

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

**Expressão diferencial da lipase brummer e níveis de triacilglicerol
em estágios de desenvolvimento e sob estresse alimentar em *Aedes
aegypti* (Diptera: Culicidae)**

Luan Valim dos Santos

Dezembro/2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Expressão diferencial da lipase brummer e níveis de triacilglicerol
em estágios de desenvolvimento e sob estresse alimentar em *Aedes
aegypti* (Diptera: Culicidae)**

LUAN VALIM DOS SANTOS

Sob orientação do professor

Emerson Guedes Pontes

Dissertação submetida ao programa de Pós
Graduação em Biologia Animal da UFRRJ,
como requisito para obtenção do grau de
Mestre em Ciências - Biologia Animal.

Seropédica, RJ

Dezembro/2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Divisão de Processamentos Técnicos

VS237e Valim dos Santos, Luan, 1994-
Expressão diferencial da lipase brummer e níveis de triacilglicerol em estágios de desenvolvimento e sob estresse alimentar em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) / Luan Valim dos Santos. - Seropédica, 2020.
69 f.

Orientador: Emerson Guedes Pontes.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, 2020.

1. Bioenergética. 2. Triacilglicerol. 3. Lipase. 4. *Aedes aegypti*. 5. Expressão gênica. I. Guedes Pontes, Emerson, 1974-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Biologia Animal III. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL



TERMO Nº 584 / 2020 - PPGBA (12.28.01.00.00.00.42)

Nº do Protocolo: 23083.069711/2020-83

Seropédica-RJ, 23 de dezembro de 2020.

LUAN VALIM DOS SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a)**, no Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração em Biodiversidade Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14/12/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação

EMERSON GUEDES PONTES
(Orientador)

LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO - UFAL

JERONIMO AUGUSTO FONSECA ALENCAR - FIOCRUZ

(Assinado digitalmente em 23/12/2020 11:12)
EMERSON GUEDES PONTES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matrícula: 1555317

(Assinado digitalmente em 23/12/2020 14:32)
LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 014.234.237-80

(Assinado digitalmente em 23/12/2020 11:53)
JERONIMO AUGUSTO FONSECA ALENCAR
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 005.893.247-05

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **584**, ano: **2020**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **23/12/2020** e o código de verificação: **3e552c37fa**

AGRADECIMENTOS

Após três anos de mestrado é muito comum ressaltar-se os desafios e lutas para chegar a essa conquista, porém, não quero me lembrar desses anos como sendo difíceis por se tratarem de várias experiências novas que demandavam muito de mim, ou cansativos por se tratarem de anos que dissequei milhares de insetos, desanimadores, em alguns momentos, por ter semanas perdidas por experimentos que deram errado, ou mesmo imprevisíveis, angustiantes e sofridos em meio a uma pandemia que testaram minha ansiedade a níveis que nunca experimentei.

Quero lembrar desse tempo como um período de aprendizagem e reconhecimento de que o resultado desses anos não se trata de uma conquista minha, mas uma conquista coletiva de todos que me deram forças e me ajudaram a superar as adversidades ou aliviaram os momentos difíceis que se apresentaram.

Agradeço a meus pais, José Ferreira dos Santos e Elsa Braga Valim dos Santos. São meus pilares de sustentação em todos os sentidos. Me auxiliam em tudo que precisei em todos os momentos, nunca me faltou nada graças a vocês. Foram fundamentais do início ao fim. Me deram segurança e confiança quando mais eu precisei. A maior parcela desse título é de vocês.

Agradeço a Jéssica Almeida Ribeiro Tito e Mayra Cristina de Souza Alves. Obrigado pelos ótimos finais de semana que vocês me proporcionaram, após momentos angustiantes eu podia voltar para casa e me encontrar com vocês apenas para rir juntos e de tudo. Celebramos vitórias e choramos algumas derrotas. Fico feliz em ver em quem temos nos tornado. Agradeço imensamente a vocês.

Agradeço a Lucas Soares Floriano. Meu amigo e companheiro. Foi você quem ouviu a maior parte das minhas lamentações e tristezas, foi um suporte constante e me deu forças para conseguir chegar até aqui. Foi você quem repetiu diversas vezes que eu era capaz de resolver os problemas e concluir essa fase da minha vida. Sou feliz por ter conhecido alguém como você.

Agradeço aos amigos que rural me deu. Muito obrigado Alex Valle, Ana Carolina Moterani, Diogo Pignatara Coimbra, Eduarda Gabriela Bento dos Santos da Silva, Fernanda Silva de Aguiar do Prado, Guilherme Guimarães Alves da Silva, Isaias Costa Gomes, Karoline Ibraim Tobias, Mateus Cavalcanti Alves e Thamires Rezende Araújo. Passamos muitos bons momentos juntos, rodízios de pizza no grill, conversar deitados durante o dia todo, assistir clipes na casa da Fê (coisa que a Carol odiava), discussões que viravam memes, comer estrogonofe de frango juntos a semana inteira, porque

era o que o dinheiro dava. Gente, muito obrigado por tantos momentos felizes que vocês me proporcionaram.

Agradeço a meu amigo e irmão, Mateus Cavalcanti Alves. Você me ajudou muito durante o tempo que dividimos apartamento. Obrigado pelos conselhos, favores e fraternidade que você me proporcionou nesse tempo.

Agradeço a Fernanda Silva de Aguiar do Prado e Ana Carolina Moterani por me alojarem sempre que precisei. Com vocês aprendo muito todo dia. São exemplos para mim em todos os sentidos. Muito obrigado. São aprendizados para a vida toda.

Agradeço a Elaine Rodrigues Miranda Mery da Silva, Luana Silva Nascimento Hastenreiter, Marcela de Souza Alves e Matheus Silva Caiado. Meus amigos de laboratório que estiveram comigo desde o início dessa trajetória, passamos por estresses coletivos juntos, mas sobrevivemos. Obrigado pelos favores, conselhos e dicas. As brincadeiras e sorrisos ou os roubos de presentes no amigo oculto do fim de ano, vocês foram muito importantes nesse processo. Vocês são pessoas incríveis.

Agradeço a Sabrina Rita da Fonseca Rezende. Você foi quem me ajudou a dar os meus primeiros passos dentro da ciência, herdei seus métodos e cuidados em realizar os experimentos de forma minuciosa. Mesmo sem obrigação você compartilhava seus conhecimentos experiências. Você é uma das pessoas mais empáticas e bem-humorada que conheci na vida. Obrigado pela sua dedicação comigo.

Agradeço a Emerson Guedes Pontes, meu orientador desde a iniciação científica. Obrigado por ter dedicado tanto tempo em me ensinar e corrigir. Amadureci muito como profissional após seus conselhos e o considero um exemplo de profissional que eu devo seguir.

Agradeço aos demais integrantes do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes pelo auxílio constante.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal que me proporcionou a oportunidade de fazer esse trabalho.

Agradeço aos professores que compartilharam comigo parte do seu conhecimento.

Agradeço aos membros da banca que prontamente aceitaram ao meu convite.

Agradeço a tudo e todos que me deram forças para continuar e concluir. Isso não se trata de um título meu, mas uma oportunidade de expressar que com a ajuda de vocês um garoto pobre de uma cidade abandonada pelo poder público, que estudou apenas em escolas municipais e estaduais teve a ajuda de vocês para conseguir chegar até aqui.

Sou grato. Sou feliz. Ter a oportunidade de conhecer e me relacionar com pessoas incríveis como vocês me tornou uma pessoa melhor não apenas por ter um título, mas por aprender a amar, cuidar e se preocupar com o mundo a nossa volta.

*“Tu te tornas eternamente responsável
por aquilo que cativas”.*

(Antoine de Saint-Exupéry)

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	4
Figura 2. Resumo da história de <i>Aedes aegypti</i> nos últimos 600 anos.....	5
Figura 3. Corte histológico transversal corado com hematoxilina e eosina da região do abdome de <i>Lutzomyia longipalpis</i> alimentada com açúcar evidenciando a distribuição do corpo gorduroso	12
Figura 4. Metabolismo de lipídios com destaque da lipólise em mamíferos e insetos.....	15
Figura 5. Esquema da estruturação bioinformática da brummer.....	17
Figura 6. Ação hormonal associada a eventos durante o primeiro ciclo gonadotrófico em fêmeas adultas de <i>Aedes aegypti</i>	18
Figura 7. Sequência de aminoácidos do gene brummer obtido do genoma de <i>Aedes aegypti</i>	25
Figura 8. Análise filogenética molecular da brummer em diferentes organismos.....	28
Figura 9. Níveis de expressão do gene brummer nas diferentes fases imaturas de <i>Aedes aegypti</i>	29
Figura 10. Expressão do gene brummer no corpo gorduroso de fêmeas adultas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas a diferentes tratamentos alimentares ao longo de 6 dias.....	31
Figura 11. Níveis de expressão do gene brummer no corpo gorduroso de fêmeas adultas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas a diferentes dietas ao longo de 6 dias comparativamente.....	32
Figura 12. Conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso de fêmeas adultas de <i>Aedes aegypti</i> submetidas a diferentes tratamentos alimentares ao longo de 6 dias.....	33
Figura 13. Análise filogenética molecular de relação entre diferentes lipases de <i>Aedes aegypti</i>	35
Figura 14. Níveis de expressão do gene brummer no corpo gorduroso de fêmeas adultas de <i>Aedes aegypti</i> horas após uma alimentação sanguínea.....	37
Figura 15. Conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso de fêmeas adultas de <i>Aedes aegypti</i> horas após uma alimentação sanguínea.....	39

Índice de Tabelas

Tabela 1. Comparação entre a sequência de aminoácidos da brummer de <i>Aedes aegypti</i> e outras espécies.....	27
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

20E	20-Hidroxiecdisona
AKH	Hormônio Adipocinético
AKHR	Receptor do Hormônio Adipocinético
ATGL	Lipase triglicéridica adiposa
bmm	Brummer
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclica
CGI-58	Gene Comparativo de Identificação 58
DAG	Diacilglicerol
FA	Ácido graxo
JH	Hormônio juvenil
HSL	Lipase hormônio sensível
Lsd1	Lipid storage droplet 1
MAG	Monoacilglicerol
PAS	Pós-alimentação sanguínea
PE	Pós-emergência
PKA	Proteína Cinase A
Plin	Perilipina
TAG	Triacilglicerol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO LITERÁRIA	3
2.1 Biologia de <i>Aedes aegypti</i>	3
2.2 Aspectos epidemiológicos, históricos e sociais.....	4
2.3 Ciclo de vida	7
2.4 Metabolismo de Lipídios.....	8
2.4.1 Corpo gorduroso: Estrutura e função	9
2.4.2 Absorção, estoque e mobilização de lipídios	12
2.4.3 Brummer/ATGL.....	15
2.5 Regulação de processos reprodutivos mediada por hormônios.....	17
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4. METODOLOGIA	21
4.1 Manutenção da colônia de <i>Aedes aegypti</i>	21
4.2 Identificação e caracterização da brummer utilizando bioinformática e a comparação com outros organismos	21
4.3 Desenho de Primers.....	22
4.4 Isolamento dos Tecidos.....	22
4.5 Isolamento/Extração do RNA	22
4.6 Síntese de cDNA.....	23
4.7 Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR).....	23
4.8 Quantitative PCR (qPCR)	23
4.9 Extração de Lipídios e Quantificação de Triacilglicerol.....	24
4.10 Análise Estatística	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Identificação, caracterização bioinformática e comparação com outros organismos	25
5.4 Ocorrência de triacilglicerol no corpo gorduroso em insetos adultos em condições normais ou submetidos a jejum.....	32
5.5 Diferenciação nos níveis de brummer e TAG no terceiro dia após a emergência em adulto.....	34
5.6 Relação da brummer com outras lipases identificadas na literatura.....	35
5.7 Efeitos de uma alimentação sanguínea nos níveis de brummer e TAG	36
5.8 Relação entre a expressão nos níveis de brummer e os estoques lipídicos	40

6. CONCLUSÕES.....	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	42

SANTOS, Luan Valim dos. Expressão diferencial da brummer e níveis de triacilglicerol em estágios de desenvolvimento e sob estresse alimentar em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). 2020. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal, Biodiversidade). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2020.

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) é o principal vetor da febre amarela, dengue, Chikungunya e Zika. O armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol (TAG) é essencial durante o ciclo de vida de mosquitos, pois permite a transformação do corpo durante a fase de pupa e suporta o gasto energético durante a fase inicial da vida adulta e maturação reprodutiva. A brummer (bmm) é uma lipase da família das patatin-like, que realiza a hidrólise das ligações ésteres do TAG liberando ácidos graxos que servem de substrato energético na β -oxidação, suportando as demandas energéticas em insetos. O presente trabalho investigou a relação entre a bmm e os estoques de TAG no corpo gorduroso de *Ae. aegypti* utilizando ferramentas de bioinformáticas, de biologia molecular e bioquímica. Para identificar a bmm no genoma de *Aedes aegypti* foi utilizada como referência a bmm identificada no genoma de *Drosophila melanogaster* e análises bioinformáticas comparativas inferiram a relação com outros organismos. Após a identificação, os níveis de expressão da bmm foram determinados através de qPCR e os níveis de TAG foram inferidos através de cromatografia de camada fina. A expressão de bmm foi diferenciada na fase larval e nos corpos gordurosos do inseto adulto, acompanhando a dinâmica das reservas de TAG. Nos estágios larvais L3, L4 e pupa, a bmm foi expressa três vezes mais em comparação com os estágios L1 e L2. No corpo gorduroso pós-emergência (PE) e pós alimentação sanguínea de animais adultos, a expressão variou ao longo dos dias analisados. Quando os animais adultos após a emergência foram submetidos ao jejum, sob ausência de sacarose, observou-se um aumento muito pronunciado a partir do terceiro dia em relação aos animais alimentados com sacarose 10%. Foi observada uma diminuição significativa nos níveis de TAG a partir do terceiro dia, o que sugere a participação de bmm no processo. Os níveis de TAG aumentaram, seis horas após a alimentação com sangue, sugerindo um processo de acúmulo de reservas lipídicas para garantir a oogênese e reprodução. A bmm em *Ae. aegypti* responde positivamente ao jejum e provavelmente está envolvida na mobilização das reservas de TAG no corpo gorduroso dos mosquitos adultos.

Palavras chaves: larva, corpo gorduroso, estoque lipídico, lipase.

ABSTRACT

SANTOS, Luan Valim dos. Diferencial expression of brummer and levels of TAG in different developmental stages and starvation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). 2020. Dissertation (Master Science in Animal Biology, Biodiversity). Instituto de de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2020.

The *Aedes aegypti* mosquito (Linnaeus 1762) is the main vector of yellow fever, dengue, Chikungunya and Zika. The storage of lipids in the form of triacylglycerol (TAG) is essential during the life cycle of mosquitoes, as it allows for the transformation of the body during the pupal phase and supports energy expenditure during the initial phase of adult life and reproductive maturation. Brummer (bmm) is a lipase of the patatin-like family, which performs the hydrolysis of TAG ester bonds by releasing fatty acids that serve as an energetic substrate for β -oxidation, supporting the energy demands of insects. The present work investigated the relationship between bmm and TAG stocks in *Ae. aegypti* fatty body using bioinformatics, molecular biology and biochemistry tools. To identify bmm in the *Aedes aegypti* genome, the bmm identified in the *Drosophila melanogaster* genome was used as a reference, and comparative bioinformatics analyzes inferred the relationship with other organisms. After identification, bmm expression levels were determined using qPCR and TAG levels were inferred through thin layer chromatography. The bmm expression was differentiated in the larval phase and the adult insect fat bodies, following the dynamics of TAG reserves. In larval stages L3, L4, and pupa, Bmm was expressed three times as much compared to stages L1 and L2. In the post-emergence and post-blood-meal fat body of adult animals, the expression varied over several days. When post-emergence adult animals were fasted, without sucrose, there was a very pronounced increase from the third day onwards compared to animals that did not fast with 10% sucrose. A significant decrease in TAG levels was observed from the third day on, which suggests the participation of bmm in the process. TAG levels increased, six hours after feeding with blood, TAG levels increased, suggesting a process of accumulation of lipid reserves to ensure oogenesis and reproduction. A bmm in *Ae. aegypti* responds positively to fasting and regulates it is probably involved in the mobilization of TAG reserves in the body of fat at the dose of adult mosquitoes.

Key Words: larvae, fat body, lipid storage, lipase.

1. INTRODUÇÃO

Os Lipídios são moléculas essenciais para a manutenção da vida. Nos insetos possuem papéis chave no metabolismo e desenvolvimento, mais especificamente em processos como metamorfose, reservas energética, diapause, componentes cuticulares e produção de feromônios, (ARRESE et al., 2001; HAHN; DENLINGER, 2007). Em *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762), o mosquito vetor de arbovirus transmissores da febre amarela, dengue, Chikungunya, Mayaro e Zika (ZARA et al., 2016), a estocagem de lipídios na forma de triacilglicerol (TAG) é particularmente importante durante o ciclo de vida, pois viabiliza a transformação corporal durante o estágio de pupa e suporta grande parte do gasto energético durante a fase inicial da vida adulta e no processo de amadurecimento reprodutivo (ARRESE et al., 2001; GONDIM et al., 2018). O metabolismo energético de insetos é fundamental para sua sobrevivência, e o corpo gorduroso se mostra muito importante no funcionamento harmônico, sendo ele imprescindível nessa homeostase. Alabaster et al. (2011) observou que a grande parte dos lipídios presentes no corpo gorduroso de *Ae. aegypti* no primeiro ciclo gonadotrófico são provenientes dos estágios larvais, porém, Ziegler & Ibrahim (2001) concluíram que a síntese de lipídios *de novo* via alimentação do adulto também ocorre. Além disso, a manutenção da homeostase energética se torna fundamental, a medida que animais se expõem a condições ambientais diversas, como a supressão alimentar ou por algum fator temporal/sazonal ao qual os insetos são submetidos. A regulação finamente ajustada na lipogênese e na lipólise definem os níveis de lipídios nas células. Nos insetos a principal forma de estocagem de TAG se dá em células especializadas do corpo gorduroso, chamadas trofócitos, que contém também carboidratos de reservas na forma de glicogênio (ARRESE; SOULAGES, 2010; BEACH, 1965; LOCKE, 1984; MARTINS et al., 2011a; ROMA; BUENO; CAMARGO-MATHIAS, 2010). A mobilização dos estoques lipídicos ocorre por ação de lipases conhecidas como triacilglicerol hidrolases (EC 3.1.1.3), tendo como principal função a hidrólise de ligações carboxilésters presentes em TAG, Diacilglicerol, galactolipídios e fosfolipídios (HORNE; HARITOS; OAKESHOTT, 2009), contribuindo para regulação desses processos em mosquitos.

