes foram obtidos com *Ae. aegypti* linhagem RED infectados por *P. gallinaceum*.

Para mostrar que essa característica está relacionada com a interação parasito – hospedeiro invertebrado e não se trata de uma característica dessa linhagem, novos experimentos foram feitos (contagem do número de ovos) utilizando, então, a linhagem HIGGS como comparativo.

Foram analisados 72 mosquitos (36 sadios e 36 infectados) *Aedes* de cada linhagem (RED e HIGGS) subdivididos em três experimentos independentes.

Os resultados desses experimentos estão descritos nas tabelas 01 e 02. A tabela 01 descreve o número de ovos depositados por cada fêmea nos três experimentos com a linhagem RED. Já a tabela 02 descreve o mesmo para a linhagem HIGGS. Os resultados das tabelas foram compilados nos gráficos das figuras 08 e 09 e as análises destes dados apontaram que a média do número de ovos produzidos pelas fêmeas da linhagem RED infectadas foi reduzido em 18,78% (Tabela 3) quando comparada às fêmeas sadias. Os resultados para a linhagem HIGGS mostraram uma redução de 21,27% (Tabela 4).

Tabela 1. Produção de ovos de mosquitos *Aedes aegypti* (linhagem RED) sadios ou infectados por *Plasmodium gallinaceum*

Linhagem RED	Sadios	Infectados	Linhagem RED	Sadios	Infectados	Linhagem RED	Sadios	Infectados
1	166	124	1	79	134	1	150	117
2	168	135	2	169	136	2	152	126
3	143	131	3	148	121	3	119	141
4	108	136	4	147	144	4	172	90
5	156	124	5	171	80	5	143	105
6	148	86	6	184	135	6	169	131
7	150	148	7	167	142	7	149	104
8	110	102	8	127	137	8	170	124
9	125	137	9	152	142	9	159	86
10	164	102	10	175	121	10	167	111
11	156	105	11	151	138	11	127	119
12	141	109	12	157	132			
Total de ovos	1735	1439	Total de ovos	1827	1562	Total de ovos	1677	1254
Média	144,6	119,9	Média	152,3	130,2	Média	152,5	114
Desvio Padrão	20,49	18,73	Desvio Padrão	27,71	17,42	Desvio Padrão	17,59	16,87

Número individual de ovos produzidos por mosquitos fêmea *Aedes aegypti* (RED) sadios e infectados por *Plasmodium gallinaceum* em três experimentos independentes com seus respectivos desvios e médias.

FONTE: Ioshino (2013)

Tabela 2. Produção de ovos de mosquitos *Aedes aegypti* (linhagem HIGGS) sadios ou infectados por *Plasmodium gallinaceum*

Linhagem HIGGS	Sadios	Infectados	Linhagem HIGGS	Sadios	Infectados	Linhagem HIGGS	Sadios	Infectados
1	176	108	1	116	96	1	160	151
2	145	109	2	167	140	2	174	154
3	95	91	3	169	122	3	95	90
4	171	157	4	179	140	4	160	96
5	99	171	5	157	137	5	170	121
6	95	151	6	169	120	6	178	116
7	149	147	7	148	61	7	181	124
8	146	115	8	155	75	8	155	122
9	178	114	9	161	141	9	143	133
10	173	119	10	154	111	10	171	161
11	188	90	11	175	107	11	174	129
12	178	121	12	136	143			
Total de ovos	1793	1493	Total de ovos	1886	1393	Total de ovos	1761	1397
Média	149,4	124,4	Média	157,2	116,1	Média	160,1	127
Desvio Padrão	34,83	26,10	Desvio Padrão	17,65	27,32	Desvio Padrão	24,32	22,41

Número individual de ovos produzidos por mosquitos fêmea *Aedes aegypti* (HIGGS) sadios e infectados por *Plasmodium gallinaceum* em três experimentos independentes com seus respectivos desvios e médias.

FONTE: Ioshino (2013)

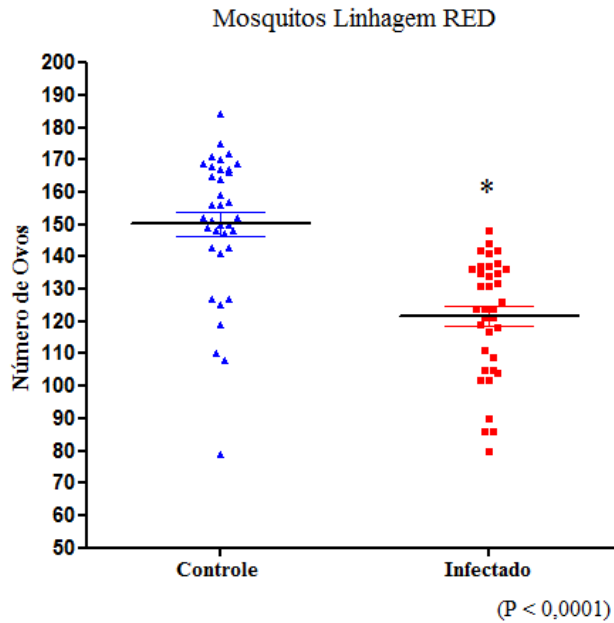
Figura 08 - Produção de ovos por mosquitos *Aedes aegypti* (RED)

Gráfico com o número de ovos produzidos por mosquitos *Aedes aegypti* linhagem RED sadio (controle) e infectado por *Plasmodium gallinaceum* (* P < 0,0001).
 FONTE: Ioshino (2013)

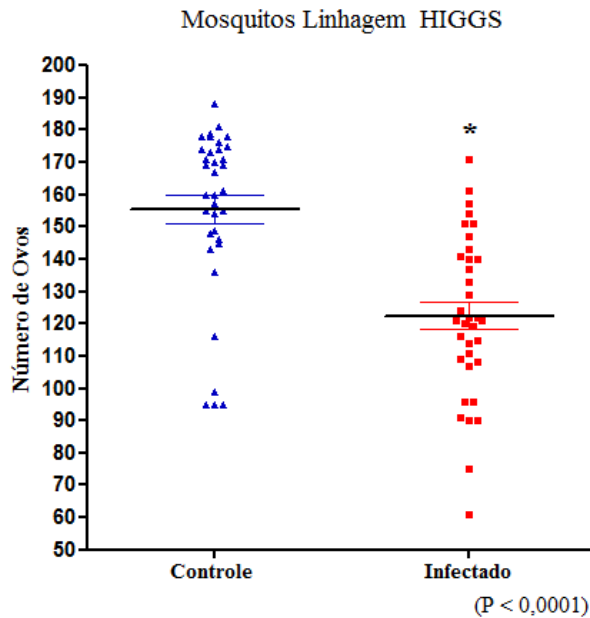
Figura 09 - Produção de ovos por mosquitos *Aedes aegypti* (HIGGS)

Gráfico com o número de ovos produzidos por mosquitos *Aedes aegypti* linhagem HIGGS sadio (controle) e infectado por *Plasmodium gallinaceum* (* P < 0,0001).
 FONTE: Ioshino (2013)

Tabela 3. Fecundidade dos mosquitos *Aedes aegypti* (linhagem RED) sadio e infectado

Linhagem RED	Sadio	Infectado	Redução (%)
Experimento 1 (n=12)	1.735	1.439	17,10%
Experimento 2 (n=12)	1.827	1.562	14,50%
Experimento 3 (n=11)	1.677	1.254	25,22%
Número total de ovos	5.239	4.255	Média 18,78%

Número total de ovos produzidos por mosquitos *Aedes aegypti* (linhagem RED) sadios e infectados por *Plasmodium gallinaceum* nos três experimentos independentes ($P < 0,0001$).

FONTE: Ioshino (2013)

Tabela 4. Fecundidade dos mosquitos *Aedes aegypti* (linhagem HIGGS) sadio e infectado

Linhagem HIGGS	Sadio	Infectado	Redução (%)
Experimento 1 (n=12)	1.793	1.493	16,73%
Experimento 2 (n=12)	1.886	1.393	26,14%
Experimento 3 (n=11)	1.761	1.397	20,67%
Número total de ovos	5.440	4.283	Média 21,27%

Número total de ovos produzidos por mosquitos *Aedes aegypti* (linhagem HIGGS) sadios e infectados por *Plasmodium gallinaceum* nos três experimentos independentes ($P < 0,0001$).

FONTE: Ioshino (2013)

4.2 Viabilidade das células foliculares

Uma vez confirmada redução da taxa de fecundidade dos mosquitos infectados, o próximo passo foi analisar a viabilidade das células que formam o folículo ovariano.

O ovário é um tecido formado por um conjunto de células foliculares. Essas possuem um número aproximado de 20 células (fêmea adulta ao emergir) podendo chegar a 200 - 250 células foliculares após 2 dias da emergência. Após a alimentação sanguínea, há um aumento gradativo na concentração de proteínas armazenadas pelo oócito e o folículo ovariano aumenta o seu tamanho, conseqüentemente há um aumento do número de

células foliculares, ou seja, de aproximadamente 260 células foliculares no momento da alimentação sanguínea, o folículo ovariano passa a ter 470 células após 10 horas do repasto (CLEMENTS, 1992).

