



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



ESTUDO FUNCIONAL DA VIA PI3K/AKT EM *Aedes* *Aegypti*

BRUNO TINOCO NUNES

**Botucatu – SP
2018**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Estudo funcional da via PI3K/AKT em *Aedes aegypti*

Aluno: Bruno Tinoco Nunes

Orientador: Prof. Dr. Jayme Augusto de Souza Neto

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

**BOTUCATU – SP
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Nunes, Bruno Tinoco.

Estudo funcional da via PI3K/AKT em *Aedes aegypti* / Bruno Tinoco Nunes. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Jayme Augusto de Souza Neto
Capes: 20202008

1. Transcriptoma. 2. Microbiota. 3. Genômica. 4. Inativação gênica. 5. *Aedes aegypti*.

Palavras-chave: Genômica funcional; Microbioma; Silenciamento gênico; Transcriptoma; Via PI3K/AKT.

Dedico este trabalho à minha esposa e ao meu filho, os quais têm sido a família que eu sempre sonhei ter.

AGRADECIMENTOS

Há quatro anos, quando cheguei em Botucatu, não esperava que minha vida mudaria tão drasticamente, e de forma tão positiva. Então, é o momento de agradecer aos envolvidos.

Começarei esta lista pela pessoa que me motivou sair de Niterói-RJ, a 600 km de Botucatu. Professor Jayme, muitíssimo obrigado por ter aceitado ser meu orientador, por ter me ensinado tantas coisas ao longo desses quatro anos e por ser um belíssimo exemplo de profissional e ser humano.

Agradeço sinceramente aos meus amigos do Vectomics: Amanda, Caio Barcelos, Clara Ribeiro, Débora, Jackson Eliezer, Kamila Voges, Mariana Porto, Robinson Ishijima, Thais Watanabe, Vanessa Carvalho e Wanderson Oliveira. Todos vocês contribuíram de alguma forma para minha formação científica. Agradeço em especial Jaqueline Jarusevicius e Letícia Oda, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e por estarem comigo desde o início.

Aos amigos e também membros do Vectomics Bianca Cechetto e Pedro Affonso, que são colaboradores deste trabalho. Vocês foram absolutamente imprescindíveis para esta tese. Sem vocês as coisas teriam sido muito mais difíceis para mim.

Ao doutor Diego Alonso, pelos valiosos ensinamentos em sequenciamentos de nova geração, sempre se mostrando muito solícito às minhas dúvidas. Foi fundamental contar com a sua experiência.

Ao doutor José Henrique de Oliveira, pelos importantes esclarecimentos acerca do ensaio de peróxido de hidrogênio.

Aos professores, coordenadores e secretários da pós-graduação.

Decidi que, como este é o meu terceiro trabalho científico ao qual dedico uma seção de agradecimentos, evitaria mencionar familiares, justamente por já ter feito em outras duas ocasiões. Não posso deixar de citar, no entanto, três pessoas que, de fato, foram fundamentais para a existência deste trabalho.

Obrigado, mais uma vez, minha avozinha querida. Minha mãe, meu pai, meu exemplo de mulher. Tudo que me tornei como profissional e ser humano é porque a Sr.^a me deu condições para tal, e eu sou infinitamente grato por isso.

À minha esposa e mãe do meu filho, Daiane, que esteve desde o início dessa jornada ao meu lado. Obrigado por ser uma mãe dedicada e uma esposa amiga. Não poderia vislumbrar como teria sido minha experiência nos últimos quatro anos sem você ao meu lado.

Ao meu filhinho lindo, Lucas, que chegou para ressignificar a minha vida. Você tornou esse trabalho leve e esperançoso. Nada do que eu escrevesse aqui seria justo para o que você representa na minha vida.

Obrigado a todos!

“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você os encara é que faz a diferença.” (Benjamin Franklin)

RESUMO

Aedes aegypti é a espécie de mosquito emergente em áreas urbanas com maior impacto na saúde pública, sendo o principal vetor dos arbovírus dengue, Zika e chikungunya. Por esse motivo, se faz indispensável a compreensão de mecanismos moleculares associados a processos fisiológicos em *A. aegypti*, como resposta imune, comportamento e homeostase intestinal. Conforme observado em outros organismos, a via PI3K/AKT tem papéis importantes no metabolismo, na reprodução, na tolerância ao estresse e na imunidade. A quinase AKT atua como um regulador negativo da via PI3K/AKT, fosforilando o fator de transcrição FOXO e impedindo sua translocação nuclear. Nosso objetivo foi avaliar o perfil transcricional em *A. aegypti* com o gene *akt* silenciado e avaliar as consequências deste silenciamento sobre a microbiota bacteriana. Além disso, investigamos uma provável ativação mitocondrial quando do silenciamento de *akt*. Mostramos que o silenciamento de *akt* resultou na ativação de genes essenciais para a manutenção da homeostase intestinal do mosquito, como peptídeos antimicrobianos (AMPs) e genes codificadores de enzimas associadas à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Notavelmente, observou-se uma forte repressão de 11 profenoloxidasas (PPOs), além de uma potente indução de genes codificadores de subunidades da enzima NADH desidrogenase, em comparação com o respectivo grupo controle, sugerindo que tal indução esteja associada a um provável aumento da atividade mitocondrial. No contexto comportamental, o transcriptoma de *A. aegypti* com o gene *akt* silenciado revelou a modulação de 5 *odorant binding proteins* (OBPs), das quais todas foram reprimidas no quarto dia após o silenciamento de *akt*. Além das OBPs, identificamos duas *long wavelength sensitive opsins*, ambas reprimidas após dois e quatro dias. Interessantemente, observamos que, dos 345 genes modulados, a grande maioria foi regulada negativamente. O silenciamento de *akt*, além de modular a carga da microbiota bacteriana de *A. aegypti*, também modulou táxons específicos após quatro dias de silenciamento, como as Classes Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria. Nosso conjunto de dados coloca a via PI3K/AKT no cerce de importantes processos fisiológicos, contribuindo para elucidar mecanismos moleculares até então pouco compreendidos do mosquito.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the emerging mosquito species in urban areas with the greatest impact on public health, being the main vector of arboviruses dengue, Zika and chikungunya. For this reason, it is essential to understand the molecular mechanisms associated with physiological processes in *A. aegypti*, such as immune response, behavior and intestinal homeostasis. As observed in other organisms, the PI3K / AKT pathway has important roles in metabolism, reproduction, stress tolerance and immunity. AKT kinase acts as a negative regulator of the PI3K / AKT pathway, phosphorylating the FOXO transcription factor and preventing its nuclear translocation. Our objective was to evaluate the transcriptional profile in *A. aegypti* with the silenced *akt* gene and to evaluate the consequences of this silencing on the bacterial microbiota. In addition, we investigated a possible mitochondrial activation during the *akt* silencing. We have shown that *akt* silencing resulted in the activation of essential genes for the maintenance of mosquito intestinal homeostasis, such as antimicrobial peptides (AMPs) and genes encoding enzymes associated with the production of reactive oxygen species (ROS). Notably, a strong repression of 11 profenoloxidasas (PPOs) was observed, as well as a potent induction of genes encoding subunits of the NADH dehydrogenase enzyme, in comparison with the respective control group, suggesting that such induction is associated with a possible increase in mitochondrial activity. In the behavioral context, the *A. aegypti* transcriptome with the mutated *akt* gene revealed the modulation of 5 odorant binding proteins (OBPs), all of which were repressed on the fourth day after *akt* silencing. In addition to the OBPs, we identified two long wavelength sensitive opsins, both repressed after two and four days. Interestingly, we observed that of the 345 modulated genes, most were down-regulated. The silencing of *akt*, besides modulating the bacterial microbiota load of *A. aegypti*, also modulated specific taxa after four days of silencing, such as the Gammaproteobacteria and Betaproteobacteria classes. Our data set puts the PI3K / AKT pathway in the vicinity of important physiological processes, contributing to elucidate the mosquito's poorly understood molecular mechanisms.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Origem e distribuição de <i>Aedes aegypti</i> no Brasil	20
1.2 Condições de Desenvolvimento do mosquito.....	21
1.3 Relevância em Saúde Pública	22
1.4 Controle do Vetor	22
1.5 Mecanismos efetores da imunidade	24
1.5.1 Via Toll	26
1.5.2 Via Imd.....	27
1.5.3 Via JAK-STAT	27
1.5.4 Peptídeos antimicrobianos.....	28
1.5.5 Via de RNA de Interferência.....	28
1.6 Via PI3K/AKT/FOXO	30
1.7 Microbiota Simbionte	32
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivos gerais	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Mosquitos.....	36
3.2 Silenciamento gênico por RNAi	36
3.2.1 Desenho experimental do silenciamento gênico e obtenção das amostras	36
3.2.2 Síntese de RNA dupla fita.....	37
3.2.3 Microinjeção.....	38
3.3 Análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	39
3.3.1 Isolamento de RNA total.....	39
3.3.2 Tratamento com DNase.....	40
3.3.3 Síntese de cDNA	40
3.3.4 qRT-PCR.....	41

3.3.5	Lista de <i>primers</i> utilizados nas reações de qRT-PCR.....	41
3.4	Ensaio de H ₂ O ₂ liberado	43
3.5	Transcriptoma	44
3.5.1	Quantificação fluorimétrica.....	44
3.5.2	Purificação de poli(A) RNA a partir de RNA total.....	44
3.5.3	Fragmentação de poli(A) RNA	44
3.5.4	Síntese da primeira fita de cDNA	45
3.5.5	Síntese da segunda fita de cDNA.....	45
3.5.6	Adenilação, ligação e enriquecimento	45
3.5.7	Avaliação da qualidade das amostras.....	46
3.5.8	Quantificação por qPCR.....	47
3.5.9	RNA-seq.....	47
3.5.10	Análise de dados do transcriptoma.....	50
3.6	Microbioma.....	50
3.5.1	Inserção dos adaptadores e indexes à biblioteca	51
3.5.2	<i>Primers</i>	52
3.5.3	Purificação dos produtos de PCR.....	53
3.5.4	Quantificação por qPCR.....	54
3.5.5	Sequenciamento	54
3.5.6	Análise de dados do microbioma	54
4	RESULTADOS	56
4.1	Parte I – Silenciamento gênico de <i>akt</i> e análise da modulação de genes e vias de interesse	56
4.1.1	Validação do silenciamento	56
4.1.2	Análise do perfil de expressão de genes e vias modulados após o silenciamento de <i>akt</i>	57
4.1.3	Análise do perfil de expressão de genes e vias modulados após o silenciamento de <i>pp2a</i>	60
4.1.4	Avaliação da carga bacteriana após o silenciamento de <i>akt</i> e PP2A	62
4.2	Parte II – Análise da expressão gênica global em <i>A. aegypti</i> silenciado para <i>akt</i>	64
4.2.1	Análise dos genes diferencialmente expressos.....	64
4.2.2	Análise de <i>Gene Ontology</i> (GO) dos genes diferencialmente expressos	69

4.3 Parte III – Investigação da hipótese de ativação mitocondrial	69
4.3.1 Ensaio de H ₂ O ₂ liberado.....	71
4.3.2 Ensaios de duplos silenciamentos	71
4.3.3 Avaliação do efeito dos duplos silenciamentos sobre a microbiota bacteriana	72
4.4 Parte IV – Avaliação do efeito do silenciamento de <i>akt</i> gerado na microbiota de <i>A. aegypti</i>	77
4.4.1 Análise de diversidade alfa	77
4.4.2 Análise de diversidade beta.....	79
4.4.3 Análise da composição taxonômica bacteriana.....	81
5 DISCUSSÃO	88
6 CONCLUSÕES.....	98
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXOS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principais vias de imunidade em mosquitos (Adaptado de Dimopoulos et al.)	25
Figura 2: Esquema do mecanismo de RNAi culminando com a degradação de um RNA mensageiro (Aigner, 2006).	29
Figura 3: Resumo da via PI3K/AKT/FOXO (Adaptado de Lam et al., 2012).	31
Figura 4: Principais etapas do desenho experimental para o silenciamento gênico realizado neste trabalho.	37
Figura 5: Esquema da estratégia utilizada para geração do template de DNA para posterior síntese de dsRNA.	38
Figura 6: Fotografia ilustrando o aparelho Nanoject II™ utilizado para microinjeção neste estudo.	39
Figura 7: Figura gerada a partir do equipamento Caliper mostrando, por meio de um gel digital, a qualidade das bibliotecas de cDNA.	46
Figura 8: Densidade de clusters ao longo das 4 lanes da flow cell.	49
Figura 9: Percentual de Q30 ao longo dos ciclos.	49
Figura 10: Intensidade dos canais verde e vermelho ao longo dos ciclos.	50
Figura 11: Figura esquemática ilustrando a estratégia de uso dos primers utilizados na preparação das bibliotecas para o sequenciamento do microbioma.	51
Figura 12: Fluxograma com as principais etapas executadas para a análise do microbioma neste estudo.	55
Figura 13: Validação do silenciamento de genes-chaves da via PI3K/AKT em fêmeas de <i>A. aegypti</i> microinjetadas com RNA dupla fita para os respectivos genes. qRT-PCR para foxo, akt e pp2a mostrando a expressão dos genes após injeção em 1, 2, 3 e 4 dias. A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de 2 réplicas biológicas independentes para foxo, 3 para akt e 1 para pp2a. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. O teste t-Student foi aplicado para análise estatística. P-values: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$	58
Figura 14: Análise do perfil de expressão de genes e vias modulados após o silenciamento de akt. qRT-PCR para foxo, nos, pgc-1a, attacin, cecropin G, cecropin E,	

defensin, dipteracin, stat, pias, socs, argonaute-2 e dicer-2 mostrando a expressão dos genes após injeção em 1, 2, 3 e 4 dias. A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de 3 réplicas biológicas independentes. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. O teste t-Student foi aplicado para análise estatística. P-values: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ **59**

