UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF

YOLANDA PORTO MUNIZ

Influência da bactéria simbionte *Wolbachia pipientis* no metabolismo de glicose durante a ovogênese do mosquito *Aedes fluviatilis*

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

JUNHO - 2017

YOLANDA PORTO MUNIZ

Influência da bactéria simbionte *Wolbachia pipientis* no metabolismo de glicose durante a ovogênese do mosquito *Aedes fluviatilis*

"Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal".

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JUNHO – 2017

YOLANDA PORTO MUNIZ

Influência da bactéria simbionte *Wolbachia pipientis* no metabolismo de glicose durante a ovogênese do mosquito *Aedes fluviatilis*

"Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal".

Aprovado em 13 de Junho de 2017

BANCA EXAMINADORA

Leonardo Araujo de Abreu (UFRJ/ Macaé) – Membro da banca

José Roberto da Silva (UFRJ/ Macaé) – Membro da banca

André Lacerda de Abreu Oliveira (UENF) – Membro da banca

Prof. Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira (UENF) – Orientador

Aos meus pais Marizete Gomes Porto Muniz e Gilcinei Sores Muniz, e ao meu marido Renato Martins da Silva. Por sempre confiar e acreditar em mim. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, pela força, pela confiança e por nunca me abandonar. Agradeço pelo seu amor incondicional;

À minha família e amigos, pela motivação e apoio;

Ao meu marido Renato Martins da Silva, pelo seu amor, carinho, companheirismo, compreensão, por nunca desistir de mim e sempre me incentivar a fazer o meu melhor;

Ao meu orientador Carlos Logullo, pelo incentivo e os puxões de orelha, por confiar em mim e no meu trabalho;

Aos integrantes da Unidade de Experimentação Animal, pelo convívio diário, pela ajuda;

Ao professor Luciano Moreira por todas as ajudas e colaborações**;**
Ã Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, aos meus professores, por todo suporte, ensino e dedicação;

Às agências de fomento: CNPq, FAPERJ, CAPES, INCT-Entomologia;

E aos membros da banca.

“Muitos homens odeiam a verdade, por amor daquilo, que tomaram por verdadeiro.”

Santo Agostinho

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é um dos mais conhecidos vetores da dengue e da febre amarela, causando grandes prejuízos na saúde pública no mundo, principalmente na África e na América Latina. A espécie é encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais. O *Aedes fluviatilis* é um mosquito neotropical e não é considerado vetor de doenças em condições naturais, constituindo um excelente modelo experimental. Estudos recentes têm proposto a introdução da bactéria *Wolbachia pipientis* em populações de mosquitos vetores como uma estratégia de controle biológico, a fim de reduzir a transmissão de doenças. A *Wolbachia pipientis* é um simbionte intracelular obrigatório que infecta cerca de 20% dos artrópodes. No *A. fluviatilis* esta bactéria atua como um endosimbionte facultativo, não interferindo no desenvolvimento do mosquito, e no *A. aegypti* essa bactéria atua como um parasita, afetando o fitness deste vetor. O presente trabalho visa compreender a modulação do metabolismo de glicose na ovogênese do mosquito *A. fluviatilis* sobre a influência da *Wolbachia pipients*. A *Wolbachia* afeta o conteúdo de glicogênio e a regulação das principais vias do metabolismo de carboidratos a fim de obter intermediários glicídicos para produção de energia, divisão e sua proliferação durante ovogênese e posterior embriogênese. Esse estudo também contribui para preencher a lacuna na literatura sobre a regulação metabólica resultante da interação parasita-hospedeiro, assim como a fisiologia desses artrópodes, ampliando também nossos conhecimentos acerca de outros organismos e suas adaptações metabólicas.

Palavras-chave: *Wolbachia*, *Aedes*, ovogênese, metabolismo.

ABSTRACT

The Aedes aegypti mosquito is one of the best known vectors of dengue and yellow fever, causing great damage to public health in the world, especially in Africa and Latin America. The species is found mainly in tropical and subtropical regions. Aedes fluviatilis is a neotropical mosquito and is not considered a vector of diseases under natural conditions, constituting an excellent experimental model. Recent studies have proposed the introduction of the bacterium Wolbachia pipientis in mosquitos as a biological control strategy in order to reduce the transmission of diseases. Wolbachia pipientis is an obligate intracellular symbiont that infects about 20% of arthropods. In A. fluviatilis this bacterium acts as a facultative endosymbionte, not interfering in the development of the mosquito, and in A. aegypti this bacterium acts as a parasite, affecting the fitness of this vector. The present work aims to understand the modulation of glucose metabolism in the oogenesis of the A. fluviatilis mosquito on the influence of Wolbachia pipients. Wolbachia affects the glycogen content and regulation of the main routes of carbohydrate metabolism in order to obtain glycidic intermediates for energy production, division and it proliferation during oogenesis and subsequent embryogenesis. This study also contributes to fill the gap in the literature on the metabolic regulation resulting from the parasite-host interaction, as well as the physiology of these arthropods, also expanding our knowledge about other organisms and their metabolic adaptations.

Keywords: *Wolbachia*, *Aedes*, oogenesis, metabolism.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Classificação taxonômica e o Ciclo de vida do mosquito *A. fluviatilis*.....14
FIGURA 2. Aparelho reprodutor feminino do mosquito.....16
FIGURA 3. Tipos de ovários em insetos.....18
FIGURA 4. A ovogênese termina em 86 horas após a alimentação sanguínea nos *A. fluviatilis*.....29
FIGURA 5. A *Wolbachia* não afeta o desenvolvimento ovariano nos mosquitos.....30
FIGURA 6. O teor de proteína total aumenta durante a ovogênese nos *A. fluviatilis*.....*31*
FIGURA 7. O glicogênio é acumulado no final da ovogênese nos *A. fluviatilis*.....32
FIGURA 8. Marcação de Glicogênio por PAS (Ácido Periódico de Schiff) durante o desenvolvimento ovariano dos *A. fluviatilis*.....*33*
FIGURA 9. Os níveis de glicose livre aumentam durante a ovogênese nos *A. fluviatilis*.....34
FIGURA 10. A atividade da Hexoquinase é afetada pela *Wolbachia* nos *A. fluviatilis*.....35
FIGURA 11. A atividade glicolítica aumenta durante a ovogênese nos *A. fluviatilis*.....36
FIGURA 12. A via das pentoses fosfato é aumentada pela *Wolbachia* durante a ovogênese nos *A. fluviatilis*.....37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....12

1.1. Ciclo de vida do mosquito *A. fluviatilis*.....13

1.2. Ovogênese.....17

1.3. Relação *Wolbachia*-mosquito.....19

1.4. Regulação do metabolismo de glicose na embriogênese do mosquito *A. aegypti* e *A.* fluviatilis.....20

2. OBJETIVOS.....23

2.1.Objetivo Geral.....23

2.2.Objetivo Específicos.....23

3. MATERIAS E MÉTODOS.....24

3.1.Manutenção dos mosquitos.....24

3.2. Obtenção de ovários.....24

3.3. Determinação do tempo da ovogênese.....24

3.4.Obtenção de homogeneizados de ovários.....25

3.5.Quantificação de Glicogênio.....25

3.6. Quantificação de Glicose.....26

3.7. Atividade de Hexoquinase.....26

3.8. Atividade de Piruvato quinase.....27

3.9.Atividade de Glicose-6-fosfato Desidrogenase.....27

3.10.Quantificação de Proteína total.....28

3.11.Análises Estatística.....28

3.12.Marcação de Glicogênio por PAS (Ácido Periódico de Schiff).....28

3.13.Microscopia dos ovários.....28

4. RESULTADOS.....29

4.1. Análise do tempo de ovogênese e do desenvolvimento ovariano dos *A. fluviatilis* na presença e ausência de *Wolbachia*.....29

4.2. Glicogênio, glicose e proteína são acumulados no decorrer da ovogênese.....31

4.3. A atividade da Hexoquinase é afetada na presença da *Wolbachia*.....35
4.4. A atividade glicolítica aumenta no decorrer do desenvolvimento ovariano.....36
4.5. A *Wolbachia* aumenta a atividade da G6PDH no final da ovogênese.....37

5. DISCUSSÃO.....38

6. CONCLUSÃO.....45

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....46

1. Introdução

Os mosquitos são insetos pertencentes à Ordem Diptera e Família Culicidae. Dentre eles o *Aedes* constitui um gênero de grande importância para a saúde pública mundial, pois constitui-se vetores de várias doenças como febre amarela, dengue, chikungunya e zika. No Brasil, o *Aedes aegypti* se destaca como principal vetor dessas doenças, sendo responsável por mais de 800 mortes e mais de 3,2 milhões de casos registrados somente para dengue nos últimos anos (Ministério da Saúde, 2015). Nesse contexto, grupos de pesquisa tem estudado aspectos metabólicos e fisiológicos desses mosquitos a fim de encontrar novos alvos que possam ser utilizados no controle desses vetores. Entretanto, outro mosquito do gênero *Aedes*, o *Aedes fluviatilis*, tem sido empregado como um excelente modelo experimental por apresentar muitas características biológicas semelhantes com o *A. aegypti,* sem que ocorra a transmissão de doenças em condições naturais (Consoli & Oliveira, 1994).

O *A. fluviatilis* é uma espécie neotropical, doméstica ou semidoméstica, encontrada em toda América Central e do Sul, abrangendo a região do sul do México até o norte da Argentina, e pode em muitos casos ser utilizado em substituição ao *A. Aegypti* ou o *A. albopictus*, não apresentando os riscos que estes envolvem. O seu baixo custo e facilidade de manutenção também o tornam útil para estudos biológicos de infecções experimentais e testes de suscetibilidade a inseticidas (Consoli & Williams,1978; Consoli *et al*., 1988). Outra abordagem é a utilização desse mosquito no estudo das interações parasita-hospedeiro como no caso do parasita da malária aviária, o *Plasmodium gallinaceum*. Sendo assim, esse mosquito pode ser utilizado com considerável segurança, uma vez que não se infecta com plasmódios da malária humana, nem tampouco com o vírus da dengue (Garnham, 1966; Camargo *et al*., 1983; Rocha *et al*., 2004).

No Brasil, o *A. fluviatilis* é encontrado em muitas regiões (Consoli & Oliveira, 1994; Forattini, 2002) apresentando uma cor parda escura, anéis brancos nas patas e uma mancha dourada na parte superior da cabeça, tendo como locais preferenciais para desova as cavidades das pedras e margens dos rios. Entretanto, hoje é possível encontrá-lo ovipondo nos mesmos depósitos utilizados pelos *A. aegypti* em regiões urbanas e peri-urbanas (FUNASA, 2001). A seleção do local de oviposição por parte das fêmeas é o principal fator responsável pela distribuição dos

mosquitos nos criadouros e é da maior relevância para a distribuição das espécies na natureza (Consoli & Oliveira, 1994).

1.1. Ciclo de vida do mosquito *A. fluviatilis*

O *A. fluviatilis* pertence ao grupo dos insetos holometabólicos, ou seja, durante seu ciclo de vida realizam uma metamorfose completa, compreendendo quatro fases: ovo, larva (quatro estádios larvais), pupa e adulto (Figura 1) (Forattini, 2002).

A fecundação ocorre durante a postura dos ovos, como os seus ovos não resistem à dessecação por tempo prolongado, eles são postos pela fêmea diretamente sobre a superfície da água, não aderido a substratos úmidos como no caso do *A. aegypti.* No momento da oviposição apresentam uma coloração pálida, tornando-se escuros após alguns minutos. Os ovos inférteis geralmente não alcançam essa tonalidade escura. Ao fim da embriogênese os ovos eclodem em larvas de primeiro estádio que ganham o meio aquático. No decorrer do desenvolvimento larval ocorrem quatro estádios distintos de muda até a transformação de larva em pupa (Consoli & Oliveira, 1994). Suas larvas são aquáticas, possuem um aspecto vermiforme e coloração enegrecida. Seu corpo é nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdômen, sendo que as duas primeiras partes são globosas, enquanto que o abdômen tem aspecto semicilíndrico e está dividido em nove segmentos. Ao contrário dos adultos que possuem aparelho bucal adaptado à punção, as larvas possuem aparelho bucal do tipo mastigador-raspador, e suas mandíbulas e maxilas são placas robustas dotadas de dentes e cerdas fortes, úteis à trituração dos alimentos. Apesar de serem aquáticas precisam subir a superfície da água para respirar, isso ocorre através do sifão respiratório que se encontra no VIII segmento do abdômen. Após os quatro estágios de muda, a larva se transforma em pupa (Consoli & Oliveira, 1994).

As pupas não se alimentam e também são aquáticas. Seu corpo é dividido em duas porções: cefalotórax e abdômen, sua coloração é a mesma da larva recém-transformada e escurece à medida que se aproxima o momento da emergência do adulto, elas são bastante móveis quando são perturbadas, mas estão quase sempre paradas na superfície da água. Após a metamorfose os adultos emergem das pupas e passam a viver no habitat terrestre (Consoli & Oliveira, 1994).

O corpo do adulto é nitidamente dividido em cabeça, tórax e abdômen. Na cabeça encontram-se os principais órgãos dos sentidos, como os olhos e as antenas. No tórax estão os apêndices especializados na locomoção, ou seja, patas e asas. No abdômen são encontrados os órgãos internos, dos aparelhos reprodutor, digestivo e excretor (Consoli & Oliveira, 1994).