Diante dessas informações (número de células foliculares) já descritas na literatura resolvemos utilizar a técnica MTT adaptando o protocolo ao ovário (tecido), uma vez que essa técnica é muito utilizada em análises de viabilidade celular em cultura de células.

Até o momento o número de artigos que utilizam o MTT para análise de tecidos é pequeno. Tutida e colaboradores (2006) padronizaram a técnica para análise da viabilidade celular de fragmentos de rins de ratos. Sendo assim resolvemos adaptá-la para analisar o ovário de mosquitos *Ae. aegypti*.

Inicialmente foi necessário estabelecer alguns parâmetros como a quantidade de pares de ovários (1 a 7), as condições dos ovários (inteiros ou macerados) e o tempo (dissecados após 2 até 36 horas do repasto sanguíneo) que os tecidos deveriam ficar na presença do sal tetrazólio (MTT). Após alguns experimentos, as melhores condições para realizar o teste MTT com os ovários foram: 5 pares de ovários, macerados e que o tecido rompido deve ficar 24 horas imerso no MTT na ausência de luz.

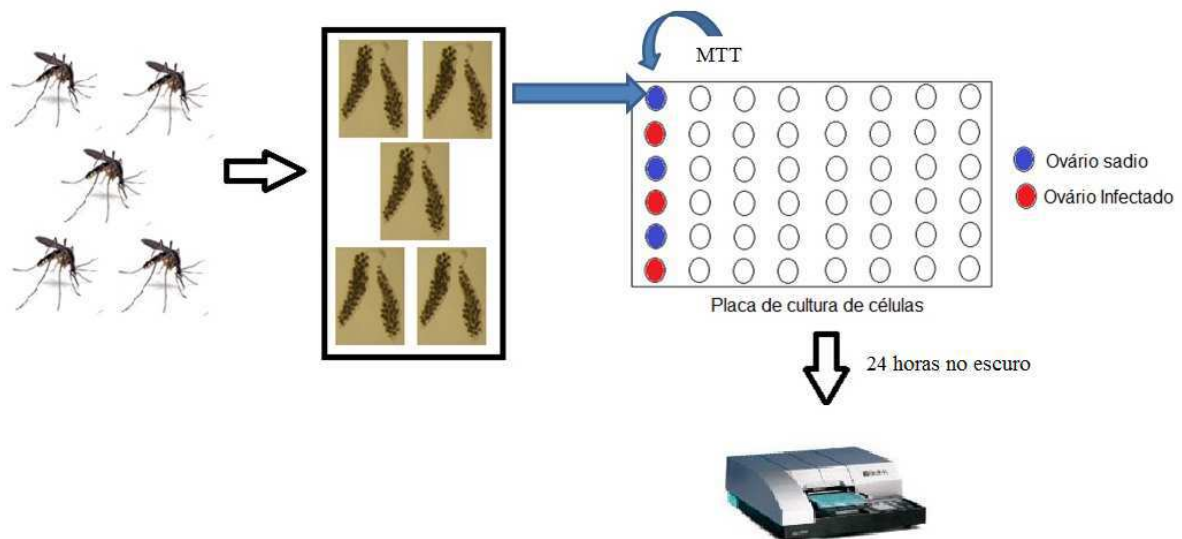
Sendo assim, para cada intervalo (14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas após alimentação) foram dissecados 15 pares de ovários de mosquitos sadios e 15 pares de ovários de mosquitos infectados e cada grupo foi subdividido em 3 poços distintos para fazer a triplicata experimental (Figura 10). Em seguida foi adicionado o sal tetrazólio (MTT) e após 24 horas da adição do MTT foi feita a leitura da absorbância dos intervalos no espectrofotômetro (item 3.3). Os valores de cada intervalo é determinado de acordo com o número de células viáveis, isto é, quanto maior o número de células viáveis maior será a degradação do sal MTT e conseqüentemente há um aumento na liberação do formazan, composto responsável pelo cálculo da absorbância no aparelho.

Os controles positivo e negativo também foram padronizados. Para o controle positivo, ovários de fêmeas 22 horas após o repasto sanguíneo sadio foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio (0,1 mM, 1,0 mM e 10 mM). Já o controle negativo foi obtido utilizando ovários no mesmo intervalo imersos em PBS (1x). Ambos os controles permaneceram nas devidas

soluções por 24 horas. A concentração de peróxido de hidrogênio que ofereceu melhor detecção da morte celular foi a de 10 mM, ou seja, nessa concentração foi observada uma redução de, aproximadamente, 10% do número de células viáveis (Figura 11).

Foram feitos experimentos utilizando ovários dissecados de 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas após alimentação sadia e infectada com *P. gallinaceum*. A técnica nos mostrou um resultado interessante. Havendo uma redução do metabolismo mitocondrial nos intervalos de 18, 22 e 24 horas após o repasto sanguíneo infectado em comparação às fêmeas alimentadas com sangue sadio (Figura 12).

Figura 10 - Esquema representativo da técnica adaptada do teste do MTT



Esquema do experimento realizado com o sal tetrazólio (MTT). Para cada poço da placa de cultura de células foi adicionado 5 pares de ovários de fêmeas sadias e infectadas por *Plasmodium gallinaceum*. Os ovários foram colocados nos respectivos poços, macerados e foi adicionado o MTT. Os tecidos permaneceram por 24 horas no escuro e depois foi realizada a leitura dos poços em um aparelho de Elisa (absorbância de 595 nm) 24 horas após a adição do sal nos poços.

FONTE: Ioshino (2013)

Figura 11 - Viabilidade celular do controle positivo da técnica do MTT

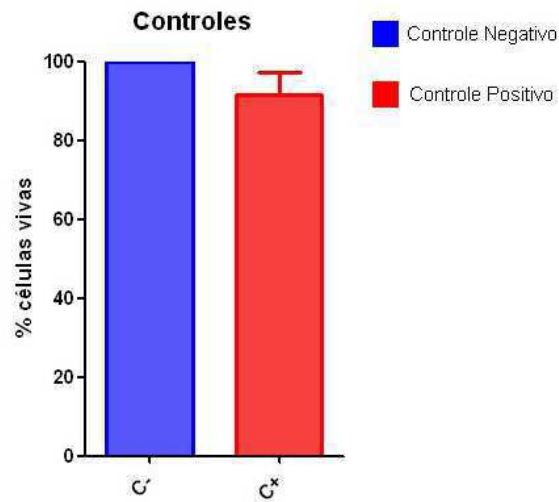


Gráfico representando a viabilidade celular dos ovários de *Aedes aegypti* imersos por 24 horas no peróxido de hidrogênio 10 mM (controle positivo).
 FONTE: Ioshino (2013)

Figura 12 - Viabilidade das células dos ovários de mosquitos *Aedes aegypti*

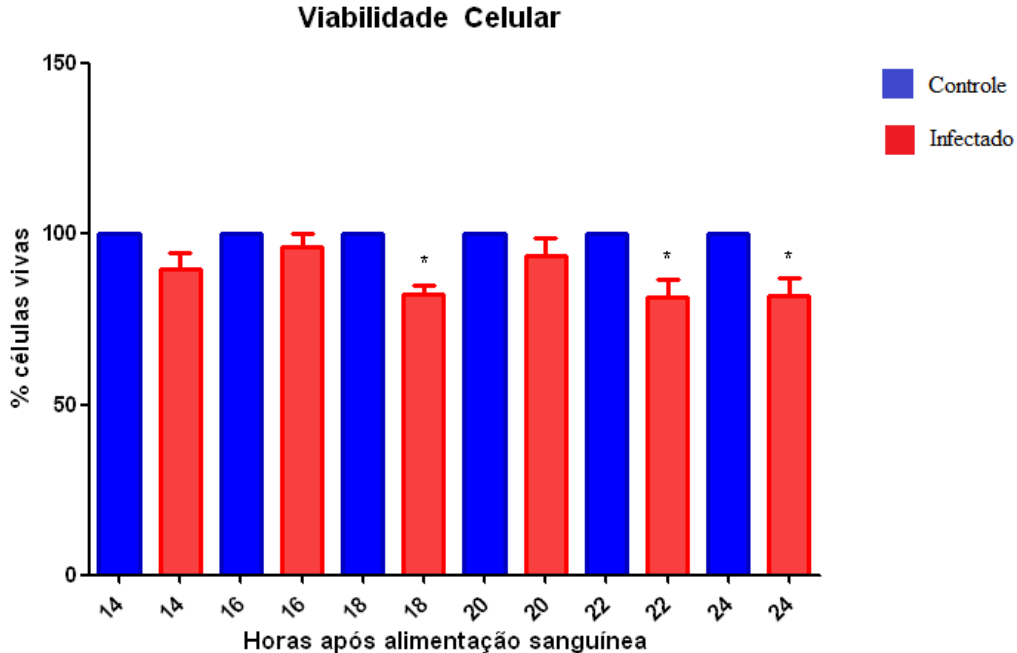
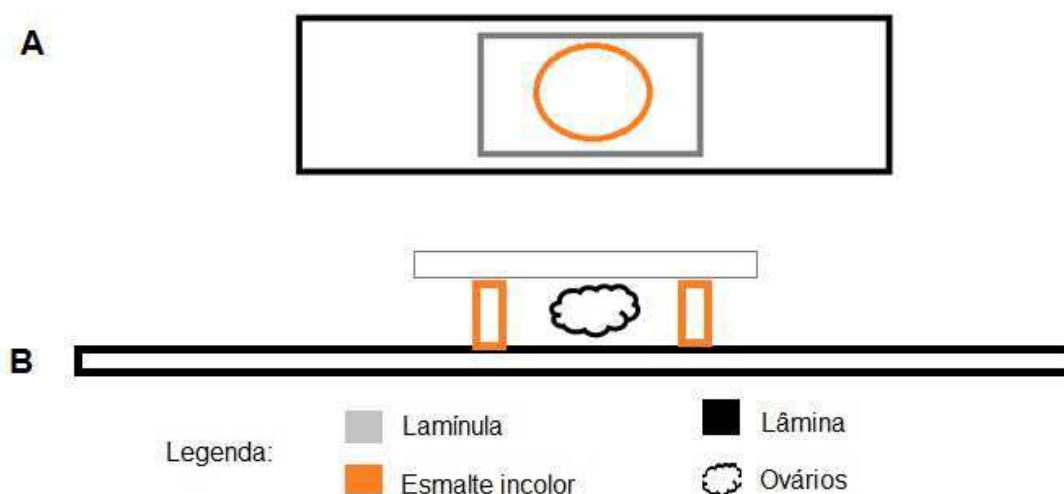


