

**Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro –  
UENF**

**Envolvimento de uma Glicogênio Sintase na morfogênese em  
embriões de *Aedes aegypti***

Newton Ruiz Sanches Junior

Campos dos Goytacazes – RJ

Abril de 2018

# **Envolvimento de uma Glicogênio Sintase na morfogênese em embriões de *Aedes aegypti***

Newton Ruiz Sanches Junior

Tese apresentada ao Centro de Ciências e tecnologias Agropecuárias Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências e tecnologias Agropecuárias.

Orientador: Prof. Dr Carlos Jorge Logullo de Oliveira

Co-orientador: Dr. Renato Martins da Silva

Campos dos Goytacazes – RJ

Abril de 2018

Newton Ruiz Sanches Junior

**Envolvimento de uma Glicogênio Sintase na morfogênese em embriões de *Aedes aegypti***

Tese apresentada ao Centro de Ciências e tecnologias Agropecuárias Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências e tecnologias Agropecuárias.

Aprovado em: 26 / 04 / 2018

Banca Examinadora:

---

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

---

Prof. Dr Rodrigo Rodrigo Nunes Fonseca – LIBHM – NUPEM/UFRJ

---

Prof. Dr. José Roberto da Silva – LIBHM – NUPEM/UFRJ

---

Dr. Renato Martins da Silva – UEA/UENF

Campos do Goytacazes

2018

## LISTA DE ABREVIACES

AaGS: Glicogênio Sintase de *Aedes aegypti*;  
AKT: Proteína Cinase B;  
AMPC: Adenina Monofofato Cíclico;  
ANOVA: Análise de Variância  
BME26: Células embrionárias de *Boophilus microplus*;  
cDNA: DNA complementar;  
CS: Cutícula Serosa;  
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole;  
DNA: cido desoxirribonucleico;  
dsRNA: Dupla fita de RNA;  
EN: Rede exocornica;  
G6P: Glicose 6 Fosfato;  
G6PDH: Glicose 6 Fosfato Dehidrogenase;  
GFP: Green Fluorescent Protein;  
GS: Glicogênio Sintase;  
GSK 3  $\beta$ : Glicogênio Sintase Quinase 3 $\beta$ ;  
H: Horas;  
H33334: Hoechst;  
IPL: Peptídeos Tipo-Insulina;  
LA: Laranja de Acridina;  
PEPCK fosfoenolpiruvato-carboxiquinase;  
PI: Iodeto de Propdeo;  
PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinase;  
RNA: cido riboxirribonucleico;  
RNAi: RNA de interferência;  
UDPG: Uridinadifosfoglicose;

## DEDICATÓRIA

*“A minha amada noiva, amiga e companheira Vivianne Mota Ladeira que iluminou este caminho com a sua luz e sua cumplicidade, através seu amor verdadeiro, vencemos todas as dificuldades e concluimos esta etapa”.*

## EPÍGRAFE

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”. (John F. Kennedy)*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a conclusão deste trabalho as minhas fontes de iluminação, meu solzinho Vivianne Mota Ladeira onde busquei forças para trilhar essa jornada e à minha família que sempre me apoiou em tudo, aos meus pais, Newton Ruiz Sanches e Frances de Souza Sanches pelos sacrifícios e perseverança, à minha querida irmã Mariha Thereza e o meu amigo e cunhado Renan Mota que sempre me ajudaram e estiveram presentes nos momentos bons e ruins compartilhando alegrias e angústias.

Agradeço também ao meu orientador Carlos Logullo por todo esse tempo dividindo conhecimento, paciência, compreensão e principalmente a amizade.

Ao meu co-orientador e amigo Renato Martins pela ajuda e companheirismo.

Aos amigos de bancada e parceiros de laboratório Bárbara Pitta, Camila Waltero, Darcy Adriann, Christiano Calixto, Jhenifer Nascimento, Saulo Palote e Guilherme Augusto.

Também agradeço aos Professores Leonardo Araújo de Abreu e Itabajara Vaz por toda ajuda, apoio e ensinamentos.

Aos professores da UEA, Fernanda Antunes, André Lacerda e Arnaldo Façanha pela dedicação exemplar ao ensino.

A professora Flávia Mury pela criteriosa revisão deste documento e aos membros da banca examinadora.

Ademais aos órgãos de fomento CAPES, FAPERJ, pela bolsa concedida e pelos recursos que viabilizaram a realização deste estudo.

Obrigado a todos e com todos compartilho este momento.

## RESUMO

A principal forma de combate ao mosquito *Aedes aegypti* é o controle populacional deste vetor. Entretanto, o uso indiscriminado de inseticidas tem levado o aumento de casos de resistência, este fenômeno levou a busca de novos conhecimentos para o desenvolvimento de fármacos e estratégias de controle populacionais tornam-se necessários para isso novos estudos que auxiliem na maior compreensão da fisiologia e do metabolismo deste inseto. Pela sua importância e dinâmica de eventos que ocorrem nesta etapa, os ovos desta espécie apresentam particularidades físico-químicas que permitem desde a resistência ao ressecamento até a quiescência. Neste trabalho buscou-se mostrar correlações existentes entre o metabolismo energético e os processos de morfogênese do mosquito *Aedes aegypti*, através do silenciamento gênico de uma enzima descrita como exclusiva do metabolismo de carboidratos, a Glicogênio Sintase (GS). Para isso foi estabelecido um protocolo de permeabilização de ovos para utilização de dupla fita de RNA para silenciamento gênico e avaliação de parâmetros como esclerotização dos ovos, taxa de eclosão e morfologia dos embriões. Para a permeabilização dos ovos para silenciamento foi utilizada uma solução de clorito de sódio 1%, sendo verificada a permeabilização destes ovos através de marcadores como o Laranja de Acridina, que foi capaz de promover a marcação em ovos e larvas após ao tratamento com clorito. Verificamos também uma taxa de silenciamento próxima de 60%, além disso, nos embriões silenciados foi observado reduções nas taxas de esclerotização dos ovos e eclosão das larvas. Quando foi analisado o teor de glicogênio presente também se observou uma redução de 60% do glicogênio presente nas larvas. Nas análises morfológicas foi observada falta de compartimentalização do embrião, ausência de produção de vitelo e falta de polarização do embrião. Utilizando um protocolo de microinjeção para silenciamento gênico nas fêmeas adultas observou-se fenômenos morfológicos semelhantes. A partir destes dados mostram que o metabolismo de carboidratos atue além de uma importante fonte de energia, como um importante fator para a organogênese e desenvolvimento embrionário do mosquito *Aedes aegypti*.

**Palavra chave:** *Aedes aegypti*, embriogênese e metabolismo de glicogênio.

## ABSTRACT

The main form of *Aedes aegypti* mosquito control is the population control of this vector. However, the indiscriminate use of insecticides has led to increased cases of resistance, this phenomenon led to the search for new knowledge for the development of drugs and population control strategies become necessary for this new studies that help in the better understanding of physiology and metabolism of this insect. Because of their importance and the dynamics of events that occur in this stage, the eggs of this species present physiology and chemical peculiarities that allow from resistance to dryness to quiescence. This work aimed to show correlations between energy metabolism and the morphogenesis processes of the *Aedes aegypti* mosquito, through the gene silencing of an enzyme described as exclusive to carbohydrate metabolism, Glycogen Synthase (GS). For this, an egg permeability protocol was established for the use of double strand of RNA for gene silencing and evaluation of parameters such as esclerotization of eggs, hatching rate and embryo morphology. For the permeabilization of the eggs for silencing, a solution of 1% sodium chlorite was used, and the permeabilization of these eggs was verified through markers such as Acridine Orange, which was able to promote labeling in eggs and larvae after treatment with chlorite. We also observed a silencing rate close to 60%, in addition, in the silenced embryos we observed reductions in the rates of esclerotization of eggs and hatching of the larvae. When the present glycogen content was analyzed, a 60% reduction of the glycogen present in the larvae was observed. The morphological analysis showed a lack of compartmentalization of the embryo, absence of calf production and lack of embryo polarization. Using a microinjection protocol for gene silencing in adult females, similar morphological phenomena were observed. From these data show that carbohydrate metabolism acts in addition to an important source of energy, as an important factor for the organogenesis and embryonic development of the *Aedes aegypti* mosquito.

Keywords: *Aedes aegypti*, embryogenesis and glycogen metabolism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> .....	13
Figura 2 Microscopia eletrônica de varredura da vista da porção dorsal dos ovos de duas espécies do gênero <i>Aedes</i> ..	16
Figura 3 A formação das membranas extraembrionárias na casca do ovo de mosquito que auxilia na resistência ao ressecamento. ....	17
Figura 4 A aquisição abrupta da resistência à dessecação na embriogênese de <i>Aedes aegypti</i> está relacionada à formação da cutícula serosa.....	18
Figura 5 Embriogênese do <i>Aedes aegypti</i> em 28°C.....	22
Figura 6 Mudanças das vias metabólicas utilizadas pelo <i>R. (b) microplus</i> durante a embriogênese.....	26
Figura 7. Mobilização de proteínas (vitelina) do embrião de <i>R. microplus</i> durante seu desenvolvimento até sua eclosão. ....	28
Figura 8 A digestão química com o clorito de sódio não afetou a taxa de eclosão nem o processo de esclerotização dos ovos.....	38
Figura 9 A digestão química com clorito de sódio promoveu a permeabilização dos ovos de <i>A aegypti</i> .....	40
Figura 10 Os marcadores Hoechst e Laranja de Acridina não interferiram na taxa de eclosão.....	41
Figura 11 A digestão química do córion com clorito de sódio (1%) por 24 horas permitiu a entrada do marcador Laranja de Acridina.....	42
Figura 12 A digestão com clorito de sódio permitiu a maior quantidade de ovos marcados com Laranja de Acridina (LA). ....	42
Figura 13 A marcação com Laranja de Acridina permaneceu após a eclosão das larvas.....	43
Figura 14 A digestão química com clorito 1% por 24 horas permitiu a maior quantidade de larvas marcadas com Laranja de Acridina (LA)..	44
Figura 15 Nas concentrações testadas de dsGS foi verificado o silenciamento gênico de aproximadamente 70%.....	45
Figura 16 As concentrações de 200 e 400 ng/ $\mu$ L de dupla fita afetaram a esclerotização dos ovos de <i>A. aegypti</i> .....	46

Figura 17 O silenciamento gênico de glicogênio sintase afetou a taxa de eclosão...	46
Figura 18 O silenciamento da GS levou a redução na quantidade de glicogênio nas larvas.....	47
Figura 19 O silenciamento da GS no embrião também inviabilizou o desenvolvimento de estruturas. ....	48
Figura 20 Nos adultos microinjetados com a concentração de 400 ng/μL de dsGS tiveram a sobrevivência afetada.....	49
Figura 21 O silenciamento de GS nas fêmeas não afetou a taxa de esclerotização e melanização dos ovos.. ....	50
Figura 22 O silenciamento gênico da GS levou a queda da taxa de eclosão.. ....	50
Figura 23 O silenciamento da GS levou a redução na quantidade de glicogênio na larva.. ....	51
Figura 24 O silenciamento da GS também inviabilizou o desenvolvimento dos embriões.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Os tratamentos com isopropanol e hipoclorito em diferentes concentrações interferiram na taxa de eclosão dos embriões.....	37
---	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	13
2.1. A família Culicidae – <i>Aedes aegypti</i> .....	13
2.2 Córion do <i>Aedes aegypti</i> .....	15
2.3 Embriogênese do <i>Aedes aegypti</i> .....	19
2.4 Metabolismo de glicogênio .....	22
2.5 Dinâmica morfofuncional e metabólica na embriogênese de artrópodes .....	24
3. JUSTIFICATIVA .....	30
4. OBJETIVOS .....	31
4.1. Objetivo geral: .....	31
4.2. Objetivos específicos .....	31
5. METODOLOGIA .....	32
5.1 Mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	32
5.2 Ensaios de eclosão dos ovos .....	32
5.3 Quantificação de glicogênio .....	33
5.4 Síntese da dupla fita de RNA (dsRNA) .....	33
5.5 Permeabilização dos ovos de <i>Aedes aegypti</i> .....	34
5.6 Extração de RNA para validação do silenciamento por RNAi .....	34
5.7 Análise da expressão relativa por RT-qPCR .....	35
5.8 Análise morfológica de ovos e larvas de <i>A. aegypti</i> por microscopia .....	35
5.9 Análise Estatística .....	36
6. RESULTADOS .....	37
6.1 Permeabilização dos ovos de <i>Aedes aegypti</i> .....	37

6.2 Silenciamento Genico da GS nos ovos de <i>Aedes aegypti</i> .....	45
6.3 Silenciamento da GS em fêmeas de <i>A. aegypti</i> através de microinjeção .....	48
7. DISCUSSÃO .....	53
8. CONCLUSÃO.....	59
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
ANEXO I.....	67

## 1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos apresentam uma grande importância na saúde pública e econômica como transmissor de patógenos, dentre as principais espécies destaca-se o mosquito *Aedes aegypti*. O mosquito *A. aegypti* é vetor de doenças como a Dengue, Zika, febre amarela e Chikungunya. Atualmente a principal estratégia de controle destas doenças é o controle populacional do mosquito. Entretanto, o uso indiscriminado de inseticidas levou ao aumento de casos de resistência a estes compostos. Com isso, alternativamente, estudos que auxiliem na maior compreensão da fisiologia e bioquímica deste inseto pode ser uma forma de encontrar novos alvos e estratégias para o seu controle populacional (Benelli e Mehlhorn, 2016).

O *A. aegypti* apresenta um ciclo de vida dividido em quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e adulto com diversos instars (Bowman *et al.* 2016; Clements, 2000). A fase de maior propagação e dispersão da espécie no ambiente é a fase embrionária, pois uma única fêmea é capaz de colocar mais de 200 ovos no ambiente. É nesta fase que ocorrem eventos primordiais para a sobrevivência da espécie e sua permanência no ambiente (Gillet *et al.*, 1961). A duração deste processo depende de diversos fatores como temperatura e umidade, em situações controladas de temperatura e umidade (28°C e 80% de umidade relativa) este processo ocorre em 61,6 horas (Farnesi *et al.*, 2009).

Os ovos desta espécie apresentam particularidades físico-químicas que permitem resistência ao ressecamento e auxiliam no processo de quiescência (caracterizado pelo hipometabolismo e parada do desenvolvimento embrionário). Além disso, trabalhos anteriores já demonstraram que há uma dinâmica metabólica como a utilização de glicogênio, glicose e proteínas em diferentes tempos e vias metabólicas durante o desenvolvimento embrionário, principalmente, em vias relacionadas com o metabolismo de glicose, a dinâmica no conteúdo de glicogênio, seguido da utilização de proteínas e lipídeos até o fim do desenvolvimento (Vital *et al.*, 2010). Classicamente, o desenvolvimento embrionário é descrito como um processo influenciado pela transcrição diferencial de genes, em que elementos

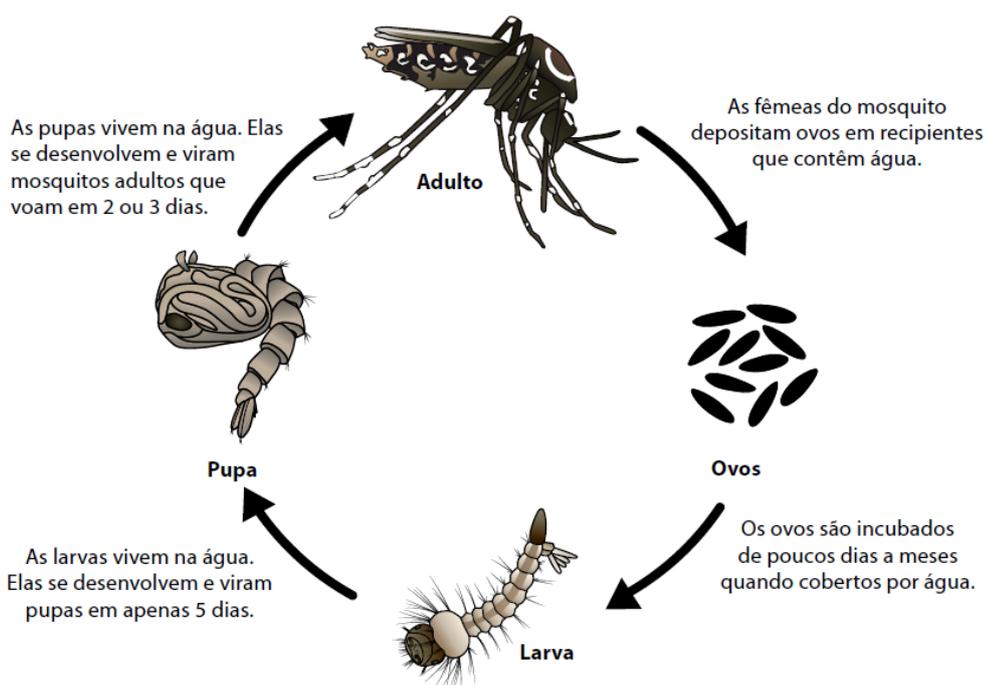
regulatórios são importantes mediadores, auxiliando na sincronização de eventos morfológicos (Chiaromonte *et al.*, 2003).

Neste trabalho foi mostrada a influência no metabolismo energético e seu papel na embriogênese do mosquito *Aedes aegypti*, através do silenciamento gênico de uma enzima descrita como exclusiva do metabolismo de carboidratos a Glicogênio Sintase (GS) e sua influencia na embriogênese do *A. aegypti*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A família Culicidae – *Aedes aegypti*

Os mosquitos pertencentes à Classe *Insecta*, Ordem Díptera e Família Culicidae, possuem alguns nomes populares como muriçocas ou carapanãs. Semelhante a outros membros da classe *Insecta* seu corpo se divide em cabeça, tórax e abdome; além disso, também possuem um par de antenas sensível ao tato; um par de asas; outro par foi adaptado em balancins; quanto ao aparelho bucal possui o tipo picador-sugador que facilita sua obtenção de alimento (sangue). São insetos holometábolos e possuem um ciclo biológico composto por quatro estágios: ovo, quatro instares larvais, pupa e adulto (Figura 1) (Consoli *et al.*, 1994).



**Figura 1** Ciclo de vida do *Aedes aegypti*.

Fonte: CDC, 2015

O ciclo de vida desta espécie e em outros culicídeos ocorre em dois ambientes, o ambiente aquático e terrestre, as primeiras fases do ciclo ovo, larva e pupa são fundamentalmente aquáticos. Nesta etapa os instares das larvas se alimentam de matéria orgânica dissolvida e de micro-organismos contidos na água, as pupas não se alimentam, e após a ecdise de pupa para adulto este mosquito

passa para a fase de ambiente terrestre, onde fazem sua reprodução, alimentação sanguínea e dispersão através do voo. (Borror *et al.*, 1988; Forattini *et al.*, 1996).

Quanto à morfologia da fase adulta há um caráter dioico (sexos separados), além de ser a forma alada, e só estão prontas para realizar a cópula após o endurecimento do tegumento corporal e, no caso dos machos, após o giro de 180° da genitália externa, que ocorre 24 horas após a ecdise da pupa. É na fase da hematofagia que os mosquitos transmitem uma grande variedade de patógenos como arboviroses dengue, zika e febre amarela e dentre outras viroses (Christophers *et al.*, 1960).

Os adultos, tanto os machos como as fêmeas, no primeiro momento buscam soluções açucaradas geralmente néctar de plantas como fonte de nutrientes. Entretanto, posteriormente, as fêmeas buscam sangue de hospedeiros vertebrados, pois necessitam das proteínas para que ocorra a maturação dos ovos. Após o acasalamento e hematofagia que fornece um aporte de aminoácidos, que serão transportados para os ovários e permitem a ovogênese, os mesmos são incorporados aos ovócitos (Clements, 2000). O *A. aegypti* apresenta, principalmente, um comportamento matutino e crepuscular para a realização do repasto sanguíneo (Eiras, 2006; Clements, 2000).

O principal hospedeiro dos mosquitos para o repasto sanguíneo são animais vertebrados, em especial mamíferos, sendo o homem o hospedeiro preferencial (Scott *et al.*, 1993; Barata *et al.*, 2001; Harrington *et al.*, 2001). O *Aedes aegypti* está associado a ambientes urbanos, local em que há uma maior concentração de fontes alimentares como o homem e diversos ambientes que servem de criadouros (Harrington *et al.*, 2001; Reiter, 2007).

Originalmente, no habitat silvestre, o *A. aegypti* é uma das espécies de mosquitos que ovipositam em buracos de árvores, axila de folhas, cascas de frutos e outras coleções de água. (Bates, 1949), realizando a chamada “skip-oviposition” ou “oviposição em saltos”. Este comportamento foi descrito inicialmente em outra espécie de mosquito a *Wyeomyia smithii* (Diptera: Culicidae). Neste tipo de ovipostura, as fêmeas de mosquitos distribuem pequenas porções de ovos, ao longo de vários criadouros (Mogi e Mokry, 1980). Posteriormente este comportamento

também foi observado em *A. aegypti* em diversos estudos (Christophers, 1960; Fay, 1966; Cobert e Chadee, 1993; Reiter, 2007).

O comportamento observado no mosquito está vinculado diretamente aos padrões que estão vinculados com o ciclo gonotrófico (período entre o repasto sanguíneo e a ovoposição). Este ciclo é iniciado com o estímulo provocado pelo odor do hospedeiro, seguido pelo repasto sanguíneo; digestão do sangue; transporte dos aminoácidos para o ovário; a formação dos conjuntos de ovócitos maduros e acaba com a oviposição (Clements, 2000). Por causa deste comportamento, em laboratório as fêmeas de *A. aegypti* não depositam seu conjunto total de ovos logo que a ovogênese está completa.