A brummer (bmm) é uma lipase, da família das *patatin-like phospholipase*, que realiza a hidrólise das ligações ésteres do TAG liberando ácidos graxos que servem de substrato energético na β -oxidação, suportando as demandas energéticas do animal (GRÖNKE et al., 2007). A bmm foi observada altamente expressa no corpo gorduroso, intestino médio e seco gástrico de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (GRÖNKE et al., 2005). Em *Bombyx mori* Linnaeus, 1758, ela foi bem frequente no corpo gorduroso e intestino médio no quarto estágio

larval (WANG et al., 2010), assim como em larvas de *Glossina morsitans* Westwood, 1851 (ATTARDO et al., 2012). Em *Nilaparvata lugens* (Stål 1854), ela foi altamente expressa no corpo gorduroso, seguida pelos ovários (ZHOU et al., 2018a).

2. REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Biologia de *Aedes aegypti*

Ae. aegypti é um díptero pertencente à família Culicidae. Possui amplo espectro de distribuição entre os trópicos nas regiões quentes e úmidas (KRAEMER et al., 2015; LETA et al., 2018). O aumento global da temperatura prevista para o fim do século XXI, que tem se intensificado através do acúmulo de gases do efeito estufa, vem sendo relacionado a ampliação desse espectro (COFFEL; HORTON; DE SHERBININ, 2018; IWAMURA; GUZMAN-HOLST; MURRAY, 2020; UPSHUR et al., 2019). Esse mosquito possui hábitos diurnos, porém, na presença de luz artificial pode ser altamente ativo durante períodos noturnos (TAVEIRA; FONTES; NATAL, 2001). Sua atividade também foi associada a abundância de recursos energéticos (BEACH, 1965; FOSTER, 1995), a presença de fartas e contínuas de fontes de glicose geram o acúmulo de lipídios no corpo gorduroso que suscitam maior motilidade em adultos de *Ae. aegypti* (UPSHUR et al., 2019).

O mosquito *Ae. aegypti* possui dois nichos ecológicos distintos dependendo do estágio em que ele estiver. Durante as fases larvais, eles vivem em ambientes aquáticos se alimentando de matéria orgânica suspensa na coluna d'água (TAVEIRA; FONTES; NATAL, 2001). Já os adultos, transcorrem entre ambientes terrestres e aéreos captando sacarose produzida por plantas ou através de outras fontes disponíveis em meios urbanos, sua fonte primária de energia são açúcares (NATAL, 2002). Fêmeas adultas possuem particularidades quanto aos machos, ao alcançar a maturidade sexual, elas procuram por parceiros para realizarem a cópula e, após isso, buscam hospedeiros para se alimentarem com sangue que disponibilizará a ela recursos essenciais para a geração de sua prole (GONDIM et al., 2018).

Após emergir do ovo, as larvas nadam ativamente em busca de alimentos para aquisição de nutrientes para sobreviverem por quatro instares, seguido pela fase de pupa que se caracteriza pelo cessamento da alimentação até emergir em adulto (Figura 1) (TAVEIRA; FONTES; NATAL, 2001). A formação de reservas é associada a capacidade de crescimento, longevidade e fecundidade (BRIEGEL, 1990). Mosquitos adultos que possuíram dietas deficientes durante a vida larval tiveram seu fitness reduzido, resultando na diminuição de ovos postos e na taxa de eclosão dos mesmos (PRICE et al., 2015; TAKKEN et al., 2013).

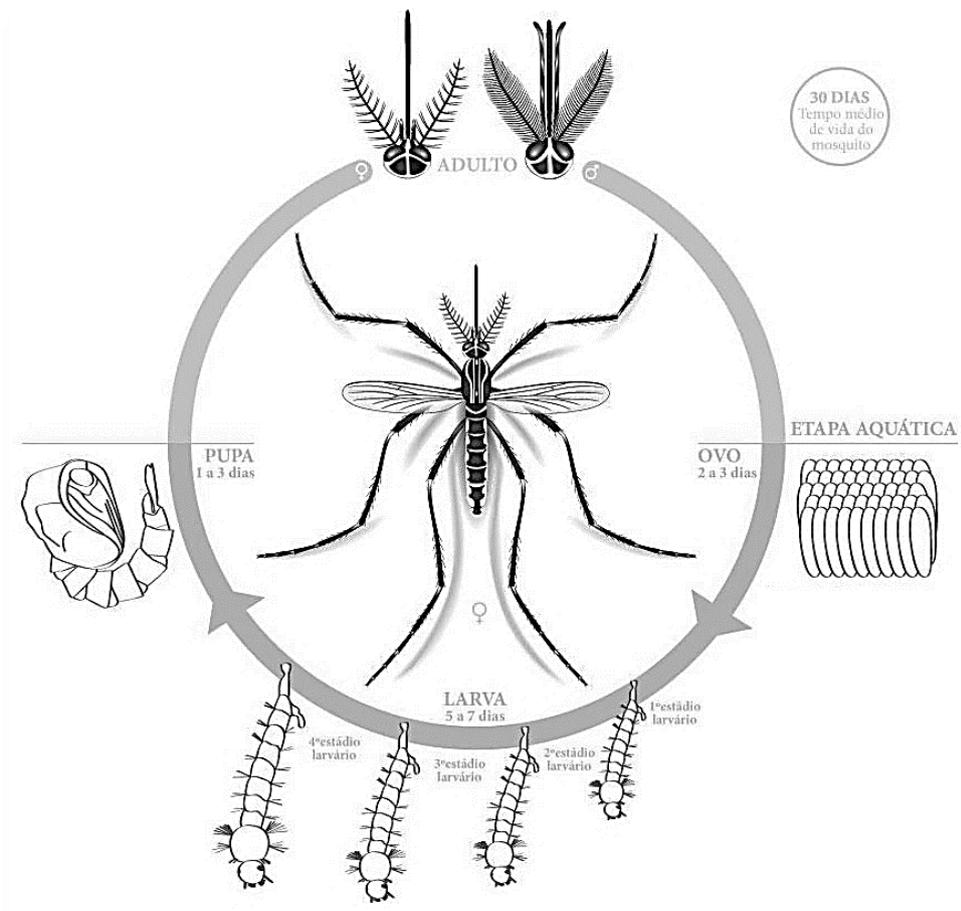


Figura 1. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Representando a emergência de larvas a partir dos ovos após entrarem em contato com a água acarretando na emergência de larvas, seguido por uma fase de pupa que se metamorfoseará emergindo adultos. A diferenciação entre a cabeça de fêmeas e machos também é notada através de adaptações morfológicas nas antenas e probóscide. Fonte: casadaciencia.org.

2.2 Aspectos epidemiológicos, históricos e sociais

A população humana cresce exponencialmente através dos avanços tecnológicos que possibilitam maior expectativa de vida e sucesso no combate a enfermidades. Segundo a Worldometer, em 2011 a população de *Homo sapiens* atingiu o número de 7 bilhões de indivíduos, projeta-se que alcance 8 bilhões em 2023, 9 bilhões em 2037 e 10 bilhões de pessoas no ano de 2055 (KUNZE et al., 2013). O crescimento populacional gera demanda por ocupação do espaço, e, conseqüentemente, a invasão do homem a habitats nativos de outras espécies. A ocupação humana em novos territórios foi altamente correlacionada com a extinção de megafauna em um curto período de tempo (ARAÚJO et al., 2017), provavelmente motivado

pela caça ou por fatores indiretos da modificação do meio, além de várias outras extinções locais de espécies menores. Uma opção para a sobrevivência dessas espécies nativas é adaptar-se ao novo meio convivendo com populações humanas, ou seja, a domesticação. Insetos que requerem uma alimentação com sangue, geralmente desenvolvem preferência pela fonte mais disponíveis e estável, como mamíferos e aves (POWELL & TABACHNICK, 2013), dentre os mamíferos podemos destacar os seres humanos.

A hipótese mais aceita proposta por Tabachnick (1991) (Figura 2) sugere que o descendente de *Ae. aegypti* domesticado é nativo da África subsaariana, eventualmente migrou para o norte da África através do deserto do Saara em um período em que a região era semi-fértil. De 4000-6000 anos atrás, ocorreu o ressecamento local que dura até hoje, os mosquitos se adaptaram as novas condições ambientais através da postura dos ovos em depósitos de água humano que era o reservatório de água mais disponível (POWELL et al, 2018; POWELL & TABACHNICK, 2013; TABACHNICK, 1991). A presença humana na região foi determinante para impedir que o fator limitante da área de distribuição do culicídeo se mantivesse. O estabelecimento de modificações no meio e a fundação de vilas e cidades, gerou ao mosquito a opção, não ideal, porém atrativa para a sobrevivência frente a pressão natural.

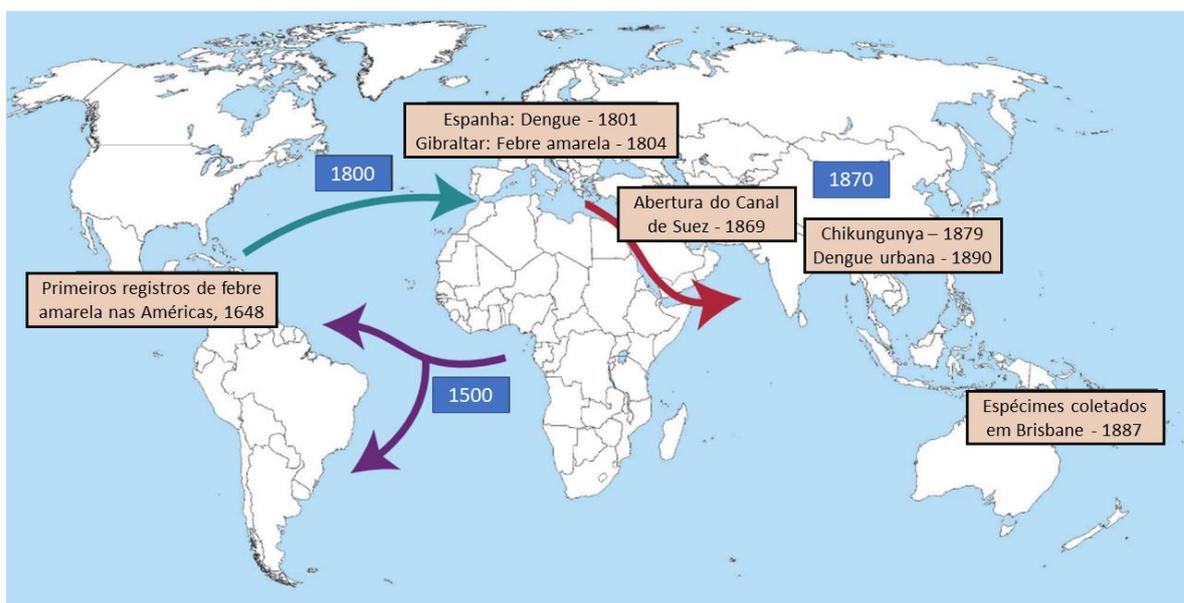


Figura 2. Resumo da história de *Aedes aegypti* nos últimos 600 anos. As rotas de movimento propostas são mostradas por setas com datas aproximadas. Os principais eventos epidemiológicos foram anotados em caixas. Adaptado de Powell et al (2018).

O mosquito *Ae. aegypti* domesticado se diferenciou de seu descendente selvagem. A nível de diferenciação, foram separados em duas subespécies: a espécie domesticada passou a ser chamada de *Ae. aegypti aegypti* e a espécie selvagem de *Ae. aegypti formosus* (TABACHNICK, 1991). Estima-se que o isolamento completo sem fluxo gênico ocorreu a cerca de 400-550 anos após a divergência ecológica/comportamental entre as duas subespécies (POWELL et al, 2018). *Ae. aegypti aegypti* se disseminou em zonas urbanas e *Ae. aegypti formosus*, manteve-se no ambiente natural fazendo posturas em buracos de árvores e se alimentando de outros animais.

O isolamento completo entre as duas subespécies ocorreu já nas Américas. Durante o período das grandes navegações, no século XVI, mercadores de escravos realizavam o trajeto entre a costa oeste da África, a América e, eventualmente, para a Portugal (ELTIS & RICHARDSON, 2015; POWELL et al, 2018). Na viagem de 2 a 4 meses os navios partiam abastados de água para atravessar o oceano atlântico e com ela, ovos e larvas de *Ae. aegypti* (TABACHNICK, 1991). Esse foi o fator determinante para dispersão de muitas espécies, inclusive, o mosquito citado. O novo continente, quente e úmido, se tornou ideal para o desenvolvimento do mosquito que conseguiu se disseminar rapidamente. O primeiro registro da ocorrência do mosquito nas Américas é datado por 1648 em Havana e Yukatan (MAY, 2006). Segundo Powell *et al* (2018, *apud* AITKEN *et al*, 1979), por volta de 1600 já haviam populações de *Ae. aegypti* estabelecidas ao ponto de gerarem epidemias de febre Amarela no México e em grande amplitude na América Central, reforçando a capacidade de adaptabilidade a ambientes quentes e úmidos. Hoje ele está presente nos trópicos e subtropicais, em praticamente todo o continente americano, na África subsaariana, no sudeste da Ásia e em toda a Índia (KRAEMER et al., 2015).

Provavelmente, o Brasil foi o primeiro país fora da África a receber esse díptero, considerando o modelo de Eltis e Richardson (2010) que afirmou haver um grande fluxo de navios entre a África e a costa brasileira (ELTIS & RICHARDSON, 2015). Porém, por conta de uma campanha de eliminação do mosquito por inseticidas entre os anos de 1950 e 1970, ele foi erradicado do país e, posteriormente, houve a recolonização por populações de *Ae. aegypti* contidas em outros países (KOTSAKIOZI et al., 2017). Ainda hoje, há programas governamentais que tentam minimizar a população de mosquitos através de campanhas de apelo sobre a necessidade de evitar manter recipientes com água acessível ao díptero.

Arbovírus que causam doenças como a febre amarela, dengue, chikungunya e zika são vetoradas pelo mesmo mosquito (ZARA et al., 2016) e geram muito investimento

governamental em saúde pública em regiões tropicais e neotropicais. Nos últimos anos, houve um aumento global na incidência de doenças causadas por arbovírus, segundo Gould *et al* (2017), a emergência e dispersão de arbovírus são mais rápidas devido ao crescimento e facilitação de vias de transporte, adaptação do vetor ao meio urbano e a falha humana em conter o aumento da densidade populacional de mosquitos (GOULD *et al.*, 2017), sendo bem fundamentado na literatura que ocorre a facilitação da dispersão desses insetos em longas distâncias em curtos períodos de tempo através de transporte passivo em automóveis (GLAESSER *et al.*, 2017a, 2017b; GUBLER, 2011). Estima-se que cerca de 4 bilhões de pessoas vivem em áreas com risco de transmissão de dengue (BRADY *et al.*, 2012). No Brasil em 2018, foram notificados 265.934 casos de dengue que gerou 155 óbitos, 87.687 de chikungunya que gerou 81 óbitos e 8.680 de zika (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018). Calculou-se que em 2016, no Brasil, foram gastos 2,3 bilhões de reais com inseticidas, larvicidas, cuidados médicos e outras causas indiretas, como a morbidez gerada semanas após os casos, impedindo e/ou dificultando a produtividade (TEICH *et al.*, 2017).

O impacto de *Ae. aegypti* se mostra relevante tanto em níveis sociais, quanto econômicos impactando diretamente comunidades mais pobres. Além disso, o uso indiscriminado de inseticidas e larvicidas com alta toxicidade pode gerar sérias implicações ambientais através da contaminação de outros organismos vivos no meio.

2.3 Ciclo de vida

Os ovos do mosquito são depositados em superfícies úmidas, ao qual, se aderem fortemente ao local sendo, frequentemente, vistos pouco acima de recipientes com água. Possuem grande resistência física e a fatores ambientais, como ressecamento, e quando entram em contato com a água a larva eclode (TAVEIRA; FONTES; NATAL, 2001). Já foi relatado que esses ovos altamente resistentes se mantendo viáveis nos primeiros 30 dias após a postura, porém, alguns ovos podem eclodir após 90 dias (FARNESI *et al.*, 2019) decorrente de suas adaptações metabólicas para resistir a dessecação (DA SILVA *et al.*, 2019).

Ae. aegypti possui quatro instares larvais com cerca de 24h de espaçamento entre cada instar, sucedidos por um estágio de pupa que viabiliza a reconstrução corporal (Figura 1). As pupas não se alimentam e passam a maior parte do tempo imóveis flutuando sob o espelho

d'água. Após mais ou menos dois ou três dias, uma fenda é aberta em seu dorso onde emerge um mosquito adulto (NELSON, 1986).

Os adultos vivem cerca de 30 dias e, durante esse período, irão amadurecer, copular e, no caso das fêmeas após uma alimentação sanguínea, irão pôr ovos que darão início a um novo ciclo (FARNESI et al., 2019; TAVEIRA; FONTES; NATAL, 2001).

Para que esse ciclo ocorra é necessário ferramentas de controle muito precisas. O amadurecimento dos indivíduos é regulado por ação do hormônio juvenil (JH) e a 20-hidroxicidisona (20E) que são hormônios que regulam o processo de muda, metamorfose e reprodução em insetos (JINDRA; PALLI; RIDDIFORD, 2013; SCHWEDES; CARNEY, 2012).

2.4 Metabolismo de Lipídios

O estabelecimento ou utilização de reservas lipídicas são reguladas por sinalizações, tanto do sistema nervoso central, como do sistema nervoso periférico realizando interações altamente precisas com fígado, enterócitos e miócitos, afim de manter a homeostase nos mamíferos (RODGERS; TSCHÖP; WILDING, 2012; SHI; BURN, 2004). A oxidação completa de carboidratos e proteínas produz cerca de 4 kcal/g, enquanto a oxidação de ácidos graxos, dependendo do tamanho da cadeia, pode produzir mais que o dobro dessa quantidade, cerca de 9 kcal/g, reforçando ainda mais a razão pelo qual os lipídios são usados como o principal reservatório de energia na maioria dos organismos vivos (KLOWDEN, 2013). A regulação do metabolismo de lipídios é fundamental para manutenção da vida.