Gráfico representando a viabilidade celular no ovário após 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas do repasto sanguíneo infectado com *Plasmodium gallinaceum*. (* P < 0,05).
 FONTE: Ioshino (2013)

4.3 Morte das células foliculares

Para iniciar as análises da morte das células foliculares foi necessário realizar adaptações nas lâminas, uma vez que o ovário é um tecido que não permite o uso convencional de lâmina e lamínula. Por esse motivo elas foram modificadas adicionando uma barreira de esmalte incolor. Dessa forma a lamínula fica suspensa e não esmaga o tecido imerso na solução de *acridine orange* (AO) (50 $\mu\text{mol/l}$ em PBS 1x) (Figura 13).

Figura 13 - Lâmina adaptada



Lâmina adaptada para análise microscópica dos ovários marcados com o reagente *acridine orange*. A) Vista superior da lâmina; B) Vista lateral da lâmina.

FONTE: Ioshino (2013)

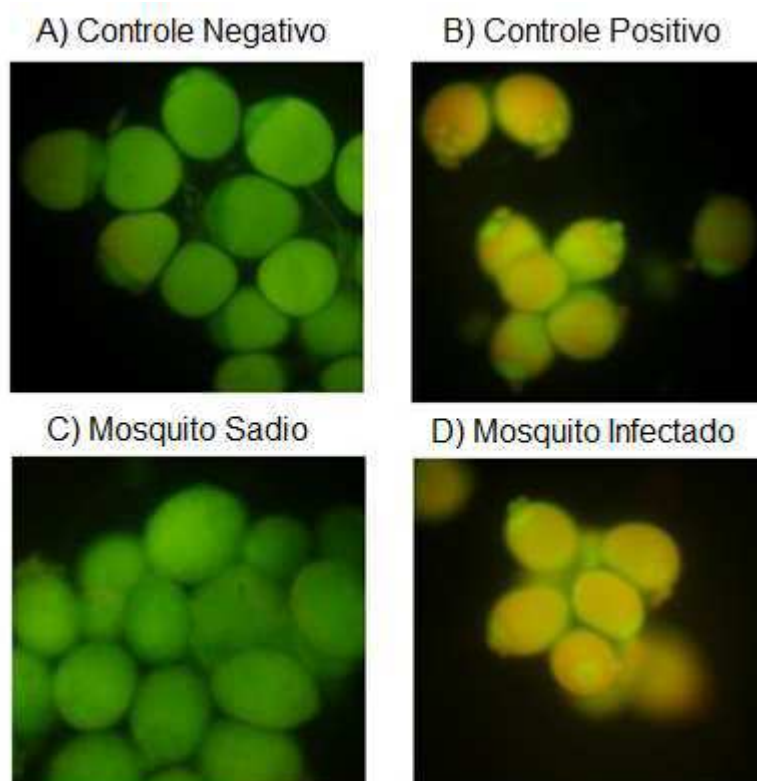
Ovários de 22 e 24 horas após o repasto sanguíneo infectado e sadio foram dissecados em solução de PBS (1x) e, em seguida, foi adicionado AO. Ao adicionar essa solução, as células foliculares dos ovários de fêmeas sadias foram marcadas, apresentando uma coloração verde comprovando que os ovários não apresentam células em morte celular (Figura 14 C). Já os núcleos das células foliculares de alguns ovários de fêmeas infectadas foram corados em laranja comprovando que as células estão em morte celular (Figura 14 D).

O controle positivo e o negativo de morte das células foliculares foram obtidos como citado no item 4.2. Ao adicionar AO sobre o controle positivo foi

possível observar uma grande quantidade de células mortas (Figura 14 A) quando comparado com ovário de fêmeas sadias (Figura 14 B).

A morte das células foliculares dos mosquitos *An. stephensi* foi observada por Hopwood e colaboradores (2001) 16 horas após a alimentação sanguínea infectada com *Plasmodium yoelii nigeriensis*. Uma das técnicas utilizada pelo autor foi a marcação dos ovários com o reagente AO. Através dessa marcação foi observada a cor alaranjada nos ovários infectados, porém ovários de fêmeas sadias apresentaram coloração verde. Esse dado reforça que os ovários de mosquitos *Ae. aegypti* infectados por *P. gallinaceum* também apresentam morte das células foliculares, porém 22 horas após o repasto sanguíneo infectado.

Figura 14 - Morte das células foliculares observadas em ovariolos de fêmeas *Aedes aegypti* infectadas por *Plasmodium gallinaceum*



Ovariolos marcados com *Acridine Orange*. A) Controle negativo: ovariolos, 22 horas após o repasto sanguíneo sadio, tratados com PBS (1x). B) Controle positivo: ovariolos, 22 horas após o repasto sanguíneo sadio, tratados com peróxido de hidrogênio (10 mM). C) Ovariolos de fêmeas após 22 horas do repasto sanguíneo sadio. D) Ovariolos de fêmeas após 22 horas do repasto sanguíneo infectado com *Plasmodium gallinaceum*.

FONTE: Ioshino (2013)

4.4 Identificação do DNA fragmentado nas células foliculares

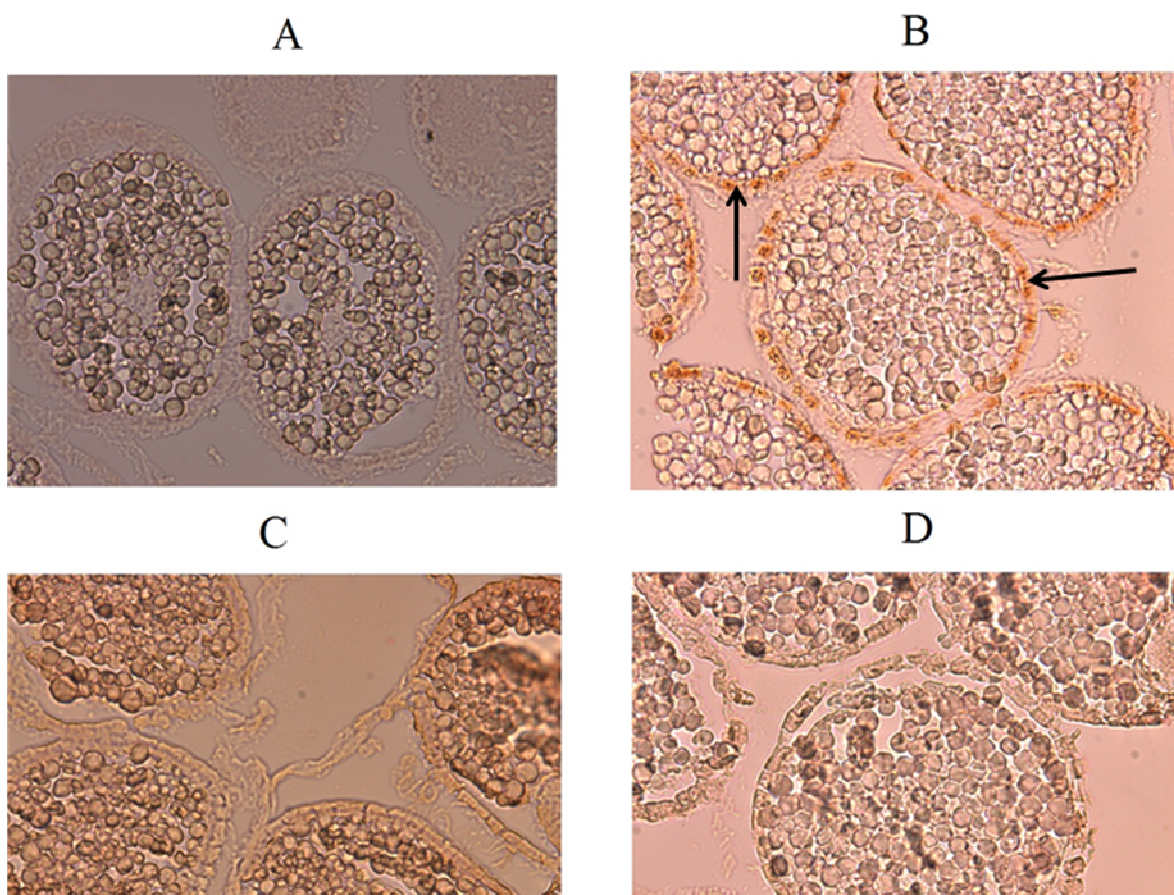
Para identificar a presença de DNA fragmentado nas células foliculares dos ovários de fêmeas *Ae. aegypti* infectadas, foi utilizado o kit DeadEnd Colorimetric TUNEL System (Promega).