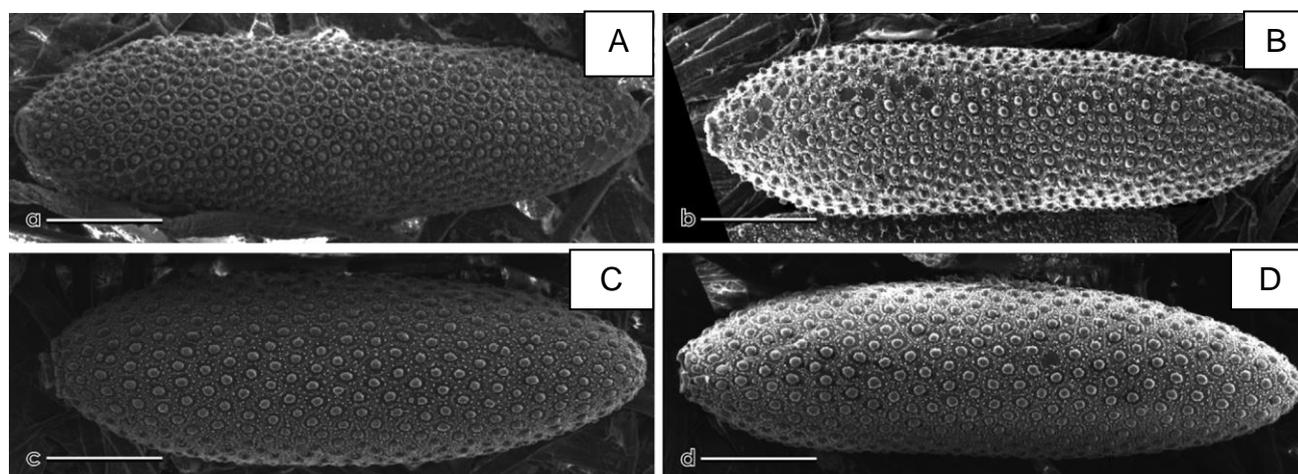
Foi observado que a maioria dos ovos são ovipostos após 72 horas de repasto sanguíneo. Entretanto observa-se a ovipostura de alguns ovos do quarto ao sexto dia após a alimentação sanguínea. Em ambiente urbano as fêmeas de *A. aegypti* realizam a ovipostura em uma grande variedade de recipientes, sendo que muitos destes recipientes são pequenos e descartáveis (Reiter, 2007).

## **2.2 Córion do *Aedes aegypti***

Além das mudanças metabólicas e morfológicas que ocorrem no embrião há também diversas mudanças em outras camadas que fazem parte da estrutura do ovo e das membranas extraembrionárias. O *córion* ou casca do ovo é a primeira camada formada e a que possui contato direto com o ambiente, a mesma confere além de uma proteção física ao embrião, permite a redução da perda de água do embrião para o ambiente (Clements, 1992). No momento da ovipostura, os ovos apresentam uma coloração clara próxima ao branco, apresentam menor resistência mecânica, ou seja, são mais flexíveis e são extremamente permeáveis, mas durante o curso da embriogênese estas características são perdidas dando lugar a uma coloração mais escura, maior resistência e rigidez e tornam-se impermeáveis (Clements, 1992; Chapman, 1998; Li *et al.*, 2006; Rezende *et al.*, 2008).

A formação do *córion* do *A. aegypti* tem o seu início logo após a ovogênese de forma que antes mesmo da ovipostura ocorrer, esta camada já está presente no

ovo, sendo o principal revestimento do ovo nas primeiras fases da embriogênese. O córion é formado por duas subcamadas: o endocóron, dito homogêneo e rígido, e o exocóron, heterogêneo e mais frouxo (Clements, 1992; Chapman, 1998; Monnerat *et al* 1999; Valle *et al* 1999). Como evidenciado por Faull e Willians (2016), através de microscopia eletrônica de varredura, na camada mais externa (exocóron) observou que as células coriônicas externas com as bordas e cantos no formato hexagonal tendo elevações e protuberâncias (tubérculos) em toda a superfície dorsal do ovo (Figura 2). Estas células podem ocasionalmente conter dois ou mais tubérculos centrais, estes tubérculos foram observados imediatamente ao lado da estrutura de rede exocoronica (EN) nos ovos de *A. aegypti* (Jarial, 2001; Faull & Willians, 2016). Já na porção ventral existe uma organização de células do exocóron diferentes no formato de plastão; esta mudança de formato pode estar atrelada a permitir a formação de bolhas de ar, permitindo a troca gasosa com o meio (Jarial, 2001) (Figura 2), sendo basicamente formada de quitina (Clements, 1992, Monnerat *et al* 1999).

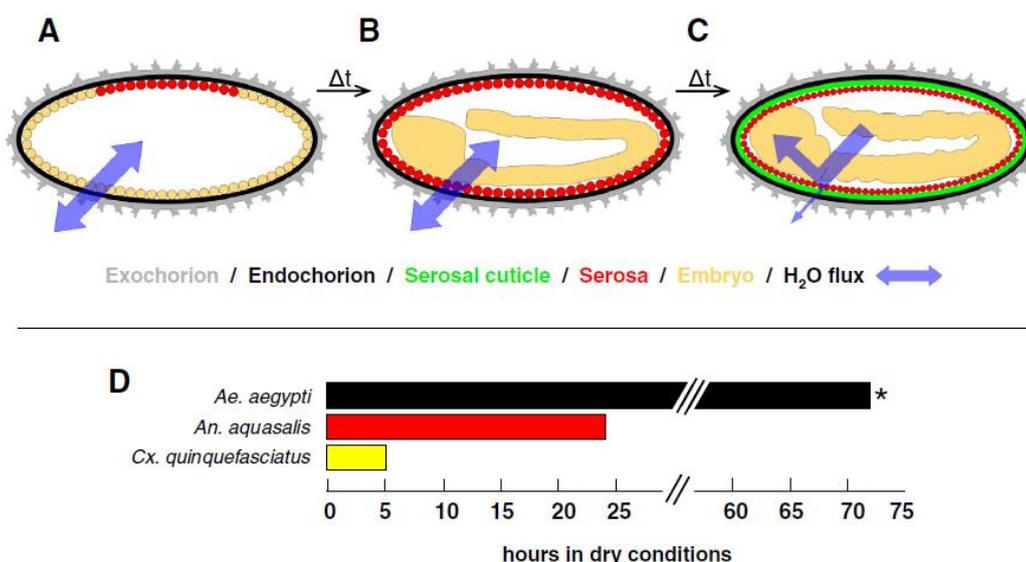


**Figura 2** Microscopia eletrônica de varredura da vista da porção dorsal dos ovos de duas espécies do gênero *Aedes*. (a) Adelaide *A. notoscriptus*; (b) Sydney *A. notoscriptus*; (c) Cairns *A. aegypti*; (d) Charters Towers *A. aegypti*. Barra de escala 100 mm.

Fonte: Jarial, 2001

Durante a terceira hora de desenvolvimento, começa o enrijecimento e o escurecimento dos ovos. Estas características estão associadas ao processo de esclerotização e a melanização do endocóron (Clements, 1992; Li *et al.*, 2006; Rezende *et al.*, 2008).

Esta estrutura é uma camada de células, localizada no espaço entre o endocócion e o embrião. Além disso, neste período começam a surgir novas membranas extraembrionárias, uma delas apresenta uma maior importância neste processo de mudanças físicas do ovo, a serosa. No caso de culicídeos (inclusive no *A. aegypti*) a serosa excreta uma secreção composta basicamente por quitina, formando uma nova camada chamada cutícula serosa (CS) e fica situada entre o endocócion e a própria serosa, tornando-se, a partir do lado externo, a terceira camada que compõe o revestimento final dos embriões (Figura 3). Além disso, esta camada é de vital importância para a resistência contra o ressecamento ou outro stress provocado por escassez hídrica (Rezende *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2014).

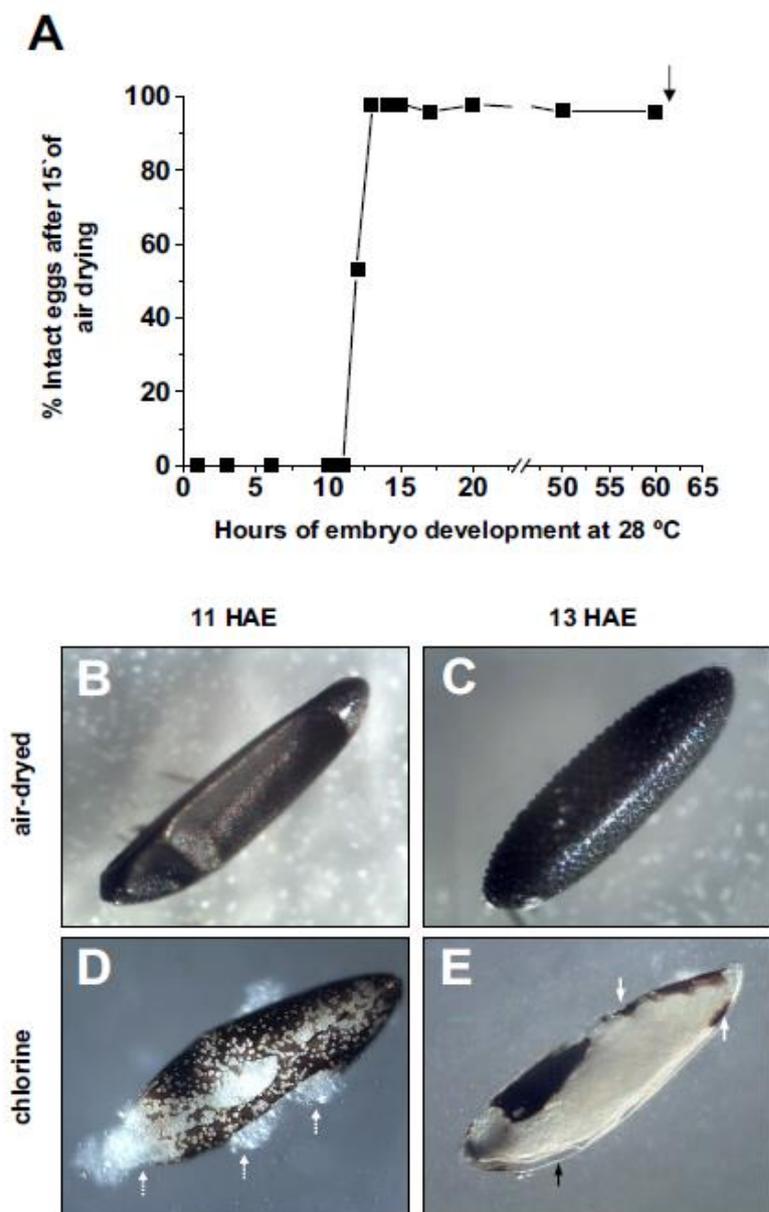


**Figura 3 A formação das membranas extraembrionárias na casca do ovo de mosquito que auxilia na resistência ao ressecamento.**(A) Logo após a oviposição (1<sup>a</sup> hora do desenvolvimento), presença do exocócion e endocócion. (B) Nas primeiras sete horas do desenvolvimento, formação da camada da serosa envolta do embrião, (C) A cutícula da serosa secretada pela serosa, que reduz consideravelmente o transito de água. (D) um comparativo da resistência de diversas espécies: *Aedes aegypti*, *A. aquasalis* e *C. quinquefasciatus* após a transferência para local com baixa umidade (20–55%).

Fonte: Farnesi *et al.*, 2015

Em *A. aegypti* e *A. gambiae* a CS é sintetizada com cerca de 20 e 22% do tempo total da embriogênese, respectivamente. Para ambas as espécies a CS é formada na etapa de extensão máxima da banda germinal. Diferente do cócion, a CS

é resistente à digestão química por hipoclorito de sódio, o que permite sua fácil identificação durante a microscopia (Figura 4) (Clements, 1992, Rezende *et al.*, 2008, Farnesi *et al.*, 2009, Goltsev *et al.*, 2009).



**Figura 4** A aquisição abrupta da resistência à dessecação na embriogênese de *Aedes aegypti* está relacionada à formação da cutícula serosa. Em (A) a porcentagem de ovos não afetados com a desidratação (B) e (C) ovos com 11 e 13 horas de desenvolvimento após 15 minutos de exposição ao ar. Em (D) e (E) os ovos com 11 e 13 horas após 15 minutos de exposição ao cloro. Flechas tracejadas brancas: extrusão de conteúdo celular. Flecha preta: cutícula serosa autossômica em volta do embrião. Setas brancas: córion remanescente.

### 2.3 Embriogênese do *Aedes aegypti*

Em culicídeos a embriogênese é iniciada com a fertilização do ovócito pelo espermatozoide, estes os espermatozoides ficam armazenados em uma estrutura que se conecta com o oviduto central da fêmea, a espermateca. Pela grande variedade de estratégias de desenvolvimento embrionário entre os gêneros e diferentes mudanças morfológicas entre as espécies durante o desenvolvimento embrionário este tópico terá como principal foco o estudo do gênero *Aedes*.

Conforme os ovócitos se aproximam da saída do oviduto os espermatozoides saem deste reservatório e fecundam o ovócito, isto ocorre momentos antes da postura dos ovos. Por este motivo, a oviposição é considerada o momento do início da embriogênese (Chapman *et al.*, 1998). Os ovos são depositados no ambiente, em locais úmidos, bem próximo da água no gênero *Aedes*; depois da postura os embriões se desenvolvem sem a necessidade da presença dos adultos (Clements *et al.*, 1992) (Gilbert *et al.*, 1997; Zeh *et al.*, 1989).

O ovo tem uma estrutura física peculiar e composição química complexa. Esta complexidade é resultante de sua função de proteção e manutenção do desenvolvimento embrionário. Todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento embrionário são colocados pela mãe durante a fase de formação do ovócito, além disso, após a eclosão, a sobrevivência das larvas é determinada pela quantidade de vitelo remanescente e pelo início de sua alimentação (Sahoo *et al.*, 1998).

Durante o desenvolvimento embrionário há um alto custo energético para a formação de tecidos do embrião assim como sua manutenção e crescimento (Thompson e Stewart, 1997). Sendo importante ressaltar que durante este estágio todo o material genético (DNA e RNA mensageiros) assim como metabólicos necessários para o desenvolvimento do embrião foram depositados pela fêmea durante a ovogênese (Walser e Lipshitz, 2011).

Através de técnicas de clarificação dos ovos foi possível observar as mudanças morfológicas dos embriões de *Aedes aegypti* durante o seu desenvolvimento, de forma que no início do desenvolvimento, durante as três primeiras horas pós-oviposição, o embrião ocupa todo o espaço físico do ovo, e os

núcleos (energídeos), se dividem em um ambiente constituído de um pseudo-sincício em que vários núcleos compartilham as mesmas membranas. Nas horas seguintes estes energídeos realizam a migração para a periferia do ovo e ocorre a formação de células polares, quando esta migração celular termina (todos os energídeos estão na periferia) é considerado que o blastoderma sincicial está formado (Trips *et al.*, 1973; Valle *et al.*, 1999; Clements *et al.*, 1992).

Neste momento começam a serem delimitados os limites celulares, levando a formação do blastoderma celular, formando um córtex visível através da clarificação. Esta formação de córtex ocorre após a diferenciação celular em dois tipos celulares distintos pelo seu tamanho, as células maiores e menores. As células maiores ficam concentradas no polo posterior do embrião (células polares) e células menores, ficam espalhadas pelo restante do embrião. As células menores possuem uma grande importância, pois são as células somáticas que formarão no futuro os compartimentos do embrião, enquanto que as células polares são as precursoras da linhagem germinativa (Raminani *et al.*, 1975; Bate *et al.*, 1993).

Na fase seguinte, chamada de gastrulação, o embrião desenvolve uma invaginação ventral (fenda ventral), que será o local de origem do sistema nervoso (mesoderma) e futuramente da fenda cefálica (precursor do cérebro). Neste momento além da formação dos segmentos há também a separação e limitação da cabeça e do tronco (Figura 5). Nestas etapas iniciais do desenvolvimento embrionário os principais compostos utilizados são lipídeos e proteínas, tendo vias com a  $\beta$ -oxidação e a gliconeogênese durante as sucessivas divisões, nas primeiras horas de embriogênese de *Aedes aegypti*, a glicose pode estar sendo direcionada preferencialmente para síntese de nucleotídeos e glicogênio (Vital *et al.*, 2010).

Um importante evento começa a ocorrer logo no início da gastrulação, a extensão da banda germinal. No final deste processo a banda germinal terá se estendido dorsalmente até o polo anterior (Monnerat *et al.*, 2002). Após a fase de extensão, ocorre aprofundamento dos sulcos dos segmentos que vem concomitantemente com a retração da banda germinal, este fenômeno é acompanhado de uma mudança metabólica importante, pois durante a embriogênese de *A. aegypti* foi registrado aumento nos níveis de glicose em

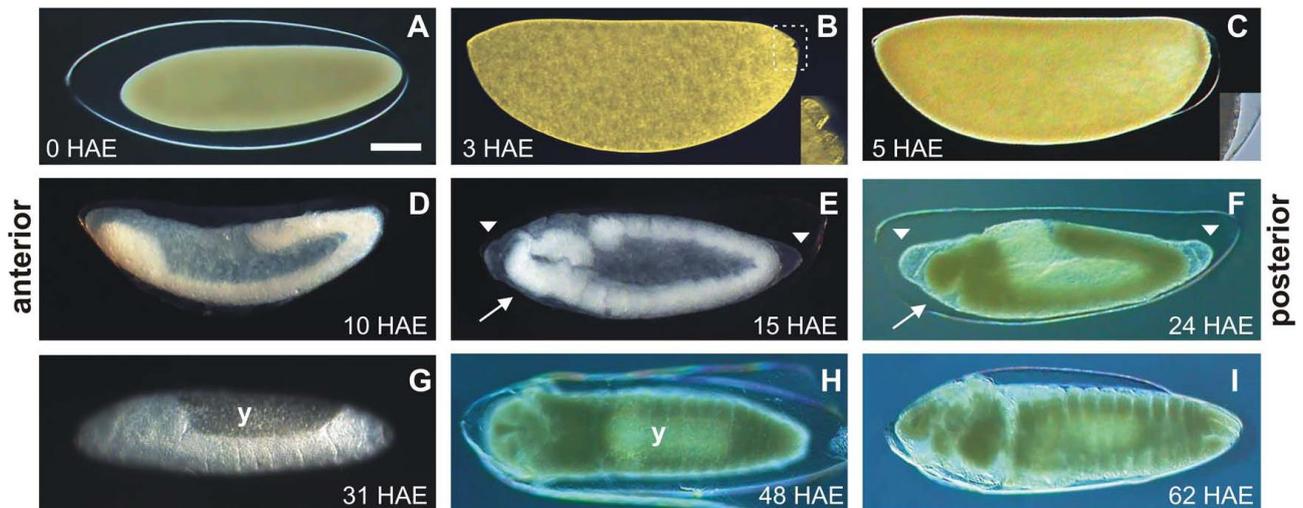
momentos relativos à segmentação, entre 15h e 20h, sugerindo ser uma importante fonte energética nesta etapa da embriogênese (Vital *et al.*, 2010) (Figura 5).

Também foi observado, um acúmulo de glicogênio nos ovos até 15h de embriogênese, seguido da diminuição do conteúdo deste metabólito nos ovos até o fim deste estágio (Vital *et al.*, 2010) É durante esta fase de retração que ocorre o movimento, típico de embriões de mosquito, uma rotação de 180° ao longo do seu eixo longitudinal (Valle *et al.*, 1999) (Figura 5). Morfologicamente após a retração da banda germinal os segmentos cefálicos e torácicos são claramente diferenciados e a segmentação é mais definida (Monnerat *et al.*, 2002).

Quando a retração da banda germinal está concluída começa o fechamento dorsal do embrião, este fechamento se caracteriza por ambas as extremidades realizarem o fechamento simultaneamente, sendo os últimos segmentos a se fecharem corresponderem aos segmentos embrionários centrais (Raminani *et al.*, 1975; Monnerat *et al.*, 2002). No ponto de vista metabólico, a gliconeogênese parece atuar como uma possível via metabólica de reabastecimento de glicose para a célula-ovo, servindo como substrato para a síntese de glicogênio e nucleotídeos (Vital *et al.*, 2010).

Após o fechamento dorsal, no final da embriogênese, há a permanência de um saco de vitelo, que serve como uma reserva energética. Na fase final, já é possível se observarem os três segmentos torácicos fundidos e os oito segmentos abdominais, além dos apêndices caudais, outras estruturas aparecem e se projetam do corpo do embrião como cerdas, escova oral, antena e espinho de eclosão (Rosay *et al.*, 1959; Monnerat *et al.*, 2002; Vital *et al.*, 2010). O tempo de duração destes processos é dependente de aspectos como a temperatura em que os ovos se desenvolvem, quando os mesmos são mantidos úmidos a 25°C, os embriões têm seu desenvolvimento completado com 77,4 horas, e a 28°C com 61,6 horas (Farnesi *et al.*, 2009).

Após aproximadamente três dias da postura os embriões pela ausência de água, os embriões podem entrar em um processo de hipometabolismo conhecido como quiescência e podem permanecer viáveis por meses e até anos (Silva *et al.*, 1999). Na figura 5 estão representadas as principais etapas morfológicas do desenvolvimento embrionário do *Aedes aegypti*.



**Figura 5** Embriogênese do *Aedes aegypti* em 28°C. (A) primeira hora após a ovoposição (after egg laying ou HAE). (B) 3-HAE com o sincício/blastoderma. (C) 5-HAE, com o blastoderma celular. (D) 10-HAE. (E) 15-HAE. (F) 24-HAE, retração da banda germinal.(G) 31-HAE. (H) 48-HAE. (I). 62-HAE. Barra de escala de 100 μm.

Fonte: Vital *et al.*, 2010

## 2.4 Metabolismo de glicogênio

O glicogênio é um polímero de glicose, caracterizado por ligações lineares feitas por ligações  $\alpha$ -1,4 e as cadeias ramificadas por ligações  $\alpha$ -1,6 entre as moléculas de glicose, sendo este um polímero ramificado, com peso molecular aproximado de 107 daltons que apresenta uma cadeia aproximada de 1-11 resíduos de glicosil, sendo que geralmente em uma molécula de glicogênio tem cerca de 4000 moléculas de glicosil (Whelan, 1991).

Há classicamente duas enzimas envolvidas na síntese de glicogênio (glicogênese), sendo a primeira enzima glicogênio sintase (GS) responsável pela ligação  $\alpha$ -1,4 entre os resíduos de glicosil e a segunda a enzima, a enzima ramificadora de glicogênio responsável pela ligação  $\alpha$ -1,6 também entre os resíduos de glicosil. Para a quebra do glicogênio para obtenção de energia é necessário a redução deste polímero a moléculas de glicose fosfato novamente, para isso há a participação das enzimas de degradação, a glicogênio fosforilase, responsável pela clivagem da cadeia linear e a enzima desramificadora de glicogênio (Devlin, 1998; Harris, 1986).

A ativação e a regulação das atividades destas enzimas dependem da regulação do metabolismo do glicogênio podendo ser alostérico ou por modificações covalentes (Devlin, 1998). A regulação por modificação covalente pode ser exemplificada via AMPc, que é um segundo mensageiro que ativa proteína quinase dependente de AMPc promovendo a fosforilação da enzima glicogênio fosforilase ativando-a. Desta forma favorece a glicogenólise e inibe a gliconeogênese, (Ferrer *et al.*, 2003).

Um tipo de regulação deste sistema é realizado pela insulina ou peptídeos tipo-insulina (IPL) e o glucagon. A insulina ou IPL no fígado ou órgão de função equivalente reverte o processo de catabolismo (inibe a glicogenólise) e auxilia na entrada de glicose para a célula, já no músculo, aumenta a síntese de proteínas e de glicogênio (Masharani, 2001). Além disso, hormônios como adrenalina sensibilizam os receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos elevando a concentração de cálcio intracelular através da ativação via do IP3 e DAG ativando a gliconeogênese (Schmitz *et al.*, 1981).