Vários exemplos na natureza mostram a importância dos lipídios o que torna a aquisição de reservas energéticas fundamental, a medida que a exposição a condições ambientais diversas com a possibilidade de ocorrer supressão nutricional por indisponibilidade de alimentos no meio ou por algum fator temporal/sazonal que podem exercer influência nos animais. As aves, por exemplo, necessitam de muita energia para manterem dias de voos realizando paradas transitórias para descanso e alimentação. Para isso, alguns pássaros pequenos aumentam cerca de 10% da massa corporal por dia de parada para suportar as demandas energéticas (ALERSTAM & LINDSTRÖM, 2011). Uma outra contribuição importante dos lipídios, está relacionada a manutenção de seus estoques para o sucesso evolutivo de mamíferos hibernantes, indivíduos que conseguem manter maiores quantidade dessas reservas após o estado de torpor gastam menos tempo se alimentando para reestabelecer sua condição ideal para um fitness

adequado e, conseqüentemente, possuem mais tempo para investir em reprodução (GEISER & KENAGY, 1993).

A homeostase do metabolismo de lipídios é igualmente importante para insetos. Nos insetos holometabólicos, a aquisição de reservas energéticas desde a emergência dos ovos se faz importante para suprir o rápido crescimento corporal que ocorre. Foi observado por Silva et al., (2020) que larvas de *Ae. aegypti* sob condições de estresse influenciam os fenótipos expressos por adultos, alterando, até mesmo, nos níveis lipídicos. Além disso, a metarrose acentuada desses animais é notavelmente caracterizada pela transição de pupas, onde há pouca ou nenhuma aquisição energética para adulto e, para ocorrer sucesso nesse processo, é necessário haver estocagem energética das larvas para viabilizar o processo de remodelamento do corpo (ARRESE et al., 2001; HAHN & DENLINGER, 2007). Além de ser indispensável para a suprir as demandas metabólicas de adultos, seja em busca de nutrientes, seja para a reprodução (NATION, 2016). Lipídios também são associados a diapausa, síntese de hidrocarbonetos na formação da cutícula e precursores de feromônios (CANAVOSO et al., 2001). Logo, a manutenção de lipídios é uma estratégia fundamental adotada pelos metazoários para viabilizar a sobrevivência após longos períodos de privação de alimentos.

2.4.1 Corpo gorduroso: Estrutura e função

O corpo gorduroso é um órgão multifuncional central na regulação da homeostase de insetos, sendo um órgão de estoque lipídico e sintetizador substâncias envolvidas no metabolismo intermediário, e múltiplos precursores liberados na hemolinfa, incluindo substâncias necessárias para reprodução e locomoção (BEACH, 1965; GONDIM et al., 2018; NATION, 2016; ZIEGLER; IBRAHIM, 2001). Além disso, esse órgão atua no sistema imunológico através da síntese de peptídeos antimicrobianos e atuando na resistência aos inseticidas e outras moléculas tóxicas aos insetos (AZEEZ; MEINTJES; CHAMUNORWA, 2014; HU et al., 2016). É um importante órgão endócrino nos insetos estando envolvido na produção de hormônios que atuam no processo de muda, como a 20E, de fatores de crescimento do disco imaginal em embriões (IDGFs) e de fatores de crescimento relacionados à adenosina desaminase (ADGFs) que também está relacionado a proliferação do disco imaginal (CHAPMAN, 2013; LORD; BROWN, 2012). Isso resulta na frequentemente associação, quanto às suas funções metabólicas ao fígado dos vertebrados (CHAPMAN, 2013; NATION, 2016; SØNDERGAARD, 1993; YONGMEI XI, 2015).

Em geral, o corpo gorduroso é um agregado celular esbranquiçado que se distribui por todo o corpo do inseto atuando como tecido conjuntivo, porém, se encontra de forma majoritária no abdome (ASSIS et al., 2014; NATION, 2016; ROMA et al., 2010). O órgão se divide em dois tipos de acordo com sua localização no corpo: periférico e perivisceral (Figura 3). O corpo gorduroso periférico se localiza abaixo do tegumento e está associado ao sistema muscular do animal, enquanto o corpo gorduroso perivisceral é encontrado em torno de órgãos, principalmente os que estão associados a região posterior do trato digestivo (ASSIS et al., 2014; CHAPMAN, 2012; MARTINS & PIMENTA, 2008; ROMA et al., 2010; TURGAY-İZZETOĞLU & GÜLMEZ, 2019). Em *Ae. aegypti* foi observado que o corpo gorduroso periférico e perivisceral nas fases larvais, em contraponto com a fase adulta que ocorre apenas o corpo gorduroso periférico (MARTINS; PIMENTA, 2008). O corpo gorduroso está sujeito a alterações conformacionais e espaciais mediante a respostas fisiológicas. Tais mudanças são associadas a dieta e fisiologia do inseto. Trabalhos tem relatado uma hipertrofia consequente do acúmulo de lipídios após uma dieta rica em açúcar e um achatamento após uma alimentação sanguínea, pois há a expansão do intestino para comportar mais sangue que o comprime contra a parede interna do corpo do animal (MARTINS; PIMENTA, 2008).

Em mosquitos apenas dois tipos celulares estão presentes, oenócitos e trofócitos (CANAVOSO et al., 2001; JOHNSON; BUTTERWORTH, 1985), sendo o último, o principal tipo celular que constitui a estrutura básica do órgão, por serem as maiores e mais abundantes células nesse tecido tendo o percentual de trofócitos para oenócitos variado de 94.1 a 91.2% e 5.9 a 9.8%, respectivamente, em fêmeas adultas de *Ae. aegypti* (MARTINS et al., 2011b).

Análises de ultraestrutura em *Ae. aegypti* revelaram que os oenócitos possuem numerosos vacúolos digestivos e densas mitocôndrias que conferem ao seu citoplasma uma natureza ácida (MARTINS et al., 2011d; ROMA; BUENO; CAMARGO-MATHIAS, 2010). Essas estruturas estão associadas a defesa inata, a partir da detecção de patógenos através de um sistema de reconhecimento de invasores, onde secretam peptídios que podem rapidamente atingir concentrações efetivas no combate do agente patogênico (MARTINS et al., 2011b; TZOU et al., 2002). A presença de gotículas de lipídios é comumente observada no citosol com a presença de um retículo endoplasmático liso muito desenvolvido, o que indica uma intensa atividade relacionada a eventos lipogênicos (ARRESE; SOULAGES, 2010; MARTINS et al., 2011d). A manutenção dos baixos níveis de lipídios na hemolinfa é facilitado pela ocorrência dos oenócitos em contato íntimo com os nutrientes circulantes nela através da interação com transportadores, como lipoforinas (lipoproteínas transportadoras) (MARTINS; RAMALHO-

ORTIGÃO, 2012). Essas células podem estar agregadas ou isoladas no corpo gorduroso estando concentradas no corpo gorduroso periférico (MARTINS et al., 2011c; RUVOLO; LANDIM, 1993; WIGGLESWORTH, 1942). A síntese de sinalizadores também é observada no corpo gorduroso, através de ensaios com oenócitos de larvas de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758, Romer et al., (1974) observaram que tais células sintetizam α - e β -ecdisona a partir de colesterol, além de auxiliar na muda com a produção de 20-hidroxiecdisona (20E) auxiliando no processo de muda, contribuindo para a estrutura da cutícula e suas propriedades fisiológicas (RUVOLO; LANDIM, 1993). Além disso, possui membranas invaginadas que ampliam a superfície de contato com a hemolinfa, visto que ocorre, principalmente, na região marginal do órgão amplificando sua atuação (MARTINS et al., 2011c).

O outro tipo celular que ocorre no corpo gorduroso de mosquitos são os trofócitos que possuem o citoplasma rico em gotículas de lipídios, grânulos proteicos, açúcares e precursores de vitelo, ribossomos livres, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi (ARRESE; SOULAGES, 2010; MARTINS et al., 2011c; ROMA; BUENO; CAMARGO-MATHIAS, 2010). Assis et al., (2014) mostraram que após uma alimentação com sangue, o citoplasma dos trofócitos é enriquecido com mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, sendo muito mais evidente quando comparado com fêmeas que se alimentaram apenas com sacarose (ASSIS et al., 2014). A concentração de trofócitos varia de acordo com a fase de vida e os estoques energéticos que começam a se estabelecer nas fases larvais, sendo muito mais abundante em pupas e em fêmeas adultas, evidenciando o investimento energético na metamorfose e na reprodução (TURGAY-İZZETOĞLU; GÜLMEZ, 2019; ZHOU; PENNINGTON; WELLS, 2004).

Os lipídios mais frequentemente encontrados nas células são lipídios neutros e fosfolipídios. Reservas lipídicas presentes no corpo gorduroso são comumente encontrados na forma de lipídios neutros, como o TAG, além de intermediários da sua metabolização na forma de DAG e MAG, e também ocorrem fosfolipídios como constituintes de membranas celulares (HORNE; HARITOS; OAKESHOTT, 2009). O TAG presente no corpo gorduroso está diretamente correlacionado a condição alimentar do inseto. Em alguns insetos, mais de 90% do estoques lipídicos no corpo gorduroso estão na forma de TAG que são obtidos diretamente através da dieta ou a partir da síntese de lipídios *de novo* (CANAVOSO et al., 2001; GONDIM et al., 2018).

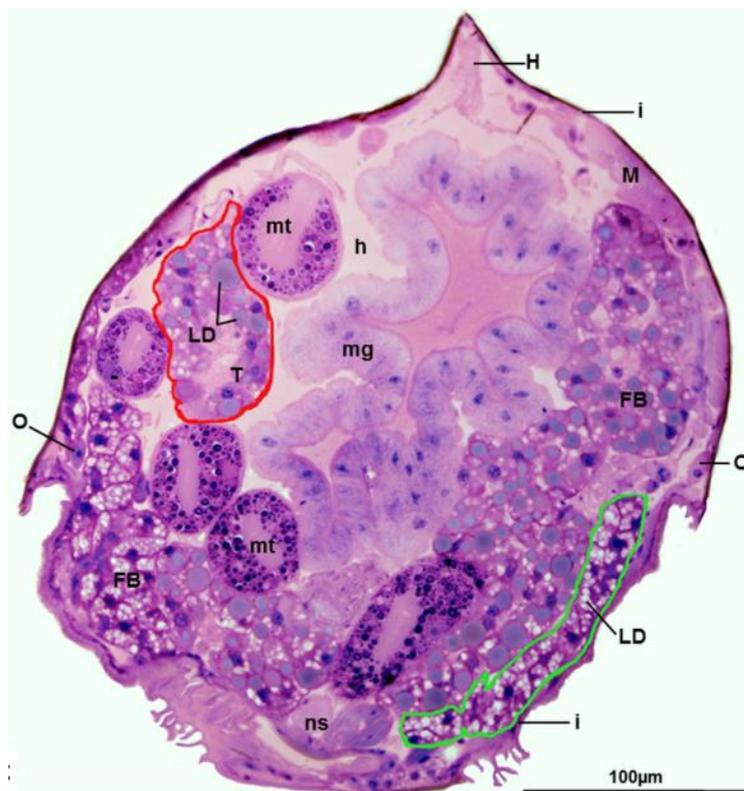


Figura 3. Corte histológico transversal corado com hematoxilina e eosina da região do abdome de *Lutzomyia longipalpis* alimentada com açúcar evidenciando a distribuição do corpo gorduroso. Os lobos corpo gorduroso (FB) perivisceral (circulado em vermelho) e o periférico (circulado em verde) estão indicados. Trofócitos (T) no FB aparecem ricos em gotículas de lipídios (LD). h, hemocele; H, coração; i, tegumento; M, músculo; mg, intestino médio; mt, túbulos de malpighi; ns, sistema nervoso; o, oenócitos; Ov, ovário. Retirado de Assis et al., (2014).

2.4.2 Absorção, estoque e mobilização de lipídios

A ingestão de nutrientes é essencial para o desenvolvimento, crescimento e manutenção da homeostase de organismos vivos (SHI & BURN, 2004). Durante a dieta, um animal pode consumir diversos lipídios, nas formas de triacilglicerol (TAG), fosfolipídios, ésteres de colesterol e ácidos graxos (FA), mas antes de serem absorvidos podem passar por transformações bioquímicas através da ação de lipases para, após isso, serem utilizadas pelo organismo (GONDIM et al., 2018; SHI & BURN, 2004).

Na porção anterior do trato digestivo de mamíferos ocorre a presença de lipases, como, por exemplo, as lipases linguais secretadas pelas glândulas de von Ebner que possui uma pequena atividade em humanos (KAWAI & FUSHIKI, 2003), as lipases gástricas que retêm grande atividade no duodeno e atua em sinergia com a lipase pancreática (CARRIERE et al.,

1993), que, por sua vez, é secretada em excesso no intestino delgado (SHI & BURN, 2004). Similarmente, foi observado em insetos a presença de lipases na região anterior do intestino médio (DOW, 1987) e também associadas a matriz peritrófica (TOPRAK et al., 2008). Essas enzimas liberam resíduos de ácidos graxos de TAG, diacilglicerol (DAG) e monoacilglicerol, além de fosfolipídios (TERRA; FERREIRA, 1994). A presença da tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu é comum (HORNE; HARITOS; OAKESHOTT, 2009) e a hidrólise de lipídios no intestino médio é mais associada a lipases neutras, lipases ácidas, fosfolipases e colesterol esterases (TOPRAK et al., 2020).

O produto final da digestão dos lipídios no trato gastrointestinal de insetos são ácidos graxos, gliceróis, fosfolipídios e colesterol não esterificados (MAJEROWICZ; GONDIM, 2013). A absorção desses produtos foi observada em *D. melanogaster*, sendo realizada por células colunares epiteliais no intestino médio denominadas enterócitos (HOLTOF et al., 2019). A difusão desses lipídios através da membrana celular ocorre por ação das proteínas de ácidos graxos (ESTEVES; EHRLICH, 2006). Após ser absorvido, os ácidos graxos são processados e oxidados nas mitocôndrias ou usados para a síntese de TAGs, DAGs e fosfolipídios. Ou então, distribuídos para outras regiões do corpo, sendo transportados na forma de DAGs (comumente no caso dos insetos) ligados a proteínas de transporte, chamadas de lipoforinas, onde são oxidadas em tecidos que precisem de energia ou estocados no corpo gorduroso na forma de TAG (GONDIM et al., 2018).

Diferentes fontes energéticas podem ser obtidas por insetos durante toda a vida. Três grupos de macronutrientes são obtidos através da dieta em diferentes insetos, lipídios, carboidratos e proteínas, assim como micronutrientes essenciais como vitaminas e minerais sendo imprescindíveis para suprir suas demandas metabólicas (HAHN; DENLINGER, 2011). Em mosquitos, durante as fases larvais a dieta se resume a detritos presentes no meio aquático, podendo ocorrer até mesmo canibalismo (BESERRA; FERNANDES; RIBEIRO, 2009), porém adultos possuem hábitos alimentares distintos evitando a competição com suas fases precedentes. A ingestão de açúcar e sangue (no caso das fêmeas) compõe importantes recursos para obtenção de energia e funcionamento adequado do seu metabolismo (ARRESE; SOULAGES, 2010; GONDIM et al., 2018). Estudos apontam que, em mosquitos, após uma refeição altamente calórica, açúcar é convertido em lipídios e estocado no corpo gorduroso (VAN HANDEL, 1965; ZIEGLER & IBRAHIM, 2001). Os açúcares simples são produtos da ação de carboidrases produzidas, principalmente, nas glândulas salivares em *Ae. aegypti* (CHAPMAN, 2013; GROSSMAN et al., 1997; TERRA; FERREIRA, 1994). Esses açúcares

são absorvidos no trato digestivo e oxidados para uso imediato ou alocados em tecidos periféricos. Aqueles que são alocados em reservas energéticas são transportados para o corpo gorduroso através de sistemas de transporte de glicose semelhantes as GLUTs (ocorrentes em mamíferos), após serem absorvidos através da ação de transportadores simporte de sódio e glicose (SGLTs), (MEYER; VITAVSKA; WIECZOREK, 2011) e, após isso, a ação de enzimas lipogênicas (acetil-CoA carboxilase e da ácido graxo sintase) promovem a formação de ácidos graxos que, por fim, são esterificados a molécula de glicerol para formação de TAG (GONDIM et al., 2018). Outra opção altamente energética é a utilização de dieta proteica provinda de uma refeição sanguínea por fêmeas de culicídeos. As principais classes de enzimas digestivas em mosquitos fêmeas *Ae. aegypti* alimentados com sangue são tripsina, quimiotripsina, aminopeptidase e carboxipeptidases (BOROVSKY, 2003; VENANCIO et al., 2009), o produto final dessa digestão é misturado com peptídeos livres, que são absorvidos por células do trato digestivo e utilizados para a síntese de ácidos graxos *de novo* (GONDIM et al., 2018; HOLTOF et al., 2019).

Insetos com grande disponibilidade de energia direcionam seus recursos para o corpo gorduroso através de vias lipogênicas (via do MAG ou a via da Glicerol 3-Fosfato) para estocar reservas para possíveis necessidades futuras (GONDIM et al., 2018). Sob tais condições, as *lipid storage droplet 1* (*Lsd1*) impedem a associação de lipases a gotículas de lipídios regulando a mobilização dessas reservas (TOPRAK et al., 2020). No corpo gorduroso, essa energia fica estocada em forma de TAG sintetizado a partir de uma molécula de glicerol 3-fosfato e três moléculas de acil-CoA derivados de ácidos graxos. Os estoques de TAG serão mantidos até que haja uma alta demanda energética para suprir funções metabólicas como metamorfosear-se, maturação sexual, produção de gametas, ou mesmo em indisponibilidades de recursos alimentares para a execução de funções fisiológicas em geral (ARRESE & SOULAGES, 2010; ASSIS et al., 2014; CANAVOSO et al., 2001; ROMA et al., 2010).