Após a preparação das lâminas (como descrito no item 3.3.3) foram feitos os controles negativo e positivo do kit (Figura 15 A e B, respectivamente) e também a marcação das lâminas referentes aos tempos de 22 após a alimentação sanguínea sadia e infectada (Figura 15 C e D, respectivamente).

Na figura 15 B (controle positivo) é possível observar que as células foliculares apresentaram uma região marrom que determina a presença do DNA fragmentando. Já a figura 15 A (controle negativo) o interior das células foliculares permaneceu translúcido indicando que não há DNA fragmentado.

Pode-se observar que as células foliculares dos ovários 22 horas após alimentação sanguínea sadia e infectada (Figura 15 C e D, respectivamente) permaneceram translúcidos, ou seja, não há DNA fragmentado nesse intervalo.

Figura 15 – Identificação do DNA fragmentado nos ovários de mosquitos *Aedes aegypti* utilizando o TUNEL (DeadEnd Colorimetric TUNEL System - Promega)



Cortes histológicos de ovários de mosquitos *Aedes aegypti* marcados com kit DeadEnd Colorimetric TUNEL System (Promega). A) Controle negativo. B) Controle positivo (DNA fragmentado indicado pelas setas pretas). C) Ovários de fêmeas de *Aedes aegypti* sadias após 22 horas do repasto sanguíneo. D) Ovários de fêmeas infectadas com *Plasmodium gallinaceum* após 22 horas do repasto sanguíneo.

FONTE: Ioshino (2013)

5 Discussão

Com a disponibilidade do genoma do mosquito *Aedes aegypti* nos banco de dados VectorBase (www.vectorbase.org) e GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), novas pesquisas na área molecular e celular estão sendo desenvolvidas com o intuito de melhorar as formas de controle desse mosquito. No entanto, para desenvolver essas novas áreas é necessário que a interação parasito / vírus – vetor esteja também em constante avanço. Por esse motivo há a necessidade de aprofundar, cada vez mais, os estudos na fisiologia básica dos mosquitos e o seu funcionamento perante a um patógeno.

Quando o intuito é avaliar o *fitness* reprodutivo e a resposta fisiológica dos mosquitos, é necessário que esses se desenvolvam em ambientes sem escassez de comida, tanto na fase adulta como larval (CAROCI, et al. 2004; CLIFTON; NORIEGA, 2012). Alguns autores demonstraram que há uma relação entre o estado nutricional dos mosquitos (larvas e adultos), produção de hormônio juvenil e a fertilidade. Quando as larvas são submetidas a um regime nutricional baixo, há uma alteração no desenvolvimento do *corpore allata* (glândula responsável pela produção do hormônio juvenil) modificando o desenvolvimento pré-vitelogênico dos ovários. A variação na quantidade de glicose disponível aos mosquitos adultos também pode interferir no desenvolvimento reprodutivo, ou seja, mosquitos expostos à baixa quantidade de glicose podem desenvolver um aumento da reabsorção dos folículos ovarianos alterando a sua capacidade reprodutiva (CLIFTON; NORIEGA, 2011).

Uma única fêmea de *Ae. aegypti* é capaz de ovipor em torno de 100 - 150 ovos na natureza (CLEMENTS, 1992). Porém alguns experimentos realizados em nosso laboratório mostraram que há uma redução da fertilidade dos mosquitos *Ae. aegypti* quando infectados por *P. gallinaceum* (Figura 08 e 09). Houve uma redução de 18,78% do número de ovos produzidos por mosquitos infectados da linhagem RED (Tabela 03) e uma redução de 21,27% nos mosquitos infectados da linhagem Higgs (Tabela 04) quando comparados aos seus respectivos controles.

Essa mesma característica também foi observada em outros culicídeos como, por exemplo, em *Culex tarsalis* infectados com vírus do Nilo Ocidental

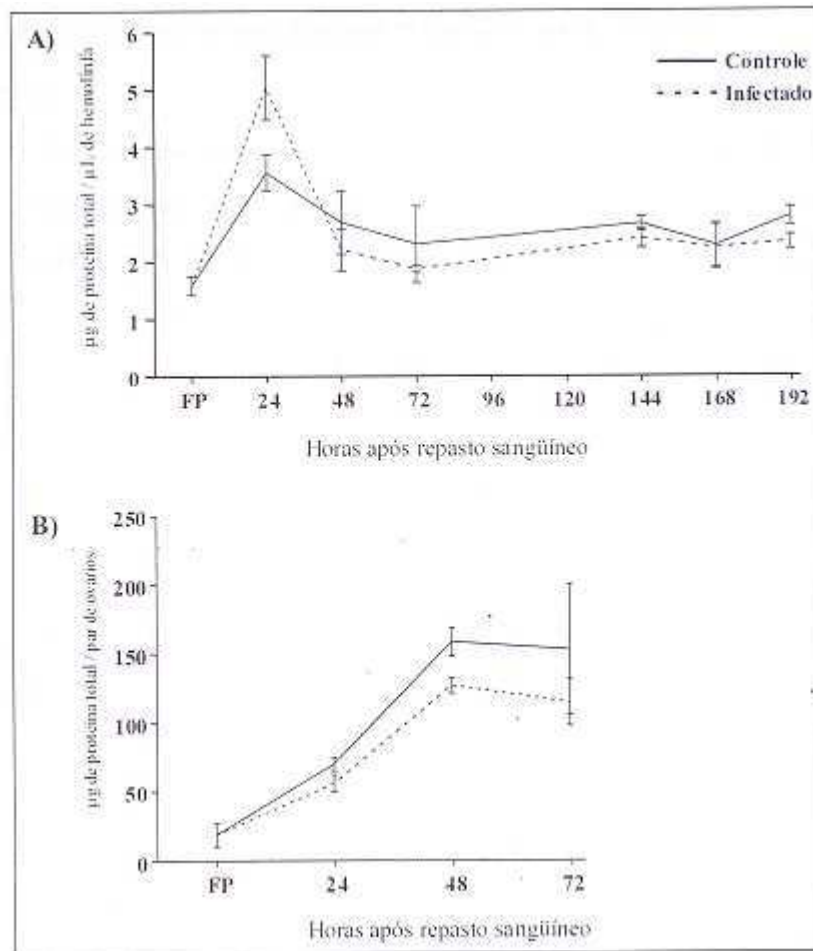
(WNV) e *An. stephensi* e *An. gambiae* infectados por *P. yoelii nigeriensis* (HOGG; HURD, 1995; AHMED, et al., 1999; STYER, et al., 2007).

Com o intuito de determinar se há uma diferença na viabilidade das células que compõe os ovários de fêmeas infectadas e sadias, utilizamos a técnica do MTT (adaptada ao tecido) que nos mostrou um resultado interessante no qual há uma redução do metabolismo mitocondrial nos intervalos de 18, 22 e 24 horas após o repasto sanguíneo infectado (Figura 12). Esse resultado difere das análises realizadas em ovários de fêmeas sadias e infectadas dos mosquitos *An. stephensi* infectados com *P. yoelii nigeriensis* onde a morte celular foi observada 16 horas após o repasto sanguíneo infectado, porém utilizando outra técnica (HOPWOOD, et al., 2001).

Apesar dos vetores pertencerem a mesma família, a interação *An. stephensi* e *P. yoelii nigeriensis* é a que mais se aproxima da interação patógeno - hospedeiro invertebrado no ciclo natural e na co-evolução das espécies. O mesmo não se pode afirmar para a interação adaptada entre *Ae. aegypti* e *P. gallinaceum* que é um modelo de laboratório, sendo essa uma provável hipótese para o atraso da morte das células do folículo ovariano.

Resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que 24 horas após o repasto sanguíneo infectado há uma redução na produção do hormônio ecdisona pelos ovários (figura 06) (ARAÚJO, et al., 2011) fato esse que pode ser explicado pela morte das células foliculares já que elas são as responsáveis pela produção desse hormônio. Conforme explicado anteriormente esse hormônio irá auxiliar na produção das proteínas pré – vitelogênicas no corpo gorduroso, conseqüentemente essa redução irá interferir na produção dessas proteínas, porém isso não justifica a redução do número de ovos produzidos pelas fêmeas infectadas (como foi observado nesse estudo) visto que há um acúmulo das proteínas na hemolinfa das fêmeas infectadas quando comparada às fêmeas sadias após 24 horas do repasto sanguíneo, como mostrou Araújo et al. (2011) (figura 16).