Figura 15: Análise do perfil de expressão de genes e vias modulados após o silenciamento de pp2a. qRT-PCR para akt, foxO, 16S, nos, attacin, cecropin G, cecropin E, stat e socs mostrando a expressão dos genes após injeção em 1, 2, 3 e 4 dias. A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de 2 réplicas técnicas oriundas de 1 réplica biológica. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. **61**

Figura 16: Avaliação da carga bacteriana após o silenciamento de akt e pp2a. qRT-PCR para o transcrito 16S do rRNA bacteriano após injeção em 2, 3 e 4 dias (akt) e 1 e 3 dias (pp2a). A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de 1 réplica biológica. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. O teste t-Student foi aplicado para análise estatística. P-values: *, $p < 0.05$ **63**

Figura 17: Análise do transcriptoma de *A. aegypti* durante o silenciamento de akt. (A) Diagrama de Venn gerado pelo software CLC Genomics Workbench 10 dos genes modulados em 2, 3 e 4 dias após silenciamento de akt. (B) Heatmap gerado pelos softwares Java TreeView e Cluster 3.0. O resultado representa a modulação da expressão gênica nos insetos silenciados (dsAKT) em relação ao grupo controle (dsLacZ). A regulação positiva está representada pela cor vermelha, enquanto a regulação negativa pela cor azul. Para ambas as figuras, foram adotados os seguintes critérios estatísticos: $-2 \geq \text{fold change} \geq 2$ e $\text{FDR } p\text{-value} \leq 0,05$ **66**

Figura 18: Avaliação do perfil transcricional de profenoloxidasas e subunidades da enzima NADH desidrogenase modulados durante o silenciamento de akt em *A. aegypti*. Os valores de fold change para cada gene gerados no CLC Genomics Workbench 10

foram usados para a construção dos gráficos pelo software GraphPad Prism 6. Os gráficos representam a modulação da expressão gênica nos insetos silenciados (dsAKT) em relação ao grupo controle (dsLacZ) em 2, 3 e 4 dias após silenciamento de akt. **67**

Figura 19: Avaliação do perfil transcricional de odorant binding proteins e long wavelength sensitive opsins modulados durante o silenciamento de akt em *A. aegypti*. Os valores de fold change para cada gene gerados no CLC Genomics Workbench 10 foram usados para a construção dos gráficos pelo software GraphPad Prism 6. Os gráficos representam a modulação da expressão gênica nos insetos silenciados (dsAKT) em relação ao grupo controle (dsLacZ) em 2, 3 e 4 dias após silenciamento de akt. **68**

Figura 20: Análise de Gene Ontology dos genes modulados durante o silenciamento de akt em *A. aegypti*. Distribuição funcional dos genes diferencialmente expressos nos mosquitos silenciados para akt, em relação ao grupo controle. Uma tabela completa de todos os genes e seus respectivos valores de fold change está disponível na tabela S1. Abreviação dos grupos funcionais: UKN, função desconhecida; DIV, funções diversas; MET, metabolismo; RTT, replicação, transcrição e tradução; TRP, transporte; CS, estrutural e citoesqueleto; PROT, proteólise; DIG, digestão; CSR, recepção quimiosensorial; R/S/MIT, redox, estresse e mitocôndria; IMM, imunidade. **70**

Figura 21: Peróxido de hidrogênio liberado a partir do intestino médio de mosquitos silenciados para akt e microinjetados para lacZ. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de duas réplicas biológicas independentes. **73**

Figura 22: Validação dos duplos silenciamentos e análise do perfil de expressão de subunidades da enzima NADH desidrogenase após microinjeção em 1 e 3 dias. (A e B) Validação do duplo silenciamento de dsAKT e dsPGC-1a e análise do perfil de expressão de subunidades da enzima NADH desidrogenase ND2, ND3 e ND4L. (C e D) Validação do duplo silenciamento de dsAKT e dsNOS e análise do perfil de expressão de subunidades da enzima NADH desidrogenase ND2, ND3 e ND4L. A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de duas réplicas biológicas independentes. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. **74**

Figura 23: Análise do perfil de expressão gênica de pgc-1a e nos nas duas condições experimentais de duplos silenciamentos. A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com

RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de duas réplicas biológicas independentes. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. 75

Figura 24: Avaliação da carga bacteriana durante os duplos silenciamentos de dsAKT e dsPGC-1a e dsAKT e dsNOS. qRT-PCR para o transcrito 16S do rRNA bacteriano após microinjeção em 1 e 3 dias. A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de 2 réplicas biológicas independentes. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo Rp49. 76

Figura 25: Gráfico resultante da análise de diversidade alfa. Cada amostra está disposta no gráfico de forma que o eixo horizontal representa o número de reads sequenciados, enquanto o eixo vertical os índices de heterogeneidade de Simpson. 78

Figura 26: Análise de diversidade Beta contendo todos os dados das 3 réplicas biológicas: réplica 1 (verde); réplica 2 (azul); e réplica 3 (amarelo). Cada qual com 6 pontos referentes aos dias 2, 3 e 4 após o silenciamento de akt. 80

Figura 27: Análises de beta diversidade para as três diferentes réplicas biológicas, contendo cada uma 3 pontos referentes aos 2, 3 e 4 dias após a microinjeção para o silenciamento com dsAKT (azul) e para o controle dsLacZ (amarelo). 82

Figura 28: Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Filo. O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada Filo bacteriano, enquanto o eixo horizontal apresenta par a par as três réplicas biológicas independentes, cada qual contendo a condição experimental referente ao silenciamento de akt e o controle LacZ, respectivamente. 83

Figura 29: Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Classe. O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada Classe bacteriana, enquanto o eixo horizontal apresenta par a par as três réplicas biológicas independentes, cada qual contendo a condição experimental referente ao silenciamento de akt e o controle LacZ, respectivamente. 84

Figura 30: Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Ordem. O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada Ordem bacteriana, enquanto o eixo horizontal apresenta par a par as três réplicas biológicas independentes, cada qual contendo a condição experimental referente ao silenciamento de akt e o controle LacZ, respectivamente. 85

Figura 31: Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Família. O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada Família bacteriana, enquanto o eixo horizontal apresenta par a par as três réplicas biológicas independentes, cada qual contendo a condição experimental referente ao silenciamento de akt e o controle LacZ, respectivamente.....	86
Figura 32: Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Gênero. O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada Gênero bacteriano, enquanto o eixo horizontal apresenta par a par as três réplicas biológicas independentes, cada qual contendo a condição experimental referente ao silenciamento de akt e o controle LacZ, respectivamente.....	87
Figura 33: Esquema proposto para ativação mitocondrial em consequência do silenciamento de akt, em <i>A. aegypti</i> . A ativação da via PI3K/AKT, mediante o silenciamento de akt, permite a translocação nuclear do fator de transcrição FOXO e a consequente ativação de um grupo de genes. Dentre esses genes, a ativação de NOS, de maneira dependente de PGC-1a, gera óxidos nítricos (NO) que induzem aumento da atividade mitocondrial. Tal aumento acarreta em maior produção de H ₂ O ₂ no citosol, ativando JABP (jun activation binding protein), que por sua vez induziria apoptose celular. Esquema baseado no conjunto de dados gerado neste estudo e em informações oriundas de trabalhos citados nesta tese.	95

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: *Primers* utilizados para síntese de dsRNA e qRT-PCR, respectivamente. **41**

Tabela 2: Distribuição de reads por biblioteca. **48**

Tabela 3: Primers, adaptadores e índices para o sequenciamento Illumina. **52**

Tabela S 1: Genes diferencialmente expressos nos mosquitos dsAKT em relação aos dsLacZ. **109**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AKT - Proteína quinase B (*Protein kinase B*)
- AMP - Peptídeo antimicrobiano (*antimicrobial peptide*)
- cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar (*complementary DNA*)
- DNA - Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- dNTP - Desoxinucleotídeos trifosfato
- dpm - Dias após microinjeção (*days after microinjection*)
- dsRNA - RNA dupla fita (*double strand RNA*)
- FOXO - *Forkhead box O*
- Imd - Deficiência imunológica (*Immune Deficiency*)
- JAK-STAT - *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway*
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*)
- PCA - Análise de componentes principais
- PCoA - Análise de coordenadas principais
- PCR - Reação em cadeia pela polimerase (*polymerase chain reaction*)
- PI3K - *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*
- qPCR - Reação em cadeia pela polimerase quantitativo em tempo real
- RISC - Complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced silencing complex*)
- RNA - Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)
- RNAi - RNA de interferência
- RNase - ribonuclease
- rRNA - RNA ribossomal
- RT-PCR - PCR por transcriptase reversa (*reverse transcriptase*)
- siRNA - Pequenos RNAs interferentes (*small interfering RNA*)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Origem e distribuição de *Aedes aegypti* no Brasil

Aedes aegypti é o vetor mais relevante nos registros epidemiológicos das moléstias causadas pelos vírus febre amarela (YFV), Zika (ZKV), chikungunya (CHKV) e pelos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV) (Beserra et al., 2010; Marchette et al., 1969; Vega-Rúa et al., 2014). A espécie tem origem africana, mais especificamente no Egito (Braga & Valle, 2007b) e sua dispersão pelo mundo ocorreu da África para a costa leste dos continentes americanos, seguida pela posterior distribuição pela costa oeste asiática. A principal teoria para a disseminação do *A. aegypti* para as Américas preconiza que a espécie tenha sido introduzida pelas embarcações de tráfico de escravos que aportaram no continente, posteriormente se distribuindo ao longo da dinâmica exploratória, urbanização e movimentação humana (Silva & Silva, 1999).

Apesar de a espécie ter sido descrita cientificamente pela primeira vez no século XVIII, apenas no século XX foi identificada como vetor transmissor da febre amarela. Devido a essa identificação, medidas governamentais de combate e controle foram iniciadas em 1955 no Brasil, terminando em 1958 uma vez que a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerou o vetor erradicado do país (FIOCRUZ, 2011; Oliveira, 2015). Entretanto, países na divisa do Brasil, como Venezuela, Suriname, Guiana e Guiana Francesa, assim como de outros continentes americanos, continuaram sendo um foco quiescente para a reintrodução do vetor por meio de deslocamentos terrestres e principalmente marítimos da própria população humana, o que efetivamente ocorreu diversas vezes entre as décadas de 60 e 80.

Atualmente, o *A. aegypti* é encontrado na maior porção do continente americano, em uma faixa que estende do Uruguai aos Estados Unidos da América, com surtos mais relevantes de arboviroses no Brasil, Paraguai, Venezuela e Cuba. Mais especificamente no Brasil, o vetor está presente em todos os estados (Braga & Valle, 2007b). Ou seja, essa espécie de mosquito está amplamente distribuída pelas áreas urbanas de todo o

país, compartilhando seu nicho com o da população humana e deixando em risco um número significativo da população brasileira (Beserra et al., 2010 apud Natal, 2002).

1.2 Condições de desenvolvimento do mosquito

Dessa forma, a manutenção da linhagem urbana de *A. aegypti* persiste até os dias atuais, principalmente em regiões com infraestrutura sanitária deficiente, as quais favorecem condições de desenvolvimento para a vida larval e pupal da espécie (Braga & Valle, 2007b; Beserra et al., 2010).

O controle desse vetor se apresenta como uma grande dificuldade, já que se trata de uma espécie domiciliada. É imprescindível conhecer, pois, o padrão de comportamento do mosquito em relação ao homem, para manutenção de sua sobrevivência e reprodução, além das variações bióticas e abióticas ao seu entorno (Beserra et al., 2010).

No que se refere ao desenvolvimento dos 4 estágios larvais e pupal, o mosquito é aquático obrigatório, de modo que, uma vez adaptado ao ambiente urbano, comumente utiliza recipientes domiciliares ou peridomiciliares com acúmulo de água parada. Os principais exemplos são tanques de armazenamento de água, vasos, pneus, vasilhames temporários, embalagens plásticas, ralos e canaletas que possam ter acúmulo de águas pluviais, fluviais ou por ação antrópica (Braga & Valle, 2007b).

Na fase adulta, a espécie tem hábitos diurnos, alimentando-se quase que exclusivamente de carboidratos como frutose e sacarose presentes em néctares ou seivas. Entretanto, para oviposição, a fêmea, que é hematófago-dependente, deposita seus ovos preferencialmente ao amanhecer e no período vespertino (Braga & Valle, 2007b; FIOCRUZ, 2011).

Embora as fêmeas ocasionalmente se alimentem com sangue antes da cópula, elas intensificam a voracidade pela hematofagia após a fecundação, quando precisam ingerir sangue para realizar a maturação dos ovos e o desenvolvimento completo dos ovários. Normalmente, três dias após a ingestão de sangue as fêmeas já estão aptas para a postura, passando, então, a procurar um local para oviposição.

A eclosão dos ovos e o desenvolvimento larval são sensíveis a fatores físicos, como: temperatura, luminosidade e presença ou ausência de fluxo de fluidos; químicos: salinidade, pH, presença ou ausência de agentes tóxicos; e biológicos: matéria orgânica

em solução, microrganismos e relações intra/interespecíficas por metazoários. Tais fatores podem, assim, serem aplicados no próprio meio de desenvolvimento ou ao entorno deste. (Beserra et al., 2010).