Em mamíferos e culturas de células de adipócitos, a mobilização dos lipídios estocados por ação de lipases está bem caracterizada. O processo se dá pela liberação de ácidos graxos e glicerol através da hidrólise de ligações éster do TAG através de regulação hormonal em momentos de baixa energética no sistema. Esse processo ocorre nos adipócitos, muito bem documentado em mamíferos, e é denominado de lipólise. Esse processo de hidrólise do TAG em glicerol e faz, vem sendo caracterizado e contacom a participação de três lipases: a ATGL, promove a hidrólise do TAG em DAG, a HSL, que hidroliza DAG em MAG, e MAGL que, por sua vez, hidroliza o MAG em glicerol e FA (LORD; BROWN, 2012). A ativação das

lipases envolve estimulação causada por um hormônio β -adrenérgico regulam a ação lipolítica da HSL e da ATGL. Além disso, ATGL necessita da coativação exercida pela proteína 5 do domínio α/β hidrolase, também conhecido como gene comparativo de identificação 58 (CGI-58) (ZIMMERMANN et al., 2009). Dentre os modelos descritos em insetos há em aberto a descrição da ocorrência de algumas dessas reações, o hormônio que é considerado o inicializador da lipólise é a AKH gera a fosforilação de *lsd1* e gera a ação de TAG lipases denominadas de brummer, gene ortólogo a ATGL (GONDIM et al., 2018). O mecanismo resumido é esquematizado na figura 4.

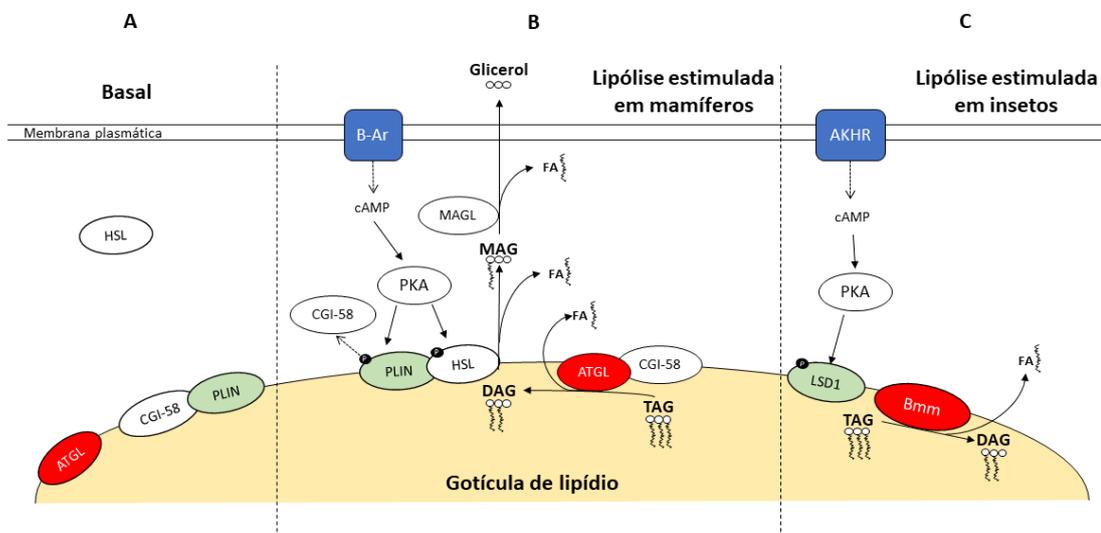


Figura 4. Metabolismo de lipídios com destaque da lipólise em mamíferos e insetos. Em A há a representação do estado onde não há a estimulação da lipólise, em B há a ocorrência do mecanismo lipolítico descrito em mamíferos e em C há a representação do que já é documentado sobre lipólise em insetos. Proteínas representadas em vermelho representam proteínas homólogas entre si com atividade de TAG lipase. Proteínas representadas em verde representam proteínas com atividade relacionada ao estoque de TAG. As formas em azul representam os hormônios receptores que regulam o metabolismo. HSL, Lipase Hormônio Sensível; Plin, Perilipina; CGI-58, Gene Comparativo de Identificação 58; ATGL, Lipase Triglicéridica Adiposa; MAGL, Monoacilglicerol lipase; PKA, Proteína Cinase A; FA, Ácido graxo; TAG, Triacilglicerol; DAG, Diacilglicerol; MAG, Monoacilglicerol; cAMP, Adenosina Monofosfato Cíclica; Bmm, Brummer; Lsd1, Lipid storage droplet 1; AKHR, Receptor do Hormônio Adipocinético. Adaptado de Lord & Brown (2012).

2.4.3 Brummer/ATGL

Do ponto de vista bioquímico, a brummer (bmm) e a ATGL são lipases que catalisam a mesma reação, a hidrólise de ligações éster do TAG tendo como resultado final DAG e ácido

graxo (GONDIM et al., 2018; LORD; BROWN, 2012). Se tratam de duas proteínas homólogas, porém, a bmm é a forma ocorrente em insetos, sendo pela primeira vez identificada e descrita em *Drosophila melanogaster* (GRÖNKE et al., 2005). Neste trabalho ela foi identificada e foi observado que ao criar moscas mutantes com perda da função da bmm, o fenótipo era de moscas obesas com o acúmulo de lipídio no corpo gorduroso. Em contrapartida, quando houve a superexpressão dela, ocorreu o oposto, os estoques lipídicos dessas moscas foram quase totalmente depletados. Mais recentemente, em um trabalho com *Nilaparvata lugens*, foi feito o silenciamento desse mesmo gene, o resultado foi incapacitação do animais em utilizar os triglicerídeos presentes no corpo inteiro do animal, tendo o mesmo resultado após o isolamento do corpo gorduroso (ZHOU et al., 2018b).

Foi observado na literatura que a bmm também é altamente expressa no corpo gorduroso de diferente insetos: *D. melanogaster* (GRÖNKE et al., 2005), *B. mori* (WANG et al., 2010), *G. morsitans* (ATTARDO et al., 2012) e *N. lugens* (ZHOU et al., 2018a). Essa lipase é comumente relacionada ao corpo gorduroso, pois possui papel central neste tecido atuando como regulador do estoque e mobilização das reservas (GRÖNKE et al., 2005; WAT et al., 2020; ZHOU et al., 2018a).

Seu papel fisiológico foi associado ao jejum prolongado em *D. melanogaster*, a intensificação do jejum resultou no aumento nos níveis de bmm (GRÖNKE et al., 2005). A associação com outras proteínas também foi observada, como a relação com AKH/AKHR que, silenciadas, reduzem a mobilização de estoques lipídicos (GRÖNKE et al., 2007). A associação com a *factor Forkhead box protein sub-group O* (FoxO) também foi observada, a FoxO desempenha um papel de regulação positiva sob a bmm (GERSHMAN et al., 2007).

A brummer (bmm) contém uma região conservada e uma variável (Figura 5). Na região conservada, ocorre a presença do domínio característico da família das patatin-like e fosfolipases contendo o grupo IV, caracterizado pela presença de lipases que possuem uma serina hidrolase modificada (Gly – X – Ser – X – Gly) que apresentam atividade de triacilglicerol lipase (EC 3: 1: 1: 3) (GHOSH et al., 2006), além disso uma região conservada denominada *brummer box* também ocorre, porém, sua função ainda é desconhecida (GRÖNKE et al., 2005).

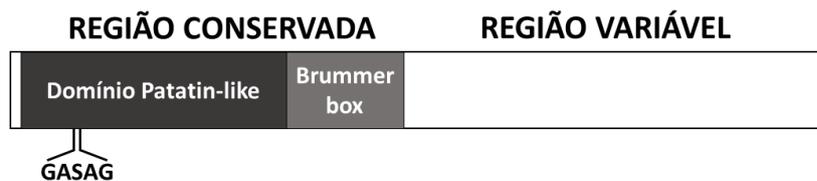


Figura 5. Esquema da estruturação bioinformática da brummer. Bmm é composta por uma região conservada e uma variável. A região conservada contém o domínio patatin-like incluindo a serina hidrolase modificada GASAG e a brummer box. Adaptado de Grönke et al., (2005).

2.5 Regulação de processos reprodutivos mediada por hormônios

A maioria dos mosquitos necessitam obrigatoriamente de nutrientes presentes no sangue de mamíferos para a produção de ovos e, conseqüentemente, reprodução (DANIELL, 2014). Essa condição reprodutiva é chamada de anautógena (CLEMENTS, 2011) e com ocorrem em insetos vetores de arbovírus causadores de doenças em humanos, como a malária, transmitida pelo *Anopheles gambiae* Giles, 1902, a leishmaniose transmitida por flebotomídeos e a dengue, febre amarela, zika, chikungunya transmitida por *Ae. aegypti*. Durante a vida adulta, as fêmeas variam sua alimentação drasticamente alternando entre néctar, rico em açúcares e sangue de animais vertebrados, rico em proteínas. O tipo de alimento consumido possui dois padrões de ocorrência e é dividida em duas fases: fase de maturidade sexual, a pré-vitelogênica (pós-emergência em adultos, PE) e a vitelogênica (pós-alimentação sanguínea, PAS) (WANG et al., 2017) que, juntas, constitui-se a oogênese (CLEMENTS, 2011).

Na alimentação com sangue, o mosquito adquire colesterol presente no hospedeiro e o converte em 7-dehidrocolesterol catalizado pela 7,8-dehidrogenase presente no retículo endoplasmático das células foliculares e, subsequentemente, em 20E (NIWA & NIWA, 2014). Esse hormônio é carregado para o corpo gorduroso onde gera a expressão da vitelogenina e, após a liberação na hemolinfa, é captada pelos oócitos e retida em grânulos de vitelo que viabilizarão o desenvolvimento dos embriões (ROY et al., 2016). Após o estabelecimento de reservas energética nos oócitos, a germinação e desenvolvimento dos embriões ocorre rapidamente, que associado a grande quantidade de ovos que uma fêmea coloca, pode gerar grandes populações de mosquitos em curtos períodos de tempo.

Essas fases são reguladas por ação hormonal, dos quais podemos destacar o hormônio juvenil (JH) e a 20-hidroxiecdisona (20E), hormônios que atuam durante toda a vida do animal e possuem papel chave no desenvolvimento do inseto e na reprodução. Na fase PE, ocorre um pico de JH nas primeiras 48h que direciona o mosquito a intensificar uma dieta rica em açúcar

que favorece o amadurecimento dos folículos ovarianos. Após 72h, ela é orientada a buscar um hospedeiro para realizar a alimentação sanguínea. A ingestão de sangue interrompe a síntese de JH na *corpora allata*, localizada na glândula protorácica e, simultaneamente, desencadeia a síntese de 20E nos ovários que gera a síntese de vitelogenina (BROWN et al, 2009; ROY et al., 2016) e, subsequentemente, a produção de postura dos ovos (Figura 6).

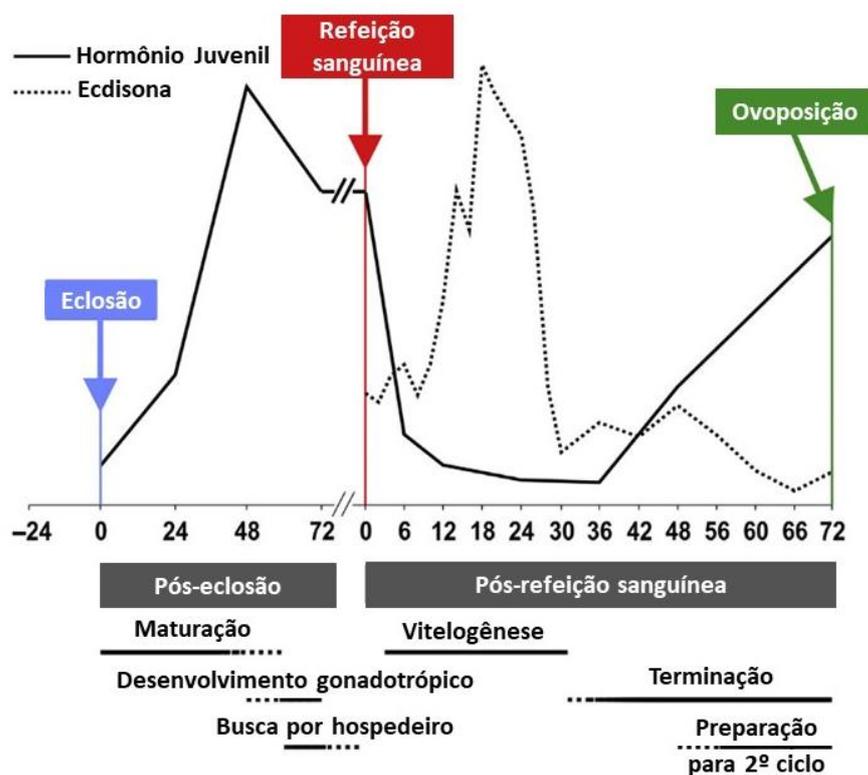


Figura 6. Ação hormonal associada a eventos durante o primeiro ciclo gonadotrófico em fêmeas adultas de *Aedes aegypti*. Após a emergência em adulto, o aumento no hormônio juvenil propicia o crescimento de folículos ovarianos e maturação da fêmea. Após 72h pós-emergência (PE), as fêmeas ativamente buscam por hospedeiros para realizar uma alimentação sanguínea. A ingestão de sangue reduz a síntese de HJ e aumenta a produção de ecdisona. A ecdisona é o principal regulador da vitelogênese que declina após 30 após alimentação sanguínea (PAS). Os baixos níveis de ecdisona é uma sinalização para o cessamento da vitelogênese e finalização do ciclo reprodutivo, seguido pela postura de ovos em 72h PAS. O segundo ciclo gonadotrófico é iniciado em 36h PAS com o aumento do JH. Adaptado de Roy et al, 2016.

A relação entre o sistema pré- e pós-vitelogênico e a ocorrência de lipídios no corpo gorduroso e nos ovários é estreita. Estudos mostraram que os nível absolutos de TAG variam dentro desse sistema, sendo elevados no fim da fase PE (72h PE) e reduzidos após a alimentação

sanguínea (HOU et al., 2015; WANG et al., 2017). Também é observado que após a alimentação sanguínea, o TAG presente no corpo gorduroso é mobilizado para produção dos oócitos (ZIEGLER & IBRAHIM, 2001). Logo, é possível considerar a vital relevância da ocorrência de lipídios para a manutenção desses processos fisiológicos.

Visto a importância epidemiológica de *Ae. aegypti* através do vetoramento de arbovirus causadores da febre amarela, dengue, zika e chikungunya associado à sua distribuição global, estudos que investiguem fatores que impactam sua sobrevivência, como o metabolismo de lipídios, podem gerar informações relevantes para o controle populacional da espécie. Além disso, pode esclarecer os mecanismos adaptativos que esses insetos desenvolveram ao longo da evolução.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a possível relação entre a brummer e os estoques de triacilglicerol no corpo gorduroso de *Ae. aegypti* utilizando ferramentas de bioinformáticas, de biologia molecular e bioquímica.

3.2 Objetivos específicos

- Identificação da brummer no genoma de *Ae. aegypti*;
- Relacionar a sequência da brummer de *Ae. aegypti* com a de outros organismos;
- Determinar a expressão da brummer ao longo do ciclo de vida e sob condições de jejum alimentar;
- Determinar a quantidade de triacilglicerol presente no corpo gorduroso de insetos adultos ao longo do ciclo de vida e sob condições de jejum alimentar.

4. METODOLOGIA

4.1 Manutenção da colônia de *Aedes aegypti*

Todos os experimentos foram realizados com mosquitos de colônias de *Ae. aegypti* (Rockfeller) no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes (LBBMA), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Os ovos foram armazenados em papel filtro seco e incubados seguindo o protocolo de Farnesi *et al.* (2006). Larvas e adultos foram mantidos a 16h de luz e 8h de escuro sob temperatura constante de 28°C e umidade entre 70-80%. As larvas foram alimentadas com ração de gato macerada. Foi oferecido aos adultos solução com 10% de sacarose *ad libitum*. Nos testes para visualizar respostas metabólicas com a ausência de sacarose foram oferecidos aos adultos água desclorada *ad libitum*. Camundongos anestesiados foram disponibilizados as fêmeas para se alimentarem com sangue. Todos os protocolos de cuidados com animais e experimentais foram conduzidos seguindo as diretrizes do comitê de cuidado e uso institucional (Comitê de Avaliação de Uso de Animais para Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, CEUA-UFRRJ) sob o registro 005/2017.

4.2 Identificação e caracterização da brummer utilizando bioinformática e a comparação com outros organismos

A sequência proteica da Brummer em *Aedes aegypti* foi identificada utilizando delineamento de arquivos de *database* através do blastp utilizando como modelo da Brummer de *Drosophila melanogaster* já presente na literatura (número de acesso no GenBank NP_648723) (GRÖNKE *et al.*, 2005). O HMMER foi utilizado para caracterização do domínio conservado e do sítio ativo (POTTER *et al.*, 2018). Para a confirmação do domínio conservado foi utilizado o PFAM (FINN *et al.*, 2016). Após a identificação da Brummer em *Aedes aegypti*, foram reunidas sequências identificadas por outros autores como “brummer”, “*adipose triglyceride lipase*” (ATGL) ou mesmo “*patatin-like phospholipase domain*” em outros organismos que foram encontradas após a realização do blastp utilizando como base a brummer em questão (HU & KURGAN, 2018). Houve o alinhamento das sequências através do MAFFT (COLLINS & WARNOW, 2018). A história evolutiva foi inferida através da utilização da Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) baseada no modelo de correção de Poisson (ZUCKERKANDL & PAULING, 1965). A árvore de consenso foi inferida após 1000 replicações. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA7.

4.3 Desenho de Primers

A partir da identificação da sequência de aminoácidos da brummer em *Aedes aegypti*, o software PRIMER3 (ALMEIDA-OLIVEIRA et al., 2017) foi utilizado para a construção de primers. Os produtos do PCR foram definidos em tamanhos entre 120 e 200 pares de base e temperaturas de Melting entre 59° e 61°C.

4.4 Isolamento dos Tecidos

Os grupos para o estudo foram estabelecidos de acordo com a fase de desenvolvimento do inseto e por sexo, no caso dos adultos. Os grupos de imaturos utilizados foram larvas dos estágios L1, L2, L3, L4 e pupa, as amostras utilizadas nos ensaios continham de 15 animais e as determinações feitas em quaduplicatas. As fêmeas adultas foram separadas em grupos de 0 a 6h pós-emergência (Dia 0), 24 a 30h pós-emergência (Dia 1), 48 a 54h pós-emergência (Dia 2), 72 a 78h pós-emergência (Dia 3), 96 a 102h pós-emergência (Dia 4), 120 a 126h pós-emergência (Dia 5) e 144 a 150h pós-emergência (Dia 6). Para análise de fêmeas alimentadas com sangue, foram estabelecidos dois grupos: fêmeas alimentadas por 3 dias com sacarose e em seguida eram alimentadas com sangue; fêmeas submetidas ao jejum por 3 dias (recebendo apenas água), seguido por uma alimentação com sangue. O corpo gorduroso de fêmeas em tempos diferentes após a alimentação sanguínea foi separado: 6h pós-alimentação sanguínea (6h PBM), 36h pós-alimentação sanguínea (36h PBM) e 72h pós-alimentação sanguínea (72h PBM). As amostras de adultos foram dissecadas, segundo o método de Chung et al., (2017) com o auxílio de microscópio estereoscópico, para obtenção de amostras de corpo gorduroso. Foi utilizado 10 corpos gordurosos em quaduplicatas.

