



Instituto Politécnico  
de Castelo Branco  
Escola Superior  
Agrária

## Relatório de Estágio

### Diversidade Genética de *Anopheles coustani* (Diptera: Culicidae) em São Tomé

Daniel Sacramento de Carvalho

#### Orientador

Carlos Manuel Gaspar dos Reis

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura, realizada sob a orientação científica do Doutor Carlos Manuel Gaspar dos Reis, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Junho de 2023



## Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família e a todos os meus colaboradores em São Tomé e Príncipe pela força e encorajamento nos momentos mais difíceis, durante todos estes anos de formação.



## Agradecimentos

Agradeço a Deus pela força que me deu durante este percurso de quatro anos de vida académica e por me ter sempre ajudado nesta fase da vida.

Uma palavra de gratidão e apreço ao meu orientador, Professor Carlos Reis, e à Professora Melina Campos, que sempre me orientaram e sem os quais este trabalho não teria acontecido.

Um forte agradecimento também à minha família e amigos pelo incentivo e ajuda dados, em especial à minha mãe, a todos os colegas da Licenciatura em Biologia e Biotecnologia Alimentar, particularmente aos colegas Dekilson Agostinho, Dainyra Rosário, Lecínia Carvalho e Ednisia.

Também não posso deixar de agradecer a Hugulay Maia pela ajuda dada neste percurso académico. Além de professor, ele foi um bom conselheiro que me fazia sorrir nos momentos mais difíceis.

Às professoras Alzira Rodrigues e Ana Maria, o meu sincero obrigado, assim como àqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação académica.

*“Pouco conhecimento  
faz com que as pessoas se  
sintam orgulhosas. Muito  
conhecimento, com que se  
sintam humildes.”*

*(Leonardo da Vinci)*

*“Quem não quer ser  
aconselhado, não pode ser  
ajudado.”*

*(Benjamin Franklin)*



## Resumo

A malária é uma doença causada pelos parasitas protozoários *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale*, que têm como vetor o mosquito *Anopheles* fêmea. A malária é uma das doenças mais comuns no continente africano, matando milhões de pessoas todos os anos, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). O mosquito é um dos insetos que causa mais doenças nos humanos. O surgimento de novos vetores, que apresentam variações genéticas em relação aos anteriores, tem tornado difícil a erradicação da malária nalguns desses países (incluindo São Tomé e Príncipe), apesar de muitos esforços e recentes intervenções. No arquipélago de São Tomé e Príncipe, foi identificada a espécie *Anopheles coluzzii* como principal vetor da malária. Mas segundo alguns estudos, suspeita-se que possam existir outras populações dentro do mesmo género que sejam vetores da malária. Por seu lado, *A. Coustani* é um dos vetores da malária na República Democrática do Congo, na Zâmbia e em Madagáscar. Em São Tomé, também existe uma pequena população desta espécie, que poderá ser um dos vetores da malária no país. Este trabalho foi elaborado no âmbito da unidade curricular estágio, do curso de Licenciatura em Agronomia, da Escola Superior Agrária de Castelo Branco (ESACB). Pretende-se apresentar os resultados de uma pesquisa feita sobre o mosquito *Anopheles coustani* em São Tomé e Príncipe, tendo como objeto de estudo a transmissão da malária por este inseto nalguns países do continente africano. Foram analisados os resultados da diversidade genética do gene mitocondrial que codifica para a subunidade I da Citocromo Oxidase (COI) de 28 amostras de *A. coustani* colhidas em vários pontos de São Tomé. As amostras foram sequenciadas pelo Laboratório da Universidade da Califórnia Davis e comparadas com outras amostras encontradas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), com recurso a diverso software disponível online (Aliview, Nucleotide BLAST, DnaSP e MEGAX). Verificou-se que as amostras de *A. coustani* encontradas na ilha de São Tomé apresentam diferenças genéticas comparativamente às de outros países da costa africana.