Portanto, o desenvolvimento imaturo do *A. aegypti* é diretamente influenciado pela qualidade da água. Porém, há resultados que mostram que quanto maior o grau de poluição da água, maior a atratividade pelas fêmeas. Assim, para *A. aegypti*, a qualidade da água não está associada ao grau de poluição, mas sim às condições que o meio apresenta para viabilizar ou não o desenvolvimento e sobrevivência dos imaturos (Beserra et al., 2010).

1.3 Relevância em saúde pública

Uma vez infectada, a fêmea de *A. aegypti* está apta para transmitir a arbovirose da qual seja portadora através da alimentação sanguínea. A disseminação de arboviroses em *A. aegypti* é mais alarmante por diferenciar-se da maior parte dos artrópodes com oviposição hematófago-dependente, cujas fêmeas só se alimentam uma vez com sangue. As fêmeas de *A. aegypti*, por sua vez, apresentam a chamada discordância gonotrófica, ou seja, utilizam comumente duas ou mais fontes de alimentação sanguínea para a mesma oviposição (FIOCRUZ, 2011).

Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil registrou 1.987.678 casos dos três principais arbovírus transmitidos pelo *A. aegypti* em 2016. Dentre os quais foram 1.500.535 casos de dengue, 271.824 casos de chikungunya e 215.319 de zika, com um total de 846 mortes registradas. Além disso, os mesmos dados mostram que 2015 e 2016 foram os dois anos com maior número de casos de dengue no Brasil desde que os casos começaram a ser registrados em 1990.

1.4 Controle do vetor

O controle mais sistemático do *A. aegypti* no Brasil foi intensificado a partir do século XX, justificado pelo aumento discrepante de casos de febre amarela e mais tardiamente pelo surgimento de casos de ambas as formas de dengue. Os métodos

utilizados envolviam a aplicação de agentes químicos larvicidas e inseticidas ou por eliminação mecânica dos criadouros (Zara et al., 2016).

O Plano de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa) foi criado em 1996 pelo Ministério da Saúde para intensificar o controle das mais relevantes arboviroses da época, os sorotipos I, II e IV do vírus dengue (DENV), como consequência dos crescentes números de casos de dengue hemorrágica. Entretanto, os esforços de erradicação do vetor não tiveram resultados satisfatórios, uma vez que o PEAa não foi eficiente no controle da disseminação cada vez mais ampla do vetor. Desta forma, o projeto foi encerrado e de forma mais emergencial, em 2001, foi implantado o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD), que não tinha mais como meta a erradicação do vetor, e sim, seu controle em regiões e municípios com maior índice de transmissão de arbovírus. No ano seguinte, como um substituto mais amplo do PIACD, surgiu o Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD), logo após a introdução do sorotipo III do vírus DENV no país (Braga & Valle, 2007a; Zara et al., 2016).

Atualmente, as estratégias de controle do vetor podem ser divididas em mecânica, química e biológica.

A eliminação do ambiente físico de oviposição é do controle mecânico. Esta estratégia de controle visa a erradicação do ciclo de desenvolvimento do mosquito com a finalidade de reduzir em médio prazo a disseminação de *A. aegypti* e, portanto, das arboviroses das quais é vetor. Esse tipo de controle abrange desde o impedimento da eclosão até o desenvolvimento larval, retirando ou adequando locais com potencial de acúmulo de água parada, os criadouros; ou, ainda, impedindo diretamente a disseminação dos adultos, principalmente a partir do uso de telas em ralos, janelas, portas e outros meios de acesso domiciliar (Zara et al., 2016).

Os métodos de controle químico são mais abrangentes e podem atuar tanto no meio de desenvolvimento aquático dos imaturos, com o uso de larvicidas, salinização, ou cloração de potenciais criadouros, quanto atuar no mosquito adulto utilizando inseticidas com mecanismos de ação variados, desde inibidores de síntese de quitina até agentes neurotóxicos (Braga & Valle, 2007b).

Controle biológico para o *A. aegypti* é todo aquele que envolve competição, predatismo ou parasitismo do vetor, proveniente de organismos metazoários ou microbiológicos. Dessa forma, é capaz de reduzir a população do mosquito utilizando a própria cadeia biológica como ferramenta de combate.

Esse método abrange qualquer fase do desenvolvimento de *A. aegypti*, ou seja, desde a fase em ovo até a adulta. Seu efeito é de médio a longo prazo, garantindo, dessa forma, um controle mais extenso e duradouro da espécie. No desenvolvimento da fase imatura podem ser usados peixes e invertebrados aquáticos como predadores de ovos, larvas e pupas. Por mecanismos diferentes, bactérias, fungos e parasitas também podem agir sobre o mosquito durante essas mesmas fases, como a exemplo do *Bacillus thurigiensis israelenses*, que é capaz de produzir endotoxinas altamente larvicidas (Zara et al., 2016).

No que se refere à fase adulta, há duas importantes linhas: aquela que, de alguma forma, prejudica a reprodução do mosquito e a que envolve a perda de competência vetorial. Um exemplo são os *A. aegypti* desenvolvidos pela empresa Oxitec Ltda. e liberados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CNTBio), em 2014, em que os mosquitos transgênicos machos da linhagem OX513A, nomeados comercialmente de Aedes do BemTM, tem sido uma ferramenta muito promissora no controle da reprodução do vetor (OXITEC, 2016). Outro exemplo é a introdução de bactérias do Gênero *Wolbachia*, que conferem tanto esterilidade da prole, quanto a diminuição do *fitness* do adulto e inibição da suscetibilidade viral. Essas bactérias são simbiontes naturais de diversos artrópodes, porém, em *A. aegypti* além de serem capazes de colonizar o seu intestino-médio, causam os efeitos citados. Uma vez que o ciclo de replicação dos arbovírus envolve sua passagem pelo trato digestivo dos insetos, estudos mais abrangentes de aplicação desse agente vêm sendo desenvolvidos (Mcmeniman et al., 2009; Moreira et al., 2009; Dutra et al., 2016).

1.5 Mecanismos efetores da imunidade

Os insetos são expostos a uma grande variedade de microrganismos patogênicos presentes no ambiente onde desenvolvem seu ciclo de vida, além de algumas espécies se alimentarem de sangue potencialmente infectado com parasitas, bactérias ou vírus. Para poder conviver com o risco de infecção os insetos desenvolveram diversas barreiras estruturais e uma resposta imunológica composta por vários mecanismos de defesa.

Uma das principais defesas dos insetos é o sistema imune inato, que é rapidamente ativado após desafio e demonstra um certo grau de especificidade a

diferentes classes de microrganismos. O sistema imune é composto basicamente por vias de sinalização que controlam uma série de mecanismos efetores, como a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), espécies reativas de oxigênio (ROS) e moléculas semelhantes a opsoninas. Desta forma, o sistema imune possibilita o controle da maior parte das infecções. A resposta imune em insetos compreende tanto mecanismos de defesa humoral como celular. Este último envolve os hemócitos presentes na hemolinfa (Medzhitov & Janeway, 2002).

Existem três principais vias imunes de sinalização em insetos: Toll, Imd e Jak/STAT (Figura 1). Estas são responsáveis pela expressão de peptídeos antimicrobianos e de genes efetores da imunidade. Embora haja algum grau de interconexão entre as diferentes vias de sinalização, bactérias Gram-positivas e fungos estimulam preferencialmente a via Toll enquanto bactérias Gram-negativas ativam a via Imd (Michel et al. 2001, Hoffmann & Reichhart 2002, Hultmark 2003). Tanto as vias de imunidade inata como a via de RNA de interferência participam na defesa antiviral dos insetos (Costa et al. 2009; Souza-Neto et al. 2009).

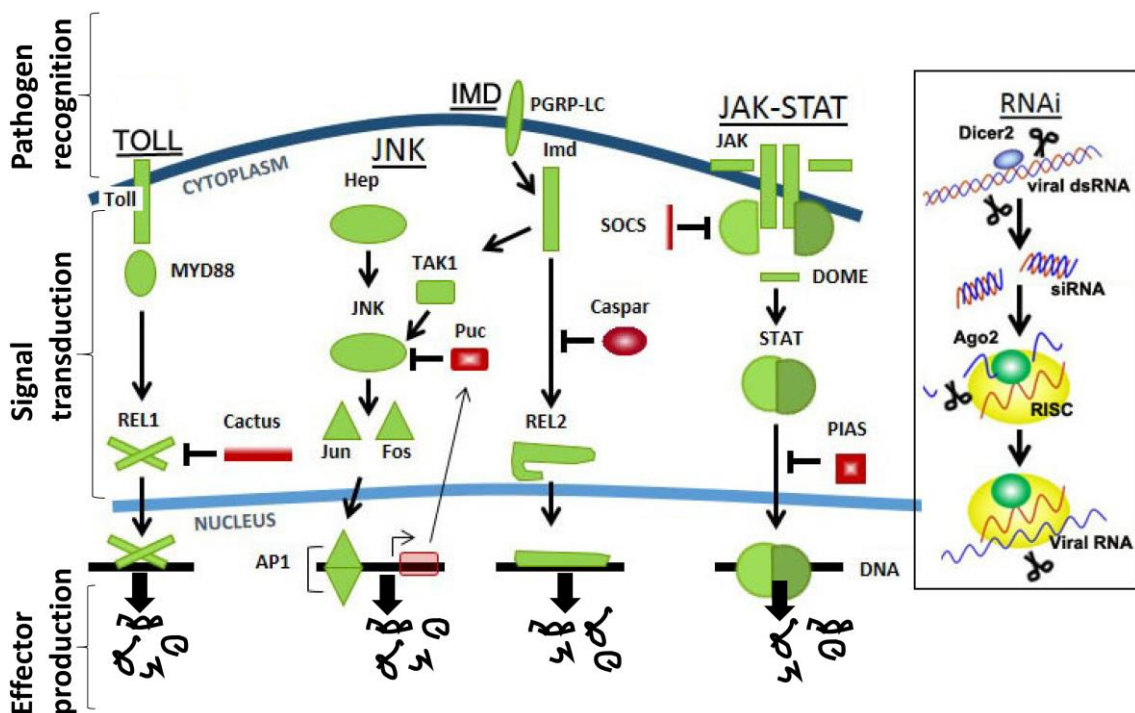


Figura 1: Principais vias de imunidade em mosquitos (Adaptado de Dimopoulos et al.).

A disponibilização da sequência do genoma do mosquito *A. aegypti* (Nene et al. 2007), em combinação com metodologias de análise de expressão gênica de alta vazão e

genética reversa, têm gerado oportunidades sem precedentes para o estudo das respostas imunes deste mosquito contra diversos patógenos (Souza-Neto et al. 2009; Xi et al. 2008; Zou & Souza-Neto et al. 2011). Estudos envolvendo microarranjos de DNA revelaram que a infecção do mosquito com o DENV resulta em uma ativação massiva de genes do sistema imune do inseto, incluindo fatores associados às vias Toll e JAK-STAT (Xi et al. 2008). Além disso, ensaios funcionais de silenciamento gênico mediado por RNA interferente (RNAi) demonstraram que é possível alterar a susceptibilidade do *A. aegypti* ao DENV através da supressão ou ativação ectópica das vias Toll (Xi et al. 2008) e JAK-STAT (Souza-Neto et al. 2009), sugerindo que estas vias desempenham um papel fundamental na defesa anti-DENV e influenciam diretamente a competência vetorial do mosquito.

1.5.1 Via Toll

A via Toll é uma cascata de sinalização conservada evolutivamente que foi inicialmente descrita pelo seu papel no estabelecimento da polaridade no eixo dorso-ventral de embriões de *Drosophila* (Belvin & Anderson, 1996). Mais tarde a via também foi associada à regulação da resposta imune, quando sua função foi caracterizada. Toll é uma proteína transmembrana que é ativada pela proteína extracelular Spaetzle após sofrer clivagem proteolítica induzida por uma cascata de cisteíno-proteinases (Hoffmann & Reichhart, 2002). Após a ligação com Spaetzle, Toll sofre alterações conformacionais, resultando no recrutamento de pelo menos três proteínas com domínios “death” (MyD88, Tube e Pelle). Pelle contém um domínio adicional de serina-treonina quinase e por isso pode estar envolvido na via de degradação proteolítica de Cactus. Cactus é uma proteína com domínio anquirina que atua como inibidor dos fatores de transcrição dorsal e relish 1 (Christophides et al. 2004). Após a degradação de Cactus, o fator de transcrição dorsal (da família NF- κ B) é translocado para o núcleo, onde promove a transcrição de diversos genes relacionados a vários aspectos da imunidade do inseto, em especial peptídeos antimicrobianos (AMPs). Em *Aedes aegypti*, pesquisas relacionam uma maior resposta imunológica da via Toll com a infecção viral disseminada pelo intestino do inseto (Olmo, 2015). Em aspectos gerais, foi demonstrado que o silenciamento induzido por dsRNA de componentes da

via Toll, como o MyD88 ou o Relish 1, é capaz de aumentar a carga viral de DENV, enquanto ao silenciar a Cactus, portanto, o regulador negativo da via, o efeito inverso é observado, chegando a reduzir até 4 vezes a carga viral (Ramirez & Dimopoulos, 2010; Xi et al., 2008).