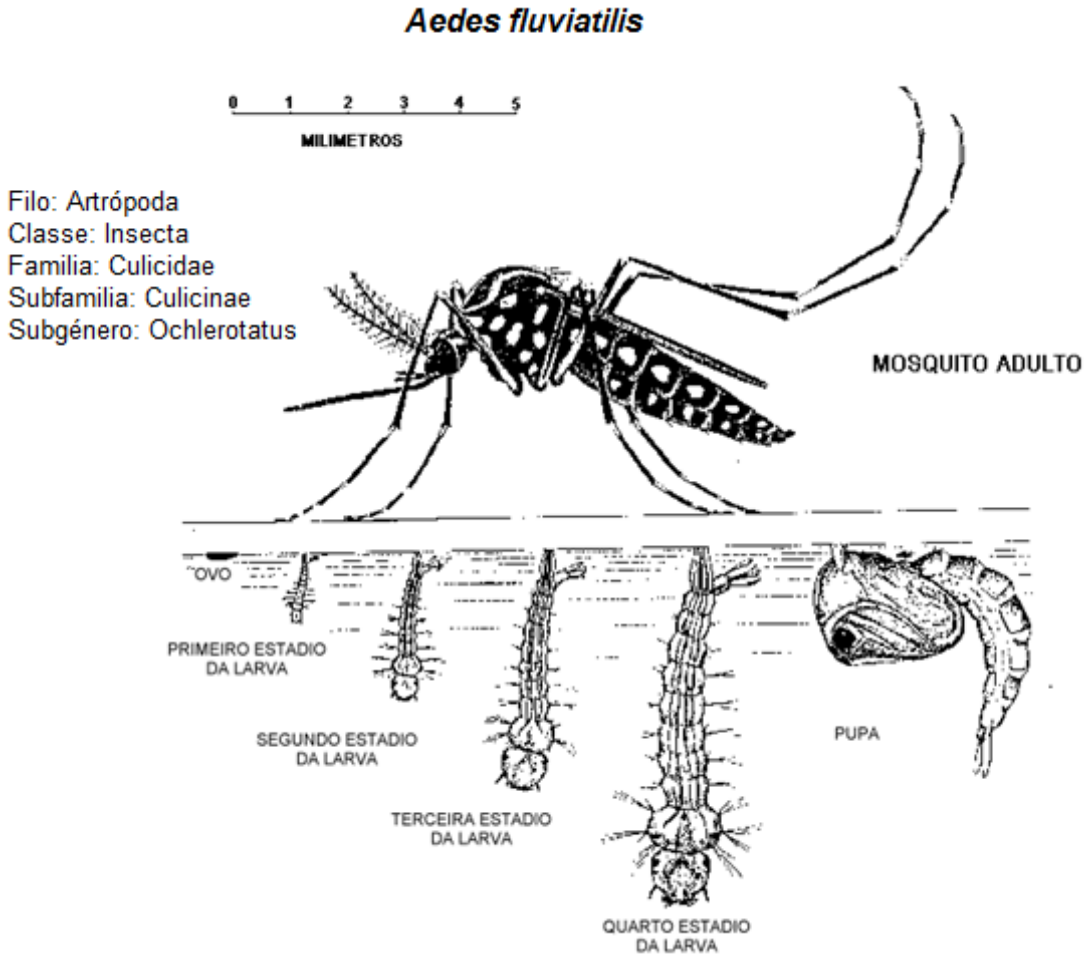

FIGURA 1. Classificação taxonômica e o Ciclo de vida do mosquito *A. fluviatilis.* Os ovos são postos na superfície da água. Os quatro estágios larvares assim como a pupa consistem na fase de vida aquática do inseto. Após a metamorfose os adultos passam a viver no habitat terrestre (Adaptado da FUNASA, 2001).

A fase de adulto representa a fase reprodutora do inseto. Os adultos possuem acasalamento estenogâmico, ou seja, são capazes de se acasalar em pequenos espaços, durante o voo ou pousados sobre uma superfície (Cambournac & Hill, 1940, in Bates, 1949). O acasalamento pode ocorrer antes ou após a primeira

alimentação sanguínea. Somente as fêmeas dos mosquitos são hematófagas e existe uma concordância gonotrófica, cada oviposição é precedida por um repasto sanguíneo, necessitado assim da alimentação sanguínea para iniciar a ovogêneses e consequentemente o processo reprodutivo. As fêmeas de *A. fluviatilis* são capazes de alimentar-se de sangue de mamíferos, aves e répteis, mostrando preferência pelo homem em condições experimentais (Consoli & Oliveira, 1994). Após a cópula, os espermatozoides são armazenados nas espermatecas e serão utilizados pouco a pouco para fecundar os ovos durante o processo de postura. Os espermatozoides podem manter-se viáveis por muito tempo (Clements, 1963; Andreadis & Hall, 1980). Em *A. fluviatilis* foram observados até 15 desovas fertilizadas por espermatozoides armazenados anteriormente à primeira desova (Consoli *et al*., 1983).

O aparelho reprodutor feminino dos mosquitos consiste de um par de ovários dorsilaterais, situados na porção posterior do abdômen, conectados por ovidutos laterais a um oviduto comum que se abre na vagina (Figura 2A) (Consoli & Oliveira, 1994). Os ovaríolos desembocam na porção superior dos ovidutos laterais e são em número variável. No *A. aegypti* foram estimados entre 50 a 150 ovaríolos (Colles & Chellapah, 1960). Numerosas traqueias, abundantemente ramificadas, servem os ovários. As espermatecas quitinizadas, providas de ductos finos, fundidos ou não, abrem-se na vagina. Em Culicinae podem ocorrer até 3 espermatecas, de tamanhos diferentes ou iguais (Consoli & Oliveira, 1994).

Cada ovaríolo consiste de um germário anterior seguido de um vitelário, envolvidos pela membrana ovariolar e pela membrana ovariana (Figura 2B). O germário contém células ainda pouco diferenciadas. O vitelário possui 2 ou 3 folículos, sendo cada qual formado por um ovócito, 7 trofócitos e um epitélio folicular circundante.

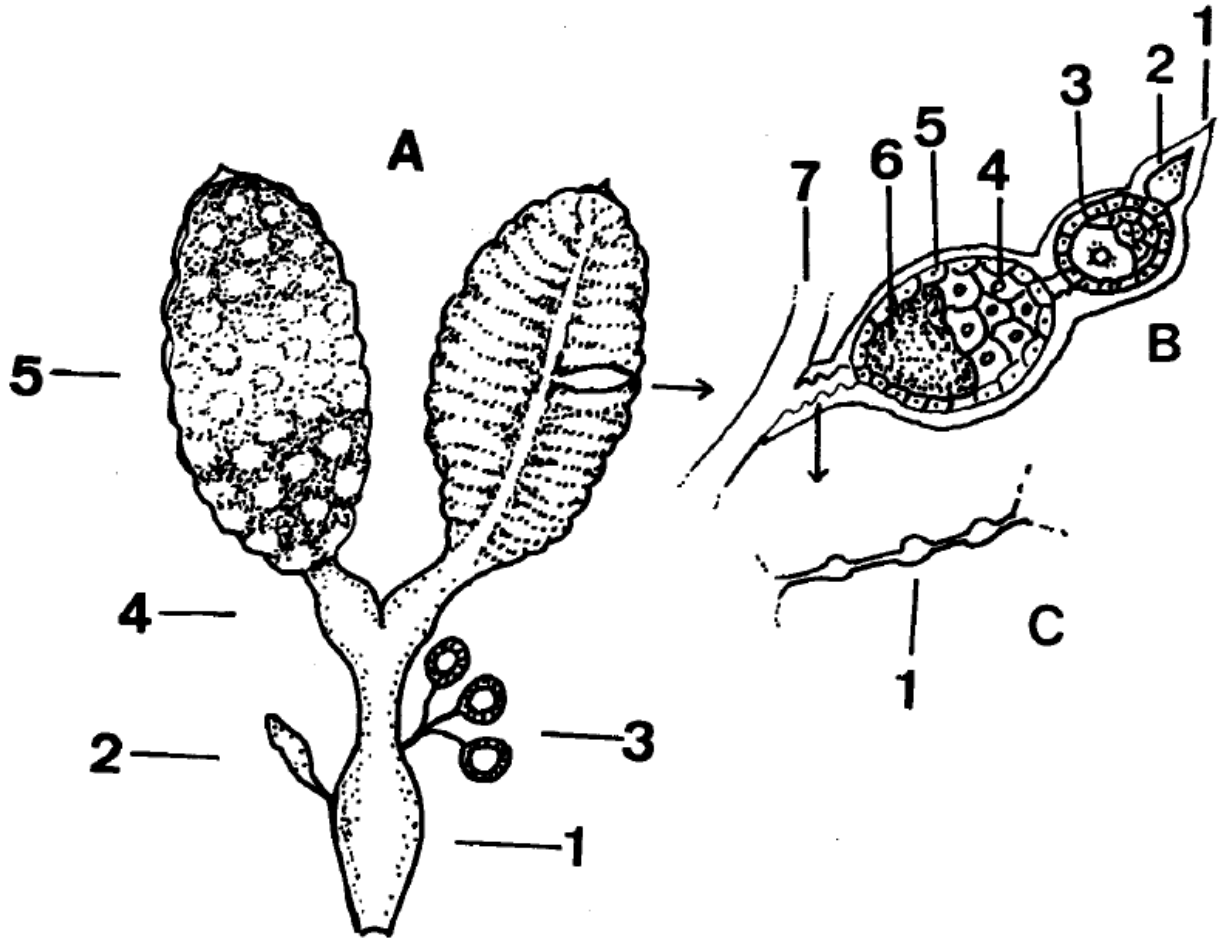

FIGURA 2. Aparelho reprodutor feminino do mosquito: (A) 1.vagina; **2.**glândula acessória; **3.**espermatecas; **4.**oviduto lateral; **5.**ovário. (**B) Ovaríolo: 1.**membrana ovariolar; **2:**germário primeiro folículo; **3.** segundo folículo; **4.**trofócitos do terceiro folículo; **5.**epitélio folicular; **6.**ovócito repleto de vitelo; **7.**oviduto interno. (**C) Pedículo ovariolar: 1.** dilatação (Consoli & Oliveira, 1994).

Segundo Detinova (1962), o desenvolvimento do folículo ovariano consiste em 5 estágios. Inicialmente o folículo é formado por 8 células indiferenciadas, apresentando-se esférico. No estágio I o ovócito pode ser claramente diferenciado dos 7 trofócitos, situados acima do mesmo. O estágio II é dividido em duas fases, no estágio II (1) grânulos de vitelo aparecem em volta do núcleo do ovócito e folículo assume forma oval. Já no estágio II (2) as granulações de vitelo aumentam consideravelmente no citoplasma do ovócito, que cresce e fica muito maior do que os tropófitos. O estágio III o ovócito ocupa ¾ do folículo que se alonga e o vitelo encobre totalmente o núcleo do ovócito. No estágio IV o folículo adquire uma forma muito alongado, com os trofócitos ocupando apenas sua extremidade superior e a oogônia ocupa 9/10 do folículo. No

estágio final (V) o córion recobre o ovo, aparecendo as características específicas da superfície do ovo, ficando os restos dos trofócitos restritos à extremidade proximal do folículo.

Quando o ovo atinge a maturidade, o epitélio folicular desaparece, ficando assim diretamente em contato com o oviduto. As contrações do oviduto são responsáveis pela ovulação. A oviposição segue-se imediatamente, ocorrendo à fertilização na passagem do ovo pelo oviduto comum, quando alguns espermatozoides liberados da espermateca penetram pela micrópila, sendo que um destes fertilizará o óvulo (Consoli *et al*., 1983).

1.2. Ovogênese

A ovogênese é o processo que conduz à maturação dos ovócitos durante a fase de pré-oviposição, caracterizada pelo rápido aumento no tamanho do ovário (Cherry, 1973). Em *A. fluviatilis* inicia-se com o repasto sanguíneo e termina na oviposição. Em insetos existem dois tipos básicos de ovogênese, o tipo panoístico e o tipo meroístico, sendo a principal diferença a presença de células nutridoras ou trofócitos no último e a ausência no primeiro (Figura 3A). Os ovários meroísticos podem ser telotróficos ou politróficos. Nos ovários meroísticos telotróficos, as células nutridoras permanecem na região apical, ligadas aos ovócitos por um cordão citoplasmático, nutrindo o ovócito a distância (Figura 3B). Nos ovários meroísticos politróficos, grupos de células nutridoras se formam e se movem junto com o ovócito encerradas no folículo, ao longo do vitelário (Figura 3C) (Chapman, 1998; Rockstein, 1973).

Os mosquitos apresentam ovários do tipo meroístico politrófico, pois possuem células nutridoras poliplóides que participam de cada cisto germinal e acompanham o ovócito ao longo de todo seu processo de crescimento e maturação até a sua liberação. Essas células nutridoras tornam-se poliplóides e especializam em transcrever RNAs mensageiros importantes para o futuro desenvolvimento embrionário (Fonseca *et al*., 2012).

