

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CARLOS RENATO DE OLIVEIRA DAUMAS FILHO

ESTUDO DO PAPEL DA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE (PTP) LAR NO
PERÍODO PREVITELOGÊNICO DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

RIO DE JANEIRO
2022

Carlos Renato de Oliveira Daumas Filho

ESTUDO DO PAPEL DA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE (PTP) LAR NO
PERÍODO PREVITELOGÊNICO DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Doutor em Química Biológica.

ORIENTADOR: Georgia Correa Atella
CO-ORIENTADOR: Rafael Dias Mesquita

RIO DE JANEIRO

2021

Carlos Renato de Oliveira Daumas Filho

**ESTUDO DO PAPEL DA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE (PTP) LAR NO
PERÍODO PREVITELOGÊNICO DO MOSQUITO *Aedes aegypti***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Doutor em Química Biológica.

Aprovado pela banca examinadora em 09 de Novembro de 2022

**Georgia Correa Atella, Professora Associada, IBqM Leopoldo de Meis – UFRJ
(Orientadora)**

Rafael Dias Mesquita, Professor Adjunto, IQ – UFRJ (Co-Orientador)

Andrea Cristina Fogaça, Professora Doutora, ICB – USP

Fernanda Marques da Cunha, Professor Adjunto A2, EPM – UNIFESP

Marcos Túlio de Oliveira, Professor Assistente Doutor, FCAV – UNESP

**Ednildo de Alcantara Machado, Professor Associado, ICBCCF – UFRJ
(Suplente Externo)**

**Claudio Akio Masuda, Professor Adjunto, IBqM Leopoldo de Meis – UFRJ
(Revisor e Suplente Interno)**

“Dedico este trabalho ao LabSiCel e a máquina de gelo da Biofísica”

Agradecimentos

Olá! Não sei se novamente, mas seguramente uma última vez. Esta é a terceira parte de um trabalho que comecei há pouco mais de 10 anos e assim, agradecerei mais um pouco àqueles que caminharam comigo e aos novos integrantes deste processo. Sou profundamente grato por ter aceitado este convite para ler este trabalho, bem como sua compreensão, caso não conheça nada de mim, ou do que produzi até então.

No que diz respeito a produção, gostaria de agradecer a Professora Georgia e, novamente, ao Professor Rafael. A morte do professor Mário, meu orientador original, não foi o final do meu projeto, mesmo que o estudo de proteínas tirosina fosfatases sempre fosse muito específico. Dentro do possível, os dois se prontificaram em me ajudar e não poderia ter seguido sem a estrutura e auxílio intelectual que me foi dada. Graças a influência da professora, consegui fazer meu tão sonhado doutorado sanduíche e graças ao professor Rafael, tive minhas ideias confrontadas para que meus devaneios científicos não gerassem becos sem saídas ou dados vazios.

O laboratório continuou se esvaziando, mas pude acompanhar a trajetória dos que nos deixavam. Com muito carinho também quero agradecê-los. Cada pessoa que seguiu uma nova trajetória a partir do LabSiCel deixou a esperança de que essa mudança tão grande não seria o fim de uma história. Ficaram em mim também as inspirações que cada um foi, à sua maneira. Dividi bancada com pessoas que me acompanharão para o resto da vida em memória. Espero revê-las um dia, neste plano, ou no outro - caso haja.

Tentei desenvolver meu trabalho com toda a motivação e ajuda que a pesquisa me proporcionou. Graças a ajuda das professoras Luciana Araripe e Rafaela Bruno, a primeira semente desta tese nasceu e agradeço profundamente o empenho delas em me incentivar e disponibilizar o espaço do laboratório para colaboração. Além delas, agradeço ao grupo do professor Carlos Logullo, especialmente a Jhenifer Nascimento, que além de amiga, também constitui parte importante desta obra.

Agradeço aos meus amigos da manhã, que também integraram o turno da noite. Desde a graduação me acostumei a virar noites no laboratório, mas só recentemente me acostumei a ter companhia pela noite/madrugada. Foram momentos de muitas risadas e conversas que me inspiraram a escrever e crescer, não apenas como pesquisador, mas como pessoa. Sou muito feliz pelas coisas que ouvi e que pude participar e espero estar com eles no futuro, rindo de todos os problemas que passamos neste período que é a formação acadêmica.

Também queria agradecer especialmente a Geane Braz. Ela foi contratada como técnica que auxiliaria nosso insetário, mas olho para trás e não vejo como eu teria continuado este trabalho sem alguém tão competente e compromissada ao meu lado. Deixo aqui meu desejo de que o futuro dela seja tão brilhante quanto possível. Agradeço aqui também quem me permitiu cumprir esta jornada, de fato. Graças a CAPES, o CNPq, FAPERJ, INCT eu pude não apenas sobreviver, mas alcancei outras realidades. Espero que o futuro não seja tão sombrio para nós que dependemos delas.

Por fim, agradeço a tudo que o professor Mário me deixou. Espero que no fim de tudo isso ele esteja contente com a nossa trajetória. Espero conseguir dar continuação ao muito que o laboratório me deixou e fazer jus a grandeza do professor que me abrigou e me deu oportunidade de fazer o que eu mais amo.

*“So if you need a hero,
Just look in the mirror.
No one's gonna save you now,
So you better save yourself”*

Kali Uchis, After the Storm

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
1. Introdução	1
1.1. O mosquito <i>Aedes aegypti</i> : habitat e ciclo de vida.....	1
1.2. Importância do mosquito <i>A. aegypti</i> como vetor.....	5
1.3. A regulação hormonal no período previtelogênico, a importância do corpo gorduroso e o papel do metabolismo na capacidade vetorial.....	7
1.4. A via de insulina.....	10
1.4.1. ILPs – Regulação e ação metabólica.....	12
1.4.2. Papel da via de insulina na capacidade vetorial.....	16
1.5. Fosforilação em Tirosina e sua importância.....	20
1.5.1. Proteínas Tirosinas Fosfatases (PTPs) e seu estudo em mosquitos.....	21
1.5.2. Proteína Tirosina Fosfatase LAR: sinalização e regulação do metabolismo energético.....	23
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. Metodologia	26
3.1. Conduta ética.....	26
3.2. Criação de mosquitos.....	27
3.3. Armazenamento, extração de RNA e análise por qPCR.....	27
3.4. Síntese, verificação da concentração e injeção da dupla fita de RNA (dsRNA) dos genes LacZ e AeLAR.....	29
3.5. <i>Western Blotting</i> para determinação do perfil de fosforilação de AKT.....	30
3.6. Quantificação de Glicogênio.....	32
3.7. Quantificação de Triacilglicerol.....	33
3.8. Ensaio de tolerância ao Jejum.....	33
3.9. Determinação da atividade locomotora e circadiana.....	33
3.10. Ensaio de busca por hospedeiro vertebrado.....	34
3.11. Ensaios de alimentação com sangue, digestão, oviposição e viabilidade dos ovos.....	34
3.12. Análise estatística.....	35

4. Resultados	36
4.1. Efeito da modulação calórica sobre a PTP AeLAR no período previtelogênico	36
4.2. Avaliação dos efeitos do silenciamento gênico da PTP AeLAR no metabolismo energético e na via de insulina durante o período previtelogênico	37
4.3. Efeito do silenciamento de AeLAR na fisiologia do mosquito e após a alimentação com sangue	41
5. Discussão	49
5.1. Relação entre AeLAR, a via de insulina (ISP) e as reservas de energéticas do mosquito no período previtelogênico.....	49
5.2. Efeitos fisiológicos do silenciamento da PTP AeLAR no mosquito	57
6. Conclusões e Perspectivas	61
7. REFERÊNCIAS	62
8. Material Suplementar	71

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é um inseto holometábolo, cujo ciclo de vida depende que fêmeas façam repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, a fim de iniciar a produção de ovos. Durante o repasto, o mosquito entra em contato com patógenos, como Dengue e Zika, transmitindo-os em alimentações subsequentes a indivíduos saudáveis. A fêmea é incapaz de realizar o repasto após a saída da água, mesmo sendo a fase adulta do inseto, já que antes é preciso o desenvolvimento de tecidos reprodutivos, sensoriais e de reserva, por exemplo. Este desenvolvimento está atrelado ao consumo de carboidratos após a saída da água, que além de gerar acúmulo de reservas energéticas que serão utilizadas para síntese de proteínas do vitelo após o repasto sanguíneo, induz a produção adequada do hormônio juvenil que induzirá as adaptações bioquímicas e moleculares adequadas ao período. Este período adaptativo é conhecido como previtelogênico e, sem ele, a fêmea encontra dificuldades para realizar a alimentação com sangue e durante o período vitelogênico. Entender o funcionamento dos eventos de sinalização do período previtelogênico pode ajudar no desenvolvimento de estratégias de controle vetorial. É uma vez que a via de insulina é muito importante para este momento, nosso grupo se interessou em estudar o ortólogo da proteína tirosina fosfatase (PTP) LAR em *A. aegypti* (AeLAR) na regulação da via desta via, uma relação de regulação há muito conhecida em mamíferos, mas pouco explorada em invertebrados. Assim, este trabalho teve como principal objetivo silenciar a PTP AeLAR no período previtelogênico e observar possíveis efeitos metabólicos e fisiológicos no mosquito, bem como as consequências após a alimentação com sangue. Observou-se que a PTP AeLAR é reprimida na restrição calórica e que seu silenciamento regula a transcrição do peptídeo insulínico 2 (ILP2) e das fosfatases Corkscrew (CSW) e PTP1B, além de induzir o acúmulo de glicogênio, sem afetar as reservas lipídicas. Os reflexos destas modificações se traduziram no aumento da resistência ao jejum, alterações da capacidade de locomoção/voo e na percepção do hospedeiro vertebrado. Após o repasto sanguíneo, houve redução da postura de ovos, mas sem prejuízo à eclosão. Concluiu-se que a PTP AeLAR é importante agente na sinalização de vias que regulam o metabolismo energético no período previtelogênico, de modo que a sua expressão inadequada afeta diversos aspectos fisiológicos do mosquito, tornando evidente o potencial de contribuição que esta enzima possui no estudo de estratégias de controle vetorial.

ABSTRACT

Aedes aegypti mosquito is a holometabolous insect, whose life cycle depends on females feed on blood from a vertebrate host to initiate egg production, the new offspring. Mosquito can get infected with pathogens during blood meal, such as Dengue and Zika, transmitting them in subsequent feedings to healthy individuals. However, the female is not able to feed after leaving the water, even though it is the adult phase of the insect. Before that, the mosquito needs to develop its reproductive, sensorial, and reserve tissues, for example. This development is linked to the consumption of carbohydrates after leaving the water, which in addition to generating the necessary energy reserves that will be used for the synthesis of proteins for the eggs after blood meal, it induces the adequate production of the hormone that will induce the appropriate biochemical and molecular adaptations for this period, the juvenile hormone. This adaptive period is known as previtellogenic and, without it, the females do not feed on blood properly and face an impaired vitellogenic period. Understanding the signaling events of this period can help in the development of vector control strategies. Our group was interested in studying the ortholog of Protein Tyrosine Phosphatase (PTP) LAR in *A. aegypti* (AeLAR), given the importance described in vertebrates and invertebrates in the regulation of the insulin pathway, an important pathway during the previtellogenic period. Thus, the main objective of this work was to knockdown the AeLAR gene in the previtellogenic period and observe defects on mosquito metabolism and physiology, and the consequences after blood feeding. It was observed that AeLAR is regulated in caloric restriction, that its knockdown regulates the insulin-like peptide 2 (ILP2), CSW and PTP1B transcription, inducing glycogen accumulation, without affecting lipid reserves. Parallel to this, there was an increase in resistance to fasting, changes in locomotion/flight activity, and in the search for the vertebrate host. After the blood meal, there was a reduction in the number of eggs laid, but without prejudice to their hatching. We concluded that the AeLAR is important to the previtellogenic period, acting as a regulatory gene in energy metabolism, and its transcriptional impairment affects many physiological aspects that are relevant to the study of vectorial capacity. The deepening of the study of this PTP has important contributions for development and/or improvement of vector control strategies.

LISTA DE ABREVIATURAS

20E	20-hidroxiecdisona, do inglês <i>20-hydroxyecdysone</i>
DPI	Dias Após Injeção
FAS2	Ácido Graxo Sintase 2, do inglês <i>Fatty Acid Synthase 2</i>
GS	Glicogênio Sintase, do inglês <i>Glycogen Synthase</i>
GSK	Cinase da Glicogênio Sintase, do inglês <i>Glycogen Synthase Kinase</i>
IGF	Fator de Crescimento Insulinico, do inglês <i>Insulin Growth Factor</i>
ILP	Peptídeo Similar a Insulina, do inglês <i>Insulin Like Peptides</i>
IPC	Células Produtoras de Insulina do inglês <i>Insulin Producing Cells</i>
IR	Receptor de Insulina, do inglês <i>Insulin Receptor</i>
IRS	Substrato do Receptor de Insulina, do inglês <i>Insulin Receptor Substrate</i>
ISP	Via de Sinalização de Insulina, do inglês <i>Insulin Signaling Pathway</i>
JH	Hormônio Juvenil, do inglês <i>Juvenile Hormone</i>
MIR	Receptor de Insulina de Mosquito, do inglês <i>Mosquito Insulin Receptor</i>
PE	Pós Emergência
PEPCK	Fosfoenolpiruvato Carboxicinase, do inglês <i>Phosphoenolpyruvate Carboxykinase</i>
PTK	Proteína Tirosina Cinase, do inglês <i>Protein Tyrosine Kinase</i>
PTP	Proteína Tirosina Fosfatase, do Inglês <i>Protein Tyrosine Phosphatase</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TAG	Triacilglicerol
Upd	Unpaired
ZT	Zeitgeber Time

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto de fêmea (esquerda) e macho (direita) do mosquito <i>A. aegypti</i>	1
Figura 2. Estágios de desenvolvimento do mosquito <i>A. aegypti</i>	2
Figura 3. Ilustração detalhando os órgãos do mosquito no estágio de pupa.....	3
Figura 4. Comparação entre <i>A. aegypti</i> macho e fêmea, destacando os aspectos de dimorfismo sexual.	3
Figura 5. Equação que define a capacidade vetorial de um organismo.	4
Figura 6. Mapa da origem dos genótipos de arbovírus transmitidos pelo mosquito <i>Aedes aegypti</i> no Brasil.....	5
Figura 7. Desenho anatômico da parte anterior do mosquito <i>Aedes aegypti</i> , destacando o sistema nervoso estomatogástrico e órgãos endócrinos.	7
Figura 8. Síntese de Hormônio Juvenil (JH) após a emergência na presença, ou não, de sacarose.....	8
Figura 9. Acúmulo e remanejamento de reservas no período pós-emergência e após a alimentação com sangue.....	9
Figura 10. Via de insulina em Mamíferos e <i>Drosophila</i>	11
Figura 11. Resumo das funções conhecidas dos ILPs de <i>A. aegypti</i> e seus locais de síntese.....	13
Figura 12. Esquema representando o processo de liberação de insulina pelas células β do Pâncreas.	14
Figura 13. Esquema representando os diferentes eventos regulatórios sobre o receptor de Insulina (Insulin Receptor) e seu substrato (IRS) mediante diferentes tipos de sinalização.....	19
Figura 14. Estrutura química dos principais aminoácidos fosforilados.	20
Figura 15. Classificação das Proteínas Tirosina Fosfatases (PTPs).....	22
Figura 16. Representação da arquitetura e regulação da PTP LAR.....	24
Figura 17. Transcrição relativa de genes de PTPs e ILP2 no corpo gorduroso de fêmeas adultas em regime de restrição calórica 3 dias após a emergência.	36
Figura 18. Avaliação da transcrição dos genes AeLAR e ILP2 no corpo gorduroso de fêmeas adultas em dieta de sacarose 10%.....	37
Figura 19. Avaliação da transcrição dos genes de PTP1B e CSW no corpo gorduroso de fêmeas adultas em dieta de sacarose 10%.....	38
Figura 20. Avaliação dos efeitos moleculares e bioquímicos do silenciamento de AeLAR no corpo gorduroso de fêmeas adultas em dieta de sacarose 10%.	39
Figura 21. Efeito do silenciamento de AeLAR no perfil metabólico do corpo gorduroso de fêmeas adultas alimentadas com sacarose 10%.	40
Figura 22. Efeito do silenciamento de AeLAR no perfil metabólico do corpo gorduroso de fêmeas adultas alimentadas com sacarose 1%.	41
Figura 23. Avaliação de tolerância ao jejum em mosquitos a partir do quinto dia de silenciamento.	42
Figura 24. Perfil da atividade locomotora/voo dos mosquitos silenciados.....	43
Figura 25. Perfil da atividade locomotora/voo dos mosquitos silenciados sob restrição calórica.....	45
Figura 26. Transcrição relativa da PTP AeLAR e de genes circadianos na cabeça de mosquitos alimentados com sacarose 10% 5 dpi.....	46
Figura 27. Ensaio de avidez em mosquitos entre 3 e 5 dpi.	47

Figura 28. Avaliação do efeito do silenciamento no repasto sanguíneo, ingestão e digestão de sangue, oviposição e eclosão de ovos..	48
Figura 29. Efeito do silenciamento no ovário e no corpo gorduroso 24h após a alimentação com sangue (24h PBM/4dpi).	49
Figura S 1. Concentração relativa de Glicogênio no corpo gorduroso de fêmeas adultas alimentadas com sacarose 10%.	71
Figura S 2. Transcrição relativa de FAS2 no corpo gorduroso de fêmeas adultas sob regime de sacarose 10%.	71
Figura S 3. Atividade locomotora/voo dos mosquitos silenciados.	72
Figura S 4. Atividade locomotora/voo dos mosquitos silenciados.	73
Figura S 5. Transcrição relativa de AeLAR no intestino médio 3 dpi e 24h PBM (4dpi).	74
Figura S 6. Transcrição relativa de AeLAR na Cabeça 3 e 5 dpi.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos respectivos genes.	28
Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores usados para síntese de dsRNA.....	29

1. Introdução

1.1. O mosquito *Aedes aegypti*: habitat e ciclo de vida

Aedes aegypti (**Figura 1**) (filo Arthropoda, subfilo Hexapoda, classe Insecta, ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, gênero *Aedes*, subgênero *Stegomyia*) é um inseto vetor de diferentes vírus de importância médica. Encontra-se principalmente entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul, que correspondem as zonas tropicais e subtropicais do globo. É oriundo da África Subsaariana e sua disseminação pelos continentes se deu através do transporte de larvas em lastros de navios que faziam o comércio entre os séculos XV e XVII (BARATA et al., 2001).



Figura 1. Foto de fêmea (esquerda) e macho (direita) do mosquito *A. aegypti*. Fonte: BERNHARD NOCHT INSTITUTE FOR TROPICAL MEDICINE (BNI), 2016.

O mosquito é holometábolo e possui quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva (aquática, lêntica, com quatro estágios de desenvolvimento – L1 a L4), pupa e o inseto adulto (**Figura 2**) (NASCI; MILLER, 1996). A oviposição acontece após a alimentação no hospedeiro vertebrado, preferencialmente humano, e a fêmea deposita seus ovos em substratos que acumulem água, preferencialmente em criadouros artificiais (latas, pneus, vasos de plantas etc) (CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1998). Originalmente, o ancestral deste mosquito depositava ovos em bromélias e internódios de bambus e a fonte sanguínea era proveniente de animais não humanos (LOUNIBOS, 1981). Uma vez que mosquitos e humanos passaram a

dividir o mesmo nicho, o inseto se adaptou a convivência, de modo que as fontes de alimentação e oviposição também mudaram (POWELL; TABACHNICK, 2013).

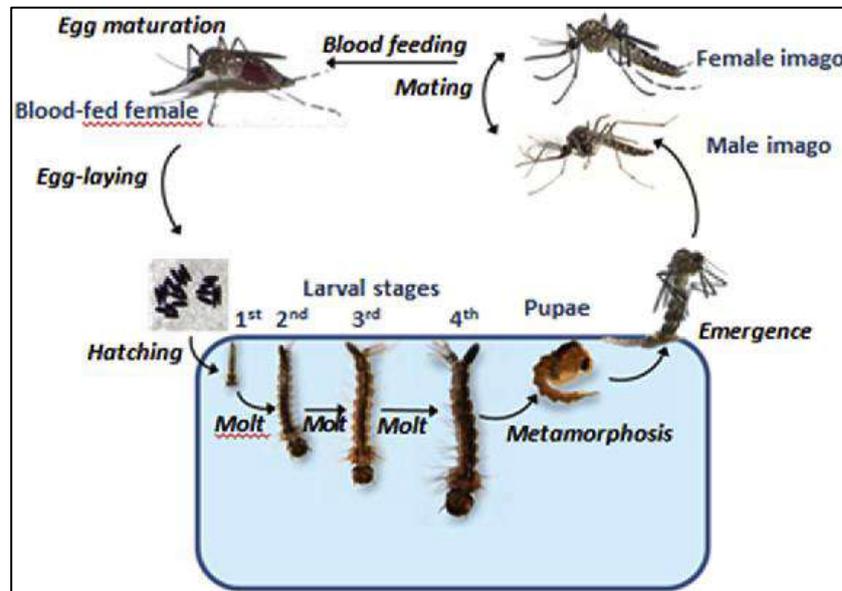


Figura 2. Estágios de desenvolvimento do mosquito *A. aegypti*. Figura representa os estádios de ovo (Hatching), Larvas (Larval stages), pupa (Pupae) e mosquitos adultos (Female/Male imago). Fonte: PRUD'HOMME et al., 2017.

A oviposição é feita em águas não turbulentas, porque as larvas são incapazes de sobreviver se submetidas à turbulência (NASCI; MILLER, 1996). Após a oviposição e exposição dos ovos a água, os ovos eclodem e as larvas submergem no ambiente aquático, onde passam os próximos 7-8 dias alimentando-se de microrganismos, detritos e invertebrados, vivos ou mortos. Durante este momento, as larvas acumulam nutrientes que sustentarão as mudanças de estágios.

Depois dos 7-8 dias, as larvas assumem o estágio de pupa e param de se alimentar. Os mosquitos podem permanecer nesta fase por até dois dias, esperando as devidas condições para emergir em mosquito adulto. Assim, quando a metamorfose está completa e as condições são adequadas, o adulto aumenta a pressão interna na pupa puxando o ar de fora, que passa através dos trompetes respiratórios (**Figura 3**), e a cutícula da pupa se rompe ao logo de linhas de quebra, liberando assim o estágio adulto do mosquito (NASCI; MILLER, 1996).

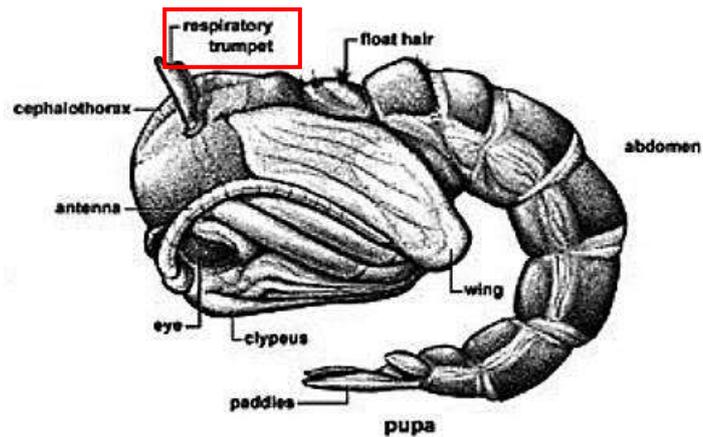


Figura 3. Ilustração detalhando os órgãos do mosquito no estágio de pupa. O mosquito encontra-se em processo de muda, onde os órgãos larvais são degenerados e substituídos com órgãos adultos. Neste processo, o mosquito não se alimenta e apenas respira pelo trompete respiratório (destacado na caixa vermelha), órgão localizado no topo do cefalotórax. Adaptado de: <medicina-y-tecnologia.blogspot.com>.

Na fase adulta, macho e fêmea apresentam dimorfismo sexual. São exemplos de características que os diferenciam: a forma do aparelho reprodutor, a maior quantidade de cerdas nas antenas e tamanho dos palpos maxilares em machos, além do tamanho do corpo, onde a fêmea é maior. O tamanho da fêmea está relacionado ao fato desta produzir os ovos a serem depositados. A fase adulta pode ser facilmente identificada pelo desenho no formato de lira no dorso do tórax em qualquer um dos gêneros (**Figura 4**) (NASCI; MILLER, 1996).

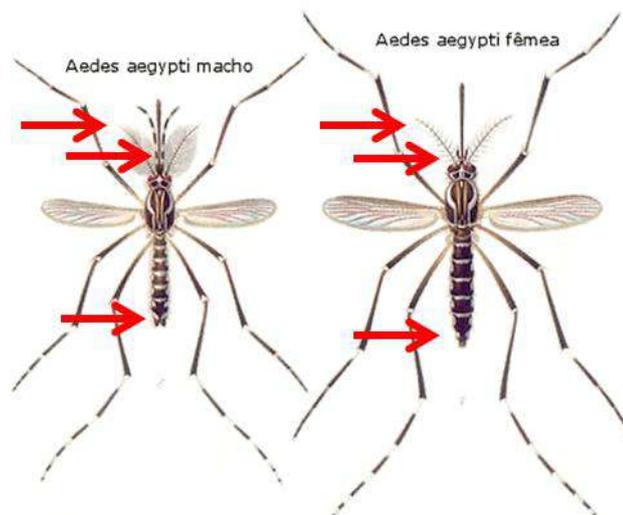


Figura 4. Comparação entre *A. aegypti* macho e fêmea, destacando os aspectos de dimorfismo sexual. O esquema mostra macho e fêmea da espécie, onde é possível ver no tórax o desenho de lira que identifica a espécie. A figura ainda destaca (setas vermelhas) alguns fenótipos que caracterizam o dimorfismo sexual, como forma do aparelho reprodutor, tamanho dos palpos maxilares e o volume de cerdas nas antenas (de baixo para cima). Adaptado de: <dengue.cecom.unicamp.br>.

A alimentação também será diferente para machos e fêmeas na fase adulta. Imediatamente após a emergência, machos e fêmeas se alimentam apenas de néctar e de fluidos adocicados, porém, as fêmeas mantêm a exclusividade desta dieta apenas por um período de aproximadamente três dias, enquanto passam por adaptações fisiológicas e moleculares, até tornarem-se aptas a realizar o repasto sanguíneo. Estas adaptações incluem o enrijecimento do exoesqueleto e amadurecimento de órgãos sensoriais e de reserva. A alimentação com sangue determina o fim do período previtelogênico e inicia o período vitelogênico, que visa a obtenção e mobilização de nutrientes para síntese do vitelo, que será destinado ao ovário, resultando na produção dos ovos (LEHANE, 2005; NASCI; MILLER, 1996).

Durante o repasto, o mosquito pode se contaminar com diferentes patógenos e transmiti-los nas alimentações subsequentes, o que o caracteriza como vetor. Sua capacidade de transmitir um determinado patógeno é diretamente influenciado pela densidade da população de vetor, sua capacidade de localizar e realizar o repasto sanguíneo, adaptação ao ambiente, a longevidade na natureza e o tempo que o patógeno leva entre a chegar ao mosquito até estar apto a ser transmitido em um próximo repasto (**Figura 5**). A trajetória evolutiva do mosquito *A. aegypti* culminou em torna-lo um vetor competente que atualmente oferece risco a milhares de pessoas ao redor do globo (BARATA et al., 2001).

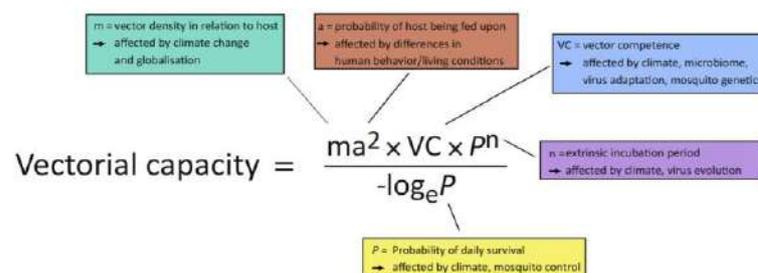


Figura 5. Equação que define a capacidade vetorial de um organismo. A equação acima representa os elementos que são levados em consideração acerca da capacidade de um organismo ser melhor ou pior vetor, como densidade populacional do animal (m), a probabilidade do repasto (a²), a competência em relação ao patógeno (VC), a probabilidade de sobrevivência (P) e o tempo que o patógeno leva para se desenvolver no hospedeiro definitivo (n). Fonte: RÜCKERT; EBEL, 2018

1.2. Importância do mosquito *A. aegypti* como vetor

Como já citado, o mosquito *A. aegypti* é capaz de transmitir diversas arboviroses. Dentre os principais patógenos se encontram os vírus da Febre Amarela, Dengue, Chikungunya e Zika, cuja importância epidemiológica existente está relacionada aos problemas de morbidade e letalidade associadas as doenças, a ausência de vacinas eficientes para a maioria das arboviroses e a presença de cepas mais virulentas, oriundas de diferentes regiões (**Figura 6**) (BARATA et al., 2001; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2017).