1.5.2 Via Imd

A via Imd é ativada principalmente em resposta a bactérias Gram-negativas e regula um grande conjunto de peptídeos antimicrobianos. O receptor transmembranar da via Imd é uma proteína reconhedora de peptídeo glicana de cadeia longa (PGRP-LC). Após estímulo, PGRP-LC passa o sinal para a proteína Imd, que contém o domínio “death” com grande similaridade em relação ao mecanismo de sinalização *tumor necrosis factor* (TNF) humano. PGRP-LC recruta a proteína Imd, que em seguida interage com o adaptador dFADD via interação com o domínio “death”. Depois disso, dFADD recruta a caspase Dredd, que então se associa com Relish. Uma vez clivada, Relish libera sua porção N-terminal (ativadora transcricional) da porção C-terminal, (inibidora da translocação), e esta é direcionada para o núcleo. Ao atingir o núcleo, Relish promove a transcrição de diversos genes relacionados à imunidade, em especial peptídeos antimicrobianos (AMPs), entre eles atacina, cecropina e diptericina, especialmente ativas contra bactérias Gram-negativas (Hoffmann, 2003).

1.5.3 Via JAK-STAT

Em *Drosophila*, esta via tem um importante papel em eventos como segmentação, proliferação e diferenciação de hemócitos, determinação de sexo e desenvolvimento de olhos, asas e pernas (Zeidler et al. 2000, Luo & Dearolf 2001). A via pode ser acionada por desafio de bactérias ou por lesões teciduais que ativam a ligação da proteína ligadora de citocina UDP3 ao receptor transmembranar DOME, induzindo sua fosforilação pela proteína HOP (uma Jak tirosina quinase). Esta fosforilação cria um sítio de ligação para as proteínas STAT inativas que são então fosforiladas, dimerizadas e translocadas ao núcleo, onde ativam a transcrição de vários

genes (Christophides et al. 2004). Aparentemente as vias Imd e Jak/STAT possuem alguns componentes em comum e, de maneira geral, todas as vias (Toll, Imd, e Jak/STAT) compartilham alguns genes em comum como alvo (Boutros et al. 2002).

Em *A. aegypti* infectado com DENV-2, a via Jak/STAT se mostrou altamente responsiva à infecção, tendo diversos genes ativados (Souza-Neto et al., 2009). No mesmo trabalho, mosquitos silenciados para o receptor Dome apresentaram maiores taxas de replicação viral, ao passo que aqueles silenciados para o repressor Pias se mostraram mais resistentes.

1.5.4 Peptídeos antimicrobianos

Nos insetos, a produção de AMPs induzida por estímulo imune ocorre principalmente no corpo gorduroso onde os peptídeos são secretados na hemolinfa e acumulados em altas concentrações e difundidos por todo o corpo (Boman, 2003). Entretanto, a produção de AMPs também é detectada em outros tecidos como o epitélio do tubo digestivo (Lehane et al. 1997). A maioria dos AMPs é anfipática, carregada positivamente e com baixo peso molecular (5–30 kDa). São também altamente abundantes e diversos, a ponto de várias famílias de AMPs já terem sido identificadas em insetos desafiados (Bulet et al. 1999). Embora haja grande variedade de peptídeos antimicrobianos, de maneira geral eles são considerados de amplo espectro, sendo funcionais contra diversos microrganismos (bactérias, fungos, leveduras, vírus, etc.). Esses peptídeos são agrupados em três classes principais: peptídeos lineares com α -hélices anfipáticas e hidrofóbicas (cecropinas, magaininas, etc.) (Lamberty et al. 2001), peptídeos com pontes disulfídicas entre cisteínas (defensinas, protegrinas, etc.) (Steiner et al., 1981) e aqueles com abundância de resíduos de prolina e/ou glicina (PRP, GRP) (Bulet et al. 1999). O mecanismo de ação mais bem conhecido é através da inserção dos AMPs na membrana celular, que causa a destruição ou a permeabilização da mesma, levando o microorganismo à morte.

Em *A. aegypti*, Pan et al. (2012) demonstraram que cecropina D e defensina C, genes induzidos pelo vírus sob o controle da via Toll, têm poder inibitório ao DENV.

1.5.5 Via de RNA de Interferência

O mecanismo de RNAi foi descoberto em 1998 como uma interferência genética potente e específica causada por RNA dupla fita, em *Caenorhabditis elegans* (Fire et al. 1998) e se baseia no silenciamento da expressão gênica através da degradação sequência-específica de RNAs mensageiros. O mecanismo de RNAi provavelmente está presente em todas as plantas e animais metazoários (Ghildiyal & Zamore 2009). O mecanismo básico de RNAi pode ser dividido em 3 etapas: primeiro, uma longa dupla fita de RNA (dsRNA) é processado em pequenas moléculas de RNA dupla fita, que variam de tamanho entre 20 e 30 nucleotídeos (siRNA) por uma ribonuclease III (RNaseIII) conhecida como Dicer; em seguida estes siRNAs são incorporados ao complexo de silenciamento induzido por RNA, conhecido como RISC; finalmente, no RISC, uma das fitas de RNA é destruída e a outra serve como molde para a clivagem de outros RNAs mensageiros que apresentem complementaridade com a sequência alvo (Figura 2).

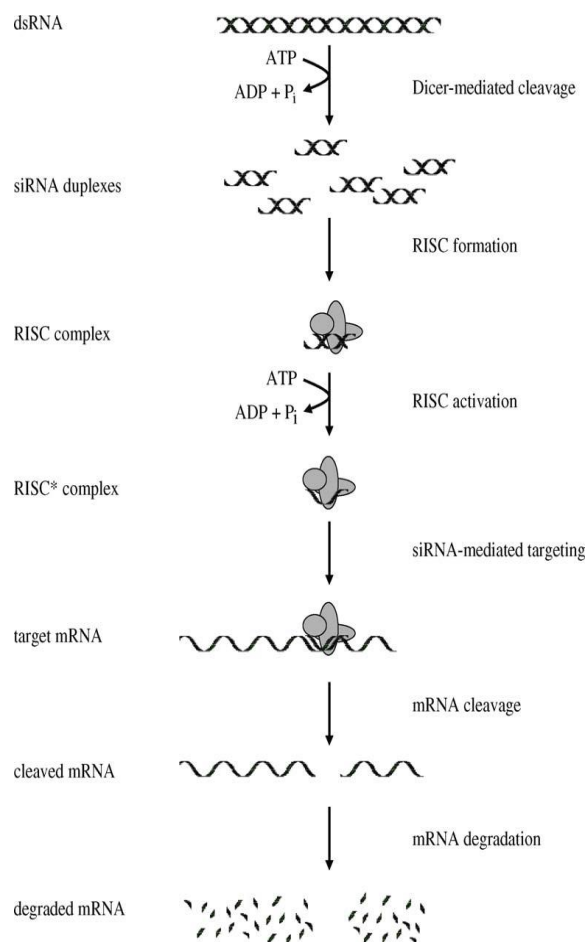


Figura 2: Esquema do mecanismo de RNAi culminando com a degradação de um RNA mensageiro (Aigner, 2006).

O processo geralmente resulta na redução da expressão gênica, influenciando na regulação e proteção do genoma contra ameaças externas e internas, tais como controle de elementos móveis do DNA durante fases embrionárias em células germinativas de mamíferos (Meister & Tuschl 2004; Tomari & Zamore 2005).

Em função de sua natureza, este mecanismo é muito eficiente na inativação de RNA viral (Fritz et al. 2006), principalmente para os organismos que não possuem respostas baseadas no interferon, tendo assim um papel importante na imunidade de vetores de arboviroses.

É importante lembrar que, nos últimos anos, vários trabalhos têm mostrado diversas evidências que sustentam que o mecanismo de RNAi está envolvido na defesa contra vírus em insetos (Keene et al. 2004; Sanchez-Vargas et al. 2004; van Rij & Andino 2006), sendo o silenciamento por RNA de interferência crucial para a defesa antiviral em adultos de *D. melanogaster* (van Rij et al. 2006) e em *Anopheles gambiae* infectado com vírus O'nyong-nyong (ONNV) (Keene et al. 2004).

1.6 Via PI3K/AKT/FOXO

A via PI3K/AKT/FOXO é capaz de regular a expressão de genes de diversos processos fisiológicos, que incluem: controle do ciclo celular, apoptose, autofagia, regulação da glicólise e gliconeogênese, resistência a estresse oxidativo, reparo de DNA, atrofia muscular, *fitness*, e regulação imunológica (Becker et al., 2010; Hansen et al., 2007; Horst & Burgering, 2007).

O fator de transcrição da via, FOXO, em seu estado funcional, pode transitar entre o núcleo e o citoplasma. A regulação negativa de FOXO ocorre principalmente em nível pós-traducional por intermédio de metilações, acetilações, ubiquitinações e principalmente fosforilações (Horst & Burgering, 2007). O mecanismo chave de regulação da via PI3K/AKT/FOXO é iniciado pela Insulina (ISN) ou pelo fator de crescimento IGF1, por meio de PRRs quinases transmembranares chamadas INSR e IGF1R, respectivamente (Becker et al., 2010; Horst & Burgering, 2007). O reconhecimento dessas macromoléculas induz na PRR a complexação dos substratos do receptor de insulina (IRSs) que são responsáveis pela ativação da Fosfatidilinositol 3-

Quinase (PI3K) (Dionne et al., 2006). A PI3K ativada, no citoplasma, reconhece e fosforila uma proteína de membrana chamada PIP2, que passa a ser chamada de Fosfatidilinositol-(3, 4, 5)-trifosfato (PIP3) (Dionne et al., 2006). Por sua vez, a PIP3 ativa a serina-treonina quinase, denominada *Protein Kinase B* (PKB ou AKT) que é a responsável pela fosforilação do fator de transcrição FOXO no citoplasma ou no núcleo, impedindo-o de se translocar para o núcleo (citoplasma) ou de se ligar ao DNA (núcleo) (Hay, 2011) (Fig. 3). Após a fosforilação, a FOXO é ubiquitinado diversas vezes, fato que o compromete à proteólise (Horst & Burgering, 2007). A ativação da via PI3K/AKT pode ser regulada negativamente pela fosfatase Pten (*phosphatase and tensin homolog*), a qual reduz a atividade de PIP3, e por PP2A (*protein phosphatase 2A*), a qual, por sua vez, desfosforila AKT em um resíduo de serina (Rahul & Dobens, 2015).

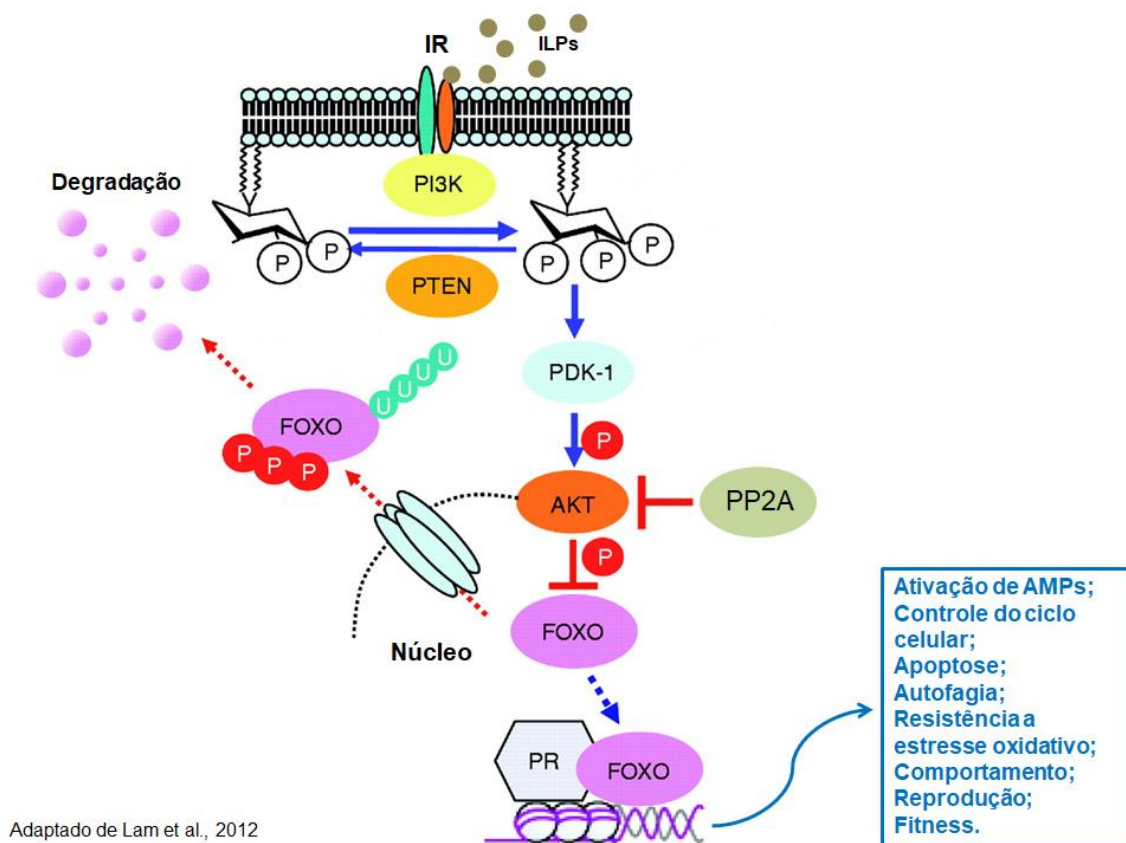


Figura 3: Resumo da via PI3K/AKT/FOXO (Adaptado de Lam et al., 2012).