Na glicogenólise a glicose 1P vinda do glicogênio é transformada a glicose 6P (G6P) na presença da enzima fosfoglicomutase. Após esta conversão a G6P é utilizada na glicólise para a geração de ATP. Quando há um aumento exacerbado de G6P, ou seja, quando esta não é mais utilizada pela via glicolítica, a G6P é revertida novamente a G1P que é transformada em uridinadifosfoglicose (UDPG) pela ação da UDPG pirofosforilase, tornando-se um substrato para a enzima glicogênio sintase (GS) que a incorpora em uma terminação não reduzida da molécula de glicogênio. A insulina, também age no músculo, ativando a proteína quinase que fosforila e ativa a fosfoproteína fosfatase 1 que promoverá a desfosforilação da glicogênio sintase, assim ativando-a (Devlin, 1998). Outro tipo de regulação da síntese de glicogênio ocorre pela ativação ou inibição da enzima glicogênio sintase (GS) através da fosforilação pela enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3), quando a GS está fosforilada se encontra na forma inativa, quando é retirado o grupamento fosfato esta enzima está na forma ativa.

A GSK-3 $\beta$  é uma serina/treonina cinase, em mamíferos ocorrem duas isoformas chamadas de GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$ , entretanto em carrapatos e mosquitos até o momento, só foi encontrada a isoforma  $\beta$  (Wang *et al.*, 1994, Lesort *et al.*, 1999). Inicialmente foi descrita como uma enzima participante da via de sinalização

da insulina, através da modulação da síntese de glicogênio, atualmente esta enzima está associada há diversos processos celulares como o ciclo celular, a transcrição gênica, integridade do citoesqueleto, crescimento epidérmico, crescimento de fibroblastos e enzimas relacionadas com a via Wnt por serem capazes de modular através da fosforilação enzimas chaves ligadas a morfogênese coordenam esses processos (Grimes e Jope, 2001; Frame e Cohen, 2001). A sua modulação ocorre por fosforilação, sendo inativada pelo grau de fosforilação em resíduos de serina e tirosina que podem ocorrer por várias cascatas de sinalização intracelular (Wang *et al.*, 1994). Já a sua ativação e atividade é aumentada pela fosforilação no resíduo Tyr<sup>216</sup>, que consiste em um dos mecanismos regulatórios e pode ser resultado de auto-fosforilação (Goode *et al.*, 1992)

O silenciamento da GSK via injeção de dsRNA provocou mudanças no metabolismo do embrião de *R. microplus* como redução da taxa de eclosão e mudanças morfológicas no embrião como alteração do eixo ventral induzindo a duplicação do eixo dorsal (Fabres *et al.*, 2009)., Em *Drosophila melanogaster* a GSK ou zw3/shaggy (gene homólogo a GSK em algumas espécies de insetos) possui um papel essencial no desenvolvimento do coração e do mesoderma (Park *et al.*, 1998), em *Xenopus laevis* a GSK auxilia na regulação da diferenciação neural (Marcus *et al.*, 1998). Um dos efeitos observados no metabolismo energético quando a GSK é silenciada é o acúmulo do glicogênio na célula pelo descontrole da enzima Glicogênio Sintase (GS) (Fabres *et al.*, 2009).

## **2.5 Dinâmica morfofuncional e metabólica na embriogênese de artrópodes**

Trabalhos anteriores envolvendo o metabolismo energético durante a embriogênese em organismos modelos como *Drosophila melanogaster* e *Danio regio* foi discutido a ativação e inibição de importantes vias de sinalização como as mediadas por peptídeos semelhantes a insulina e mTOR. Estas variações estão diretamente relacionadas com as fontes energéticas como a glicose, e aminoácidos que estão sendo recrutadas e a demanda energética do embrião (Thuy *et al.*, 2014).

Estes estudos foram baseados em análises dos metabólitos gerados que foram identificados através da cromatografia gasosa e líquida. De forma geral as

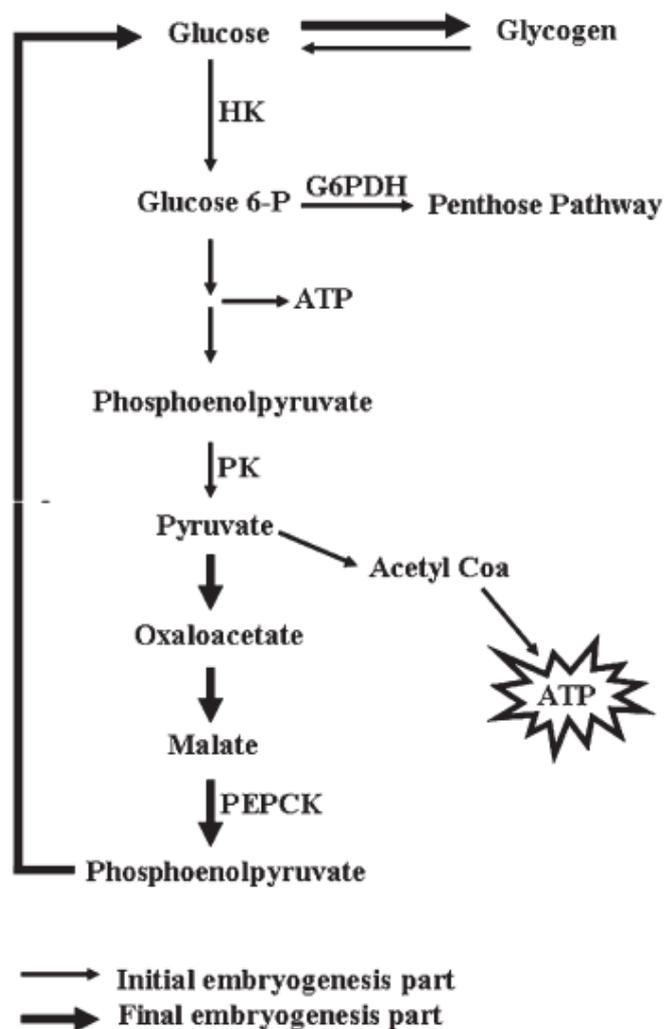
primeiras fontes energéticas utilizadas são fontes glicídicas (carboidratos) como a glicose e glicogênio (Thuy *et al.*, 2014). Esta escolha pode estar diretamente envolvida com a rápida obtenção de energia provida pela degradação destes nutrientes (Thuy *et al.*, 2014), pois existe uma grande demanda energética no início da embriogênese (Moraes *et al.*, 2007; Vital *et al.*, 2010).

Após as fases iniciais, há um rápido crescimento e um grande número de divisões celulares o que leva à uma alta exigência de glicose para a rápida produção de ATP, pois esta fase é iniciada a fase de diferenciação celular e organogênese do embrião. Nesta fase são utilizadas outras fontes energéticas como aminoácidos através da gliconeogênese (utilização de fontes não glicídicas para a obtenção de energia) e lipídeos através da  $\beta$ -oxidação, além disso, existe a suspeita de uma maior ativação de vias paralelas a via glicolítica para a síntese de purinas através da ativação das vias das pentoses, inibindo de forma indireta a degradação de glicose, a utilização destas fontes energéticas se mantém constantes durante toda a fase intermediária do desenvolvimento (Thuy *et al.*, 2014; Vicent *et al.*, 2015).

Entretanto no final do desenvolvimento, próximo a eclosão dos ovos há uma nova mudança metabólica em que as fontes glicídicas como a glicose e o glicogênio que foram resintetizados voltam a ser utilizadas para auxiliar no final do desenvolvimento e fornecer a energia necessária para que a larva consiga sair do ovo (Huang *et al.*, 2013).

Em carrapatos, em especial *R. microplus*, as variações metabólicas são evidenciadas no metabolismo de glicogênio. Inicialmente a reserva de glicogênio é mobilizada para apoiar as demandas de crescimento embrionário. Observa-se que nos primeiros estágios do desenvolvimento ocorre degradação de glicogênio e produção de glicose-6-fosfato (G6P) que é observada pela redução da quantidade de glicogênio. Durante o avanço dos processos de desenvolvimento há a degradação de proteínas e a ativação da gliconeogênese, em que se observa a re-síntese de glicogênio e acúmulo deste polímero que será reutilizado posteriormente (Campos *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2007) (Figura 6).

Estas variações da glicose 6 fosfato sugerem que haveria duas fases distintas da utilização da G6P: na primeira fase, antes do blastoderma celular, G6P é direcionada para a glicólise e via das pentoses e na segunda fase, depois da formação do blastoderma celular, em que a G6P é direcionada somente para a glicólise (Figura 6). Esta hipótese é suportada pelo padrão de atividade da hexoquinase (primeira enzima da glicólise) durante a embriogênese *R. microplus* (Campos *et al.*, 2006). Dessa forma, sugere-se a presença de um mecanismo para permitir não só a captação de glicose após estágios iniciais, mas também do glicogênio acumulado durante a embriogênese.



**Figura 6** Mudanças das vias metabólicas utilizadas pelo *R. (b) microplus* durante a embriogênese..

Fonte: Moraes *et al.*, 2007

Abreu e colaboradores (2009), após estudo da resposta à insulina em linhagem de células embrionárias BME26 de *R. microplus*, demonstraram que este hormônio foi capaz de estimular o acúmulo de glicogênio via PI3K/AKT. Ao utilizarem inibidores de PI3K a expressão relativa da sua subunidade reguladora (P85) foi reduzida durante a embriogênese (Abreu *et al.*, 2009). A variação das fontes energéticas utilizadas pelo embrião de carrapato demonstram a versatilidade e o poder adaptativo dos embriões frente a diversidades (Moraes *et al.*, 2007).

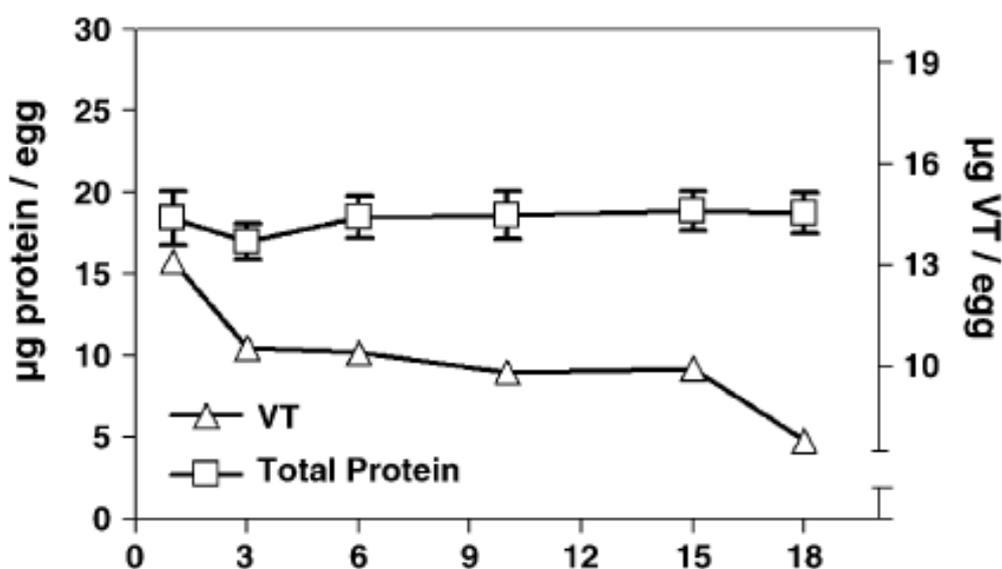
Além de possuir importantes funções no controle de crescimento e desenvolvimento de diversas espécies a insulina é classicamente descrita a maior ativação do metabolismo da glicose e também de outras vias como via das pentoses fosfato para a síntese de DNA e replicação celular (Ceddia *et al.*, 2003). A insulina também atua como um regulador de crescimento, reprodução e senescência (Riehle e Brown, 2007). A sinalização celular por insulina, ou peptídeos com funções semelhantes à insulina, foi observado em outros organismos como *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (Brogiolo *et al.*, 2001; Gregoire *et al.*, 1998). Em *D. melanogaster* tem sido mostrado que insulina humana estimula a proliferação e a diferenciação neural embrionária (Pimentel *et al.*, 1996).

Em *Aedes aegypti* foi verificado um fenômeno semelhante também após a formação de blastoderma celular (5ª hora de desenvolvimento) com o aumento da atividade de G6PDH (Vital *et al.*, 2010). Entretanto uma das diferenças encontradas entre o metabolismo energético do *R. microplus* e o *A. aegypti* é que no mosquito a síntese de glicogênio ocorre no início da embriogênese, possivelmente devido a baixa atividade da enzima Glicogênio Sintase Kinase 3 $\beta$  (GSK3) que regula negativamente a síntese de glicogênio pela inibição da Glicogênio sintase, mas após a retração da banda germinal (24 horas de desenvolvimento) foi observado que a redução na quantidade de glicogênio concomitantemente com o aumento da expressão de GSK3 $\beta$  e maior atividade de PEPCK (Vital *et al.*, 2010).

Outra espécie de mosquito em que se observou uma dinâmica de glicogênio durante a embriogênese foi o *Aedes fluviatilis* nesta espécie há o aumento dos níveis de glicogênio na embriogênese mais tardio, após 30 horas de

desenvolvimento, entretanto estas variações do conteúdo de glicogênio também acompanham as mudanças nas expressões da GSK3 $\beta$  (da Rocha *et al.*, 2014).

Para auxiliar na obtenção de energia através da degradação de aminoácidos (gliconeogênese) que ocorre durante o desenvolvimento embrionário há um conjunto de proteínas já descritas para esta finalidade, as vitelinas (Logullo *et al.*, 2009). Moraes e colaboradores (2007) descreveram a dinâmica dos carboidratos e proteínas na embriogênese do *R. microplus* mostrando que além de corresponder cerca de 60% das proteínas totais do embrião parte das vitelinas ou sua precursora, vitelogenina são mantidas após a eclosão das larvas (Figura 7) o que auxilia no aporte energético e sobrevivência da larva até a mesma encontrar um hospedeiro (Logullo *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2006).



**Figura 7.** Mobilização de proteínas (vitelina) do embrião de *R. microplus* durante seu desenvolvimento até sua eclosão.

Fonte: Campos *et al.*, 2006

Em estudos realizados com cultura de células embrionárias de *R. microplus* BME 26, foram observados que diferentes níveis de glicose no meio de cultura geram alterações nos níveis de transcrição de genes envolvidos com o metabolismo de carboidratos na célula embrionária. Genes como Glicogênio Sintase (GS), Glicogênio Sintase Quinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) possuem uma regulação mútua em resposta ao tratamento com altos níveis de glicose. Além disso, foi encontrado um perfil de transcrição semelhante em enzimas gliconeogênicas como

fosfoenolpiruvato-carboxiquinase (PEPCK) e a glicose-6 fosfatase (GP), de forma que tanto as enzimas da gliconeogênese como as glicolíticas foram reguladas de forma coordenada, mostrando perfis de transcrição semelhantes com o envolvimento direto da GSK3 nesta regulação (Silva *et al.*, 2015).

### 3. JUSTIFICATIVA

O controle dos mosquitos é uma importante questão na economia e na saúde pública mundial, pois os mosquitos transmitem um grande número de agentes patogênicos. O *Aedes aegypti* é o principal vetor do vírus da Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela.

Segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2016, as doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti* totalizaram 1.468.037 de casos notificados, até o mês de abril de 2017 houve um total de 164.302 de casos notificados, sendo 204 óbitos. Ainda no ano de 2016 a dengue teve a incidência de Dengue de 507 casos para cada 100 mil habitantes, da Chikungunya de 20,9 casos/100 mil habitantes e a Zika 82,8/100 mil habitantes. Em abril de 2017 houve cerca de 60 casos graves de dengue só no Estado do Rio de Janeiro.

Classicamente os eventos que envolvem a organogênese, diferenciação celular e morfologia na embriogênese são atribuídos à mudanças na transcrição gênica e gradientes de determinadas proteínas. Neste trabalho foi mostrado que há também uma importante correlação entre a morfogênese na embriogênese com o metabolismo energético em especial de glicogênio em *Aedes aegypti*.

Desta forma processos adaptativos envolvidos com o metabolismo energético com mudança nas demandas energéticas e de seus substratos são essenciais para o desenvolvimento embrionário, através da regulação de eventos como a proliferação celular e diferenciação celular. Dentro deste contexto, a maior compreensão dos processos que envolvem a morfogênese e os processos metabólicos que ocorrem durante a embriogênese do *Aedes aegypti* pode ser uma importante ferramenta para a obtenção de novos alvos para o controle do mosquito assim como o desenvolvimento de novas estratégias e inseticidas para o controle do mosquito.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral:**

Investigar a correlação do metabolismo de glicogênio com os processos de morfogênese e embriogênese do mosquito *Aedes aegypti*.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Estabelecer um protocolo de permeabilização de ovos do *A. aegypti* para o silenciamento gênico;
- Avaliar o efeito do silenciamento gênico em ovos na primeira hora de desenvolvimento de *A. aegypti*;
- Avaliar a influência e a regulação do metabolismo de glicogênio após o silenciamento da Glicogênio Sintase na embriogênese dos ovos de fêmeas silenciadas para GS;
- Avaliar as mudanças morfológicas dos embriões do mosquito após silenciamento gênico da GS

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Mosquito *Aedes aegypti*.

Os mosquitos utilizados neste estudo foram obtidos a partir de uma colônia no laboratório da Universidade Estadual do Norte Fluminense na cidade de Campos dos Goytacazes. A colônia é mantida a temperatura de 28°C em ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Os estágios de larva e pupa são mantidos em potes cobertos contendo 3 litros de água filtrada com uma população de aproximadamente 500 larvas por porte, sendo alimentadas como ração de gatos moída na água (Wiskas® carne).

Já as fêmeas adultas são mantidas em gaiolas com solução com sacarose (10%) *ad libitum* nos três primeiros dias após ecdíase da fase de pupa para a fase adulta, após este tempo são alimentadas com sangue de camundongo através da alimentação natural durante sessenta minutos ou até seu total ingurgitamento não ultrapassando o tempo máximo de noventa minutos, depois de 72 horas as fêmeas foram submetidas à ovipostura sincronizada. Para a oviposição sincronizada as fêmeas foram adormecidas em gelo e transferidas para placas de petri tampadas contendo papel filtro, após as fêmeas despertarem este papel foi umedecido e as mesmas foram colocadas em ambiente escuro a 28°C e 80% de umidade por 60 minutos. Após o término do tempo as fêmeas foram novamente transferidas para a gaiola e os ovos postos no papel filtro foram coletados e submetidos aos experimentos.

Para os ensaios de microinjeção das fêmeas foram microinjetadas 120 fêmeas com o volume de 32 nL em duas concentrações 230 e 400 ng/  $\mu$ L de dsGS ou dsGFP, 24 horas após a ecdíase de pupa para adulto, após 48 horas foi realizada a alimentação natural com sangue de camundongos.

### 5.2 Ensaios de eclosão dos ovos

Para os ensaios de eclosão dos ovos, os embriões de 0-72 horas de desenvolvimento, contidos em placas de petri com água destilada e foram contados. Após a contagem a água foi retirada e substituída por uma solução contendo extrato de levedura (0,01%) diluída em água destilada e mantidas a temperatura de 28°C

durante 24 horas. Após este tempo foram contadas as larvas de cada poço e foi contabilizado o percentual de eclosão em cada poço para cada um dos tratamentos utilizados tanto para os ensaios de silenciamento quanto para verificação de entrada de marcadores.

### **5.3 Quantificação de glicogênio**

Foi utilizado o kit comercial Glucosax<sup>®</sup> (Dolex, Brasil) para o ensaio de conteúdo de glicogênio. Para isso as larvas no estágio L1 foram obtidas seguindo o protocolo descrito no item 5.1 depois da contagem das larvas estas foram recolhidas com o auxílio de uma ponteira cortada. Posteriormente, as larvas foram maceradas utilizando um micropistilo em microtubos de 1,5 mL. Esta maceração foi em presença de 500 µL de tampão acetato (200 mM; pH = 4,8) durante aproximadamente 15 minutos. Depois de macerado este material seguiu a metodologia de quantificação de glicogênio semelhante ao utilizado por Moraes *et al.*, 2007.

As amostras maceradas foram incubadas com 1 unidade  $\alpha$ -amiloglucosidase em tampão acetato (200 mM , pH 4,8) durante 4 h a 40 °C em banho seco (Dryblock - Fisatom<sup>®</sup>). Posteriormente, adicionou-se tampão fosfato (100 mM , pH 7,4) e foi realizada a leitura da absorbância em um leitor de placa de ELISA (Multiskan Go Thermo scientific<sup>®</sup>) em 510 nm de comprimento de onda. Após a quantidade de glicogênio ter sido determinada foi realizada a razão da quantidade de glicogênio total pelo número de larvas coletadas anteriormente. Após esta razão foi realizado o cálculo de normalização para porcentagem dos valores em que foi considerado o valor médio das leituras de cada repetição biológica, para estes cálculos foi considerado o valor de 100 % para o controle (GFP). Os resultados são apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes.

### **5.4 Síntese da dupla fita de RNA (dsRNA)**

Síntese de dsRNA para GFP e GS foi realizada usando o sistema de RNAi T7 RiboMAX<sup>™</sup> Express (Promega, EUA), os parâmetros utilizados foram estabelecidos conforme o fabricante. A validação das dsRNAs para o gene alvo foi realizado pelos

programas: dsCheck (<http://dscheck.rnai.jp/>) e DEQOR ([http://deqor.mpi-cbg.de/deqor\\_new/input.html](http://deqor.mpi-cbg.de/deqor_new/input.html)). Aproximadamente 2 µg do produto de PCR foram purificadas e utilizadas para a transcrição *in vitro* de dsRNA como descrito previamente por Fabres e colaboradores (2009). O controle negativo (gene não-relacionado) foi utilizado o gene GFP (Green Fluorescent Protein), é uma proteína produzida pelo cnidário *Aequorea victoria* (gentilmente doado pelo MSc Tae kwon Kim, Texas AM University). Os dsRNAs produzidos neste trabalho possuem os seguintes tamanhos: dsGFP (635 pb) e dsGS (798 pb).

### **5.5 Permeabilização dos ovos de *Aedes aegypti***

Os ovos utilizados neste experimento foram embriões na primeira hora de desenvolvimento (até uma hora após ovipostura), estes mesmos embriões foram transferidos do papel filtro para placas de 12 poços estéreis utilizando pinceis, estas placas continham uma solução de 1% de clorito de sódio (Vetec, Sigma Aldrich) dissolvido em água destilada por 24 horas, para cada grupo foram utilizados de  $120 \pm 20$  de ovos. Para os ensaios de silenciamento gênico, estes ovos foram expostos a esta solução (1% de clorito) com concentrações de 100, 200 e 400 ng/µL de dsGS ou dsGFP durante 24 horas. Após este tempo estas soluções foram retiradas e substituídas por 500 µL de água destilada por 48 horas.