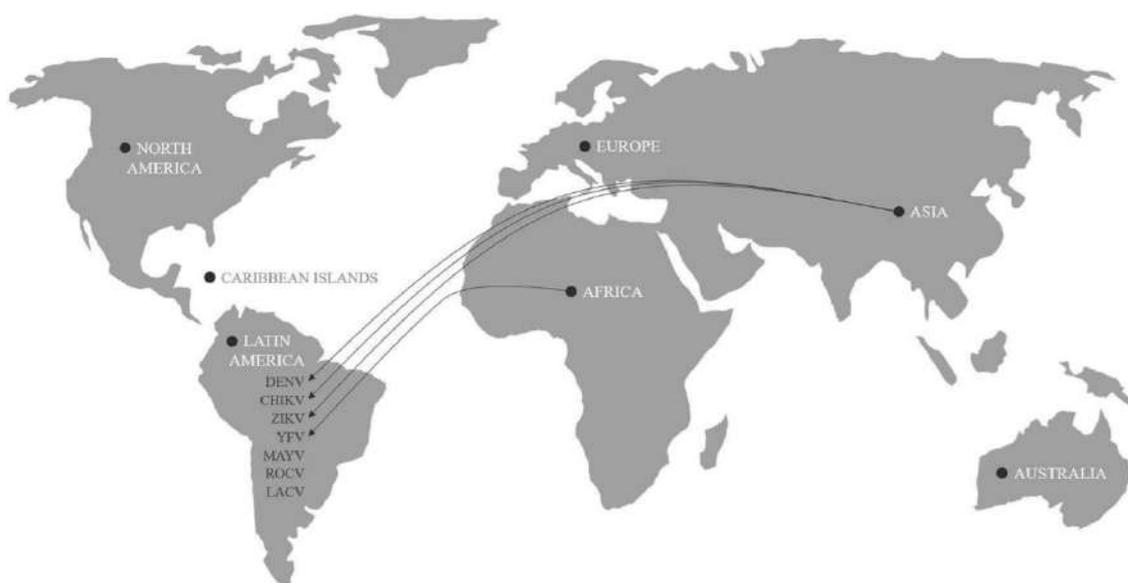


Figura 6. Mapa da origem dos genótipos de arbovírus transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti* no Brasil. Fonte: RODRIGUES-ALVES et al., 2020.

O vírus da febre amarela (família Flaviviridae e gênero *Flavivirus*) é historicamente o mais conhecido. Após a picada do mosquito contaminado, estima-se que cerca de 15 a 50% das pessoas infectadas desenvolvam a doença, que se inicia com uma febre abrupta, calafrios e dor de cabeça. No entanto, 57 a 85% das pessoas afetadas conseguem combater a infecção (PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA, 2014). No início do século XX, com o desenvolvimento de vacinas eficazes e as campanhas de erradicação do mosquito em zonas urbanas do Caribe e América Latina, a febre amarela urbana pôde ser erradicada (BRASIL, 2004).

Entretanto, o vírus Dengue (família Flaviviridae e gênero *Flavivirus*) acabou assumindo o nicho que surgira e, atualmente, cerca de 2,5 bilhões de pessoas ao

longo das regiões tropicais e subtropicais se encontram em risco (GUZMAN et al., 2010). As infecções por dengue apresentam dois grandes quadros patológicos: o primeiro, mais brando e mais frequente, que se desenvolve como uma febre aguda devido a um complexo conjunto de respostas imune, mas que se vai em aproximadamente 7 dias; e uma segunda, mais severa, que pode se manifestar como febre hemorrágica, ou como Síndrome do Choque Dengue, podendo ser fatal (IDREES; ASHFAQ, 2012).

O vírus da febre Chikungunya (família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*) pertence ao complexo sorológico da Floresta Semliki e seu nome significa “aquele que se dobra”, referindo-se ao efeito da artralgia incapacitante. Além disso, a infecção causa febre, mialgia, náusea, vômito, dor de cabeça, conjuntivite, dor retrobulbar, fotofobia e em raras ocasiões manifestações hemorrágicas. O vírus já era conhecido desde 1950, mas devido a processos migratórios e o surgimento de uma linhagem asiática mais virulenta, a doença ganhou destaque e já podia ser encontrada em todos os continentes (PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA, 2014; WEAVER; LECUIT, 2015).

Já vírus Zika (família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*), que não apenas é transmitido pelo vetor durante o repasto, mas também por transmissão vertical no hospedeiro vertebrado, sexualmente e através de transfusões de sangue, manifesta algum tipo de sintoma em apenas 20-25% dos doentes, que pode incluir febre, mialgia, prurido, dor nos olhos e exantemas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2019). Entretanto, o problema que mais preocupou as populações que vivem nas áreas de risco foi a associação entre o Zika vírus e possíveis danos ao sistema nervoso central de fetos. Houve diversos registros no Brasil, Polinésia Francesa e alguns outros países de casos de microcefalia, artrogripose e hidropisia fetal associados a infecção por este vírus. Os eventos não foram raros, principalmente no Brasil, onde problemas fetais já vinham sendo relatados, principalmente até o terceiro trimestre da gestação (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2019).

Estas doenças, no entanto, não são transmitidas imediatamente após a saída do mosquito da água. Como destacado anteriormente, no período após a emergência as fêmeas da espécie têm pouca atração pelo hospedeiro vertebrado e ainda não realizam o repasto sanguíneo (FOSTER, 1995), mostrando preferência pelo consumo

de néctar e fluidos adocicados (LEHANE, 2005). Ou seja, entender mais sobre a biologia do mosquito momento pode elucidar novas ferramentas de combate a transmissão de arboviroses.

1.3. A regulação hormonal no período previtelogênico, a importância do corpo gorduroso e o papel do metabolismo na capacidade vetorial

O hormônio juvenil (JH, do inglês *Juvenile Hormone*), principal hormônio do período previtelogênico (LEHANE, 2005), tem importante papel na metamorfose do mosquito para fase adulta e no processo de maturação sexual, por exemplo. Sua síntese e secreção se dá em um par de glândulas endócrinas conectadas ao cérebro, a *corpora allata* (**Figura 7**) (NORIEGA, 2004).

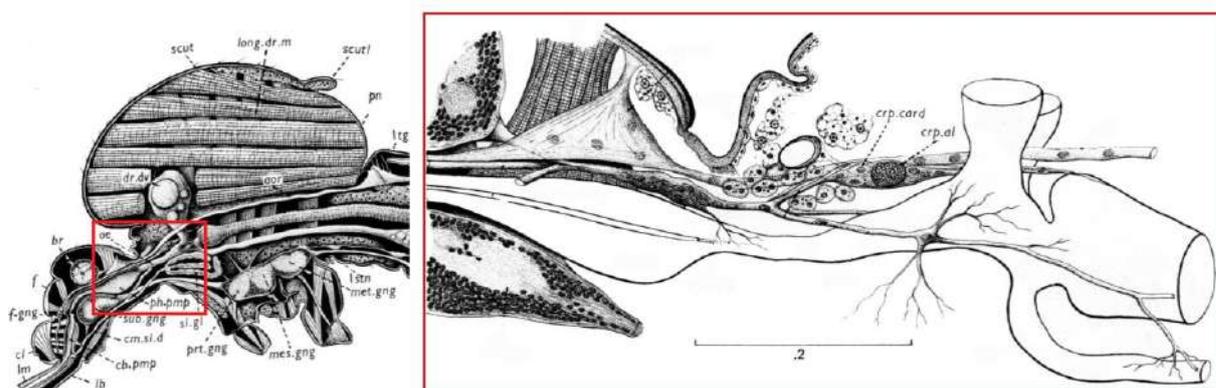


Figura 7. Desenho anatômico da parte anterior do mosquito *Aedes aegypti*, destacando o sistema nervoso estomatogástrico e órgãos endócrinos. Na parte anterior, próximo ao cérebro (br), encontram-se os órgãos endócrinos como a *corpora allata* (crp.al) e a *corpora cardiaca* (crp.card). Adaptado de: JOBLING B, 1987.

Entre 24 e 56h após a emergência, a concentração de JH atinge seu pico e se mantém alto até que o mosquito realize o repasto sanguíneo (ZHAO et al., 2016). A sinalização para que ocorra a síntese do hormônio depende da ativação da via de insulina (ISP, do inglês *Insulin Signaling Pathway*), que vai ser estimulada em resposta ao aumento de peptídeos similares a insulina (ILP, do inglês *Insulin Like Peptides*) na circulação, decorrente da chegada de carboidratos provenientes da alimentação (**Figura 8**). A pouca obtenção de carboidratos impacta a síntese de JH, causando prejuízos gonadotróficos (FEYEREISEN; FARNSWORTH, 1987; NORIEGA, 2004; PEREZ-HEDO; RIVERA-PEREZ; NORIEGA, 2014)

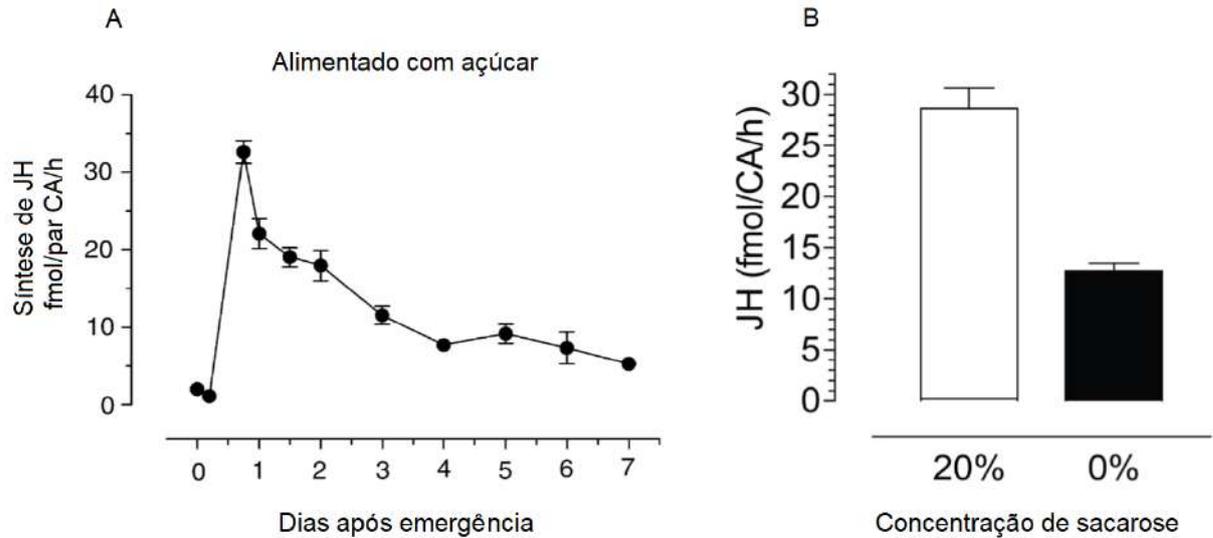


Figura 8. Síntese de Hormônio Juvenil (JH) após a emergência na presença, ou não, de sacarose. (A) produção de JH dias após emergência em fentomol por par da glândula *Corpora Allata* por hora (fmol/par CA/h). (B) síntese de JH 4 dias após emergência na presença e na ausência de sacarose em fmol/par CA/h. Adaptado de: PEREZ-HEDO M, RIVERA-PEREZ & NORIEGA FG, 2014; NORIEGA FG, 2004.

A atrofia dos tecidos reprodutivos é um problema característico associado a baixa produção de JH (NORIEGA, 2004), mas destaca-se também os prejuízos causados pela maturação inadequada do corpo gorduroso, tecido de reserva e endócrino análogo ao fígado e tecido adiposo de vertebrados (HOU et al., 2015; SHARMA; NUSS; GULIA-NUSS, 2019). Durante o período previtelogênico, o JH atua sobre o corpo gorduroso regulando a expressão de enzimas-chave do metabolismo de carboidratos e lipídeos, induzindo o acúmulo de glicogênio e lipídeos, fontes energéticas para a síntese de ovos após o repasto sanguíneo (**Figura 9**) (HOU et al., 2015; LING; RAIKHEL, 2021).

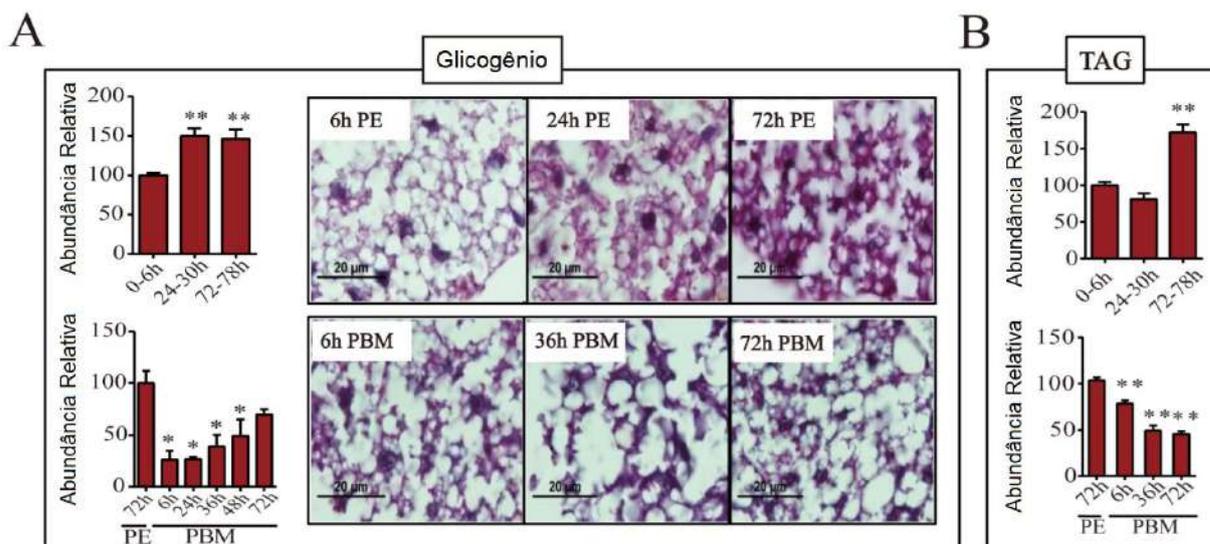


Figura 9. Acúmulo e remanejamento de reservas no período pós-emergência e após a alimentação com sangue. (A - superior) Níveis de glicogênio até 72h após a emergência quantificados enzimaticamente (gráfico), ou corando o tecido por Periodic acid–Schiff (PAS) (painéis). (A - inferior) Níveis de glicogênio até 72h após o repasto (PBM). (B - superior) Níveis de Triacilglicerol (TAG) até 72h após emergência quantificado enzimaticamente. (B - inferior) Níveis de Triacilglicerol (TAG) até 72h após o repasto (PBM). Adaptado de: HOU et al., 2015.

Durante as primeiras 24h de vida do mosquito adulto há estímulo para a transcrição geral de enzimas do metabolismo de carboidratos no corpo gorduroso. No terceiro dia de vida destes mosquitos, enzimas envolvidas com degradação e oxidação de glicose, como glicogênio fosforilase e trealose-6-fosfato fosfatase, bem como metabólitos intermediários da via glicolítica, como Glicose-6-fosfato e Piruvato, encontram-se a níveis significativamente baixos, enquanto algumas enzimas de síntese, como glicogênio sintase e trealose-6-fosfato sintase, têm apenas um declínio moderado. Ao mesmo tempo, as concentrações de açúcares circulantes aumentam desde a emergência até o terceiro dia (HOU et al., 2015). Da mesma maneira, enquanto enzimas da degradação de lipídeos aparecem reprimidas desde a emergência, mantendo-se assim até o terceiro dia de vida dos mosquitos, enzimas de biossíntese lipídica, como as FAS (do inglês, *Fatty acid synthase*), aparecem mais expressas nas primeiras horas de vida do mosquito e sofrem apenas uma moderada queda em sua expressão até o terceiro dia após a emergência (WANG et al., 2017). Estes fatores levaram a concluir que a influência de JH no período previtelogênico induz a manutenção da síntese e acúmulo de reservas. (HOU et al., 2015).

Esta regulação metabólica no período previtelogênico influencia de maneira direta ou indireta diferentes aspectos da capacitação vetorial, já que influenciam a maior ou menor taxa de picadas, a continuidade do ciclo gonotrófico, bem como a

maior ou menor densidade populacional, além de influenciar no aumento ou diminuição da sobrevivência do vetor (AIMAN et al., 2016; BRIEGEL; KNÜSEL; TIMMERMANN, 2001; GARRETT-JONES; GRAB, 1964). E uma vez que todos estes aspectos estão interligados pela ativação da via de insulina (MORRIS et al., 2012), que também regula a expressão do “maquinário” molecular importante para a adaptação do mosquito no período vitelogênico (HOU et al., 2015), faz-se necessário entender mais de sua regulação durante o período previtelogênico, principalmente nos tecidos que são centrais neste controle, como o corpo gorduroso.

1.4. A via de insulina

A via de insulina está presente em todos os animais e seu funcionamento também é bastante conservado. Ela coordena respostas que variam desde a manutenção de reservas energéticas, até a regulação da longevidade, por exemplo. De maneira geral, a ativação desta via se inicia quando algum estímulo externo induz a liberação do hormônio insulina pelo respectivo órgão endócrino, que cai na circulação e viaja até encontrar seu receptor, o receptor de insulina (IR, do inglês *Insulin Receptor*). Ao se ligarem, o receptor sofre mudanças conformacionais, que resultam em alterações pós-traducionais, ativando uma cascata de sinalização intracelular, que culmina em mudanças no perfil metabólico e transcricional da célula-alvo (NELSON; COX, 2008).

O receptor de insulina é um heterotetrâmero composto por duas subunidades α e β idênticas e pertence à família de receptores tirosina cinase. As subunidades α ficam dispostas para o meio extracelular, enquanto as β estão imersas na membrana celular e na porção citosólica. As subunidades α possuem o domínio de ligação a insulina, enquanto as subunidades β detêm a atividade cinase, que utiliza de ATP para fosforilar os respectivos alvos em resíduos de tirosina, o que inclui a própria região carboxiterminal da subunidade β (NELSON; COX, 2008).

Quando o receptor reconhece seu ligante, a mudança conformacional induzida pela interação permite que uma subunidade β fosforile a outra subunidade em três resíduos de tirosina, forçando uma segunda mudança conformacional nesta subunidade, que expõe o sítio de ligação aos substratos que serão recrutados. O primeiro deles é o substrato do receptor de insulina (IRS, do inglês *Insulin Receptor Substrate*), que interage com o respectivo domínio de ligação e é fosforilado pelo IR

em diversos resíduos de tirosina, tornando-se um ponto de nucleação para um complexo de proteínas que continuará a cascata de transdução de sinal (NELSON; COX, 2008).

Uma vez iniciada, a cascata de sinalização ativa duas vias principais: a via das MAPK (do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase*) e a via da PI3K (do inglês *Phosphatidylinositol-3-Kinase*), responsáveis por regular os processos metabólicos, de proliferação, diferenciação e sobrevivência, por exemplo (AKSAMITIENE; KIYATKIN; KHOLODENKO, 2012; NELSON; COX, 2008), que governam as respostas metabólicas citadas inicialmente. Apesar de haver diferenças em alguns pontos, boa parte deste funcionamento se mantém conservado entre mamíferos e insetos, como mostra a **Figura 10**.

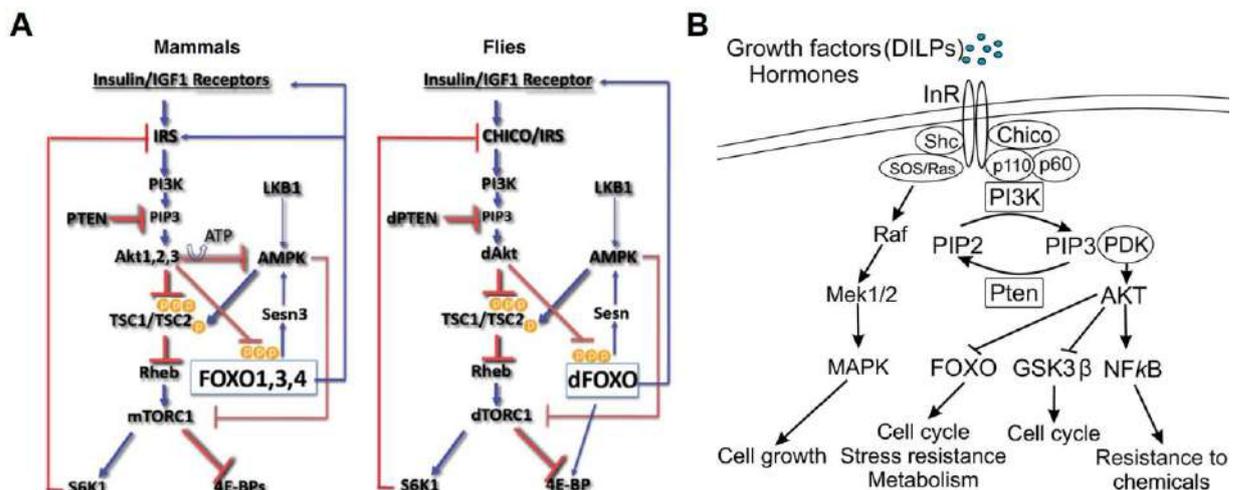


Figura 10. Via de insulina em Mamíferos e *Drosophila*. Figura mostra (A) as similaridades e diferenças entre a via PI3K de mamíferos e *Drosophila* (flies) e (B) e as cascatas de transdução decorrentes da ativação da via de insulina (MAPK e PI3K/AKT), bem como as respostas decorrentes da ativação da via. IGF1: Insulin Growth Factor 1; IRS: Insulin Receptor Substrate; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate; PTEN: Phosphatase and Tensin homologue; AKT: Serine/Threonine Kinase 1; LKB1: Liver Kinase B1; AMPK: AMP-activated protein Kinase; TSC: Tuberous Sclerosis Complex; Rheb: Ras homolog enriched in brain; Sesn3: Sestrin 3; FOXO: forkhead box O; mTORC1: mammalian Target of Rapamycin Complex 1; S6K: Ribosomal protein S6 kinase; 4E-BPs: Eukaryotic initiation factor 4E Binding Proteins; DILPs: *Drosophila* Insulin Like Peptides; InR: Insulin Receptor; SOS: Son of Sevenless; MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase; Mek1/2: Mitogen-Activated Protein Kinase 1/2; PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphate; PDK: Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase; GSK3β: Glycogen Synthase Kinase-3 β; NFκB: nuclear factor kappa B. Adaptado de: HAY N, 2011; SEMANIUK et al., 2020.

Como indicado, esta cascata é ativada pela insulina, uma proteína pequena com duas cadeias polipeptídicas A e B, ligadas por pontes dissulfeto. Em mamíferos o polipeptídeo é sintetizado no pâncreas na forma de cadeia única como pré-proinsulina, que passará por um processamento proteolítico para ser armazenado em

vesículas na forma de proinsulina, que é então liberada na circulação na forma madura do hormônio. Em humanos há uma insulina e uma série de peptídeos similares, que apresentam uma variedade de funções em diferentes tecidos, tanto no desenvolvimento, quanto na fase adulta do organismo (NÄSSEL; BROECK, 2016; NELSON; COX, 2008).

Insetos não possuem insulina, apenas peptídeos similares a insulina (ILPs) que são assim chamados dada sua similaridade com a própria insulina, especialmente quanto ao número e posições das cisteínas presentes, e na disposição do precursor pre-proinsulina, que poderá ser processado até a forma de duas cadeias A e B na forma madura. Os ILPs variam quanto a região de síntese, função e número, segundo a espécie do invertebrado (NÄSSEL; BROECK, 2016). Em relação a função, cada ILP possui um impacto distinto no metabolismo, já que alguns podem atuar como a própria insulina humana, ou como IGFs (do inglês, *Insulin Growth Factor*), que também se ligam a receptores Tirosina cinase, ou ainda Relaxinas, que se ligam a receptores acoplados a proteína G (CHOWAŃSKI et al., 2021). O entendimento da regulação e ação dos ILPs tem sido importante para entender o papel que a ISP exerce em invertebrados.

1.4.1. ILPs – Regulação e ação metabólica

Em insetos, a produção e secreção de ILPs foi inicialmente estudada na mariposa *Bombix mori*, onde identificaram-se quatro pares de MNCs (do inglês, *Medial Neurosecretory Cells*) no cérebro com fibras localizadas periféricas a *corpora allata* (CA), capazes de secretar estes peptídeos. Estas células passaram então a serem chamadas de IPCs (do inglês, *Insulin Producing Cells*). Atualmente sabe-se que as IPCs não estão restritas ao SNC e podem estar presentes em outros órgãos, como Intestino e Corpo Gorduroso (CHOWAŃSKI et al., 2021).

O mosquito *A. aegypti* possui oito ILPs descritos (AeILPs) (RIEHLE et al., 2006), dos quais sete possuem uma forma propeptídica, mas todos possuem seis resíduos de cisteínas que unem as cadeias A e B (SHARMA; NUSS; GULIA-NUSS, 2019). A expressão destes AeILPs acontece majoritariamente na cabeça (AeILP1, -3, -4, -7 e -8), mas também incluem ovário e corpo gorduroso (AeILP2, -5 e -6) (LING; RAIKHEL, 2021).

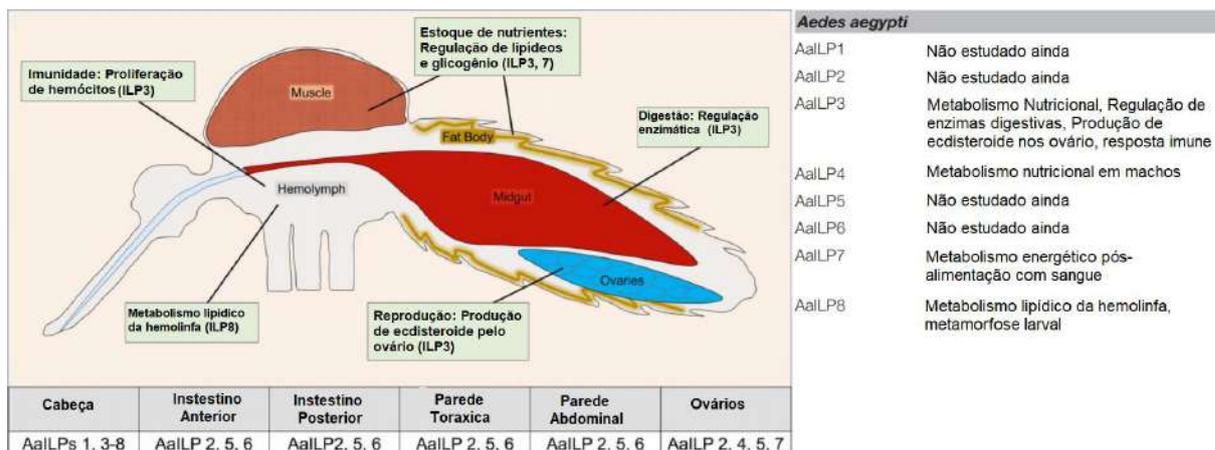


Figura 11. Resumo das funções conhecidas dos ILPs de *A. aegypti* e seus locais de síntese. A figura apresenta de forma resumida a ação conhecida dos ILPs do mosquito, bem como seus locais de síntese. Hemolinfa (hemolymph); Corpo Gorduroso (Fat Body); Intestino (Midgut); Ovários (Ovaries). AaILP (*Aedes aegypti* ILP). Fonte: SHARMA; NUSS; GULIA-NUSS, 2019; WEN et al., 2010.

A regulação transcricional dos AeILPs ainda não está totalmente elucidada, mas se sabe que o JH e a 20E (do inglês, *20-hydroxyecdysone*) possuem receptores nucleares que se ligam a regiões promotoras para indução ou repressão da transcrição dos AeILPs, regulando assim processos de metamorfose e desenvolvimento, ou as alterações metabólicas necessárias anteriores e posteriores ao repasto sanguíneo. A ativação do receptor Met pelo JH em *A. aegypti* induz a transcrição dos AeILP2, -6 e -7 e repressão dos AeILP1, -3, -4 e -5. A ativação do heterodímero EcR (do inglês, *ecdysone receptor*) e USP (do inglês, *Ultraspiracle*) pelo 20E induz a transcrição dos AeILP1, -3, -4, -5 e -8 e reprime os AeILP2, -6 e -7 (LING; RAIKHEL, 2021). Os AaILP1, -3 e -8 são transcritos de forma policistrônica e os ILP7 e -8 estão sujeitos a regulados de microRNAs (SHARMA; NUSS; GULIA-NUSS, 2019).

Em outros modelos, vias como a da PI3K/AKT também já se mostraram importantes na regulação transcricional de ILPs. Em moscas, mostrou-se que a ativação do fator transcricional FOXO (do inglês, *Forkhead/winged helix box gene, group O*), regulado por esta via, diminui os níveis de transcritos de ILPs nos IPCs. Uma vez que a ativação de FOXO depende do grau de ativação da própria via de insulina na IPC, especula-se que a manutenção da transcrição de ILPs pelas IPCs possa ser autócrina (ALFA; KIM, 2016).