Em *A. aegypti* são escassos os relatos sobre o papel desempenhado pela via PI3K/AKT. Apesar disso, foi visto que mosquitos transgênicos, capazes de superexpressar *akt* no corpo gorduroso, apresentaram maior taxa de sobrevivência quando comparados a mosquitos selvagens (Arik et al., 2015). Em um amplo trabalho, que envolveu a caracterização de membros da família *forkhead box* (Fox) em *A. aegypti*, foi demonstrado que o silenciamento de FoxO levou a uma diminuição da expressão de vitelogenina, resultando em significativamente menos ovos depositados (Hansen et al., 2007).

1.7 Microbiota Simbionte

Os mosquitos, assim como os demais insetos, têm seu intestino-médio colonizado por uma microbiota simbionte que é necessária para o seu desenvolvimento (Dillon & Dillon 2004) e para o funcionamento de diversos processos fisiológicos como digestão, nutrição, reprodução (Gaio et al. 2011), maturação do sistema imune (Weiss et al. 2011) bem como proteção contra patógenos (Hurst & Hutchence 2010). Neste sentido, a influência que tais relações exercem sobre os insetos é uma forte justificativa para investigações do uso da microbiota para o controle das doenças transmitidas por vetores (Cirimotich et al. 2011b).

Estudos recentes indicam que a microbiota intestinal é um fator determinante na competência vetorial dos mosquitos. A remoção da microbiota do intestino destes insetos através de um tratamento com antibióticos resultou em níveis mais altos de infecção por *Plasmodium falciparum* em *Anopheles gambiae* (Dong et al. 2009) e DENV em *A. aegypti* (Xi et al. 2008), sugerindo que tais bactérias protegem os insetos contra infecções por vírus e protozoários. Embora este mecanismo ainda seja amplamente desconhecido, a hipótese mais aceita é a de que a microbiota promova uma estimulação basal do sistema imune dos mosquitos, o que resulta em um aumento na produção das moléculas efectoras que os defendem das infecções com patógenos humanos como o *P. falciparum* e o DENV (Cirimotich et al. 2011b).

De fato, existe um compartilhamento funcional nas repostas imunes inatas induzidas por bactérias e parasitas em vetores de doenças. Dados gerados através de microarranjos de DNA revelaram uma sobreposição substancial na ativação de genes do

sistema imune inato de *A. gambiae* submetidos a uma infecção bacteriana sistêmica ou infecção oral com *Plasmodium*. Alguns destes genes codificam moléculas efetoras que protegem o mosquito especificamente contra bactérias, ao passo que outros apresentam dupla função: antibacteriana e anti-*Plasmodium* (Dong et al. 2006). No entanto, nenhum gene apresenta ação específica contra o protozoário, sugerindo que o mosquito utiliza parte da resposta antibacteriana para conter o desenvolvimento do *Plasmodium* (Dong et al. 2006; Meister et al. 2009).

Uma quantidade significativamente menor de estudos tem se dedicado a elucidar a influência da microbiota intestinal de *A. aegypti* na infecção e transmissão do DENV. Com o propósito de entender melhor as complexas interações recíprocas entre a microbiota, o mosquito e o DENV, Ramirez et al. (2012) analisaram a flora microbiana cultivável de populações naturais de *A. aegypti* coletadas no Panamá. As bactérias identificadas eram, na sua maioria, Gram-negativas, sendo mais comuns as das classes Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Bacilli e Alphaproteobacteria, incluindo seis gêneros previamente isolados de diversos mosquitos: *Asaia spp.* (Favia et al. 2007; Gusmao et al. 2010), *Aeromonas spp.*, *Enterobacter spp.*, *Paenibacillus spp.* (Lindh et al. 2005), *Proteus spp.* (Chao & Wistreich 1960) e *Comamonas spp.* (Demaio et al. 1996).

Das bactérias isoladas, duas cepas, *Proteus sp.* e *Paenibacillus sp.*, apresentaram atividade antiviral, pois após serem reintroduzidas ao intestino do mosquito causaram uma redução significativa na replicação do DENV (Ramirez et al. 2012). A reintrodução destas bactérias ao intestino do mosquito induz a transcrição dos peptídeos antimicrobianos Defensina, Cecropina, Lisozima e Atacina, que também são ativados pelo DENV (Xi et al. 2008), sugerindo que tais bactérias causam um efeito inibitório ao vírus através da modulação de genes de imunidade relacionados às vias que governam a resposta anti-dengue (Ramirez et al. 2012), como por exemplo as vias Toll e JAK-STAT.

Além da evidente ação indireta, através da ativação do sistema imune do mosquito, as bactérias podem apresentar diversos mecanismos de ação direta contra o patógeno. A lise de tripanosomas (Castro et al. 2007) e leishmanias (Moraes et al. 2008) pela bactéria *Serratia sp.*, isolada de triatomíneos, foi observada após a formação de biofilme na superfície dos parasitas. Além disso, uma bactéria do gênero *Enterobacter* com potencial anti-*Plasmodium spp.* foi isolada do intestino-médio de anofelinos selvagens capturados na Zâmbia. Esta cepa de bactéria produz espécies reativas de

oxigênio que matam o *Plasmodium* no intestino do mosquito, tornando-o refratário ao parasita (Cirimotich et al. 2011a). Além disso, um estudo recente demonstrou que a incubação do vírus La Crosse (família Bunyaviridae) com bactérias isoladas de mosquitos *A. albopictus* coletados na natureza causa uma redução na capacidade infectiva do vírus em experimentos *in vitro*, na ausência de fatores do vetor (Joyce et al. 2011), sugerindo que as bactérias podem interferir diretamente nos processos de reconhecimento, internalização e/ou replicação viral.

As interações tripartites mosquito-microbiota-patógeno são recíprocas, de modo que a infecção com o vírus Chikungunya ou *P. falciparum* é capaz de induzir uma mudança na diversidade da microbiota intestinal dos mosquitos *A. albopictus* (Zouache et al. 2012) e *A. gambiae* (Boissière et al. 2012), respectivamente. De modo surpreendente, *A. gambiae* infectados com *P. falciparum* passam a portar uma quantidade relativa extremamente maior de bactérias da família Enterobacteriaceae, em que estão inseridas bactérias com potencial direto anti-*Plasmodium* (Cirimotich et al. 2011a).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Elucidar os mecanismos fisiológicos controlados pela via PI3K/AKT, bem como sua influência sobre a homeostase e a microbiota intestinal em *A. aegypti*.

2.2 Objetivos específicos

- ✚ Analisar as respostas transcricionais globais moduladas pela via PI3K/AKT;
- ✚ Avaliar a influência da via PI3K/AKT sobre a homeostase e a microbiota bacteriana de *A. aegypti*;
- ✚ Investigar os mecanismos pelos quais a via PI3K/AKT controla tais processos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Mosquitos

Todos os experimentos foram realizados usando *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller mantidos em colônia. Para induzir a eclosão homogênea das larvas, foi utilizada uma câmara de vácuo durante 40 minutos. Os mosquitos adultos foram alimentados com sacarose 10% autoclavada e foram mantidos em uma câmara sob condições padrões de insetário a temperatura de 28 ± 1 °C, com umidade de $80 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12h claro/12h escuro.

3.2 Silenciamento gênico por RNAi

3.2.1 Desenho experimental do silenciamento gênico e obtenção das amostras

Mosquitos da linhagem Rockefeller foram separados em dois grupos testes (dsAKT ou dsPP2A) e um grupo controle (dsLacZ). Cada grupo foi microinjetado com o seu respectivo dsRNA e coletado em *pools* nos dias que se seguiram (Fig. 4). A descrição de cada etapa da metodologia é detalhada nas seções seguintes.

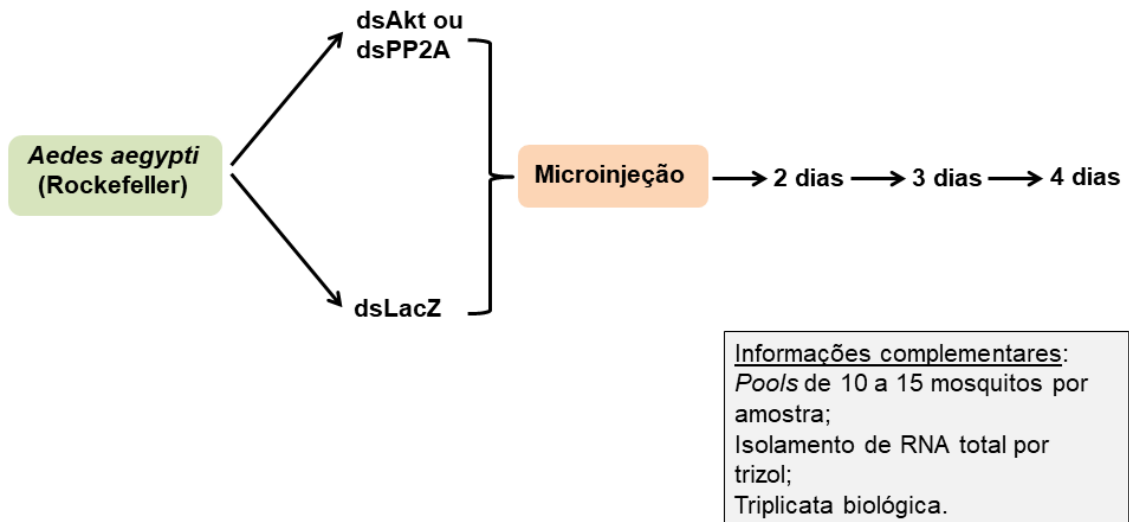


Figura 4: Principais etapas do desenho experimental para o silenciamento gênico realizado neste trabalho.

3.2.2 Síntese de RNA dupla fita

Os dsRNAs utilizados no silenciamento foram sintetizados *in vitro* a partir do produto amplificado de cDNA para os genes Akt, FoxO e PP2A, cujos *primers* (Tabela 1) para os genes continham o promotor T7 nas extremidades das sequências. (Figura 5). As condições do termociclador para geração do *template* de DNA para posterior síntese de dsRNA foram de: 95 °C por 3 minutos; 35 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 58 °C por 45 segundos e 72 °C por 45 segundos; e 72 °C por 7 minutos. A transcrição *in vitro* foi realizada com o *kit* HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England BioLabs) de acordo com as recomendações do fabricante. A precipitação do dsRNA foi realizada adicionando 0,1 (v/v) de acetato de sódio 7,5M e 2,5 (v/v) de etanol absoluto, seguido de uma centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. O dsRNA foi lavado com 500 µL de etanol 75% e uma nova centrifugação com os mesmos parâmetros da anterior foi realizada. O dsRNA foi ressuscendido em 20 µL de água ultrapura. Por fim, as concentrações de todas as amostras foram determinadas pelo *NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000* (Uniscience) e ajustadas para 3 µg/µL.

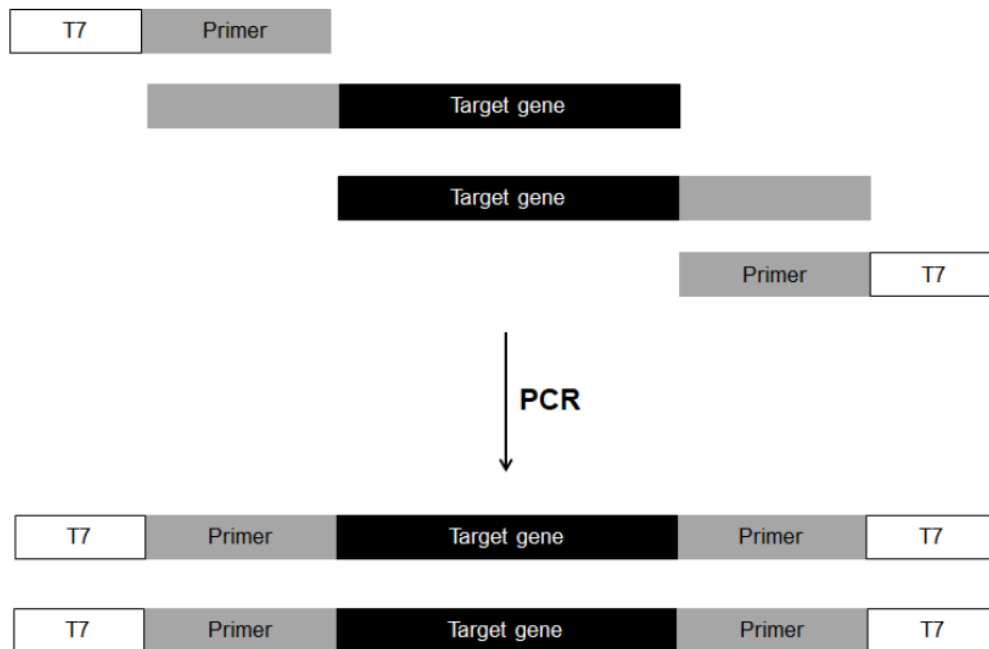


Figura 5: Esquema da estratégia utilizada para geração do template de DNA para posterior síntese de dsRNA.