### **5.6 Extração de RNA para validação do silenciamento por RNAi**

Para esta validação foi realizado a extração de RNA total a partir de 40 mg de ovos com 48 horas de desenvolvimento utilizando Reagente Trizol® (Invitrogen, USA). Dois microgramas de RNA total foram transcritos para cDNA utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Invitrogen, USA).

## 5.7 Análise da expressão relativa por RT-qPCR

As análises de expressão relativa foram realizadas utilizando o equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, USA) e para as curvas de calibração foram realizadas diluições seriadas do cDNA (de 400 a 25 ng). Os valores de eficiência para cada gene estudado acima de 85% foram aceitos para o cálculo de expressão relativa. Para todas as reações foram padronizadas quantidades de cDNA de 200ng.

Os *primers* específicos utilizados como gene *housekeeping* a proteína ribossomal 49 (RP49) utilizado por Gentile *et al.*, (2005) para verificar a expressão relativa por PCR em tempo real e para o gene da Glicogênio Sintase AaGS (número de acesso XM\_001648654.2). A expressão relativa foi determinada utilizando os valores de Ct de cada corrida no Software Tool-REST (Pfaffj *et al.*, 2001). Como controle para o experimento foi utilizado uma dupla fita não relacionada GFP.

## 5.8 Análise morfológica de ovos e larvas de *A aegypti* por microscopia

Para a verificação da maior permeabilização dos ovos ao clorito de sódio (1%) foram obtidos ovos de 1h de desenvolvimento. Estes ovos foram expostos á uma solução contendo clorito de sódio 1% por 24 horas. Para confirmação do processo de permeabilização foram utilizados os marcadores DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 0,1µg/mL, PI (Iodeto de Propídeo) 1µg/mL, Hoechst (H33334) 1 µg/µL e o Laranja de Acridina (LA) 100 µg/mL. Para análise da entrada dos marcadores nos embriões foi utilizado o microscópio de fluorescência (Microscópio Axio Imager A2 - Carl Zeiss).

Para análise das imagens dos embriões marcados com Laranja de Acridina foi utilizado o microscópio confocal LSM 710 Zeiss Axio Observer (Carl Zeiss AG). As imagens foram coletadas utilizando o filtro de 488 nm laser para excitação e os filtros de 350 a 700 nm para emissão. Para retirar a possibilidade do falso positivo pela fluorescência endógena os parâmetros de intensidade do laser e tempo de exposição foram realizados como os ovos controles que não foram submetidos à digestão química com clorito de sódio.

Para a análise morfológica de embriões silenciados para o gene da GS foi realizada a clarificação dos ovos de *Aedes aegypti* após 48 horas de desenvolvimento utilizando uma solução de clarificação descrita por Trpiš (1970) utilizando campo claro e DIC (Differential Interference Contrast) no microscópio (Axio Imager A2, Carl Zeiss)

### **5.9 Análise Estatística**

Para os testes que envolviam somente duas amostras (controle e tratamento) foi utilizado o Teste t Student não-paramétrico ( $p < 0,05$ ) para determinar se as diferenças entre os tratamentos foram significativas. Para os ensaios que envolviam um número maior de amostras (acima de duas) foi utilizado como teste estatístico de análise de variância (ANOVA) e pós teste Tukey ( $p < 0,05$ ). O programa utilizado para a confecção de todos os gráficos e análise estatística foi o GraphPad Prism 5.03 Software (GraphPad Software, Inc.).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Permeabilização dos ovos de *Aedes aegypti*

Para a realização do silenciamento gênico houve a necessidade de se testarem diferentes soluções já conhecidas como eficientes para aumentar a permeabilização através da digestão química do córion. Para isso, testou-se em embriões de 1h de desenvolvimento as soluções de hipoclorito nas concentrações de (0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20%) e isopropanol (10, 20, 40, 80 e 100%) estes compostos haviam sido utilizados em outros trabalhos de permeabilização. Observou-se que ambas foram nocivas ao embrião, pois a taxa de eclosão destes ovos tratados não ultrapassou 50% nas menores concentrações de hipoclorito de sódio (0,1%). De posse destes resultados, foram testadas outras soluções até iniciarmos os testes com a solução de clorito de sódio, nas concentrações de 10 e 1%. Na tabela 1 são mostradas as taxas de eclosão dos tratamentos com hipoclorito e isopropanol.

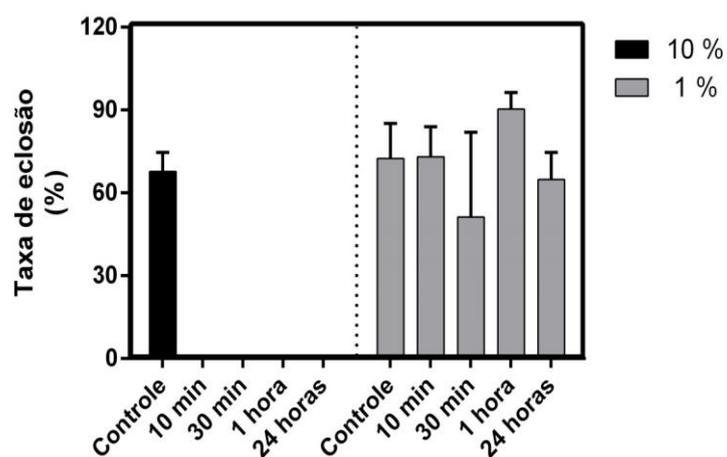
Em embriões de 1h de desenvolvimento na presença de clorito de sódio (1%), observamos que a taxa de eclosão (Figura 8A) e de esclerotização (Figura 8B) não foi alterada após 24 horas de exposição.

**Tabela 1 Os tratamentos com isopropanol e hipoclorito em diferentes concentrações interferiram na taxa de eclosão dos embriões.** Todas as concentrações apresentaram uma queda na taxa de eclosão de no mínimo 50%. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes

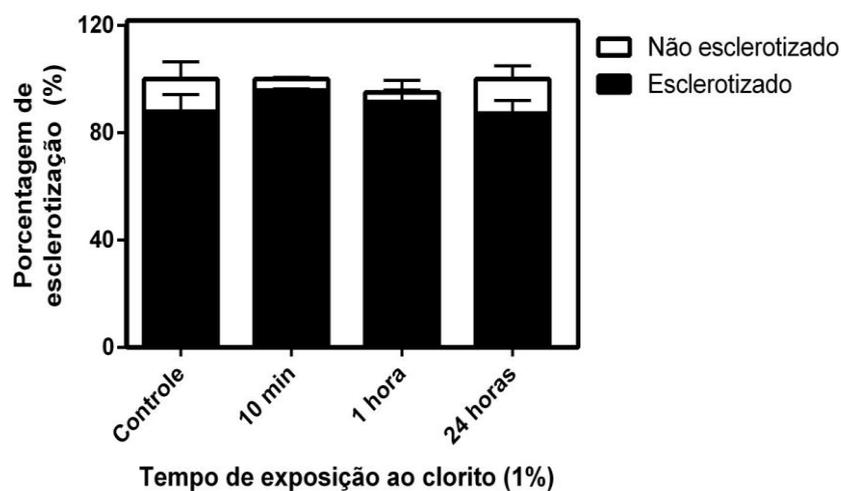
Amostras	Taxa de eclosão
Controle	64,73 ± 20,22
Isopropanol 100%	0
Isopropanol 80%	14,51 ± 5,40
Isopropanol 40%	25,02 ± 10,13
Isopropanol 20%	1,17 ± 1,29
Isopropanol 10%	18,28 ± 10,86
Controle	60,63 ± 11,63

Hipoclorito 20%	0
Hipoclorito 10%	0
Hipoclorito 5%	0
Hipoclorito 1%	0
Hipoclorito 0,5%	0
Hipoclorito 0,1 %	46,93 ± 3,62

A

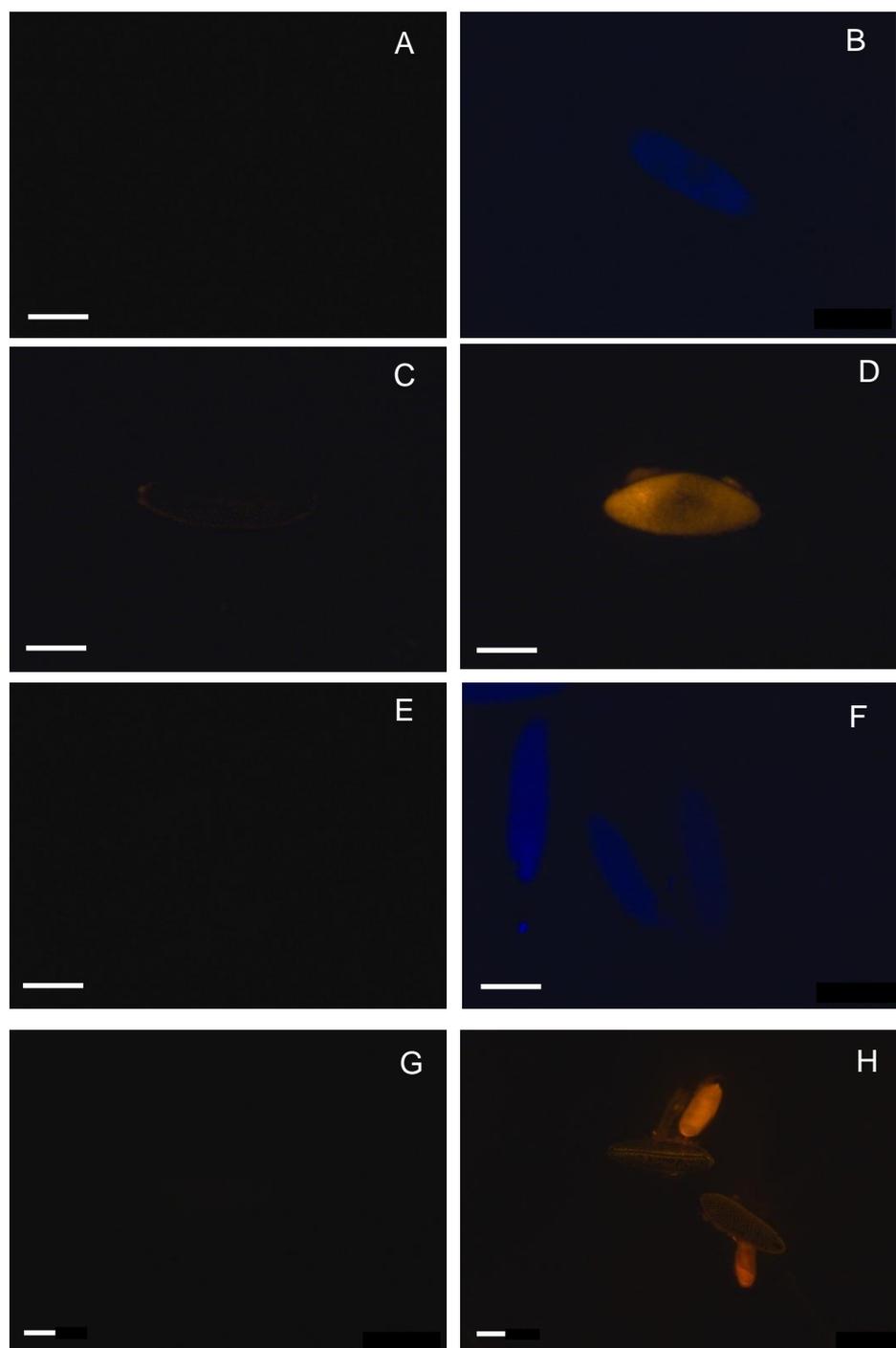


B



**Figura 8** A digestão química com o clorito de sódio não afetou a taxa de eclosão nem o processo de esclerotização dos ovos. Em A = taxa de eclosão em diferentes concentrações de clorito (10% e 1%) após diferentes tempos de incubação. Em B = taxa de esclerotização dos ovos em diferentes tempos de exposição ao clorito de sódio a 1%. (10 min, 1 hora e 24 horas). Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA utilizando o pós-teste Tukey ( $p < 0.05$ ). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes.

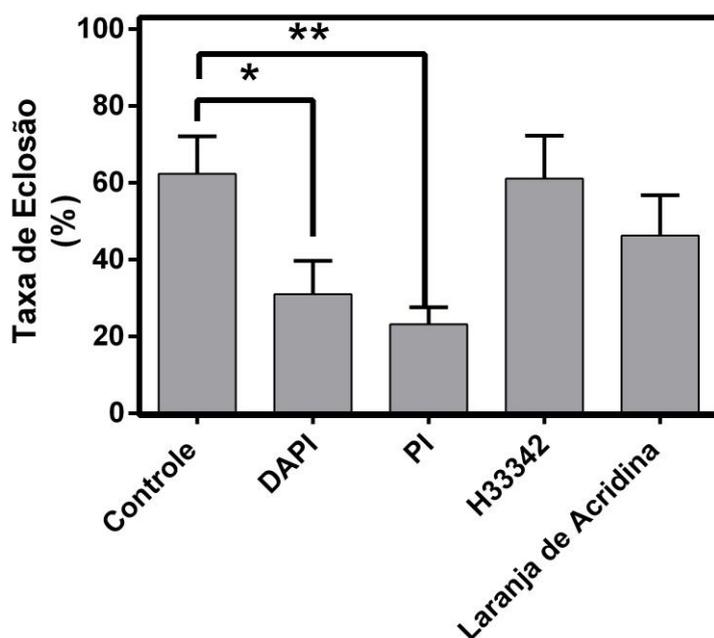
Como o clorito de sódio mostrou-se mais eficiente e menos danoso para os embriões, este foi escolhido para os experimentos de digestão do córion utilizando embriões de 0 - 1h de desenvolvimento. A permeabilidade do ovo foi analisada utilizando quatro marcadores: o DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (0,1µg/mL), PI (Iodeto de Propídeo) (1µg/mL), Hoechst (H33334) (1 µg/µL) e o Laranja de Acridina (LA) (100 µg/mL). Nas concentrações testadas de cada marcador foi possível observar o aumento da permeabilidade 24 horas após o tratamento com clorito de sódio (1%) em comparação com o controle (Figura 9).



**Figura 9** A digestão química com clorito de sódio promoveu a permeabilização dos ovos de *A. aegypti*. Em A=controle (água destilada) com DAPI e B= tratado com 1% de clorito com DAPI; em C=controle (água destilada) com PI, D = tratado com 1% de clorito com PI; E = controle (água destilada) com Hoechst, F = tratado com 1% de clorito com Hoechst; G = controle (água destilada) com Laranja de Acridina e H tratado com 1% de clorito com Laranja de Acridina. A barra de escala: 200 $\mu$ m.

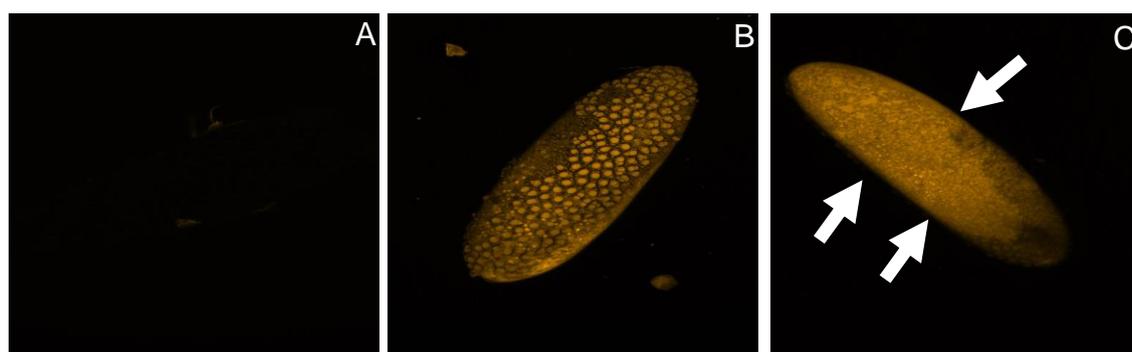
Após o monitoramento da permeabilidade dos marcadores para o interior dos embriões foi avaliado se estes mesmos marcadores também podiam influenciar

no desenvolvimento embrionário. Para isso foi avaliada a taxa de eclosão dos ovos tratados com estes marcadores na primeira hora do desenvolvimento tendo uma exposição de 24 horas. Foi observado que as taxa de eclosão dos ovos tratados com DAPI e PI apresentaram uma redução de aproximadamente, 70% e 75%, respectivamente. No entanto, os ovos tratados com Hoechst (H3334) e Laranja de Acridina não apresentou diferença estatística em relação ao controle (Figura 10).



**Figura 10** Os marcadores Hoechst e Laranja de Acridina não interferiram na taxa de eclosão. Os marcadores DAPI e PI apresentaram as maiores interferências na taxa de eclosão, sendo considerados os mais tóxicos. Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA e pós-teste Tukey ( $p < 0.05$ ). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes.

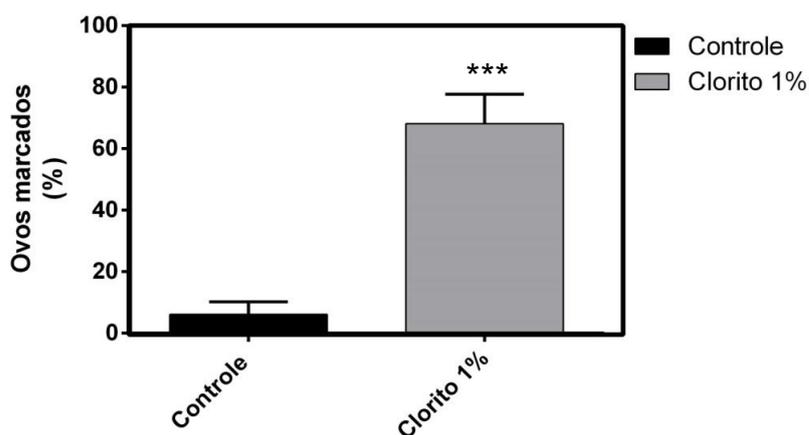
Após a avaliação da taxa de eclosão foi adotado o uso do marcador Laranja de Acridina para a visualização da maior permeabilização dos ovos tratados com clorito, sendo realizadas microscopias em confocal para determinar se o tratamento com clorito de sódio promovia mudanças no córion ou em outras estruturas extra embrionárias.



Laranja de Acridina	-	+	+
Clorito 1%	-	-	+

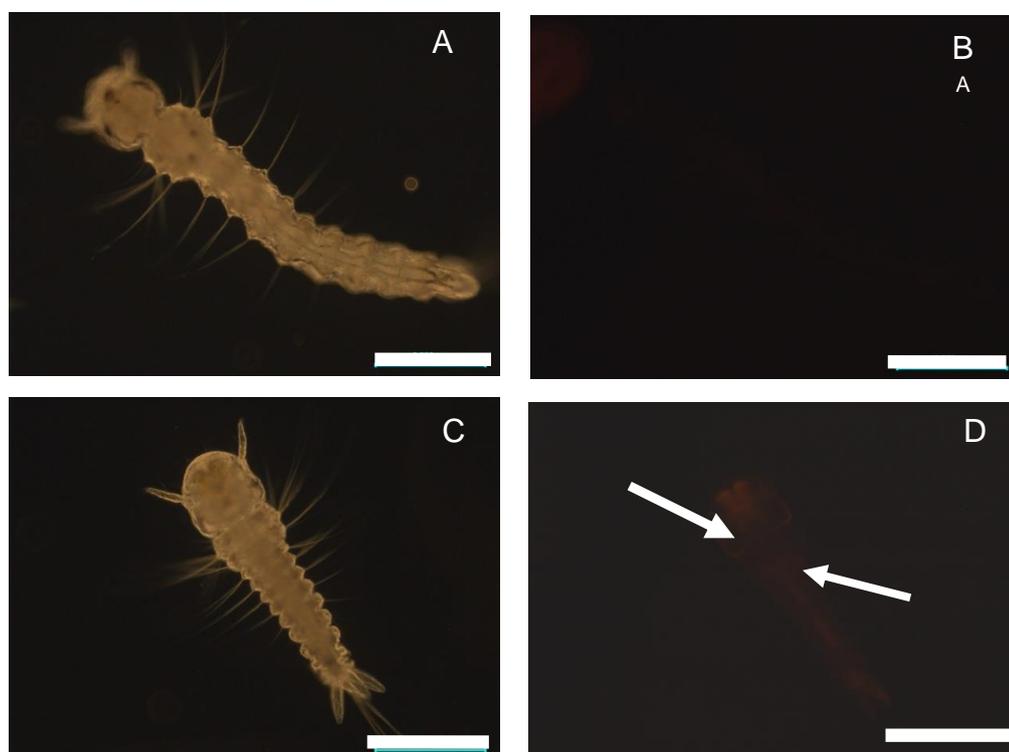
**Figura 11** A digestão química do córion com clorito de sódio (1%) por 24 horas permitiu a entrada do marcador Laranja de Acridina. Foi utilizada a concentração de 400 µg/mL de Laranja de Acridina em embriões na primeira hora de desenvolvimento. Em A = Ovos controle sem Laranja de Acridina e sem Clorito 1%; B = ovos tratados com Laranja de Acridina e sem clorito; C = ovos tratados com Laranja de Acridina e clorito 1%. Nas setas brancas estão mostrando as mudanças no exocórien provocados pela digestão química.

Observou-se que após a digestão química com o clorito de sódio (1%) o exocórien havia perdido sua característica morfológica tornando-se liso de forma que a marcação foi observada possivelmente na serosa e embrião (Figura 11C). Foi realizada a contagem dos ovos marcados com laranja de acridina na presença ou ausência de clorito de sódio (1%). Foi possível observar uma maior quantidade de ovos marcados (um aumento de 7 vezes) quando estes foram expostos à solução com clorito de sódio 1% (Figura 12).



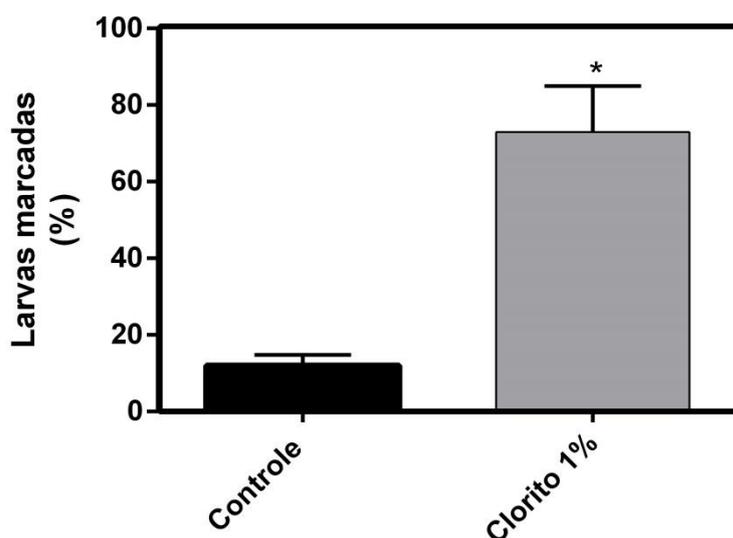
**Figura 12** A digestão com clorito de sódio permitiu a maior quantidade de ovos marcados com Laranja de Acridina (LA). Na barra preta os ovos tratados com LA e água destilada e na barra cinza os ovos tratados com Clorito 1% e LA. O teste estatístico utilizado foi *t-student* ( $p < 0.05$ ). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes.