Além disso, o balanço nutricional também é capaz de regular a transcrição de ILPs. Larvas de mosquitos mantidas desde a eclosão com rações de diferentes composições nutricionais apresentam variações nos níveis transcricionais de AeILPs,

tanto em larvas tardias (L4), quanto em adultos (POORAIIOUBY et al., 2018). Em *Drosophila*, sabe-se que a expressão dos dILPs 3 e 5 são reduzidos pela privação de nutrientes, ao passo que altas concentrações de açúcar induzem a transcrição dos dILPs 3, 5 e 2. Seria esperado que o fator de transcrição sensível a glicose, Mondo-Mlx, ortólogo ao fator transcricional de mamíferos ChREBP (do inglês, Carbohydrate response element binding protein), fosse o responsável pela transcrição destes dILPs, mas observou-se que apenas o dILP3 responde a sinalização de Mondo-Mlx (ALFA; KIM, 2016).

No que diz respeito a secreção, mamíferos têm como principal estímulo o aumento na concentração de glicose na circulação, que é percebido pelas células β do pâncreas, que internaliza e metaboliza a glicose, aumentando assim a concentração citoplasmática de ATP. Altas concentrações de ATP inibem canais de Potássio, resultando na despolarização da membrana celular, que induz a abertura dos canais de Cálcio e o influxo de íons para a célula. O aumento nas concentrações de Cálcio induz mudanças conformacionais no citoesqueleto, que movimentam as vesículas que armazenam a insulina, permitindo a exocitose do peptídeo, como mostra a **Figura 12** (NÄSSEL; BROECK, 2016; NELSON; COX, 2008).

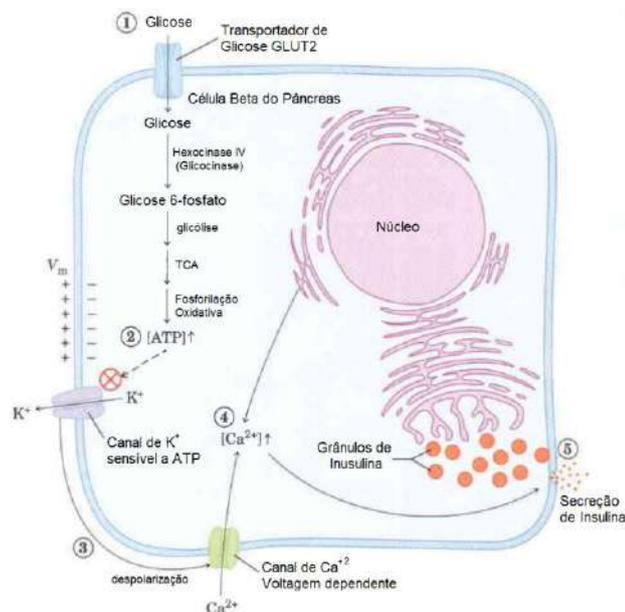


Figura 12. Esquema representando o processo de liberação de insulina pelas células β do pâncreas. A figura representa as etapas para liberação da insulina armazenada em grânulos no citosol das células β do Pâncreas, que se inicia (1) na entrada de Glicose na célula e sua metabolização para aumento das concentrações de ATP; (2) O aumento nas concentrações de ATP inibe os canais de Potássio, que (3) causam despolarização na membrana, estimulando a abertura dos canais de Cálcio. (4) O influxo de Cálcio permite o rearranjo do citoesqueleto para que as vesículas contendo a pro-

insulina sejam secretadas. TCA: Tricarboxylic Acid Cycle; ATP: Adenosine TriPhosphate. Fonte: NELSON; COX, 2008.

Este mesmo funcionamento parece estar conservado em insetos. Tanto em *B. mori*, quanto em *D. melanogaster*, a presença de glicose induz a liberação de ILPs. Esta glicose é capaz de alterar o potencial de membrana das IPCs e induz o aumento no influxo de Cálcio nestas células (KRÉNEISZ et al., 2010; MASUMURA et al., 2000), permitindo assim a liberação das vesículas contendo ILPs. Entretanto, uma vez que diferentes ILPs possuem funções distintas sobre o metabolismo energético, a liberação destes peptídeos também está ligada a estímulos provenientes de outros tecidos, como intestino e corpo gorduroso, quanto estes percebem a chegada de nutrientes (GÉMINARD; RULIFSON; LÉOPOLD, 2009).

Em *A. aegypti*, a função de alguns ILPs já foi estudada. A injeção do peptídeo sintético de AeILP3 em mosquitos decapitados após a alimentação com açúcar induziu aumento nos estoques de glicogênio e lipídeos de maneira dose dependente, reduzindo os níveis do principal açúcar circulante, a trealose, um dissacarídeo que é sintetizado no corpo gorduroso a partir dos açúcares absorvidos na alimentação, para que posteriormente seja liberado na hemolinfa. Perturbações nas reservas energéticas também foram observadas em mosquitos mutantes expressando AaILP7 e -8 não funcionais. Mutantes para o AaILP7 mostram aumento dramático das reservas de lipídeos no corpo gorduroso e uma redução dos estoques de glicogênio e, de maneira oposta, os mutantes para AaILP8 apresentam redução nos estoques de lipídeos e aumento das reservas de glicogênio (SHARMA; NUSS; GULIA-NUSS, 2019).

Em relação ao repasto sanguíneo, sabe-se que o AaILP3 atua no intestino ativando a produção e secreção de tripsinas, garantindo o prosseguimento da digestão, além de induzir na hemolinfa a proliferação de hemócitos, células do sistema imune inato de insetos, como possível defesa a chegada de patógenos provenientes da alimentação. Observou-se também que a injeção do peptídeo sintético de AeILP3 induziu no ovário a produção de ecdiosteróides, que agem sobre o corpo gorduroso em conjunto ao próprio AeILP3 para dar início ao processo de síntese das proteínas do vitelo. Administrações do peptídeo sintético de AaILP4 também foram capazes de induzir o estímulo de ecdiosteróides, mas em concentrações até 5 vezes maiores se comparado ao AaILP3, sem alterar as reservas metabólicas. Mosquitos mutantes para

os AeILP7 e -8 apresentaram apenas desenvolvimento parcial dos folículos ovarianos após a alimentação com sangue (SHARMA; NUSS; GULIA-NUSS, 2019).

E apesar da importância que estas informações possuem para o estudo da ISP, ainda se fazem necessárias abordagens complementares, principalmente devido à dificuldade de estudar os ILPs separadamente. O baixo grau de conservação evolutivo entre ILPs dificulta a inferência de função entre modelos (SHARMA; NUSS; GULIA-NUSS, 2019), sem contar que os mecanismos regulatórios descritos anteriormente não atuam sobre os ILPs individualmente e promovem uma respostas compensatórias por parte de outros peptídeos, mascarando assim os efeitos da ausência do ILPs de interesse (SEMANIUK et al., 2021). E por conta destas regulações e papéis variados nos diferentes contextos alimentares do mosquito, que o estudo de diferentes aspectos importantes para o vetor, como forrageamento, cópula, ciclo circadiano, longevidade etc, torna-se ainda mais complexo e demandam de outras abordagens.

1.4.2. Papel da via de insulina na capacidade vetorial

Visando estudar o papel que a via de insulina possui no organismo, uma das estratégias tornou-se interferir na atividade de proteínas reguladoras, ou de proteínas-chave da via, aumentando, ou diminuindo as ações reguladoras sobre a via, reprimindo-a, ou mantendo-a ativa. Este conceito se baseia no estudo de “nós críticos” e as principais abordagens têm se concentrado sobre a as proteínas AKT/PKB, PI3K e sobre o próprio receptor de insulina (TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006).

Abordagens como esta já foram utilizadas em outros organismos e mostram o papel regulatório que a via de insulina possui sobre processos como longevidade, reprodução e refratoriedade a patógenos (CORBY-HARRIS et al., 2010; HAUCK et al., 2013; TOIVONEN; PARTRIDGE, 2009). Em modelo de *Anopheles stephensi* transgênico, a expressão de AKT miristoilada no intestino médio, mantendo a via de insulina constitutivamente ativa, modula negativamente a longevidade após a alimentação com sangue infectado com *Plasmodium falciparum*, ao mesmo tempo que reprime a replicação do protozoário (CORBY-HARRIS et al., 2010).

Entretanto, esta mesma abordagem em outro tecido mostrou que este efeito não é consistente. Em *A. aegypti* e *A. stephensi*, observou-se que a expressão de AKT

miristoilada no corpo gorduroso de mosquitos que se alimentam com sangue, ao contrário do que foi visto no intestino e do que se observou em outros modelos, aumenta o tempo de vida destes insetos, em comparação a mosquitos não transgênicos (ARIK et al., 2015; HWANGBO et al., 2004). E em ambas as abordagens a transgênese não afetou a oviposição (ARIK et al., 2015; CORBY-HARRIS et al., 2010), mesmo que a via de insulina seja fundamental para o processo de ovogênese (SHARMA; NUSS; GULIA-NUSS, 2019).

A supressão gênica do IR no mosquito *A. aegypti* tem sido utilizada como forma de estudar sua relação com a bactéria *Wolbachia*. Apesar da implementação bem-sucedida da bactéria no controle de arboviroses, ainda não estão claros todos os mecanismos moleculares que coordenam o estabelecimento da bactéria no mosquito, ou de que maneira esta contribui para redução da replicação de determinados vírus no vetor, mas se sabe que há relação com a via de insulina (TERRADAS; MCGRAW, 2017) e com a manipulação do metabolismo energético do hospedeiro, como é o caso do metabolismo de lipídeos (CARAGATA et al., 2013). Viu-se que, em *A. aegypti*, a bactéria é capaz de reprimir a ativação da via de insulina, de modo que a inibição química da atividade cinase do receptor, bem como a diminuição da expressão do MIR via RNAi, corroboram a hipótese de que a replicação dos vírus DENV e ZIKV dependem do grau de ativação da via, como já havia sido observado em células de mamíferos (HAQSHENAS et al., 2019; KUMAR et al., 2016).

Outras evidências mais indiretas reiteram a importância de processos coordenadas pela atividade da via de insulina no estudo da capacidade vetorial. Por exemplo, mosquitos da espécie *Wyeomyia smihizi*, cuja população é composta por indivíduos que se alimentam de sangue e indivíduos que não se alimentam de sangue, apresentam a expressão do gene de fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK, do inglês *Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase*) diferencialmente expressa entre estes indivíduos, onde a maior expressão deste gene em mosquitos que não realizam o repasto indica que o metabolismo gliconeogênico é especialmente importante para o hábito hematofágico (BRADSHAW et al., 2018).

A PEPCK é a principal enzima que regula o processo de síntese *de novo* de glicose, chamada gliconeogênese, catalisando a conversão de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato. Este processo pode ocorrer no citoplasma, mediado pela isoforma citoplasmática da enzima (PEPCK-C), ou na matriz mitocondrial mediante ação da

isoforma mitocondrial (PEPCK-M) (CHATTERJEE; PERRIMON, 2021). A isoforma citoplasmática é regulada pela atividade da via de insulina, já que a via de PI3K, quando ativa a proteína PKB (do inglês *Protein Kinase B*), também chamada de AKT, regula negativamente o fator transcricional responsável pela transcrição da PEPCK-C, FOXO (do inglês *Fork head box O*).

Outro exemplo importante de via biológica que regula diferentes aspectos da capacidade vetorial, cuja própria regulação depende da atividade da via de insulina é o ciclo circadiano (YAMAGUCHI et al., 2022). O relógio circadiano coordena diversos aspectos fisiológicos de organismos eucarióticos mediante indução e repressão de eventos de transcrição e tradução em períodos de 24h (SHETTY et al., 2022). Os principais genes envolvidos neste ciclo são os fatores transcricionais *Clock (Clk)* e *Cycle (cyc)*, que regulam a própria atividade transcrevendo seus repressores transcricionais. Dentre eles, encontram-se os genes *Period (per)* e *Timeless (tim)*, que quando expressos se dimerizam no citoplasma, migram para o núcleo e reprimem a ação de *cyc* e *Clk* (MEIRELES-FILHO; KYRIACOU, 2013). A fotoliase *Cryptochrome 1 (cry1)* atua mantendo o ciclo ativo induzindo a degradação de *tim*, enquanto *cry2* se complexa a *per* e *tim* para reprimir a atividade transcricional de *cyc* e *Clk*. Entretanto, diferente de *cry1*, o gene de *cry2* está restrito a alguns grupos de insetos e é importante na regulação de padrões de comportamento a nível de espécie, como visto para *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (GENTILE et al., 2009; SHETTY et al., 2022).

Em *A. aegypti*, sabe-se que o ciclo circadiano regula a resposta olfatória a odores humanos, a atividade locomotora e a taxa de reprodução, em contra partida, a alimentação com sangue regula a expressão de genes do relógio, evidenciando a relação entre o hábito hematofágico e a regulação circadiana. Ao mesmo tempo, em insetos, a atividade do ciclo circadiano depende da atividade da via de insulina e da regulação que proteínas desta via, como AKT e GSK (do inglês, *Glycogen Synthase Kinase*), exercem sobre as proteínas de relógio (YAMAGUCHI et al., 2022).

De todo modo, as estratégias para o estudo desta via precisam de bastante redundância para confirmar a veracidade de um determinado evento. Apesar da grande conservação evolutiva, nem todos os mecanismos de sinalização estão completamente conservados (HAQSHENAS et al., 2019) e os efeitos regulatórios podem variar entre determinados tecidos, que não respondem da mesma maneira que outros mediante um mesmo estímulo, como mencionado anteriormente (ARIK et al.,

2015), o que pode estar atrelado ao fato de que a via de insulina apresenta variações de regulação locais, mediante diferentes tipos de estresse, como mostra a **Figura 13** (YE, 2007).

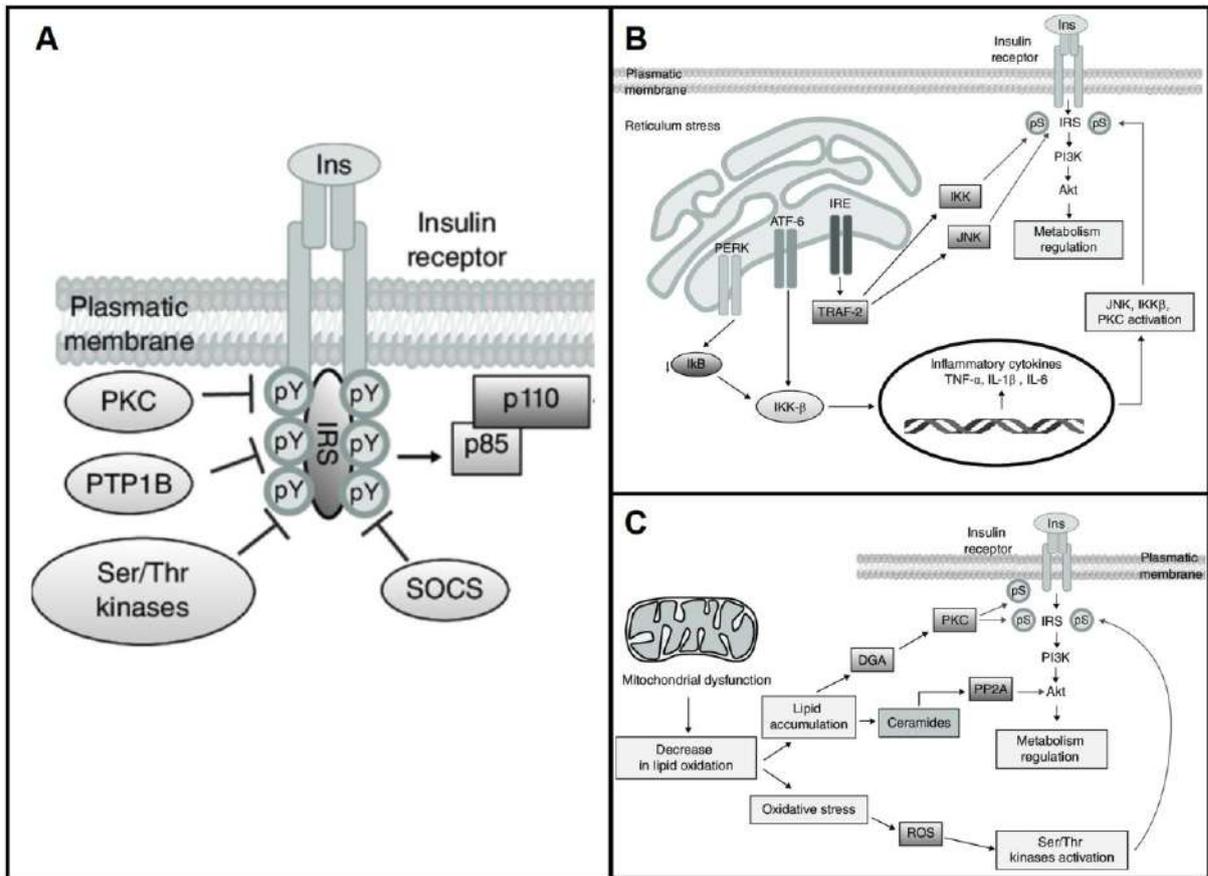


Figura 13. Esquema representando os diferentes eventos regulatórios sobre o receptor de Insulina (Insulin Receptor) e seu substrato (IRS) mediante diferentes tipos de sinalização. (A) Figura exemplifica a quantidade de diferentes proteínas capazes de modificar o receptor de insulina, ou seu substrato, através da adição, ou remoção de resíduos de fosfato de diferentes aminoácidos-chave. (B) Esquema mostra como o estresse no retículo endoplasmático é capaz de induzir a ativação de proteínas que podem modificar o receptor de insulina e/ou seu substrato. (C) Figura mostra como outro tipo de estresse é capaz de induzir outros grupos de proteínas a modificarem o receptor de insulina e/ou seu substrato. Ins: Insulina; IRS: Insulin Receptor Substrate; PKC: Protein Kinase C; PTP1B: Protein Tyrosine Phosphatase 1B; SOCS: Suppressor of Cytokine Signalling; pS: phospho-Serin; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; AKT: Serine/Threonine Kinase 1; IκB: Inhibitor of nuclear factor kappa B; IKK: IκB kinase; IKKβ: Iκappa B kinase β; TNF: Tumor Necrosis Factor; TRAF-2: TNF Receptor Associated Factor 2; IRE: Iron-Responsive Element; JNK: c-Jun N-terminal kinase; ATF-6: Activating Transcription Factor 6; PERK: Protein kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase; IL: Interleucine; DGA: Diacylglycerol; ROS: Reactive Oxygen Species; PP2A: Protein Phosphatase 2A. Adaptado de: (GUTIÉRREZ-RODELO; ROURA-GUIBERNA; OLIVARES-REYES, 2017).

Desta maneira, outra forma de explorar a importância que esta via possui para o vetor é através do estudo das regulações que a via possui no mosquito. E porque a regulação da ISP está baseada em alterações das dinâmicas de fosforilação e desfosforilação, especialmente em resíduos de tirosina, faz-se relevante estudar as

proteínas que compõem esta dinâmica, as proteínas cinases e fosfatases de tirosina (ALONSO et al., 2004; HAN; YE; ZOU, 2008; TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006). No que diz respeito ao período pós-emergência do mosquito, por exemplo, é sabido que após a saída do inseto adulto da água e até o sexto dia de vida, machos e fêmeas passam por modificações significativas em seus perfis de fosforilação em tirosina (JABLONKA et al., 2011).

1.5. Fosforilação em Tirosina e sua importância

As proteínas que compõem a dinâmica completa de fosforilação em tirosina, como outras dinâmicas, são proteínas cinases (PTKs, do inglês *Protein Tyrosine Kinase*), capazes de fosforilar resíduos de tirosina; proteínas com domínios de ligação capazes de reconhecer os resíduos fosforilados; e proteínas fosfatases (PTPs, do inglês *Protein Tyrosine Phosphatase*), capazes de remover a modificação inicial. Como é possível observar na **Figura 14** a ligação fosfoéster de tirosina é a mesma para serina, treonina e tirosina, mas fisicamente existe uma distância considerável entre a hidroxila fosforilada para a estrutura principal da proteína, uma vez que a fosforilação é feita no anel fenólico do aminoácido. Evolutivamente, isto possibilitou o estabelecimento de uma pressão seletiva por sítios de ligação que são mais profundos, cuja interação é mediada por hidrofobicidade, ou interações do tipo π , que resíduos de serina e treonina não são capazes de estabelecer (HUNTER, 2014). Sua relevância estaria ainda atrelada a formação de um sistema ortogonal de transdução de sinal, ou seja, ausência, ou pouca interferência de um sinal pré-existente, como as fosforilações em serina/treonina (TONG; WANG; SU, 2017).

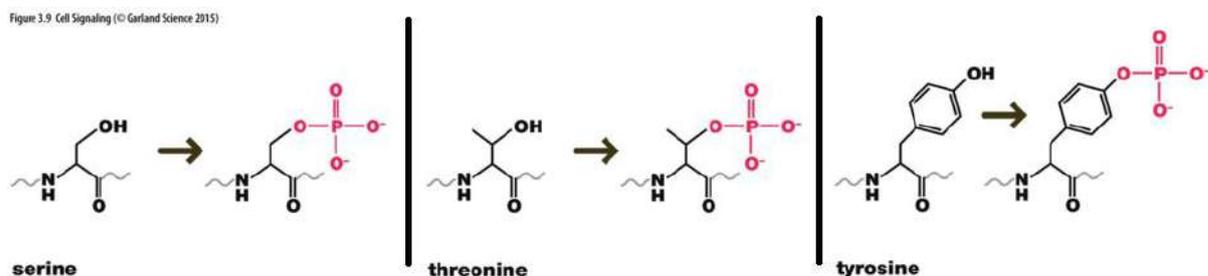


Figura 14. Estrutura química dos principais aminoácidos fosforilados. A figura mostra a estrutura química dos fosfoésteres de serina, treonina e tirosina, mostrando a distância que a ligação fosfato no resíduo possui em relação a cadeia principal (cinza). Acima do nome encontra-se a estrutura principal,

em seguida, a mesma estrutura fosforilada, onde o radical fosfato está destacado em vermelho. Fonte: <quizlet.com/497242974/mcmb-31-cell-signaling-ii-flash-cards/>.

E com a descoberta que o desbalanço dos níveis de fosfotirosina está relacionado ao desenvolvimento de doenças metabólicas e neurológicas, como diabetes, Alzheimer e câncer, rapidamente o estudo sobre proteínas tirosina cinase e fosfatase foi impulsionado, visando a descoberta de inibidores aplicáveis em novas terapias (HUNTER, 2014). Atualmente, muitas proteínas cinases e fosfatases de tirosina são estudadas e possuem drogas específicas para tratamento de doenças que estão relacionadas ao respectivo mau-funcionamento.

As PTKs ainda representam a maioria destes estudos, dentre outros motivos, devido à natureza histórica dos eventos de descoberta, já que a primeira PTP só foi clonada e purificada 10 anos depois da primeira PTK (CHARBONNEAU et al., 1989; GUAN et al., 1990; KÖHN, 2020; SMOLY et al., 2017). Contudo, cada vez mais as PTPs mostram a sua relevância no ambiente celular e estudá-las torna-se uma importante oportunidade de entender mais sobre outras doenças, como aquelas negligenciadas (KÖHN, 2020).

1.5.1. Proteínas Tirosinas Fosfatases (PTPs) e seu estudo em mosquitos

Por definição, as PTPs englobam todas as enzimas capazes de hidrolisar ligações fosfato presentes em resíduos de tirosina (ALONSO; PULIDO, 2016), mas como mencionado anteriormente, devido a sua origem evolutiva, há PTPs capazes de desfosforilar não apenas, mas também tirosina (ALONSO; PULIDO, 2016; MOORHEAD et al., 2009). Como mostra a **Figura 15**, as PTPs estão separadas em três grandes famílias, divididas com base no aminoácido responsável pelo ataque nucleofílico durante o processo de remoção do íon fosfato. Na família 1 a desfosforilação é coordenada pela cisteína do motivo catalítico CXXXXXR; a família 2 contém os integrantes das Dehalogenases Haloácidas, onde a catálise depende do aspartato do motivo DXDX(V/T); por fim, a família 3 é composta por membros da superfamília das Histidina Fosfatases, divididas entre os ramos das Fosfoglicerato Mutase e das Fosfatases Ácidas, que dependem da histidina de seu motivo RHGXRXP para catálise (ALONSO; PULIDO, 2016).

Cys-based CxxxxR	Class I	Subclass I	Classic	pTyr, PIPs
		Subclass II	VH1-like	pTyr, pSer, pThr, PIPs, Other
		Subclass III	SACs	PIPs
		Subclass IV	PALD1	? = unknown substrate
		Subclass V	INPP4s	PIPs
		Subclass VI	TMEM55s	PIPs
	Class II	LMW-PTP	pTyr	
	SSU72	pSer		
	Class III	CDC25s	pTyr, pThr	
Asp-based	HAD	EYAs	pTyr, pSer	
His-based	PGM	UBASH3s	pTyr	
	Acid phosphatases	ACPs	pTyr, pSer, pThr, Other	

Figura 15. Classificação das Proteínas Tirosina Fosfatases (PTPs). A figura mostra os diferentes níveis hierárquicos de classificação das PTPs. As diferentes cores representam as famílias, que ainda são divididas em classe e subclasse, cujos nomes encontram-se ao lado. Na caixa laranja estão representados os substratos preferenciais de cada subclasse, sejam fosfo-Tirosina (pTyr), fosfo-Serina, fosfo-Treonina (pThr), fosfatidilinosítídeos (PIPs), ou outros/desconhecidos. Fonte: ALONSO, 2016.

No que diz respeito a regulação da dinâmica de fosforilação, as fosfatases apresentam um menor número de genes e maior expressão, em relação as cinases, e não apresentam uma hierarquia de sinalização, ou seja, não costumam afetar diretamente outras fosfatases, mesmo que também sejam reguladas por fosforilação. E uma vez que as PTPs possuem uma arquitetura bastante conservada, mais de uma enzima é capaz de regular um mesmo evento. Isto quer dizer que uma mesma PTP possui diferentes alvos, ou um mesmo alvo pode ser desfosforilado por diferentes fosfatases. Esta forma de ação pressupõe uma regulação espaço-temporal deste sistema, evitando a permanência da fosforilação em diferentes alvos que estejam em regiões diferentes da célula (BARR; KNAPP, 2010; SMOLY et al., 2017).

Atualmente, muito do que se sabe sobre o papel destas enzimas é proveniente de informações relacionadas a mutações em mamíferos. Estudos em camundongos observando a perda de função também vêm sendo utilizado para este propósito, tendo elucidado muito sobre a importância destas proteínas na saúde humana (HATZIHRISTIDIS et al., 2015). E uma vez que as PTPs possuem função bastante conservada, as informações geradas puderam ser transpostas para modelos mais simples, ajudando no desenvolvimento de novos tratamentos, ou formas de prevenção de doenças que afetam humanos (HATZIHRISTIDIS et al., 2015).

Em mosquitos, até o presente momento, o papel destas enzimas vêm sendo estudado no contexto de entender a regulação da via de insulina e como ela afeta a capacidade que o inseto possui de se reproduzir e de transmitir patógenos (GU; CHEN; LIN, 2021; RUZZI et al., 2020; XU et al., 2020). Por exemplo, com a

caracterização da PTEN (do inglês, *Phosphatase and Tensin homolog*), enzima que reprime a ISP, mostrou-se em *A. aegypti* através de supressão gênica que a redução de sua transcrição induz aumento na produção de ovos. Mais tarde, em *Anopheles stephensi*, ao induzir o aumento na expressão desta mesma enzima, notou-se o aumento no tempo de vida e maior refratoriedade ao protozoário causador da malária, *Plasmodium falciparum*. Em outro estudo, caracterizou a PTP1B de *A. aegypti*, enzima que desfosforila o IR, mostrando que a redução de sua transcrição causa redução do número de ovos (ARIK et al., 2009; HAUCK et al., 2013; MORETTI et al., 2014; RIEHLE; BROWN, 2007).

Recentemente, a PTP LAR (do inglês, *Leukocyte common antigen-related*) e sua relação com a ISP foi descrita pela primeira vez em *D. melanogaster* (KAUR et al., 2019). Em mamíferos sua relação com o ISP já havia sido bastante explorada (ZABOLOTNY et al., 2001), mas em insetos a PTP era conhecida apenas pelo papel que possui regulando o desenvolvimento de alguns tecidos, principalmente o SNC (HATZIHRISTIDIS et al., 2015). Assim, estudá-la em mosquitos pode fornecer melhor entendimento da biologia destes insetos e somar aos dados já existentes sobre as PTPs, a regulação da ISP e seu possível uso desta via como ferramenta no controle de vetores.