3.2.3 Microinjeção

As microinjeções para as três réplicas independentes foram realizadas de acordo com Shahabuddin et al. (1998). Resumidamente, fêmeas de *A. aegypti* anestesiadas em um cooler a 0°C foram microinjetadas com 69 nL de dsRNA na concentração de 3 µg/µL para *foxO*, *akt*, *PP2A* ou *lacZ* (grupo controle). No caso dos silenciamentos duplos, os mosquitos foram microinjetados com 138 µL de dsRNA na concentração de 3 µg/µL para *akt* e *pgc-1a*, *akt* e *nos* ou *lacZ*. Após as injeções, os insetos foram mantidos em gaiolas sob as mesmas condições descritas de temperatura, umidade e alimentação (Xi et al., 2008). Os pools de 10–15 fêmeas por amostra foram retirados da gaiola após 1, 2, 3 e 4 dias de microinjeção. As cabeças foram removidas e o restante foi macerado em microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de TRIzol e armazenados em um freezer -80 °C.



Figura 6: Fotografia ilustrando o aparelho Nanoject II™ utilizado para microinjeção neste estudo.

3.3 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

3.3.1 Isolamento de RNA total

Os microtubos de 1,5 mL com tecido macerado em 500 μ L de TRIzol foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. Após a fase líquida ser transferida para um novo tubo, todas as amostras receberam 100 μ L de clorofórmio, foram agitadas vigorosamente por inversão, incubadas por 3 min à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi cuidadosamente

transferida para um novo tubo, de forma a evitar o carreamento de DNA genômico, que se encontra na interfase aquosa/orgânica. Ao material do novo tubo foi adicionado 250 µL de isopropanol. O RNA foi precipitado por 3 min à temperatura ambiente e em seguida centrifugado a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C. O *pellet* foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 75%. A cada lavagem, o material foi agitado com auxílio de um vórtex e centrifugado a 7.500 rpm por 5 min a 4 °C. Ao final, o material foi seco à temperatura ambiente por aproximadamente 10 min e ressuspendido em 20 µL de água ultrapura. As concentrações de RNA foram determinadas pelo espectrofotômetro *NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000* (Uniscience) para todas as amostras que foram imediatamente armazenadas a -80 °C.

3.3.2 Tratamento com DNase

Do total de RNA extraído, 1 µg foi tratado com o *kit* RQ1 RNase-Free DNase (Promega) de modo a eliminar eventuais resquícios de DNA genômico (gDNA) presente nas amostras de RNA. Para isso, as amostras foram incubadas por 2 horas a 37 °C, seguido pela adição de EDTA 1: 10 (v/v), que age como um agente quelante da reação, impedindo que a DNase aja após a síntese de cDNA.

3.3.3 Síntese de cDNA

Após a etapa do tratamento por DNase, o RNA, livre de DNA genômico, foi usado como molde para a síntese de cDNA. A síntese foi realizada a partir do *kit* RevertAid First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher). As condições do termociclador foram: 25 °C por 5 minutos; 42 °C por 1,5 horas; e 70 °C por 5 minutos. Após sintetizados, os cDNAs de cada grupo experimental foram diluídos 1/10 em água ultrapura e armazenados a -20 °C.

3.3.4 qRT-PCR

As reações de qRT-PCR foram executadas no *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) com o *kit* Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo Fisher). O *housekeeping rp49* foi adotado como gene normalizador das reações (Bonizzoni et al., 2011). Para cada reação foram utilizados 7,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix, 3 µL de primers e 4,5 µL de cDNA. As condições do equipamento foram de: um ciclo inicial de 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 30 segundos, finalizado por uma análise de curva de *melt*, para todas as reações. A análise da expressão gênica seguiu o método $\Delta\Delta C_T$ (Livak & Schmittgen, 2001). Os gráficos e análises estatísticas foram realizados no *software* *GraphPad Prism 7*.

3.3.5 Lista de *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR

As sequências de *primers*, disponíveis na Tabela 1, foram obtidas a partir das sequências completas de cada gene depositadas no *VectorBase* para *A. aegypti*. A ferramenta *online Primer3* foi utilizada para o delineamento dos *primers*, enquanto análises posteriores ao delineamento, tais como tamanho da sequência amplificada; taxa de CG; taxa de formação de *hairpin*; taxa de autodimerização; taxa de heterodimerização e temperatura de *melting* (TM), foram executadas no *Oligo Analyser*.

Tabela 1: *Primers* utilizados para síntese de dsRNA e qRT-PCR, respectivamente.

Nome ^a	Sequência
dsAkt-F	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAC GCG AGA GCT TTG GAA TTA 3'
dsAkt-R	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAT TGT AGG CCT CGG ATG ATG 3'
dsFoxO-F	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAG CGT CGG TGA GTT TGT AAC AAG AGA GTG TGC GTA T 3'
dsFoxO-R	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTG GTG GCG GAT GAC GCT GAT TGC GGT TGG TTC 3'
dsLacZ-F	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GTC AGT GAG CGA GGA AGC 3'
dsLacZ-R	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTA TCC GCT CAC AAT TCC ACA 3'

dsNOS-F	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTC AGG AAT GCT GTT CGA CTG 3'
dsNOS-R	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTG CGT TTT GAG TGC AGA TTC 3'
dsPGC-1a-F	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TGA ATC CGA GTC CGA AAA 3'
dsPGC-1a-R	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTG TTT AGC TGC TTG CAT TGG 3'
dsPP2A-F	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA TAC CTG AGC AGC CAG CAG 3'
dsPP2A-R	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCA GTC TTG AGG AAG TCG CGT 3'
Akt-F	5' GGA CCA AAC GAC GTT AAG GA 3'
Akt-R	5' GTT AGC TCG ACG CTT TCA CC 3'
Argonata 2-F	5' CTG GCC TTT AGC GAG TTC AC 3'
Argonata 2-R	5' CCT TGA CCT CCT GCT CGT AG 3'
Attacin-F	5' TTA GGT CTG GGC GGT AAC AC 3'
Attacin-R	5' GAA GTG AGT GGG AAC CGA AA 3'
Bacterial 16S-F	5' TCC TAC GGG AGG CAG CAG T 3'
Bacterial 16S-R	5' GGA GTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT 3'
Cecropin E-F	5' TTG CAC TCG TTC TGC TCA TC 3'
Cecropin E-R	5' ACA CGT TTT CCG ACT CCT TC 3'
Cecropin G-F	5' CCA AGC CTT GTG AAC CAG TA 3'
Cecropin G-R	5' GGC CAC CTG CTT CAG ACT 3'
Defensin-F	5' GAT TCG GCG TTG GTG ATA GT 3'
Defensin-R	5' TTA TTC AAT TCC GGC AGA CG 3'
Diptericin-F	5' AGC TAC CCA CCA ACA GGA TG 3'
Diptericin-R	5' CCT GAA ATC CAC CGA AAT GT 3'
FoxO-F	5' GGT GGC CTT GAG GGT CTA TC 3'
FoxO-R	5' CAG AGG CCA GGT ATT GGA AC 3'
ND2-F	5' CCT GAT TAG GAG CTT GAA TAG GA 3'
ND2-R	5' TTG AAG AAG CGA AAG CTT GA 3'
ND3-F	5' TCC ATT TGA ATG TGG ATT CG 3'
ND3-R	5' GGA TTA AAG CAA TTT CTA CAT CAA AAA 3'
ND4L-F	5' TTT CTA GTC GTA AGC ATT TAC TTT GT 3'
ND4L-R	5' CCC CTT CAC AAA CAC AAA AA 3'
NOS-F	5' TCA GGA ATG CTG TTC GAC TG 3'
NOS-R	5' GCA GAT TCC TCC GGT TGA TA 3'
PGC-1a-F	5' GAG GAC AGC GGT TCA GAT TC 3'
PGC-1a-R	5' TTT GTG TCG TCG TCT TTT CG 3'
Pias-F	5' GCT GCA ACG CAT GAA AAC TA 3'
Pias-R	5' CAG ACG GGA CAG TTC CAA GT 3'

PP2A-F	5' TCC AGA AGC TAC GTC AGT GC 3'
PP2A-R	5' GCT GCT CAG GTA TTC GAC CA 3'
Rp49-F	5' ACA AGC TTG CCC CCA ACT 3'
Rp49-R	5' CCG TAA CCG ATG TTT GGC 3'
Socs-F	5' GGA ACG AAA CGG AAA ACA GA 3'
Socs-R	5' TCT ACT GGG GCA AAA TGG AC 3'
STAT-F	5' TTC AGA AGC ACA AGC ACA GG 3'
STAT-R	5' AGC AAA GCG AAC TTC TCG TC 3'

^a-F = primer forward; -R = primer reverse.

3.4 Ensaio de H₂O₂ liberado

A liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a partir dos intestinos médios de mosquitos microinjetados tanto para dsAKT quanto para dsLacZ foi avaliada com o auxílio do kit *Amplex™ Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit*, conforme orientações do fabricante. Resumidamente, fêmeas de *A. aegypti* anestesiadas em um cooler a 0°C tiveram seus intestinos médios dissecados e colocados em 50 µL de PBS, em contato com gelo. Para cada grupo experimental (dsAKT e dsLacZ), 15 intestinos médios foram dissecados, em no máximo 30 minutos. Em seguida, aos 50 µL de PBS contendo o pool de intestinos médios, foram adicionados 50 µL da seguinte mistura:

	1X	2,5X
Amplex® Red (100 µM)	1	2,5
Horseradish peroxidase/HRP (0,2 U)	20	50
PBS (1X)	29	72,5
Volume final	50 µL	50 µL/Tubo

Deste modo, os intestinos médios de ambas as condições experimentais foram incubados em PBS na presença de *Amplex® Red* e *Horseradish peroxidase/HRP*, por 30 minutos, à temperatura ambiente e com luz fraca.

Após os 30 minutos de incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, por 3 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante coletado.

A fluorescência (Excitação: 530 nm; Emissão: 590 nm) foi medida pelo Qubit® (Life Technologies), e comparada a uma curva padrão de peróxido de hidrogênio.

Duas réplicas biológicas foram realizadas.

3.5 Transcriptoma

O transcriptoma foi realizado com as amostras de RNA geradas pelos experimentos de silenciamento entre Akt vs. LacZ.

O protocolo para preparação das bibliotecas foi executado segundo recomendações do fabricante (SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep for Illumina Multiplexed Sequencing), sendo as principais etapas brevemente descritas abaixo.

3.5.1 Quantificação fluorimétrica

Os *pools* de RNA foram analisados quantitativamente e qualitativamente pelo Qubit® (Life Technologies). Este passo é importante para determinar a quantidade de RNA total inicial para síntese de cDNA que deve estar entre 50 ng e 4 µg, bem como para verificar a qualidade de cada *pool*.

3.5.2 Purificação de poli(A) RNA a partir de RNA total

Nesta etapa, os RNAs que apresentam cauda poli-A são purificados a partir do *pool* de RNA total de cada amostra. A purificação se dá com o uso de *beads* magnéticas que possuem, em sua superfície, oligos dT que se ligam às caudas poli-A dos RNAs mensageiros.

3.5.3 Fragmentação de poli(A) RNA

Após a purificação dos RNAs com cauda poli-A, estes são quimicamente fragmentados em pequenos pedaços utilizando cátions divalentes sob alta temperatura,

isto resultou em bibliotecas com fragmentos variando de 120-200 pares de base (pb), com um tamanho médio de 150 pb.

3.5.4 Síntese da primeira fita de cDNA

Os fragmentos de RNA clivados foram utilizados para a síntese da primeira fita de cDNA utilizando transcriptase reversa e iniciadores randômicos. Neste processo há também a adição de actinomicina D (*First Stand Synthesis Act D mix - FSA*), que impede a síntese de cadeia DNA-dependente, permitindo a síntese somente de cadeia RNA-dependente, melhorando a especificidade da amplificação.

3.5.5 Síntese da segunda fita de cDNA

Em seguida foi realizada a síntese da segunda fita de cDNA utilizando uma DNA polimerase I e RNase H. Este processo remove o RNA molde e sintetiza uma cadeia de substituição, incorporando dUTP (que serão posteriormente excisados da dupla fita de cDNA pela ação da enzima Uracil-DNA Glycosylase (UDG)) no lugar de dTTP para gerar o cDNA dupla fita. *Beads* magnéticas *AMPure XP* foram utilizadas para purificar o cDNA dupla fita. Ao final deste processo foi obtido o cDNA *blunt-ended* (DNA sem pontas sobressalentes).

3.5.6 Adenilação, ligação e enriquecimento

Para dar prosseguimento ao preparo das bibliotecas foi realizada a adenilação (adição de uma única adenina "A") das extremidades 3' dos fragmentos *blunt-ended* para impedir a ligação um ao outro durante a reação de ligação dos adaptadores. Assim um nucleotídeo "T" na extremidade 3', correspondente único do adaptador, fornece uma saliência complementar para a ligação do adaptador ao fragmento. Essa estratégia garante uma baixa taxa de formação de quimera (modelo concatenado). Com os fragmentos adenilados, foi realizada a ligação dos adaptadores de indexação nas

extremidades dos cDNA dupla fita, preparando-os para a hibridização na *flow cell*. O enriquecimento dos fragmentos foi realizado por PCR com o uso de *primers* que se anelam com as extremidades dos adaptadores, enriquecendo seletivamente fragmentos que possuem moléculas adaptadoras ligadas em ambas as extremidades, amplificando assim a biblioteca de DNA. Fragmentos com apenas um ou sem adaptadores nas suas extremidades são subprodutos da reação de ligação. Nenhum destes fragmentos pode ser utilizado para formar *clusters*. Fragmentos sem quaisquer adaptadores, não podem hibridizar com iniciadores ligados à superfície da *flow cell*. Os fragmentos com um adaptador em apenas uma extremidade pode hibridizar aos iniciadores ligados à superfície da *flow cell*, mas não podem formar *clusters*.