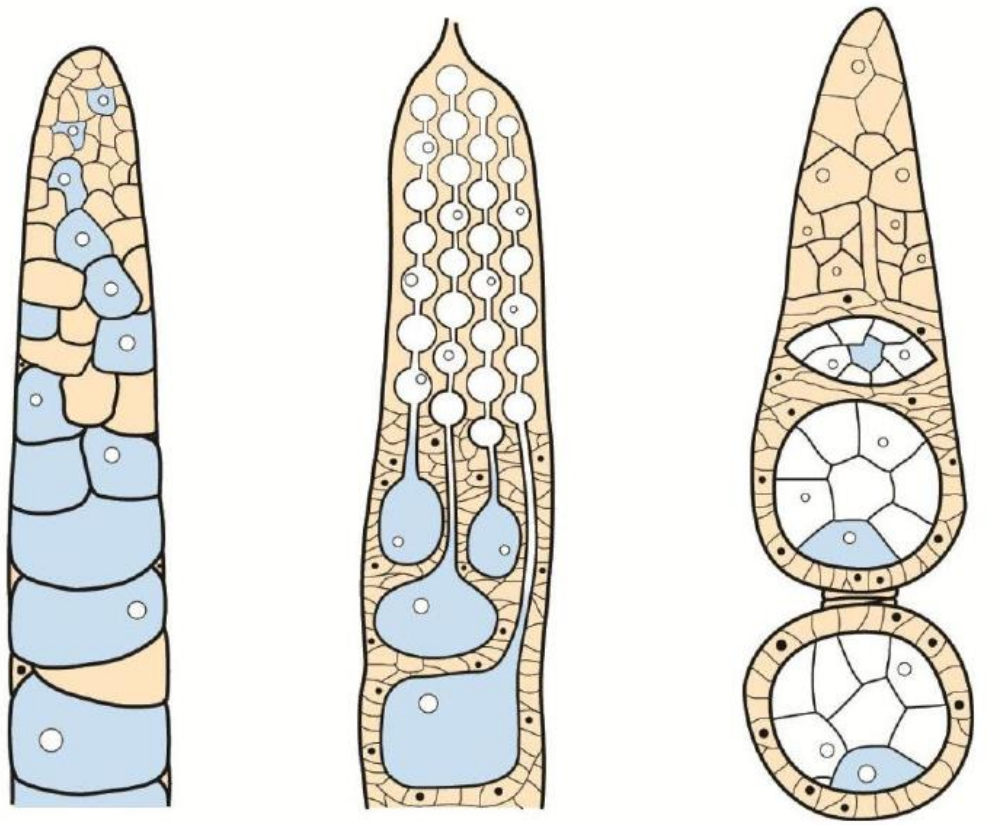

FIGURA 3. Tipos de ovários em insetos. (A) Ovário tipo panoístico onde o ovócito é azul e as laranjas são células foliculares. Não existem células nutridoras. (B) Ovário do tipo meroístico telotrófico onde células nutridoras permanecem no germário. (C) No ovário meroístico politrófico onde as células nutridoras poliplóides (branco) participam de cada cisto germinal e seguem o ovócito em azul até a sua liberação. Adaptado a partir de Buning, 1994. Ilustração por Vitória Santos. (Fonseca *et al*., 2012).

Muitos trabalhos confirmam a necessidade de proteínas para a produção de ovos nos mosquitos (Clements, 1963). Estudos indicam a necessidade de pelo menos dez aminoácidos essenciais na dieta para que ocorra a produção normal de ovos: arginina, isoleucina, lisina, felilalanina, treonina, triptofano, valina, histidina e metionina (Dimond, Lea & De long, 1958). Após a alimentação sanguínea, os açúcares, lipídios e aminoácidos derivados da digestão das proteínas do sangue são utilizados na maturação dos ovócitos. Sendo assim, para que se complete a ovogênese é necessário que ocorra uma regulação metabólica refinada que coordene a utilização de nutrientes, garantindo o crescimento apropriado do ovócito. A fêmea provê ao ovo todas as substâncias orgânicas e inorgânicas necessárias para o desenvolvimento do embrião (Stewart & Thompson, 1993). No momento da oviposição tudo que é requerido para o desenvolvimento do embrião já foi

adicionado ao ovo, com exceção de oxigênio para o metabolismo aeróbio (Rahn *et al.,* 1974) e, em algumas espécies, água (Vleck, 1991).

1.3. Relação *Wolbachia* - Mosquito

As Wolbachias são bactérias Gram negativas, α-proteobactéria e foram primeiramente identificadas nos ovários do mosquito *Culex pipiens* em 1924 por Hertig e Wolbach. Estas bactérias infectam artrópodes, incluindo uma alta taxa de insetos. Acredita-se que essas bactérias possam infectar até 76 % dos insetos (Hilgenboecker *et al*., 2008; Jeyaprakash & Hoy, 2000). Além destes, infectam também aranhas, isópodos, e uma série de nematodos do grupo das filárias (O'Neill *et al*., 1997; S. L. Dobson *et al*, 1999). O sucesso destas bactérias tem sido atribuído à sua capacidade de induzir uma série de distorções reprodutivas em seus hospedeiros, para aumentar o sucesso reprodutivo das fêmeas infectadas, aumentando assim a transmissão materna da *Wolbachia* (Werren *et al*., 2008). Elas podem manipular a reprodução de várias formas, como: feminização, morte de machos, partenogênese e incompatibilidade citoplasmática (Stouthamer *et al*., 1999).

Uma característica importante do *A. fluviatilis* é o fato de ser naturalmente infectado com a bactéria *Wolbachia pipientis*, sendo classificada como um endosimbionte facultativo (ou seja, secundário), pois foi observado que em *A. fluviatilis* selvagens, contendo a *Wolbachia* naturalmente, quando tratadas com antibióticos para a retirada da *Wolbachia*, não tiveram suas taxas de sobrevivência, fecundidade, fertilidade e tempo de embriogênese alterados (Moreira *et al*., 2009; Botan *et al*., 2013; Fernandes *et al*., 2014). Em 2013 Botan caracterizou a cepa de *Wolbachia* presente nos *A. fluviatilis*, denominando-a de *w*Flu. A *w*Flu é encontrada em baixa densidade no cérebro, tubos de malpighi e predominantemente nos ovários (ovócitos e nas células nutridoras) (Moreira *et al*., 2009).

A incompatibilidade citoplasmática (IC) é o efeito mais comum causado pela *Wolbachia* na reprodução dos artrópodes (Stouthamer *et al*., 1999). Nos *A. fluviatilis* foi observado uma incompatibilidade citoplasmática unidirecional. Este cruzamento incompatível ocorre entre machos infectados e fêmeas não-infectadas, neste caso não haverá prole. Enquanto que cruzamentos recíprocos entre machos livres da bactéria e fêmeas positivas produzem progênie normal (Botan *et al*., 2013; Oliveira &

Moreira, 2012). Botan (2013) também demostrou que com este mecanismo (IC), a cepa *w*Flu possui uma alta capacidade para invadir a população de seu hospedeiro, atingindo uma prevalência de 100% em algumas gerações.

A *Wolbachia* vem sendo utilizada como controle biológico de mosquitos vetores, e ao contrário do observado para *A. fluviatilis*, a *Wolbachia* estabelece uma relação parasitária em mosquitos *A. aegypti* transfectados, uma vez que a mesma não pertence à flora bacteriana natural desse vetor. *A Wolbachia* interfere negativamente nos *A. aegypti*, reduz o ingurgitamento de sangue, diminui o tempo de vida dos mosquitos adultos, reduz a taxa de oviposição, retarda o desenvolvimento embrionário e reduz a viabilidade dos embriões no período de quiescência (McMeniman *et al*., 2009; McMeniman& O'Neill, 2010; McMeniman *et al*., 2011; Turley *et al*., 2009; Caragata *et al*., 2013). Sendo assim, muitos autores propõem o uso da *Wolbachia* como estratégia de controle desse mosquito (Iturbe-Ormaetxe *et al*., 2011).

Apesar do grande esforço para controlar a população de mosquitos vetores de doenças, muitas delas estão aumentando em prevalência, distribuição geográfica e gravidade, e as opções para controlá-los são limitadas. A transinfecção de diferentes cepas de *Wolbachia* em populações de mosquitos vetores é uma abordagem nova de biocontrole e apresenta resultados promissores (Iturbe-Ormaetxe *et al*., 2011). Foi demonstrado que transfecção de *Wolbachia* em *A. aegypti* limita as infecções por Dengue, Chikungunya e Zika (Moreira *et al*., 2009; Aliota *et al*., 2016). Em *Anopheles stephense* reduz a infecção por *Plasmodium* (Guowu Bian *et al*., 2013).

1.4. Regulação do metabolismo de glicose na embriogênese do mosquito *A. aegypti* e *A. fluviatilis*

O nosso grupo de pesquisa é pioneiro no estudo da regulação das principais vias do metabolismo de glicose em artrópodes hematófagos vetores de doenças, principalmente na embriogênese, mas não necessariamente restrito a esta fase do ciclo de vida. O estudo dessas enzimas e a compreensão das vias às quais pertencem tem como objetivo entender as particularidades da regulação do metabolismo de glicose nesses artrópodes comparando com outros organismos classicamente descritos na literatura.

O estudo clássico em metabolismo embrionário de artrópodes nos mostra como as reservas de glicogênio são importantes para sustentar o desenvolvimento do embrião. O processo de ovogênese em artrópodes é iniciado após a alimentação e os níveis de glicogênio, lipídios e proteínas aumentam consideravelmente nos ovócitos (Fagotto, 1990; Cherry, 1973). A mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, considerada um organismo modelo no estudo da ovogênese e embriogênese de insetos, acumula glicogênio em folículos ovarianos maduros, sendo a forma predominante de estocagem de carboidratos nos ovos (Gutzeit *et al*., 1993). Nas primeiras etapas da embriogênese de *Drosophila* foi observado que o conteúdo de glicogênio e proteína apresentava uma correlação inversa, ou seja, quando os níveis de proteína totais declinavam, ocorria um acúmulo de glicogênio (Shiomi & Kitazume, 1956; Medina & Vallejo, 1989; Gutzeit *et al*., 1993).

Outros estudos revelaram ainda que o conteúdo de glicogênio oscila durante o processo embrionário de *Drosophila*, contudo sendo abundantemente estocado nos momentos tardios da embriogênese (Yamazaki & Nusse, 2002; Yamazaki & Yanagawa, 2003). O nosso grupo, ao estudar a embriogênese do carrapato *Rhipicephalus microplus*, observou um perfil similar com relação ao metabolismo de glicogênio. Na fase inicial da embriogênese do carrapato observou-se a degradação do glicogênio, e já nos momentos finais do processo embrionário essas reservas de glicogênio são ressintetizadas com concomitante queda nos níveis de proteína totais (Moraes *et al*., 2007). Em mosquitos *Aedes fluviatilis* em presença da Wolbachia pôde-se também notar um dramático aumento do coneúdo de glicogênio durante embriogênese. Na ausência da *Wolbachia* essa mudança no metabolismo foi menos acentuada (Fernandes *et al*., 2014). Destaca-se que no caso do *A. fluviatilis* não há efeitos deletérios na presença de *Wolbachia*, uma vez que a *Wolbachia* pertence à flora natural deste mosquito. Esses estudos descrevem eventos metabólicos associados ao processo embrionário do *A. aegypti* e do *A. fluviatilis* sem, contudo, investigar a etapa que precede o embrião, a ovogênese, momento em que ocorre a transferência maternal da *Wolbachia* (Werren, 1997; Stouthamer *et al*., 1999; S.L Dobson *et al*., 1999; Werren *et al*., 2008).

O estudo das vias do metabolismo de glicose durante a ovogênese e embriogênese ajuda a entender a interação hospedeiro/simbionte, podendo contribuir também no desenvolvimento de estratégias de controle para mosquitos

transmissores de doenças. Recentemente mostrou-se uma dependência do metabolismo de glicogênio na interação da *Wolbachia* com o *A. fluviatilis*, onde essa reserva estaria sendo mobilizada para produzir piruvato. O piruvato, por sua vez, seria utilizado pela bactéria para gerar energia (Fernandes *et al*., 2014). Dentro deste contexto, com este trabalho investigamos o metabolismo de glicose a fim de compreender sua regulação durante a ovogênese, complementando os estudos anteriormente realizados durante o processo embrionário. Acredita-se, que este estudo poderá ampliar o conhecimento acerca dos mecanismos de interação parasítica/simbiótica da *Wolbachia* com seus hospedeiros.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar os aspectos relacionados ao metabolismo de glicose nos ovários durante a ovogênese do *Aedes fluviatilis* sob a influência da *Wolbachia pipientis*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o fluxo de glicose através da investigação dos conteúdos de Glicose e Glicogênio nos ovários dos mosquitos com e sem *Wolbachia*.

- Avaliar o fluxo enzimático relacionado ao metabolismo de glicose através da determinação da atividade das enzimas: Hexoquinase, Piruvato Quinase, Glicose-6-fosfato desidrogenase nos ovários dos mosquitos com e sem *Wolbachia*.

- Caracterizar os eventos morfológicos durante a ovogênese nos ovários dos mosquitos com e sem *Wolbachia*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Manutenção dos mosquitos

Os mosquitos *A. fluviatilis* foram mantidos no insetário do grupo Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e interação patógeno vetor, no Centro de Pesquisa René Rachou – MG, em uma temperatura constante de 27 ºC, umidade relativa do ar de 60 a 80%, fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. Os mosquitos adultos foram mantidos em gaiolas teladas e alimentados com uma solução de sacarose 10% (p/v) *ad libitum*. As larvas foram mantidas em bandejas com água desclorada e alimentadas com ração para peixe (GoldFish Colour). Para obtenção dos ovos, fêmeas adultas foram alimentadas naturalmente com sangue de camundongo. Os camundongos foram anestesiados com Thiopentax 0,2 ml. Durante este trabalho foram utilizadas duas linhagens de *A. fluviatilis*, uma naturalmente com *Wolbachia* (*w*Flu), e outra formada por mosquitos que foram tratados com antibióticos, para retirada da *Wolbachia* (*w*Flutet). Ambas as linhagens foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Luciano Moreira (FIOCRUZ-MG).

3.2. Obtenção de ovários

Para o desenvolvimento dos ovários, fêmeas adultas (5 a 10 dias) foram submetidas a um jejum sem sacarose por 24 horas, porém com acesso a água para evitar a desidratação. Após o período de jejum foram alimentadas naturalmente com sangue de camundongo, durante uma hora. Os ovários foram dissecados 24, 48 e 72 horas após ao termino da alimentação sanguínea. Foram coletados em torno de quinze pares de ovários por replicata biológica. Os ovários foram armazenados em freezer – 80°C em microtubos de 2,0 mL, contendo 200 µL do tampão apropriado e 2 µL do coquetel de inibidores de proteases (Sigma), para algumas amostras também foram acrescentados 5 µL de inibidor de fosfatases (molibdato de amônio 0,2 mM).