Figura 16 - Quantificação de proteína total na hemolinfa e ovários após a alimentação sanguínea



Quantificação de proteína em mosquitos *Aedes aegypti* sadios e infectados por *Plasmodium gallinaceum*. A) Quantificação de proteína total de homolinfa. B) Quantificação de proteína total de ovários

FONTE: Araújo, 2008 - Tese doutorado

Outro ponto interessante é associar o desenvolvimento do parasito no mosquito e a redução da viabilidade celular nos ovários 22 e 24 horas após o repasto sanguíneo. Apesar do ovário não ser um tecido importante para o desenvolvimento do *Plasmodium* no mosquito, sabe-se que entre 20 e 36 horas, após o repasto sanguíneo infectado, o oocineto invade a parede do intestino médio. Portanto pode ser que esteja ocorrendo uma modificação fisiológica (ativação do sistema imunológico, por exemplo) que influencia a fecundidade da fêmea de *Ae. aegypti*.

Uma provável explicação para essa redução da viabilidade celular é a morte das células foliculares que circundam os ovariolos presentes nos

ovários. Portanto após observar a redução da viabilidade celular dos ovários 18, 22 e 24 horas após a alimentação sanguínea sadia e infectada com *P. gallinaceum*, foi utilizado o reagente *acridine orange* (AO) para confirmar a morte dessas células.

Através dessa metodologia, ovários 18 horas após a alimentação sanguínea sadia e infectada apresentaram a coloração verde indicando, então, que as células foliculares não estão em morte celular. Porém ao analisar os intervalos de 22 e 24 horas as células dos ovários de fêmeas infectadas foram coradas em laranja mostrando que as células estão em morte quando comparado aos ovários de fêmeas sadias (Figura 14).

Esses dados corroboram com Hopwood e colaboradores (2001) que, utilizando o mesmo reagente (AO), observaram morte dessas células nos ovários de mosquitos *An. stephensi* 16 horas após a alimentação sanguínea infectada com *Plasmodium yoelii nigeriensis*.

Um tipo de morte celular muito importante na regulação e homeostase dos organismos é a apoptose, frequentemente definida como uma via de morte celular regulada no qual está envolvida uma sequência de caspases apoptóticas (DEGTEREV; YUAN, 2008; BOATRIGT; SALVESEN, 2003). Uma das características celulares evidentes em células que sofreram esse processo é a fragmentação nuclear e, conseqüentemente, a fragmentação do DNA (ALBERTS, 2004). Sendo assim, utilizamos a marcação TUNEL para identificar a presença de DNA fragmentado, caso a morte das células foliculares seja do tipo apoptose.

Em nossos resultados não foi possível encontrar DNA fragmentado nos cortes dos ovários de fêmeas infectadas (Figura 15 D), mas isso não significa que a morte celular (apoptose) não esteja ocorrendo no tecido.

Uma das hipóteses que explica essa ausência do DNA fragmentado nas células foliculares é a necessidade de realizar o corte de todo o ovário para observar a presença dessa característica, pois, talvez, a área onde foi realizado o corte histológico não corresponde ao local onde se encontram as células foliculares em apoptose. Outro ponto que é importante lembrar são os tempos (22 e 24 horas após a alimentação sanguínea infectada) nas quais foram realizadas as marcações. Talvez esses não sejam o mesmo momento que

ocorre a fragmentação do DNA, por isso a necessidade de fazer novas análises utilizando tempos mais tardios como 26 até, no máximo, 30 horas após o repasto sanguíneo, pois a partir desse tempo as células foliculares começam a morrer dando origem ao córion, uma camada importante que dará proteção aos ovos (CLEMETS,1992).

Além disso, outras metodologias podem ser empregadas com o intuito de determinar a morte por apoptose, caso esse seja o processo que ocorre nos ovários das fêmeas infectadas, por exemplo, a identificação da ativação da caspase – 3 e a realização da hibridação *in situ* fluorescente (FISH) (ROEKRING; SMITH, 2010). A primeira técnica tem como objetivo identificar, através do kit ApoAlert caspase-3 colorimetric assay (Clontech), a presença da caspase – 3 que é uma enzima (protease) envolvida na apoptose, uma vez que esse fato foi observado em *Ae. aegypti* quando infectados por denguevírus (ROEKRING; SMITH, 2010).

Por outro lado pode ser que, diferente do *An. stephensi*, a morte das células foliculares ocorra pelo processo de necrose que, ao contrário de uma célula apoptótica, não é uma morte programada.

Através desses estudos podemos afirmar que há uma redução da viabilidade celular nos ovários de mosquitos nos intervalos de 22 e 24 horas após o repasto sanguíneo infectado e que essa redução está relacionada com a morte das células foliculares.

Esses dados servirão de base para determinar o tipo de morte celular que ocorre no tecido bem como os genes envolvidos nesse processo.

6 Conclusão

Os mosquitos *Aedes aegypti* infectados por *Plasmodium gallinaceum* apresentam redução significativa do seu fitness reprodutivo e uma das explicações para essa característica é a morte das células foliculares que envolvem os ovariolos.

Até o presente momento não foi possível determinar se o tipo de morte dessas células corresponde à apoptose como foi descrito em mosquitos *Anopheles stephensi* infectados por *Plasmodium yoelii nigeriensis*.

Referências

- AHMED, A. M.; HURD, H. Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in *Anopheles gambiae* via follicular apoptosis. **Microbes Infect.**, v.8, n.2, p. 308-315, 2006.
- AHMED, A. M.; MAINGON, R. D.; ROMANS, P.; HURD, H. Effects of malaria infection on vitellogenesis in *Anopheles gambiae* during two gonotrophic cycles. **Insect Mol Biol.**, v. 10, n. 4, p. 347-356, 2001.
- AHMED, A. M.; MAINGON, R. D.; TAYLOR, P. J.; HURD, H. The effects of infection on the reproductive fitness of the mosquito *Anopheles gambiae*. **Invertebr. Repr. Develop.**; v. 36, p. 1-3, 1999.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Ciclo celular e morte celular programada. In: _____ **A Célula**, 4 ed. São Paulo: Ed. Artmed, 2004, p. 983-1026.
- ARAÚJO, R. V. Estudo dos efeitos da infecção por *Plasmodium gallinaceum* em processos fisiológicos de *Aedes aegypti*. 2007 86 folhas. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- ARAÚJO, R. V.; MACIEL, E.; HARTFELDER, K.; CAPURRO, M. L. Effects of *Plasmodium gallinaceum* on hemolymph physiology of *Aedes aegypti* during parasite development. **J. Insect Physiol.**, v. 57, p. 265 – 273, 2011.
- ATTARDO, G.M.; HANSEN, I.A.; RAIKHEL, A.S. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, p. 661 – 675, 2005.
- BOATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 725 – 731, 2003.
- BROWN, M. R.; GRAF, R.; SWIDEREK, K. M.; FENDLEY, D.; STRACKER, T. H.; CHAMPAGNE, D. E.; LEA, A. O. Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 7, p. 3967-3971, 1998.
- CAROCI, A. S.; LI, Y.; NORIEGA, F. G. Reduced juvenile hormone synthesis in mosquitoes with low teneral reserves reduces ovarian previtellogenic development in *Aedes aegypti*. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p. 2685-2690, 2004.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- CLEMENTS, A. N. Development, nutrition and reproduction. In: _____ **The Biology of mosquitoes**, v. 1. Londres: Chapman & Hall, 1992, p. 360-405.
- CLIFTON, M. E.; NORIEGA, F. G. Nutrient limitation results in juvenile hormone-mediated resorption of previtellogenic ovarian follicles in mosquitoes. **J. Insect Physiol.**, v. 57, p. 1274–1281, 2011.
- CLIFTON, M. E.; NORIEGA, F. G. The fate of follicles after a blood meal is dependent on previtellogenic nutrition and juvenile hormone in *Aedes aegypti*. **J. Insect Physiol.**, v. 58, p. 1007-1019, 2012.
- COLLINS, F. H.; JAMES, A. A. Genetic modification of mosquitoes. **Science and Medicine**, v. 3, n. 6, p. 52-61, 1996.
- DEGTEREV, A.; YUAN, J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nature**, v. 9, p. 378 – 390, 2008.
- DEITSCH, K. W.; CHEN, J. S.; RAIKHEL, A. S. Indirect control of yolk protein genes by 20-hydroxyecdysone in the fat body of the mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 25, n. 4, p. 449-454, 1995.
- FOCKS, D. A. An improved separator for the developmental stages, sexes and species of mosquito (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, v.17, p. 567-568, 1980.
- FORATTINI, O. P. Família Culicidae – Morfologia . In: _____ **Culicidologia médica**, v. 1. São Paulo: Edusp; 1996, p. 193 - 267.
- GRAY, E. M.; BRADLEY, T. J. Malarial infection in *Aedes aegypti*: effects on feeding, fecundity and metabolic rate. **Parasitology**, v. 132, p. 1-8, 2005.
- HACKER, C. S. The differential effect of *Plasmodium gallinaceum* on the fecundity of several strains of *Aedes aegypti*. **J. Invert. Pathol.**, v. 18, p. 373-377, 1971.
- HOGG, J. C.; HURD, H. *Plasmodium yoelii nigeriensis*: the effect of high and low intensity of infection upon the egg production and bloodmeal size of *Anopheles stephensi* during three gonotrophic cycles. **Parasitology**, v. 111, p. 555-562, 1995.
- HOGG, J. C.; HURD, H. The effects of natural *Plasmodium falciparum* infection on the fecundity and mortality of *Anopheles gambiae* s. l. in north east Tanzania. **Parasitology**, v. 114, p. 325-331, 1997.
- HOPWOOD, J. A.; AHMED, A. M.; POLWART, A.; WILLIAMS, G. T.; HURD, H.