O Laranja de Acridina é um marcador que não apresenta especificidade de marcação para células embrionárias de forma que pode ser utilizado para marcação de diversos compartimentos celulares, inclusive podendo mudar de coloração dependendo do pH do compartimento em que se encontra (Campos *et al.*, 2006). Durante o desenvolvimento embrionário surgem novas camadas extraembrionárias dotadas de células como a serosa e o endocóxon (Resende *et al.*, 2008). A fim de determinar se as marcações encontradas nos ovos eram, realmente, derivadas do embrião, foi realizado o ensaio de digestão química com clorito de sódio (1%) dos ovos em presença de uma solução contendo Laranja de Acridina por 24 horas. Para isso acompanhou-se o desenvolvimento até a eclosão destes ovos em larvas no estágio L1. Em que foi observado que a marcação com Laranja de Acridina permaneceu após a eclosão das larvas, mostrando que a digestão com clorito permitiu que o marcador chegasse ao embrião nas primeiras horas de desenvolvimento.



**Figura 13** A marcação com Laranja de Acridina permaneceu após a eclosão das larvas. Em A e B larvas vinda de ovos tratados com água e expostos ao LA por 24 horas; Em C e D larvas vinda dos ovos tratados com clorito 1% e expostos ao LA por 24 horas. Nas setas brancas locais de marcação na Larva de LA. Na barra de escala= 2000  $\mu$ m.

Além disso, foi observado que esta maior permeabilidade levou a um aumento de 7 vezes de larvas marcadas em comparação com o controle (sem clorito) (Figura 14).



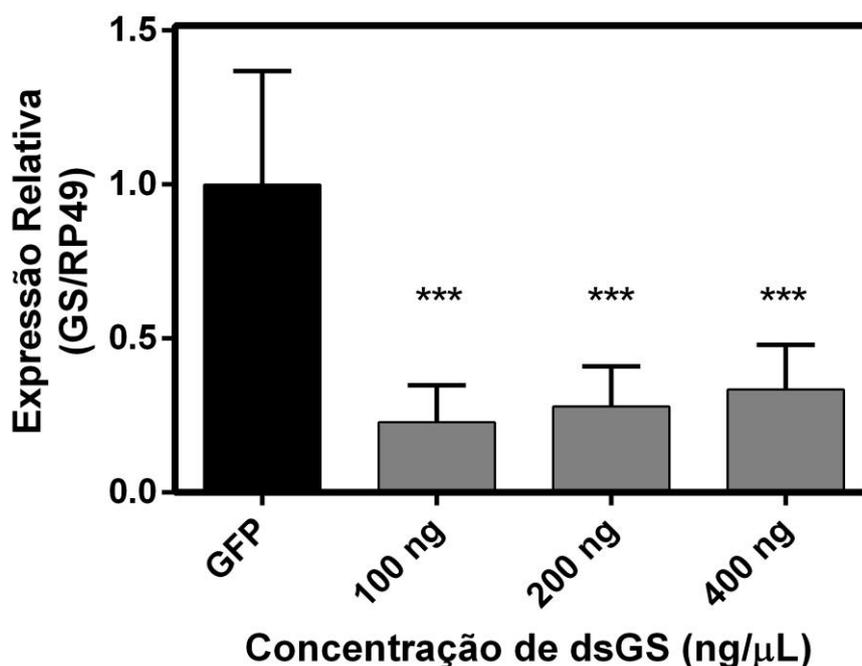
**Figura 14** A digestão química com clorito 1% por 24 horas permitiu a maior quantidade de larvas marcadas com Laranja de Acridina (LA). Na barra preta o percentual das larvas marcadas oriundas dos ovos tratados com LA e água destilada e na barra cinza o percentual das larvas marcadas oriundas de ovos tratados com Clorito 1% e LA. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes. O teste estatístico utilizado foi *t-student* ( $p < 0.05$ ).

De posse dos resultados obtidos até o momento, foi possível verificar uma maior permeabilização dos ovos com o tratamento com clorito 1%. Dessa forma, para dar continuidade aos experimentos de silenciamento gênico por meio da imersão de dsRNA e a digestão química durante 24 horas. Estes experimentos foram realizados com intuito de analisar a influência do metabolismo de carboidratos, em especial, do glicogênio nos processos de embriogênese. Para isso foi realizado o silenciamento gênico da enzima glicogênio sintase, por ser uma enzima classicamente descrita como exclusiva do metabolismo de glicogênio.

Os embriões foram submetidos a digestão química com clorito de sódio (1%) na presença de diferentes concentrações de dupla fita de glicogênio sintase (dsGS) para determinar quais das concentrações apresentava o maior taxa de silenciamento no embrião de *Aedes aegypti*.

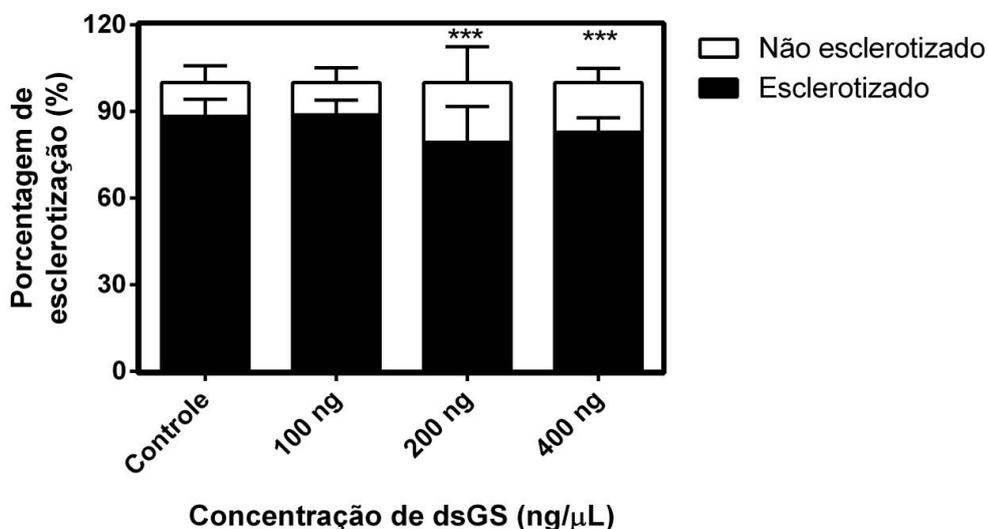
## 6.2 Silenciamento Genico da GS nos ovos de *Aedes aegypti*

Após a análise em PCR em tempo real dos ovos de 0-48h de desenvolvimento foi possível observar um silenciamento gênico de 60% a 70% nas amostras tratadas com dsGS (Figura 15).

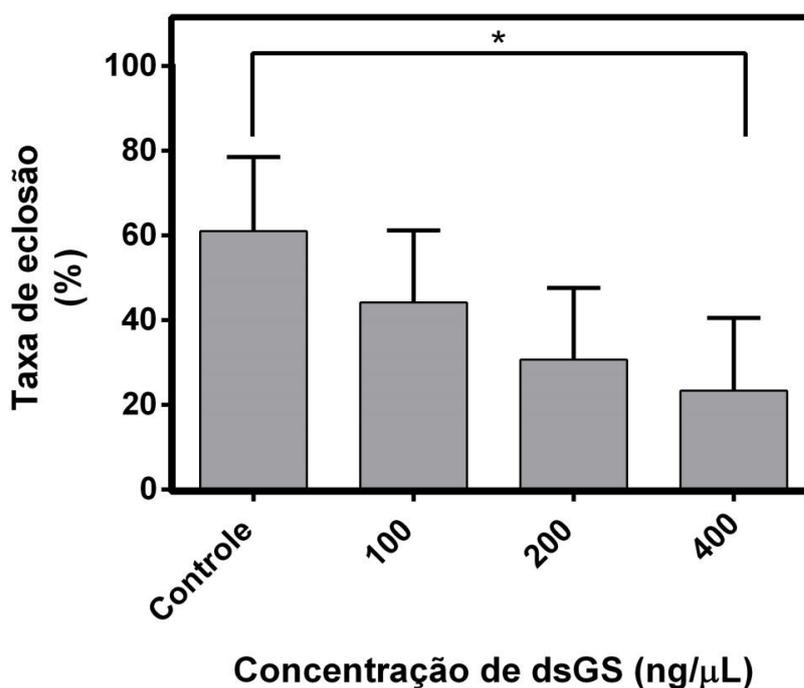


**Figura 15** Nas concentrações testadas de dsGS foi verificado o silenciamento gênico de aproximadamente 70%. A barra preta representa o controle com GFP. Nas barras em cinza as expressões relativas das larvas vindas de ovos tratados com diversas concentrações de dsGS (100, 200 e 400 ng/μL). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes. Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA e pós-teste Tukey ( $p < 0.05$ ), todos os tratamentos apresentaram diferença estatística em comparação com o controle.

Os primeiros parâmetros observados foram a taxa de esclerotização dos ovos e a taxa de eclosão após o tratamento com diferentes concentrações de dsGS. A taxa de esclerotização dos ovos tratados com as concentrações de 200 e 400 ng/μL, apresentaram reduções de aproximadamente 10% em comparação ao controle, entretanto não foi observada diferença nos ovos tratados com 100 ng/μL (Figura 16). Já com relação a taxa de eclosão dos ovos foi observada uma redução de 40% quando o ovo foi tratado com 400 ng/μL de dsGS (Figura 17).



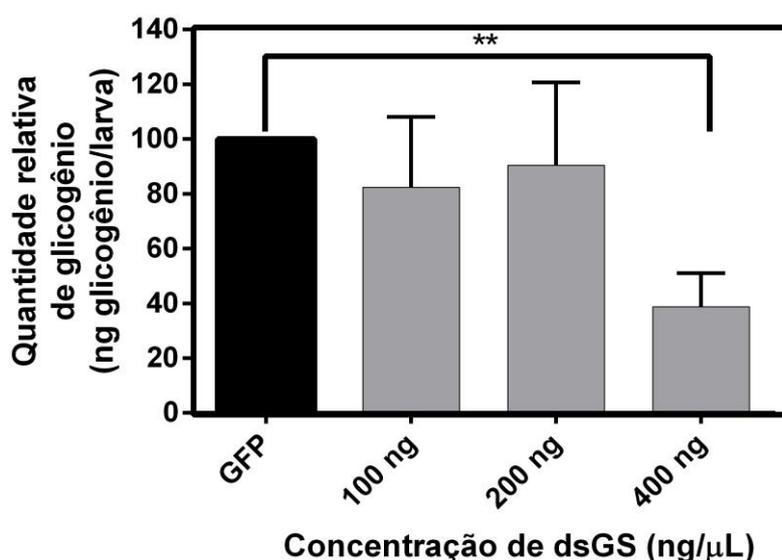
**Figura 16** As concentrações de 200 e 400 ng/μL de dupla fita afetaram a esclerotização dos ovos de *A. aegypti*. As barras em preto representam as porcentagens dos ovos esclerotizados, na barra branca dos ovos não esclerotizados foram testadas diferentes concentrações de dupla fita de RNA 100, 200 e 400 ng/μL os ovos foram expostos por 24 horas a dsGS. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes. Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA e pós-teste Tukey ( $p < 0.05$ ).



**Figura 17** O silenciamento gênico de glicogênio sintase afetou a taxa de eclosão. Foram testadas diferentes concentrações de dupla fita de RNA 100, 200 e 400 ng/μL para silenciamento gênico os ovos expostos por 24 horas a dsGS. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA e pós-teste Tukey ( $p < 0.05$ ).

Além da taxa de eclosão foi observado o conteúdo de glicogênio nas larvas tratadas com diferentes concentrações de dsGS por 24 horas. Foi observado que os

ovos tratados com 400 ng/ $\mu$ L apresentaram uma maior redução do conteúdo de glicogênio (aprox. 60%), de forma que não houve diferença nas concentrações menores após ter sido observado que o silenciamento foi realizado, foi observado se havia mudanças no teor de glicogênio das larvas (L1) (Figura 18).

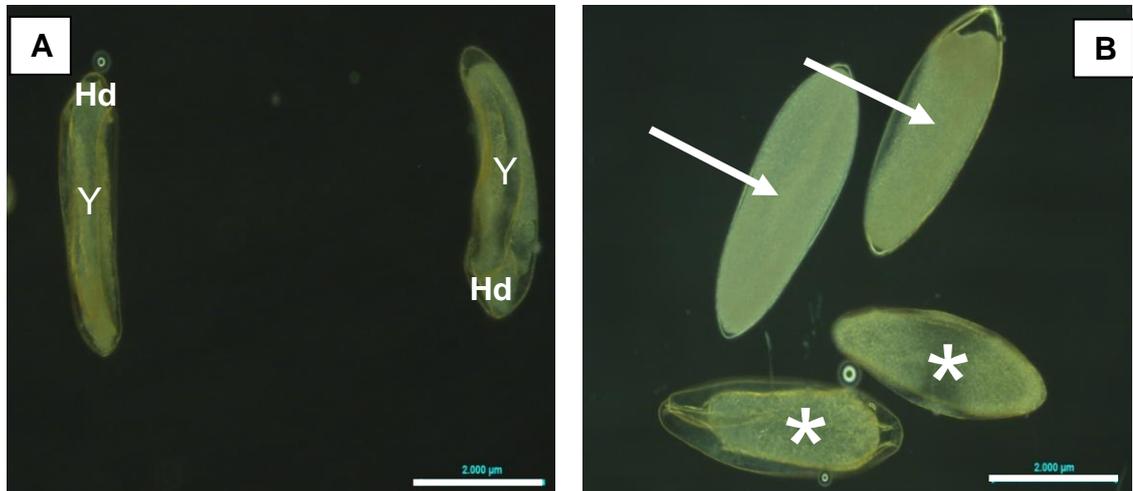


**Figura 18** O silenciamento da GS levou a redução na quantidade de glicogênio nas larvas. A barra preta representa o controle com GFP para os cálculos considerado 100%. Nas barras em cinza as quantidades relativas de glicogênio das larvas vindas de ovos tratados com diversas concentrações de dsGS (100, 200 e 400 ng/ $\mu$ L). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes. Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA e pós-teste Tukey ( $p < 0.05$ ).

De posse da confirmação do silenciamento e da redução dos níveis de glicogênio nas larvas, foi feita uma análise da morfologia dos ovos silenciados na concentração de 400 ng/ $\mu$ L. A concentração de 400 ng/ $\mu$ L foi utilizada, pois apresentou uma maior redução na quantidade de glicogênio. Para esta análise foi realizado a clarificação e fixação dos ovos utilizando a solução de Trpis de 0-48h de desenvolvimento.

O silenciamento gênico da GS além de afetar a viabilidade dos embriões e reduzir as reservas energéticas (redução do glicogênio) também promoveu mudanças morfológicas do embrião que foram percebidas após a clarificação e fixação dos ovos de 0-48h de desenvolvimento. As principais mudanças observadas estão relacionadas com a falta de compartimentalização do embrião, ausência de

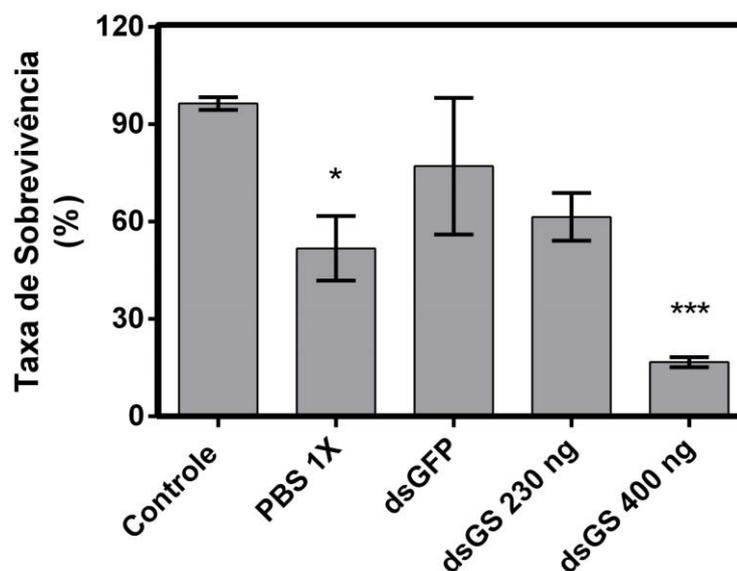
vitelo e falta de polarização do embrião. Na figura 19 estão representadas estas mudanças morfológicas.



**Figura 19 O silenciamento da GS no embrião também inviabilizou o desenvolvimento de estruturas.** Em A embriões clarificados com 48 horas de desenvolvimento tratados com 400 ng/µL de dsGFP na primeira hora de desenvolvimento. Em B embriões clarificados com 48 horas de desenvolvimento tratados com 400 ng/µL de dsGS na primeira hora de desenvolvimento. As setas brancas mostram embriões com ausência de vitelo e o asterisco os ovos sem segmentação do embrião. Y = vitelo; Hd= cabeça. Na barra de escala= 2.000 µm

### 6.3 Silenciamento da GS em fêmeas de *A. aegypti* através de microinjeção

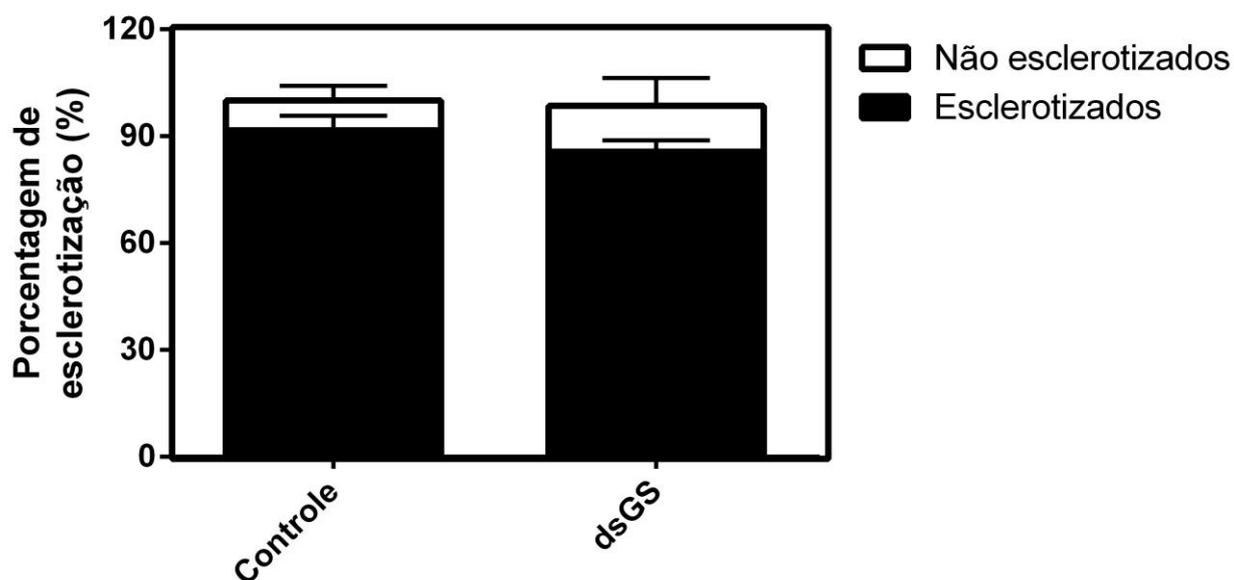
A fim de avaliar se provocar mudanças no metabolismo de glicogênio também interferiram na eclosão e segmentação do embrião nos estágios iniciais da embriogênese, quando há a transferência de nutrientes e transcritos da fêmea para a sua prole também foi realizado o silenciamento da GS em fêmeas. Para isso foi realizada microinjeção com dsGS de fêmeas 48 horas antes da alimentação sanguínea. Na Figura 20 está representada a taxa de sobrevivência das fêmeas após a microinjeção com dsGS.



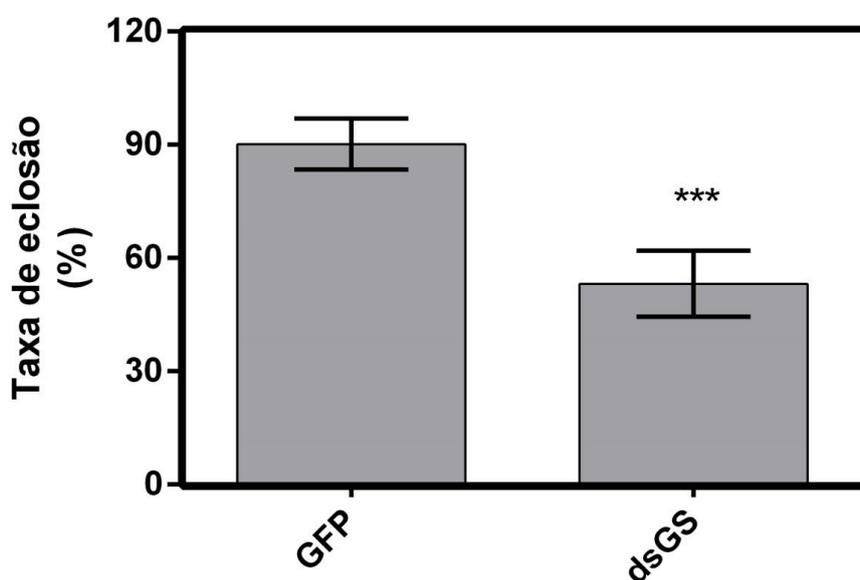
**Figura 20** Nos adultos microinjetados com a concentração de 400 ng/ $\mu$ L de dsGS tiveram a sobrevivência afetada. O controle utilizado neste experimento foram os mosquitos adormecidos em baixa temperatura, a concentração de dsGFP utilizadas foi 400 ng/ $\mu$ L. Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA e pós-teste Tukey ( $p < 0.05$ ).

Foi observado que houve diferença estatística na sobrevivência de fêmeas microinjetadas com a concentração de 400 ng/ $\mu$ L, para evitar que a mortalidade das fêmeas microinjetadas interfeririam em algum parâmetro que seria analisado nas fêmeas foi escolhido a concentração de 230 ng/ $\mu$ L de dsRNA. Foram analisados os parâmetros de esclerotização dos ovos, eclosão e quantidade de glicogênio.