3.3. Determinação do tempo da ovogênese

Foram utilizadas 108 fêmeas adultas com 10 dias de idade por grupo, com e sem *Wolbachia*. As fêmeas foram submetidas a um jejum sem sacarose por 24 horas e em seguida foram alimentadas naturalmente com sangue de camundongo,

durante uma hora. Após 48 horas do termino da alimentação sanguínea, cada fêmea foi transferida para uma minigaiola, contendo 10 ml de água desclorada no fundo e um algodão embebido em sacarose a 10% na parte superior. Foi avaliado o tempo da ovogênese a cada duas horas e considerado o termino da ovogênese quando 50% dos mosquitos oviposessem na água.

3.4. Obtenção de homogeneizados de ovários

Foram utilizados ± quinze pares de ovários por homogeneizado. Todos os homogeneizados foram obtidos por ruptura mecânica, com auxílio de um homogeneizador mecânico (Ultra Stirrer 80) sob baixa temperatura (no gelo) em microtubos de 2,0 mL, na presença de 200 µL do tampão apropriado, mais 2 µL do coquetel de inibidores de proteases (Sigma), para alguns experimentos também foram acrescentados 5 µL de inibidor de fosfatases (molibdato de amônio 0,2 mM). Após a centrifugação adequada para cada experimento, os sobrenadantes foram recolhidos e utilizados para as análises bioquímicas.

3.5. Quantificação de Glicogênio

Foram homogeneizados ± quinze ovários em 200 µL de tampão Acetato de Sódio 0,2 M, pH 4,8 e 2 µL do coquetel de inibidores de proteases (Sigma) por homogenato e centrifugados a 100 x *g* por 10 min a 4°C, os sobrenadantes foram recolhidos. Foram utilizados 20 µL do sobrenadante, 140 µL de tampão Acetato de Sódio 0,2 M, pH 4,8 e incubados com 40 µL da enzima α- Amiloglicosidase (1 mg/ mL de Tp. Acetato de Sódio 10 mM, pH 4,8) por 4 horas à 40°C. Após este período foram adicionados 800 µL do Reagente 1 (Glicose Liquiform, Labtest) e incubados por 10 minutos à 37°C. Foram transferidos 200 µL da reação para placa de 96 poços (Costar 3590) e as amostras foram lidas no leitor de placa (Multiskan GO/ Thermo Scientific) a 505 nm. Cada ponto foi realizado em triplicata e suas absorbâncias foram descontadas do controle em que a enzima α-Amiloglicosidade (SIGMA) foi omitida (glicose endógena), mas com a presença do homogenato. Foi realizada uma curva padrão de glicogênio 2 mg/ ml (SIGMA) submetida às mesmas condições das amostras. A quantidade de glicogênio foi obtida pela razão entre a quantificação total do metabolito pela quantidade de proteinas (µg) na amostra. O experimento foi

realizado em triplicata para o cálculo da média ± desvio padrão da quantificação do metabólito.

3.6. Quantificação de Glicose

Foram homogeneizados ± quinze ovários em 100 µL de tampão PBS 1X, pH 7,4, 2 µL do coquetel de inibidores de proteases (Sigma), 5 µL de inibidor de fosfatases (molibdato de amônio 0,2 mM), por homogenato e centrifugados a 13.000 x *g* por 10 min a 4°C, os sobrenadantes foram recolhidos. Foram utilizados 10 µL do sobrenadante, 200 µL do Reagente 1 (Glicose Liquiform, Labtest) e foram incubados por 10 minutos à 37°C. A leitura das amostras foram realizadas no leitor de placa (Multiskan GO/ Thermo Scientific) a 505 nm. O conteúdo de glicose foi enzimaticamente determinada pela glicose oxidase, com base em uma curva padrão de glicose (1 mg/ mL). A quantidade de glicose foi obtida pela razão entre a quantificação total do metabolito pela quantidade de proteinas (µg) na amostra. O experimento foi realizado em triplicata para o cálculo da média ± desvio padrão da quantificação do metabólito.

3.7. Atividade de Hexoquinase

Foram homogeneizados ± quinze ovários em 200 µL de tampão de ensaio (HK Assay Buffer), por homogenato e centrifugado a 13.000 x *g* por 10 minutos a 10°C, os sobrenadantes foram recolhidos. Foram utilizados 20 µL do sobrenadante e as etapas subsequente ocorrem de acordo com o protocolo do *Hexokinase Colorimetric Assay Kit* (SIGMA). A atividade total HK foi determinada indiretamente pela oxidação de NADH, acoplada ao consumo de glicose pela glicose-6-fosfato desidrogenase. As leituras das amostras foram realizadas a 450 nm em intervalos de 5 minutos, durante 35 minutos de reação. O método fundamenta-se na detecção da formação de NADH a 450 nm, que é proporcional à velocidade de formação de glicose-6-fosfato no meio. A atividade específica foi obtida pela razão entre a atividade total, proporcional à formação de NADH, pela quantidade de proteínas (µg) na amostra. O experimento foi realizado em triplicata para o cálculo da média ± desvio padrão da quantificação do metabólito.

3.8. Atividade de Piruvato quinase

Foram homogeneizados ± quinze ovários em 200 μL de tampão Imidazole (0,05 M Imidazole, 0,12 M potassion chloride e 0,062 M magnesium sulfate, pH 7.6) por homogenato, centrifugado a 13.000 x *g* por 10 minutos a 10°C e recolhido o sobrenadante. Foram utilizados 20 µL do sobrenadante e as etapas seguintes de acordo com o protocolo do Pyruvate Kinase Assay (Worthington). As leituras das amostras foram realizadas no espectrofotômetro (Multiskan GO/ Thermo Scientific) a 3400 nm em intervalos de 1 minutos, durante 10 minutos de reação. A atividade de PK foi medida indiretamente pela oxidação de β-NADH acoplada ao consumo de PEP pela lactato desidrogenase. O método fundamenta-se na detecção do consumo de β-NADH a 340 nm, que é proporcional à velocidade de formação de piruvato no meio (Worthington, 1998). A atividade específica foi obtida pela razão entre a atividade total, proporcional ao consumo de β-NADH, pela quantidade de proteínas (µg) na amostra. O experimento foi realizado em triplicata para o cálculo da média ± desvio padrão da atividade especifica.

3.9. Atividade de Glicose-6-fosfato Desidrogenase

Foram homogeneizados ± quinze ovários em 200 μL de tampão Tris-HCl (Tris 0,055 M, MgCl2 0,0033 M, pH 7,8) por homogenato, centrifugado a 100 x *g* por 10 minutos a 4°C e recolhido o sobrenadante. Foram utilizados 20 µL do sobrenadante e as etapas seguintes de acordo com o protocolo do Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase Assay (Worthington). As leituras das amostras foram realizadas no espectrofotômetro (Multiskan GO/ Thermo Scientific) a 340 nm em intervalos de 1 minutos a 30°C, durante 10 minutos de reação. A velocidade da reação foi determinada pela detecção da formação de β-NADH (Moritz *et al*., 2000). A atividade especifica foi obtida pela razão entre a atividade total, proporcional a formação de β-NADH, pela quantidade de proteínas (µg) na amostra. O experimento foi realizado em triplicata para o cálculo da média ± desvio padrão da atividade especifica. Foram realizados três experimentos independentes.

3.10. Quantificação de Proteína total

Para a quantificação de proteína as amostras foram diluídas 10X em água Milli-Q. No meio reacional foram adicionados 10 µL da diluição, 196 µL do Ácido Biscinconínico (Sigma) e 4 µL de Sulfato de Cobre (Sigma) e foram incubados por 30 minutos à 37°C. As leituras das amostras foram realizadas no leitor de placa (Multiskan GO/ Thermo Scientific) a 562 nm. A quantidade de proteína foi determinada com base em uma curva padrão de proteína (BSA 1 mg/mL, Sigma). O experimento foi realizado em triplicata para o cálculo da média ± desvio padrão da quantificação do metabólito.

3.11. Análises Estatística

Os experimentos foram realizados com 3 amostras independentes (± quinze pares de ovários por amostra) em triplicata, os valores foram expressos em média e desvio padrão. O programa estatístico utilizado foi o Prism 5 e os testes estatísticos realizados foram two-way ANOVA e pós teste Bonferroni.

3.12. Marcação de Glicogênio por PAS (Ácido Periódico de Schiff)

Em uma lâmina escavada os ovários individualmente foram fixados em paraformoldeído 4% por 30 minutos, em seguida lavados com água destilada. Depois foi adicionado ácido periódico 1% por 15 min, em seguida lavados com água destilada. Foi adicionado reagente de Schiff por 10 min, em seguida foram dados dois banhos de Solução Sulforosa por dois minutos cada. Lavar bem em água destilada por 15 min. As fotos dos ovários foram obtidas no microscópio (Axio Imager.D2 - ZEISS), utilizando uma objetiva de 5X e uma ocular de 10X e uma iluminação externa.

3.13. Microscopia dos ovários

Os ovários foram individualmente colocados em uma lâmina escavada com PBS 1X e as fotos dos ovários foram obtidas no microscópio (Axio Imager.D2 - ZEISS), utilizando uma objetiva de 5X e uma ocular de 10X, um fundo escuro e uma iluminação externa.

4. Resultados

4.1. Análise do tempo de ovogênese e do desenvolvimento ovariano dos *A. fluviatilis* na presença e ausência de *Wolbachia*.

Para determinar o tempo de ovogênese, foram utilizadas 108 fêmeas adultas para cada grupo, com e sem *Wolbachia*. Consideramos como fim deste tempo, quando 50% das fêmeas começassem a ovipor. Esta oviposição foi observada a cada duas horas a partir do tempo de 48 horas após a alimentação sanguínea destas fêmeas. Observamos que o tempo de ovogênese foi igual em ambos os grupos, não havendo diferença estatística entre eles. Desta forma determinamos que a ovogênese termina em 86 horas após a alimentação sanguínea, destacado em vermelho nos gráficos (Figura 4). Avaliando a morfologia dos ovários segundo Detinova (1962), observamos que os ovários de 24, 48 e 72 horas após a alimentação sanguínea estão nos estágios II, III e IV-V, respectivamente (os estágios foram descritos na introdução). Não observamos diferenças no desenvolvimento ovariano entre os mosquitos com e sem *Wolbachia* (Figura 5).

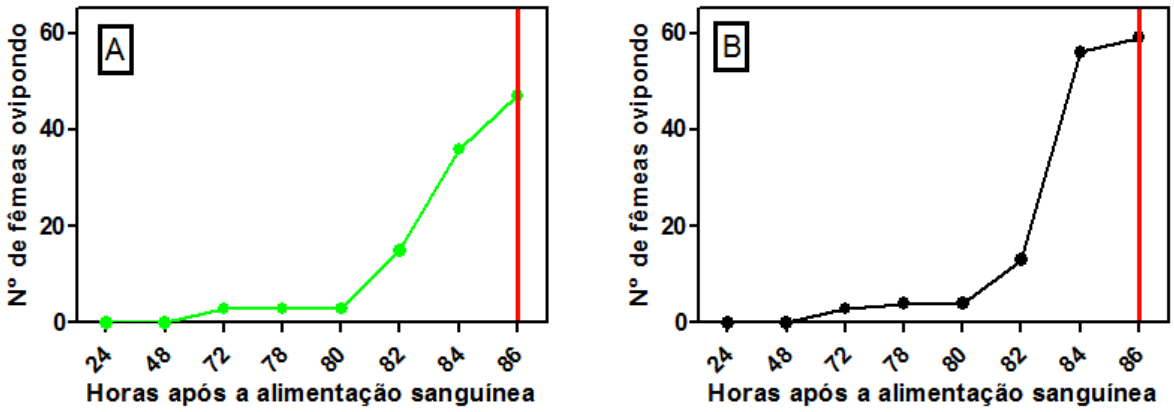

FIGURA 4. A ovogênese termina em 86 horas após a alimentação sanguínea nos *A. fluviatilis.* (A)*w*Flu (B)*w*Flutet. *Nº de fêmeas que oviposeram foram contadas a cada duas horas até que 50% das fêmeas começassem a ovipor*, consideramos assim o termino da ovogênese em 86 horas após a alimentação sanguínea. Não houve diferença estatística no número de fêmeas que oviporam. Foram realizados os testes estatísticos two-way ANOVA e pós teste Bonferroni, um valor de P<0,05.