Malaria-induced apoptosis in mosquito ovaries: a mechanism to control vector egg production. **J. Exp. Biol.**, v. 204, p. 2773-2780, 2001.

JAHAN, N.; HURD, H. Effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* (Haemosporidia: Plasmodiidae) on *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) vitellogenesis. **J. Med. Entomol.**, v. 35, n. 6, p. 956-961, 1998.

MARSHALL, J. M.; TAYLOR, C. E. Malaria control with transgenic mosquitoes. **Plos medicine**, v. 6, p. 164-168, 2009.

NAGAO, E.; ARIE, T.; DORWARD, D. W.; FAIRHURST, E. M.; DVORAK, J. A. The avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* causes marked structural changes on the surface of its host erythrocyte. **J. Struct Biol.**, v. 162, n. 3, p. 460-467, 2008.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Health situation in the americas Basic Indicators 2009.** Disponível em: http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2009/BI_ENG_2009.pdf. Acesso em: 25 fev. 2013.

RAIKHEL, A. S.; DHADIALLA, T. S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 37, p. 217-251, 1992.

RAIKHEL, A. S.; KOKOZA, V. A.; ZHU, J.; MARTIN, D.; WANG, S. F.; LI, C.; SUN, G.; AHMED, A.; DITTMER, N.; ATTARDO, G. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, p. 1275-1286, 2002.

REITER, P. Climate change and mosquito-borne disease. **Environ. Health Perspect**, v. 109, p. 141-161, 2001.

ROEKRING, S.; SMITH, D. R. Induction of apoptosis in dengue virus infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 104, p. 239-241, 2010.

SOUZA-NETO, J. A.; SIM, S.; DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, v. 106, n. 42, p. 17841-17846, 2009.

STYER, L. M.; MEOLA, M. A.; KRAMER, L. D. West Nile Virus Infection Decreases Fecundity of *Culex tarsalis* Females. **J. Med. Entomol.**, v. 44, n. 6, p. 1074-1085, 2007.

TUTIDA, L.A. et al. Padronização do MTT como um teste de viabilidade celular em fragmentos corticais de rins de ratos. In: **58 Reunião Anual da Sociedade**

Brasileira Progresso da Ciência. Florianópolis, 2006. Anais. São Paulo. SBPC, 2006 (Online).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2009.** Geneva: WHO Press 2009, 78 p.

Anexo A

Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*

André Luis Costa-da-Silva^{1*}, Flávia Rosa Navarrete¹, Felipe Scassi Salvador², Maria Karina-Costa¹, Rafaella Sayuri Ioshino¹, Diego Soares Azevedo¹, Desirée Rafaela Rocha¹, Camila Malta Romano², Margareth Lara Capurro¹

1 Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil, **2** Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil

Abstract

Aedes aegypti, the main vector of dengue virus, requires a blood meal to produce eggs. Although live animals are still the main blood source for laboratory colonies, many artificial feeders are available. These feeders are also the best method for experimental oral infection of *Ae. aegypti* with Dengue viruses. However, most of them are expensive or laborious to construct. Based on principle of Rutledge-type feeder, a conventional conical tube, glycerol and Parafilm-M were used to develop a simple *in-house* feeder device. The blood feeding efficiency of this apparatus was compared to a live blood source, mice, and no significant differences ($p=0.1189$) were observed between artificial-fed (51.3% of engorgement) and mice-fed groups (40.6%). Thus, an easy to assemble and cost-effective artificial feeder, designated “Glytube” was developed in this report. This simple and efficient feeding device can be built with common laboratory materials for research on *Ae. aegypti*.

Citation: Costa-da-Silva AL, Navarrete FR, Salvador FS, Karina-Costa M, Ioshino RS, et al. (2013) Glytube: A Conical Tube and Parafilm M-Based Method as a Simplified Device to Artificially Blood-Feed the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. PLoS ONE 8(1): e53816. doi:10.1371/journal.pone.0053816

Editor: Pedro Lagerblad Oliveira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

Received: October 18, 2012; **Accepted:** December 3, 2012; **Published:** January 14, 2013

Copyright: © 2013 Costa-da-Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (#2008/10254-1; #2009/53637-0) - www.fapesp.br, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq/Departamento de Ciência e Tecnologia – DECIT (#555648/2009-5) - www.cnpq.br, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES - www.capes.gov.br, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular – INCT-EM - www.inctem.bioqmed.ufrj.br. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: alcosta@icb.usp.br

Introduction

Blood feeding of *Aedes aegypti*, the major dengue viruses' vector, is a fundamental part of routine protocols to maintain mosquito colonies in insectary facilities since a blood meal is required for egg production by females [1]. After bioethical certification by animal-care committees [2,3], anesthetized or immobilized live animals are used frequently as a source of blood for mosquitoes [4]. However, use of live animals is not possible in many circumstances. For example, the lack of animal facilities or an animal-use regulatory or permitting structure can limit blood provision. Furthermore, the “3 Rs” principles (reduction, refinement and replacement) in the scientific use of live animals [5] also need to be considered when feeding anautogenous mosquito species. Artificial feeders can be applied to replace live animals as blood sources [4]. Dengue virus infection of *Ae. aegypti* for experimental purposes is usually done with a titrated viremic blood meal and requires an artificial blood-feeder system [6,7].

There are numerous reports showing successful development and use of different devices to artificially feed blood-sucking invertebrate vectors of human pathogens [8–10]. Artificial feeding apparatus for *Ae. aegypti* also are represented extensively in the literature [11–17]. These approaches share common features.

Blood is placed between a heating element (used to mimic vertebrate blood temperature) and a thin membrane, which females penetrate with their proboscis to access and imbibe the blood. One of the most popular devices is Rutledge-type feeder with Parafilm-M® simulating the skin [11]. Several based versions are available, but a few number of these devices is easy to assemble with common materials available in research laboratories and cost-effective [15].

We developed a simple artificial membrane-feeding method using a standard conical tube and Parafilm M as a simplified and convenient apparatus to facilitate the *Ae. aegypti* artificial blood-feeding.

Materials and Methods

Ethics Statement

All experiments with mice were carried out in accordance with the guidelines of the Ethical Principles for Experiment on Animals adopted by Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de laboratório (SBCAL) and approved by the Institutional Ethics Review Committee (Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA)-Universidade de São Paulo, protocol #014.

Experiments involving the use of human blood were conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Concentrated human erythrocytes type A stored in ACD (acid citrate dextrose), cited as “blood” in the experiments, were donated by Instituto de Hematologia de São Francisco LTDA (HEMASF). This already-existing collection was (HEMASF-A) received as anonymous sample from blood donor. The protocol was approved by the Institutional Review Board in Human Research (Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas/USP) and Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, protocol #503.

Aedes aegypti Rearing

Ae. aegypti (Higgs white-eye strain) larvae, pupae and adults were reared in a local facility at the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil. Mosquitoes were maintained at $27 \pm 1^\circ\text{C}$, 75–80% relative humidity and with a 12:12 h light:dark cycle. Larvae were fed on finely powdered fish food (Tetramin®) and adult mosquitoes were maintained *ad libitum* on solution of 10% sucrose (w/v). Pre-mated five-day old adult females were blood-fed using anaesthetized mice when required.

Glytube Materials and Assembling the Device

The feeder, designated “Glytube”, is based on a 50 mL conical-bottomed tube with screw cap, Parafilm-M®, Dura Seal™ heat-resistant sealing film (or other laboratory sealing film) and 40 mL of 100% glycerol (Figures 1 and 2). An orifice 2.5 cm in diameter is cut in the center of the screw cap (Figures 1B and 1C) and a square of Parafilm membrane (5 cm×5 cm, Figure 1E) is rubbed on human skin to adhere natural odor ligands and improve its attractiveness to mosquitoes [18]. This membrane is stretched across the cap until becomes translucent and is placed over the screw cap (Figure 1D). The membrane edges are folded on the lateral gripping ribs at outer side of the screw cap. Another thin strip of Parafilm (2.5 cm×5.0 cm) is used to laterally fix the feeding membrane on the screw cap and the excess of stretched Parafilm is removed. This unit comprises the feeding element in which the internal part of screw cap is the blood reservoir (Figure 1D). The conical tube forms the heating element and is filled with 40 mL of 100% glycerol, the open end of the tube is sealed with Dura Seal film (10 cm×13 cm) and fixed laterally using a strip of Parafilm (2.5 cm×5.0 cm) (Figures 1A and 1F). The thermal conductivity of glycerol is low [19] and it works as a heated lid, keeping the blood temperature longer. The plastic that seals the tube (Figure 1F) provides the interface between blood and glycerol, facilitating heat transfer to the blood.