**Palavras-Chave:** *Anopheles coustani*, Malária, Mosquito, São Tomé.



## Abstract

Malaria is a disease caused by the protozoan parasites of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* species, whose vector is the female *Anopheles* mosquito. Malaria is one of the most common diseases in the African continent, killing millions of people every year, according to the World Health Organization (WHO). The mosquito is one of the insects that causes the most disease in humans. The emergence of new vectors, that have genetic variations from the previous ones, has made the eradication of malaria difficult in some of these countries (including São Tomé and Príncipe), despite many efforts and recent interventions. In the archipelago of São Tomé and Príncipe, the species *Anopheles coluzzii* was identified as the main vector of malaria. According some studies, it is suspected that there may be other populations of individuals within the same genus that are vectors of malaria. On the other hand, *A. coustani* is one of the vectors of malaria in the Democratic Republic of Congo, Zambia, and Madagascar. In São Tomé, there is also a small population of this species, which may be one of the vectors of malaria in this country. This work was prepared as part of the curricular unit internship of the bachelor's degree in Agronomy, at the Agricultural School of Castelo Branco (ESACB). The aim is to present the results of a research on the *Anopheles coustani* mosquito in São Tomé and Príncipe, having as object of study the transmission of malaria by this insect in some countries of the African continent. The genetic diversity of the mitochondrial gene that codifies the subunit I of cytochrome oxidase (COI) of 28 samples of *A. coustani* collected in various parts of São Tomé was studied. The samples were sequenced by the University of California Davis Laboratory and were compared with other samples found in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database, using several software programs available online (Aliview, Nucleotide BLAST, DnaSP and MEGAX). The samples of *A. coustani* found on the island of São Tomé have genetic differences when compared to those from other countries on the African coast.

**Keywords:** *Anopheles coustani*, Malaria, Mosquito, São Tomé.



# Índice geral

Dedicatória .....	III
Agradecimentos .....	V
Resumo .....	VII
Abstract .....	IX
Índice de figuras .....	XIII
Índice de símbolos .....	XV
Lista de tabelas .....	XVI
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos .....	XVIII
1- Introdução .....	1
1.1 Os mosquitos (Diptera: Culicidae).....	1
1.2 A malária .....	3
1.3 A situação em São Tomé e Príncipe .....	4
2. Objetivos .....	5
3. Materiais e Métodos .....	5
3.1 Área de estudo .....	5
3.2 Deteção do gene COI por PCR.....	6
4. Resultados e Discussão .....	7
5. Considerações finais.....	11
Referências bibliográficas .....	12
Anexo .....	14



## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Mapa da ilha de São Tomé onde foram colhidas as 28 Amostras de <i>Anopheles coustani</i> .....	6
<b>Figura 2</b> - Vista parcial do Alinhamento da sequência do gene COI, das 28 amostras de <i>Anopheles coustani</i> de São Tomé no software Aliview, sendo possível observar as 4 bases diferentes.....	8
<b>Figura 3</b> - Vista no software BLAST das 28 amostras de <i>Anopheles coustani</i> , colhidas em São Tomé e para as quais foi sequenciado o gene COI .....	9
<b>Figura 4</b> - Árvore filogenética ( <i>maximum-likelihood tree</i> ) das 28 amostras de COI de <i>Anopheles coustani</i> colhidas em São Tomé.....	11



## Índice de símbolos

- (S) - Número de sítios polimórficos,
- (h) - Número de haplótipos de ADN.
- (Hd) - Diversidade de haplótipos.
- ( $\pi$ ) - Diversidade de nucleótidos.
- (k) - Número médio de diferenças de nucleótidos.



## Lista de tabelas

Tabela 1 - Percentagem de semelhança e número de bases diferentes entre Haplótipos de <i>Anopheles coustani</i> de São Tomé e amostras de alguns países do continente africano (dados obtidos com o software BLAST)-----	8
Tabela 2 - Análise de polimorfismos de DNA (gene COI) das 28 amostras de <i>Anopheles coustani</i> com origem em São Tomé -----	9



## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

STP - São

Tomé e

PríncipeST -

São Tomé

Pb - Pares de bases

COI - Cytochrome c Oxidase subunit 1

ESACB - Escola Superior Agrária de

Castelo Branco NCBI - National Center

for Biotechnology InformationPCR -

Reação em Cadeia da Polimerase