3.5.7 Avaliação da qualidade das amostras

A avaliação da qualidade das bibliotecas foi realizada na empresa Genotype, por meio do Caliper (HT DNA LabChip® Kit) (Figura 7).

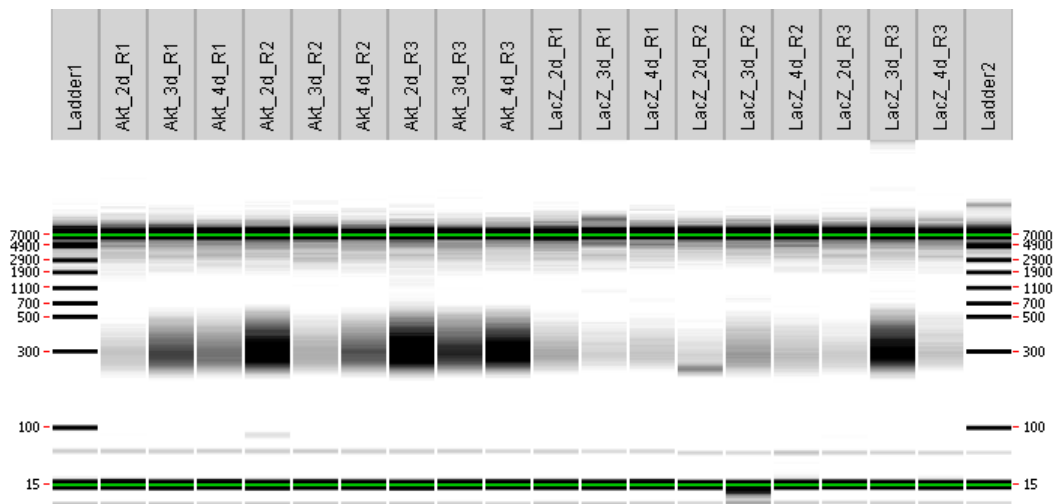


Figura 7: Figura gerada a partir do equipamento Caliper mostrando, por meio de um gel digital, a qualidade das bibliotecas de cDNA.

3.5.8 Quantificação por qPCR

Quantificações absolutas baseadas em qPCR usando o KAPA Library Quantification Kit Illumina® foram realizadas individualmente para todas as bibliotecas de cDNA. A quantificação foi feita no equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). A técnica utiliza *primers* que se anelam aos adaptadores Illumina presentes nas amostras de cDNA e realiza a quantificação a partir de 6 padrões com concentrações conhecidas. Após a quantificação, a concentração de cada amostra foi ajustada para 4 nM. Bem definidas as concentrações das amostras, estas foram homogeneizadas em um mesmo volume individual, formando um *pool* que passou por outra quantificação absoluta para confirmação da concentração de 4 nM, ideal para o sequenciamento.

3.5.9 RNA-seq

O transcriptoma das amostras de fêmeas de *Aedes aegypti* silenciadas para o gene Akt, assim como para o grupo controle (dsLacZ), foi realizado em um sequenciador NextSeq 500. O kit utilizado para o sequenciamento foi o High Output Flow Cell Cartridge v2, que acompanha uma *flow cell* de 400 milhões de *reads* de capacidade. O sequenciamento empregado foi do tipo paired-end, com 151 ciclos para cada extremidade da fita de DNA. Ao todo, foram 503 milhões de *reads* após filtragem (*Passing Filter* - PF), com a seguinte distribuição, por lane, na *flow cell*: Lane 1: 138,783,440; Lane 2: 130,724,960; Lane 3: 118,398,904; Lane 4: 117,716,680. É possível observar a distribuição de *reads* (para um total de 503 milhões) por biblioteca por meio da Tabela 2, abaixo:

Número dos Índice	Identificação das amostras	Índex 1 (I7)	Reads por amostra	% Reads identificados (PF)
1	LacZ_3d_R1	CATCAAGT	24.996.585	4.9695
2	Akt_3d_R3	AGTCACTA	23.429.237	4.6579
3	LacZ_3d_R3	AGCCATGC	23.102.287	4.5929

Número dos Índice	Identificação das amostras	Índex 1 (I7)	Reads por amostra	% Reads identificados (PF)
4	LacZ_2d_R1	GGAGAACA	45.472.709	9.0403
5	LacZ_2d_R3	CTGAGCCA	24.008.693	4.7731
6	LacZ_4d_R2	CCTAATCC	23.779.325	4.7275
7	LacZ_4d_R1	AAGGTACA	26.654.976	5.2992
8	LacZ_2d_R2	CGCTGATC	30.161.892	5.9964
9	Akt_2d_R2	ATCCTGTA	27.347.607	5.4369
10	LacZ_4d_R3	GTACGCAA	17.997.843	3.5781
11	Akt_2d_R3	ACACGACC	19.430.387	3.8629
12	LacZ_3d_R2	GGTGCGAA	22.796.463	4.5321
13	Akt_3d_R2	CTGTAGCC	28.597.562	5.6854
14	Akt_4d_R1	CAGATCTG	21.611.898	4.2966
15	Akt_3d_R1	GCTAACGA	29.086.981	5.7827
16	Akt_4d_R3	AACGCTTA	19.421.333	3.8611
17	Akt_4d_R2	GCTCGGTA	25.591.634	5.0878
18	Akt_2d_R1	AACTCACC	38.909.062	7.7354

Tabela 2: Distribuição de reads por biblioteca.

O gráfico da figura 8 representa a densidade de clusters ao longo das 4 lanes da *flow cell*. Em verde são representadas as densidades após o *passing filter*.

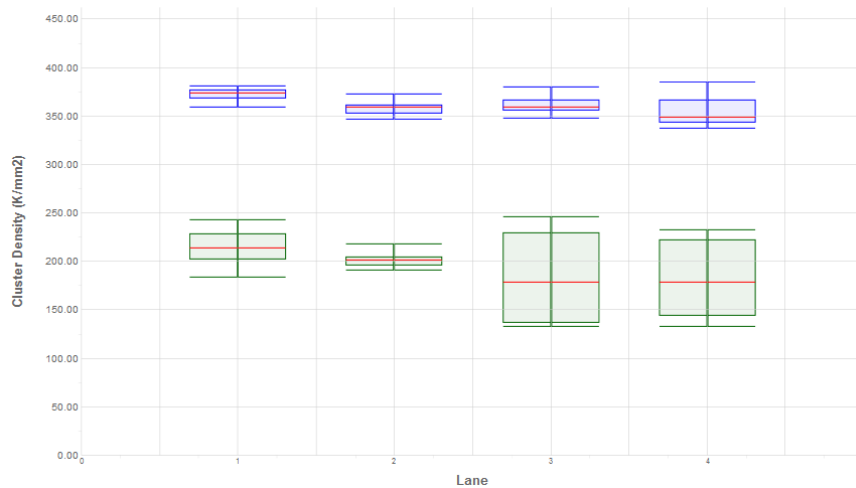


Figura 8: Densidade de clusters ao longo das 4 lanes da flow cell.

O percentual de Q30 (probabilidade de inserção incorreta de base de 1 em 1000) ao longo dos ciclos, para ambas as extremidades das fitas de DNA é mostrado na figura 9:

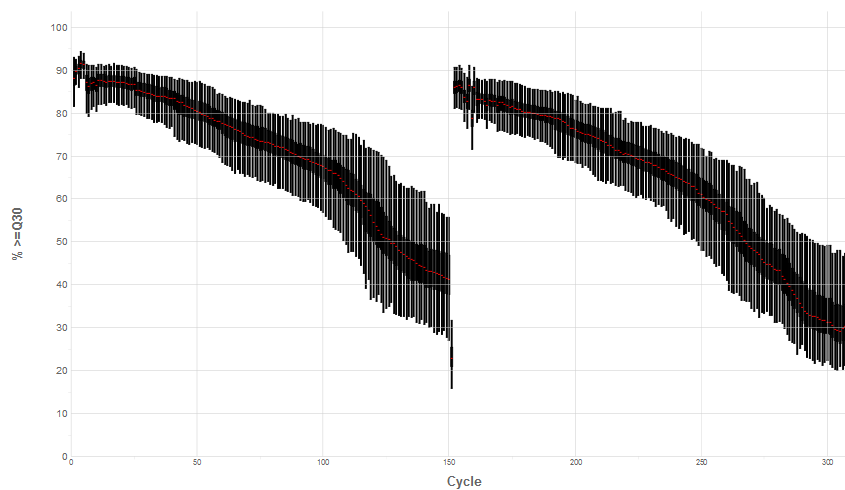


Figura 9: Percentual de Q30 ao longo dos ciclos.

A intensidade de fluorescência dos canais verde e vermelho pode ser visualizada na figura 10:

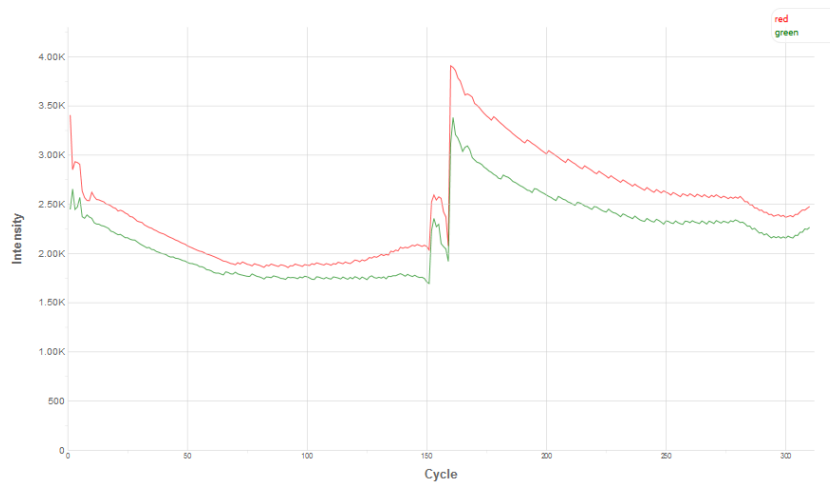


Figura 10: Intensidade dos canais verde e vermelho ao longo dos ciclos.

3.5.10 Análise de dados do transcriptoma

A análise dos dados foi realizada na plataforma *CLC Genomics Workbench* versão 10 (<http://www.clcbio.com>) (Qiagen). Brevemente, as *tags* foram mapeadas utilizando-se como referência a anotação genômica da cepa Liverpool de *Ae. aegypti* (versão AaegL3, depositada em abril de 2014). Foi assumido que o nível de acúmulo dos RNAs poli-adenilados reflete as mudanças na atividade transcricional do gene correspondente e estimado em termos de *reads per kilobase per million mapped reads* (RPKM) (Mortazavi *et al.*, 2008). A expressão diferencial de genes entre as diferentes condições experimentais (Akt vs. LacZ) foi determinada pelos testes de proporções com o valor *p* de 0,05 e *false discovery rate* (FDR) menor ou igual a 0,05 (Benjamini & Hochberg, 1995).

3.6 Microbioma

O 16S rRNA possui uma grande diversidade de regiões, dentre as quais, algumas são extremamente conservadas entre eubactérias. Por outro lado, também há regiões hipervariáveis, que podem ser utilizadas como sequências de diferenciação taxonômica. A estratégia utilizada por Caporaso *et al.* (2010) utiliza *primers* complementares a regiões conservadas, ou seja capazes de anelar teoricamente em todas as eubactérias,

que amplificam entre elas a mesma região hipervariável V4. Dessa forma, é possível comparar o produto amplificado com um banco de dados contendo essas regiões em diferentes táxons. O que permite avaliar o efeito do silenciamento sobre diversidade bacteriana.

As amostras de cDNA sintetizadas a partir dos experimentos de silenciamento gênico entre Akt vs. LacZ foram utilizadas também para avaliação microbiômica.

3.5.1 Inserção dos adaptadores e indexes à biblioteca

A preparação inicial da biblioteca consiste em adicionar, nas amostras, os adaptadores Illumina com seus correspondentes índices para o sequenciamento. A adição ocorreu por meio de uma PCR para a qual foram utilizados *primers* capazes de amplificar a região hipervariável V4 do rRNA 16S, como descrito por Caporaso et al. (2010). O esquema da Figura 11 exemplifica o método.