4.5 Isolamento/Extração do RNA

As amostras foram homogeneizadas com um pistilo em 700µL de TRIzol Reagent (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). A extração de RNA total foi realizada pelo protocolo do fabricante. O RNA foi quantificado em um NanoDrop spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fischer Scientific). A integridade e qualidade do RNA foi analisada com uma eletroforese em gel de agarose 1,5%. Todas as amostras tiveram taxas de A260/A280 de 2,0±0,1.

4.6 Síntese de cDNA

Depois da extração, 1µg de RNA total foi tratado com 1U de DNase I (Sigma-Aldrich) por 30 minutos a 37°C em um volume final de 10µL. Depois disso, a reação foi interrompida com a incubação em 70°C e adição de 50mmol de EDTA. O RNA tratado foi utilizado para sintetizar o cDNA com random primers e 50 U de reverse transcriptase MultiScribe™ MuLV do High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) em um volume final de 20µL.

4.7 Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

As reações de polimerase em cadeia foram realizadas com kit Taq PCR Master Mix (Qiagen) em duas condições: um ciclo por 2 minutos a 96°C, seguido por 40 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C e no final, 72°C por 5 minutos para as análises utilizando um primer controle. O primer usado como gene de referência foi a proteína ribossomal 49 (RP49): forward: 5- GCT ATG ACA AGC TTG CCC CCA-3 e Reverse 5-TCA TCA GCA CCT CCA GCT C-3 (GENTILE et al, 2005). O outro ciclo por 2 minutos a 96°C, seguido por 40 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C e no final, 72°C por 5 minutos nas amplificações utilizando os primers da brummer. Os primers sintetizados utilizando o software Primer3, foram programados para anelarem a 59° e 61°C. Os produtos de PCR foram observados através de eletroforese em gel de agarose 1,8% e visualizado sobre luz UV.

4.8 Quantitative PCR (qPCR)

A qPCR foi realizada em um sistema StepOnePlus (Thermo Fischer Scientific) com Power SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems). A reação continha 7,5µL do Mix citado anteriormente, 0,3µL dos primers forward e reverse sintetizados e 0,75µL de cDNA em um volume final de 15µL. As reações foram realizadas em MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems), com a seguinte programação: 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e uma curva de dissociação. Controle negativo foi executado para determinar se as misturas de reação estavam contaminadas com DNA exógeno. O primer utilizado como gene de referência foi a proteína ribossomal 49 (RP49). E o primer para verificar a expressão da brummer foi projetada usando Primer3 - 5'- CAA CAG CTC CAG ATC GAA GAA -3'(forward) e 5'- CGA AGT GGC TTC

CGA AAG TA -3' (reverse). Todas as amostras foram ensaiadas em triplicatas e a expressão do RP49 foi usada para normalização. A eficiência do primer da Brummer foi determinada pelos valores do ciclo de quantificação (Cq) obtidos após qPCR utilizando amostras de cDNA diluídas em série (MEUER et al, 2001).

4.9 Extração de Lipídios e Quantificação de Triacilglicerol

Os diferentes grupos e/ou tecidos de *Aedes aegypti* foram macerados em água destilada e, posteriormente, os lipídios foram extraídos segundo o método de Bligh and Dyer (1959) utilizado por Silva et al., (2020). Os lipídios foram separados por cromatografia de camada fina (TLC) em placa de sílica para lipídios neutros usando os solventes hexano, éter etílico e ácido acético (90:60:1) e depois imersos em solução aquosa contendo 14% de sulfato de cobre e 8% de ácido fosfórico. Após a secagem, a placa foi aquecida em estufa por cerca de 200°C por 5 minutos. A quantificação do Triacilglicerol foi inferida através de uma análise densitométrica (RUIZ; OCHOA, 1997) através do Image Lab Software 5.1 (Bio-Rad). As análises foram realizadas em triplicatas.

4.10 Análise Estatística

Nas análises estatísticas e representações gráficas foi utilizado o Prism 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, USA). Os resultados foram expressos como médias e erro padrão da média. A ANOVA one-way foi utilizada para análises comparativas das diferentes condições alimentares de fêmeas adultas separadamente e estágios larvais de *Ae. aegypti*, seguida do teste de Tukey. Já a ANOVA two-way foi usada para comparações entre as condições dos adultos, seguida pelo teste de Sidak. A significância estatística foi determinada a $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação, caracterização bioinformática e comparação com outros organismos

A brummer (bmm) contém uma região conservada e uma variável (GRÖNKE et al., 2005). Na região conservada, ocorre a presença do domínio característico da família das *patatin-like fosfolipases* contendo o grupo IV, caracterizado pela presença de lipases que possuem uma serina hidrolase modificada (Gly – X – Ser – X – Gly) e que apresentam atividade de triacilglicerol lipase (EC 3: 1: 1: 3) (GHOSH et al., 2006). Foi utilizado como referência a sequência da bmm de *Drosophila melanogaster* identificada por Gronke et al, 2005 (GenBank nº de acesso NP_648723) para realizar o rastreamento da proteína homóloga no genoma de *Aedes aegypti* utilizando o algoritmo Blastp. A sequência de aminoácidos da bmm em *Aedes aegypti* foi identificada na biblioteca de proteínas (GenBank nº de acesso EAT35954) apresentando a díade catalítica nos resíduos de Serina e Aspartato (S42 e D161), além da ocorrência da serina hidrolase modificada (Gly – Ala – Ser – Ala – Gly) corroborando para essa identificação (Figura 7). O alinhamento entre as duas sequências resultou em 76% de similaridade e 67% de identidade (Tabela 1).

1	<u>MATKMNLSFA</u>	<u>CGGFLGIYHV</u>	<u>GVAVCFKKYA</u>	<u>PHLLLHRISG</u>	ASAGSLAACC	<u>LLCDMPLGEM</u>
61	<u>TSDFFRVVNE</u>	<u>ARSHSLGPFS</u>	<u>PRFNITQTCLL</u>	<u>EGLQKFLPPD</u>	<u>AHERVNGKLNH</u>	<u>ISLTRVYDGG</u>
121	<u>NVIVSQFNRS</u>	<u>EDLLQALLCA</u>	<u>CFIPVFSGLL</u>	<u>PPRFHGVRYM</u>	DGAFSDNLPT	<u>LDENTVTVSP</u>
181	<u>FCGESDICPR</u>	<u>DNSSOMFHVN</u>	<u>WANTSIELSK</u>	<u>QNMNRFGRIL</u>	<u>FPPRPEILSS</u>	<u>FCOOGFDDAL</u>
241	<u>NFLHRNNLIS</u>	<u>CTRCLSVQST</u>	<u>FSLADQPTQL</u>	<u>EDQLLEBYDP</u>	<u>ECSECKECNE</u>	<u>HRQNALDGSM</u>
301	<u>PDTVLTVFQT</u>	<u>YIEEANKGLM</u>	<u>NWVFRHRGAR</u>	<u>LLKALSIPAT</u>	<u>LPADIMVATL</u>	<u>SKLLVATPTI</u>
361	<u>GSQLWSVSKF</u>	<u>AIKTLNAILQ</u>	<u>RIRREQQVLY</u>	<u>ETMLSLVMRL</u>	<u>LQIWQLPPIQ</u>	<u>MAASRDRDGG</u>
421	<u>DDVHPDYDTF</u>	<u>DHILEATSHH</u>	<u>DAMYAYYYLD</u>	<u>ADNKVKVTEI</u>	<u>FDMTDDGSPA</u>	<u>LQTVQEREVN</u>
481	<u>QQLEYDNDWE</u>	<u>TRQPDFLYTD</u>	<u>SYDRDNLMDF</u>	<u>DELFDPHMH</u>	<u>CRHHYQQLQQ</u>	<u>QNHSVDPVAT</u>
541	<u>SAALQQWQQQL</u>	<u>QIEELPSDDG</u>	<u>ANDTLYLQPE</u>	<u>ADQQQALLSE</u>	<u>ATSLLLSKPP</u>	<u>AASVYSIVE</u>

Figura 7. Sequência de aminoácidos do gene brummer obtido do genoma de *Aedes aegypti*. A sequência foi rastreada a partir do GenSeed como descrito em Material e métodos. A região sublinhada é o domínio conservado *Patatin-like phospholipase*. A região em negrito é a região contendo a serine hidrolase motif que caracteriza esse domínio. Aminoácidos em vermelho representam a díade catalítica nas posições S42 e D161.

Em sua estrutura ocorrem regiões conservadas incluindo um domínio patatin-like e uma brummer box com função desconhecida (GRÖNKE et al., 2005). Similarmente as ATGL localizadas nos adipócitos de mamíferos, a brummer possui uma serina hidrolásica com atividade esterásica (HIRSCHBERG et al., 2001). Esse domínio já foi descrito como sendo altamente conservado (LASS et al., 2011), mesmo na comparação entre proteínas homólogas em vários grupos animais, sugerindo, até mesmo, modelos de insetos para o estudo de obesidade em humanos (GHOSH et al., 2006).

A sequência da bmm de *Ae. aegypti* revelou alto grau de similaridade (em sua maioria bem acima de 50%) e contou com a presença do domínio das patatin-like quando comparado com a sequência de outros organismos (tabela 1) (KIENESBERGER et al., 2009). Em todas as sequências obtidas, incluído as de grupos não relacionados, foi evidenciado a conservação dessa estrutura proteica desde fungos até os mamíferos (LASS et al., 2011). O grau de similaridade entre as proteínas evidencia que se tratam de proteínas ortólogas, pois a similaridade entre elas estabelece parte da história evolutiva das espécies destacadas no estudo, reconstruindo grupos e relações de parentesco entre as elas. As relações entre os grupos possuem altos percentuais replicação sendo na maioria dos ramos se repetem em mais de 50% das árvores (figura 8), pois corresponde ao percentual de árvores que possuíam tais agrupamentos em 1000 replicatas.

Um ponto importante e que deve ser destacado, foi a observação da localização dos sítios ativos da bmm entre os diferentes organismos representados na tabela 1. As díades catalíticas de mosquitos do gênero *Aedes* e *Culex* localizam-se nos aminoácidos S38 e D161, enquanto nos outros insetos localizam-se nos aminoácidos S38 e D157, evidenciando que entre os culicídeos, *Aedes* e *Culex* tem suas sequências mais próximas entre eles do que Anopheles. Os vertebrados também são semelhantes entre si, suas díades catalíticas localizam-se nos aminoácidos S47 e D166, com exceção do lagarto *Pogona vitticeps* (Ahl, 1926) que, dentro do universo estabelecido dentro do presente estudo, foi o único vertebrado que se diferiu dos outros. A relação filogenética entre as espécies propostas na tabela 1, revelou que os grandes grupos monofiléticos já estabelecidos se mantiveram íntegros e todos os valores de bootstrap foram relevantes, demonstrando que se trata de uma proteína altamente conservada que se diferenciou ao longo do processo evolutivo mantendo suas relações de parentesco (Figura 8). Dessa forma, a bmm é mais um exemplo da evolução através da percepção de sua diferenciação ao longo da cadeia evolutiva reforçando as relações de parentesco entre agrupamentos já estabelecidos.

Tabela 1. Comparação entre a sequência de aminoácidos da brummer de *Aedes aegypti* e outras espécies.

GenBank ^a	Organismo	Sítio ativo previsto ^b	Similaridade (%) ^c	Identidade (%) ^c	Grupo
EAT35954	<i>Aedes aegypti</i>	S42-D161	100	100	Diptera
IP_019548650	<i>Aedes albopictus</i>	S42-D161	100	83	Diptera
KFB50034	<i>Anopheles sinensis</i>	S38-D157	98	70	Diptera
ETN67723	<i>Anopheles darlingi</i>	S38-D157	99	70	Diptera
IP_001861611	<i>Culex quinquefasciatus</i>	S42-D161	100	89	Diptera
AHE57674	<i>Manduca sexta</i>	S38-D157	80	62	Lepidoptera
NP_648723	<i>Drosophila melanogaster</i>	S38-D157	76	67	Diptera
XP_970721	<i>Tribolium castaneum</i>	S38-D157	84	57	Coleoptera
IP_005177151	<i>Musca domestica</i>	S38-D157	77	66	Diptera
OWR44847	<i>Danaus plexippus plexippus</i>	S38-D157	80	57	Lepidoptera
IP_012230680	<i>Linepithema humile</i>	S38-D157	81	59	Hymenoptera
IP_016768330	<i>Apis mellifera</i>	S38-D157	81	54	Hymenoptera
AEV59505	<i>Glossina morsitans</i>	S38-D157	58	76	Diptera
IP_001165929	<i>Bombyx mori</i>	S38-D157	58	72	Lepidoptera
IP_002429955	<i>Pediculus humanus corporis</i>	S38-D157	77	53	Phthiraptera
IP_002434048	<i>Ixodes scapularis</i>	Não identificado	58	51	Acari
IP_013421717	<i>Lingula anatina</i>	S41-D160	70	47	Brachiopoda
IP_022249636	<i>Limulus polyphemus</i>	Não identificado	59	52	Merostomata
CDW57522	<i>Trichuris trichiura</i>	S38-D157	68	42	Nematoda
PRD26278	<i>Nephila clavipes</i>	Não identificado	68	43	Araneae
IP_017261050	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	S47-D166	63	40	Actinopterygii
IP_020644568	<i>Pogona vitticeps</i>	S48-D167	63	38	Squamata
IP_024072248	<i>Terrapene mexicana triungui</i>	S47-D166	59	41	Testudines
AAH64747	<i>Mus musculus</i>	S47-D166	68	39	Muridae
AAW81962	<i>Homo sapiens</i>	S47-D166	69	38	Human
KQK80004	<i>Amazona aestiva</i>	S47-D166	40	51	Aves
OON10692	<i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	S443-D557	36	31	Fungi

^a Números de acesso para as sequências de aminoácidos obtidos no GenBank.

^b Sítios ativos previstos através do HMMER.

^c Percentuais de identidade e similaridade foram calculados utilizando o algoritmo Blastp.

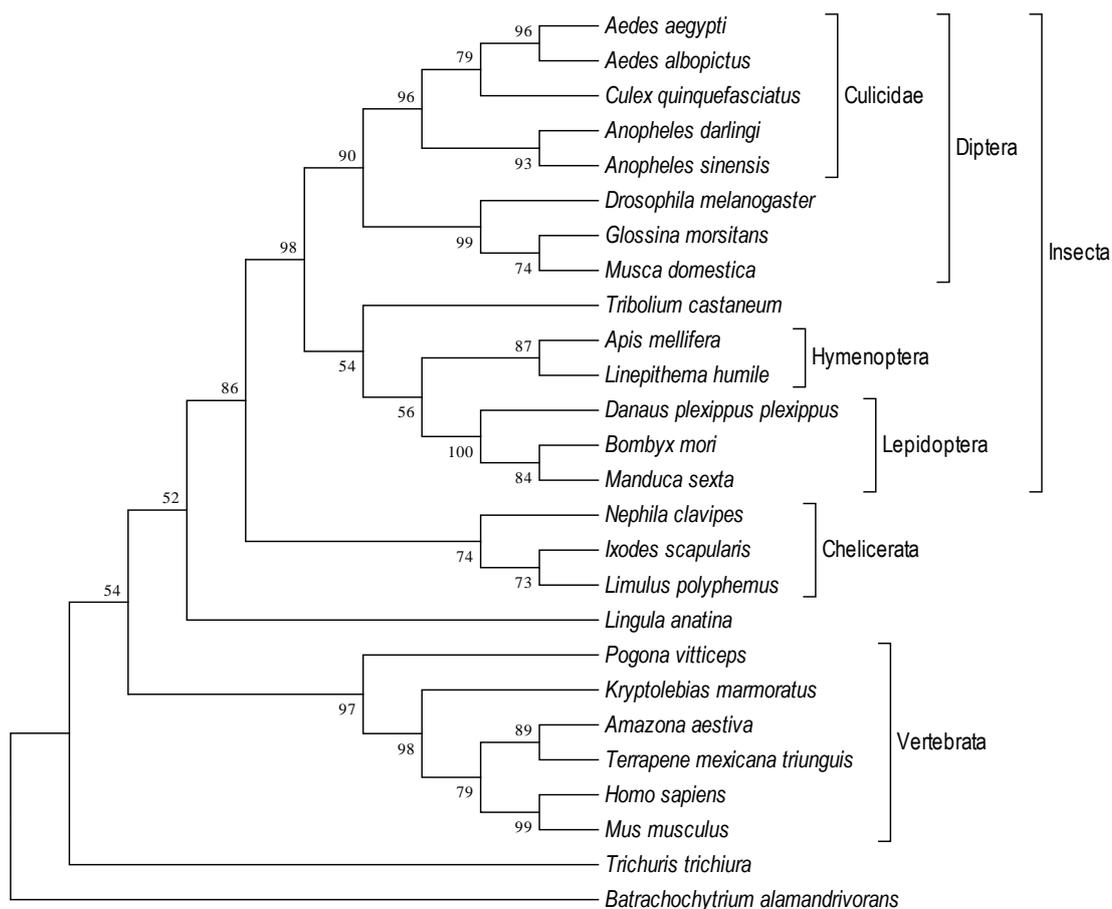


Figura 8. Análise filogenética molecular da brummer em diferentes organismos. A história evolutiva foi inferida pelo método da Máxima Verossimilhança, baseado no modelo de correção de Poisson. A árvore de consenso inferida a partir de 1000 réplicas foi utilizada para representar a história evolutiva dos táxons analisados. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados foram agrupados na geração das árvores filogenéticas (1000 repetições) são mostrados próximos aos ramos. A análise envolveu 26 sequências de aminoácidos. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7.