1.5.2. Proteína Tirosina Fosfatase LAR: sinalização e regulação do metabolismo energético

A PTP LAR é uma fosfatase Clássica da Família 1, Subclasse I (**Figura 15**) e do tipo receptora. Dentre as oito classes de PTPs receptoras – R1/R6, R2A, R2B, R3, R4, R5, R7 e R8 – a PTP LAR pertence a classe R2A, caracterizada pela presença de domínios Imunoglobulina e Fibronectina tipo III na sua porção extracelular, responsável por reconhecer estímulos externos, enquanto sua porção citoplasmática possui dois domínios PTP, D1 e D2, que transmitem os estímulos recebidos mediante desfosforilações de proteínas-alvo. O domínio D1 N-terminal é cataliticamente ativo, ao passo que o domínio D2 possui descrita apenas função regulatória, ligando-se ao domínio D1 para controlar sua atividade (**Figura 16**) (XU; FISHER, 2012).

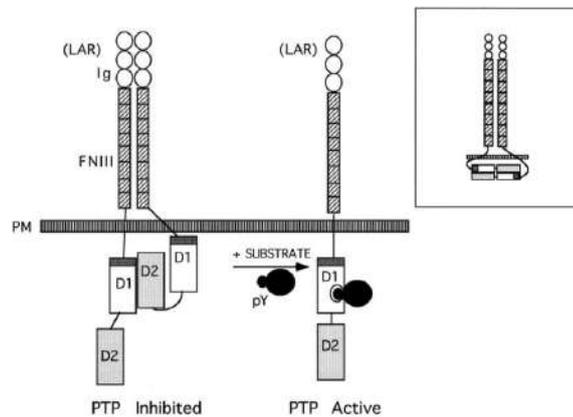


Figura 16. Representação da arquitetura e regulação da PTP LAR. A figura representa a arquitetura da PTP LAR, destacando os domínios de Imunoglobulina (Ig) e Fibronectina III (FNIII) na porção extracelular, acima da membrana plasmática (PM), enquanto abaixo da PM se encontram os domínios PTP D1 e D2. A PTP é representada na forma inibida, regulada pelo domínio D2 de outra PTP LAR, até que reconhece o substrato e muda sua conformação para forma ativa, expondo o domínio D1. Fonte: WALLACE MJ et al., 1998.

Os diferentes efeitos decorrentes das interações entre o domínio extracelular desta PTP e outras moléculas da matriz extracelular já foram estudadas em invertebrados. Por exemplo, em *Drosophila*, sabe-se que a interação da porção extracelular com proteoglicanos promove a formação de junções neuromusculares, ao passo que a ligação de ancoras GPI suprime a morfogênese sináptica (XU; FISHER, 2012). Estas respostas estão associadas a mudanças na dinâmica celular promovidas pela ação da fosfatase, que atua coordenando vias relacionadas a adesão célula-célula e dinâmica de rearranjo do citoesqueleto, desfosforilando alvos como a proteína Ena, substrato da tirosina cinase Abl (CHAGNON; UETANI; TREMBLAY, 2004).

Estas modificações também podem estar relacionadas aos outros alvos desta PTP, que incluem outras PTKs que se autofosforilam, como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*), o fator de crescimento de hepatócitos (HGFR, do inglês *Hepatocyte Growth Factor Receptor*) e o próprio receptor de insulina, como observado em mamíferos (XU; FISHER, 2012). Por este motivo, o papel que a PTP exerce sobre o metabolismo energético começou a ser investigado em mamíferos, já que a PTP LAR também se concentra em tecidos com alta sensibilidade a insulina. Demonstrou-se que a ativação da PTP LAR era capaz de reduzir não apenas a fosforilação do receptor de insulina, mas também de seu substrato, IRS. Além disso, observou-se que a desfosforilação também ocorria nas vesículas que reciclavam os IR, uma vez que translocavam junto a PTP. Por fim, a interação física entre IR e a fosfatase foi comprovada a partir de abordagens de

imunoprecipitação, reforçando o potencial da PTP LAR como um regulador negativo da via (AHMAD; GOLDSTEIN, 1997).

Mais tarde, outros experimentos exploraram a relação entre a PTP LAR, o IR e o metabolismo energético mais detalhadamente. Camundongos transgênicos que não expressavam a PTP LAR apresentavam menor produção de insulina no jejum e tendências de aumento de fosforilação no IR e no IRS, o que seria esperado para ausência de um regulador negativo do receptor. No entanto, as evidências de que a administração de insulina não alterava a estocagem de glicose, ou produção de glicose hepática, além de acarretar em menor ativação da PI3K em relação aos animais controle, tornou incerto o papel da fosfatase como reguladora negativa da via (REN et al., 1998).

A fim de simplificar os experimentos a modelos mais objetivos de doença metabólica, camundongos superexpressando a PTP LAR no músculo esquelético foram desenvolvidos e seus estudos mostraram vários fenótipos de resistência à insulina, como hiperinsulinemia, diminuição na captação de glicose e síntese de glicogênio. Entretanto, não foram observadas alterações dos níveis de fosforilação de IR, ou IRS1, mas redução da fosforilação em IRS2, levando a concluir que a PTP LAR possui um papel na sinalização da via regulando a sinalização através da desfosforilação de IRS2 (ZABOLOTNY et al., 2001).

Em *Drosophila*, o papel da PTP LAR na regulação da via de insulina foi estudado para entender o processo proliferativo de células hematopoiéticas. Assim, observou-se que larvas incapazes de expressar a fosfatase apresentavam maior atividade da via de insulina, o que estava relacionado ao aumento da proliferação e diferenciação celular no nicho hematopoiético. No modelo, mostrou-se que o aumento na ativação da IRS induziu o aumento na produção de ROS, que é importante para ativação de vias proliferativas (KAUR et al., 2019).

De toda forma, a regulação que a PTP LAR exerce sobre a via de insulina em insetos foi observada pontualmente no contexto hematopoiético e não se sabe se a PTP é importante em outros contextos, nem se esta regulação se aplica a outros organismos, como o mosquito. Pensando no aperfeiçoamento de estratégias de combate vetorial e sabendo a importância que a via de insulina possui para estes animais, este trabalho tenta mostrar uma possível relação entre a PTP LAR do mosquito *A. aegypti* (AeLAR), a via de insulina e o metabolismo energético, bem como

a relevância desta sinalização no contexto da capacidade vetorial. Se esta PTP mantém seu papel como regulador negativo da via, espera-se que alterações em sua expressão aumente a atividade da via, alterando o metabolismo energético dos mosquitos, bem como o *fitness* dos insetos, trazendo assim novas evidências sobre a importância que a via de insulina possui para regulação de aspectos metabólicos e fisiológicos do mosquito que sejam relevantes no estudo da capacidade vetorial.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo estudar a relação de AeLAR com o metabolismo energético e a via de insulina no período previtelogênico, bem como seus efeitos na fisiologia do mosquito e nos eventos que sucedem o repasto sanguíneo.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar como a modulação calórica no período previtelogênico afeta a transcrição de AeLAR;
- Reduzir a expressão da PTP AeLAR após a emergência e avaliar no corpo gorduroso o impacto na resposta hormonal e sobre acúmulo de reservas energéticas;
- Mostrar no corpo gorduroso os efeitos do silenciamento na sinalização da via de insulina, avaliando no perfil de fosforilação da proteína AKT e o perfil transcricional dos genes de PEPCK (do inglês *Phosphoenolpyruvate Carboxykinase*);
- Avaliar o impacto do silenciamento na fisiologia do mosquito, observando: resistência ao jejum, locomoção, busca pelo hospedeiro vertebrado;
- Avaliar os efeitos do silenciamento nos eventos subsequentes ao repasto sanguíneo, como a produção e a viabilidade dos ovos postos.

3. Metodologia

3.1. Conduta ética

Todos os experimentos com animais foram conduzindo seguindo as diretrizes institucionais do comitê de cuidado e uso (Comitê de avaliação de uso de animais para pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro, CAUAP-UFRJ) e o guia do NIH para cuidado e uso de animais de laboratório (ISBN 0-309-05377-3). Os protocolos foram aprovados pelo CAUAP-UFRJ sob o registro IBQM067-05/16. O cuidado com os animais esteve a encargo dos técnicos responsáveis pelos coelhos.

3.2. Criação de mosquitos

A linhagem Liverpool black eye de *Aedes aegypti* foi mantida no insetário da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, sob o ciclo de 12h:12h luz:escuro a 28°C e umidade entre 60-80%. Larvas eram alimentadas com ração de cachorro (Pedigree adulto raças pequenas) e mosquitos adultos eram mantidos em gaiolas de plástico, dispondo de algodões embebidos em solução de sacarose 10% (açúcar cristal União) *ad libitum*. Para manutenção da colônia, a alimentação com sangue era administrada através da orelha de coelho por contato direto com a gaiolas.

3.3. Armazenamento, extração de RNA e análise por qPCR

Cabeça, corpo gorduroso, intestino médio e ovários de mosquitos foram triturados com auxílio de pistilos plásticos em tubos plásticos de 1,5 mL (*Eppendorf*) livres de RNase e DNase com reagente Trizol (*Life Technologies*) e, em seguida, armazenados a -80 °C para preservar o ácido nucleico até o início do processo de extração de RNA. Para mosquito total e cabeça utilizou-se uma quantidade de 500 uL de reagente e 300 uL para demais tecidos. Todas as centrifugações foram feitas a 14.000 x g por 10 minutos em centrífuga (*Thermo* - MEGAFUGE 40R) refrigerada a 4 °C.

Para iniciar o processo de extração, as amostras foram descongeladas e uma parte de clorofórmio (*Merck*) foi adicionada para cada 5 partes de Trizol. As amostras foram então gentilmente misturadas e ficaram em repouso até completa separação de fases. Em seguida, os tubos foram centrifugados e a fase aquosa das amostras transferida para novos tubos, que recebeu mesmo volume de isopropanol (*Merck*). Os tubos foram gentilmente agitados para garantir a homogeneidade e a solução foi

novamente centrifugada.

Ao fim da centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ao ácido nucleico precipitado no fundo do tubo foi adicionado uma solução 70% de etanol (*Merck*) e o tubo foi novamente centrifugado. O etanol foi descartado e substituído por etanol absoluto (*Merck*) para nova centrifugação. Ao final, as amostras foram deixadas para secar a temperatura ambiente e o ácido nucleico seco foi ressuspendido em água MiliQ autoclavada.

A concentração de RNA das amostras foi inferida em nanoDrop-3300 (*Thermo Scientific*) e 1 µg de RNA foi tratado com DNase I (*Fermentas*), segundo a recomendação do fabricante. Após o tratamento, as amostras foram utilizadas como molde para síntese de cDNA com kit cDNA High Capacity cDNA Reverse Transcription (*Applied Biosystems*), também seguindo as instruções do fabricante. As amostras de cDNA sintetizadas foram armazenadas a -20 °C até o uso.

As análises de qPCR utilizando as amostras de cDNA foram feitas no equipamento StepOnePlus Real Time PCR (*Applied Biosystems*) utilizando o kit Hot FIREPol Evagreen qPCR Mix Plus (*Solis Biodyne*) utilizando a rotina: 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos e 60 °C por 1 minuto, acrescido de uma etapa de desnaturação. Os iniciadores dos genes que foram amplificados pela reação de qPCR estão dispostos no **Tabela 1**, tendo como genes de controle os Fatores de Iniciação Eucarióticos (eIF, do inglês *Eukaryotic Initiation Factor*) 1a e 3j.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos respectivos genes.

Gene	Sequência 5' -> 3'
AAEL005284 (AeLAR)	F: GTA ACT ATA TGG TGC AAA CC
	R: GAT TGT GGA GAC TTC TAG C
AAEL001919 (PTP1B)	F: GGC GAA GAG CAC AAA TTG
	R: ATC GGA ACG TCC TTT TGC
AAEL008528 (CSW)	F: GGT CCA ATT TGT GTC CAC
	R: ATC TCG CAG TCC AGA CC
AAEL000937 (ILP2)	F: TCAAACAGGACCTGGACGAG
	R: GCGACGATAGGACTCCACTG
AAEL008126 (FAS2)	F: GGATCGGTGATCGCTGTGG
	R: TCGAAAGCAGGTGCCTTAGG
AAEL004378 (eIF1a)	F: GGTGTCAAGCGATTGTGTCA
	R: AAGCCGATGAGGATGATGTC
AAEL012279	F: GGACGAGCTTGAGGAGAAAA

(eIF3j)	R: CGCTCAGCTTCTTCTTGCTT
AAEL000080 (PEPCK_C)	F: CCCAAGTCGCAAAACGTGATCC
	R: GATGGTGCCTTGGGCCTGTAGAG
AAEL000025) (PEPCK_M)	F: TTCCGTAGCGGACAACCAAATCC
	R: AGCGTGAAGAGTATTAATCAGGGTAGCA
AAEL011967 (CRY2)	F: ACTTGCCGGTGCTGAAGAACT
	R: CGATGATACACTTGGCCGTGCG
AAEL002049 (CYC)	F: CCGACCAGGAGCTGAAAATG
	R: GACCTAGCAAATCACCCCTGTG
AAEL022593 (CLCK)	F: ACGCAGCATAGTTCAAATC
	R: CATCATCTGCTGCTGGAGTA
AAEL019461 (TIM)	F: ATCGAACAACTTTGGGAGC
	R: CGATCCCGTAAAACCTGTATG
AAEL008141 (PER)	F: CGTTGAAAAGTCTCAATCAACCT
	R: GCTGAGTGAAAGCTTCGCCG

3.4. Síntese, verificação da concentração e injeção da dupla fita de RNA (dsRNA) dos genes LacZ e AeLAR

Inicialmente, dispondo dos iniciadores descritos na **Tabela 2**, os moldes para síntese dos dsRNAs referentes aos genes AeLAR e LacZ acrescidos de sequência T7 foram sintetizados utilizando, ou o cDNA produzido anteriormente, ou o vetor II-TOPO contendo o gene LacZ, respectivamente. Para tal, utilizou-se o reagente Master Mix (Fermentas) na rotina de 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95° por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto e finalmente 72 °C por 10 minutos.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores usados para síntese de dsRNA. Sequência de iniciadores F (Forward) e R (Reverse) dos genes indicados, contendo a porção T7 para síntese do dsRNA.

Gene	Sequência 5' -> 3'
AAEL005284 com T7	F: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AGG TGG CTG CCT TGA CT
	R: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GGG TCT GGA ATC TTA CAA CG
LacZ com T7	F: GTA AAACGA CGG CCA GT
	R: CTC GAG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AGG AAA CAG CTA TGA C
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG

Uma vez sintetizados, oito microlitros do molde foram incubados no kit de síntese de dsRNA MEGAscript RNAi kit (Ambion) segundo especificação do fabricante por 16h a 37 °C. Após a síntese, o produto dsRNA foi precipitado com 2 Volumes de Isopropanol (Merck) e 0,3 Volumes de Acetato de Sódio 3 M pH 4,2 e deixado a -80 °C por 10 minutos. Em seguida, o precipitado foi centrifugado a 14.000 G por 10 minutos, o sobrenadante descartado e ao precipitado adicionou-se 500 uL de etanol 70% (Merck) para nova centrifugação nas mesmas condições. Uma vez mais o sobrenadante foi descartado e o precipitado novamente centrifugado em 500 uL de etanol absoluto. Depois que o sobrenadante foi descartado pela última vez, o precipitado foi ressuspendido em 15 uL de água MiliQ autoclavada.

Para averiguar a concentração, um microlitro das soluções de dsRNAs dsLacZ e dsAeLAR foram diluídos 600 vezes e 5 uL do diluído aplicados em gel de agarose (Invitrogen) 2,5% para eletroforese em cuba Bio-Rad a 70 V e 400 mA por 1h 20 minutos em tampão TAE (do inglês, *Tris-Acetate-EDTA*). As bandas resultantes, juntamente as bandas de concentração conhecida do peso molecular GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) foram avaliadas no programa ImageJ. As densitometrias das bandas de concentração conhecida foram utilizadas como curva padrão para estimar a concentração das bandas de dsRNA a partir da comparação de densitometrias. Após ajuste, quando necessário, as soluções foram mantidas a -20 °C até o uso.

Para injeção foram utilizados mosquitos que emergiram em um período de até 5h. Os mosquitos foram mantidos em gelo para adormecer e com auxílio de estereoscópio duas injeções de 69 nL foram feitas no tórax de mosquitos fêmeas com microinjetor Nanoject II (Drummond Scientific). Os mosquitos injetados foram mantidos no insetário em gaiolas de plástico, dispondo apenas de sacarose até o momento que foram necessários aos experimentos. Em todas as gaiolas havia 1 macho para cada 5 fêmeas injetadas. Quando necessário, os machos foram removidos do convívio com as fêmeas.

3.5. *Western Blotting* para determinação do perfil de fosforilação de AKT

O corpo gorduroso de mosquitos com 3 e 5 dias após a injeção foi dissecado e armazenado em tubos 1,5 mL do tipo Eppendorf, segundo o respectivo tipo de

injeção. Cada tubo recebeu 2,5 µL de tampão homogenato (Tris-HCl 20 mM frio de pH 7,4, Triton X-100 0,1% e Cloreto de Sódio 200 mM, complementado com PAO (Óxido de Fenilarsina, do inglês *Phenylarsine Oxide*) 1 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, PMSF 1mM, Ortovanadato de Sódio 1 mM, Fluoreto de Sódio 10 mM, azida sódica 0,2 mg/ml e coquetel inibidor de proteases P 8340 Sigma) por tecido e o conteúdo foi triturado com auxílio de pistilo plástico. O homogeneizado foi armazenado a -20 °C até o momento da extração.

Para extração, o material congelado foi descongelado, mantido em banho sonificador (USC 700 unique) por 10 minutos e inicialmente centrifugado a 6.000 x g. O sobrenadante foi coletado e reservado em gelo, enquanto os restos de tecido foram centrifugados novamente a 14000 x g por 10 minutos, a fim de recuperar amostra retida no tecido. Os sobrenadantes foram unificados e a concentração proteica estimada pela técnica de LOWRY et al., (1951), comparando as absorbâncias das respectivas amostras às da curva padrão de BSA (Sigma) a partir de leitura em espectrofotômetro (Spectramax M3) no comprimento de onda de 660 nm.

Cerca de 40 µg de proteínas foram aliquoteados e misturados com tampão de lise (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 2% SDS, 0.01% azul de bromofenol e 5% 2-mercaptoetanol) e aquecidos em banho seco (Labnet Accublock) por 10 minutos a 99°C. O material foi aplicado em gel de Acrilamida e Bis-Acrilamida 10% com SDS (0,75 mm) para eletroforese (Laemmli, 1970). Ao final da eletroforese o gel foi deixado para repousar em tampão de transferência (Glicina 39 mM e Tris 48 mM) a 4 °C por 30 minutos e uma membrana de PVDF (Amersham) ativada em Metanol (Merck) e também foi deixada em tampão de transferência por 15 minutos em orbital (Gosharker SK180 pro) a temperatura ambiente. Ao final da incubação as proteínas do gel foram transferidas para membranas PVDF em rotina semi-seca usando o equipamento Trans-Blot (Bio-Rad) a 10 V, 400 mA e 33 minutos.

Ao final da transferência, a membrana foi mantida em tampão de bloqueio TBS-T (do inglês, *Tris-buffered saline - Tween 20* 0,1%) com albumina 5% por 5 horas a 4 °C sob agitação constante. Em seguida, a membrana foi incubada com solução de bloqueio contendo anticorpo IgG policlonal de coelho anti-fosfoAKT (Serina 505, Cell Signaling) na diluição 1:1000, ou IgG policlonal anti-AKT pan (Cell Signaling) na diluição 1:1000, ambos por 16 h a 4 °C sob agitação constante. Ao final, lavou-se a membrana 3 vezes com TBS-T por 5 minutos e incubou-se a membrana com

anticorpo IgG monoclonal de bode anti-IgG de Coelho conjugado a *horseradish* peroxidase (Cell Signaling), na diluição 1:10000, por 2 horas. Depois de três lavagens com TBS-T por 5 minutos e outras três lavagens com TBS por 5 minutos, a membrana foi incubada com a solução de revelação do kit de quimiluminescência (Milipore) por 1 minuto e revelada em escâner C-Digit.

Após a revelação, a membrana foi lavada 2 vezes em NaOH 0,1 M por 5 minutos, então a solução foi removida e as membranas lavadas com água destilada uma vez e outras três vezes com TBS-T por 5 minutos. Em seguida, as membranas são incubadas com anticorpo IgG monoclonal anti-alfaTubulina (Sigma) na diluição 1:1000 em TBST albumina 5% por duas horas em temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens com TBS-T por 5 minutos e nova incubação com IgG de bode anti-IgG de camundongo conjugado a *horseradish* peroxidase (*GE-Healthcare*), diluído 5000 vezes, por uma hora. Então, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T por 5 minutos e outras 3 vezes com TBS, também por 5 minutos, e novamente a membrana foi incubada com a solução de revelação do kit de quimiluminescência por 1 minuto e revelada em escâner C-Digit.

3.6. Quantificação de Glicogênio

Para dosagem de glicogênio, os respectivos homogenatos extraídos do corpo gorduroso foram incubados em placa de 96 poços com tampão contendo, ou não, 1 unidade de α -amylglucosidase (Sigma Chemicals) por 4 horas a 40 °C. A quantidade de glicose livre em todos os poços foi avaliada utilizando kit de glicose oxidada (Labtest Ref.133). A reação de oxidação da glicose foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 510 nm. Os valores de glicose livre gerados nos poços que foram incubadas, ou não, com a enzima foram subtraídos para determinar os valores de glicogênio das amostras e estes valores comparados a curva padrão de glicogênio. As concentrações de glicogênio das amostras foram normalizadas pela quantidade de proteína por microlitro de cada amostra.

3.7. Quantificação de Triacilglicerol

O homogenato do corpo gorduroso também foi usado para quantificar triacilglicerol utilizando o kit Triglicérides 120 (Doles), utilizando placa de 96 poços, onde o extrato foi deixado reagindo segundo as recomendações do fabricante a 37 °C por 10 minutos. A reação foi lida em espectrofotômetro a 510 nm e os valores absolutos de triacilglicerol foram obtidos a partir da comparação com uma curva padrão de reagente solução padrão presente no kit. As concentrações de triacilglicerol foram então normalizadas pela concentração de proteína por microlitro de cada amostra.

3.8. Ensaio de tolerância ao Jejum

Grupos de aproximadamente 25 fêmeas injetadas com dsLacZ ou dsAeLAR foram mantidas com os machos nas condições do insetário por 5 dias após a injeção dispondo de sacarose 10% *ad libitum*. No quinto dia, a sacarose foi substituída por água e quaisquer mosquitos mortos foram removidos das gaiolas. Deste momento em diante, as fêmeas mortas foram removidas diariamente até o que não houvesse mais mosquitos vivos.

3.9. Determinação da atividade locomotora e circadiana

Após injeção com dsLacZ ou dsAeLAR, os mosquitos descansaram no insetário da UFRJ por aproximadamente 24h, para então serem levados à FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). Os mosquitos foram anestesiados em gelo e individualmente introduzidos em tubos cilíndricos (25 x 150 mm) dispondo em uma das extremidades um chumaço de algodão embebido em sacarose, a fonte de alimento durante toda duração do experimento. Os tubos foram introduzidos em monitores de atividade com sensores infravermelho (Trikinetics LAM25, Waltham, MA, USA) e vedados com protetores emborrachados. Os monitores foram mantidos em sala com regime 12:12 h luz:escuro com luz entre 7:30 e 19:29, a 28°C. Durante os experimentos, todas as vezes que o inseto cruzou o sensor infravermelho uma unidade de movimento foi computada. A atividade diária foi registrada a cada 5

minutos utilizando o DAMSystem3 software (www.trikinetics.com) e os dados foram analisados como descrito em ARARIPE et al., 2018

3.10. Ensaio de busca por hospedeiro vertebrado

O ensaio de busca de hospedeiro vertebrado foi adaptado de DE CARVALHO et al., 2021. Brevemente, dez mosquitos fêmeas, injetadas com dsLacZ, ou dsAeLAR eram sugados de dentro das respectivas gaiolas e transferidas para uma gaiola de acrílico, de dimensões 16 x 16 x 16 cm, coberta por um pedaço de tecido de tela. A gaiola possui uma divisória que compartimentaliza cada grupo em metade do volume da gaiola. Após 15 minutos de aclimação, o comportamento dos mosquitos de pouso na tela foi gravado por 5 minutos com uma câmera Cyber Shot. Em seguida, o braço direito de um voluntário humano foi disponibilizado sobre a tela a uma distância de aproximadamente 2 cm, para evitar o contato entre os mosquitos e os voluntários. O comportamento de pouso dos mosquitos também foi gravado por 5 minutos.

Todo o processo foi feito no insetário entre 16:00h e 18:00h. Os mosquitos foram testados 3, 4 e 5 dias após injeção e o experimento repetido com três voluntários diferentes (dois homens e uma mulher entre 20 e 30 anos). O braço dos voluntários foi isolado com isopor para evitar a chegada de possíveis interferências externas. Os pousos foram contados manualmente a partir da visualização dos vídeos, pausando a cada segundo, e o número absoluto de pousos em cada experimento, na ausência e na presença do braço, foi registrado.

3.11. Ensaio de alimentação com sangue, digestão, oviposição e viabilidade dos ovos

Três dias após a injeção, as gaiolas contendo os mosquitos injetados com dsLacZ e dsAeLar foram expostas a uma das orelhas do coelho ao mesmo tempo por 30 minutos, observando a alimentação das fêmeas. Os mosquitos não foram deixados em jejum. Após a alimentação, os mosquitos foram imediatamente anestesiados em gelo e aqueles que conseguiram se alimentar, independentemente da quantidade, foram contados e a proporção entre alimentados e número de mosquitos total foi feita.

Neste processo, os mosquitos não engorgitados são removidos e os intestinos de seis mosquitos totalmente engorgitados foram dissecados intactos e, dois a dois, os intestinos foram armazenados em tubos de 1,5 mL tipo Eppendorf e homogeneizados em 20 uL de tampão homogenato por tecido com auxílio de pistilo plástico e finalmente armazenados a -20°C. Os mosquitos restantes foram devolvidos ao insetário e passado 24h após a alimentação outros seis intestinos de mosquitos foram dissecados e homogeneizados como descrito anteriormente.

Os intestinos homogeneizados foram descongelados, sonicados por 10 minutos, centrifugados a 6000 G por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado para dosagem de proteína pelo método de LOWRY et al. (1951), lido a 660 nm em espectrofotômetro, e os dados de absorbância comparados com os da curva padrão de BSA para estimar a quantidade de sangue ingerido e restante, após as 24h de digestão.

Os mosquitos restantes foram mantidos no insetário nas respectivas gaiolas por mais 72h com sacarose 10% para completar o ciclo gonotrófico, quando foram individualmente alocados em copos de papel de 450 mL contendo algodão embebido em sacarose 10% e um copo de plástico de 50 ml com água destilada e um pedaço de papel de filtro, visando a oviposição dos mosquitos, onde foram mantidos por 48h. Ao final deste tempo, os ovos postos foram contados e as fêmeas tiveram seus ovários dissecados para avaliar a possível presença de ovariolos em seus úteros.

Os ovos ovipostos foram deixados para secar por 72-96h nas condições do insetário, para garantir a embriogênese completa. Quando secaram, pedaços do papel de filtro contendo 30 ovos foram postos individualmente em uma solução de 0,3% de extrato de levedura (Sigma) por 24h para que eclodissem. O número de larvas presentes na solução foi contado e o sucesso de eclosão representado percentualmente em relação ao número total de ovos presentes e os dados comparados entre os grupos dsLacZ e dsAeLar.

3.12. Análise estatística

Os experimentos foram repetidos, pelo menos, em triplicata biológica com duplicata técnica. Os gráficos mostram as médias dos dados com os respectivos erros padrão. Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 7.00 (www.graphpad.com) através dos testes t-student e 2way ANOVA, quando aplicável.

4. Resultados

4.1. Efeito da modulação calórica sobre a PTP AeLAR no período previtelogênico

Mosquitos adultos foram coletados nas primeiras 5h de vida e separados em dois grupos, um deles mantido a dieta controle de sacarose (10%) e o outro mantido sob restrição calórica (1%). Os mosquitos foram submetidos a esta condição durante os três dias que se seguiram após a emergência e, ao final, o corpo gorduroso de fêmeas de cada grupo foi coletado para comparar a transcrição da AeLAR em cada regime. Incluiu-se a análise transcricional das duas outras principais PTPs reguladoras da via de insulina, PTP1B e CSW (TSOU; BENCE, 2013), para avaliar comparativamente se há impactos diferentes entre os genes destas proteínas tirosina fosfatase, e do gene de ILP2, uma das insulinas reguladas pelo principal hormônio regulador deste período, o JH (LING; RAIKHEL, 2021). Como é possível observar na **Figura 17**, a restrição calórica não altera a expressão das fosfatases PTP1B e CSW, mas reprime a expressão da PTP AeLAR e induz aumento na expressão da ILP2.