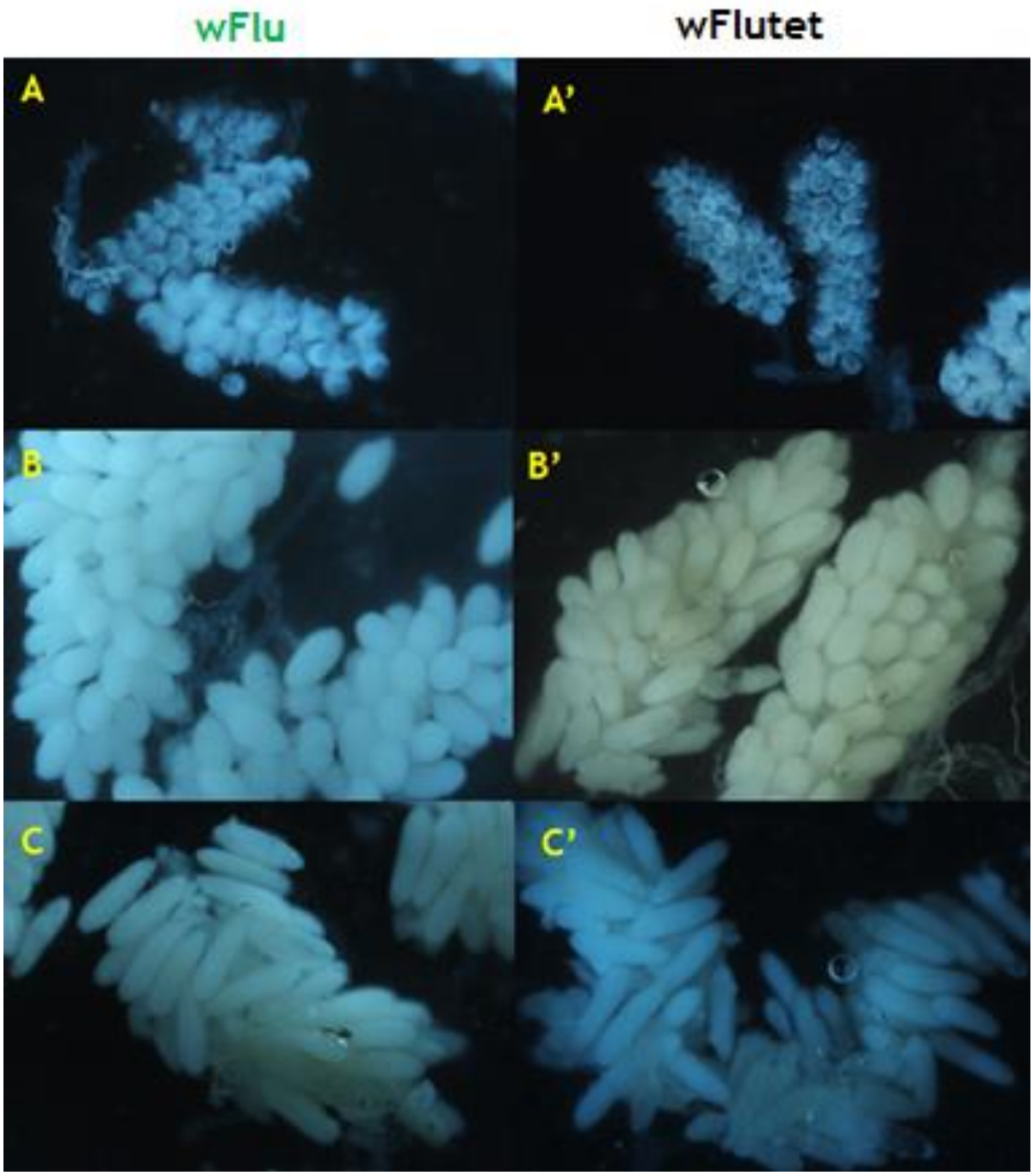

FIGURA 5. A *Wolbachia* não afeta o desenvolvimento ovariano. (A, B, C) *w*Flu: 24, 48 e 72 horas após a alimentação sanguínea. (A', B', C') *w*Flutet: *w*Flu: 24, 48 e 72 horas após a alimentação sanguínea. As fotos foram obtidas no microscópio (Axio Imager.D2 - ZEISS), utilizando uma objetiva de 5X e uma ocular de 10X, um fundo escuro e uma iluminação externa.

4.2. Glicogênio, glicose e proteína são acumulados no decorrer da ovogênese.

Os níveis de proteínas totais aumentaram estatisticamente no decorrer da ovogênese nos *A. fluviatilis*. Observamos um aumento de 79% nos mosquitos naturais e de 67% nos mosquitos sem a *Wolbachia*, em relação ao tempo inicial da ovogênese. Também constatamos que durante toda ovogênese o teor de proteína total nos mosquitos sem *Wolbachia* foi estatisticamente maior em relação aos mosquitos com a bactéria, como mostrado na figura 6.

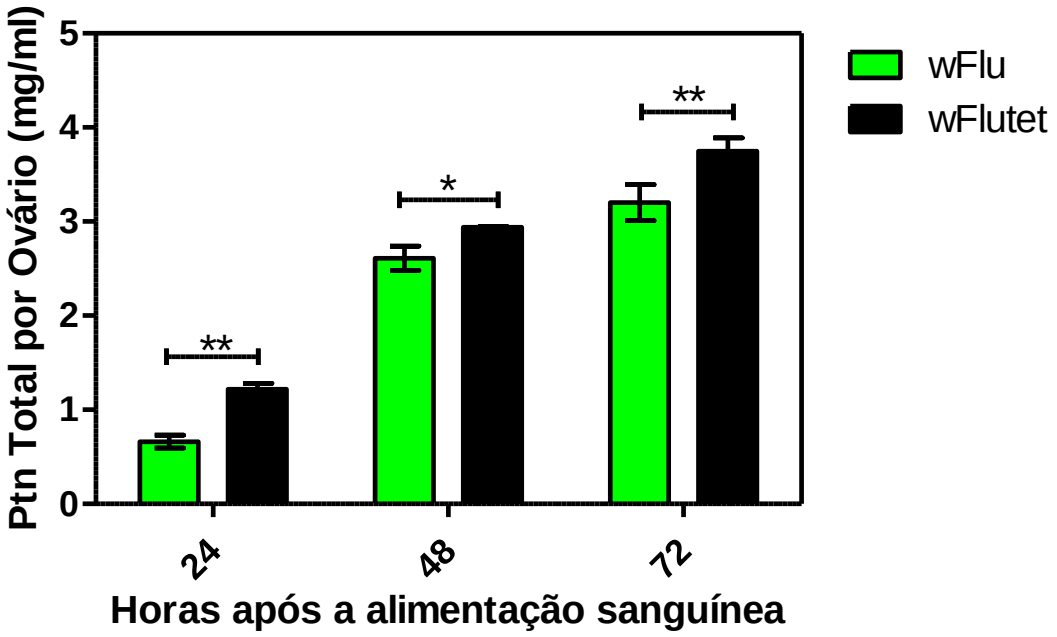

FIGURA 6. O teor de proteína total aumenta durante a ovogênese nos *A. fluviatilis*. A quantificação de proteína total foi determinado nos ovários de *A. fluviatilis*, após 24, 48 e 72 horas da alimentação sanguínea. As barras representam as médias ± desvio padrão. Foram realizados os testes estatísticos two-way ANOVA e pós teste Bonferroni, um valor de P<0,05. * Representa diferenças significativas entre as grupos.

Observamos que no final da ovogênese ocorreu um acúmulo do glicogênio em ambos os mosquitos, houve um aumento estatístico de mais de 10X em relação aos tempos de 24h e 48h de ovogênese. No entanto, no tempo de 72 horas após a alimentação sanguínea os níveis de glicogênio nos *A. fluviatilis* sem *Wolbachia* foram estatisticamente maiores em relação mosquito natural (Figura 7). Também podemos observar pela clássica marcação de glicogênio por PAS, que realmente os

ovários possuem um alto teor de glicogênio (Figura 8). Na quantificação da glicose foi visto que os níveis de glicose aumentaram estatisticamente durante a ovogênese em ambos os mosquitos, todavia não houve diferença estatística entre eles (Figura 9).

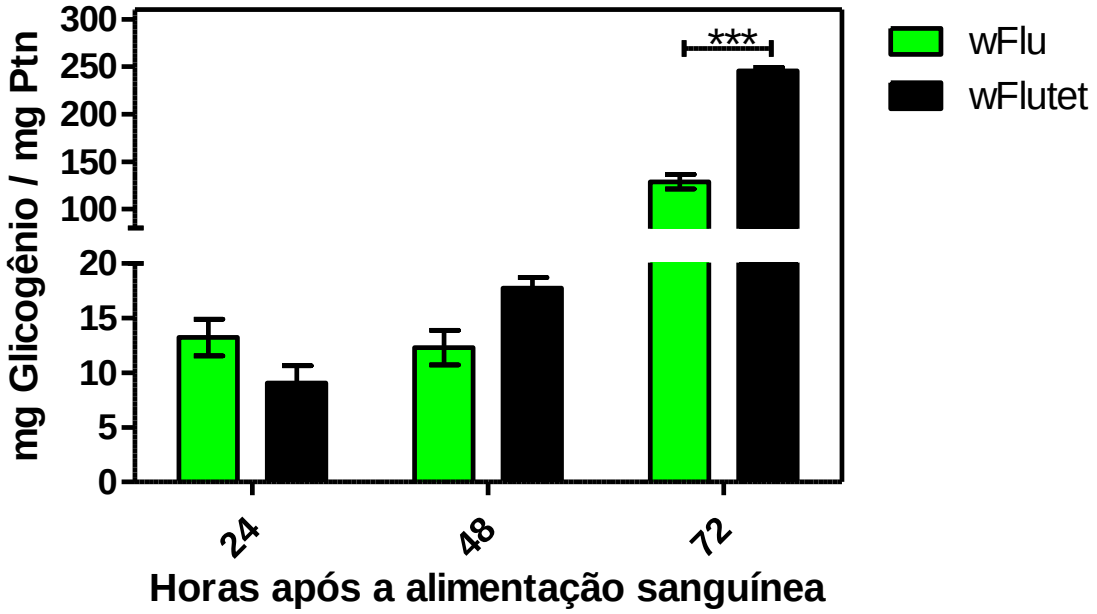

FIGURA 7. O glicogênio é acumulado no final da ovogênese nos *A. fluviatilis*. O conteúdo da glicogênio foi determinado nos ovários de *A. fluviatilis*, após 24, 48 e 72 horas da alimentação sanguínea. As barras representam as médias ± desvio padrão. Foram realizados os testes estatísticos two-way ANOVA e pós teste Bonferroni, um valor de p <0,05. * Representa diferenças significativas entre as amostras.

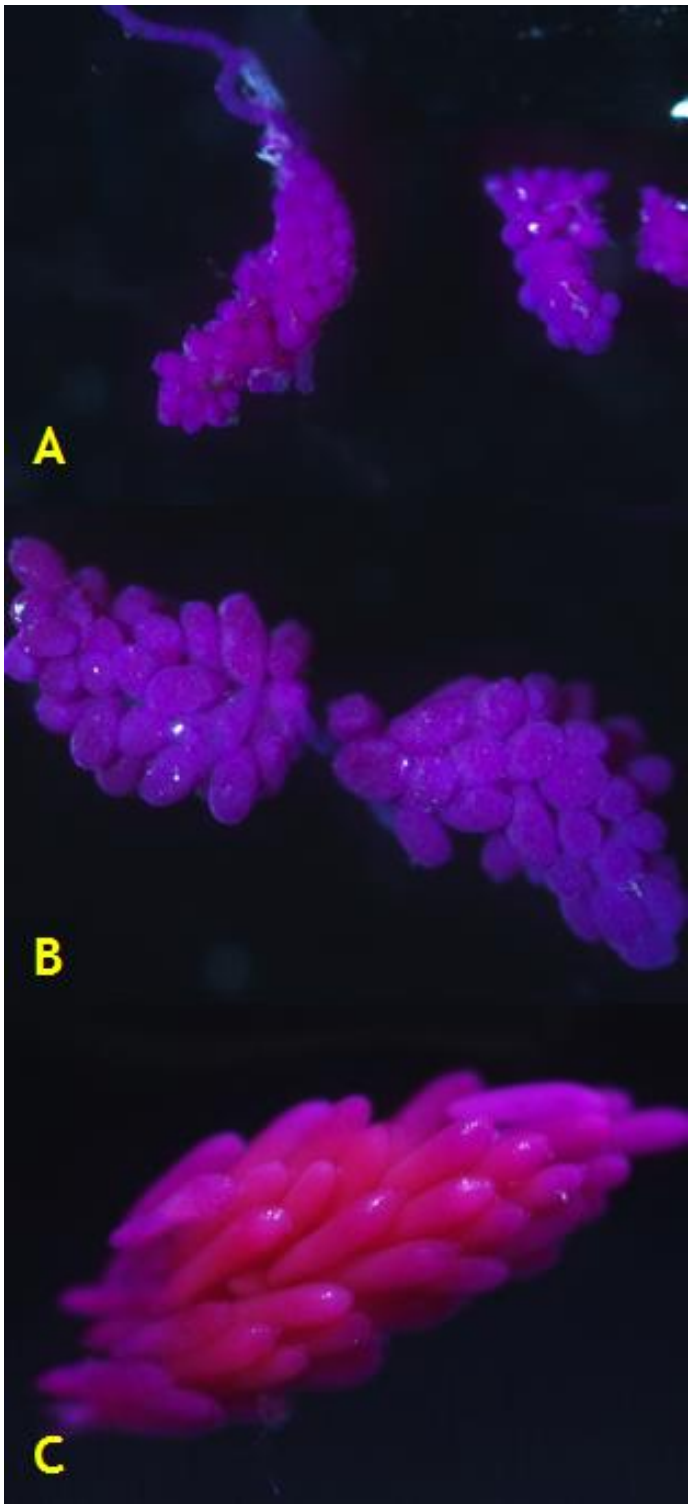

FIGURA 8. Marcação de Glicogênio por PAS (Ácido Periódico de Schiff) durante o desenvolvimento ovariano dos *A. fluviatilis.* (A, B, C) *w*Flu: 24, 48 e 72 horas após a alimentação sanguínea. As fotos foram obtidas no microscópio (Axio Imager.D2 - ZEISS), utilizando uma objetiva de 5X e uma ocular de 10X, um fundo escuro e uma iluminação externa.