5.2 Expressão relativa da brummer durante a vida larval

A bmm em fases imaturas em insetos ainda foi pouco investigada na literatura em diferentes modelos animais, nós observamos que a sua expressão ocorre diferencialmente dentre esses estágios em *Ae. aegypti* (Figura 9). O desenvolvimento das fases larvais é importante para a sobrevivência e viabilidade dos adultos. Suas reservas, enquanto imaturos, munirão a metamorfose e crescimento corporal, sendo nitidamente observado um rápido crescimento corporal após eclosão dos ovos, fato que se infere um aumento na dinâmica lipídica nesse período. Nas fases iniciais, L1 e L2, a bmm é expressa aumentando nos estágios L3 e L4 e se mantendo no estágio de pupa (Figura 9), destacando-se que o aumento dos níveis de

expressão da fase L3 em relação a L2 foi de 237,5%. Esse aumento não foi correlacionado com níveis de TAG ou a outros estoques bioquímicos nesse estudo, porém, fatores fisiológicos associado ao desenvolvimento do inseto nitidamente pode estar demandando maior catálise lipídica a partir da fase L3.

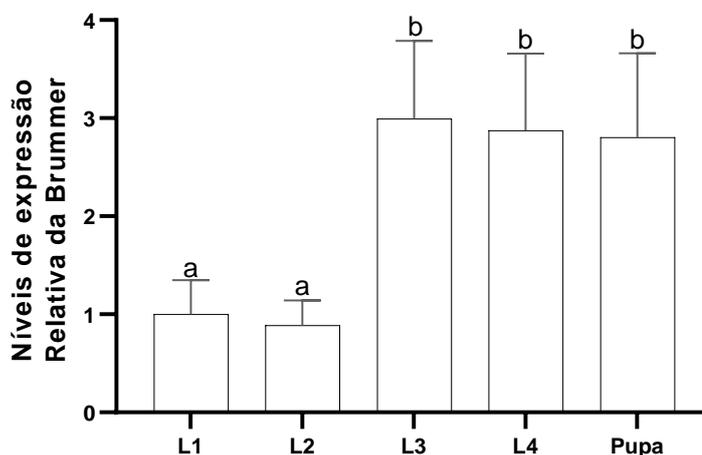


Figura 9. Níveis de expressão do gene Brummer em diferentes fases imaturas de *Aedes aegypti*. Os níveis de expressão são relativos aos valores da fase L1 (1.0). Os níveis de expressão foram normalizados com o gene de referência RP49. As diferenças estatísticas foram determinadas através de One-way ANOVA ($P > 0.0001$). As barras anotadas com letras minúsculas distintas são significativamente diferentes ($P > 0.05$).

A expressão da *bmm* foi associada ao processo de muda (WANG et al., 2010; ZHOU et al., 2018a). Em *B. mori* foi observado que a ocorrência da *bmm* foi regulada positivamente pela 20E induzindo a redução do conteúdo lipídico presente no corpo gorduroso e seu aumento na hemolinfa que convergem com o momento de muda entre as fases larvais e pupação (WANG et al., 2010). Zhou et al., (2018a) inferiu que essa relação também esteja associada a presença do JH que também é importante para a maturação de fases imaturas de *N. lugens* e atua em conjunto com a *bmm* para estabelecimento de vitelogenina. No momento de metamorfose, durante o estágio de pupa, a demanda energética é muito grande para o indivíduo, fato que justifica a necessidade da regulação positiva da *bmm* que promove a mobilização dos estoques energéticos presentes no corpo gorduroso, porém, mais estudos são necessários para investigar as razões do seu aumento no estágio L3 e outros genes que caracterizem a mobilização de energia.

5.3 Expressão relativa da brummer presente no corpo gorduroso sob jejum

O corpo gorduroso é um órgão secretor e de estocagem energética que possui múltiplas funções metabólicas, sendo importante no metabolismo lipídios garantindo energia para o inseto se desenvolver, movimentar e reproduzir preservando sua homeostase (ARRESE; SOULAGES, 2010; ASSIS et al., 2014; CANAVOSO et al., 2001; ROMA; BUENO; CAMARGO-MATHIAS, 2010). Foi observado na literatura que a bmm é altamente expressa nesse órgão em *D. melanogaster* (GRÖNKE et al., 2005), *B. mori* (WANG et al., 2010), *G. morsitans* (ATTARDO et al., 2012) e *N. lugens* (ZHOU et al., 2018a). Nossos resultados também mostraram sua ocorrência no corpo gorduroso de fêmeas adultas de *Ae. aegypti*, reforçando a necessidade de uma proteína que mobilize os estoques energéticos sob forte demanda.

Assim como nos estágios imaturos, a expressão da bmm ocorre de forma diferencial no corpo gorduroso na fase adulta de fêmeas alimentadas com e sem sacarose (Figuras 10 e 11). Em fêmeas adultas alimentadas com sacarose, foi observado que os níveis de expressão da bmm no corpo gorduroso se mantêm constante na maior parte do tempo nos primeiros seis dias após a emergência em adulto com uma redução no terceiro dia (Figura 10A). Para avaliar as fêmeas sob jejum, elas não receberam alimentação de sacarose 10% por seis dias e a expressão da bmm foi determinada a cada dia (Figura 10B). Até o segundo dia, a bmm nos animais em jejum apresentou um perfil similar ao dos animais que receberam alimentação com sacarose. No terceiro dia a expressão da bmm aumentou consideravelmente em relação aos animais alimentados, aumentando ainda mais a partir do quarto dia e se mantendo até o sexto dia (Figura 10B). Após o sétimo dia sem sacarose na dieta, ocorreu a mortalidade de praticamente todos os animais inviabilizando a continuidade do teste (dado não mostrado).

A falta de diferenciação entre os níveis de expressão da bmm no corpo gorduroso de fêmeas submetidas a uma dieta com sacarose indicam que, sob condições de alta disponibilidade energética, pode não haver atividade significativa dessa proteína. Porém, ao observar essas fêmeas sob jejum, os níveis de expressão sob tal condição chega a ser 8 vezes maior do que as que foram alimentadas, corroborando com a regulação desempenhada pelo jejum proposto por Gronke et al. (2005). Ressalta-se também que apenas 72h após a emergência em adulto houve a diferenciação entre os dois grupos de fêmeas sob os diferentes tratamentos (Figura 11).

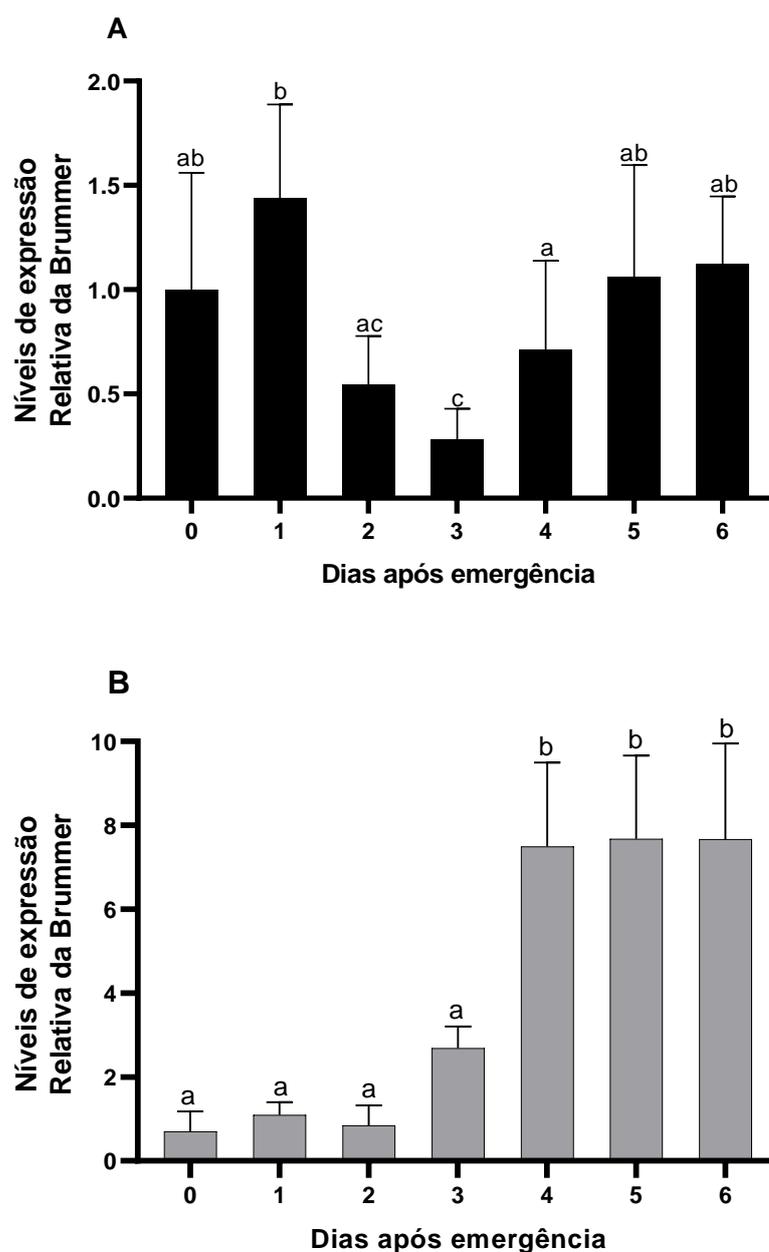


Figura 10. Expressão do gene brummer no corpo gorduroso de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* submetidas a diferentes tratamentos alimentares ao longo de 6 dias. A: Fêmeas submetidas a dieta com solução contendo 10% de sacarose. B: Fêmeas em jejum submetidas a uma solução contendo apenas água. Os níveis de expressão são relativos aos valores de expressão média de fêmeas adultas submetidas a uma dieta com sacarose (1.0). Valores estão representados como porcentagens de expressão e representam a média de quatro replicatas biológicas independentes \pm SEM. Os níveis de expressão foram normalizados com o gene de referência RP49. Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando One-way ANOVA ($P < 0.05$).

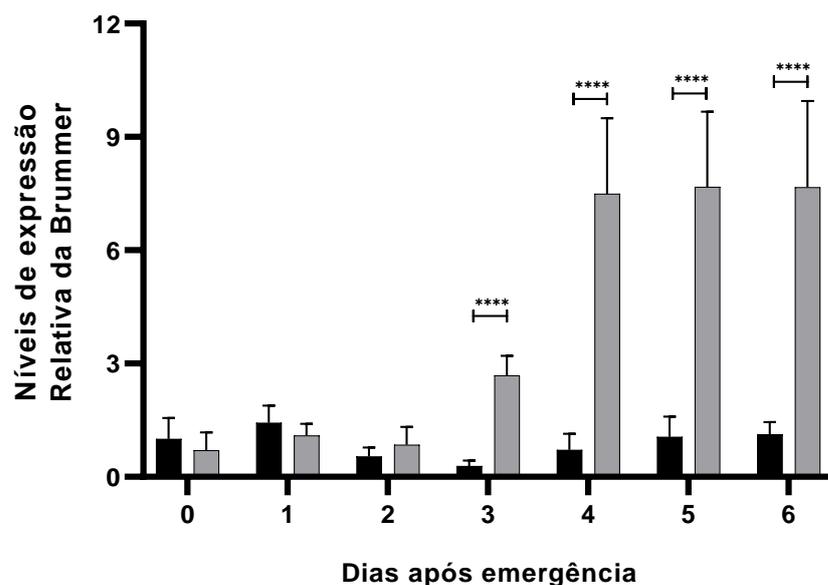


Figura 11. Níveis de expressão do gene brummer no corpo gorduroso de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* submetidas a diferentes dietas ao longo de 6 dias comparativamente. As barras pretas representam fêmeas adultas que receberam uma dieta com solução contendo uma solução com 10% de sacarose. As barras cinzas representam fêmeas adultas que receberam uma solução contendo apenas água. Os níveis de expressão são relativos a fêmeas adultas submetidas a uma dieta com sacarose (1.0). Valores estão representados como porcentagens de expressão e representam a média de quatro replicatas biológicas independentes \pm SEM. Os níveis de expressão foram normalizados com o gene de referência RP49. Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando Two-way ANOVA (**** $P < 0.0001$).

5.4 Ocorrência de triacilglicerol no corpo gorduroso em insetos adultos em condições normais ou submetidos a jejum

Os níveis de TAG foram determinados no corpo gorduroso de fêmeas adultas após a emergência (PE) e após a alimentação sanguínea (PAS). Os animais PE foram alimentados com sacarose 10% por seis dias ou mantidos em jejum. Para determinação do TAG foram extraídos os lipídios de 10 corpos gordurosos de fêmeas alimentadas com sacarose ou submetidas ao jejum e analisados através de TLC. Os resultados mostram que os níveis de TAG diminuem até o terceiro dia em ambos, animais alimentados e os submetidos ao jejum e sem diferença entre eles. A partir do terceiro dia os níveis de triacilglicerol se restabelecem nos animais que foram alimentados e se mantêm nos animais submetidos ao jejum (Figura 12).

Os resultados normalizados por corpo gorduroso mostram que os níveis de triacilglicerol diminuem até o terceiro dia em ambos, animais alimentados e os submetidos ao jejum e sem diferença entre eles. A partir do terceiro dia os níveis de triacilglicerol se restabelecem nos

animais que foram alimentados e se mantêm nos animais submetidos ao jejum (Figura 12A). Ao observar os resultados normalizados por proteína, também não há diferenças entre os dois tratamentos nos primeiros 3 dias, porém, diferindo-se muito a partir do quarto dia, onde observamos os valores de fêmeas alimentadas com sacarose cerca de 2 vezes maiores nos dias 4, 5 e 6 (Figura 12B).

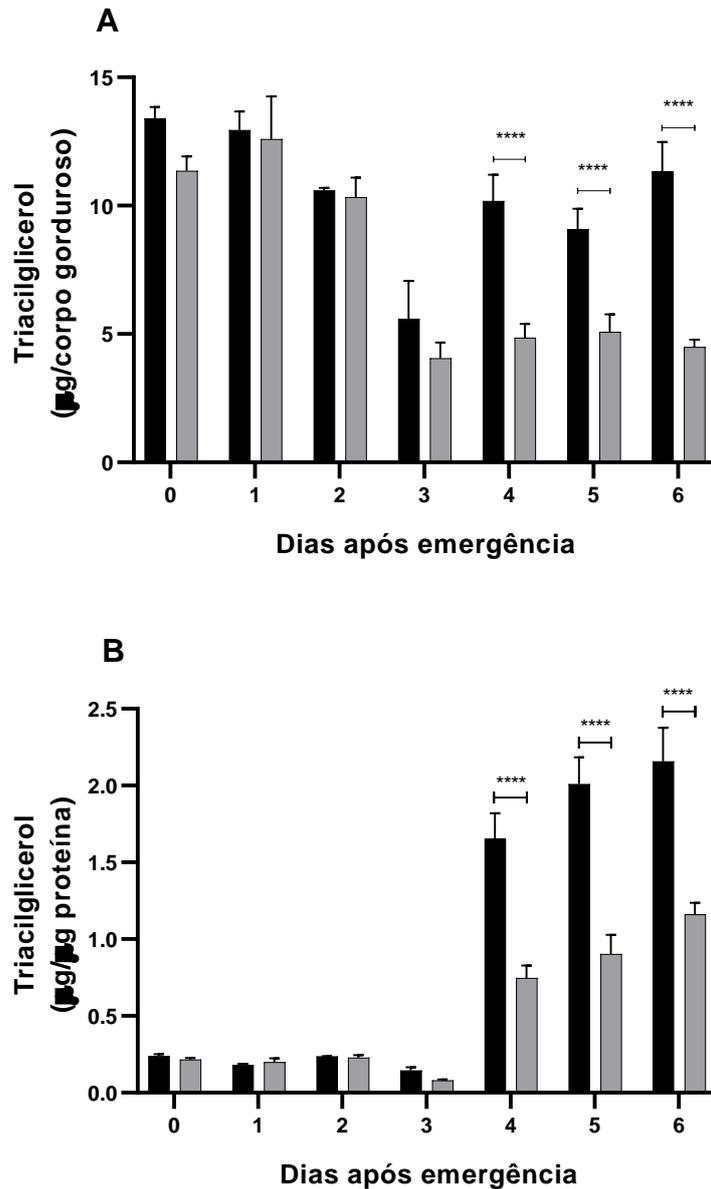


Figura 12. Conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* submetidas a diferentes tratamentos alimentares ao longo de 6 dias. A: Triacilglicerol normalizado por corpo gorduroso. B: Triacilglicerol por normalizado por proteína. As barras pretas representam fêmeas adultas que receberam uma dieta com solução contendo uma solução com 10% de sacarose. As barras cinzas representam fêmeas adultas que receberam uma dieta contendo apenas água. Valores estão representados como μg de triacilglicerol e representam a média de quatro a cinco replicatas biológicas independentes \pm SEM. As diferenças estatísticas foram determinadas através de Two-way ANOVA (**** $P > 0.0001$).

A diferença entre os dois gráficos com diferentes normalizações (figura 12) é graças ao decréscimo gradual de reservas proteicas que ocorre no corpo gorduroso após a emergência em adulto que se mantém sem diferenças independente do tratamento alimentar que os animais foram submetidos onde observamos cerca 54µg de proteína por corpo gorduroso no dia 0 e cerca de 4,6µg de proteína por corpo gorduroso no dia 6. Porém, o consenso entre as duas figuras é que as fêmeas submetidas a diferentes tratamentos alimentares até o terceiro dia possuem níveis de TAG parelhos e diferenciam-se muito após o quarto dia. Sugerindo assim que há uma causa não relacionada a dieta que gera essa diminuição dos estoques lipídicos no terceiro dia independente da dieta submetida.

5.5 Diferenciação nos níveis de brummer e TAG no terceiro dia após a emergência em adulto

Essa diferenciação nos níveis de expressão e de TAG após o terceiro dia pode ser correlacionado com a maturação dos ovários. Segundo Roy et al. (2016), em 72h após a emergência em adulto ocorre a finalização da maturação sexual e, com isso, a fêmea se encontra altamente ativa para buscar um hospedeiro para realizar o repasto sanguíneo e completar o seu ciclo gonadotrófico. As fêmeas que foram submetidas a refeições com sacarose *ad libitum* não apresentaram diferenças significativas entre os dias após a emergência (Figura 10A), porém, na ausência de uma fonte energética constante após essa demanda no terceiro dia, as fêmeas em jejum apresentaram um aumento em relação ao dia 2 de cerca de cerca 317% no dia 3 e cerca de 886% a partir do dia 4, evidenciando a relação entre o acentuamento do jejum e a expressão da bmm (Figura 10B).