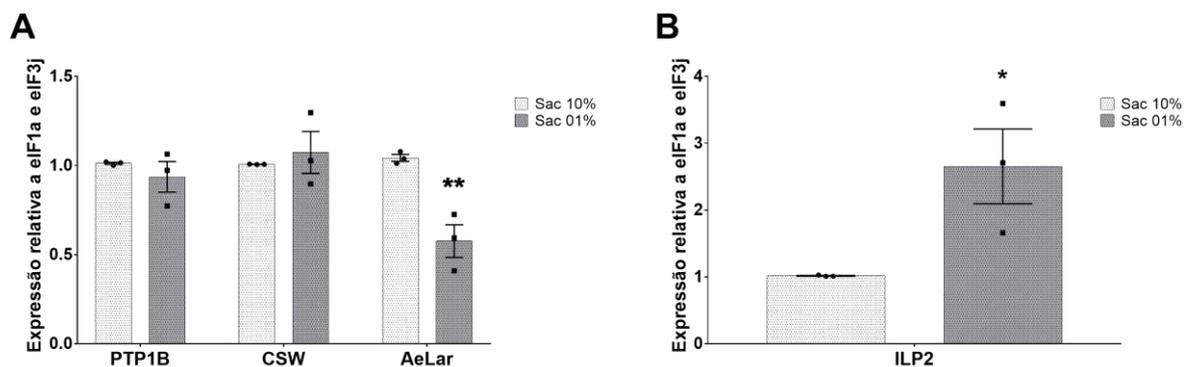


Figura 17. Transcrição relativa de genes de PTPs e ILP2 no corpo gorduroso de fêmeas adultas em regime de restrição calórica 3 dias após a emergência. A figura (A) apresenta a transcrição dos genes de PTP1B, CSW, AeLAR em dieta de sacarose 1% em relação a expressão de genes em mosquitos mantidos em dieta de sacarose 10%. (B) Transcrição relativa de ILP2 em mosquitos mantidos em dieta de sacarose 1% em relação a expressão de genes em mosquitos mantidos em dieta de sacarose 10%. Os dados foram submetidos a comparações de teste t-student. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. $N = 3$. Média \pm SEM.

4.2. Avaliação dos efeitos do silenciamento gênico da PTP AeLAR no metabolismo energético e na via de insulina durante o período previtelogênico

Inicialmente, tendo observado que os níveis transcricionais da PTP AeLAR e do gene ILP2 se alteraram inversamente mediante o estresse nutricional, avaliou-se a existência da possível relação regulatória da PTP para com o ILP2. Como resultado, observou-se que o silenciamento induziu a transcrição de ILP2 no corpo gorduroso 3 dpi (**Figuras 18A e 18B**), similar ao observado anteriormente na condição de estresse nutricional. Estendeu-se a análise até o quinto dia após a injeção, quando observou-se que o gene de ILP2 já não estava mais diferencialmente transcrito, mesmo que o silenciamento tenha perdurado (**Figuras 18A e 18B**).

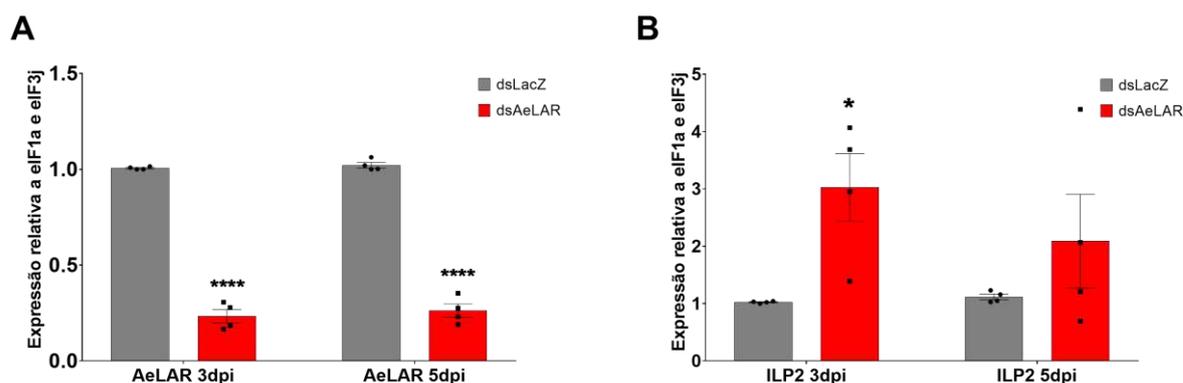


Figura 18. Avaliação da transcrição dos genes AeLAR e ILP2 no corpo gorduroso de fêmeas adultas em dieta de sacarose 10%. As figuras (A) e (B) apresentam os efeitos na transcrição de AeLAR e ILP2 após 3 e 5 dias de injeção da dupla fita de RNA (dsRNA) para AeLAR (dsAeLAR), em relação transcrição nos grupos injetados com dsLacZ, respectivamente.. Os dados foram submetidos a comparações de teste t-student. **** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$. N = 4. Média \pm SEM.

Novamente analisou-se a expressão dos genes das outras fosfatases, também dentro da janela de observação mais longa. Como mostra a **Figura 19**, de fato existe um efeito do silenciamento da AeLAR sobre as PTP1B e CSW, onde a PTP1B se encontra mais reprimida 3 dpi (**Figura 19A**), enquanto no quinto dia ambas aparecem reprimidas (**Figura 19A e 19B**).

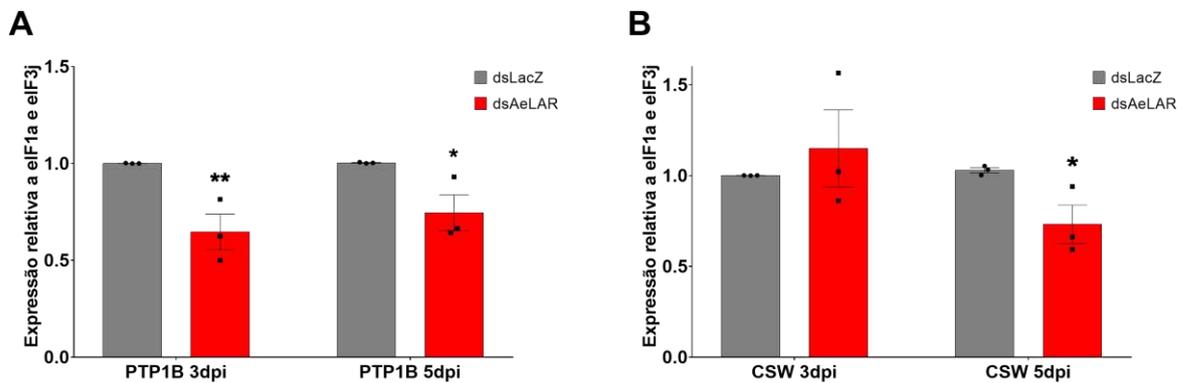


Figura 19. Avaliação da transcrição dos genes de PTP1B e CSW no corpo gorduroso de fêmeas adultas em dieta de sacarose 10%. As figuras (A) e (B) apresentam os efeitos na transcrição de PTP1B e CSW após 3 e 5 dias de injeção de dsAeLAR, em relação transcrição nos grupos injetados com dsLacZ, respectivamente. Os dados foram submetidos a comparações de teste t-student. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. $N = 4$. Média \pm SEM.

Para avaliar o efeito do silenciamento sobre a via de insulina, os mosquitos silenciados tiveram o perfil de fosforilação da cinase AKT/PKB, bem como o perfil transcricional das PEPCK citoplasmática (PEPCK_C) e mitocondrial (PEPCK_M) avaliados no corpo gorduroso, três e cinco dias após a injeção. No terceiro dia após a injeção, quando a transcrição das fosfatases AeLAR e PTP1B encontra-se reprimida, a AKT se mostra mais fosforilada, quando comparada ao grupo dsLacZ (**Figuras 20A e 20B**). De maneira antagônica ao esperado, PEPCK_C aparece mais expressa em relação ao grupo controle (**Figuras 20E e 20G**), tal qual a PEPCK_M (**Figuras 20F e 20H**). No quinto dia, a fosforilação de AKT no grupo silenciado se tornara equivalente ao grupo controle (**Figuras 20C e 20D**), enquanto PEPCK_C e PEPCK_M já não estão diferencialmente mais transcritos em relação ao grupo controle (**Figuras 20E até 20H**).

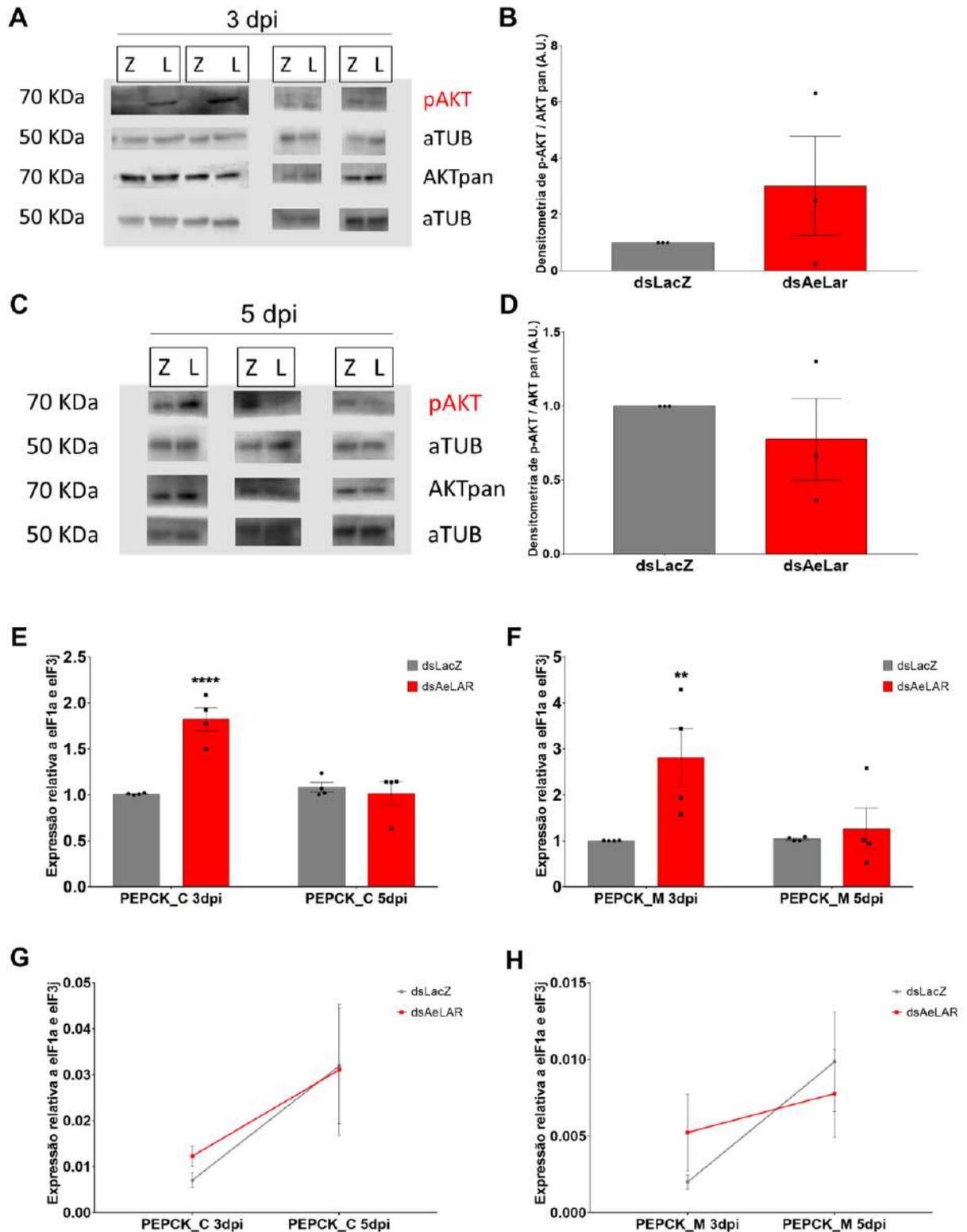


Figura 20. Avaliação dos efeitos moleculares e bioquímicos do silenciamento de AeLAR na expressão de AKT fosforilada e na transcrição de PEPCK no corpo gorduroso de fêmeas adultas em dieta de sacarose 10%. A Figura (A) representa o Western Blotting de AKT fosforilada (pAKT) com respectiva tubulina (aTUB) e AKT total (AKTpan) com a respectiva tubulina, três dias após a injeção de dsLacZ (Z) e dsAeLAR (L). (B) Análise da relação de densitometria de pAKT e AKTpan dos grupos injetados com dsAeLAR em relação aos respectivos grupos injetados com dsLacZ referente a figura (E). (C) Western Blotting de AKT fosforilada (pAKT) com respectiva tubulina (aTUB) e AKT total (AKTpan) com a respectiva tubulina, cinco dias após a injeção de dsLacZ (Z) e dsAeLAR (L). (D) Análise

da relação de densitometria de pAKT e AKTpan dos grupos injetados com dsAeLAR em relação aos respectivos grupos injetados com dsLacZ referente a figura (G). Os valores em kDa nas figuras (A) e (C) indicam o peso aproximado referente a cada proteína revelada. pAKT e AKTpan foram revelados em membranas separadas e, para cada, há a tubulina revelada na respectiva membrana. A análise das figuras (B) e (D) corresponde a normalização da densitometria da pAKT ou AKTpan pela densitometria da respectiva tubulina e, em seguida, a densitometria normalizada de pAKT foi dividida pela densitometria normalizada de AKTpan. As figuras (A) e (B) apresentam os efeitos na transcrição de PEPCK_C e PEPCK_M após 3 e 5 dias de injeção de dsAeLAR, em relação transcrição nos grupos injetados com dsLacZ, respectivamente. (C) e (D) representam a transcrição total dos genes PEPCK_C e PEPCK_M no terceiro e quinto dia após as injeções de dsAeLAR e dsLacZ. Os dados foram submetidos a comparações de teste t-student. **** p < 0.0001; ** p < 0.01. As figuras de qPCR são resultado da análise de 4 experimentos independentes. As figuras de densitometria de Western Blotting são resultado da análise de 3 experimentos independentes. Média ± SEM.

Concomitante, ao avaliar-se os níveis de glicogênio e Triacilglicerol (TAG) 3 e 5 dpi, como pode ser visto na **Figura 21**, observou-se que no terceiro dia as concentrações de glicogênio e TAG permanecem inalteradas (**Figuras 21A e 21B**), enquanto no quinto dia a concentração de glicogênio do grupo injetado com dsAeLAR é maior, não apenas em relação ao terceiro dia, mas também em relação ao grupo controle no quinto dia (**Figura 21A e S1**). No quinto dia, as concentrações de TAG permanecem inalteradas entre os grupos injetados, mas houve aumento nas concentrações de TAG observadas entre 3 e 5 dpi no grupo controle (**Figura 21B**). Apesar de não ser estatístico, o grupo injetado com dsAeLAR segue a mesma tendência. Avaliou-se a transcrição do gene de Ácido Graxo Sintase 2 (FAS 2, do inglês *Fatty acid synthase 2*) para relacionar possíveis causas de ausência de mudanças das reservas de TAG entre os grupos, mas nos dois momentos observados a FAS2 encontrava-se aparentemente reprimida (**Figura S2**).

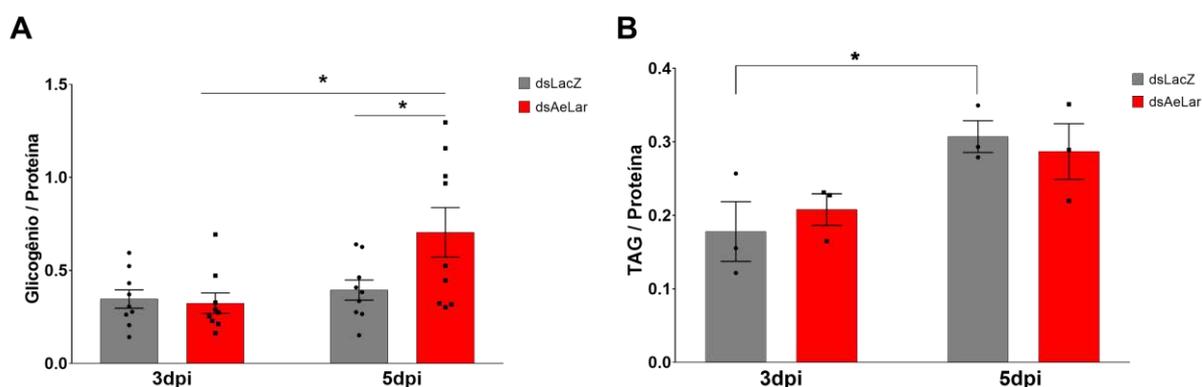


Figura 21. Efeito do silenciamento de AeLAR no acúmulo de Glicogênio e TAG no corpo gorduroso de fêmeas adultas alimentadas com sacarose 10%. (A) Concentrações totais de glicogênio normalizada pela proteína do tecido em grupos injetados com dsLacZ e dsAeLAR, três e cinco dias após a injeção (N = 9; 2way-ANOVA com pós-teste de Tukey). (B) Concentrações totais de TAG normalizada pela proteína do tecido em grupos injetados com dsLacZ e dsAeLAR, três e cinco

dias após a injeção (N = 3; teste 2way-ANOVA com pós-teste de Tukey). * p < 0.05. Média ± SEM.

Para entender melhor a natureza do acúmulo de glicogênio observado anteriormente, decidiu-se repetir a análise em mosquitos mantidos em dietas de restrição calórica. E como pode ser visto na **Figura 22**, o resultado anterior se repete quanto as reservas de glicogênio, enquanto as reservas de TAG não se mostraram alteradas, nem entre os injetados, ou entre o decorrer dos dias observados.

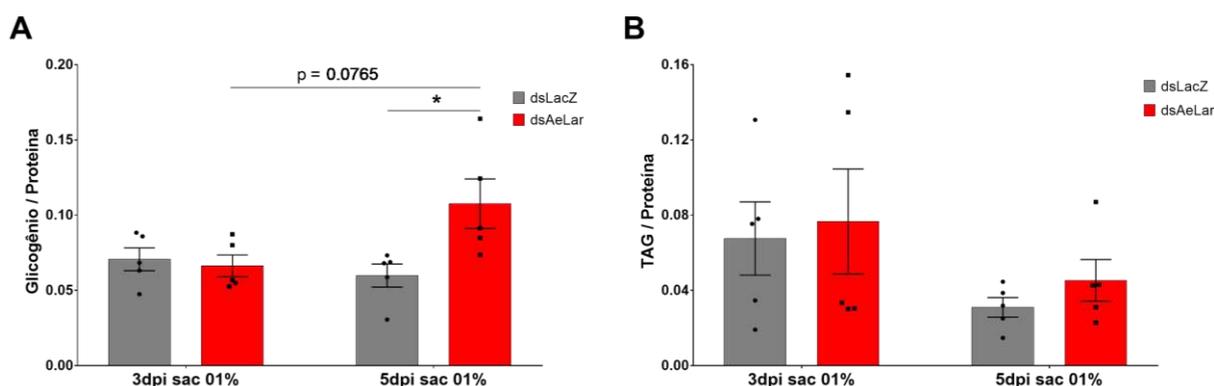


Figura 22. Efeito do silenciamento de AeLAR no acúmulo de Glicogênio e TAG no corpo gorduroso de fêmeas adultas alimentadas com sacarose 1%. (A) Concentrações totais de Glicogênio normalizada pela proteína do tecido em grupos injetados com dsLacZ e dsAeLAR, três e cinco dias após a injeção (teste 2way-ANOVA com pós-teste de Tukey). (B) Concentrações totais de TAG normalizada pela proteína do tecido em grupos injetados com dsLacZ e dsAeLAR, três e cinco dias após a injeção (teste 2way-ANOVA com pós-teste de Tukey). * p < 0.05. N = 5. Média ± SEM.

4.3. Efeito do silenciamento de AeLAR na fisiologia do mosquito e após a alimentação com sangue

Tendo em vista o acúmulo de reservas, decidiu-se iniciar a avaliação dos efeitos do silenciamento na fisiologia dos mosquitos analisando a sobrevivência em jejum. Assim, a partir do quinto dia os mosquitos foram mantidos apenas com água e a sobrevivência avaliada. A **Figura 23** mostra que ambos os grupos sobrevivem até 7 dias após a remoção da sacarose, porém, há significativamente mais mosquitos silenciados para a PTP AeLAR vivos no terceiro dia do início da restrição calórica que mosquitos controle indicando que o tempo médio de tolerância ao jejum dos mosquitos silenciados é maior

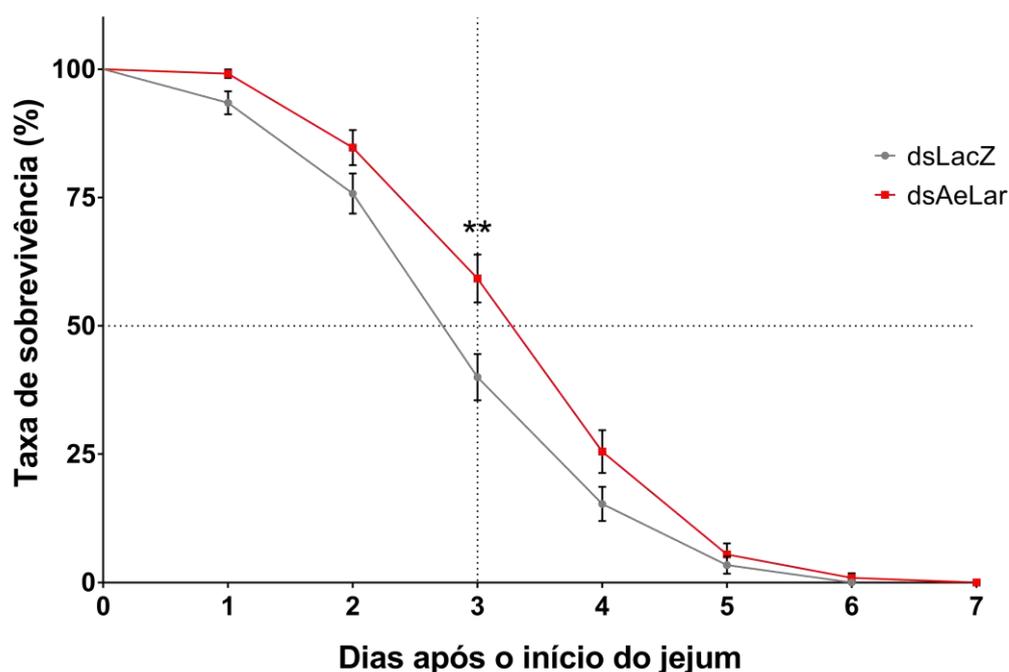


Figura 23. Avaliação de tolerância ao jejum em mosquitos a partir do quinto dia de silenciamento. A figura mostra o perfil de sobrevivência de mosquitos a partir do quinto dia de silenciamento. Os grupos foram mantidos com sacarose 10% durante este tempo, que foi então substituída por água. ** $p < 0.001$. Os dados foram submetidos a comparações de Log-rank (Mantel-Cox) e Gehan-Breslow-Wilcoxon. $N = 5$; dsLacZ = 118♀; dsAeLAR = 110♀. Média \pm SEM.

Em seguida, avaliou-se o deslocamento/voo destes mosquitos em um regime de 12h:12h de luz:escuro. A partir desta análise, observou-se que até o terceiro dia os mosquitos silenciados para a fosfatase possuem sua atividade de locomoção/voo diurna e no ponto de Zeitgeber Time (ZT) 12 (apagar de luzes) significativamente reduzidas, enquanto o resto atividade noturna é maior. A partir do quarto dia após a injeção, toda atividade torna-se menor nos animais silenciados, havendo ainda neste mesmo grupo uma estagnação momentânea da atividade diurna entre os dias 4 e 5 dpi (**Figuras 24 e S3B**). Também chama a atenção que, a partir do quinto dia de injeção, os mosquitos silenciados apresentam uma diferença de atividade pronunciada entre o ZT7 e ZT11, (**Figuras 24 e S3A**).

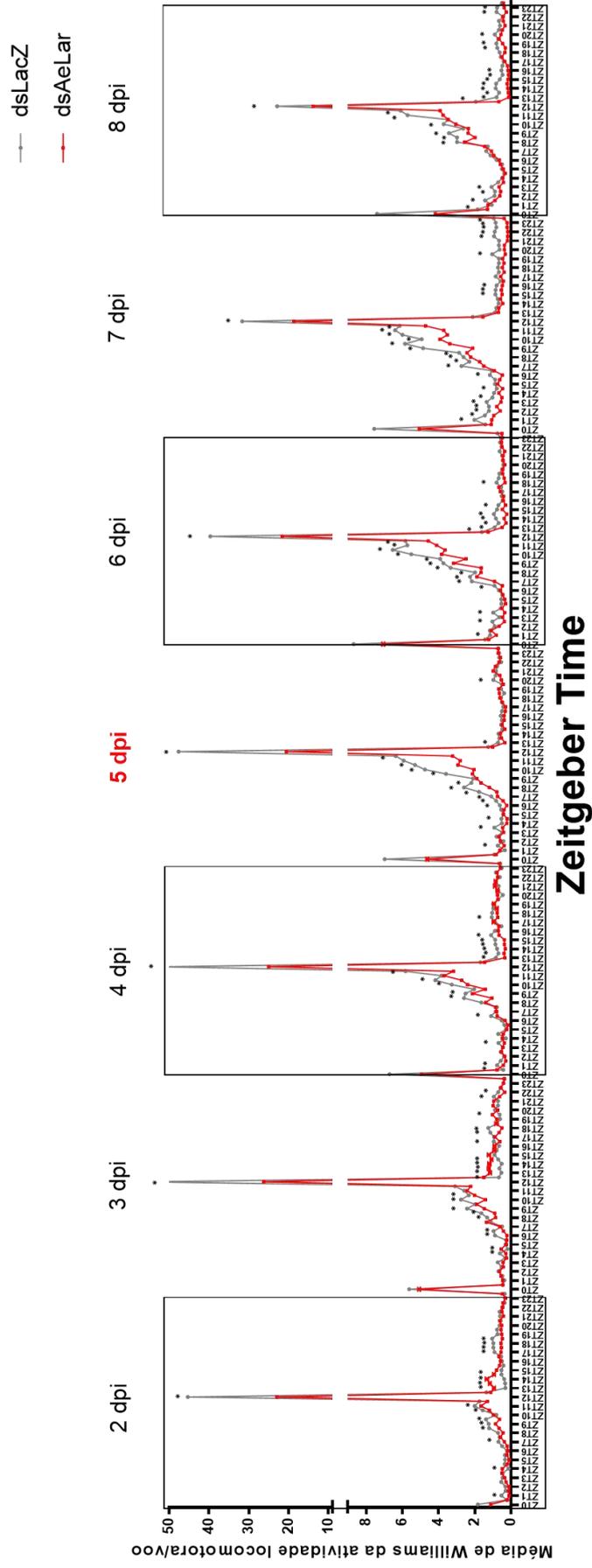


Figura 24. Perfil da atividade locomotora/voo dos mosquitos silenciados. Mosquitos silenciados tiveram sua atividade de locomoção/voo avaliada por 7 dias, iniciado no segundo dia após a injeção, para permitir a aclimação dos grupos. Os mosquitos foram mantidos em um regime de 12h:12h luz:escuro e cada ZT (Zeitgeber Time) indica 1h de tempo passado. Os pontos são as médias feitas para cada meia hora de experimento. Os ZTs 0-11 indicam as horas de luz e os ZTs 12-23 indicam as horas de escuro. Os mosquitos dispuseram de sacarose 10% durante todo o experimento. Cada marcação com * acima de um ponto indica que houve uma diferença estatística significativa entre as atividades dos grupos. As comparações foram submetidas ao teste 2way ANOVA com pós-teste de Sidak. N = 3; dsLacZ = 97; dsAeLAR = 96. Média \pm SEM.

Apesar das alterações locomotoras gerais, o fato de que a diferença observada entre ZT7 e o ZT11 e o aumento nas reservas de glicogênio ocorreram 5 dpi levantaram o questionamento de que os mosquitos silenciados estariam apresentando um comportamento hiperfágico, para suprir uma possível demanda de carboidratos aumentada, gerando então as alterações comportamentais observadas, por permanecerem no algodão embebido em sacarose. Para atacar este ponto, os mosquitos injetados foram novamente submetidos a análise comportamental, mas sob restrição calórica, estimulando assim a hiperfagia (DESHPANDE et al., 2014), a fim de comparar o padrão de comportamento dos grupos entre as dietas.