A taxa de esclerotização dos ovos de fêmeas microinjetadas com 230 ng/ $\mu$ L não apresentou diferença estatística em comparação ao controle (Figura 21). Entretanto a taxa de eclosão das larvas vindas das fêmeas microinjetadas com dsGS tiveram uma redução de 30% em comparação com o controle (fêmeas microinjetadas com dsGFP) (Figura 21).

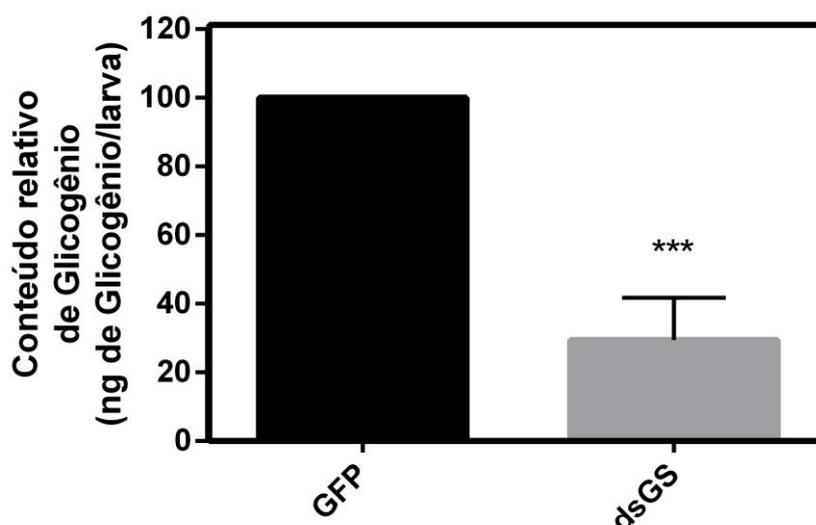


**Figura 21** O silenciamento de GS nas fêmeas não afetou a taxa de esclerotização e melanização dos ovos. As barras em preto representam as porcentagens dos ovos esclerotizados, na barra branca dos ovos não esclerotizados, na coluna do controle os ovos vindo de fêmeas microinjetados com GFP e na coluna dsGS os ovos de fêmeas microinjetadas na concentração de dsGS (230 ng/μL). Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA e pós-teste Tukey ( $p < 0.05$ ).



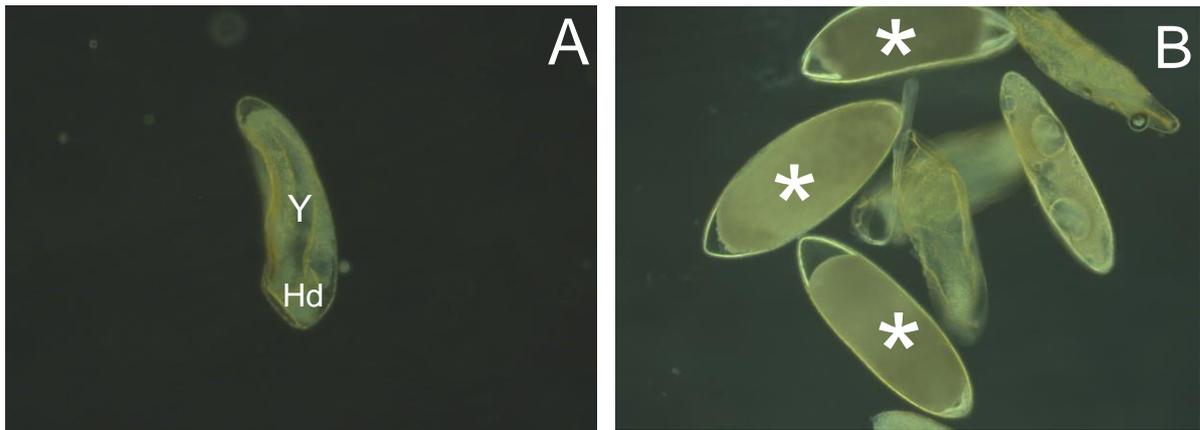
**Figura 22** O silenciamento gênico da GS levou a queda da taxa de eclosão. A barra preta a taxa de eclosão das larvas vindas de fêmeas microinjetadas com dsGFP (230 ng/μL). Na barra em cinza a taxa de eclosão das larvas vindas de ovos de fêmeas microinjetadas na concentração de dsGS (230 ng/μL). O teste estatístico utilizado foi *t-student* ( $p < 0.05$ ).

Após a avaliação da taxa de eclosão e esclerotização dos ovos silenciados foi feita a verificação da quantidade de glicogênio para determinar se o silenciamento gênico da fêmea foi capaz de modular o metabolismo de glicogênio, reduzindo a síntese de glicogênio nas larvas (L1). Observou-se que o silenciamento foi capaz de reduzir, aproximadamente, 65% do glicogênio contido nas larvas com comparação com o controle (Figura 23).



**Figura 23** O silenciamento da GS levou a redução na quantidade de glicogênio na larva. A barra preta representa a quantidade de glicogênio das larvas vindas de fêmeas microinjetadas com o dsGFP (230 ng/ $\mu$ L) para os cálculos foi considerado 100%. Na barra em cinza a quantidade relativa de glicogênio das larvas vindas de ovos de fêmeas microinjetadas vindas de ovos de fêmeas microinjetadas na concentração de dsGS (230 ng/ $\mu$ L).O teste estatístico utilizado foi *t-student* ( $p < 0.05$ ).

Além de observar as mudanças no metabolismo de glicogênio, foi observado se haveria alguma mudança morfológica provocada pelo silenciamento da GS nas fêmeas, para isso foi realizada a fixação e clarificação dos ovos de *A. aegypti* com 48 horas de desenvolvimento.



**Figura 24 O silenciamento da GS também inviabilizou o desenvolvimento dos embriões.** Em A embriões clarificados com 48 horas de desenvolvimento de fêmeas microinjetadas 230 ng/ $\mu$ L de dsGFP na primeira hora de desenvolvimento. Em B embriões clarificados com 48 horas de desenvolvimento de fêmeas microinjetadas com 230 ng/ $\mu$ L de dsGS, Os asteriscos nos ovos mostram a ausência de segmentação do embrião. Y = vitelo; Hd= cabeça. Na barra de escala= 2.000  $\mu$ m

O silenciamento gênico da GS em fêmeas além de afetar a viabilidade dos embriões e reduzir as reservas energéticas através da redução do glicogênio (Figuras 22 e 23) também promoveu mudanças morfológicas do embrião, as principais mudanças estão relacionadas com a falta de compartimentalização do embrião, assim como ausência de vitelo e de polarização do embrião, na figura 24 estão representada estas mudanças morfológicas.

## 7. DISCUSSÃO

Para o estudo de todos estes fenômenos embrionários foi necessário desenvolver uma técnica capaz de permeabilizar os ovos, atuando em suas membranas extraembrionárias, em especial, no córion. O córion é a primeira barreira existente nos ovos, sendo a única barreira nas primeiras horas do desenvolvimento embrionário do *A. aegypti* (Valle *et al* 1999; Faull e Willians, 2015). Esta camada é além de controlar a entrada de substâncias para o interior no ovo, também promove outras mudanças como mudança de cor (ovos claros para escuros) e de aspectos físicos como maior rigidez (Rezende *et al.*, 2008).

Quanto ao tratamento com o clorito de sódio (Figuras 8, 9 e 10) teve êxito, pela diferentes dissoluções do sal em solução aquosa, se decompõem em ácido hipocloroso ( $\text{HClO}_2$ ) e uma base hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) que realiza a hidrólise das ligações N-acetamido da quitina (Tsigos *et al.*, 2000). Estas reações permitem a maior permeabilização dos ovos, mas somente na concentração de 1% foi possível realizar esta permeabilização sem afetar a taxa de eclosão e a esclerotização dos ovos (Figuras 8, 9 e 10). O processo de esclerotização e melanização dos ovos são processos que envolvem além da gênese de novas camadas extraembrionárias como também mudanças estruturais no próprio córion com mudanças na ligação das proteínas (*crosslink*) e de cor provocada pela atividade da uma enzima fenol-oxidase (Clements, 2000; Li *et al.*, 2006).

Como observado anteriormente, a maior sensibilidade do *Aedes aegypti* as soluções de hipoclorito e propanol (Tabela 1) pode estar relacionado com a própria estratégia de vida do parasita, pois diferentes de outras espécies, assim que o ovo é posto pela fêmea possui somente uma camada, o córion. Esta estratégia é adotada por permitir a maior entrada de água no início da embriogênese e depois da sétima hora esta maior permeabilidade é reduzida até a sétima hora (28°C) em que há a formação de cutícula da serosa tornando o ovo impermeável a entrada e saída de água (Farnesi *et al.*, 2015). Em outras espécies, como a mosca *Drosophila melanogaster* e o carrapato *Rhicephalus microplus* o ovo quando é posto já apresentam algumas barreiras que promovem desde uma proteção física até mesmo

evitando a dissecação como, por exemplo, uma camada de cera assim que oviposto pelo órgão de gené em carrapatos (Booth *et al.*, 1992).

Além disso, a maior sensibilidade do *A. aegypti* nesta etapa do desenvolvimento pode também estar relacionada com a falta de compartimentalização do embrião, pois nesta fase (primeira hora) não uma delimitação clara dos limites de cada célula ou só há uma fina membrana as limitando é quando ocorre as primeiras divisões celulares (Trips *et al.*, 1973), a presença de um componente tóxico pode rapidamente se disseminar por todo o embrião inviabilizando o desenvolvimento embrionário. No caso do hipoclorito sua decomposição gera clorato de sódio e cloreto de sódio ou ácido hipocloroso, dependendo das concentrações a dissolução é mais rápida, quanto maior a concentração de hipoclorito maior é a sua dissolução. Além disso, em um ambiente com pH próximo a 7,0 difunde-se facilmente no meio intracelular, realizando mudanças no potencial de oxidação-redução da célula causada pela presença do ácido hipocloroso (Tsigos *et al.*, 2000).

A baixa toxicidade do Laranja de Acridina, já havia sido observada por Martins (2015) em adultos *Aedes aegypti* em seu trabalho de caracterização de glândulas salivares em que se observaram diferentes padrões e graus de intensidade de marcação conforme o sexo. Além disso a autora observou que o marcador também foi transferido para a saliva, sendo detectada a marcação na pele no hospedeiro durante as fases da alimentação (Martins, 2015).

O tratamento com o clorito de sódio foi capaz de permitir a maior permeabilização dos ovos para entrega do marcador Laranja de Acridina e a dsGS levando ao silenciamento gênico em ovos, desta forma esta técnica permite um estudo de função gênica no embrião mais específico, pois retira a possibilidade do fenômeno observado ser algum tipo de efeito inespecífico ou herdado da fêmea silenciada ao invés do silenciamento do embrião. Além da imersão há variadas formas de entrega da dsRNA incluindo microinjeção, adicionado na alimentação, eletroporação ou em associação com vírus, bactérias e lipoproteínas (Kocan *et al.*, 2011; de La Fuente *et al.*, 2007; Fire *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 2015). A escolha da imersão foi feita pelo maior facilidade de manuseio do material além de permitir uma análise visual do ovo durante a fase de esclerotização.

A taxa esclerotização e melanização dos ovos influenciam diretamente no equilíbrio da água do ovo e sobrevivência do embrião. Como foi observado por Farnesi e colaboradores (2017) que espécies em que os ovos apresentam pouca coloração havia uma menor resistência a perda de água e a outros tipos de estresses de forma que o aumento da pigmentação auxilia na sobrevivência de insetos e que em alguns casos pode ser importante fator que define aptidão das espécies em suas estratégias de vida (Farnesi *et al.*, 2017).

Já com relação a taxa de eclosão dos ovos foi observada uma redução de 40% na eclosão das larvas quando o ovo foi tratado com 400 ng/ $\mu$ L de dsGS. Esta redução na taxa de eclosão já foi observada em outros trabalhos envolvendo o silenciamento de genes envolvidos com o metabolismo energético em embriões de outras espécies como no carrapato *Rhipicephalus (boophilus) microplus* foram silenciados os genes codificantes para AKT (Kinase B) e GSK (glicogênio Sintase Kinase) em que foi observado uma redução de aproximadamente de 30% em ambos os genes (Fabres *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2015), em *Rhodinus prolixus* quando houve o silenciamento da acil-CoA sintetase de cadeia longa (long-chain acyl-CoA synthetases) enzima envolvida com o metabolismo de lipídeos foi observada uma queda de até 100% da taxa de eclosão (Bezerra *et al.*, 2016).

Em alguns artrópodes foi demonstrado que o metabolismo embrionário possui uma grande dependência de reservas energéticas, incluindo o glicogênio para a manutenção do desenvolvimento do embrião (Fagotto, 1990; Moraes *et al.*, 2007, Campos *et al.*, 2006, Logullo *et al.*, 2009; Vital *et al.*, 2010). Um dado marcante neste sentido foi descrito durante a ovogênese em *Drosophila melanogaster* onde foi observado um acúmulo de glicogênio nos folículos ovarianos maduros, sendo o glicogênio a forma de armazenamento de energia predominante (Gutzeit *et al.*, 1993).

Ainda em *D. melanogaster*, foi descrito que nos estágios iniciais da embriogênese, o metabolismo de proteínas e glicogênio possuem uma correlação negativa, pois os níveis de proteína total diminuem à medida que os níveis de glicogênio aumentam (Shiomi e Kitazume, 1956; Medina & Vallejo, 1989; Gutzeit *et al.*, 1993). De forma a corroborar estes dados, outros estudos mostraram que os níveis de glicogênio possuem uma variação durante a embriogênese, ocorrendo um

aumento dos níveis de glicogênio nos estágios tardios da embriogênese de *D. melanogaster* (Yamazaki e Nusse, 2002; Yamazaki e Yanagawa, 2003).

No carrapato *R. microplus* ocorre a re-síntese de glicogênio no final da embriogênese estando relacionada com a ativação de via gliconeogênica para suprir as demandas energéticas, tendo como principal substrato energético os aminoácidos (Moraes *et al.*, 2007; Logullo *et al.*, 2009; Fabres *et al.*, 2010). A enzima Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), responsável por catalisar o passo inicial da gliconeogênese, está sendo ativada de acordo com a formação dos embriões deste carrapato (Ballard e Oliver 1965; Ballard *et al.* 1967). Quando os níveis de glicose estão baixos, principalmente, pelo alto consumo nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário as atividades das enzimas gliconeogênicas estão aumentadas. Neste momento, a atividade e transcrição de PEPCK estão aumentadas (Chakravarty *et al.*, 2005).

Já em *Aedes aegypti* a dinâmica, atividade e regulação da PEPCK durante a embriogênese apresenta algumas diferenças em comparação a outros modelos, pois no início do desenvolvimento a atividade de PEPCK é baixa aumentando sua intensidade durante o curso da embriogênese alcançando níveis elevados até a eclosão (Vital *et al.*, 2010). Através da comparação com bancos de dados de genômica, transcriptômica e proteômica relacionada à biologia do desenvolvimento de diferentes espécies como *Danio rerio* e *Drosophila melanogaster*, foi observado que há uma grande variedade de estratégias metabólicas durante o desenvolvimento embrionário. Em *D. melanogaster* foi possível determinar o momento do desenvolvimento embrionário houve uma mudança no perfil metabólico através da análise do perfil da quantidade de metabólitos (Thuy *et al.*, 2014).

Ainda dentro desta linha de raciocínio, Vastag e colaboradores (2011) propuseram que em *Xenopus laevis* antes da gastrulação (início da embriogênese), os aminoácidos são a principal fonte de energia. Por outro lado, trabalhos realizados em *D. melanogaster* mostraram que alguns metabólitos como a frutose 6 fosfato, gliceroldeído 3 fosfato, fumarato e aspartato relacionados à glicólise e o ciclo de Krebs desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento embrionário (Vastag *et al.*, 2011; Thuy *et al.*, 2014). No presente trabalho observamos que a redução do teor de glicogênio nos ovos afetou a eclosão (figura 16) e a morfologia

do embrião (figura 19) durante o seu desenvolvimento afetando importantes eventos como a segmentação e compartimentalização do embrião observado através da clarificação e fixação dos ovos. O mesmo fenômeno foi observado quando foi realizado o silenciamento gênico das fêmeas através da microinjeção de dsRNA como redução dos teores de glicogênio, ausência de segmentação do embrião e queda da taxa de eclosão (figuras 22, 23 e 24) de forma que estes dados apontam para um importante papel do glicogênio na embriogênese e organogênese.

Utilizando espectrometria de massa Xavier e colaboradores (2018) mostraram que durante a ovogênese do *R. microplus* há uma dinâmica de diferentes substratos nos estágios finais da maturação do ovócito como de ácidos graxos, aminoácidos, eletrólitos, purinas e pirimidinas. Além disso, neste mesmo período também foram observados o aumento de proteínas envolvidas com o metabolismo energético como a vitelogenina e de metabólitos como a glicose, glicogênio e piruvato sugerindo uma relação direta entre o metabolismo de carboidratos e o desenvolvimento de oócitos (Xavier *et al.*, 2018). Sabe-se que o acúmulo de glicogênio pode servir como um mecanismo compensatório para a manutenção de energia utilizada para a produção de ovos (Xavier *et al.*, 2018).

Em outros trabalhos envolvendo o silenciamento gênico de genes envolvidos com o metabolismo energético tem-se observado efeitos semelhantes. Fabres e colaboradores (2010) mostraram que o silenciamento de GSK em fêmeas de *R. microplus* levou a redução da taxa de eclosão e a mudanças morfológicas no embrião como alteração do eixo ventral induzindo a duplicação do eixo dorsal (Fabres *et al.*, 2009). Em *Drosophila melanogaster* a GSK ou *zw3/shaggy* (gene homólogo a GSK em algumas espécies de insetos) possui um papel essencial no desenvolvimento do coração e do mesoderma (Park *et al.*, 1998), em *Xenopus laevis* a GSK auxilia na regulação da diferenciação neural (Marcus *et al.*, 1998). Em *Rhodnius prolixus* quando houve o silenciamento da acil-CoA sintetase de cadeia longa além da redução da taxa de eclosão as poucas larvas eclodidas apresentavam alterações morfológicas como tamanho reduzido, coloração anormal dos ovos e larvas, má formação de abdômen e tórax (Bezerra *et al.*, 2016).

Em outros modelos como o besouro *Tribolium castaneum* Fraga e colaboradores (2013) mostraram que os ovos silenciados para GSK3 possuíam um

maior teor de glicogênio, redução do número de ovos postos assim como redução da taxa de eclosão. Em trabalhos mais recentes, o silenciamento de GSK em *Rhodnius prolixus* levou ao aparecimento dos mesmos fenômenos além de mudanças morfológicas no embrião em comparação com o controle e em fêmeas adultas ao comprometimento da ovogênese (Mury *et al.*, 2016).

O desenvolvimento embrionário é uma fase já conhecida pelas rápidas e drásticas mudanças vividas pelo embrião durante a sua formação, uma destas mudanças é a dinâmica metabólica provocada pelas mudanças de substratos energéticos, por conseguinte, vias metabólicas principalmente, em vias relacionadas ao metabolismo de glicogênio. Neste trabalho foi mostrado que o silenciamento gênico da enzima GS e a sua correlação com os eventos morfológicos e da viabilidade dos embriões. Mostrando que o metabolismo de carboidratos além de uma importante fonte de energia atua como um importante fator para a organogênese e desenvolvimento embrionário do mosquito *Aedes aegypti*.

## 8. CONCLUSÃO

- Neste trabalho foi estabelecido um protocolo de permeabilização de ovos do mosquito *A. aegypti* nas primeiras horas de desenvolvimento para o silenciamento gênico com o tratamento prévio com uma solução de clorito de sódio a 1%;
- O silenciamento gênico da enzima Glicogênio Sintase em ovos de 0-1h de desenvolvimento de *A. aegypti* levou a redução da taxa de eclosão e da concentração de glicogênio;
- O silenciamento da Glicogênio Sintase em fêmeas adultas também promoveu uma diminuição da taxa de eclosão e concentração de glicogênio;
- Foi mostrado que este silenciamento também causou as mudanças morfológicas dos embriões como ausências de segmentação.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu L., A. Fabres, E. Esteves, A. Masuda, I. Da Silva Vaz Jr., S. Daffre, C. Logullo, Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway, *Comp.Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 153 (2009) 185–190.
- Ballard F., Hanson R., Leveille G. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *J. Biol. Chem.*;242:2746–2750, 1967.
- Ballard Fj, Oliver It. Carbohydrate metabolism in liver from foetal and neonatal sheep. *Biochem J. Abr*;95:191–200, 1965.
- Barata, E. F., Costa, A.I.P., Chiaravalloti Neto, F., Barta, J.M.S. & Natal, D. População de *Aedes aegypti* (L.) em área endêmica de dengue, no Sudeste do Brasil. *Rev. Saúde Pública.* 2001; 35: 237-242.
- Bate, M., Marquardt, W.C. The development of *Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1993.
- Bates, M. The natural History of Mosquitoes. New York: The Macmillan Company; 1949. 379 pp.
- Benelli G., Mehlhorn H. Declining malaria, rising dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control *Parasitol. Res.*, 115, 2016: pp. 1747-1754.
- Bezerra MA, Eric L. Klett E.L., De Paula I.F., Rosalind I.B.R.A. Coleman K, Gondim C.. Long-chain acyl-CoA synthetase 2 knockdown leads to decreased fatty acid oxidation in fat body and reduced reproductive capacity in the insect *Rhodnius prolixus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1861: 650–662, 2016.
- Biedler JK, Hu W, Tae H, Tu Z. Identification of Early Zygotic Genes in the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* and Discovery of a Motif Involved in Early Zygotic Genome Activation. *PLoS ONE* 7(3): e33933, 2012.
- Booth T.F. Observations on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Exp Appl Acarol* 14:137–149, 1992.
- Borror JD e Delong DM. Introdução ao estudo dos insetos, Edgar Blucher, São Paulo, 1988.
- Bowman LR, Donegan S, McCall PJ Is Dengue Vector Control Deficient in Effectiveness or Evidence?: Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016: 10(3): e0004551. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004551>
- Broggiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Zoologisches Institut, Universität Zürich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057, Zürich, Switzerland. Curr Biol*;11(4):213-21, 2001.
- Campos E.; Moraes J.; Façanha A.R., Moreira E; Valle D.; Abreu L.; Manso P.P.A.; Nascimento A.; Pelajo-Machado M.; Lenzi H.; Masuda a.; Silva I. V.J.; Logullo C. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Veterinary Parasitology*.138, 349–357, 2006.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Dengue Fever, 2005. Disponível em: <[www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm)>. Acesso em: 15 dez. 2017.

Chakravarty S1, Herkenham M. Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J Neurosci.* Feb 16;25(7):1788-96, 2005.

Chapman R.F. *The insects: Structure and function.* Cambridge University Press, 1998.

Chiaromonte, F., Weber RJ, Roskin KM, Diekhans M, Kent WJ, Haussler D. The share of human genomic DNA under selection estimated from human-mouse genomic alignments. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, v. 68, 2003: p.245-54.