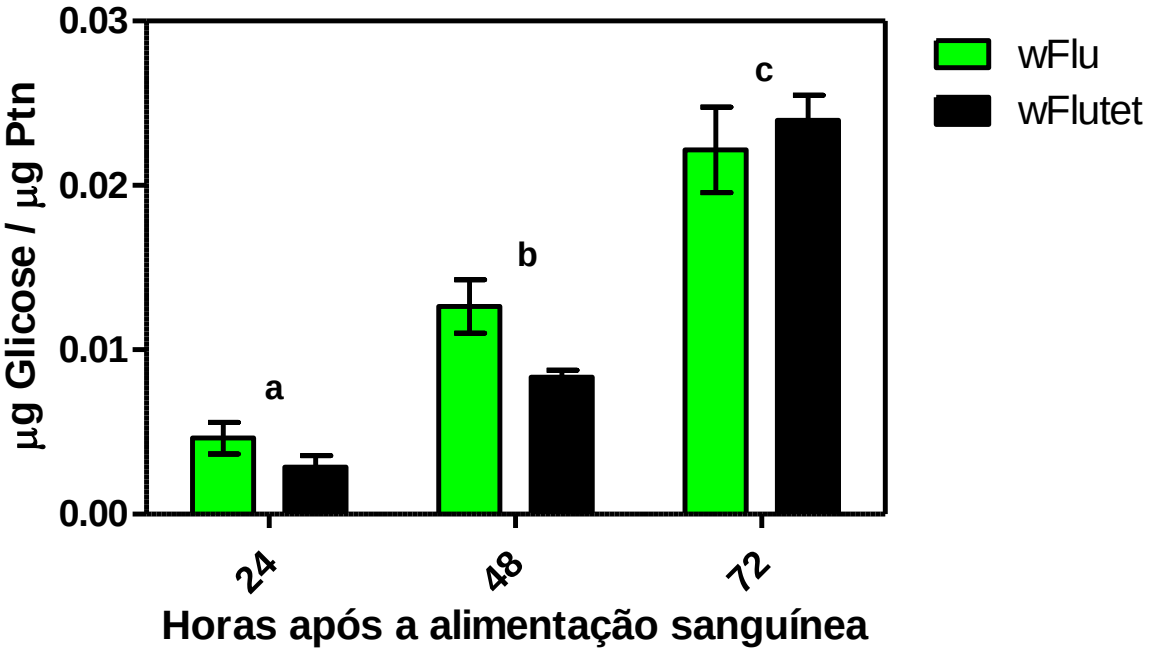

FIGURA 9. Os níveis de glicose livre aumentam durante a ovogênese nos *A. fluviatilis*. O conteúdo de glicose foi determinado nos ovários de *A. fluviatilis*, após 24, 48 e 72 horas da alimentação sanguínea. As barras representam as médias ± desvio padrão. Foram realizados os testes estatísticos two-way ANOVA e pós teste Bonferroni, um valor de p <0,05. ª Representa diferenças significativas entre as grupos.

4.3. A atividade da Hexoquinase é afetada na presença da *Wolbachia*

Durante a ovogênese observamos que a atividade da Hexoquinase (HK) é afetada na presença da *Wolbachia*. Vimos que em ambos os mosquitos sua atividade está significativamente maior no início, porém a atividade da HK no mosquito sem a *Wolbachia* é significantemente maior em ralação ao mosquito controle. Nos mosquitos sem a *Wolbachia* vimos que há uma diminuição significativa da atividade da HK em decorrer da ovogênese, observamos uma diminuição final de 40% em relação ao início. Nós mosquitos naturais, com *Wolbachia*, observamos que há uma queda significativa da atividade no tempo de 48 horas após a alimentação sanguínea, mas sua atividade se restabelece no tempo de 72 horas (Figura 10).

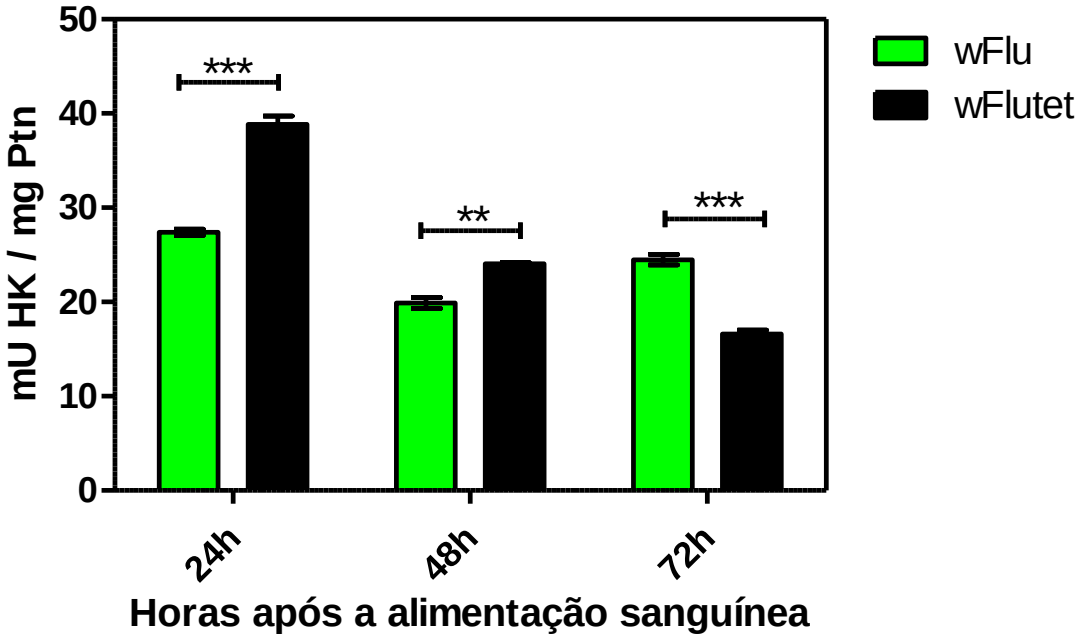

FIGURA 10. A atividade da Hexoquinase é afetada pela *Wolbachia* nos *A. fluviatilis*. A atividade específica da enzima HK foi determinada nos ovários de *A. fluviatilis*, após 24, 48 e 72 horas da alimentação sanguínea. As barras representam as médias ± desvio padrão. Foram realizados os testes estatísticos two-way ANOVA e pós teste Bonferroni, um valor de P<0,05. * Representa diferenças significativas entre as amostra.

4.4. A atividade glicolítica aumenta no decorrer do desenvolvimento ovariano.

A atividade da Piruvato quinase (PK) aumenta significativamente no decorrer da ovogênese. Em ambos os mosquitos houve um aumente da atividade de mais de 700%, em relação ao início da ovogênese. No tempo de 48 horas a atividade da PK estava maior nos ovários com *Wolbachia*, porém em 72 horas a atividade foi inversa, sendo maior nos ovários sem a *Wolbachia* (Figura 11).

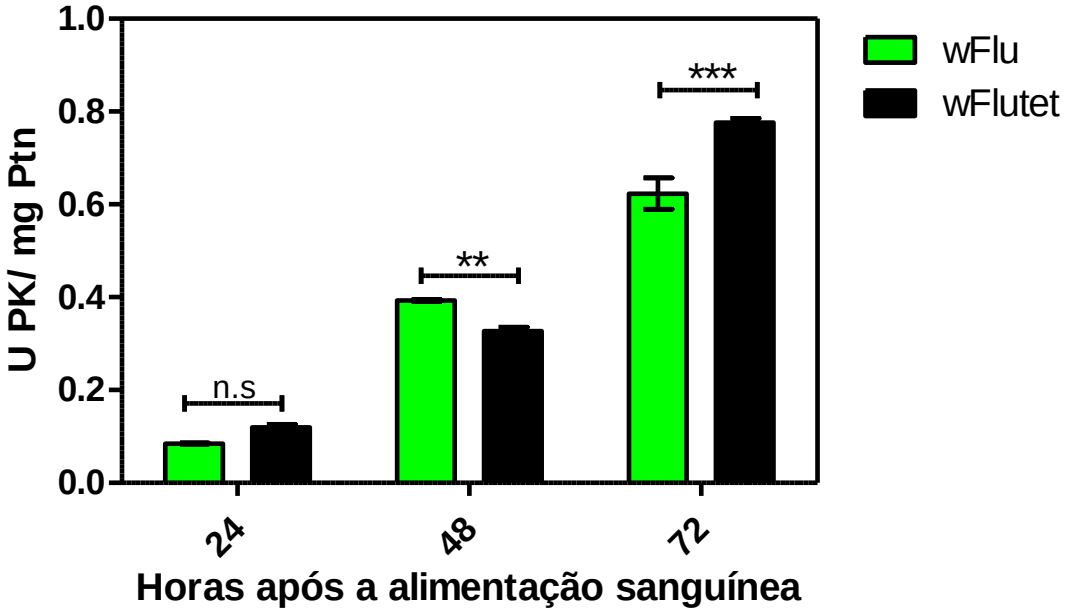

FIGURA 11. A atividade glicolítica aumenta durante a ovogênese nos *A. fluviatilis*. A atividade específica da enzima PK foi determinada nos ovários de *A. fluviatilis*, após 24, 48 e 72 horas da alimentação sanguínea. As barras representam as médias ± desvio padrão. Foram realizados os testes estatísticos two-way ANOVA e pós teste Bonferroni, um valor de p <0,05. * Representa diferenças significativas entre as amostras.

4.5. A *Wolbachia* aumenta a atividade da G6PDH no final da ovogênese.

Supreendentemente o perfil da atividade da G6PDH (Glicose 6 fosfato desidrogenase) foi inversa nos mosquitos. Na ausência de *Wolbachia*, observamos que a atividade da G6PDH decaí 28%. Todavia no mosquito natural (*w*Flu), observamos que a atividade da G6PDH aumentou 28%, em relação ao início (Figura 12).

.

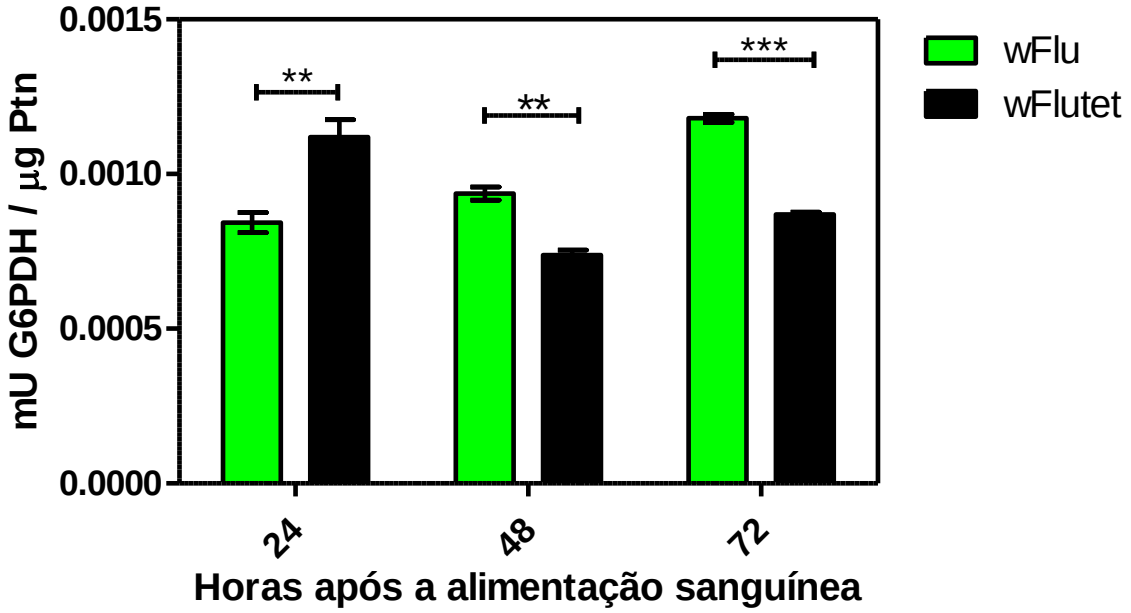

FIGURA 12. A via das pentoses fosfato é aumentada pela *Wolbachia* durante a ovogênese nos *A. fluviatilis*. A atividade específica da enzima G6PDH foi determinada nos ovários de *A. fluviatilis*, após 24, 48 e 72 horas da alimentação sanguínea. As barras representam as médias ± desvio padrão. Foram realizados os testes estatísticos two-way ANOVA e pós teste Bonferroni, um valor de p <0,05. * Representa diferenças significativas entre as amostras.

5. Discussão

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes do planeta e possuem grande importância nos processos biológicos. Polímeros insolúveis de carboidratos funcionam tanto como elementos estruturais quanto de proteção nas paredes celulares bacterianas e de vegetais. Carboidratos também se ligam covalentemente a proteínas e lipídios, agindo como sinais que determinam a localização intracelular ou o destino metabólico dessas moléculas. Mas, sobretudo os carboidratos possuem grande importância como reserva energética e ocupam posição central no metabolismo na maioria dos organismos. Neste trabalho investigamos algumas das principais rotas do metabolismo de glicose a fim de descrever a mobilização de nutrientes durante a ovogênese na presença e na ausência de *Wolbachia*, complementando os estudos anteriores descritos na embriogênese desses mosquitos (Fernandes *et al*., 2014).

Um dos primeiros parâmetros avaliados nesse trabalho foi o conteúdo de glicogênio na ovogênese do *A. fluviatilis*. No entanto, para a avaliação de qualquer atividade enzimática ou metabólica é necessário conhecer o tempo de ovogênese desse mosquito, pois a literatura carece dessa informação. Portanto, constatamos que após a alimentação sanguíneas, os mosquitos começaram a ovipor a partir de 72h, sendo o ápice em 86h para ambos os mosquitos, na presença ou ausência de *Wolbachia* (Figura 4). Sendo assim, foram escolhidos três momentos distintos após a alimentação sanguínea (24h, 48h e 72h), que corresponderiam a um momento inicial, um intermediário e um final (pré-oviposição), para descrever os eventos metabólicos ocorridos durante a ovogênese do mosquito *A. fluviatilis* (Figura 5). Em *Aedes aegypti*, também são utilizaram esses mesmos tempos para análises metabólicas, no estuda da ovogênese (Briegel *et al*., 2003). Também constatamos que não houve diferença no tempo de ovogênese e na morfologia dos ovários em ambas linhagens com e sem *Wolbachia* (Figura 4 e 5). Outros trabalhos com *A. fluviatilis* também demostraram que a *Wolbachia* não interfere no tempo de embriogênese e na morfologia destes embriões, nem no tempo de vida dos mosquitos adultos, tampouco nas taxas de fecundidade, fertilidade (Botan *et al*., 2013; Fernandes *et al*., 2014).