Inicialmente, como é possível observar nas **Figuras S3A e S4A**, o comportamento total dos grupos injetados e sob restrição calórica é bem menor, entretanto, como é possível observar nas **Figuras 25 e S4B**, o grupo silenciado apresenta um padrão comportamental diário completamente diferente sob restrição calórica, sugerindo que o silenciamento também afeta a atividade locomotora. Foram vistas atividades diurna e noturna maiores que a do grupo injetado com dsLacZ (2 dpi), ou maior atividade diurna e menor noturna (3 dpi), ou ainda menor atividade diurna e maior noturna (4 e 5 dpi) e finalmente menores atividades diurna e noturna (6 e 7 dpi) (**Figura S4**). Ainda assim, a partir do quarto dia após a injeção, a atividade entre o ZT10 e ZT12 começa a ficar pronunciadamente menor no grupo silenciado e se mantém até o final da observação, similar ao observado para os grupos sob dieta controle (**Figuras 24 e 25**).

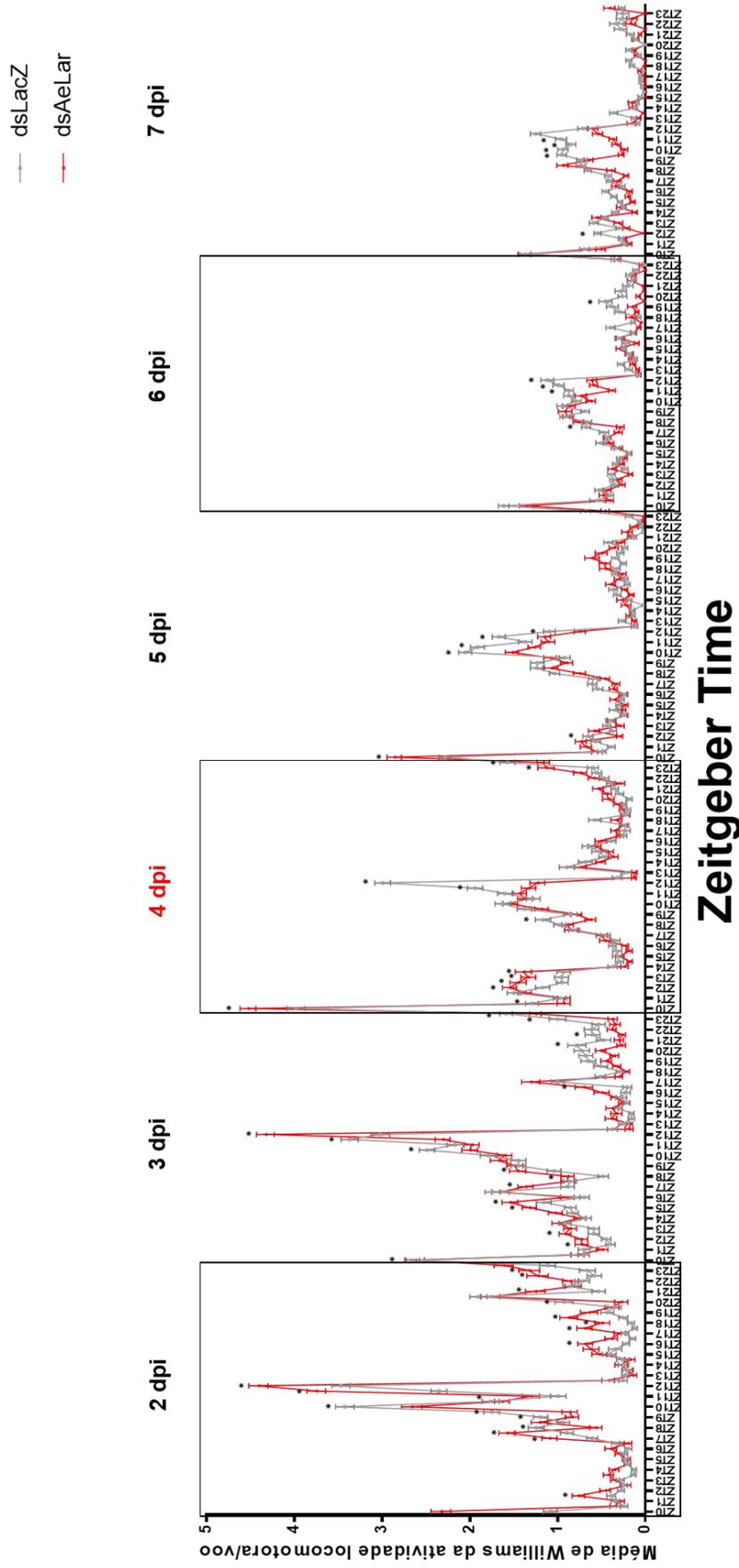


Figura 25. Perfil da atividade locomotora/voo dos mosquitos silenciados sob restrição calórica. Mosquitos silenciados tiveram sua atividade de locomoção/voo avaliada por 7 dias, iniciado no segundo dia após a injeção, para permitir a aclimação dos grupos. Os mosquitos foram mantidos em um regime de 12h:12h luz:escuro e cada ZT (Zeitgeber Time) indica 1h de tempo passado. Os pontos são as médias feitas para cada meia hora de experimento. Os ZTs 0-11 indicam as horas de luz e os ZTs 12-23 indicam as horas de escuro. Os mosquitos dispuseram de sacarose 1% durante todo o experimento. Cada marcação com * acima de um ponto indica que houve uma diferença estatística significativa entre as atividades dos grupos. As comparações foram submetidas ao teste 2way ANOVA com pós-teste de Sidak. N = 60. Média \pm SEM.

Esta alteração comportamental característica próxima ao ZT12, o momento que antecede o apagar de luzes, indica desregulação nos genes de relógio circadiano, o que também poderia afetar a atividade locomotora/voo (HARDIN, 2005). Assim, a transcrição dos genes circadianos foi investigada em mosquitos injetados, para determinar o possível efeito do silenciamento sobre os genes de relógio. E mesmo que a regulação circadiana esteja distribuída em diferentes regiões do corpo (HARDIN, 2005), uma vez que o foco estava na percepção de luz, avaliou-se apenas a cabeça dos mosquitos 5 dpi. Como mostra a **Figura 26**, dos 5 genes analisados, o silenciamento na cabeça reprime a transcrição de *cry2* e *cyc*.

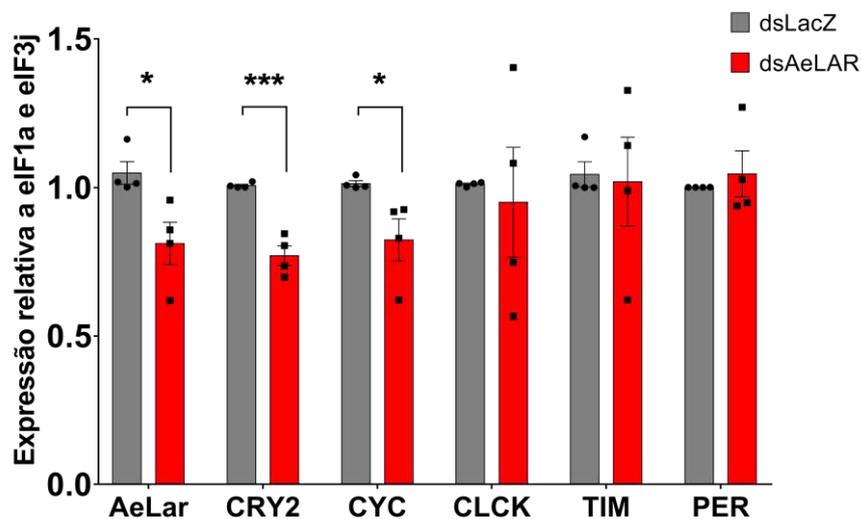


Figura 26. Transcrição relativa da PTP AeLAR e de genes circadianos na cabeça de mosquitos alimentados com sacarose 10% 5 dpi. O gráfico mostra a transcrição de AeLAR, CRY2 (*Cryptochrome 2*), CYC (*Cycle*), CLK (*Clock*), TIM (*Timeless*) e PER (*Period*) na cabeça de mosquitos injetados com dsAeLAR em relação a dos mosquitos injetados com dsLacZ. Os dados foram submetidos a comparações de teste t-student. * $p < 0.05$. N= 4. Média \pm SEM.

De toda forma, dado a alteração na locomoção/voo destes mosquitos, decidiu-se avaliar se o silenciamento da PTP AeLAR traria impacto significativo na procura do vetor pelo hospedeiro vertebrado. Para isso, nos dias três, quatro e cinco após a injeção, correspondentes a janela de tempo em que a alteração comportamental observada se consolida, comparou-se o número de voos que os mosquitos silenciados fizeram na ausência e na presença de voluntários humanos, sem que os mosquitos pudessem picá-los de fato, para avaliar se haveria prejuízos práticos decorrentes do silenciamento.

E como é possível observar na **Figura 27**, mesmo que nos dois grupos a atividade de voo na ausência e na presença do voluntário aumente durante os dias observados, a exposição a pista sensorial parece ser percebida de forma significativa apenas pelo grupo controle, já que este foi o único que apresentou aumento constante do número de voos em direção ao braço no tempo estipulado, quando comparado o número de voos durante o mesmo tempo, mas sem exposição do voluntário, durante a janela de dias observada.

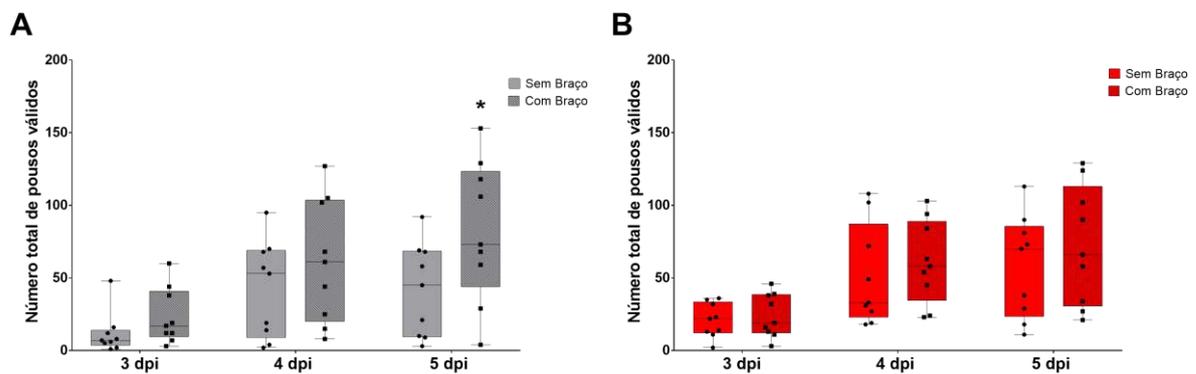


Figura 27. Ensaio de avidez em mosquitos entre 3 e 5 dpi. A figura mostra a contagem de todos os pousos dados em 5 minutos de observação pelo grupo de 10 fêmeas injetadas com dsLacZ (A), ou dsAeLAR (B), na ausência, ou presença do antebraço de um voluntário. Cada ponto representa o número total de voos em cada observação, no respectivo dia. O experimento foi conduzido do terceiro ao quinto dia após a injeção. **** $p < 0.0001$. Os dados foram submetidos ao teste 2way ANOVA com pós-teste de Sidak. $N = 9$. Média \pm SEM.

Para concluir a relação de análises feitas que avaliam alguns aspectos do *fitness* do mosquito relevantes a capacidade vetorial, decidiu-se investigar os possíveis impactos do silenciamento nos eventos relacionados ao período vitelogênico. No que diz respeito a alimentação com sangue, como é possível ver na **Figura 28A**, a proporção de fêmeas alimentadas tende a ser menor no grupo silenciado que no grupo controle. Das fêmeas alimentadas, observou-se a quantidade de sangue ingerido pelas fêmeas que se alimentaram completamente e digerido nas 24h pós-alimentação com sangue (PBM, do inglês *post-blood meal*) não foi diferente entre os grupos (**Figura 28B**), mesmo que o silenciamento tenha ocorrido no intestino (**Figura S5**). Entretanto, avaliando a oviposição, constatou-se que o grupo silenciado ovipôs menos que o grupo controle (**Figura 28C**), ainda que a taxa de eclosão avaliada tenha sido a mesma (**Figura 28D**)

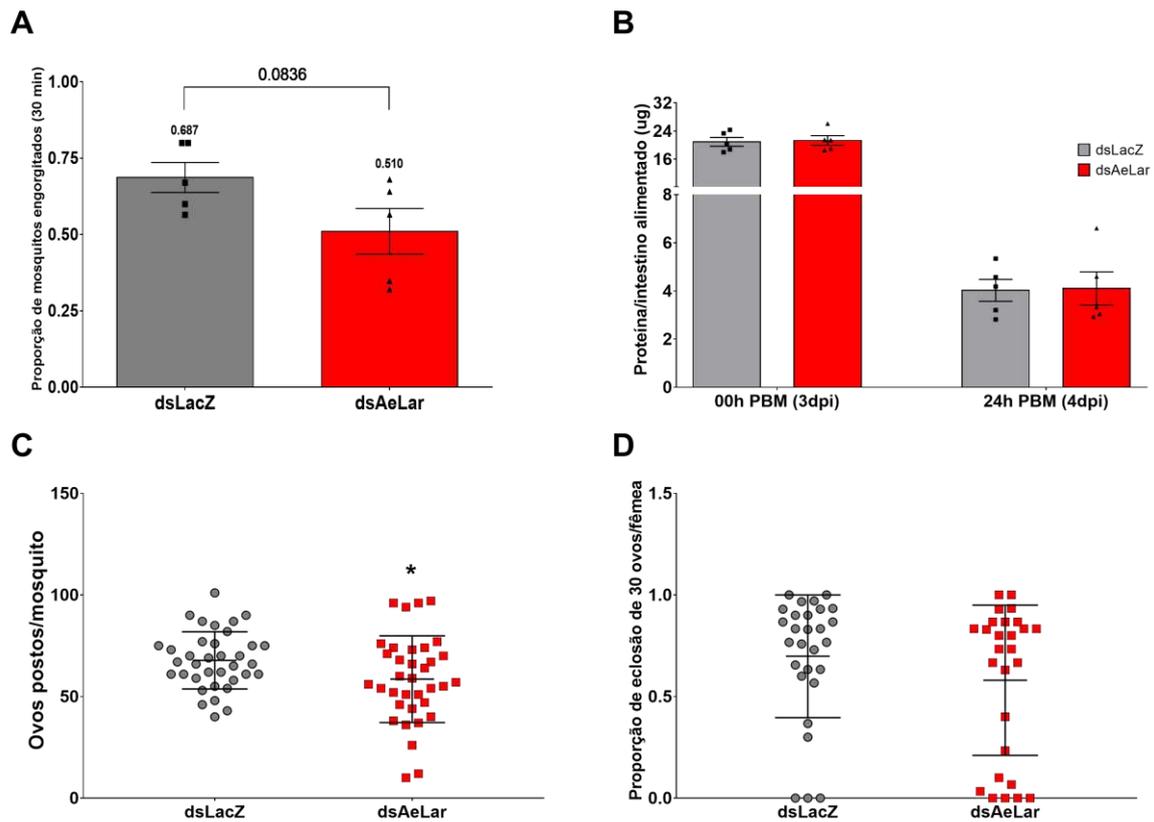


Figura 28. Avaliação do efeito do silenciamento de AeLAR no repasto sanguíneo, ingestão e digestão de sangue, oviposição e eclosão de ovos. (A) Figura mostra a proporção de fêmeas que se alimentaram com sangue em relação ao total das respectivas gaiolas injetadas com dsLacZ ou dsAeLAR em 30 minutos que lhes foram oferecidas concomitantemente a orelha de coelho 3 dpi (N=5; Média ± SEM). Média (B) Quantidades totais de Proteína no intestino de fêmeas totalmente alimentadas, que foram injetadas com dsAeLAR ou dsLacZ, imediatamente após a alimentação (00h PBM), ou 24h após a alimentação (24h PBM) (N = 5; Média ± SEM). (C) Quantidade de ovos postos por grupos de mosquitos injetados com dsLacZ ou dsAeLAR (6dpi) (N= 4; dsLacZ = 37♀; dsAeLAR = 36♀; Média ± SD). (D) Avaliação da proporção de eclosão de 30 ovos postos por cada fêmea injetada com dsLacZ ou dsAeLAR (9dpi) (N= 3; dsLacZ = 28♀; dsAeLAR = 27♀; Média ± SD). Até o momento da alimentação e após a alimentação, os mosquitos foram mantidos em regime de sacarose 10%. As comparações foram submetidas ao teste t-student. * p < 0.05.

Sabendo que o sangue modula positivamente a transcrição de ILP2 no ovário (LING; RAIKHEL, 2021), avaliou-se a transcrição do gene após a injeção. Como é possível ver na **Figura 29A**, houve uma repressão significativa da transcrição de ILP2 no ovário, mesmo que a injeção não tenha induzido repressão da transcrição de AeLAR no órgão. Investigou-se também o possível papel do corpo gorduroso neste contexto, já que a produção de ovos depende da expressão de vitelogenina no tecido (NASCI; MILLER, 1996). Como mostra a **Figura 29B**, o silenciamento 24h após a alimentação induz um aumento na transcrição de vitelogenina.

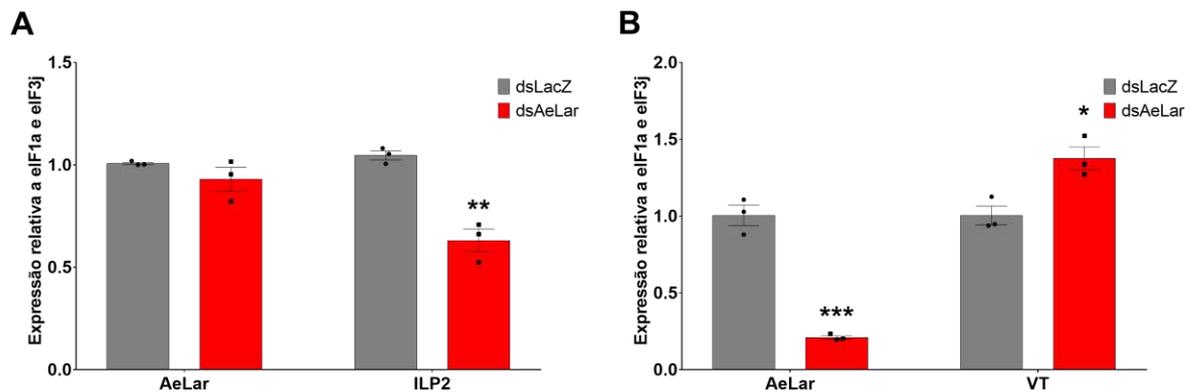


Figura 29. Efeito do silenciamento de AeLAR na expressão de ILP2 e VT no ovário e no corpo gorduroso 24h após a alimentação com sangue (24h PBM/4dpi). A figura (A) mostra a transcrição relativa dos genes de AeLAR e ILP2 nos ovários de mosquitos injetados com dsAeLAR em relação aos que foram injetados com dsLacZ. A figura (B) mostra a transcrição relativa de AeLAR e Vitelogenina (VT) no corpo gorduroso de mosquitos, que foram injetados com dsLacZ, ou dsAeLAR. Os dados foram submetidas ao teste t-student. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. N = 3.

5. Discussão

5.1. Relação entre AeLAR, a via de insulina (ISP) e as reservas de energéticas do mosquito no período previtelogênico

Para iniciar a avaliação da relação entre a PTP AeLAR e eventos coordenados pela via de insulina, sabendo que baixas concentrações de carboidratos ingeridas durante o período previtelogênico induzem modificações moleculares adaptativas na ISP de mosquitos, adequando assim a produção de JH às demandas metabólicas (PEREZ-HEDO; RIVERA-PEREZ; NORIEGA, 2014), avaliou-se o efeito da restrição calórica na expressão da PTP AeLAR. A restrição pressupõe não apenas a redução das concentrações de JH, mas também impede a síntese de reservas energéticas, como glicogênio e TAG, para além das que o mosquito trás consigo após a emergência, as reservas tenerais (BRIEGEL; KNÜSEL; TIMMERMANN, 2001; PEREZ-HEDO; RIVERA-PEREZ; NORIEGA, 2014). Foram incluídas também outras duas PTPs importantes na regulação da ISP de insetos, PTP1B e CSW (RUZZI et al., 2020; WU et al., 2011), para melhor discutir possíveis papéis regulatórios e compensatórios exercidos por estas fosfatases na adaptação a restrição calórica (SMOLY et al., 2017).

Neste cenário, a repressão transcricional exclusiva de AeLAR (**Figura 17A**) testifica que esta enzima possui destaque no processo de adaptação metabólica a

baixas concentrações de carboidratos, e que sua repressão pode estar relacionada ao aumento da sensibilidade da ISP. Em mamíferos, a repressão de PTPs em situação de restrição calórica já havia sido descrita, como forma de aumentar a sensibilidade da ISP, preparando assim o organismo para eventual chegada de nutrientes (HALE; TER STEEGE; DEN HERTOOG, 2017). Aumentar a sensibilidade da ISP em condições de restrição calórica é algo que já foi observado em mosca e mosquito (LAMMING; ANDERSON, 2014; PEREZ-HEDO; RIVERA-PEREZ; NORIEGA, 2014).

Em *Drosophila*, observou-se que o sistema hormonal de ILPs responde as flutuações calóricas (ALFA; KIM, 2016). Portanto, como controle do processo de adaptação metabólica que seria esperado frente a restrição calórica, decidiu-se observar a transcrição de um dos ILPs, o ILP2, entre os grupos de mosquitos submetidos as respectivas dietas, tendo em vista a problemática do estudo destas insulinas (SHARMA; NUSS; GULIA-NUSS, 2019). No corpo gorduroso são transcritos os ILP2, -5 e -6, dentre os 8 que o mosquito possui, dos quais o ILP2 foi escolhido por ser positivamente modulado por JH. O ILP6 é um possível IGF que possui uma regulação complexa e afeta o metabolismo energético indiretamente através da modulação dos ILP2, -4 e -5, mecanismo pouco explorado (LING; RAIKHEL, 2018; SHARMA; NUSS; GULIA-NUSS, 2019). Em relação ao ILP5, sua análise mostrou que possui um perfil antagônica ao ILP2 sobre o metabolismo, além de um mecanismo de repressão por JH (LING; RAIKHEL, 2018), de modo que decidiu-se não explorá-lo neste trabalho dado eventuais problemas de detecção. O ILP1 não tem efeito metabólico conhecido, enquanto os ILP4, -7 e -8, apesar do efeito que possuem, são específicos da cabeça e do ovário, tecidos onde o dsRNA surtiu pouco, ou nenhum efeito (**Figuras 29 e S6**)(SHARMA; NUSS; GULIA-NUSS, 2019). Já o ILP3, além de ser específico da cabeça, é possível que não seja afetado por modulações calóricas, como seu análogo em *Drosophila*, o dILP2 (ALFA; KIM, 2016; MIN et al., 2008).

Como observado na **Figura 17B**, o mosquito responde a restrição calórica e a transcrição de ILP2 é maior em mosquitos alimentados com sacarose 1% que mosquitos na dieta controle. Como o ILP2 foi descrito como regulado positivamente pelo receptor de hormônio juvenil (LING; RAIKHEL, 2018), é conflitante que esteja mais transcrito em dietas de restrição calórica, que reduzem os títulos de JH

(NORIEGA, 2014). Seria esperado uma repressão transcricional de genes-alvo, como o próprio ILP2. No entanto, o aumento de ILP2 na restrição calórica pode ser um fenômeno similar ao que foi observado em *Drosophila* (ANTOSH et al., 2011), que induziu aumento na transcrição, tanto de genes ativados, quanto dos reprimidos por JH, indicando que dentre as possibilidades de regulação deste gene, por exemplo, a ativação por JH não seja o único mecanismo regulatório.

No mosquito, *Kr-h1* (do inglês, *Kruppel homolog 1*) é o fator transcricional que interage com o promotor do gene de ILP2, cuja transcrição pode ser induzida em resposta a ligação de JH ao seu receptor e fator transcricional *Met* (do inglês, *Methoprene-tolerant*) (LING; RAIKHEL, 2021). Ao mesmo tempo, o receptor de serotonina 5HT2B (do inglês, *5-hydroxytryptamine receptor, type 2B*) também é capaz de induzir a transcrição de ILP2 após o repasto sanguíneo, quando as concentrações de serotonina aumentam, ao passo que as concentrações de JH são mais baixas (LING; RAIKHEL, 2018). A transcrição de ILP2 no mosquito também pode ser induzida por ILP6, que como mencionado anteriormente, é um provável IGF expresso no corpo gorduroso de *A. aegypti* (LING; RAIKHEL, 2018; SHARMA; NUSS; GULIA-NUSS, 2019). No mosquito, a transcrição deste IGF-like é regulada por *Kr-h1* e *Ae5HT2B*, mas em *Drosophila*, observou-se que o fator transcricional FOXO é capaz de induzir a transcrição do IGF-like dILP6 no corpo gorduroso, a fim de controlar a liberação de outros ILPs no SNC durante o déficit nutricional (KANG et al., 2017; LING; RAIKHEL, 2018, 2021), de modo que se o sistema também se conserva em mosquitos, implica que a ativação de FOXO também poderia induzir ILP2. E apesar de incerto o motivo pelo qual há aumento de AeILP2 durante a restrição calórica, mais experimentos são necessários para estabelecer as diferenças regulatórias de ILPs mediante as diversas condições nutricionais.

Ainda assim, tendo em mente que AeLAR é parte do processo de adaptação metabólica em resposta às demandas energéticas, iniciou-se a investigação do possível papel que a PTP AeLAR exerce no período previtelogênico de mosquitos sob dieta controle, onde há maior produção de JH e transcrição da PTP. Observou-se o período de 3 a 5 dias após a emergência, para entender melhor o papel biológico desta PTP. E similar ao observado na restrição calórica, que mostrou uma regulação simultânea entre os genes de AeLAR e ILP2, o silenciamento gênico de AeLAR induziu a transcrição de ILP2 no terceiro dia pós-injeção (dpi), mas não no quinto dia

(**Figuras 18A e 18B**), levantando a dúvida se o silenciamento aumentou a liberação de JH, por exemplo, ou se induziu um estado de restrição calórica.

Além disso, como o silenciamento se manteve estável até o quinto dia após a injeção (**Figuras 18A**), suspeitou-se que o desaparecimento da diferença na transcrição de ILP2 estaria relacionada a regulações intermediárias entre 3 e 5 dpi. Assim, decidiu-se avaliar se a PTP1B, ou a CSW sofreram alguma modulação, após o silenciamento de AeLAR. Como visto na **Figura 19**, a transcrição de PTP1B aparece reprimida já no terceiro dia após a injeção de dsAeLAR e se mantém até o quinto dia (**Figura 19A**), enquanto a fosfatase CSW é reprimida no quinto dia após a injeção (**Figura 18B**), ambos resultados que se mostraram diferentes do que se esperaria de uma compensação de função por parte destas enzimas (SMOLY et al., 2017).

Não são esperados efeitos inespecíficos de silenciamento após a injeção de dsAeLAR, já que o alvo da dupla-fita de RNA é especificamente a região de fibronectina 3 da porção extracelular da PTP AeLAR, domínio ausente nas outras PTPs. Além disso, alinhamentos locais entre a sequência da PTP AeLAR/sequência molde para síntese do dsRNA e as outras PTPs não mostraram sequer similaridade, dificultando ainda mais a possibilidade de o mesmo tratamento ter surtido efeito sobre as duas PTPs. Isto leva a crer que, em mosquitos, o silenciamento da PTP AeLAR de fato reprima a transcrição da PTP1B 3 e 5dpi, e de CSW no quinto dia. Em mamíferos, dados de *Western Blotting* com cultura de células mostram que o silenciamento da LAR não afetou a expressão da PTP1B 48h após o silenciamento gênico, ou a CSW após 15h (KULAS et al., 1995; MANDER; HODGKINSON; SALE, 2005), sendo esta a primeira vez que este evento é observado.

De todas as formas, a repressão de pelo menos três PTPs reguladoras da ISP após injeção de dsAeLAR chama a atenção, já que a regulação da via estaria possivelmente comprometida (KAUR et al., 2019; RUZZI et al., 2020; WU et al., 2011). Como não foi possível avaliar os efeitos do silenciamento na liberação de JH, decidiu-se avaliar a que nível a ISP foi afetada, já que uma suposta interferência nos níveis de fosforilação do receptor de insulina mostraria seus efeitos sobre as vias abaixo na regulação, como a via da PI3K. Alterações na via de PI3K influenciam diretamente nos níveis de AKT fosforilada, de modo que quanto maior o grau de fosforilação, infere-se que há maior atividade da via de insulina e vice-versa. Já

alterações no grau de atividade de AKT, reflete-se na transcrição dos genes gliconeogênicos, como a PEPCK. A PEPCK citoplasmática (PEPCK_C) é uma das isoformas deste gene, que é regulada diretamente por esta via e diminui, ou aumenta sua transcrição em resposta a maior, ou menor grau de ativação de ISP, respectivamente. Já a isoforma de PEPCK mitocondrial (PEPCK_M) foi analisada, porque, em moscas, está atrelada a processos de adaptação metabólica assim como PEPCK_C, mas também porque em mamíferos sua expressão acompanha desbalanços hormonais, como da insulina (CHATTERJEE; PERRIMON, 2021; EVELAND et al., 2016; STARK; KIBBEY, 2014).