CHRISTOPHERS, S. *Aedes aegypti (L.) The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure.* Cambridge, UK: The University Press; 1960;739 p.

Clements, A.N. *The biology of mosquitoes. Sensory reception and behavior.* (2nd Edition). CABI Publishing, New York. 2000; 740 p.

Cobert, P.S & Chadee, D.D. An improved method for detecting substrate preferences shown by mosquitoes that exhibit 'skip oviposition'. *Phys Entomol*, 1993; 18:114-118.

Consoli, R.A.G.B. & Lourenço-De-Oliveira, R. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.* Rio de Janeiro, Fiocruz, 1994; 228p.

Devlin TM. *Manual de Bioquímica com correlações clínicas.* 4a. ed. São Paulo: Editora Edgarg Blucher Ltda; 1998.

Edman, J.D, Scott, T.W, Costero, A, Morrison, A.C., Harrington, L. C., Clark, G. G. *Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites.* *J Med Entomol* 1998; 35:578-583.

Eiras, A.E, Resende, M.C e Silva, I.M. Proposta de validação da MosquiTRAP® e do Sistema de Monitoramento Inteligente (MI-Dengue): uma nova tecnologia para o monitoramento e geração de índices de vigilância entomológica para o Programa Nacional de Controle do dengue. Relatório técnico submetido r SVSMS, 2006; 177p.

Eiras, A.E. *Culicídeos.* pp. 355-367 In: *Parasitologia Humana.* Eds. D.P.Neves, A.L. de Melo, O. Genaro & P.M. Linardi. 11th Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, Brazil, 2005. 494 p.

Fabres A, De Andrade CP, Guizzo M, Sorgine MHF, Paiva-Silva GDO, Masuda A, et al. Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. *Parasitol.* 2010; 137(10): 1537–46.

Fagotto F. *Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres.* *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* 14(4): 217-235, 1990.

Farnesi L.C, Vargas H.C.M, Valle D., Rezende G.L. Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Oct 30;11(10):e0006063.

Farnesi LC, Martins AJ, Valle D e Rezende GL. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009; 104: 124-126.

Farnesi LC, Menna-Barreto RF, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J Insect Physiol.* Dec;83:43-52, 2015.

Faull KJ, Williams CR. Intraspecific variation in desiccation survival time of *Aedes aegypti* (L.) mosquito eggs of Australian origin. *J Vector Ecol.* 2015 Dec;40(2):292-300. doi: 10.1111/jvec.12167.

Fay, R.W. & Eliason, D.A. A preferred oviposition site as a surveillance method for *Aedes aegypti*. *Mosq. News.* 1966; 26: 531-535.

Fay, R.W. & Perry, A.S. Laboratory studies of oviposition preferences of *Aedes aegypti*. *Mosq. News.* 1965; 25:276-281.

Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, Fernandez-Novell JM, Garcia-Rocha M, de la Iglesia N, et al. Control of glycogen deposition. *FEBS Lett* 2003;546(1):127-32.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998; 391(6669): 806–11. doi: 10.1038/35888 PMID: 9486653

Forattini OP. *Culicidologia Médica*. Volume 2. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

Fraga, A., Ribeiro, L., Lobato, M., Santos, V., Silva, J. R., Gomes, H., da Cunha Moraes, J. L., de Souza Menezes, J., de Oliveira, C. J., Campos, E. e da Fonseca, R. N. Glycogen and glucose metabolism are essential for early embryonic development of the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *PLoS ONE* 8, e65125, 2013.

Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 2001;359:1–16. [PubMed: 11563964]

Gentile C, Lima JB, Peixoto AA. Isolation of a fragment homologous to the rp49 constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Oct;100(6):545-7, 2005.

Gilbert S. F., Raunio A. M. *Embryology: Constructing the Organism*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 1997. Apostol, B.L, Black, W.C Iii, Reiter, P, Miller B.R. Use of randomly amplified polymorphic DNA amplified by polymerase chain reaction markers to estimate the number of *Aedes aegypti* families at oviposition sites in San Juan, Puerto Rico. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51:89-97.

Gillett J. D., Philip S. Corbet & Haddow A. J. Observations on the Oviposition-Cycle of *Aedes* (*Stegomyia*) *Aegypti* (Linnaeus), VI, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 55:4, 427-431, 1961.

Goltsev Y, Rezende GL, Vranizan K, Lanzaro G, Valle D e Levine M. Developmental and evolutionary basis for drought tolerance of the *Anopheles gambiae* embryo. *Dev Biol* 330: 462-70, 2009.

Goode N1, Hughes K, Woodgett JR, Parker PJ. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *J Biol Chem.*25;267(24):16878-82, 1992.

Gregoire F M, Cynthia M. SMAS e Hei Sook Sul. Understanding Adipocyte Differentiation *Physiol Rev* January, vol. 78 no. 3 783-809, 1998.

Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 2001;65:391–426. [PubMed: 11527574]

Gutzeit H. O., Seydlitz-Kurzbach E.V. e Neuschroer R. How *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) Follicles Become Spatially Organized and Obtain Their Ovoid Shape. *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* Vol. 22, Nos 2-4. pp. 335-347, 1993.

Harrington, L.C, Edman, J.D, Scott, T.W. Why do females *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *J. Med. Entomol.* 2001; 38(3): 411-422.

Huang S.; Xu F; Lam S. H., Gong Z. e Ong C. N. Metabolomics of developing zebrafish embryos using gas chromatography - and liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol. BioSyst.* 9, 1372-1380, 2013.

Jarjal MS. Toxic effect of garlic extracts on the eggs of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a scanning electron microscopic study. *J Med Entomol*, 2001 May;38(3):446-50.

Kocan KM, Blouin E, de la Fuente J. RNA interference in ticks. *J Vis Exp.* 2011; 47: 2474. doi: 10.3791/2474 PMID: 21304465

Lee M.T, Bonneau A.R, Giraldez A.J. Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:581-613

Lesort M, Jope RS, Johnson GV. Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase. *J Neurochem.* Feb;72(2):576-84, 1999.

Li J.S. e Li J. Major chorion proteins and their crosslinking during chorion hardening in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Bioch Mol Biol*, 2006: 36: 954-964.

Logullo C., Witola W.H., Andrade C., Abreu L., Gomes J., da Silva Vaz Jr. I., Imamura S., Konnai S., Ohashi K. & Onuma M. Expression and activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology.* 161(3-4): 261-269, 2009.

Marcus EA, Kintner C, Harris W. The role of GSK3beta in regulating neuronal differentiation in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Neurosci.* Nov;12(4-5):269-80, 1998.

Martins K.A. Comportamento alimentar de dípteros vetores de patógenos e estudo da expressão de proteínas de choque térmico (HSP 70 e 90) de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Phlebotominae) frente a diferentes estresses relacionados à hematofagia. (Tese) Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

Masharani UK, J.H. Pancreatic Hormones & Diabetes Mellitus. In: Greenspan FG, Basic and endocrinology. New York; 2001. p. 623.

Medina M, Vallejo CG. An aspartic proteinase in *Drosophila*: maternal origin and yolk localization. *Int J Dev Biol.* Jun;33(2):313-5, 1989.

Mogi, M. & Mokry, J. Distribution of *Wyeomyia smithii* (Diptera: Culicidae) eggs in pitcher plants in Newfoundland, Canada. *Trop. Med.* 1980; 22:1-12.

Monnerat AT, Machado MP, Vale BS, Soares MJ, Lima JB, Lenzi HL e Valle D. *Anopheles albitarsis* embryogenesis: morphological identification of major events. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 589-96, 2002.

Monnerat AT, Soares MJ, Lima JB, Rosa-Freitas MG e Valle D. *Anopheles albitarsis* eggs: ultrastructural analysis of chorion layers after permeabilization. *J Insect Physiol*, 1999: 45: 915-922.

Moraes J.; Galina A.; Alvarenga P.H.; Rezende G.L., Masuda A., Da Silva Vaz Jr I.; Logullo C. Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146, 528–533, 2007.

Mury F.B, Lugon M.D, Fonseca R.N, Silva JR, Berni M, Araujo H.M, Fontenele M.R, Abreu L.A., Dansa M, Braz G, Masuda H, Logullo C. Glycogen Synthase Kinase-3 is involved in glycogen metabolism control and embryogenesis of *Rhodnius prolixus*. *Parasitology. Out*;143(12):1569-79, 2016.

Nijhof AM, Balk JA, Postigo M, Jongejan F. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. *BMC Mol Biol*. 2009; 10: 112.

Park KW, Yang HM, Youn SW, Yang HJ, Chae IH, Oh BH, Lee MM, Park YB, Choi YS, Kim HS, Walsh K (2003) Constitutively active glycogen synthase kinase-3 $\beta$  gene transfer sustains apoptosis, inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells, and reduces neointima formation after balloon injury in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1364–1369

Park, M., Venkatesh, T.V., Bodmer, R. Dual role for the zeste-white3/shaggy-encoded kinase in mesoderm and heart development of *Drosophila*. *Dev. Genet.* 22(3): 201—211, 1998.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*; 29(9): 45, 2001.

Pimentel B; de la Rosa EJ; de Pablo F. Insulin acts as an embryonic growth factor for *Drosophila* neural cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 226(3):855-61, 1996.

Raminani LN e Cupp EW. Early embryology of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *International J Insect Morphol and Embryol* 4: 517-528, 1975.

Reiter, P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: Implications for the efficacy of control strategies. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2007; 7:261-273.

Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA e Valle D. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev Biol*, 2008: 8: 82.

Riehle M.A., Moreira C.K., Lampe D., Lauzon C., e Jacobs-Lorena M. Using bacteria to express and display anti-Plasmodium molecules in the mosquito midgut. *International Journal of Parasitology* 37(6): 595-603, 2007.

Rodriguez, I. R. e Whelan, W. J. (1985) A novel glycosyl-amino acid linkage: rabbit muscle glycogen is covalently linked to a protein via tyrosine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132: 829-836.

Ruiz N, Abreu L.A., Parizi L.F, Kim T.K, Mulenga A, Braz G.R.C, Vaz Jr I, Logullo C. Non-Invasive Delivery of dsRNA into De-Waxed Tick Eggs by Electroporation. *PLoS ONE* 10(6): e0130008, 2015..

Sahoo, G., Sahoo, R.K., Mohanty–Hejmadi, P. Calcium metabolism in olive ridley turtle eggs during embryonic development, *Comp. Bioch. Phys. Part A* 121: 91-97, 1998.

Schmitz JM, Graham RM, Sagalowsky A, Pettinger WA Renal  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 adrenergic receptors: biochemical and pharmacological correlations.. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219 (2): 400–6, 1981.

Scott, T. W., Chow, E., Strickman, D., Kittayapong, P., Wirtz, R. A., Lorenz, L. H., And Edman, J. D.. Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. *J. Med. Entomol*, 1993; 30:922-927.

Shannon, R, Burke, A, Davis, N. The flight of *Stegomyia aegypti* (L.) *Am J Trop Med Hyg* 1930; 145-150.

SHIOMI T. e KITAZUME Y. Changes in glycogen content during early embryonic development in *Drosophila melanogaster*. *Drosoph. Inf. Serv.* 30, 151-152, 1956.

Tadros, W.; Lipshitz, H. D. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, v. 136, n. 18, p. 3033-3042, September 15, 2009.

Thompson M.B., Stewart, R.J. Embryonic metabolism and growth in lizards of the genus *Eumeces*. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A, 647–654, 1997.

Thuy A.P.N.T, Yamaguchi M., Bamba T, Fukusaki E Metabolome Analysis of *Drosophila melanogaster* during Embryogenesis. *PLoS ONE* 9 (8), 2014.

Trpis M, Haufe W e Shemanchuk J. Embryonic development of *Aedes (O.) sticticus* (Diptera: Culicidae) in relation to different constant temperatures. *Can Entomol* 105: 43-50, 1973.

Trpiš M. A new bleaching and decalcifying method for general use in zoology. *J Zool* 1970, 48:892-893.

Tsigos I., Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V., 2000. Chitin deacetylases: New, versatile tools in biotechnology. *TIBTECH*, 18, 305-312.

Valle D, Monnerat AT, Soares MJ, Rosa-Freitas MG, Pelajo-Machado M, Vale BS, Lenzi HL, Galler R e Lima JBP. Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. *J Insect Physiol* ,1999: 45: 701-708.

Valle D, Monnerat AT, Soares MJ, Rosa-Freitas MG, Pelajo-Machado M, Vale BS, Lenzi HL, Galler R e Lima JBP. Mosquito embryos and eggs: polarity and terminology of chorionic layers. *J Insect Physiol* 45: 701-708, 1999.

Vargas HC, Farnesi LC, Martins AJ, Valle D e Rezende GL. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *J Insect Physiol*, 2014: 62: 54-60.

Vastag L, Jorgensen P, Peshkin L, Wei R, Rabinowitz JD, et al. (2011) Remodeling of the metabolome during early frog development. *PLoS One* 6: e16881.

Vincent E.E, Sergushichev A., Griss T., Gingras M.C., Samborska B., Ntimbane T. et al. Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Regulates Metabolic Adaptation and Enables Glucose-Independent Tumor Growth. *Mol Cell*. Oct 15;60(2):195-207, 2015.

Vital W, Rezende GL, Abreu L, Moraes J, Lemos FJA, Vaz Jr IS, Logullo C. Germ band retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. *BMC Developmental Biol*, 2010: 10:25.

Walser CB, Lipshitz HD. Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition. *Curr Opin Genet Dev.* 21(4):431-43, 2011.

Wang QM, Fiol CJ, DePaoli-Roach AA, Roach PJ. Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem*. May 20;269 (20):14566-74, 1994.

Xavier MA, Tirloni L, Pinto AFM, Diedrich JK, Yates JR, Mulenga A, Logullo C, da Silva Vaz I Jr., Seixas A, Termignoni C. A proteomic insight into vitellogenesis during tick ovary maturation. *Sci Rep*. Mar 16;8(1):4698, 2018.

Yamazaki H, Nusse R. Identification of DCAP, a drosophila homolog of a glucose transport regulatory complex. *Mech Dev.* Nov;119(1):115-9, 2002.

Yamazaki H, Yanagawa Si. Axin and the Axin/Arrow-binding protein DCAP mediate glucose-glycogen metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* May 2;304(2):229-35, 2003.

Zeh, D. W, Zeh J.A. e Smith R L. Ovipositors, amnions and eggshell architecture in the diversification of terrestrial arthropods. *Quarterly Review of Biology.* 64, 147- 168, 1989.

**ANEXO I**

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20

21

22

**The dynamics of energy metabolism in the tick embryo.**

23

**A dinâmica do metabolismo energético em embriões de carrapato.**

24

Renato Martins<sup>a</sup> & Newton Ruiz<sup>a</sup>, Rodrigo Nunes da Fonseca<sup>b,d</sup>, Itabajara da Silva Vaz

25

Junior<sup>c,d</sup>, Carlos Logullo<sup>a,d\*</sup>

26

27

<sup>a</sup> Unidade de Experimentação Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil.

29

30

<sup>b</sup> Laboratório Integrado de Bioquímica Hatisaburo Masuda, Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Rio de Janeiro, Brazil.

33

34

<sup>c</sup> Centro de Biotecnologia and Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

36

37

<sup>d</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM), Brazil.

38

**Abstract:**

40

41

The cattle tick *Rhipicephalus microplus* is an ectoparasite capable of transmitting a large number of pathogens, causing considerable losses in the cattle industry, with substantial damage to livestock. Over the years, important stages of its life cycle, such as the embryo, have been largely ignored by researchers. Tick embryogenesis has been typically described as an energy-consuming process, sustaining cell proliferation, differentiation, and growth. During the embryonic stage of arthropods, there is mobilization of metabolites of maternal origin for the development of organs and tissues of the embryo. Glycogen resynthesis in late embryogenesis is considered as an effective indicator of embryonic integrity. In the cattle tick *R. microplus*, glycogen resynthesis is sustained by protein degradation through the gluconeogenesis pathway at the end of the embryonic period. Despite recent advancements in research on tick energy metabolism at the molecular level, the dynamics of nutrient utilization

51

52 during *R. microplus* embryogenesis is still poorly understood. The present study aims to  
53 describe the regulatory mechanisms of carbohydrate metabolism during maternal-zygotic  
54 transition and identify possible new targets for the development of novel drugs and other  
55 control measures against *R. microplus* infestations.

56

57 **Keywords:** Energy metabolism; embryogenesis; *Rhipicephalus microplus*

58

### 59 **Resumo**

60

61 O carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* é um ectoparasita capaz de transmitir diversos  
62 patógenos, sendo responsável por grandes perdas na pecuária pelos danos causados ao gado.  
63 Atualmente, muitos estudos têm negligenciado fases importantes do ciclo de vida deste  
64 parasita, como a fase da embrionária. A embriogênese é classicamente descrita como um  
65 processo que demanda um consumo de energia, possibilitando a proliferação celular,  
66 diferenciação e crescimento. Além disso, em artrópodes, o estágio da embriogênese é  
67 caracterizado pela mobilização de metabolitos de origem materna para o desenvolvimento de  
68 novos tecidos e órgãos. A re-síntese de glicogênio no final da embriogênese tem sido descrito  
69 em diversas espécies de artrópodes sendo considerado um indicador de integridade do  
70 embrião. No caso do *R. microplus* a re-síntese de glicogênio é sustentado pela degradação de  
71 proteínas durante a gliconeogênese, no terço final da embriogênese. Apesar dos recentes  
72 avanços, no estudo molecular e do metabolismo energético, os mecanismos envolvidos na  
73 dinâmica da utilização de diferentes substratos energéticos durante a embriogênese do  
74 carrapato *R. microplus* ainda é pouco entendido. Diante deste panorama, estudos que  
75 descrevam a regulação destes mecanismos e da associação do metabolismo de carboidratos  
76 com a transição materno zigótica, pode auxiliar na busca de novos alvos para o  
77 desenvolvimento de novos acaricidas e outras intervenções para o controle infestações de *R.*  
78 *microplus*.

79

80 **Palavras-chave:** Metabolismo energético, embriogênese e *Rhipicephalus microplus*.

81

82

83

**84 Introduction:**

85

86 Arthropod embryogenesis:

87         The fruit fly *Drosophila melanogaster* has been used as a model organism for the  
88 understanding of the molecular mechanisms that orchestrate arthropod development (Ober *et*  
89 *al.*, 2012). There are many molecular and genetic tools available for studying the events  
90 involved in cell differentiation of *D. melanogaster* embryos and gene regulatory networks that  
91 control this process which makes this Diptera the best known multicellular organism (Roy *et*  
92 *al.*, 2010). The understanding of the complex embryo gene regulatory networks and gene  
93 interactions may unravel the hidden secrets of insect evolution (Davis and Patel, 2002; Lynch  
94 and Desplan, 2003).

95         The pre-gastrulation embryo should be defined as a two-dimensional Cartesian  
96 coordinate system (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980) with bilateral symmetry and clear  
97 anterior-posterior (AP) and dorsal-ventral (DV) axes which are independent but develop  
98 simultaneously. Predetermined embryonic cell fate is possible if maternal mRNA is  
99 deposited in oocytes providing positional information that can be interpreted and refined by  
100 downstream target genes (Nüsslein-Volhard *et al.*, 1987). Combined approaches have been  
101 used to understand the transitions that occur in embryonic patterning strategies during the  
102 evolution of insects (Prpic *et al.*, 2008). One particular approach has generated greater  
103 understanding of insect embryogenesis. Comparing hemimetabolous and holometabolous  
104 insects with a short-germ type of development with those insects with a long-germ type of  
105 development such as *Drosophila* may reveal how gene regulatory networks evolved in insects  
106 and may also unravel common strategies that would be linked to the transition from short-  
107 germ type to long-germ type of embryogenesis (Davis and Patel, 2002).

108         During the early stages of its development, the embryo undergoes maternal-to-  
109 zygotic transition (MTZ) which is a stage in embryonic development characterized by  
110 extensive mRNA degradation followed by the activation of zygotic transcription. During  
111 oocyte formation, the female lays eggs containing mRNA, protein, and certain nutrients  
112 necessary for zygotic development (Tadros and Lipshitz, 2009). After fertilization, the genetic  
113 material deposited by the female in the oocyte controls the majority of the early events of  
114 embryogenesis (De Renzis *et al.*, 2007).

115 MZT occurs in a variety of organisms including echinoderms, nematodes, insects,  
116 fish, amphibians, and mammals. The MZT of *Drosophila melanogaster* is completed in about  
117 2.5 hours. In the mouse MZT occurs within approximately 22 hours after fertilization  
118 (Simpson *et al.*, 1988). In *D. melanogaster*; maternal transcript destabilization consists of two  
119 major events. The first one is exclusively maternal occurs after oocyte activation even in the  
120 absence of zygotic products while the second one takes place after zygotic activation (Tadros  
121 and Lipshitz, 2009). The RNA binding protein Smaug (SMG) is involved in the maternal  
122 transcript destabilization of *D. melanogaster*, (Tadros *et al.*, 2003; Semotok *et al.*, 2005;  
123 Semotok *et al.*, 2008).

124 The first zygotic genes that are activated during *D. melanogaster* embryogenesis  
125 display variants of sequences termed "TAGteam" of approximately 500 bp upstream of its  
126 transcriptional start sites (Ten Bosch *et al.*, 2006). Studies have identified that the protein  
127 Zelda, which is encoded by the zinc-finger gene *zld*, binds to the TAGteam promoting its  
128 transcription (Liang *et al.*, 2008). In the *D. melanogaster* embryo, two zygotic clusters are  
129 activated during mitotic cycles 8 and 14, and their zygotic mRNAs are mostly transcription  
130 factors (De Renzis *et al.*, 2007). Some of these genes are responsible for establishing the  
131 anteroposterior (AP) and dorsoventral (DV) axes during the embryonic syncytial and cellular  
132 blastoderm stages while others possibly induce zygotic genome activation (Satija and  
133 Bradley, 2012). The majority of the studies on the *D. melanogaster* embryo have focused on  
134 transcription factors and signaling molecules during early development. In contrast, much less  
135 is currently known about the regulation of the metabolic status during these stages as a limited  
136 number of studies have been conducted in order to investigate this particular aspect of the  
137 insect embryogenesis (Fraga *et al.*, 2013).

138 Embryogenesis has been typically described as an energy consuming process  
139 (Thompson and Stewart, 1997; Vleck and Hoyt, 1991). In such context, energy metabolism  
140 needs to be finely regulated since the egg constitutes a closed system which relies solely on  
141 yolk contents for embryo energy maintenance and organ development (Fagotto, 1990,  
142 Yamamoto and Takahashi 1993, Logullo *et al.*, 1998). Once embryonic development is  
143 complete, hatching occurs. Yolk remains inside the midgut of the larval tick (Taheri *et al.*,  
144 2014). During the starvation period, ticks are sustained by reserve substances stored in their  
145 midguts (Logullo *et al.*, 1998).