O glicogênio tem sido descrito como a forma predominante de estocagem de carboidratos em ovos de insetos, podendo ser acumulado nos momentos finais da

ovogênese (Gutzeit *et al*., 1993; Sieber *et al*., 2016; Santos *et al*., 2008). Quando o conteúdo de glicogênio foi avaliado em ovários do *A. fluviatilis,* também observamos um acúmulo de glicogênio no final da ovogênese dos mosquitos, seja na presença ou ausência da bactéria (Figura 7). Briegel (2003) demonstrou que em *A. aegypti* também ocorre um aumento acentuado do conteúdo de glicogênio da metade para o final da ovogênese nos ovários do mosquito. Em *Drosofila* e em *Rhodnius prolixus* também foi visto o mesmo processo, sendo esse fenômeno comum em insetos (Gutzeit *et al*., 1993; Sieber *et al*., 2016; Santos *et al*., 2008). Entretanto, na marcação do glicogênio por PAS, foi observado que a coloração do ovário no tempo de 72h estava menos intensa (Figura 8). Consideramos que isto tenha sucedido uma vez que neste momento já ocorreu a formação de duas das três camadas que revestem o ovo, o exocórion e do endocórion, dificultando assim a entrada do PAS (Detinova, 1962; Valle *et al*.,1999).

Também notamos que nos ovários de 72h dos mosquitos *w*Flutet, os níveis de glicogênio foram 40% maiores em relação aos mosquitos com *Wolbachia* (Figura 7), ou seja, a presença da *Wolbachia* faz com que as reservas de glicogênio sejam menores, sugerindo que a bactéria esteja modulando o metabolismo de glicogênio do hospedeiro. Anteriormente foi descrito que durante a embriogênese do *A. fluviatilis* a *Wolbachia* estaria mobilizando as reservas de glicogênio do mosquito para a produção de piruvato via glicólise, dessa forma competindo com o hospedeiro no uso deste substrato (Fernandes *et al*., 2014). Em outro estudo, Foster (2005) sequenciou o genoma da *Wolbachia* endossimbionte de *Brugia malayi* e identificou uma enzima chamada piruvato fosfato diquinase que utiliza o piruvato como substrato, principalmente para a geração de frutose-6-fosfato por uma via que foi recentemente descrita pelo nosso grupo de pesquisa (Fernandes *et al*., 2014). Também em *Brugia malayi* foi visto em fêmeas adultos naturalmente com *Wolbachia* que os níveis de glicogênio eram cerca de 45% menores, comparados as fêmeas que passaram por um tratamento para retirada da *Wolbachia*, neste mesmo trabalho foi demostrado que a *Wolbachia* estaria localizada próximo aos grânulos de glicogênio dentro da célula, sugerindo uma associação entre o metabolismo de glicogênio e a bactéria (Voronin *et al*., 2016).

Quando observamos os níveis de glicose, notamos que ocorreu um aumento significativo de seu conteúdo durante a ovogênese (Figura 9). Este fenômeno também foi observado na ovogênese da *Drosofila* e do *Rhodnius prolixus* (Sieber *et al*., 2016; Santos *et al*., 2008). A glicose, ao ser fosforilada no carbono seis, pode ser utilizada para a síntese de glicogênio. O aumento observado anteriormente dos níveis de glicogênio ao decorrer da ovogênese de ambos os mosquitos pode ser em consequência do concomitante aumento de glicose que é disponibilizada aos ovários através da quebra da trealose provida pelo corpo gorduroso. Após a alimentação sanguínea os nutrientes provindos do sangue são utilizados pelo corpo gorduroso e redistribuídos para os tecidos e órgãos do mosquito, incluindo os ovários (Hou *et al*., 2015; Santos *et al*., 2008). No entanto, no tempo de 72h da ovogênese do *A. fluviatilis*, onde foi observado a maior diferença no conteúdo de glicogênio entre os mosquitos *w*Flu e *w*Flutet, não houve diferença na quantidade de glicose entre as linhagens (Figura 9). Esses resultados sugerem que no fim da ovogênese mesmo quando disponibilizado de glicose é a mesma, os 40% a menos de glicogênio observado nos mosquitos com *Wolbachia* é em decorrência da mobilização dessas reservas e não de um aporte diferenciado de glicose. Durante a embriogênese do *A. fluviatilis,* Fernandes (2014) também relatou não haver diferença no conteúdo de glicose em relação aos embriões com e sem a *Wolbachia*, apesar das taxas de glicogênio serem diferentes.

Contudo, não só a glicose é depositada nos ovócitos, mas também lipídios e proteínas. Em *Rhodnius prolixus* foi demostrado que os níveis de glicose e proteína aumentam concomitantemente com o glicogênio durante a ovogênese desse artrópoda, e em *A. aegypti* também demostraram que os níveis de proteína e glicogênio aumentam simultaneamente (Briegel *et al*., 2002; Santos *et al*., 2008). A GSK3, enzima classicamente descrita como reguladora do metabolismo de glicogênio, também participa de inúmeros eventos celulares como diferenciação e adesão celular, controle transcricional, apoptose, a síntese de proteínas, entre outros (Beurel & Jope, 2006; Miura *et al*., 2010; Jope *et al*, 2007; Muyllaert *et al*., 2008; Ali *et al*., 2001). Neste último caso, quando a GSK3 está inibida, o fator de alongamento ELF2 permanece ativo, promovendo a síntese de proteínas (Cohen & Frame, 2001; Ali *et al*., 2001; Zhang *et al*., 2014). No caso do *A. fluviatilis* as taxas de proteína aumentam ao longo da ovogênese juntamente com o conteúdo de

glicogênio (Figura 6), sugerindo uma regulação via GSK3 nos momentos finais da ovogênese do mosquitos.

Notamos também que essas taxas de proteína no decorrer do desenvolvimento ovariano nos mosquitos com *Wolbachia*, foram em todos os tempos estatisticamente menores em comparação aos ovários sem a bactéria (Figura 6), sugerindo uma competição pelos aminoácidos. A *Wolbachia* tem um genoma reduzido e é claramente dependente de seu hospedeiro para uma ampla gama de necessidades nutricionais (Fernandes *et al*., 2014). Caragata (2013) descreve uma competição por aminoácidos entre a *Wolbachia* e o mosquito *A. aegypti*. No trabalho eles demostraram que as fêmeas adultas suplementadas com diferentes aminoácidos durante a alimentação, conseguiam recuperar 15-20% da taxa fecundidade e 30-40% da taxa de viabilidade dos embriões, visto que a *Wolbachia* reduz estas taxas nos *A. aegypti.*

Já a atividade de hexoquinase (HK), enzima inicial da via glicolítica, responsável por formar glicose 6 fosfato (G6P) a partir de glicose, corrobora com o perfil de glicose observado ao longo da ovogênese do *A. fluviatilis*. A atividade da HK é reduzida durante a ovogênese, apresentando o maior pico em 24h e o menor valor em 72h (Figura 10). A internalização de glicose nos tecidos e órgãos de mosquito é mais intensa nas primeiras horas após a alimentação sanguínea, em decorrência do grande aporte de nutrientes presentes no sangue ingerido (Briegel, 2003; Hou *et al*., 2015). Além disso, a dosagem de glicose apresentou os menores valores em 24h da ovogênese provavelmente em consequência da elevada atividade de HK observada no mesmo período, fosforilando a glicose vinda do meio extracelular, formando G6P. Já para os mosquitos *w*Flu, a atividade da HK nos ovários permaneceu estável em todos os tempos investigados (Figura 10).

Se observarmos o curso metabólico do glicogênio ao piruvato na ovogênese do mosquito *A. fluviatilis*, notamos que a piruvato quinase (PK), enzima final da glicólise, apresenta um perfil similar ao descrito para o conteúdo de glicogênio, com aumento de atividade ao longo da ovogênese (Figura 11). Em *Drosófila* foi demostrado que o teor de piruvato aumenta estatisticamente no decorrer da ovogênese, sugerindo um aumento da atividade de PK. No entanto, esperávamos uma maior atividade de PK nos mosquitos *w*Flu em relação ao *w*Flutet em 72h do

desenvolvimento ovariano, onde os níveis de glicogênio são menores em relação aos mosquitos sem *Wolbachia*, o que denotaria um maior consumo do glicogênio à piruvato na presença da *Wolbachia*. Este não foi o caso, pois a atividade de PK também está mais baixa nos mosquitos com *Wolbachia* quando comparado aos sem a bactéria, sugerindo que o produto da degradação do glicogênio, a glicose 6 fosfato, nos mosquitos *w*Flu poderia estar seguindo uma outra rota além da via glicolítica.

Classicamente, o glicogênio pode ser degradado em G6P na célula, e esta poderá ser utilizada pela via glicolítica para produção de piruvato ou ser direcionada para a via das pentoses, responsável pela síntese de ribose e poder redutor na forma de NADPH. A ribose é um açúcar muito importante para a síntese de ácidos nucléicos, que normalmente ocorre durante a proliferação celular. Surpreendentemente a atividade de G6PDH mostrou-se inversa nos ovários dos *A. fluviatilis* com *Wolbachia*, tendo sua atividade elevada no final da ovogênese, quando comparados aos mosquitos sem a bactéria (Figura 12). Na embriogênese do *A. aegypti* foi visto que a G6PDH possui elevada atividade nas primeiras horas desenvolvimento devido à intensa proliferação celular nesse estágio (Vital *et al*., 2010). Outro ponto importante é que a *Wolbachia* não possui em seu genoma as enzimas responsáveis pela síntese de ribose (Fernandes *et al*., 2014), necessitando assim de ribose do hospedeiro para a síntese de ácidos nucleicos e sua consequente divisão e proliferação. Em outros artrópodes onde a *Wolbachia* é um endosimbionte natural, é comum observar um aumento das populações da bactéria ao final da ovogênese (Genty *et al*., 2014). Outros autores postulam a G6PDH como um marcador para determinar a competência de ovócitos, sendo a atividade dessa enzima de crucial importância nesse processo (Torner *et al*., 2008). Em *Drosófila* também foi observado aumento de ribose, G6P e piruvato nos momentos finais da ovogênese (Sieber *et al*., 2016), uma possível consequência do aumento da população de *Wolbachia*, natural da *Drosófila*, no final da ovogênese e também uma preparação para a posterior embriogênese. A atividade aumentada de G6PDH no *A. fluviatilis* com *Wolbachia* pode ser devido à intensa proliferação celular que ocorrerá no processo embrionário do mosquito, constituindo assim uma preparação para a elevada demanda de ribose do vindouro embrião e também em razão do possível aumento do número de bactérias nos ovários, visto que a *Wolbachia* é transmitida

maternalmente e sua taxa na população do *A. fluviatilis* é de 100%, para manter esta taxa a bactéria precisaria infectar todos os ovócitos viáveis e desta forma seria transmitida para toda a prole (Botan *et al*., 2013). Essa foi a única enzima estudada neste trabalho que apresentou um perfil completamente oposto para os dois mosquitos ao longo de toda ovogênese, sugerindo que a presença da *Wolbachia* estaria afetando significativamente a via das pentoses, aumentando seu fluxo no decorrer da ovogênese.

Vale ressaltar que a *Wolbachia* é um simbionte natural do mosquito *A. fluviatilis*, não havendo efeitos deletérios pela bactéria, seja nas taxas de sobrevivência, fecundidade ou fertilidade (Moreira *et al*., 2009; Botan *et al*., 2013; Fernandes *et al*., 2014). Mesmo que o glicogênio seja utilizado para a produção de piruvato, mantendo a população de bactérias (Fernandes *et al*., 2014), isto não causa danos ao metabolismo do mosquito. É possível que exista um sistema de retroalimentação entre a própria bactéria e o hospedeiro, que por ser um simbionte, retornaria metabólitos ou mesmo ATP para o hospedeiro, evitando assim um efeito prejudicial ao mosquito. Tem sido demonstrado que a *Wolbachia* pode obter um rendimento energético (em ATP) maior através da degradação do piruvato em relação ao seu hospedeiro (Raverdy *et al*., 2008; Mertens, 1993). Entende-se que este trabalho associado a outros estudos da ovogênese e embriogênese dos mosquitos, ajude a compreender a regulação metabólica resultante da interação parasita-hospedeiro, assim como a fisiologia desses artrópodes, ampliando também nossos conhecimentos acerca de outros organismos e suas adaptações metabólicas.

Esses resultados em conjunto descrevem um panorama metabólico que conduz a um melhor entendimento da modulação do metabolismo de glicose na ovogênese e na embriogênese deste mosquito, além de esclarecer a interação simbiótica sob o contexto metabólico. O estudo poderá também contribuir no desenvolvimento de estratégias para o controle do mosquito *A. aegypti*. Atualmente métodos de controle alternativo interferem em fases preferenciais do ciclo de vida do mosquito, como as larvas, adultos e o embrião (Thompson e Stewart, 1997). Embora esse último estádio seja negligenciado, novos estudos na embriogênese e ovogênese de artrópodes, em particular focados no metabolismo de carboidratos, têm conduzido a um melhor entendimento da dinâmica de utilização de nutrientes

desde a formação do ovócito até a mobilização de reservas durante a formação do embrião (Campos *et al*., 2006; Vital *et al*., 2010; Moraes *et al*., 2007). Esse estudo também contribui para preencher essa lacuna na literatura e mostrar sobre um contexto de regulação do metabolismo de glicose que a ovogênese e embriogênese são um processo mais dinâmico do que atualmente considerado.