O aumento das quantidades AKT fosforilada 3dpi (**Figuras 20A e 20B**) corrobora que houve alteração na ativação da atividade da via de insulina, além de sugerir que houve aumento da atividade desta via, possivelmente pela redução na expressão de duas PTPs, a PTP AeLAR e a PTP1B, no mesmo período. O desaparecimento deste efeito no quinto dia (**Figuras 20C e 20D**) pode ser resultado de um processo de adaptações metabólicas para manutenção da homeostase, como exemplificado pelo perfil transcricional dos genes de PEPCK, que inicialmente se encontram mais transcritos no terceiro dia, mas a diferença em relação ao grupo controle desaparece porque a transcrição no grupo controle alcança os níveis transcricionais dos grupos silenciados, e não porque há redução na transcrição das PEPCKs no grupo silenciado (**Figuras 20E e 20F**). Entretanto, é importante ressaltar que os níveis transcricionais de ambos os genes de PEPCK encontravam-se elevados no grupo 3 dpi, diferente do que seria esperado no mecanismo clássico de funcionamento da ISP (CHATTERJEE; PERRIMON, 2021).

Assim, caso o aumento nas concentrações de pAKT no grupo silenciado esteja relacionado a repressão das fosfatases repressoras da ISP, AeLAR e PTP1B, que resultou em aumento na atividade da via, tal qual observado em *Drosophila* (KAUR et al., 2019; WU et al., 2011), também seria esperado que FOXO, alvo da atividade cinase de AKT, tivesse menor atividade nuclear, que se refletiria em uma menor transcrição de PEPCKs (CHATTERJEE; PERRIMON, 2021), não o oposto. Entretanto, o aumento transcricional da PEPCK_C observado no grupo silenciado, por exemplo (**Figuras 20G**), não parece dramaticamente alto e pode ser consequência da atividade colateral de vias paralelas. Em mamíferos, por exemplo, a contínua atividade de ISP é capaz de alterar o balanço redox nas células, que é

percebido por proteínas como JNK (do inglês, *Janus Kinase*), que estimulam a atividade transcricional de FOXO para controlar o desbalanço redox e, colateralmente, induzem a transcrição de PEPCK (KUMASHIRO et al., 2008). Em *Drosophila*, os efeitos de aumento na proliferação de células hematopoiéticas observados após o silenciamento de LAR foram consequência do aumento na produção de ROS e a maior atividade da via de JNK (KAUR et al., 2019)

Entretanto, mesmo que durante 5 dias após a injeção os níveis de AeLAR e PTP1B encontrem-se baixos (**Figuras 18A e 19A**), não é esperado que a ISP permaneça constantemente ativa e a redução na transcrição de CSW observada (**Figuras 19B**) pode participar dos eventos de autoregulação da via (YE, 2007). A CSW possui um papel complexo na regulação da via de insulina, já que sua atividade pode variar segundo o estímulo, ativando, ou reprimindo a ISP. Em fibroblastos mutantes para CSW a atividade da PI3K é maior mediante o estímulo com EGF (do inglês, *Epidermal Growth Factor*) e menor quando as células são estimuladas com PDGF (do inglês, *Platelet-Derived Growth Factor*), ou IGF-1 (do inglês, *Insulin-like Growth Factor 1*) (ZHANG et al., 2002). Em *Drosophila*, mutantes para a CSW apresentavam menores quantidades de pAKT no intestino, mas quando o silenciamento foi feito no corpo gorduroso, ou mesmo no SNC, as reservas de TAG aumentam no corpo gorduroso (RUZZI et al., 2020). Assim, é possível que 3 dpi a repressão de AeLAR e PTP1B tenha causado aumento na atividade de ISP, aumento no estresse oxidativo e, paralelamente, aumento na atividade nuclear de FOXO, que se refletiu sobre a transcrição dos genes PEPCK e ainda de ILP2 se a regulação de FOXO de fato existir. Já no quinto dia, como forma de controlar a atividade de ISP, a transcrição de CSW foi reprimida, levando a redução da atividade da ISP, equiparando o metabolismo do grupo silenciado ao do grupo controle, reduzindo as diferenças observadas 3 dpi.

De toda forma, uma vez que o silenciamento alterou a dinâmica da ISP, decidiu-se avaliar as consequências sobre as reservas de glicogênio e TAG acumuladas pelo mosquito. Os experimentos mostraram que a PTP AeLAR desempenha papel importante na regulação das reservas de glicogênio, que se mostraram significativamente aumentadas 5 dpi (**Figura 22A e S1**), evento que foi corroborado pela observação do mesmo aumento em mosquito sob restrição calórica (**Figura 23A**), mesmo que nesta dieta as concentrações de glicogênio e TAG tendam

apenas a se manterem constantes, ou seja, não há perda ou acúmulo (BRIEGEL; KNÜSEL; TIMMERMANN, 2001).

Em relação a ausência de variação das reservas de TAG, não apenas entre controle e silenciado, mas também entre o terceiro e quinto dia após a injeção no grupo silenciado (**Figura 22B**), é importante ressaltar que o silenciamento reprime a transcrição do gene de ácido graxo sintase 2 (FAS2, do inglês *Fatty Acid Synthase 2*), enzima de síntese lipídica (**Figura S2**). Fisiologicamente, o pico transcricional de FAS2 no mosquito se apresenta em até 24h após a emergência até que sua transcrição é rapidamente reprimida, mas o corpo gorduroso continua a acumular TAG (WANG et al., 2017). Após o silenciamento, entretanto, é possível que o efeito da repressão transcricional extra de FAS2 não esteja necessariamente refletido dentro da janela de tempo observada, contudo, análises em pontos posteriores a 5 dpi podem mostrar possíveis consequências desta repressão e evidenciar que as concentrações de TAG no mosquito silenciado, na verdade, tendam a serem menores que o controle com o decorrer do tempo.

Já o aumento observado nos estoques de glicogênio entre 3 e 5 dpi pode estar atrelada a manutenção da repressão de PTP1B durante este período, causada pelo silenciamento de AeLAR, uma vez que a diminuição da transcrição de PTP1B, além de estar associada ao aumento da atividade da ISP, também está associada a regulação do metabolismo de trealose, como observado no besouro *Tribolium castaneum*, onde o silenciamento desta PTP induziu aumento nas reservas de glicogênio (WU et al., 2011; XU et al., 2020).

Em insetos, a glicose não é o principal açúcar circulante, mas a trealose. A glicose é absorvida no intestino e levada ao corpo gorduroso, onde pode ser metabolizada pela via glicolítica para manutenção energética, para síntese de trealose para exportação, ou ainda para síntese de glicogênio e armazenamento. O glicogênio armazenado no corpo gorduroso também será degradado para formar mais trealose, que será liberado na circulação (BECKER et al., 1996). No besouro, observou-se um acúmulo de trealose 48h após o silenciamento de PTP1B, mas redução de seu conteúdo 72h após o silenciamento. Concomitante a redução de trealose, observou-se aumento na expressão de enzimas de degradação de trealose, assim como do conteúdo de glicose e glicogênio, sugerindo que houve degradação de trealose a glicose e subsequente conversão a glicogênio. Esta ideia foi reforçada,

porque o silenciamento da PTP1B no besouro também reduziu a atividade da enzima PK (do inglês *Pyruvate Kinase*), responsável pela formação de Piruvato e última etapa da glicólise, indicando que a via glicolítica estaria estagnada, permitindo acúmulo de intermediários, estimulando assim a síntese de glicogênio (XU et al., 2020).

A hipótese de que o acúmulo de glicogênio possa estar atrelado a desregulação da expressão da PTP1B após o silenciamento de AeLAR não é a única possibilidade, no entanto. Por exemplo, o aumento no consumo de sacarose, hiperfagia, não foi avaliado diretamente neste trabalho, mas não necessariamente há uma relação entre a hiperfagia e o aumento dos estoques de glicogênio, como foi observado em moscas (DOCHERTY et al., 2015). Outra possibilidade para além das alterações na atividade da via de insulina é que a repressão de PTP1B poderia estar envolvida na desregulação do metabolismo energético, porque esta fosfatase é capaz de regular a via análoga a via de leptina em mamíferos, afetando assim a percepção do mosquito acerca das próprias reservas nutricionais, induzindo a liberação de ILPs e o acúmulo de glicogênio. Em moscas, o silenciamento do ativador desta via, Upd2 (do inglês, *Unpaired 2*), causou redução no armazenamento de TAG no corpo gorduroso, além de induzir aumento na circulação de açúcares na hemolinfa, embora não tenha sido significativo (RAJAN; PERRIMON, 2012).

É possível explorar ainda a relação entre a maior ativação da ISP e possíveis alterações do balanço redox quando a ISP está mais ativa, sugerido pelo aumento transcricional dos genes de PEPCKs (**Figura 20E e 20F**), no contexto de acúmulo de glicogênio. Trabalhos com *Drosophila* mostram que, similar ao que ocorre em mamíferos (KUMASHIRO et al., 2008), dietas ricas em carboidratos, ao mesmo tempo que induzem a liberação de mais ILPs e maior ativação da ISP, também induzem o aumento do estresse oxidativo e redução da viabilidade mitocondrial. Estes efeitos ativam vias de reparo, que aumentam a atividade nuclear de FOXO, antes mais inibida, induzindo a expressão de genes que atuam no controle do estresse oxidativo (ECKER et al., 2017; ROVENKO et al., 2015). Paralelo a transcrição de enzimas de controle oxidativo, outros genes são expressos para adaptar o inseto aos processos metabólicos em que a célula se encontra, como a PEPCK.

Em invertebrados o principal papel da PEPCK neste momento é desviar o piruvato formado a partir da oxidação de glicose para síntese de outras moléculas,

especialmente glicerol-3-fosfato e glicose-6-fosfato, processos conhecidos como gliceroneogênese e gliconeogênese, para armazenar moléculas de ácido graxo livre na forma de TAG e manter a atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase e formação de potencial redutor na forma de NADPH (DELLA NOCE et al., 2019; OKAMURA et al., 2007). O excesso de glicos-6-fosfato é um potente regulador alostérico da glicogênio sintase, o que poderia induzir a síntese de mais glicogênio (BOUSKILA et al., 2010).

5.2. Efeitos fisiológicos do silenciamento da PTP AeLAR no mosquito

De todo modo, o fato é que a principal consequência metabólica do silenciamento da PTP AeLAR foi o aumento dos estoques de glicogênio, levando-nos inicialmente a observar se este acúmulo teria alguma influência positiva sobre o tempo de meia vida dos mosquitos quando submetidos a jejum, como foi observado em moscas (DJAWDAN et al., 1998). O acúmulo de glicogênio e a resistência ao jejum são especialmente importantes no contexto da capacidade vetorial, porque ao mesmo tempo que o mosquito *A. aegypti* é altamente antropofílico, ainda depende da ingestão de carboidratos, cujo acesso a fontes naturais tem sido dificultado pelo processo de urbanização (BARREDO; DEGENNARO, 2020), mas é sabido que estes insetos já estão se adaptando a fontes artificiais de açúcares, como a de resíduos domiciliares (DIENG et al., 2017), processo que ainda não é estudado.

E uma vez que mosquitos silenciados apresentam maior resistência ao jejum, corroborando o que havia sido observado em *Drosophila* (DJAWDAN et al., 1998) (**Figura 23**), é possível que a modulação da expressão da PTP AeLAR seja importante para o intervalo entre a emergência até o acesso a outras fontes energéticas viáveis, de modo que mais mosquitos estariam disponíveis para manutenção do ciclo de transmissão de patógenos.

Outros efeitos também estão associados ao acúmulo de glicogênio, como modificações das atividades locomotora e de voo em insetos, como visto em *Drosophila*, onde moscas com maiores reservas apresentam menores atividades de voo, após um mesmo período de jejum (WINWOOD-SMITH; WHITE; FRANKLIN, 2020). Quando submetidos a análise locomotora/voo, os mosquitos silenciados e com maiores reservas também mostraram menores atividades locomotoras, principalmente no quinto dia de observação, que coincidiu com o aumento das

reservas de glicogênio (**Figuras 21, 24 e S3B**). Entretanto, esta diminuição da atividade locomotora poderia estar associada a um possível comportamento hiperfágico, tentando compensar um possível déficit calórico associado ao provável desvio de parte dos açúcares destinados a manutenção do metabolismo para os estoques de glicogênio. Entretanto, ao submeter os mosquitos a restrição calórica, tanto controle quanto silenciado reduziram suas atividades locomotoras, mas o comportamento de locomoção dos grupos sob restrição foi diferente do grupo sob dieta controle (**Figuras 24 e 25**), reforçando que o silenciamento induz alterações na locomoção dos mosquitos, mesmo que não se possa descartar a possibilidade de que os mosquitos silenciados também estejam apresentando comportamento hiperfágico.

A redução específica na atividade locomotora/voo observada no grupo silenciado próximo ao apagar das luzes (ZT12), tanto na dieta controle, quanto na restrição calórica (**Figura S3A e S4A**), também chamada de redução na robustez da atividade, levantando a hipótese de que as alterações locomotoras após o silenciamento também possam estar relacionadas a modificações em genes do relógio circadiano, já que há a regulação circadiana e motora estão diretamente relacionadas (HARDIN, 2005). Em moscas, a relação entre a PTP LAR e o ciclo circadiano já foi investigado, onde a ausência de expressão de LAR induzida exclusivamente desde o desenvolvimento embrionário gerou adultos arrítmicos em regime de completo escuro. Entretanto, a ausência da PTP não desregulou genes específicos do relógio, mas demonstrou-se que o silenciamento afetava projeções neurais importantes, impedindo o correto acúmulo do neuropeptídeo PDF (do inglês, *Pigment-Dispersing Factor*) nas projeções dorsais e nas projeções do trato ótico posterior (AGRAWAL; HARDIN, 2016).

Para avaliar possíveis diferenças entre moscas e mosquitos, analisou-se a transcrição dos principais genes de relógio, *Clock (Clk)*, *Cycle (cyc)*, *Period (per)*, *Timeless (tim)* e *Cryptochrome 2 (cry2)* (SHETTY et al., 2022) na cabeça de mosquitos 5 dpi mantidos sob regime de sacarose 10% m/v, onde observou-se repressão consistente da transcrição de *cry2* e *cyc*, dicotomia na transcrição dos genes *Clk* e *tim*, ao passo que *per* se mostrou inalterado (**Figura 26**). De fato, a repressão de *cyc* acompanhada da repressão de *cry2*, como ocorreu na cabeça dos mosquitos após o silenciamento de AeLAR, já havia sido vista em grilos (TOMIYAMA

et al., 2020), ao passo que a dicotomia observada, ou a ausência na variação da expressão dos outros genes podem estar associados as diferenças de horários em que as replicatas foram coletadas, que mesmo próximos, não foram os mesmos. No que diz respeito a redução da robustez, é possível que a repressão de *cry2* observada tenha papel relevante, já que os picos transcricionais deste gene coincidem com os picos de atividade locomotora do mosquito, no início da manhã e no final da tarde (GENTILE et al., 2009), momentos em que foram observados os principais prejuízos locomotores (**Figura 24**).

O gene de *cry2* é uma fotoliase que atua como possível repressor transcricional de *cyc* e *Clk*, de modo que também seria esperado que sua repressão refletisse em maior transcrição dos outros genes de relógio, o que não foi observado. Contudo, a repressão concomitante de *cyc* também precisa ser levada em consideração, bem como seu papel na regulação transcricional de *cry2*, ainda pouco explorada neste inseto (GENTILE et al., 2009; SHETTY et al., 2022). Apenas recentemente o papel de *cyc* foi mais bem estudado na biologia do mosquito, mostrando que insetos apresentando uma proteína mutante incapaz de dimerizar-se com *Clk* perdiam a ritmicidade dos principais genes circadianos, exceto *cry1* (SHETTY et al., 2022). Os dois genes precisam ser melhor estudados individualmente para melhor compreender os possíveis efeitos de uma repressão conjunta, mas há possibilidade de que estejam envolvidos também nos prejuízos locomotores observados.

Análises mais detalhadas ainda são necessárias para determinar se também há prejuízos locomotores associados a possíveis anomalias ao SNC causadas pelo silenciamento, levando em consideração a importância que esta PTP possui para o desenvolvimento do SNC (KRUEGER et al., 1996). Mesmo que o mosquito seja holometábolo, ainda ocorrem modificações moleculares, bioquímicas e teciduais após a emergência (DE CARVALHO et al., 2021) e a injeção é feita nas primeiras horas de vida adulta dos insetos. De toda forma, tendo em vista o efeito regulatório da restrição calórica na expressão de AeLAR, o efeito que esta PTP possui no armazenamento de glicogênio, o possível efeito na alimentação, os efeitos observados na atividade locomotora/voo e nos genes de relógio circadiano, torna-se mais evidente a importância que o gene AeLAR possui na biologia do mosquito, cujo papel está possivelmente relacionado a manutenção do balanço energético.

Além disso, ao analisar a percepção dos mosquitos frente a presença de um hospedeiro vertebrado 3, 4 e 5 dias após o silenciamento (**Figura 27**), tornou-se evidente que a redução da expressão de AeLAR comprometeu percepção dos mosquitos. O resultado pode ser reflexo do prejuízo locomotor observado no silenciamento, ou pode ainda estar relacionada a redução transcricional de *cyc*, observada anteriormente. Como mencionado, os mosquitos mutantes para *cyc* não apenas sofreram alterações nos perfis transcricionais de genes circadianos, mas também apresentaram uma redução de até 65% na resposta a percepção ao odor humano, que foi atribuída a uma provável alteração na expressão de genes olfativos, que provavelmente foi causada pela alteração circadiana (SHETTY et al., 2022).

Os efeitos do silenciamento sobre o metabolismo e fisiologia do mosquito na alimentação com sangue e nos eventos que sucedem o período vitelogênico foram finalmente avaliados, levando a conclusão de que, apesar de não ter influenciado na quantidade de mosquitos que realizaram o repasto sanguíneo, que neste caso pode ter sido consequência da análise 3 dpi, de modo que análises posteriores ao quinto dia mostrem real redução na proporção de mosquitos que fazem o repasto sanguíneo, percebeu-se que o número de ovos é menor no grupo silenciado, mesmo que a eclosão tenha permanecido similar entre os grupos (**Figuras 28C e 28D**). Esta redução de ovos postos pode estar atrelada aos efeitos das variações de ILP2 observada no ovário, já que a ingestão/digestão de sangue não foi afetada pelo silenciamento (**Figura 28A e 28B**), ainda que o intestino tenha apresentado diminuição na expressão de AeLAR (**Figura S5**). O ILP2 é bastante expresso no tecido e a alimentação com sangue reprime sua expressão no ovário. Ainda assim, mosquitos mutantes para o ILP2 apresentam ovários atrofiados e uma menor porcentagem de ovos postos por fêmeas (LING; RAIKHEL, 2021). Apesar do silenciamento não ter atingido o tecido, de fato observou-se uma repressão significativa da insulina no tecido (**Figura 29A**).

As concentrações de glicogênio não foram avaliadas no corpo gorduroso 24h pbm em mosquitos silenciados, mas sabe-se que é necessário degradação das reservas metabólicas durante a produção das proteínas do vitelo (HOU et al., 2015). Se o efeito da manutenção de acúmulo de glicogênio causada pelo silenciamento estiver afetando o mosquito no período vitelogênico, então é possível que haja prejuízo a síntese das proteínas do vitelo, ou em sua incorporação no ovário, ainda

que a transcrição de vitelogenina observada estivesse positivamente regulada nos mosquitos silenciados (**Figura 28B**), efeito que precisa ser mais bem estudado.

6. Conclusões e Perspectivas

O estudo da PTP AeLAR durante o período previtelogênico indica que a fosfatase parece participar de processos de adequação metabólica, através da regulação de expressão dos genes de insulina, especificamente o ILP2, e das outras fosfatases que participam da regulação do receptor de insulina, PTP1B e CSW. A supressão gênica a longo prazo da PTP AeLAR mostrou que sua desregulação possui efeitos sobre o armazenamento de glicogênio, que se refletiram em outros aspectos fisiológicos, como resistência a jejum, locomoção, ciclo circadiano, percepção de pistas sensoriais, além de afetar diretamente a oviposição. Assim, este trabalho mostra pela primeira vez em invertebrados e em um artrópode vetor, a importância que PTP AeLAR possui para diferentes aspectos fisiológicos, que são extremamente relevantes a capacidade vetorial do mosquito.

Os dados apresentados ainda podem ser reforçados com outras análises moleculares e bioquímicas que ajudem a entender melhor como a PTP AeLAR regula estes processos, como por exemplo as análises dos níveis de GSK (do inglês, *Glycogen Synthase Kinase*) fosforilada, cuja regulação está relacionada não apenas ao controle do metabolismo energético e síntese de glicogênio, mas também ao controle do relógio circadiano, ou ainda interferências mais específicas sobre os genes de fosfatases PTP1B e CSW.

Quanto a real importância que o ILP2 possui para o contexto metabólico e outros efeitos que o silenciamento possui na atividade locomotora em regimes de claro, ou escuro completo, este trabalho se limitou apenas a comentá-los, pois tratam-se de perguntas mais complexas a serem explorados em outro momento.

7. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P.; HARDIN, P. E. The Drosophila Receptor Protein Tyrosine Phosphatase LAR Is Required for Development of Circadian Pacemaker Neuron Processes That Support Rhythmic Activity in Constant Darkness But Not during Light/Dark Cycles. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 13, p. 3860–3870, 30 Mar. 2016.
- AHMAD, F.; GOLDSTEIN, B. J. Functional association between the insulin receptor and the transmembrane protein-tyrosine phosphatase LAR in intact cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 1, p. 448–57, 3 Jan. 1997.
- AIMAN, M. et al. EFFECTS OF SUGAR CONCENTRATION ON FECUNDITY, BITING BEHAVIOR AND SURVIVABILITY OF FEMALE AEDES (STEGOMYIA) ALBOPICTUS (SKUSE). **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 47, n. 6, p. 1160–6, Nov. 2016.
- AKSAMITIENE, E.; KIYATKIN, A.; KHOLODENKO, B. N. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 1, p. 139–146, 1 Feb. 2012.
- ALFA, R. W.; KIM, S. K. Using Drosophila to discover mechanisms underlying type 2 diabetes. **Disease Models & Mechanisms**, v. 9, n. 4, p. 365–376, 1 Apr. 2016.
- ALONSO, A. et al. Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 699–711, Jun. 2004.
- ALONSO, A.; PULIDO, R. The extended human PTPome: A growing tyrosine phosphatase family. **FEBS Journal**, v. 283, n. 8, p. 1404–1429, 2016.
- ANTOSH, M. et al. Comparative transcriptional pathway bioinformatic analysis of dietary restriction, Sir2, p53 and resveratrol life span extension in Drosophila. **Cell Cycle**, v. 10, n. 6, p. 904–911, 15 Mar. 2011.
- ARARIPE, L. O. et al. Locomotor activity in males of Aedes aegypti can shift in response to females' presence. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 254, 18 Dec. 2018.
- ARIK, A. J. et al. Manipulating insulin signaling to enhance mosquito reproduction. **BMC Physiology**, v. 9, n. 1, p. 15, 20 Dec. 2009.
- ARIK, A. J. et al. Increased Akt signaling in the mosquito fat body increases adult survivorship. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 4, p. 1404–1413, 30 Apr. 2015.
- BARATA, E. A. M. DE F. et al. População de Aedes aegypti (L .) em área endêmica de dengue , Sudeste do Brasil * Aedes aegypti (L .) population in an endemic area of dengue in the Southeast Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 237–242, 2001.
- BARR, A. J.; KNAPP, S. Large-Scale Structural Analysis of Protein Tyrosine Phosphatases. In: BRADSHAW RA; EA, D. (Eds.). . **Handbook on cell signaling**. 2. ed. California: Elsevier Science, 2010. p. 871.

BARREDO, E.; DEGENNARO, M. Not Just from Blood: Mosquito Nutrient Acquisition from Nectar Sources. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 5, p. 473–484, May 2020.

BECKER, A. et al. The regulation of trehalose metabolism in insects. **Experientia**, v. 52, n. 5, p. 433–439, May 1996.

BOUSKILA, M. et al. Allosteric Regulation of Glycogen Synthase Controls Glycogen Synthesis in Muscle. **Cell Metabolism**, v. 12, n. 5, p. 456–466, Nov. 2010.

BRADSHAW, W. E. et al. Evolutionary transition from blood feeding to obligate nonbiting in a mosquito. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 5, p. 1009–1014, 30 Jan. 2018.

BRASIL. **Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_epid_febre_amarela.pdf>.

BRIEGEL, H.; KNÜSEL, I.; TIMMERMANN, S. E. *Aedes aegypti*: size, reserves, survival, and flight potential. **Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology**, v. 26, n. 1, p. 21–31, Jun. 2001.

CARAGATA, E. P. et al. Dietary Cholesterol Modulates Pathogen Blocking by *Wolbachia*. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, p. e1003459, 27 Jun. 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Surveillance and Control of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the United States**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/resources/vector-control.html>>. Acesso em: 4 oct. 2021.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Zika Virus**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/about/overview.html>>.

CHAGNON, M. J.; UETANI, N.; TREMBLAY, M. L. Functional significance of the LAR receptor protein tyrosine phosphatase family in development and diseases. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 82, n. 6, p. 664–675, 1 Dec. 2004.

CHARBONNEAU, H. et al. Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 14, p. 5252–5256, 1 Jul. 1989.

CHATTERJEE, N.; PERRIMON, N. What fuels the fly: Energy metabolism in *Drosophila* and its application to the study of obesity and diabetes. **Science Advances**, v. 7, n. 24, 11 Jun. 2021.

CHOWAŃSKI, S. et al. Insulin-Like Peptides and Cross-Talk With Other Factors in the Regulation of Insect Metabolism. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 29 Jun. 2021.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO DE OLIVEIRA, R. Biologia e morfologia interna. In: CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. (Ed.). **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. p. 225.

CORBY-HARRIS, V. et al. Activation of Akt Signaling Reduces the Prevalence and Intensity of Malaria Parasite Infection and Lifespan in *Anopheles stephensi* Mosquitoes. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, p. e1001003, 15 Jul. 2010.

DE CARVALHO, S. S. et al. *Aedes aegypti* post-emergence transcriptome: Unveiling the molecular basis for the hematophagic and gonotrophic capacitation. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. e0008915, 6 Jan. 2021.

DELLA NOCE, B. et al. Carbohydrate Metabolic Compensation Coupled to High Tolerance to Oxidative Stress in Ticks. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4753, 18 Dec. 2019.

DESHPANDE, S. A. et al. Quantifying *Drosophila* food intake: comparative analysis of current methodology. **Nature Methods**, v. 11, n. 5, p. 535–540, 30 May 2014.

DIENG, H. et al. Sweet waste extract uptake by a mosquito vector: Survival, biting, fecundity responses, and potential epidemiological significance. **Acta Tropica**, v. 169, p. 84–92, May 2017.

DJAWDAN, M. et al. Metabolic reserves and evolved stress resistance in *Drosophila melanogaster*. **Physiological zoology**, v. 71, n. 5, p. 584–94, 1998.

DOCHERTY, J. E. B. et al. Mio acts in the *Drosophila* brain to control nutrient storage and feeding. **Gene**, v. 568, n. 2, p. 190–195, Sep. 2015.

ECKER, A. et al. High-sucrose diet induces diabetic-like phenotypes and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Protective role of *Syzygium cumini* and *Bauhinia forficata*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 605–616, May 2017.

EVELAND, M. et al. Knockdown expression of Syndecan in the fat body impacts nutrient metabolism and the organismal response to environmental stresses in *Drosophila melanogaster*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 1, p. 103–108, Aug. 2016.

FEYEREISEN, R.; FARNSWORTH, D. E. Precursor supply for insect juvenile hormone III biosynthesis in a cockroach. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 6, p. 2676–81, 25 Feb. 1987.

FOSTER, W. A. Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics. **Annual Review of Entomology**, v. 40, n. 1, p. 443–474, Jan. 1995.

GARRETT-JONES, C.; GRAB, B. THE ASSESSMENT OF INSECTICIDAL IMPACT ON THE MALARIA MOSQUITO'S VECTORIAL CAPACITY, FROM DATA ON THE PROPORTION OF PAROUS FEMALES. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 31, p. 71–86, 1964.

GÉMINARD, C.; RULIFSON, E. J.; LÉOPOLD, P. Remote Control of Insulin Secretion by Fat Cells in *Drosophila*. **Cell Metabolism**, v. 10, n. 3, p. 199–207, Sep. 2009.

GENTILE, C. et al. Circadian Expression of Clock Genes in Two Mosquito Disease Vectors: cry2 Is Different. **Journal of Biological Rhythms**, v. 24, n. 6, p. 444–451,

19 Dec. 2009.

GU, S.-H.; CHEN, C.-H.; LIN, P.-L. Expression of protein tyrosine phosphatases and Bombyx embryonic development. **Journal of Insect Physiology**, v. 130, p. 104198, Apr. 2021.

GUAN, K. L. et al. Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 4, p. 1501–1505, 1 Feb. 1990.