Zhou et al, (2004) observaram, através da utilização de uma alimentação de larvas L4 de *Ae. aegypti* com ácido oleico marcado, que há grande eficiência no carreamento de reservas energéticas das fases imaturas para os adultos. Onde 75% permaneceram na forma de lipídios, 16% na forma de proteínas e 6% na forma de glicogênio. Visto isso, as fêmeas adultas, mesmo nos primeiros dias, não sentem uma necessidade imediata por energia, pois ainda possuem altas reservas energéticas na forma de triacilglicerol provindas das larvas que podem suprir suas demandas logo após a emergência em adulto. Porém, no terceiro dia há uma grande demanda que gera a mobilização de grande parte das reservas lipídicas. Aquelas sob a dieta com sacarose, conseguem reestabelecer suas reservas através de uma fonte de açúcar, porém, aquelas que estiveram sob jejum tiveram sua necessidade intensificada, fato que poderia estar aumentando a expressão da bmm que pode ser relacionada a redução nos níveis de TAG.

5.6 Relação da brummer com outras lipases identificadas na literatura

Além da bmm, outras lipases foram observadas por outros autores em *Ae. aegypti*. Wang et al., (2017) observaram a expressão de mRNA de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios no corpo gorduroso de fêmeas. Seus dados foram representados através de um heat map com faixas temporais dentro dos 3 dias após emergência e dentro dos 3 dias após a alimentação sanguínea. Dentre essas proteínas 6 foram identificadas por eles como lipases (lipase 1, AAEL006027-RA; lipase 2, AAEL006961-RA; lipase 3, AAEL007055-RA; Triacylglycerol lipase 1, AAEL014553-RA; Triacylglycerol lipase 2, AAEL012654-RA; e Triacylglycerol lipase 3, AAEL002149-RA). As sequências dessas proteínas foram obtidas e comparadas com a bmm. Através de um alinhamento e construção de árvore de máxima verossimilhança (Figura 13), foi observado que a bmm possui alguma relação de proximidade com a lipase TAG lipase 3 através de análises filogenéticas das sequências, enquanto as outras ficaram dispostas em outros dois ramos independentes sem consenso entre eles. Faz algum sentido a bmm ser mais próxima de outras TAG lipases, pois, elas catalisam a mesma reação, porém, podem ser expressas em momentos diferentes ou ao mesmo tempo dependendo de diferentes sinalizações, essa simples análise evidenciou que elas possuem sequências bem distintas.

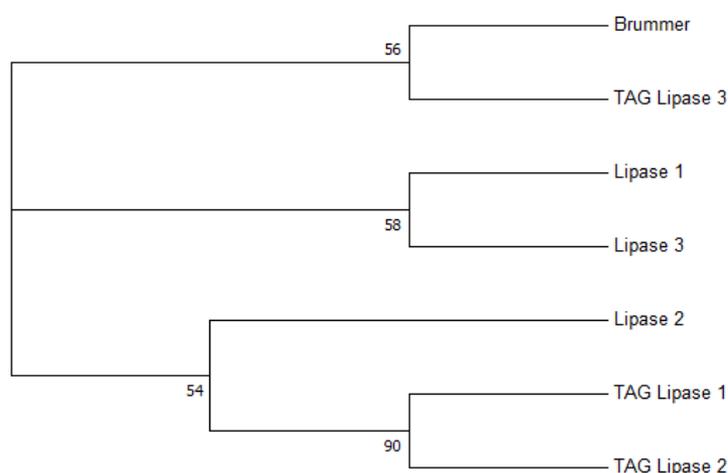


Figura 13. Análise filogenética molecular de relação entre diferentes lipases de *Ae. aegypti*.

A história evolutiva foi inferida pelo método da Máxima Verossimilhança, baseado no modelo de correção de Poisson. A árvore de consenso inferida a partir de 1000 réplicas. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de autoinicialização (1000 repetições) são mostrados próximos aos ramos. A análise envolveu 7 sequências de aminoácidos sendo 6 referentes ao trabalho de Wang et al., (2017) e a brummer identificada no presente trabalho. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7.

Do ponto de vista da biologia molecular, foi observado que as lipases 3, TAG lipase 1 e TAG lipase 2 possuem padrões de expressão semelhantes, ocorrendo em níveis muito baixos ou nulos após a emergência em adultos, porém, ocorrendo em 24h após uma alimentação com sangue e se intensificando após 36h. As lipases 1 e 2 ocorrem logo nas primeiras 24h após emergência e nas primeiras 24h após a emergência. Enquanto a TAG lipase 3, que foi a mais próxima filogeneticamente com a bmm, ocorreu em baixos níveis entre 12 e 24h após a emergência tendo baixíssimos ou nulos níveis de expressão mesmo após a alimentação sanguínea tendo apenas um pico 12h após a alimentação com sangue. Esses perfis nos fizeram questionar qual é o perfil da bmm após uma alimentação sanguínea e se ela tem semelhança com o momento de ocorrência dessas lipases.

5.7 Efeitos de uma alimentação sanguínea nos níveis de brummer e TAG

Para completar seu ciclo gonadotrófico, é providencial para a maioria dos mosquitos fêmeas que alimentem-se com sangue para obter aminoácidos essenciais e outros nutrientes para a produção dos seus ovos (DANIELL, 2014). Após o terceiro dia de emergência em adultos, as fêmeas já atingiram a maturidade sexual e, assim, estão aptas para reproduzirem-se (ROY et al., 2016). Fêmeas após a emergência em adulto foram mantidas sob uma dieta com sacarose 10% por 3 dias sendo alimentadas com sangue após esse período. Após a alimentação sanguínea foi observado um aumento significativo da expressão da bmm em 36h pós alimentação sanguínea (PAS) quando comparado com 6h PAS. Em 72h PAS houve uma queda na expressão, mas que se manteve bastante elevada quando comparada com 6h PBM. Fomos avaliar se o estresse de um jejum exerceria algum efeito sobre a expressão da bmm quando comparado aos animais alimentados. Para isso, fêmeas pós-emergência não receberam alimentação de sacarose 10% por três dias e a expressão da bmm foi determinada após a refeição com sangue após esse período (Figura 13). Sob jejum, foi observada uma queda bastante expressiva 6h PAS quando comparada aos animais antes de receberem a alimentação sanguínea (72 PE). Em 36h e 72h PAS a expressão da bmm seguiu um perfil similar ao dos animais que foram alimentados com sacarose após a emergência. Um fato observado foi que fêmeas que não receberam uma dieta com sacarose aparentaram consumir um volume maior de sangue quando comparado as fêmeas que receberam tal dieta (dado não mostrado).

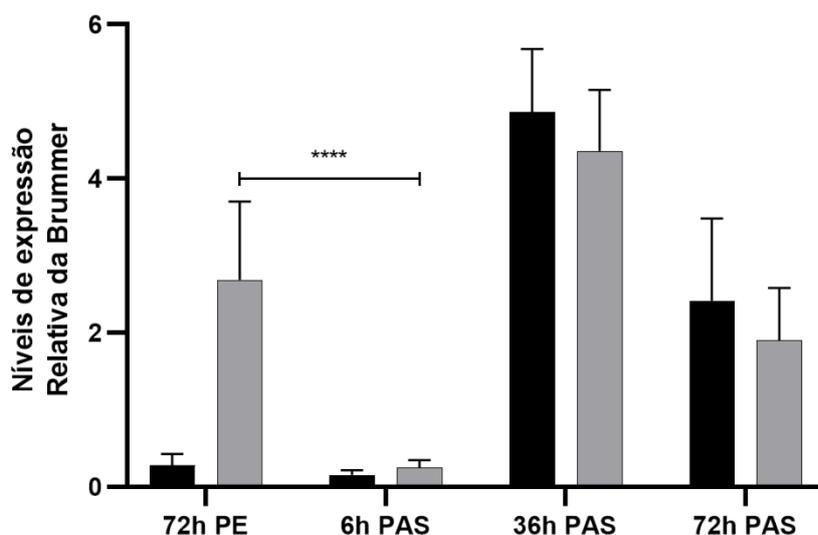


Figura 14. Níveis de expressão do gene brummer no corpo gorduroso de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* horas após uma alimentação sanguínea. As barras pretas representam fêmeas adultas que receberam uma dieta com solução contendo uma solução com 10% de sacarose. As barras cinzas representam fêmeas adultas que receberam uma dieta contendo apenas água. A alimentação sanguínea foi realizada após 3 dias submetidos a sua dieta *ad libitum*. Os níveis de expressão são relativos a fêmeas adultas submetidas a uma dieta com sacarose recém emergidas em adultas (1.0). Valores estão representados como porcentagens de expressão e representam a média de quatro replicatas biológicas independentes \pm SEM. As diferenças estatísticas foram determinadas através de Two-way ANOVA (**** $P > 0.0001$).

Afim de um contraponto aos níveis de bmm, avaliamos a ocorrência de TAG nas mesmas condições (Figura 14). Ao observar o TAG presente no corpo gorduroso de fêmeas que foram alimentadas com sangue antecedidas por 3 dias sob uma dieta com sacarose tendo os dados normalizados pelo n utilizado, observamos que não houve diferença entre elas, mantendo os mesmos níveis de quando estiveram no terceiro dia com a dieta de sacarose 10%. Em contrapartida, as fêmeas que estiveram sob jejum por 3 dias, já em 6h de alimentar com sangue, tiveram um aumento na ocorrência de TAG em quase três vezes, seguido por uma queda abrupta que quase exauriu o TAG presente, porém, após 72h se igualou aos níveis das fêmeas que tiveram uma dieta com sacarose.

Porém, os níveis de TAG normalizados por proteína tiveram um perfil diferente aos dados normalizados por número de animais. As fêmeas que foram alimentadas por 3 dias com sacarose mantiveram nas primeiras 6h os mesmos níveis de antes da alimentação sanguínea, sucedido por um aumento de cerca de 5 vezes em 36h PAS que se manteve em 72h PAS. Já as fêmeas submetidas ao jejum antes da alimentação sanguínea tiveram um aumento, nas primeiras

horas (6h PAS), sucedida por uma queda bem grande (36h PAS), que também foi visto na normalização por animal, e seguido por um aumento de cerca de 12 vezes em 72h PAS.

A variação observada nos dados normalizados por proteína pode ser relacionada a refeições sanguíneas, que além de serem necessárias para completar o ciclo gonadotrófico de fêmeas adultas, também podem ser uma importante fonte energética. Zhou et al., (2004) observaram que a partir de uma alimentação artificial com aminoácidos marcados, 65% desses aminoácidos são oxidados e excretados, 15% é convertido em lipídios para a fêmea ou para os ovos, 10% é convertido em glicogênio ou outros metabólitos e 10% é convertido em proteínas para a fêmea ou ovos. Os dados do presente estudo indicam que as fêmeas que estiveram sob jejum, na ausência de uma refeição rica em açúcar, utilizou aminoácidos presentes no sangue para síntese lipídica, que foi logo vista nas primeiras 6h PAS, porém, mobilizou seus estoques para prover energia para a vitelogênese. Esse comportamento evidenciou que as fêmeas priorizaram as demandas próprias, ocasionando a quebra do jejum logo nas primeiras 6h PAS, fato que é observado através da queda dos níveis de mRNA de bmm. Além disso, os níveis de proteína em 72h PAS também foi notório, fato que pode ser correlacionado com os níveis de TAG, pois, em comparação com 36h PAS, em 72h houve uma redução dos níveis de proteínas totais nas fêmeas sob jejum e uma elevação nos níveis de TAG que se igualaram as fêmeas alimentadas com sacarose, provavelmente, parte dessas proteínas foram mobilizadas para a síntese lipídica nesse momento evidenciando que elas podem ser importantes fontes energéticas na ausência de sacarose.

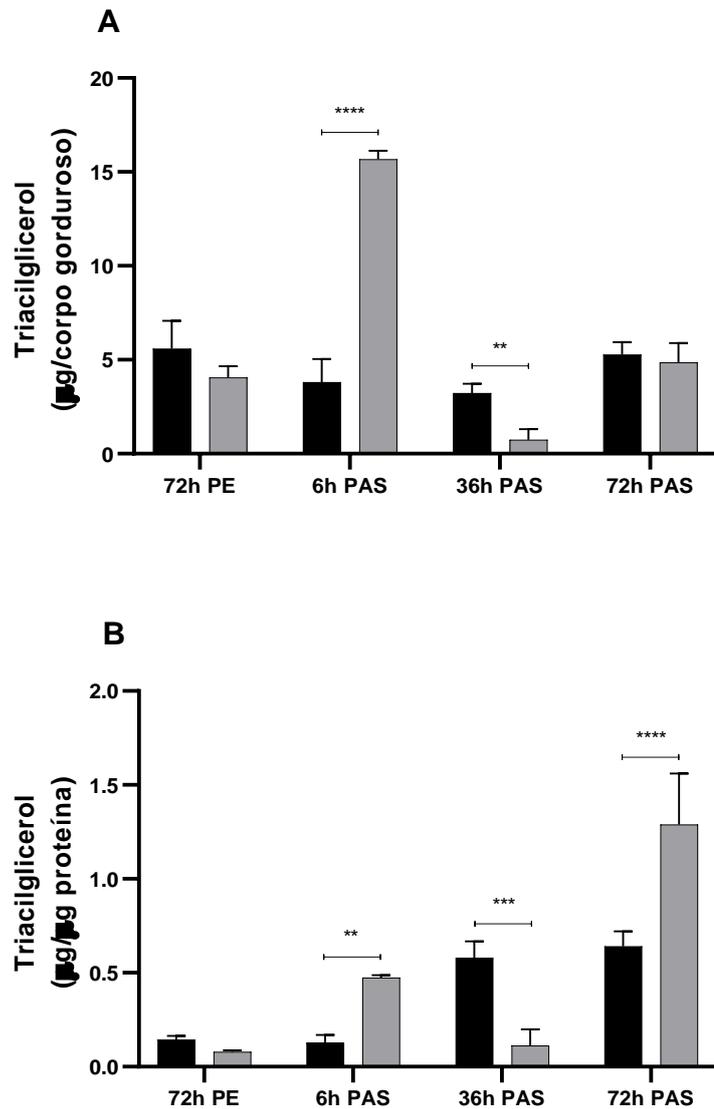


Figura 14. Conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* horas após uma alimentação sanguínea. A: Triacilglicerol normalizado por corpo gorduroso. B: Triacilglicerol por normalizado por proteína. As barras pretas representam fêmeas adultas que receberam uma dieta com solução contendo uma solução com 10% de sacarose. As barras cinzas representam fêmeas adultas que receberam uma dieta contendo apenas água. A alimentação sanguínea foi realizada após 3 dias submetidos a sua dieta *ad libitum*. As diferenças estatísticas foram determinadas através de Two-way ANOVA (** $P > 0.01$ **** $P > 0.0001$).

5.8 Relação entre a expressão nos níveis de *brummer* e os estoques lipídicos

A *bmm* é um gene responsivo a fome, sendo positivamente regulada em condições de jejum, fato que corrobora com nossos dados frente a dieta sem sacarose. A indução da fome pode ser gerada tanto pelo processo de pupação com o aumento do 20-hidroxiecdisona (20E) desencadeado pelos processos de muda em insetos imaturos (WANG et al., 2010), como pela ausência de alimento por insetos adultos. Respostas adaptativas de espécies de insetos frente a condições de estresse garantiram sua sobrevivência frente as adversidades impostas, a resistência a fome é uma delas. O estabelecimento de reservas energética e sua utilização sob demanda é precisamente regulada. Na ausência de uma dieta altamente energética, nós observamos que fêmeas adultas aumentaram cerca de 7 vezes a expressão da *bmm*. Grönke et al., (2005) observaram o acúmulo excessivo de moléculas de TAG no corpo gorduroso de *D. melanogaster* com *bmm* mutante, porém, quando houve o silenciamento dela em *N. lugens*, o conteúdo de lipídios na hemolinfa diminuiu, enquanto houve um aumento no corpo gorduroso (ZHOU et al., 2018a). Nós observamos que a *bmm* e os estoque de TAG são inversamente correlacionáveis. A redução das reservas lipídicas, gera o aumento da expressão dos níveis de *bmm*. O aumento dos níveis de expressão pode ser explicado como uma reação aos altos níveis do hormônio adipocinético (AKH) que possui ação semelhante ao glucagon em mamíferos e que atua em paralelo a *bmm* durante a fome o regulando positivamente (BHARUCHA; TARR; ZIPURSKY, 2008; GRÖNKE et al., 2007). Na literatura também foi observado que a superexpressão do factor Forkhead box protein sub-group O (FoxO) induz a expressão da *bmm* (GERSHMAN et al., 2007), em contrapartida, sua mutação sub regula a *bmm* no corpo gorduroso (WANG et al., 2011). Há consenso que todos esses fatores são super expressos em condições de restrição alimentar.

Hossain et al., (2013) concluíram que o hormônio 20E, que induz a lipólise no corpo gorduroso de *B. mori* durante a muda e pupação, aumenta a atividade transcricional de FoxO e, conseqüentemente, regulando positivamente a *bmm*. Além disso, a fase PBM, que começa a partir da ingestão de sangue, é principalmente moderada pelo 20E, resultando em um rápido desenvolvimento dos ovos (WANG et al., 2017). A 20E possui baixíssimos níveis nas primeiras horas PBM, passam a aumentar após 12h PBM, tenho um pico em 18h PAS e declinando vagarosamente após 30h cessando a vitelogênese e começando a fase de terminação do ciclo reprodutivo (ROY et al., 2016). Nossos resultados dos níveis de expressão da *bmm* concordam parcialmente com o fato da 20E estar muito baixa nas primeiras 6h PAS e aumentarem posteriormente, observamos que os níveis de expressão em 36h PAS estão maiores que 6h PAS,

porém, já estaria representando um declínio nos níveis de 20E e menores ainda em 72h PAS. Um fato curioso foi a rápida queda nos níveis de expressão da bmm 6h PAS quando comparado a 72h PE evidenciando a resposta imediata do organismo após a refeição sanguínea.

Atualmente, poucos estudos falam a respeito da quebra da fome em *Aedes aegypti*. A desregulação do metabolismo gerou uma resposta imediata de sobrevivência ao entrar em contato com o alimento, priorizando-o, em um primeiro momento, estocar o máximo possível de energia para garantir a sobrevivência e, secundariamente, investir na produção de ovos. Foi nítida a distinção entre fêmeas com diferentes dietas sob a perspectiva da bmm e do TAG. A bmm não mostrou diferenças após a alimentação sanguínea, logo um outro fator que não foi avaliado no presente estudo gerou uma regulação a bmm.