The feeding and heating elements are applied together to blood feed the mosquitoes (Figure 1H). Pre-heated blood (1.5 mL at 37°C) is placed in the internal side of the perforated screw cap with the fixed membrane (Figure 1G). Pre-heated glycerol (50°C) is transferred to the conical tube and the top is covered with Dura Seal film. The heating element is screwed to the cap containing the membrane and pre-heated blood. A complete screwing of the two elements is necessary to guarantee the contact between 1.5 mL blood volume and the heater element. The assembled apparatus is offered to the females confined to a plastic cup covered with fine-mesh marquisette. The Glytube is placed on the mesh-netted cup lids with feeding unit membrane in contact with the marquisette (Figure 1H).

Blood and Conditions to Perform Mosquito Blood-feeding Experiments

All feeding experiments were done in an insectary maintained at $27 \pm 1^\circ\text{C}$. A total of 1.5 mL pre-heated (37°C) concentrated erythrocytes was delivered to the Glytube feeding element. For control groups, a plastic Petri dish with a 2.5 cm diameter hole (the same diameter of the orifice in the screw cap) in its center was used to provide the same accessible surface area for females to feed on mice. The anesthetized mice were placed on the Petri dish on top of the plastic cups containing the mosquitoes. A small region of the mouse’s abdomen (limited by the orifice) was exposed during feeding.

For artificial blood-feeding experiments, 100 female and 32 male (3:1 ratio) pupae were divided in two groups and transferred into a plastic cup containing 100 mL distilled water and covered with fine-mesh marquisette. After adults’ emergence, distilled water was discarded and insects were kept on 10% sucrose solution. Four days after emergence, sucrose solution was removed and 5 days-old pre-mated females were allowed to blood-feed for 30 minutes on anaesthetized mice (Balb/c strain) (control group) or on Glytube device (experimental group). After 30 minutes, CO₂ anaesthetized mosquitoes were maintained on ice and engorged females were counted. To obtain feeding efficiency, these experiments were done in biological triplicates (independent hatched postures), two with experimental triplicate groups and another one with experimental sixplicate groups.

Statistical Analysis and Programs

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism® (version 5.00) for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The engorged female percentages between Glytube and mice-fed groups were used to estimate the statistical significance by Mann-Whitney test.

Glytube schematic representation and exploded drawing were done using Solidworks program (version 2012).

Results and Discussion

To evaluate Glytube feeding efficiency as an artificial feeder, the total number of engorged females was compared with that derived from controls in which females were fed for the same time (30 minutes) on anesthetized mice. Table 1 summarizes all the performed experiments. The Glytube feeder was a blood meal efficient source (51.3% [279/544] of females showed engorgement, Figure 1I) when compared to anaesthetized mice (40.6% [242/596]) and the difference of mean percentages between the Glytube and mice-fed groups are not significant ($p = 0.1189$, Figure 3).

Our results support the conclusion that the Glytube device is a useful method to artificially blood-feed *Ae. aegypti* females for colony maintenance in the insectary or when infected blood meals are needed in virus-challenge experiments. Reinforcing this assumption, Dengue virus-infected *Ae. aegypti* was obtained by using Glytube loaded with blood and virus supernatant mixture (data not shown). Also in a simple test, Glytube containing the same blood preparation described in this work was offered to two other Culicidae mosquito’s species - *Culex quinquefasciatus* (Culicinae) and *Anopheles aquasalis* (Anopheline) and engorged females were observed (data not shown), although the comparison with mice was not performed.

In this report, comparison of the artificial feeder efficiency with anaesthetized mice was done to show that the Glytube can be used to replace live animals on *Ae. aegypti* blood-feeding. Comparing live blood source to artificial feeder is a prerequisite to validate a new

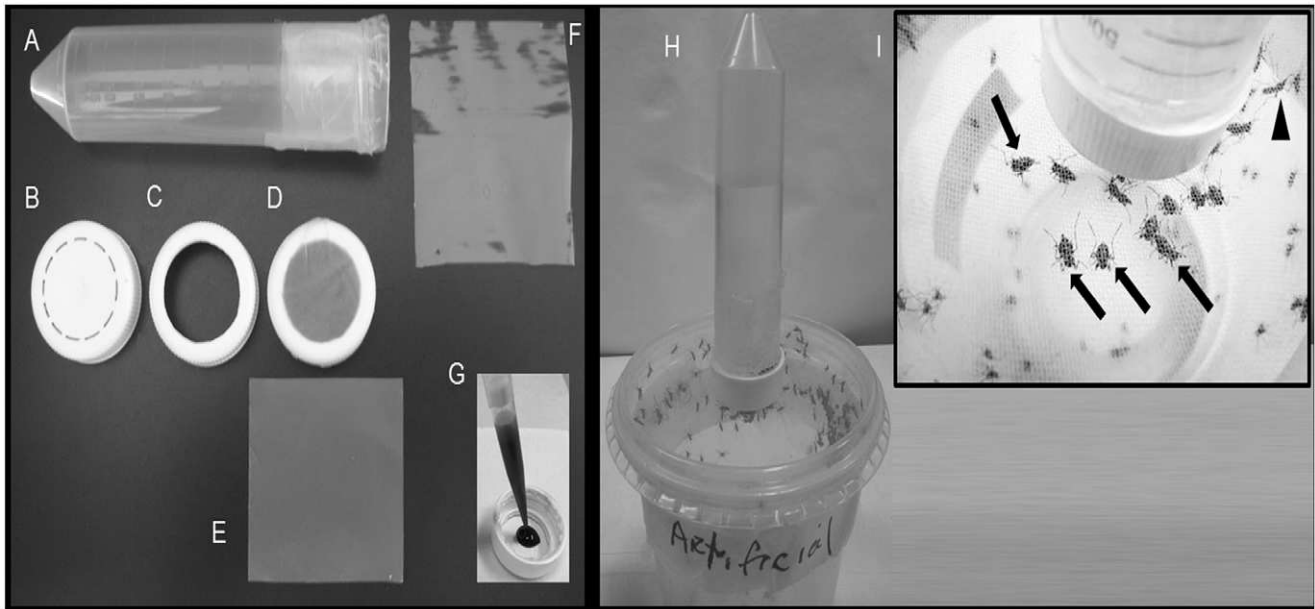


Figure 1. Materials used to assemble the Glytube blood feeder device. **A.** A conical tube (50 mL) filled with 40 mL warmed 100% glycerol and top sealed with Dura Seal™ heat-resistant sealing film. The sealing film is laterally held to the tube using a Parafilm-M® thin strip (2.5 cm×5.0 cm). **B.** Screw cap of the conical tube. Dashed circular black line indicates the cap region where plastic is removed by cutting to generate the feeding element. **C.** Screw cap with 2.5 cm diameter hole. **D.** Screw cap covered externally with stretched Parafilm-M. A strip of Parafilm is fixing the feeding membrane to the cap. **E.** A piece of Parafilm-M (5 cm×5 cm) as a feeding membrane. Parafilm must be stretched to cover the screw cap. **F.** A piece of Dura Seal heat-resistant sealing film is used to sealing the conical tube filled with pre-heated 100% glycerol. **G.** Blood supplying the feeding element at internal side of the screw cap with the stretched Parafilm membrane. **H.** Heating and feeding elements assembled together to feed the *Ae. aegypti* females. **I.** Non blood-fed (black arrowhead) and artificially blood-fed females with dilated abdomens (black arrows).
doi:10.1371/journal.pone.0053816.g001

system. Furthermore, other reports which published different artificial feeders also just compared feeding efficiency in relation to live animals [12,17,20].

Feeding efficiency is a relevant parameter which needs to be observed in development of artificial feeder devices. Unfortunately, the differences in experimental conditions between articles that showed other blood feeders are enormous and impose difficulties

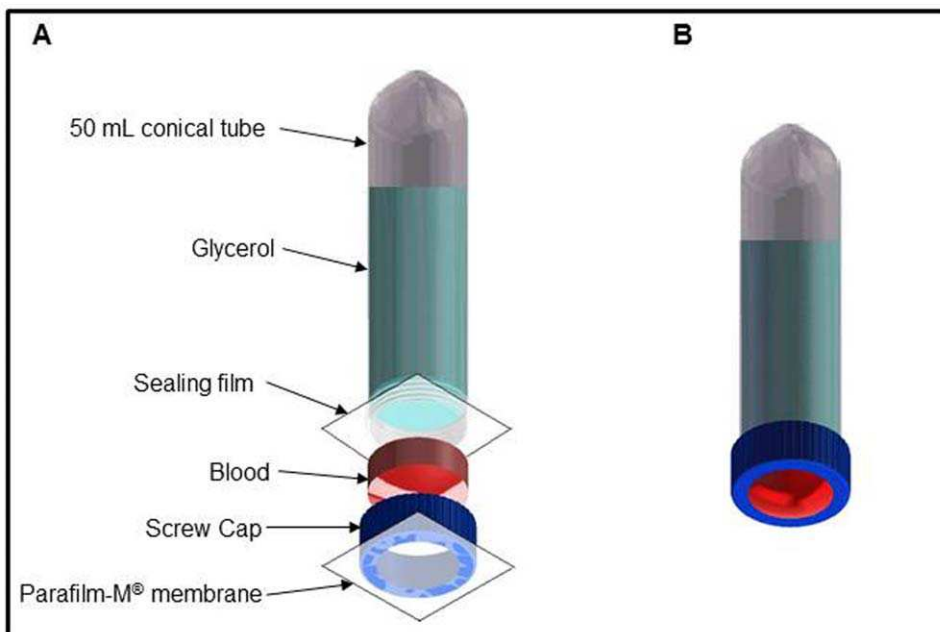


Figure 2. Schematic representation of the Glytube. **A.** Exploded drawing showing the materials used to prepare the device and elements order to assemble the *in-house* feeder. **B.** View of assembled Glytube before mosquito feeding.
doi:10.1371/journal.pone.0053816.g002