GUTIÉRREZ-RODELO, C.; ROURA-GUIBERNA, A.; OLIVARES-REYES, J. A. [Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update]. **Gaceta medica de Mexico**, v. 153, n. 2, p. 214–228, 2017.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. S12, p. S7–S16, Dec. 2010.

HALE, A. J.; TER STEEGE, E.; DEN HERTOOG, J. Recent advances in understanding the role of protein-tyrosine phosphatases in development and disease. **Developmental biology**, v. 428, n. 2, p. 283–292, 2017.

HAN, G. H.; YE, M. L.; ZOU, H. F. Development of phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteome analysis. **Analyst**, v. 133, n. 9, p. 1128–1138, 2008.

HAQSHENAS, G. et al. A Role for the Insulin Receptor in the Suppression of Dengue Virus and Zika Virus in Wolbachia-Infected Mosquito Cells. **Cell Reports**, v. 26, n. 3, p. 529- 535.e3, Jan. 2019.

HARDIN, P. E. The Circadian Timekeeping System of Drosophila. **Current Biology**, v. 15, n. 17, p. R714–R722, Sep. 2005.

HATZIHRISTIDIS, T. et al. A Drosophila-centric view of protein tyrosine phosphatases. **FEBS Letters**, v. 589, n. 9, p. 951–966, 2015.

HAUCK, E. S. et al. Overexpression of phosphatase and tensin homolog improves fitness and decreases Plasmodium falciparum development in Anopheles stephensi. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 12, p. 775–787, Nov. 2013.

HOU, Y. et al. Temporal Coordination of Carbohydrate Metabolism during Mosquito Reproduction. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 7, p. e1005309, 9 Jul. 2015.

HUNTER, T. The genesis of tyrosine phosphorylation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 5, p. 1–14, 2014.

HWANGBO, D. S. et al. Drosophila dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. **Nature**, v. 429, n. 6991, p. 562–566, 3 Jun. 2004.

IDREES, S.; ASHFAQ, U. A. A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. **Genetic Vaccines and Therapy**, v. 10, n. 1, p. 6, 28 Dec. 2012.

JABLONKA, W. et al. A transient increase in total head phosphotyrosine levels is

observed upon the emergence of *Aedes aegypti* from the pupal stage. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 546–552, 2011.

KANG, P. et al. *Drosophila* Kruppel homolog 1 represses lipolysis through interaction with dFOXO. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16369, 27 Dec. 2017.

KAUR, H. et al. Lar maintains the homeostasis of the hematopoietic organ in *Drosophila* by regulating insulin signaling in the niche. **Development**, 1 Jan. 2019.

KÖHN, M. Turn and Face the Strange: A New View on Phosphatases. **ACS Central Science**, v. 6, n. 4, p. 467–477, 22 Apr. 2020.

KRÉNEISZ, O. et al. Glucose increases activity and Ca²⁺ in insulin-producing cells of adult *Drosophila*. **NeuroReport**, v. 21, n. 17, p. 1116–1120, 8 Dec. 2010.

KRUEGER, N. X. et al. The Transmembrane Tyrosine Phosphatase DLAR Controls Motor Axon Guidance in *Drosophila*. **Cell**, v. 84, n. 4, p. 611–622, Feb. 1996.

KULAS, D. T. et al. Insulin Receptor Signaling Is Augmented by Antisense Inhibition of the Protein Tyrosine Phosphatase LAR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 6, p. 2435–2438, Feb. 1995.

KUMAR, R. et al. Identification and characterization of the role of c-terminal Src kinase in dengue virus replication. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30490, 26 Aug. 2016.

KUMASHIRO, N. et al. Impact of Oxidative Stress and Peroxisome Proliferator–Activated Receptor γ Coactivator-1 α in Hepatic Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 57, n. 8, p. 2083–2091, 1 Aug. 2008.

LAMMING, D. W.; ANDERSON, R. M. Metabolic Effects of Caloric Restriction. In: **eLS**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014.

LEHANE, M. J. **The biology of blood-sucking in insects, second edition**. Massachusetts: Cambridge University Press, 2005.

LING, L.; RAIKHEL, A. S. Serotonin signaling regulates insulin-like peptides for growth, reproduction, and metabolism in the disease vector *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 42, p. E9822–E9831, 16 Oct. 2018.

LING, L.; RAIKHEL, A. S. Cross-talk of insulin-like peptides, juvenile hormone, and 20-hydroxyecdysone in regulation of metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 6, p. e2023470118, 9 Feb. 2021.

LOUNIBOS, L. P. Habitat segregation among African treehole mosquitoes. **Ecological Entomology**, v. 6, n. 2, p. 129–154, May 1981.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, Nov. 1951.

MANDER, A.; HODGKINSON, C. P.; SALE, G. J. Knock-down of LAR protein tyrosine

phosphatase induces insulin resistance. **FEBS Letters**, v. 579, n. 14, p. 3024–3028, 6 Jun. 2005.

MASUMURA, M. et al. Glucose Stimulates the Release of Bombyxin, an Insulin-Related Peptide of the Silkworm *Bombyx mori*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 118, n. 3, p. 393–399, Jun. 2000.

MEIRELES-FILHO, A. C. A.; KYRIACOU, C. P. Circadian rhythms in insect disease vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. suppl 1, p. 48–58, 2013.

MIN, K.-J. et al. *Drosophila* lifespan control by dietary restriction independent of insulin-like signaling. **Aging Cell**, v. 7, n. 2, p. 199–206, Apr. 2008.

MOORHEAD, G. B. G. et al. Evolution of protein phosphatases in plants and animals. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 2, p. 401–409, 2009.

MORETTI, D. M. et al. Molecular analysis of *Aedes aegypti* classical protein tyrosine phosphatases uncovers an ortholog of mammalian PTP-1B implicated in the control of egg production in mosquitoes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

MORRIS, S. N. S. et al. Development of diet-induced insulin resistance in adult *Drosophila melanogaster*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 8, p. 1230–1237, Aug. 2012.

NASCI, R. S.; MILLER, B. R. Culicine mosquitoes and the agents they transmit. In: BJ BEATY; WC MARQUARDT (Ed.). . **The Biology of Disease Vectors**. 1. ed. Niwot: Colorado University Press, 1996. p. 146–159.

NÄSSEL, D. R.; BROECK, J. VANDEN. Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 2, p. 271–290, 15 Jan. 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of biochemistry**. 5. ed. New York: Freeman and Company, 2008.

NORIEGA, F. G. Nutritional regulation of JH synthesis: a mechanism to control reproductive maturation in mosquitoes? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 7, p. 687–693, Jul. 2004.

NORIEGA, F. G. Juvenile Hormone Biosynthesis in Insects: What Is New, What Do We Know, and What Questions Remain? **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 1–16, 19 Oct. 2014.

OKAMURA, T. et al. ATF-2 regulates fat metabolism in *Drosophila*. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 4, p. 1519–29, Apr. 2007.

PEREZ-HEDO, M.; RIVERA-PEREZ, C.; NORIEGA, F. G. Starvation Increases Insulin Sensitivity and Reduces Juvenile Hormone Synthesis in Mosquitoes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86183, 29 Jan. 2014.

POORAIIOUBY, R. et al. Nutritional Quality during Development Alters Insulin-Like

Peptides' Expression and Physiology of the Adult Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. **Insects**, v. 9, n. 3, p. 110, 30 Aug. 2018.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. suppl 1, p. 11–17, 2013.

PRUD'HOMME, S. M. et al. Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito *Aedes aegypti*: On the relevance of transgenerational studies. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 242–254, Jan. 2017.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. **Pathogen Safety Data Sheets: Infectious Substances – Dengue virus**. Disponível em: <<https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/dengue-fever-virus-1-2-3-4-pathogen-safety-data-sheet.html>>.

RAJAN, A.; PERRIMON, N. *Drosophila* cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion. **Cell**, v. 151, n. 1, p. 123–137, 2012.

REN, J. M. et al. Transgenic mice deficient in the LAR protein-tyrosine phosphatase exhibit profound defects in glucose homeostasis. **Diabetes**, v. 47, n. 3, p. 493–497, 1 Mar. 1998.

RIEHLE, M. A. et al. Molecular characterization of insulin-like peptides in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: Expression, cellular localization, and phylogeny. **Peptides**, v. 27, n. 11, p. 2547–2560, Nov. 2006.

RIEHLE, M. A.; BROWN, J. M. Characterization of phosphatase and tensin homolog expression in the mosquito *Aedes aegypti*: Six splice variants with developmental and tissue specificity. **Insect Molecular Biology**, v. 16, n. 3, p. 277–286, 2007.

ROVENKO, B. M. et al. High sucrose consumption promotes obesity whereas its low consumption induces oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 79, p. 42–54, Aug. 2015.

RÜCKERT, C.; EBEL, G. D. How Do Virus–Mosquito Interactions Lead to Viral Emergence? **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 4, p. 310–321, Apr. 2018.

RUZZI, L. R. et al. The Phosphatase CSW Controls Life Span by Insulin Signaling and Metabolism Throughout Adult Life in *Drosophila*. **Frontiers in Genetics**, v. 11, 7 May 2020.

SEMANIUK, U. et al. *Drosophila* insulin-like peptides: from expression to functions – a review. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 169, n. 2, p. 195–208, 27 Feb. 2021.

SHARMA, A.; NUSS, A. B.; GULIA-NUSS, M. Insulin-Like Peptide Signaling in Mosquitoes: The Road Behind and the Road Ahead. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, 22 Mar. 2019.

SHETTY, V. et al. Impact of disabled circadian clock on yellow fever mosquito *Aedes aegypti* fitness and behaviors. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 6899, 27 Dec. 2022.

SMOLY, I. et al. An Asymmetrically Balanced Organization of Kinases versus Phosphatases across Eukaryotes Determines Their Distinct Impacts. **PLOS Computational Biology**, v. 13, n. 1, p. e1005221, 30 Jan. 2017.

STARK, R.; KIBBEY, R. G. The mitochondrial isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) and glucose homeostasis: Has it been overlooked? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 4, p. 1313–1330, Apr. 2014.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 85–96, Feb. 2006.

TERRADAS, G.; MCGRAW, E. A. Wolbachia -mediated virus blocking in the mosquito vector *Aedes aegypti*. **Current Opinion in Insect Science**, v. 22, p. 37–44, Aug. 2017.

TOIVONEN, J. M.; PARTRIDGE, L. Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 299, n. 1, p. 39–50, Feb. 2009.

TOMIYAMA, Y. et al. The role of clockwork orange in the circadian clock of the cricket *Gryllus bimaculatus*. **Zoological Letters**, v. 6, n. 1, p. 12, 11 Dec. 2020.

TONG, K.; WANG, Y.; SU, Z. Phosphotyrosine signalling and the origin of animal multicellularity. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1860, p. 20170681, 16 Aug. 2017.

TSOU, R. C.; BENCE, K. K. Central Regulation of Metabolism by Protein Tyrosine Phosphatases. **Frontiers in Neuroscience**, v. 6, 2013.

WANG, X. et al. Hormone and receptor interplay in the regulation of mosquito lipid metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 13, p. E2709–E2718, 28 Mar. 2017.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 26 Mar. 2015.

WINWOOD-SMITH, H. S.; WHITE, C. R.; FRANKLIN, C. E. Flight activity and glycogen depletion on a low-carbohydrate diet. **Journal of Experimental Biology**, 1 Jan. 2020.

WU, C.-L. et al. Dock/Nck facilitates PTP61F/PTP1B regulation of insulin signalling. **Biochemical Journal**, v. 439, n. 1, p. 151–159, 1 Oct. 2011.

XU, K.-K. et al. Roles of the PTP61F Gene in Regulating Energy Metabolism of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Frontiers in Physiology**, v. 11,

20 Aug. 2020.

XU, Y.; FISHER, G. J. Receptor type protein tyrosine phosphatases (RPTPs) – roles in signal transduction and human disease. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 6, n. 3, p. 125–138, 1 Aug. 2012.

YAMAGUCHI, S. T. et al. The regulation of circadian rhythm by insulin signaling in *Drosophila*. **Neuroscience Research**, v. 183, p. 76–83, Oct. 2022.

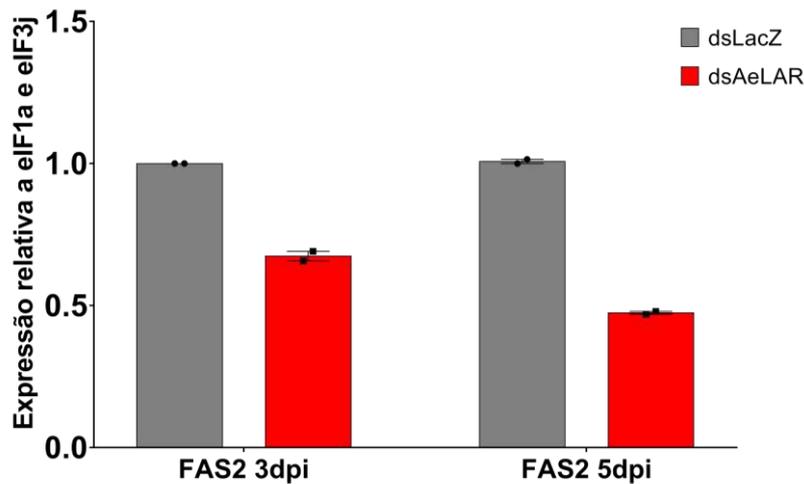
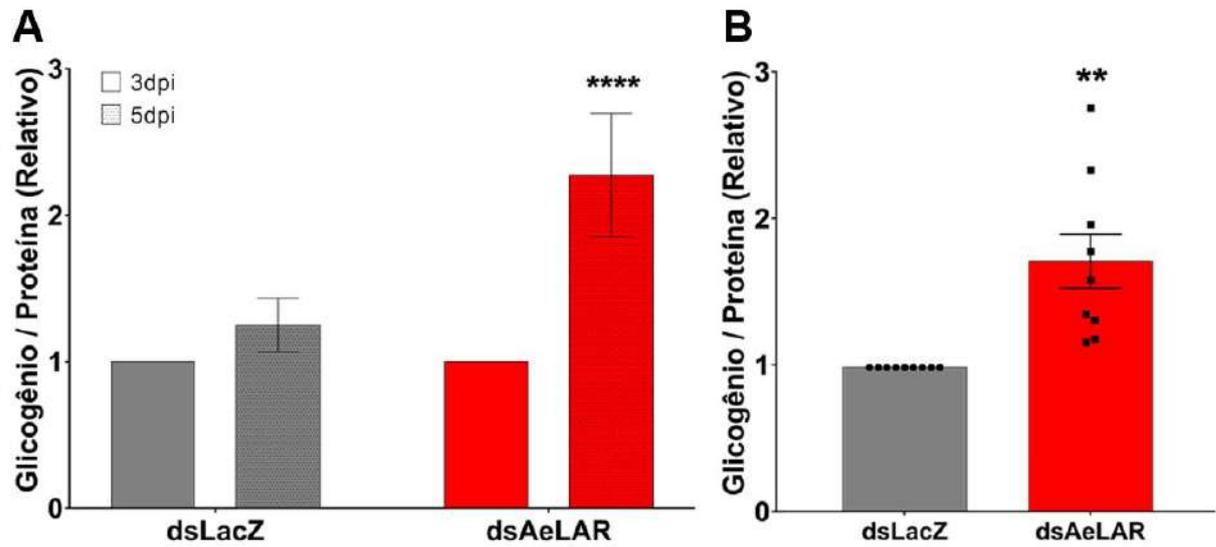
YE, J. Role of Insulin in the Pathogenesis of Free Fatty Acid-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 7, n. 1, p. 65–74, 1 Mar. 2007.

ZABOLOTNY, J. M. et al. Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 9, p. 5187–5192, 24 Apr. 2001.

ZHANG, S. Q. et al. Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 12, p. 4062–72, Jun. 2002.

ZHAO, B. et al. Determination of juvenile hormone titers by means of LC-MS/MS/MS and a juvenile hormone-responsive Gal4/UAS system in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 77, p. 69–77, 2016.

8. Material Suplementar



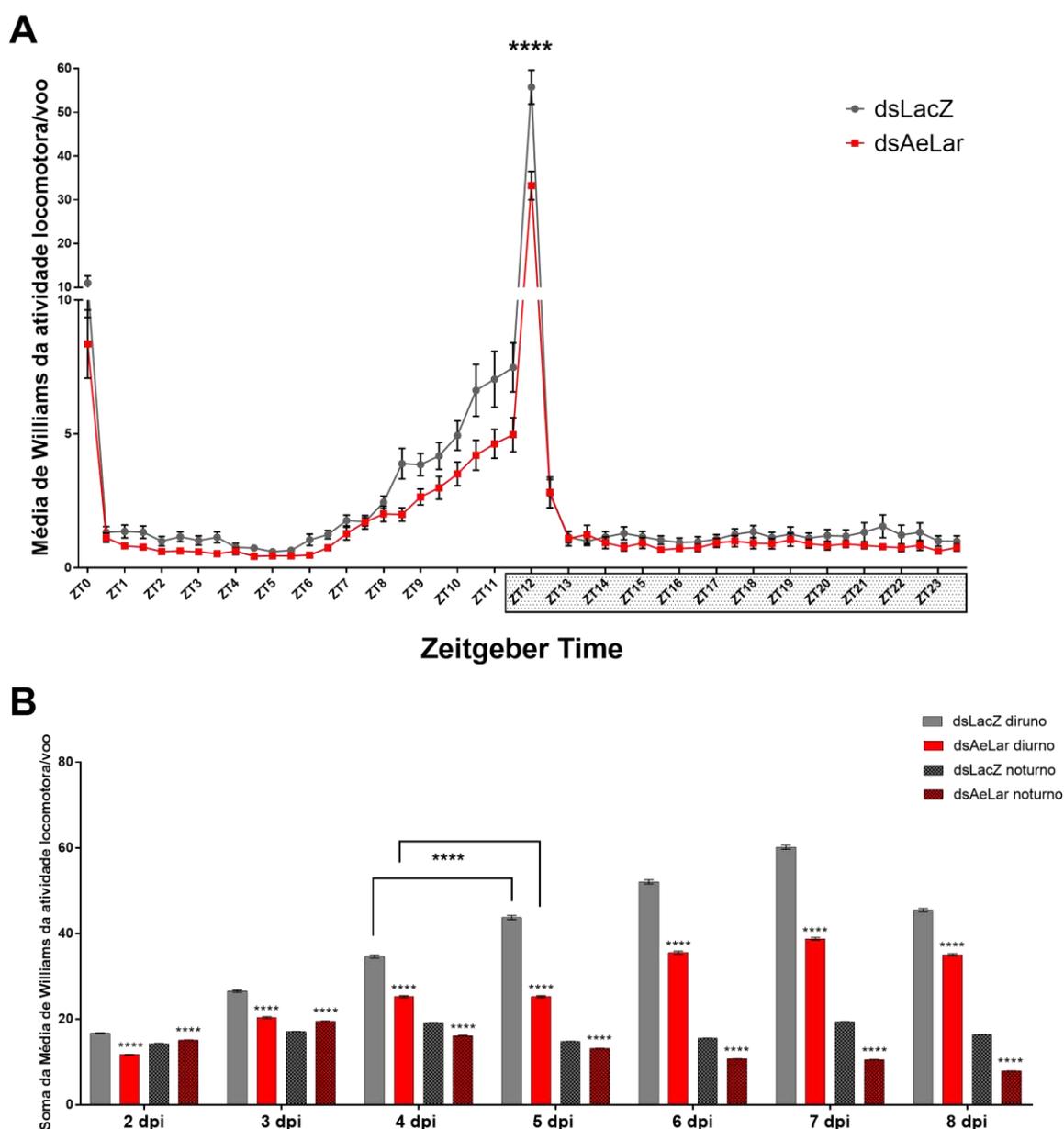


Figura S 3. Atividade locomotora/voos dos mosquitos silenciados. Mosquitos alimentados com sacarose 10% e silenciados para PTP AeLAR tiveram sua atividade de locomoção/voos avaliada por 7 dias, iniciado no segundo dia após a injeção, para permitir a aclimação dos grupos. A figura (A) mostra a atividade total observada durante todos os 7 dias de experimento, onde a área hachurada no eixo X indica o período em que a luz esteve apagada. A figura (B) mostra o perfil das atividades locomotoras diurnas (Após o ZT0 e antes do ZT12) e noturnas (Após o ZT12 e antes do ZT0) de cada dia. As atividades nos pontos ZT0 e ZT12 não foram incluídos no cálculo devido a discrepância da atividade. **** $p < 0.0001$. As comparações foram submetidas ao teste 2way ANOVA. Média \pm SEM. Os testes foram repetidos em 3 replicatas independentes, totalizando 97 mosquitos para o grupo dsLacZ e 96 mosquitos para o grupo dsAeLAR.

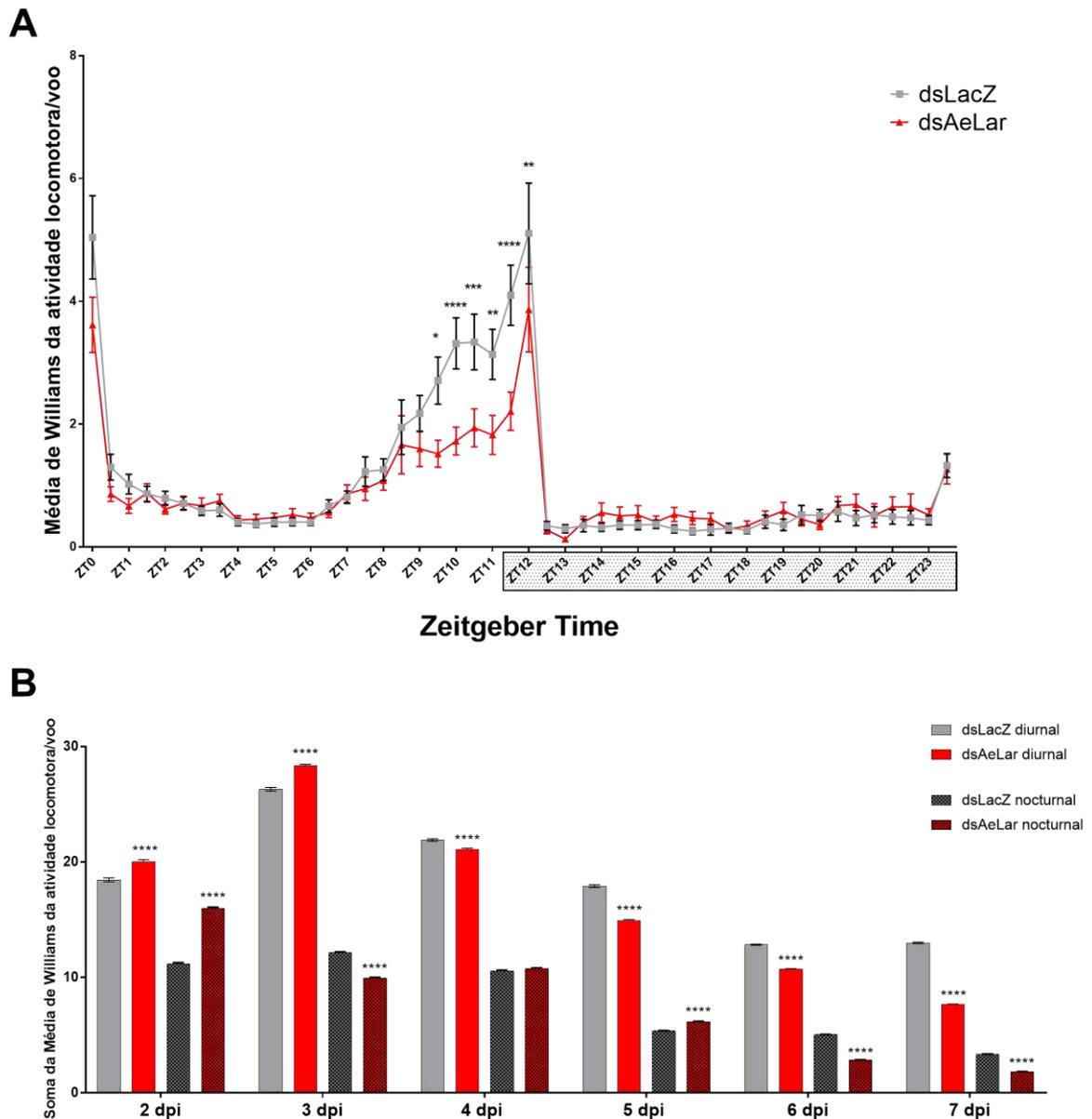


Figura S 4. Atividade locomotora/voo dos mosquitos silenciados. Mosquitos alimentados com sacarose 10% e silenciados para PTP AeLAR tiveram sua atividade de locomoção/voo avaliada por 7 dias, iniciado no segundo dia após a injeção, para permitir a aclimação dos grupos. A figura (A) mostra a atividade total observada durante todos os 7 dias de experimento, onde a área hachurada no eixo X indica o período em que a luz esteve apagada. A figura (B) mostra o perfil das atividades locomotoras diurnas (Após o ZT0 e antes do ZT12) e noturnas (Após o ZT12 e antes do ZT0) de cada dia. As atividades nos pontos ZT0 e ZT12 não foram incluídos no cálculo devido a discrepância da atividade. **** $p < 0.0001$. As comparações foram submetidas ao teste 2way ANOVA. Média \pm SEM. Os testes foram repetidos em 3 replicatas independentes. N = 60.

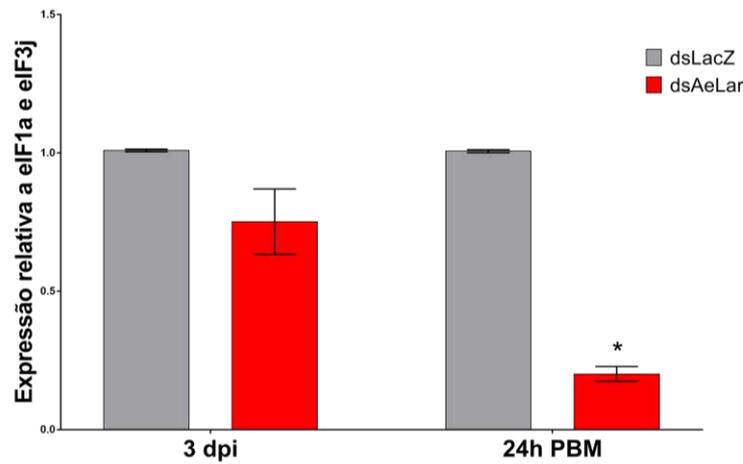


Figura S 5. Transcrição relativa de AeLAR no intestino médio 3 dpi e 24h PBM (4dpi). Mosquitos com 5h PE foram injetados e mantidos sob dieta de sacarose 10%. No terceiro dia pós-injeção, parte dos mosquitos tiveram seus intestinos dissecados, enquanto os mosquitos restantes foram alimentados com sangue. Dispondo de sacarose 10%, os mosquitos alimentados descansaram no insetário e 24h PBM, os intestinos de alguns mosquitos foram dissecados. A figura mostra o perfil transcricional da AeLAR 3 dpi e 24h pbm. * $p < 0.05$. As comparações foram submetidas ao teste t-student. N=2.

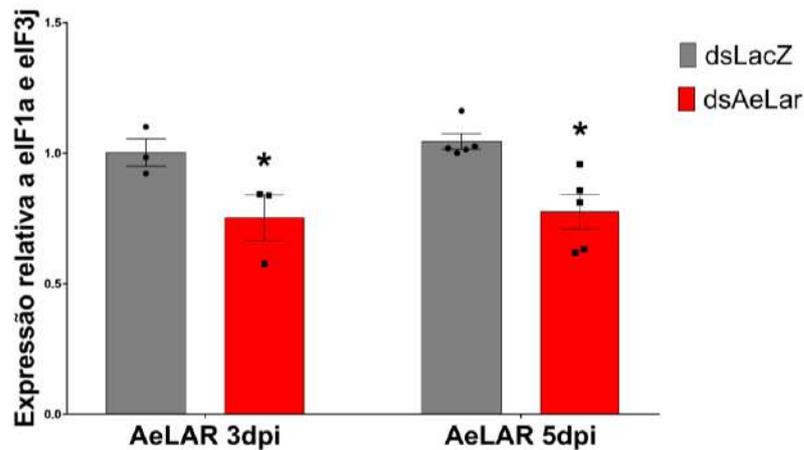


Figura S 6. Transcrição relativa de AeLAR na Cabeça 3 e 5 dpi. Mosquitos com 5h PE foram injetados e mantidos sob dieta de sacarose 10%. No terceiro dia pós-injeção, parte dos mosquitos tiveram suas cabeças dissecadas e armazenadas, enquanto os mosquitos restantes foram mantidos por mais dois dias nas mesmas condições no insetário. No quinto dia, os mosquitos restantes tiveram suas cabeças dissecadas e armazenadas para os procedimentos posteriores. A figura mostra o perfil transcricional da AeLAR 3 dpi (N=3) e 5dpi (N=5). * $p < 0.05$. As comparações foram submetidas ao teste t-student. Média \pm SEM.