6. Conclusão

A *Wolbachia* estaria modulando o metabolismo de glicose e glicogênio do hospedeiro a fim de obter intermediários glicídicos para produção de energia, divisão e proliferação durante ovogênese e posterior embriogênese. E esta modulação poderia está sendo realizada via GSK3, que além de controlar o metabolismo de glicogênio, afetaria a dinâmica degradação e síntese de proteínas, esclarecendo assim importantes mecanismos da interação simbiótica e parasítica sob o contexto metabólico, entre *Wolbachia* e mosquito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali A, Hoeflich P, Woodgett JR (2001) Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. Chem Rev 101: 252722540. .

Aliota MT, Peinado SA, Velez ID, Osorio JE (2016). The wMel strain of Wolbachia Reduces Transmission of Zika virus by Aedes aegypti. Sci Rep. 2016 Jul 1;6:28792. doi: 10.1038/srep28792

Andreadis, T.C. & Hall, D.W. (1980). Relationship between physiological age and fecundity in *Culex salinarius* (Diptera: Culicidae). /. *Med. Entomol., 17:*485 486.

Baton LA, Pacidônio EC, Gonçalves DS, Moreira LA (2013) *w*Flu: characterization and evaluation of a native *Wolbachia* from the mosquito *Aedes fluviatilis* as a potential vector control agent. PLoS One 8(9): e3115.

Bates, M. (1949). The natural history of mosquitoes. The Macmillan Company, NY, 379 pp.

Beurel, E.; Jope, R. S. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. Progress in Neurobiology, v. 79, p. 173-189, 2006.

Briegel H, Gut, Leo AO. Sequential deposition of yolk components during oogenesis in na insect, Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). J Insect Physiol. 2003 Mar;49(3):249-60.

Camargo M.V.T., Consoli R.A.G.B., Williams P., Krettli A.U. (1983). Factors influencing the development of *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes fluviatilis*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 78 (1): 83-94.

Campos E., Moraes J., Facanha A. R., Moreira E., Valle D., Abreu L., Manso P. P. A., Nascimento A., Machado M. P., Lenzi H., Masuda A., Vaz Jr I. E. S., Logullo C., (2006) Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. Veterinary Parasitology, 138, 349–357.

Caragata EP, Rances E, O'Neill SL, McGraw EA (2013). Competition for Amino Acids Between *Wolbachia* and the mosquitos, *Aedes aegypti*. Invertebrate Microbiology 67:205-218.

Cohen & Frame (2001). The renaissance of GSK3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 769-776 | doi:10.1038/35096075

Cherry, L.M., 1973. The accumulation and utilization of food reserves by adult female cattle tick, *Boophilus microplus* (canestrine). Aust. J. Zool. 21, 403–412.

Chapman, R. F., (1998). The Insects Structure and Function. Fourth Edition. Cambridge University Press. 770p.

Cohen, Philip & Frame, Sheelagh (2001). The renaissance of GSK3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 769-776 | doi:10.1038/35096075

Colless, D.H. & Chellapah, W.T. (1960). Effects of body weight and size of bloodmeal upon egg production in *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae). *Am. Trop. Med. Parasit., 54:*475-482.

Clements, A.N. (1963). *The physiology of mosquitoes.* International Series of Monographs on pure and applied biology. The Macmillan Company - NY, pp 393.

Consoli, R.A.G.B. & Williams, P. (1978). Laboratory observations on the bionomics of *Aedes fluviatilis* (Lutz) piptera: Culicidae). Bull. ent. Res., 68:123-136.

Consoli, R.A.G.B. & Williams, P. (1981). Aspects of the biology of laboratory - reared female *Aedes fluviatilis*. Mosquito News, 41:30-36.

Consoli, R.A.G.B.; Mendes, N.M.; Pereira, J.P.; Santos, B.S. & Lamounier, M.A. (1988). Influência de diversos derivados de vegetais na sobrevida das larvas de *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) em laboratório. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 83(1):* 87-93.

Consoli R.A.G.B. & Oliveira R. L. (1994). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeito: FIOCRUZ.

Consoli, R.A..B.; Williams, P.; Moreno, E.C.; Santos, B.S. (1983). Features of reproduetion in laboratory reared *Aedes fluviatilis* (Lutz, 1904) (Diptera: Culicidade). *Mem. Inst.Oswaldo Cruz, 78:*37-47.

Detinova, T.S. (1962). *Age-Grouping methods in Diptera of madical importance.* WHO, Monograph series nr. 47, pp 215.

Dimond, J.B.; Lea, A.O. & Delong, D.M. (1958). Nutritional requirements for reproduction in insects. *Proc. Tenth. Int. Congr. Ent. 1956:*135-137.

Dobson, S.L, K Bourtzis, H.R Braig, B.F Jones, W Zhou, F Rousset, S.L O'Neill (1999). *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. Insect Biochem Mol Biol, 29: 153–160.

Fagotto, F., 1990. Yolk degradation in tick eggs: In Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. Arch. Insect. Biochem. Phisiol., 14, 217-235.

Fernandes MR, Martins R, Costa EP, Pacidônio EC, Abreu LA, Vaz Jr IS, Moreira LA, Fonseca RN, Logullo C, (2014). The modulation of the symbiont/host interaction betwenn wolbachia pipientis and *Aedes fluviatilis* embryos by glycogen metabolism. Plos One 9(6): e98966.

Fonseca R.N., Gomes H., Araújo H. (2012). Cap. 2. Aspectos Morfofuncionais da Embriologia dos Artrópodes. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular.

Foster J, Ganatra M, Kamal I, Ware J, Makarova K, et al. (2005) The Wolbachia genome of Brugia malayi: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. PLoS Biol 3: e121. doi:10.1371/journal.pbio.0030121.

Forattini O. P. (2002). Culicidologia Medica. São Paulo: Edusp, cap.14, p. 453-492.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde (2001). Dengue Instruções de Combate ao Vetor-Manual de Normas Técnicas. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil.

Garnham, P. (1966) Malaria Parasites and other haemosporidia. Blackwell Scientific publications, Oxford, 1114.

Genty Lise-Marie, Didier Bouchon, Maryline Raimond, Joanne Bertaux. Wolbachia Infect Ovaries in the Course of Their Maturation: Last Minute Passengers and Priority Travellers?

Guowu Bian, Deepak Joshi, Yuemei Dong, Peng Lu, Guoli Zhou, Xiaoling Pan, Yao Xu, George Dimopoulos, Zhiyong Xi, (2013). *Wolbachia* Invades Anopheles stephensi Populations and Induces Refractoriness to *Plasmodium* Infection. *Science* 340, 748; DOI: 10.1126/science.1236192

Gutzeit, H. O., Zissler, D., Grau, V., Liphardt, M., Heinrich, U., (1993). Glycogen stores in mature ovarian follicles and young embryos of *Drosophila*: ultraestrutural changes and some biochemical correlates. Eur. J. Cell Biol. 63, 52-60.

Hertig M, Wolbach SB (1924) Studies on rickettsia-like micro-organisms in insects. J Med Res 44: 329–374.

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH, (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? - A statistical analysis of current data. FEMS Microbiol Lett 281: 215–220.

Hou Yuan, Xue-Li Wang, Tusar T. Saha3☯, Sourav Roy3, Bo Zhao, Alexander S. Raikhel, Zhen Zou. Temporal Coordination of Carbohydrate Metabolism during Mosquito Reproduction. PLoS Genet 11(7): e1005309

Jeyaprakash A, Hoy MA, (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. Insect Mol Biol 9: 393–405.

JOPE, R. S.; YUSKAITIS, C. J.; BEUREL, E. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. Neurochemical Research, v. 32, p. 577 -595, 2007.

Iturbe-Ormaetxe I, Walker T , O'Nell SL (2011). Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. EMBO Rep.12(6):508-18. doi: 10.1038/embor.2011.84.

McMeniman CJ e O'Neill SL, (2010). A virulent *Wolbachia* infection decreases the viability of the dengue vector *Aedes aegypti* during periods of embryonic quiescence. Plos neglected tropical dissuades 4(7): e748.

McMeniman CJ, Hughes GL, O'Neill SL (2011). A *Wolbachia* symbionte in *Aedes aegypti* disrupts mosquito egg development to a greater extent when mosquitoes feed on nonhumam versus human blood. BioOne 48 (1):76-84.

McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AW, Sidhu M, *et al*. (2009). Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. Science 323: 141–144.

Medina M., Vallejo C. G., (1989). The contents of proteins, carbohydrates, lipids and DNA during the embryogenesis of Drosophila. Int. J. Develop. Biol. 1989, 33, 403-405.

Mertens E (1993). ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists. Parasitol Today 9:122–6.

Ministério da Saúde, dados divulgados para 2015. (http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue).

MIURA, T.; TANNO, M.; SATO, T. Mitochondrial kinase signalling pathways in myocardial protection from ischaemia/ reperfusion-induced necrosis. Cardiovascular Research, v. 88, p. 7–15, 2010.

Moraes, J., Galina, G., Alvarenga, P. H., Rezende, G. L., Masuda, A., Vaz Jr, I, S., Logullo, C., (2007). Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. Comparative Biochemistry and Physiology 146, 528–533.

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, *et al*. (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya,and *Plasmodium*. Cell 139: 126821278.

MUYLLAERT, D.; KREMER, A.; JAWORSKI, T. et al. Glycogen synthase kinase-3β, or a link between amyloid and tau pathology? Genes, Brain and Behavior, v. 7, n. 1, p. 57 – 66, 2008.

Oliveira, Caroline Dantas & Moreira, Luciano Andrade (2012). Uso de Wolbachia no controle biológico. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular.

O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A., and Werren, J.H. (1997). Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction (Oxford University Press).

Rahn, H., Paganelli, C. V., Ar, A., 1974. The avian egg: air-cell gas tension, metabolism and incubation time. Respiration Physiology. 22, 297-309.

Raverdy S, Foster J M, Roopenian E, Carlow CKS (2008). The *Wolbachia* endosymbionte of *Brugia malayi* has an active pyruvate phosphate dikinase. Molecular &Biochemical Parasitology 160 163–166.

Rocha A.C.V.M, Braga E.M, Araújo M.S.S, Franklin B.S., Pimenta P.F.P. (2004). Effect of the *Aedes fluviatilis* saliva on the development of *Plasmodium gallinaceum* infection in *Gallus (gallus) domesticus*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 99(7): 709-715.

Rockstein, M., (1973). The Physiology of Insecta. Second Edition. Academic Press. 512p.

Santos R, Mariano AC, Rosas-Oliveira R, Pascarelli B, Machado EA, Meyer-Fernandes JR, Gondim KC., (2008). Carbohydrate accumulation and utilization by oocytes of Rhodnius prolixus. Arch Insect Biochem Physiol. 67(2):55-62.

Sieber Matthew H., Michael B. Thomsen, Allan C. Spradling, (2016). Electron Transport Chain Remodeling by GSK3 during Oogenesis Connects Nutrient State to Reproduction. Cell 164, 420–432,

Shiomi, T., Kitazume, Y., 1956. Changes in glycogen content during early embryonic development in Drosophila melanogaster. Drosophila Information Service.

Stouthamer R, Breeuwer JA, Hurst GDD (1999) *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. Annu Rev Microbiol 53: 71–102.

Stewart, J.R., Thompson, M.B. (1993), A novel pattern of embryonic nutrition in a viviparous reptile. *J.Exp. Biol*., 174: 97-108.

Thompson M. B., Stewart, R. J., 1997. Embryonic metabolism and growth in lizards of the genus Eumeces. Comparative Biochemisty and Physiology 118, 647–654.

Torner H, Ghanem N, Ambros C, Holker M, Tomek W *et al*., 2008. Molecular and sudcellular characterization of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. Reproduction Research 135:197–212

Turley AP, Moreira LA, O'Neill SL, McGraw EA (2009). *Wolbachia* infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*. Plos neglected tropical dissuades 3(9): e516.

Valle, D., Monnerat, A. T., Soares, M. J., Rosa-Freitas, M. G., Pelajo-Machado, M., Vale, BS., Lenzi, H. L., Galler, R., Lima, J. B., 1999. Mosquito embryos and eggs: polarity and terminologyof chorionic layers. J Insect Physiol 45, 701-708.

Vital W. Rezende G. L., Abreu L., Moraes J., Lemos F. J. A., Vaz I. S., Logullo C, (2010). Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. BMC Developmental Biology 10:25.

Vleck, D. (1991), Water economy and solute regulation of reptilian and avian embryos. In: Deeming, D.C., Ferguson, M.W.J. (Eds.), Egg incubation: Its effects on embryonic development in birds and reptiles. Cambridge University Press, Cambridge, 245-259.

Voronin D, Bachu S, Shlossman M, Unnasch TR, Ghedin E, Lustigman S, (2016). Glucose and Glycogen Metabolism in *Brugia malayi* Is Associated with *Wolbachia* Symbiont Fitness. PLoS One. 2016 Apr 14;11(4):e0153812. doi: 10.1371/journal.pone.0153812. eCollection 2016.

Werren JH (1997) Biology of Wolbachia. Annu Rev Entomol 42: 587–609.

Werren JH, Baldo L, Clark ME (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nat Rev Microbiol 6: 741–751.

Yamazaki H., Nusse R., 2002. Identification of DCAP, a Drosophila homolog of a glucose transport regulatory complex. Mech. Dev. 119, 115-119.gk

Yamazaki H, Yanagawa S., 2003. Axin and the Axin/Arrow-binding protein DCAP mediate glucose–glycogen metabolism. Biochem. Bioph. Res. Commun. 304, 229-235.

Zhang X, Zhao F, Si Y, Huang Y, Yu C, Luo C, Zhang N, Li Q, Gao X. (2014) GSK3β regulates milk synthesis in and proliferation of dairy cow mammary epithelial cells via the mTOR/S6K1 signaling pathway. Molecules. 3;19(7):9435-52.