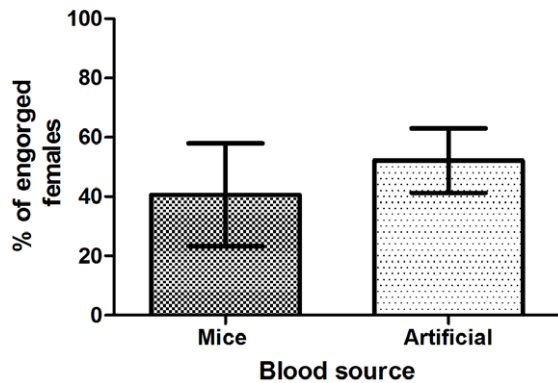


Figure 3. Blood-feeding efficiency of the Glytube feeder device compared with mice blood-fed females. The experiments were done in three biological replicates, two with three and another one with six independent experiments. To generate blood-feeding efficiency, the number of engorged females after 30 minutes of feeding was divided by total number of females allowed to feed. The numbers of females fed on Glytube or mice were not significantly different by Mann-Whitney test ($p=0.1189$). doi:10.1371/journal.pone.0053816.g003

to establish feeding efficiency comparison between the available feeders with confidence. For example, time allowed to feed, age of females, live animal used as blood source in controls, blood source for experimental groups and blood preparation before loading the artificial device are critical.

Glytube feeding efficiency is not high as traditional glass feeders. However, glass feeders are defined as “more complex designs for membrane feeders” [4]. Moreover, increasing the number of Glytube devices to offer during the feeding time can improve the feeding efficiency showed by our results with one feeder. Accordingly, mice available surface to be bitten by females in the control groups was limited using a plastic dish with a 2.5 cm diameter hole (the same diameter of the orifice in the screw cap) to reproduce the same surface that Glytube offers to females (as explained in the Material and Methods section). Without this artifice, a higher level of feeding efficiency on mice is observed (data not shown).

Glytube is a simple system, easily constructed in any laboratory, and requires no special materials or complex heater elements. Since the defined pre-warmed temperatures for blood (37°C) and glycerol (50°C) showed comparable feeding response in relation to live animal during 30 minutes, this range is satisfactory to stimulate *Ae. aegypti* to feed [13]. Furthermore, Glytube is simple to wash and disinfect because the conical tube and cap are autoclavable materials, and can be reusable after sterilization. The feeding membrane and sealing film plastic are discarded as infectious waste and replaced. Finally, this system can be adapted for a range in volume of blood (using a 15 mL conical tube for small volumes) or more than one 50 mL conical tube can be used simultaneously to feed colonies with many mosquitoes, increasing the feeding membrane surface to be bitten by females, also reflecting in feeding efficiency.

References

1. Clements AN (1992) The biology of mosquitoes. London: Chapman & Hall. 509 pp.
2. Gauthier C (2008) The institutional animal care committee: Keystone of international harmonization. Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments: 157–161.

Table 1. *Aedes aegypti* blood-feeding efficiency after 30 minutes between two methods.

Biological Replicate	Experimental Replicate	Blood Feeding Efficiency (Engorged/Total females)	
		Mice	Glytube
Hatching 1	Exp. 1	10% (5/50)	43,1% (22/50)
	Exp. 2	18% (9/50)	62% (31/50)
	Exp. 3	18% (9/50)	42% (21/50)
Hatching 2	Exp. 1	54,9% (28/51)	49% 24/49)
	Exp. 2	52,9% (27/51)	32% (16/50)
	Exp. 3	46,9% (23/49)	48% (24/50)
Hatching 3	Exp. 1	64% (32/50)	52,5% (21/40)
	Exp. 2	48,9% (22/45)	56,5% (26/46)
	Exp. 3	40% (20/50)	57,6% (19/33)
	Exp. 4	58% (29/50)	73,5% (25/34)
	Exp. 5	40,4% (21/52)	60,9% (28/46)
	Exp. 6	35,4% (17/48)	48,9% (22/45)

doi:10.1371/journal.pone.0053816.t001

Different types of blood feeders, made with a variety of materials, facilitate the accessibility of laboratories around the world to construct their devices. This diversity avoids the limitation to perform experiments involving the blood feeding process.

Conclusions

Glytube is one of the simplest and low-cost artificial feeder systems available and one of the most accessible apparatus to be assembled with common materials found in conventional laboratories.

Acknowledgments

We thank Isabel Cristina dos Santos Marques, Ediane Saraiva Fernandes and Neuza Saraiva Fernandes for the technical assistance. We also thank Dr. Alejandro Miguel Katzin and Valnice de Jesus Peres, Instituto de Hematologia do São Francisco LTDA (HEMASF) for providing erythrocytes, Dr. Carlos E. Winter (ICBII-USP) and Dr. Anthony A. James (UCI) for review and critical reading of the manuscript, and Raul Fernandes Vazquez for designing the Glytube drawings.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ALCS FRN FSS CMR. Performed the experiments: ALCS FRN MKC RSI DSA DRR. Analyzed the data: ALCS FRN MKC CMR. Contributed reagents/materials/analysis tools: MLC. Wrote the paper: ALCS FRN MKC CMR MLC.

3. Filipecki ATP, Machado CJS, Valle S, Teixeira MDO (2011) The Brazilian legal framework on the scientific use of animals. ILAR journal/National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources 52: E8–15.
4. Benedict MQ (2009) Bloodfeeding: Membrane Apparatuses and Animals. Methods in Anopheles Research. MR4. p. 288.

5. Ferdowsian HR, Beck N (2011) Ethical and scientific considerations regarding animal testing and research. *PLoS one* 6: e24059. doi:10.1371/journal.pone.0024059.
6. Das S, Garver L, Ramirez JR, Xi Z, Dimopoulos G (2007) Protocol for dengue infections in mosquitoes (*A. aegypti*) and infection phenotype determination. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*: 220. doi:10.3791/220.
7. Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ (2007) Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiology* 7: 9.
8. Chiang RG, Chiang JA (2010) Feeding through artificial membranes reduces fecundity for females of the blood-feeding insect, *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 74: 103–113.
9. Huebner E, Harrison R, Ycaw K (1994) A new feeding technique for experimental and routine culturing of the insect *Rhodnius prolixus*. *Canadian Journal of Zoology* 72: 2244–2247.
10. Waladde SM, Young AS, Morzaria SP (1996) Artificial feeding of ixodid ticks. *Parasitology Today (Personal ed)* 12: 272–278.
11. Rutledge LC, Ward RA, Gould DJ (1964) Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosquito News* 24: 407–419.
12. Cosgrove JB, Wood RJ, Petric D, Evans DT, Abbott RH (1994) A convenient mosquito membrane feeding system. *Journal of the American Mosquito Control Association* 10: 434–436.
13. Cosgrove J, Wood R (1995) Probing and gorging responses of three mosquito species to a membrane feeding system at a range of temperatures. *Journal of the American Mosquito Control Association* 11: 339–342.
14. Tseng M (2003) A simple parafilm M-based method for blood-feeding *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 40: 588–589.
15. Rampersad J, Ammons D (2007) Versatile blood bags for laboratory feeding of mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 23: 149–152.
16. Pothikasikorn J, Boonplueang R, Suebsaeng C, Khaengraeng R, Chareonviriyaphap T (2010) Feeding response of *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) using out-of-date human blood in a membrane feeding apparatus. *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology* 35: 149–155.
17. Deng L, Koou SY, Png a B, Ng LC, Lam-Phua SG (2012) A novel mosquito feeding system for routine blood-feeding of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Tropical Biomedicine* 29: 169–174.
18. Ghaninia M, Larsson M, Hansson BS, Ignell R (2008) Natural odor ligands for olfactory receptor neurons of the female mosquito *Aedes aegypti*: use of gas chromatography-linked single sensillum recordings. *The Journal of Experimental Biology* 211: 3020–3027. doi:10.1242/jeb.016360.
19. Singh R (2004) Determination of thermal conductivity of high porosity organic foams at varying temperatures and pressures using thermal probe method. *Indian Journal of Engineering & Materials Sciences* 11: 125–129.
20. Benzou GL, Apperson CS (1987) An electrically heated membrane blood-feeding device for mosquito colony maintenance. *Journal of the American Mosquito Control Association* 3: 322–324.