6. CONCLUSÕES

A expressão da brummer ocorre de forma diferencial durante a vida de *Ae. aegypti*, sendo regulada por fatores hormonais, como resposta a condições fisiológicas ou ambientais. Fatores não identificados nesse estudo geraram o aumento da bmm entre as fases L2 e L3, consideramos que mais estudos são necessários para responder a essa questão. A dieta influencia a ocorrência da bmm no corpo gorduroso que responde a ausência prolongada de nutrientes em fêmeas adultas. Nos primeiros 3 dias após a emergência, elas utilizam os estoques provindos das fases imaturas. Em 72h PE há um grande gasto energético associado a maturação sexual reduzindo os estoques de TAG, após esse período, fêmeas adultas com a disponibilidade de uma dieta rica em açúcar reestabelece suas reservas lipídicas. Aminoácidos presentes no sangue ou proteínas presentes no corpo gorduroso podem ser utilizados como fonte energética. Além disso, há outros fatores que influenciam o aumento da expressão da bmm sendo muito mais evidentes após uma alimentação sanguínea. A observação de seus efeitos após a silenciamento e sob o ponto de vista de machos e/ou em outros tecidos, como ovários (no caso de fêmeas), podem ser interessantes para responder a questões que não foram contempladas nesse trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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

ALERSTAM, T.; LINDSTRÖM, Å. **Optimal Bird Migration: The Relative Importance of Time, Energy, and Safety**. 1. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

ALMEIDA-OLIVEIRA, F. et al. Reference genes for quantitative PCR in the adipose tissue of mice with metabolic disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 88, p. 948–955, 2017.

ARAUJO, B. B. A. et al. Bigger kill than chill: The uneven roles of humans and climate on late Quaternary megafaunal extinctions. **Quaternary International**, v. 431, p. 216–222, 2017.

ARRESE, E. L. et al. Lipid storage and mobilization in insects: Current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 7–17, 2001.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 207–225, 2010.

ASSIS, W. A. DE et al. The characterization of the fat bodies and oenocytes in the adult females of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. **Arthropod Structure and Development**, v. 43, n. 5, p. 501–509, set. 2014.

ATTARDO, G. M. et al. Analysis of lipolysis underlying lactation in the tsetse fly, *Glossina morsitans*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 5, p. 360–370, maio 2012.

AZEEZ, O. I.; MEINTJES, R.; CHAMUNORWA, J. P. **Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: The nexus Lipids in Health and Disease**, 2014. Disponível em: <<http://www.lipidworld.com/content/13/1/71>>. Acesso em: 2 jul. 2019

BARAL, C. et al. Viewpoint ask not what your postdoc can do for you ... **Communications of the ACM**, v. 61, n. 1, p. 42–44, 2018.

BEACH, V. **From the Florida State Board of Health Entomological Research Blood**. [s.l.:

s.n.]. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1357660/pdf/jphysiol01162-0034.pdf>>.

Acesso em: 10 jun. 2019.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; RIBEIRO, P. S. Larval density as related to life cycle, size and fecundity of aedes (*Stegomyia*) aegypti (L.) (Diptera: Culicidae) in laboratory. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 847–852, 2009.

BHARUCHA, K. N.; TARR, P.; ZIPURSKY, S. L. A glucagon-like endocrine pathway in *Drosophila* modulates both lipid and carbohydrate homeostasis. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 19, p. 3103–3110, 1 out. 2008.

BOROVSKY, D. **Biosynthesis and Control of Mosquito Gut Proteases** *IUBMB Life*, 1 ago. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1080/15216540310001597721>>. Acesso em: 28 nov. 2020

BRADY, O. J. et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018** *Boletim Epidemiológico*. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>>.

BRIEGEL, H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n. 3, p. 165–172, jan. 1990.

BROWN, M. R.; SIEGLAFF, D. H.; REES, H. H. Gonadal Ecdysteroidogenesis in Arthropoda: Occurrence and Regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 54, n. 1, p. 105–125, 2009.

CANAVOSO, L. E. et al. Fat Metabolism in Insects. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 23–46, 2001.

CARRIERE, F. et al. Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. **Gastroenterology**, v. 105, n. 3, p. 876–888, 1 set. 1993.

CHAPMAN, R. F. **The Insects Structure and Function**. 5. ed. New York: Cambridge University Press, 2013.

CHUNG, H. N. et al. Fat body organ culture system in aedes aegypti, A vector of zika virus. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2017, n. 126, p. 1–8, 2017.

CLEMENTS, A. N. The biology of mosquitoes. v. 3, p. 1–571, 2011.

COFFEL, E. D.; HORTON, R. M.; DE SHERBININ, A. **Temperature and humidity based projections of a rapid rise in global heat stress exposure during the 21st century***Environmental Research Letters*, 1 jan. 2018. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/1748-9326/13/i=1/a=014001?key=crossref.1628e439fe93adb84839f0550336785b>>

COLLINS, K.; WARNOW, T. PASTA for proteins. **Bioinformatics**, v. 34, n. 22, p. 3939–3941, 2018.

DA SILVA, R. M. et al. Hypometabolic strategy and glucose metabolism maintenance of *Aedes aegypti* egg desiccation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 227, p. 56–63, 1 jan. 2019.

DANIELL, H. Sleeping dogs of the genome: Retrotransposable elements may be agents of somatic diversity, disease and aging. **Science**, v. 346, n. 6214, p. 211–220, 2014.

DOW, J. A. T. Insect Midgut Function. **Advances in Insect Physiology**, v. 19, n. C, p. 187–328, 1987.

ESTEVEZ, A.; EHRLICH, R. **Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins***Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* Elsevier Inc., , mar. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045605002413>>. Acesso em: 8 maio. 2020

FARNESI, L. C. et al. Embryonic development and egg viability of wMel-infected *Aedes aegypti*. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, 2019.

FINN, R. D. et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016.

- FOSTER, W. A. Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics. **Annual Review of Entomology**, v. 40, n. 1, p. 443–474, 1995.
- GEISER, F.; KENAGY, G. J. Dietary fats and torpor patterns in hibernating ground squirrels. **Canadian Journal of Zoology**, v. 71, n. 6, p. 1182–1185, 1993.
- GENTILE, C.; LIMA, J. B. P.; PEIXOTO, A. A. Isolation of a fragment homologous to the rp49 constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 545–547, 2005.
- GERSHMAN, B. et al. High-resolution dynamics of the transcriptional response to nutrition in *Drosophila*: A key role for dFOXO. **Physiological Genomics**, v. 29, n. 1, p. 24–34, 14 mar. 2007.
- GHOSH, M. et al. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 6, p. 487–510, 2006.
- GLAESSER, D. et al. Global travel patterns: An overview. **Journal of Travel Medicine**, v. 24, n. 4, p. 330–342, 2017a.
- GLAESSER, D. et al. Global travel patterns: An overview. **Journal of Travel Medicine**, v. 24, n. 4, p. 1–5, 2017b.
- GONDIM, K. C. et al. Lipid metabolism in insect disease vectors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 101, n. August, p. 108–123, 2018.
- GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, n. July, p. 1–13, 2017.
- GRANT, P. M.; BATRA, I. P. Band structure of polyacetylene, (CH)_x. **Solid State Communications**, v. 29, n. 3, p. 225–229, 1979.
- GRÖNKE, S. et al. Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 5, p. 323–330, 2005.
- GRÖNKE, S. et al. Dual lipolytic control of body fat storage and mobilization in *Drosophila*. **PLoS Biology**, v. 5, n. 6, p. 1248–1256, 2007.

GROSSMAN, G. L. et al. Evidence for two distinct members of the amylase gene family in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 8–9, p. 769–781, ago. 1997.

GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21 st century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4 SUPPL., p. 3–11, 2011.

HAHN, D. A.; DENLINGER, D. L. **Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization** *Journal of Insect Physiology* Pergamon, , 1 ago. 2007.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002219100700087X?via%3Dihub>>.

Acesso em: 18 jun. 2019

HAHN, D. A.; DENLINGER, D. L. Energetics of insect diapause. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 103–121, 7 jan. 2011.

HIRSCHBERG, H. J. H. B. et al. Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 19, p. 5037–5044, 1 out. 2001.

HOLTOF, M. et al. **Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut** *Cell and Tissue Research*, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00441-019-03031-9>>.

Acesso em: 8 maio. 2020

HORNE, I.; HARITOS, V. S.; OAKESHOTT, J. G. Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 8, p. 547–567, 2009.

HOSSAIN, M. S. et al. 20-Hydroxyecdysone-induced transcriptional activity of FoxO upregulates brummer and acid lipase-1 and promotes lipolysis in *Bombyx* fat body. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 9, p. 829–838, set. 2013.

HOU, Y. et al. Temporal Coordination of Carbohydrate Metabolism during Mosquito Reproduction. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 7, p. 1–24, 2015.

HU, G.; KURGAN, L. Sequence Similarity Searching. **Current Protocols in Protein Science**, v. 95, n. 1, p. 1–14, 2019.

HU, J. S. et al. Mechanisms of TiO₂ NPs-induced phoxim metabolism in silkworm (*Bombyx mori*) fat body. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 129, p. 89–94, maio 2016.

IWAMURA, T.; GUZMAN-HOLST, A.; MURRAY, K. A. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2130, 2020.

JINDRA, M.; PALLI, S. R.; RIDDIFORD, L. M. The Juvenile Hormone Signaling Pathway in Insect Development. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 181–204, 2013.

JOHNSON, M. B.; BUTTERWORTH, F. M. Maturation and aging of adult fat body and oenocytes in *Drosophila* as revealed by light microscopic morphometry. **Journal of Morphology**, v. 184, n. 1, p. 51–59, 1985.

KAWAI, T.; FUSHIKI, T. Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, n. 2 54-2, p. R447–R454, ago. 2003.

KIENESBERGER, P. C. et al. Mammalian patatin domain containing proteins: A family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. SUPPL., p. S63–S68, 2009.

KLOWDEN, M. J. **Physiological Systems in Insects: Third Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013.

KOTSAKIOZI, P. et al. Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2017.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. **eLife**, v. 4, n. JUNE2015, p. 1–18, 2015.

KUNZE, K. et al. The wordometer - Estimating the number of words read using document image retrieval and mobile eye tracking. **Proceedings of the International Conference on Document Analysis and Recognition, ICDAR**, p. 25–29, 2013.

LASS, A. et al. Lipolysis - A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 1, p. 14–27, 2011.

- LETA, S. et al. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 67, p. 25–35, 2018.
- LOCKE, M. **Insect Ultrastructure**. 1. ed. Springer, Boston, MA: Plenum Press, 1984.
- LORD, C. C.; BROWN, J. M. Distinct roles for α - β hydrolase domain 5 (ABHD5/CGI-58) and adipose triglyceride lipase (ATGL/PNPLA2) in lipid metabolism and signaling. **Adipocyte**, v. 1, n. 3, p. 123–131, 2012.
- MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Insect lipid metabolism: Insights into gene expression regulation. In: **Recent Trends in Gene Expression**. [s.l: s.n.]. p. 147–189.
- MARTINS, G. F. et al. A comparative study of fat body morphology in five mosquito species. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 742–747, 2011a.
- MARTINS, G. F. et al. Insights into the transcriptome of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 308–315, 2011b.
- MARTINS, G. F. et al. Histochemical and ultrastructural studies of the mosquito *Aedes aegypti* fat body: Effects of aging and diet type. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, n. 11, p. 1032–1039, 2011c.
- MARTINS, G. F. et al. Isolation, primary culture and morphological characterization of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. **Tissue and Cell**, v. 43, n. 2, p. 83–90, 1 abr. 2011d.
- MARTINS, G. F.; PIMENTA, P. F. P. Structural Changes in Fat Body of *Aedes aegypti* Caused by Aging and Blood Feeding. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 6, p. 1102–1107, 2008.
- MAY, R. **Plagues and peoples**. New York: Anchor Books, 2006. v. 58
- MEYER, H.; VITAVSKA, O.; WIECZOREK, H. Identification of an animal sucrose transporter. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 12, p. 1984–1991, 15 jun. 2011.
- MILLER, J. C. **Atlas of the Transatlantic Slave Trade**. New Haven: Yale University Press, 2011. v. 32
- NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico, São Paulo**, v. 64, n. 2, p. 205–207,

2002.

NATION, J. L. **Insect Physiology and and Biochemistry**. 3. ed. GAINESVILLE: CRC Press, 2016. v. 672

NELSON, M. J. **Aedes aegypti: biology and ecology**. Washington: [s.n.].

NIWA, R.; NIWA, Y. S. Enzymes for ecdysteroid biosynthesis: Their biological functions in insects and beyond. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 78, n. 8, p. 1283–1292, 2014.

POTTER, S. C. et al. HMMER web server: 2018 update. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W200–W204, 2018.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. **History of domestication and spread of Aedes aegypti--a review** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2013.

PRICE, D. P. et al. Small mosquitoes, large implications: Crowding and starvation affects gene expression and nutrient accumulation in *Aedes aegypti*. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, 2015.

RASMUSSEN, R. **Quantification on the LightCycler**. Heidelberg: Springer US, 2001.

RODGERS, R. J.; TSCHÖP, M. H.; WILDING, J. P. H. Anti-obesity drugs: Past, present and future. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 5, n. 5, p. 621–626, 2012.

ROMA, G. C.; BUENO, O. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. **Micron**, v. 41, n. 5, p. 395–401, jul. 2010.

ROMER, F.; EMMERICH, H.; NOWOCK, J. Biosynthesis of ecdysones in isolated prothoracic glands and oenocytes of *Tenebrio molitor* in vitro. **Journal of Insect Physiology**, v. 20, n. 10, p. 1975–1987, 1974.

ROY, S. et al. Regulation of Reproductive Processes in Female Mosquitoes. In: **Advances in Insect Physiology**. [s.l: s.n.]. v. 51p. 115–144.

RUIZ, J. I.; OCHOA, B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. **Journal of**

Lipid Research, v. 38, n. 7, p. 1482–1489, 1997.

RUVOLO, M. C. C.; LANDIM, C. DA C. Morphologic and morphometric aspects of oenocytes of *Apis mellifera* queens and workers in different phases of life. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 3, p. 387–395, 1993.

SCHWEDES, C. C.; CARNEY, G. E. **Ecdysone signaling in adult *Drosophila melanogaster*** *Journal of Insect Physiology* Pergamon, , 1 mar. 2012.

SHI, Y.; BURN, P. **Lipid metabolic enzymes: Emerging drug targets for the treatment of obesity** *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004.

SILVA, E. R. M. N. et al. The influence of larval density on triacylglycerol content in *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, p. 1–11, 3 nov. 2020.

SØNDERGAARD, L. Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body. **Trends in Genetics**, v. 9, n. 6, p. 193, jun. 1993.

TABACHNICK, W. J. Evolutionary Genetics and Arthropod-borne Disease: The Yellow Fever Mosquito. **American Entomologist**, v. 37, n. 1, p. 14–26, 1991.

TAKKEN, W. et al. Larval nutrition differentially affects adult fitness and *Plasmodium* development in the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 345, 10 dez. 2013.

TAVEIRA, L. A.; FONTES, L. R.; NATAL, D. **Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti***. Ribeirão Preto: [s.n.].

TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arbovirose no Brasil. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 3, p. 267–276, 2017.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and**, v. 109, n. 1, p. 1–62, set. 1994.

TOPRAK, U. et al. A chitin deacetylase and putative insect intestinal lipases are components

of the *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) peritrophic matrix. **Insect Molecular Biology**, v. 17, n. 5, p. 573–585, out. 2008.

TOPRAK, U. et al. A journey into the world of insect lipid metabolism. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 2, p. 1–67, 2020.

TURGAY-İZZETOĞLU, G.; GÜLMEZ, M. Characterization of fat body cells at different developmental stages of *Culex pipiens*. **Acta Histochemica**, v. 121, n. 4, p. 460–471, maio 2019.

TZOU, P.; DE GREGORIO, E.; LEMAITRE, B. How *Drosophila* combats microbial infection: A model to study innate immunity and host-pathogen interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 102–110, 1 fev. 2002.

UPSHUR, I. F. et al. Temperature and sugar feeding effects on the activity of a laboratory strain of *Aedes aegypti*. **Insects**, v. 10, n. 10, 16 out. 2019.

VAN HOUTEN, B.; WOSHNER, V.; SANTOS, J. H. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. **DNA Repair**, v. 5, n. 2, p. 145–152, 2006.

VENANCIO, T. M. et al. The *Aedes aegypti* larval transcriptome: A comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. **Insect Molecular Biology**, v. 18, n. 1, p. 33–44, fev. 2009.

WANG, B. et al. A hormone-dependent module regulating energy balance. **Cell**, v. 145, n. 4, p. 596–606, 13 maio 2011.

WANG, S. et al. 20-Hydroxyecdysone reduces insect food consumption resulting in fat body lipolysis during molting and pupation. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 3, p. 128–138, 2010.

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

WAT, L. W. et al. **A role for triglyceride lipase brummer in the regulation of sex differences in *Drosophila* fat storage and breakdown.** [s.l: s.n.]. v. 18

WIGGLESWORTH, V. B. The Storage of Protein, Fat, Glycogen and Uric Acid in the Fat Body and other Tissues of Mosquito Larvae. **Journal of Experimental Biology**, v. 19, n. 1, p. 56–77, 1942.

YONGMEI XI, Y. Z. Fat Body Development and its Function in Energy Storage and Nutrient Sensing in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Tissue Science & Engineering**, v. 06, n. 01, p. 1–8, 2015.

ZARA, A. L. DE S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saúde do Brasil**, v. 25, n. 2, p. 391–404, 2016.

ZHOU, G. et al. Metabolic fate of [14C]-labeled meal protein amino acids in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, n. 4, p. 337–349, 1 abr. 2004.

ZHOU, G.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. Utilization of pre-existing energy stores of female *Aedes aegypti* mosquitoes during the first gonotrophic cycle. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 9, p. 919–925, set. 2004.

ZHOU, J. et al. Characterization of a *Nilaparvata lugens* (Stål) brummer gene and analysis of its role in lipid metabolism. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 3, p. e21442, 2018a.

ZHOU, J. et al. Brummer-dependent lipid mobilization regulates starvation resistance in *Nilaparvata lugens*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 2, 1 out. 2018b.

ZIEGLER, R.; IBRAHIM, M. M. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 6, p. 623–627, 2001.

ZIMMERMANN, R. et al. **Fate of fat: The role of adipose triglyceride lipase in lipolysis** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, jun. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198108001881>>. Acesso em: 9 maio. 2020

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary divergence and convergence in proteins

BT - Evolving genes and proteins. **Evolving genes and proteins**, p. 97–166, 1965.