146 Larval stages of the Lone Star Tick *Amblyomma americanum* can survive starvation  
147 for approximately 8 months whereas the nymphal and adult stages are able to survive  
148 starvation for 6 months and 19 months, respectively (Goddard and Varela-Stokes, 1987).  
149 Other tick species can survive longer periods without feeding such as the adult stages of  
150 *Ornithodoros erraticus* that under natural conditions can withstand starvation for several  
151 years (Palma *et al.*, 2012).

152 In contrast, larvae of the tick *Amblyomma spp* can survive starvation for 6 months  
153 while nymphs of this tick species have the ability to survive up to 12 months of starvation  
154 (Diamant and Strickland, 1965). In extreme climatic conditions, larval stages of the tick *R.*  
155 *microplus* can survive over 6 months without feeding (Gonzales, 1974). A dynamic  
156 regulation of energy metabolism is required for ticks to survive without feeding for prolonged  
157 periods of time.

158

### 159 **Energy metabolism in the arthropod embryo**

160

161 Our research group has investigated the mechanisms underlying energy metabolism  
162 during the embryonic development of the cattle tick *R. microplus*. Results of our studies have  
163 provided insights into the dynamics of nutrient utilization during tick embryogenesis.  
164 Information generated from our studies may help finding candidate antigens for the  
165 development of vaccines against ticks (Moraes *et al.*, 2007; Logullo *et al.*, 2009; Fabres *et al.*,  
166 2010; Abreu *et al.*, 2013).

167 *Rhipicephalus microplus* is an ectoparasite found in cattle from tropical and  
168 subtropical regions. Its importance in veterinary medicine lies in the ability of this tick to  
169 transmit pathogens. It causes considerable losses to the cattle industry worldwide and incurs  
170 substantial damage to livestock (Grisi *et al.*, 2014). Altogether the economic losses caused by  
171 *R. microplus* to livestock industry and the costs of tick control In Brazil, are estimated at 3  
172 billion U.S. dollars per year (Abreu *et al.*, 2009; Grisi *et al.*, 2014).

173 The cattle industry experienced a period of relative success in the control of ticks as  
174 there was ample access and widespread use to antiparasitic drugs and a rapidly growing body  
175 of knowledge on bovine ticks and tick-borne diseases was available. However, the concept  
176 that the control of parasitic infestations in cattle is successfully achieved only by the  
177 therapeutic and prophylactic use of chemical compounds is sheer conjecture, and has led to

178 the emergence of acaricide-resistant ticks. Development of drug resistance among ticks is  
179 currently the major drawback to effective parasite control in cattle (Casida and Quistad,  
180 1998).

181 The study of molecules that participate in intracellular pathways of the developing  
182 tick embryo could reveal the complex networks that regulate metabolism during embryonic  
183 development in various organisms. Thus, research characterizing control mechanisms and  
184 identifying key enzymes involved in the energy metabolism of *R. microplus* may help finding  
185 possible new vaccine target antigens in order to develop novel immunotherapeutic strategies  
186 against the cattle tick and implement efficient tick eradication and control measures (Campos  
187 *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2007).

188 Our findings indicate that there is mutual regulation among major enzymes of  
189 glucose metabolism at the transcriptional and enzymatic levels (da Silva *et al.*, 2015). In our  
190 metabolomics research, metabolite levels from metabolic routes in *D. melanogaster* were  
191 measured. This approach furthered our understanding of substrates involved in carbohydrate  
192 catabolism and anabolic pathways of insects (Yamaguchi *et al.*, 2014). These findings have  
193 expanded our knowledge about the physiology of hematophagous arthropods and energy  
194 metabolism of ticks (Moraes *et al.*, 2007; Logullo *et al.* 2009, da Silva *et al.*, 2015).  
195 Furthermore, the investigation of key components of these metabolic pathways has provided  
196 invaluable information for the development and improvement of vaccines and drugs to control  
197 important disease vectors. Although these events are primarily studied in embryonic cells or  
198 during embryogenesis (Abreu *et al.*, 2013; Yamaguchi *et al.*, 2014), some of the aspects of  
199 glucose metabolism have also been investigated in adult arthropod tissues and organs before  
200 or after a blood meal (Vital *et al.*, 2010).

201 Female adult ticks must have a blood meal in order to complete oogenesis and  
202 consequently their reproductive success (Grimes, 1980). Hematophagous arthropods can  
203 ingest large volumes of blood. The amount of blood that is ingested by an engorged tick  
204 during one blood meal would correspond to several times their body weight. Table 1 shows  
205 the following information about the feeding habits of three different species of  
206 hematophagous arthropods - *Rhipicephalus microplus*, *Rhodnius prolixus*, and *Aedes aegypti*:  
207 the weight gain of the blood-feeding arthropod after a blood meal; the number of eggs laid by  
208 these females after a blood meal; and the volume blood ingested by these females during one

209 blood meal. Nutrient substances that are present in the blood are essential for arthropods  
210 during oogenesis.

211

212 **Table 1:** Comparison between three different species of hematophagous arthropods - *Rhipicephalus microplus*,  
213 *Rhodnius prolixus*, and *Aedes aegypti* – with regard to their feeding habits: the volume blood ingested by a  
214 female during one blood meal; the weight gain of the blood-feeding arthropod after a blood meal, and the  
215 number of eggs laid by these females after a blood meal.

	<i>Rhipicephalus microplus</i>	<i>Rhodnius prolixus</i>	<i>Aedes aegypti</i>
Blood volume ingested	300-500 $\mu$ l	297 $\mu$ l**	2,5 $\mu$ l
Weight gain after a blood meal	150-200 mg	236,8 mg	3 mg
Number of eggs laid*	3000	574	75

216 \*The number of eggs laid is mean values per female.

217 \*\*The volume of blood is the average flow rate of 0,33  $\mu$ l per second.

218 Sources: Buxton *et al.*, 1930; Woke *et al.*, 1956; Davey *et al.*, 1986; Madeira *et al.*, 2002; Arévalo *et al.*,  
219 2007; Ruegg & Davey *et al.*, 2012; Rey *et al.*, 2014.

220

221 In arthropods, classical studies on embryonic metabolism have demonstrated that  
222 glycogen reserves are important to sustain the development of the embryo (Fagotto, 1990;  
223 Moraes *et al.*, 2007, Campos *et al.*, 2006, Logullo *et al.*, 2009; Vital *et al.*, 2010). During  
224 *Drosophila melanogaster* oogenesis, glycogen is predominantly accumulated in mature  
225 ovarian follicles and is a major storage form of carbohydrate in eggs (Gutzeit *et al.*, 1993). In  
226 the early stages of *Drosophila* embryogenesis, protein metabolism and glycogen metabolism  
227 are negatively correlated since total protein levels decline as glycogen levels increase (Shiomi  
228 and Kitazume, 1956; Medina and Vallejo, 1989; Gutzeit *et al.*, 1993). Other studies have  
229 shown that glycogen levels vary during *Drosophila* embryogenesis, and that abundant  
230 glycogen stores are present during the late stages of the fly embryogenesis (Yamazaki and  
231 Nusse, 2002; Yamazaki and Yanagawa, 2003).

232 Glycogen metabolism during the embryonic development of the tick *R. microplus* is  
233 similar to that of the fly *D. melanogaster*. During early development of the tick embryo,  
234 glycogen degradation occurs while during the late stages of embryogenesis glycogen reserves  
235 are resynthesized and protein degradation ensues.

236 During this final stage of this process, gluconeogenesis is intensified to provide the  
237 embryo with an adequate glucose supply. Amino acids play an important role as substrates for  
238 gluconeogenesis and subsequent glycogen resynthesis during the final stages of  
239 embryogenesis in these arthropods (Moraes *et al.*, 2007). During the embryogenesis of

240 *Rhipicephalus microplus*, lipids, carbohydrates and proteins are used as major energy sources  
241 (Fig. 1), Our studies show that gluconeogenesis makes a significant contribution to maintain  
242 the energy balance in the late stages of *R. microplus* embryo development (Moraes *et al.*,  
243 2007; Logullo *et al.*, 2009; Fabres *et al.*, 2010).

244 During gluconeogenesis, glucose is generated from non-glycosidic compounds. This  
245 metabolic pathway is regulated by phosphoenolpyruvate carboxikinase (PEPCK) which is an  
246 enzyme that catalyzes the initial steps of gluconeogenesis (Ballard and Oliver 1963; Ballard *et*  
247 *al.* 1967). When glucose levels are low, as during the early stages of tick embryonic  
248 development, the rate of gluconeogenesis increases. In this scenario, PEPCK activity in  
249 gluconeogenesis is increased. Transcription of the gene for this enzyme is controlled by  
250 several hormones and is tissue-specific (Chakravarty *et al.*, 2005).

251 In one study about glucose metabolism during the embryogenesis of *R. microplus*,  
252 Moraes *et al.* (2007) found that PEPCK activity increases as glycogen is re-synthesized. These  
253 findings suggest that glucose may form from other substrates through this pathway ensuring  
254 glycogen re-synthesis. PEPCK dynamics, activity and regulation during *Aedes aegypti*  
255 embryogenesis are different from those of *R. microplus* embryonic development. During the  
256 early stages of embryogenesis of this mosquito, PEPCK activity is low. PEPCK activity  
257 increases as embryogenesis progresses until it reaches high levels which are kept high until  
258 hatching (Vital *et al.*, 2010). These results suggest that, in addition to PEPCK activity,  
259 gluconeogenesis may also have an important role in maintaining the embryo viability.

260

## 261 **Conclusion**

262

263 The metabolic requirements of the developing tick embryo and the mechanisms  
264 regulating embryogenesis in arthropods have been extensively studied by many researchers  
265 over the years and are now well-established and well-characterized. However, some aspects  
266 of the tick embryo physiology remains unclear. Glucose metabolism plays an essential role  
267 during embryonic development and viability of various species. There is an increasing body  
268 of knowledge gained from research regarding glucose metabolism in the tick embryo.  
269 Information generated in these studies will give us a comprehensive view of the dynamics of  
270 this metabolic pathway during tick embryogenesis.

271

272 **Legend**

273 **Figure 1.** Dynamic of energy source during embryogenesis of *Rhipicephalus microplus*. In  
 274 early development the first energy source is mobilized is lipids, in middle and late of  
 275 development carbohydrate and protein are recruited and glycogen is resynthesized.  
 276

277 **References**

278 Abreu LA, Calixto C, Waltero CF, Della Noce BP, Githaka NW, et al. The conserved role of  
 279 the AKT/GSK3 axis in cell survival and glycogen metabolism in *Rhipicephalus (Boophilus)*  
 280 *microplus* embryo tick cell line BME26. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 2574–82. doi:  
 281 10.1016/j.bbagen.2012.12.016 PMID: 23274741

282 Arévalo A, Carranza JC, Guhl F, Clavijo JA, Vallejo GA. Comparación del ciclo de vida de  
 283 *Rhodnius colombiensis* Moreno, Jurberg & Galvão, 1999 y *Rhodnius prolixus* Stal, 1872  
 284 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en condiciones de laboratorio. *Biomédica* 2007;  
 285 27(supl. 1):119-29.

286 Buxton PA. The biology of a blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Trans Entomol Soc.* 1930;  
 287 78: 227-236. doi10.1111/j.1365-2311.1930.tb00385.x

288 Campos E, Moraes J, Façanha AR, Moreira E, Valle D, Abreu L, et al. Kinetics of energy  
 289 source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic  
 290 development. *Veterinary Parasitology* 2006; 138, 349–357. doi:10.1016/j.vetpar.2006.02.004

291 Casida JE and Quistad GB. Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future?  
 292 *Annual Review of Entomology* 1998; v. 43:1, p. 1-16. doi:10.1146/annurev.ento.43.1.1.

293 Chakravarty K, Cassuto H, Reshef L, Hanson RW, Cox MM. Factors that control the tissue-  
 294 specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit. Rev.*  
 295 *Biochem. Mol. Biol* 2005;40:129–154.

296 Da Silva, R.M.; Della Noce, B.; Waltero, C.F.; Costa, E.P.; de Abreu, L.A.; et al. Non-  
 297 Classical Gluconeogenesis-Dependent Glucose Metabolism in *Rhipicephalus microplus*  
 298 Embryonic Cell Line BME26 *Int. J. Mol. Sci* 2015; 16: 1821-1839

299 Davey KG, Maimets K, Prueg, R. The relationship between crop size and egg production in  
 300 *Rhodnius prolixus*. *Can. J. Zool* 1986; 64: 2654-2657.

301 Davis, G. K.; Patel, N. H. Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches  
 302 to insect segmentation. *Annu Rev Entomol* 2002; v. 47, p. 669-99.

303 De Renzis, S. Elemento O, Tavazoie S., Wieschaus E F. Unmasking activation of the zygotic  
 304 genome using chromosomal deletions in the *Drosophila* embryo. *PLoS Biol* 2007; v. 5, n. 5, p.  
 305 e117.

- 306 Diamant G and Strickland RK.. Manual on Livestock Ticks for Animal Disease Eradication  
307 Personnel. Washington U.S. Department of Agriculture/Agricultural Research Service, 1965.
- 308 Fabres A, Andrade CP, Guizzo M, Sorgine MHF, Paiva-Silva GDO, Masuda A, et al. Effect  
309 of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and  
310 egg hatching. *Parasitol* 2010; 137(10): 1537–46. doi: 10.1017/S0031182010000284 PMID:  
311 20500916
- 312 Fagotto F. Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase  
313 in yolk spheres. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 1990; 14, 217–235.
- 314 Fraga A, Ribeiro L, Lobato M, Santos V, Silva JR, Gomes H, et al. Glycogen and glucose  
315 metabolism are essential for early embryonic development of the red flour beetle *Tribolium*  
316 *castaneum*. *PLoS One* 2013; 48(6): e65125. doi: 10.1371/journal.pone.0065125
- 317 Goddard J, Varela-Stokes AS. Role of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.), in  
318 human and animal diseases. *Vet Parasitol* 2009; 160: 1–12.  
319 doi:10.1016/j.vetpar.2008.10.089 [PubMed]
- 320 Gonzales JC, Silva NR, Wagner EM. O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* (Canestrini,  
321 1887) em bovinos estabulados *Arquivo Faculdade Veterinária da UFRGS* 1974; v. 2, n. 1, p.  
322 25-34.
- 323 Grimes AJ. Humand Red Cell Metabolism. *Blackwell Scientific Publications* 1980.
- 324 Grisi L, Cerqueira RL, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Caçado PHD, et al.  
325 Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras*  
326 *Parasitol Vet* 2014; v. 23: 150–6. doi: 10.1590/S1984-29612014042 PMID: 25054492.
- 327 Gutzeit HO, Zissler D and Fleig R. Oogenesis in the honeybee *Apis mellifera*: Cytological  
328 observations on the formation and differentiation of previtellogenic ovarian follicles. *Roux's*  
329 *Arch Dev Biol* 1993; 202:181-191
- 330 Kornberg RD and Thomas JO. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science*, 1974;  
331 v. 184, n. 4139, p. 865-8, May 24.
- 332 Liang HL, Nien CY, Liu HY, Metzstein MM et al. The zinc-finger protein Zelda is a key  
333 activator of the early zygotic genome in Drosophila. *Nature* 2008; v. 456, n. 7220, p. 400-3,  
334 Nov 20.
- 335 Logullo C, Witola WH, Andrade C, Abreu L, Gomes J, et al. Expression and activity of  
336 glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus*  
337 (*Boophilus*) *microplus*. *Vet Parasitol* 2009; 161(3–4): 261–9. doi:  
338 10.1016/j.vetpar.2009.01.029
- 339 Logullo C, Vaz IS, Sorgine MHF, Paiva-Silva GO, Faria FS, et al. Isolation of an aspartic  
340 proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology* 1998;  
341 116, 525–532.

- 342 Lynch J, Desplan C. Evolution of Development: Beyond Bicoid. *Current Biology* 2003; v. 13,  
343 n. 14, p. R557-R559.
- 344 Madeira NG, Macharelli CA, Carvalho LR. Variation of the Oviposition Preferences of *Aedes*  
345 *aegypti* in Function of Substratum and Humidity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002 v. 97(3): 415-  
346 420.
- 347 Medina M, Vallejo CG. The contents of proteins, carbohydrates, lipids and DNA during the  
348 embryogenesis of *Drosophila*. *Int J Develop Biol* 1989; v33:403–405.
- 349 Moraes J, Galina A, Alvarenga PH, Rezende GL, Masuda A, da Silva Vaz I, *et al.* Glucose  
350 metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. *Comp Biochem*  
351 *Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007; 146(4): 528–33. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.05.009 PMID:  
352 16904922
- 353 Nusslein-Volhard C, Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and polarity in  
354 *Drosophila*. *Nature*, 1980; v. 287, n. 5785, p. 795-801.
- 355 Nusslein-Volhard, C., Frohnhofer, H.G., Lehmann, R. Determination of anteroposterior  
356 polarity in *Drosophila*. *Science* 1987; v238: 1675--1681.
- 357 Ober, U. Ayroles JF, Stone EA, Richards S, Zhu D, *et al.* Using whole-genome sequence data  
358 to predict quantitative trait phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet* 2012; v. 8,  
359 n. 5, p. e1002685.
- 360 Palma M, Carvalho LI, Figueiredo M, Amaro F, Boinas F, Cutler J, Nuncio MS. *Borrelia*  
361 *hispanica* in *Ornithodoros erraticus*. *Clinical Microbiology and Infection* 2012; v 18, Issue 7,  
362 July, Pages 696–701.
- 363 Prpic NM, Schoppmeier M, Damen WGM. Gene Silencing via Embryonic RNAi in Spider  
364 Embryos. *Cold Spring Harbor Protocols* 2008; v.2008, n. 11, p. pdb.prot5070-pdb.prot5070.
- 365 Rey JR. and O'Connell M. Oviposition by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Influence of  
366 congeners and of oviposition site characteristics. *Journal of Vector Ecology* 2014; v.39 (1):  
367 190-196.
- 368 Roy S, Ernst J, Kharchenko PV, Kheradpour P, Negre N *et al.* Identification of functional  
369 elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science* 2010; v. 330, n. 6012,  
370 p. 1787-97, Dec 24.
- 371 Ruegg RP and Davey KG. The effect of C18 juvenile hormone and Altosid on the efficiency  
372 of egg production in *Rhodnius prolixus*. *International Journal of Invertebrate Reproduction*  
373 2012; v. 1:1, 3-8.
- 374 Satija R, Bradley RK. The TAGteam motif facilitates binding of 21 sequence-specific  
375 transcription factors in the *Drosophila* embryo. *Genome Res* 2012; v. 22, n. 4, p. 656-65.

- 376 Semotok JL, Cooperstock RL, Pinder BD, Vari HK, *et al.* Smaug recruits the  
377 CCR4/POP2/NOT deadenylase complex to trigger maternal transcript localization in the early  
378 *Drosophila* embryo. *Curr Biol* 2005; v. 15, n. 4, p. 284-94.
- 379 Semotok JL, Westwood JT, Goldman AL, Cooperstock RL *et al.* Measuring mRNA stability  
380 during early *Drosophila* embryogenesis. *Methods Enzymol* 2008; v. 448, p. 299-334.
- 381 Shiomi T, Kitazume Y. Changes in glycogen content during early embryonic development in  
382 *Drosophila melanogaster* 1956. *Drosophila Information Service*.
- 383 Simpson L, Wieschaus EF. Zygotic activity of the null0 locus is required to stabilize the  
384 actinmyosin network during cellularization in *Drosophila*. *Development* 1988; v. 110:851–  
385 863. [PubMed: 2088725]
- 386 Tadros W, Houston SA, Bashirullah A, Cooperstock RL, Semotok JL, *et al.* Regulation of  
387 Maternal Transcript Destabilization During Egg Activation in *Drosophila*. *Genetics* 2003; v.  
388 164, n. 3, p. 989-1001.
- 389 Tadros W, Lipshitz HD. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*  
390 2009; v. 136, n. 18, p. 3033-3042, September 15.
- 391 Taheri M, Nabian S, Ranjbar M, Mazaheri Nezhad R, Gerami Sadeghian A, Sazmand A.  
392 Study of vitellogenin in *Boophilus annulatus* tick larvae and its immunological aspects. *Trop*  
393 *Biomed* 2014; v. 3:398-405.
- 394 Ten Bosch JR, Benavides JA, Cline TW. The TAGteam DNA motif controls the timing of  
395 *Drosophila* pre-blastoderm transcription. *Development* 2006; v. 133, n. 10, p. 1967-77.
- 396 Thompson, M.; Stewart, R. Embryonic metabolism and growth in lizards of the genus  
397 Eumeces. *Comp. Biochem. Physiol* 1997; v. 118, 647–654.
- 398 Vital W, Rezende GL, Abreu L, Moraes J, Lemos FJ, Vaz Ida S Jr, Logullo C. Germ band  
399 retraction as a landmark in glucose metabolism during *Aedes aegypti* embryogenesis. *BMC*  
400 *Dev. Biol* 2010; v.10:25. doi: 10.1186/1471-213X-10-25 PMID: 20184739
- 401 Vleck C, Hoyt D. Metabolism and energetic of reptilian and avian embryos. In Egg  
402 Incubation: Its Effects On Embryonic Development in Birds and Reptiles; *Cambridge Univ.*  
403 *Press* 1991; pp. 285–306.
- 404 Woke PA. Effects of various blood fractions on egg production of *Aedes Aegypti* Linn. *Am J*  
405 *Epidemiol* 1937; v. 25 (2): p. 372-380. doi:  
406 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118313>
- 407 Woke PA., Mona S. All Y and Rosenberger Crj. The numbers of eggs developed related to  
408 the quantities of human blood ingested in *Aedes aegypti* (l.) (diptera: culicidae) 1956 v. 49,  
409 Issue 5, 1, p. 435–441. doi.org/10.1093/aesa/49.5.435.

- 410 Yamaguchi M, An PN, Bamba T , Fukusaki E. Metabolome analysis of *Drosophila*  
411 *melanogaster* during embryogenesis *PLoS One* 2014; v. 9(8):e99519. doi:  
412 10.1371/journal.pone.0099519.
- 413 Yamamoto Y, Takahashi SY. Cysteine proteinase from Bombyx eggs: role in programmed  
414 degradation of yolk proteins. *Comp Biochem Physiol B* 1993; v. 106 (1), 35-45.
- 415 Yamazaki H, Nusse R. Identification of DCAP, a drosophila homolog of a glucose transport  
416 regulatory complex. *Mechan Develop* 2002; v. 119:115–119. doi: 10.1016/S0925-  
417 4773(02)00307-6.
- 418 Yamazaki H, Yanagawa S. Axin and the Axin/Arrow-binding protein DCAP mediate  
419 glucose-glycogen metabolism. *Biochem Bioph Res Commun* 2003; v. 304:229–235. doi:  
420 10.1016/S0006-291X(03)00582-5.
- 421