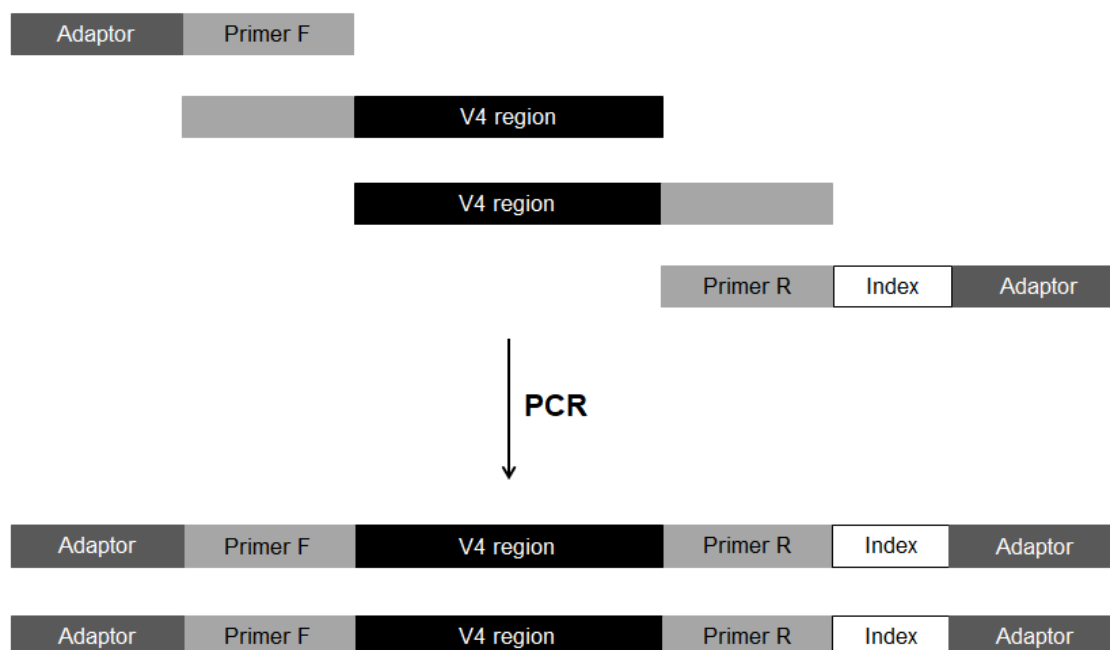


Figura 11: Figura esquemática ilustrando a estratégia de uso dos primers utilizados na preparação das bibliotecas para o sequenciamento do microbioma.

Para inserir os adaptadores e seus respectivos índices na sequência da região alvo de utilizado um único *primer forward* (F) para todas as amostras e um *primer reverse* (R) diferente para cada amostra, cada qual contendo seu próprio índice antes do

adaptador. Dessa forma, ao final da reação, todos os *amplicons* apresentaram ambas as sequências e cada amostra passou a ser diferenciada pelo seu índice.

3.5.2 Primers

Os *primers* utilizados no método definido por Caporaso et al. (2010) foram idealizados especificamente para análises de microbioma bacteriano a partir do rRNA 16S, presente na subunidade menor do ribossomo bacteriano. Os *primers*, utilizados nessa estratégia são separados em 5 diferentes regiões: a primeira é do adaptador Illumina; a segunda é do índice referente à amostra; a terceira e a quarta são sequências estabilizadoras entre as sequências anteriores e a do *primer*; e a quinta é a região do *primer* referente à região constante do RNA ribossomal 16S. O *primer forward* (F) é o mesmo para todas as amostras e não possui a segunda região descrita anteriormente (515F 5'– AATGATACGGCGACC ACCGAGATCTACAC TATGGTAATT GT GTGCCAGCMGCCGCGGTAA –3'). Já os *primers reverse* (R) seguem na Tabela 3.

Tabela 3: Primers, adaptadores e índices para o sequenciamento Illumina.

Amostra ^a	Iniciadores ^b
dsAkt 2d R1	806rcbc60 (5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCAATTGAC AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsAkt 3d R1	806rcbc61 (5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGGAGTCTCAT AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsAkt4d R1	806rcbc62 (5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCTCGAAGATTC AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsAkt 2d R2	806rcbc77 (5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCATGTCCCGT AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsAkt 3d R2	806rcbc78 (5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTACGATATGAC AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsAkt 4d R2	806rcbc79 (5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGGTGGTTTCC AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsAkt 2d R3	806rcbc83 (5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTTCTCTTCTCG AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsAkt 3d R3	806rcbc84 (5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTAAGATGCCT AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsAkt 4d R3	806rcbc85 (5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGTTCTAGCTG

		AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsLacZ 2d R1	806rcbc63	(5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGGCTTACGTGT AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsLacZ 3d R1	806rcbc64	(5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCTACCACTC AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsLacZ 4d R1	806rcbc65	(5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACTTCCAACCTC AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsLacZ 2d R2	806rcbc80	(5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAGTATGCGCAA AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsLacZ 3d R2	806rcbc81	(5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGCGCTGAATGT AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsLacZ 4d R2	806rcbc82	(5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATGGCTGTCAGT AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsLacZ 2d R3	806rcbc86	(5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTTGTTCTGGGA AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsLacZ 3d R3	806rcbc88	(5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTCACAACCGTG AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')
dsLacZ 4d R3	806rcbc87	(5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGACTTCCAGCT AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')

^a 2d, 3d e 4d representam respectivamente 1 dia, 2 dias e 3 dias após a microinjeção. Enquanto, R1, R2 e R3 são as três diferentes réplicas biológicas.

^b verde = adaptadores Illumina; azul/vermelho = sequências estabilizadoras; preto = sequência aneladora da sequência constante do *16S rRNA*; e lilás = índices.

3.5.3 Purificação dos produtos de PCR

As amostras foram purificadas com o uso de *beads* magnéticas utilizando o *kit* Agencourt AMPure XP . As *beads* foram homogeneizadas junto às amostras em volume de 1,8 (v/v). As *beads* ligam-se aos *amplicons* permitindo a interação com o suporte magnético (Ambion RNA Life Technologies), resultando na formação de um *pellet* de cDNA-*beads*. O restante da solução foi descartado e foram efetuadas sucessivas lavagens com 200 µL de etanol 70%. As bibliotecas purificadas foram ressuspensas em 40 µL de água ultrapura e armazenadas a -20 °C.

3.5.4 Quantificação por qPCR

As quantificações absolutas baseadas em qPCR usando o KAPA Library Quantification Kit Illumina® foram realizadas nos mesmos moldes daqueles descritos na seção dedicada ao transcriptoma.

3.5.5 Sequenciamento

Ajustada a concentração do *pool*, este foi distribuído em uma *flowcell mid* com capacidade de 15 milhões de *reads*/amostra. As amostras foram sequenciadas pelo método *paired-end* no *MiSeq Personal Sequencer* (Illumina) do Departamento de Genética/IBB/Botucatu com o Kit MiSeq Reagent (Illumina).

3.5.6 Análise de dados do microbioma

Resumidamente, uma planilha de metadados foi criada contendo as diferentes relações entre as condições experimentais, tais como dias, réplicas e grupos experimentais; seguido da importação dos *reads* do *output* do sequenciador em fastq; do *download* do banco de dados (SILVA v119 97%); da otimização dos pareamentos dos *reads*; e do *trimming* para a correção de comprimento das sequências. Após as etapas iniciais de processamento das amostras, seguiu-se para a clusterização das unidades taxonômicas operacionais (OTU). Esta ocorreu por meio da distribuição taxonômica de todas as *tags* agrupadas pelos índices, que processadas a partir de um método de alinhamento global e utilizando as sequências 16S de referência do banco de dados SILVA v119 97%, foram associadas a um determinado táxon para similaridade $\geq 97\%$, sendo descartadas todas as que não possuísem essa identidade mínima. Nos casos em que uma *tag* apresentou similaridade superior a 80% com mais de uma sequência de referência, foi considerada apenas a de maior valor. Para o alinhamento das OTUs utilizou-se o MUSCLE, cujas *tags* foram agrupadas de acordo com sua taxonomia consenso por máxima verossimilhança. Como parâmetros para a análise taxonômica, foram realizadas as análises de diversidade *Alpha* e *Beta*. Com isso, as amostras

avaliadas de diversidade bacteriana dos mosquitos silenciados para *akt* foram dispostas par a par com as do grupo controle *lacZ* em gráficos de coluna no *software CLC Genomics Workbench 10*, para posterior avaliação da modulação de suas abundâncias relativas. Um fluxograma com o resumo das etapas realizadas nesta análise pode ser apreciado abaixo (Fig. 12).

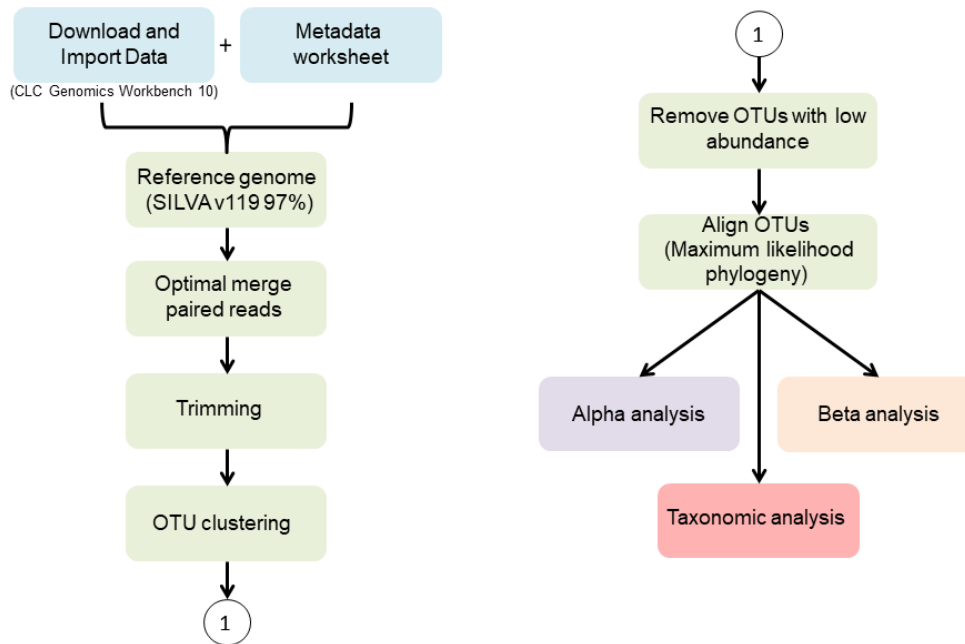


Figura 12: Fluxograma com as principais etapas executadas para a análise do microbioma neste estudo.

4 RESULTADOS

Os resultados descritos abaixo foram divididos em quatro tópicos principais. Para o primeiro deles a análise de expressão gênica por qRT-PCR foi utilizada tanto para validar o silenciamento gênico por RNAi, quanto para avaliar a expressão de genes associados à modulação de outras vias de interesse que poderiam estar sob influência da via PI3K/AKT. A mesma abordagem também foi utilizada para avaliar a carga bacteriana após o silenciamento gênico.

O transcriptoma dos mosquitos silenciados para *akt* contribuiu para elucidar os genes e vias eventualmente relacionados à via PI3K/AKT, direta ou indiretamente. Para tanto, a técnica de RNA-seq foi utilizada para o sequenciamento e análise da expressão gênica em larga escala.

Com o intuito de investigar determinados resultados obtidos a partir do transcriptoma de *A. aegypti* com o gene *akt* silenciado, experimentos tanto de ensaios bioquímicos quanto de duplos silenciamentos foram realizados.

Finalmente, a quarta abordagem é referente à diversidade da microbiota bacteriana, obtida a partir do sequenciamento das regiões hipervariáveis V4 presentes no 16S rRNA bacteriano. Esse tipo de análise gera três resultados: a diversidade *alpha*, que avalia se o sequenciamento foi capaz de resolver a diversidade microbiana nas amostras estudadas; a diversidade *Beta*, que define quais são os principais componentes de agrupamento das amostras; e, por fim, a diversidade taxonômica, que mostra a abundância relativa de diferentes táxons bacterianos.

4.1 Parte I – Silenciamento gênico de *akt* e análise da modulação de genes e vias de interesse

4.1.1 Validação do silenciamento

Para investigar o papel da via PI3K/AKT sobre determinados genes e vias de *A. aegypti*, foram escolhidos três componentes da via: *foxO*, *akt* e *pp2a*. Fêmeas do mosquito foram microinjetadas no tórax com RNA dupla fita para os respectivos genes

e a eficácia do silenciamento gênico induzido por dsRNA foi avaliada pela técnica de PCR em tempo real (Figura 13). As amostras foram obtidas em 1, 2, 3 e 4 dias após a microinjeção.

Dos três genes para os quais os mosquitos foram microinjetados com RNA dupla fita sequência específica, dois obtiveram silenciamento significativo para análises posteriores. *FOXO* não apresentou silenciamento mesmo após duas réplicas biológicas (Fig. 13 A). O silenciamento de *akt*, por outro lado, mostrou ser eficiente nos quatro pontos de tempo adotados no experimento, sendo estatisticamente significativo em todos eles (Fig. 13 B). Da mesma forma, PP2A foi silenciado nos dois pontos testados, como se pode observar no gráfico (Fig. 13 C).

4.1.2 Análise do perfil de expressão de genes e vias modulados após o silenciamento de *akt*

Com o intuito de investigar quais vias são afetadas quando o regulador negativo *akt* está silenciado, em *A aegypti*, foram realizados experimentos para avaliar o perfil de expressão gênica por PCR em tempo real para os genes observados na figura 14.

Apesar de ser inicialmente esperado que o silenciamento de *akt* resultasse em um aumento da expressão de *foxo*, não houve qualquer modulação significativa na expressão do fator de transcrição nos quatro pontos de tempo observados (Fig. 14 A).

A expressão do gene codificador da enzima Óxido nítrico sintetase (NOS), responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), mais especificamente de óxidos nítricos, também foi avaliada. Houve aumento na expressão de *NOS* nos três primeiros dias após o silenciamento de *akt*, com uma variação estatisticamente significativa no segundo dia após a injeção de dsakt (Fig. 14 B). No quarto dia a expressão de *NOS* tende, aparentemente, a atingir níveis basais quando comparado ao grupo controle.

A expressão gênica de PGC-1 α , um regulador chave do metabolismo energético e o principal ativador da biogênese mitocondrial, não foi modulada durante o silenciamento de *akt*, em nossos experimentos (Fig. 14 C).

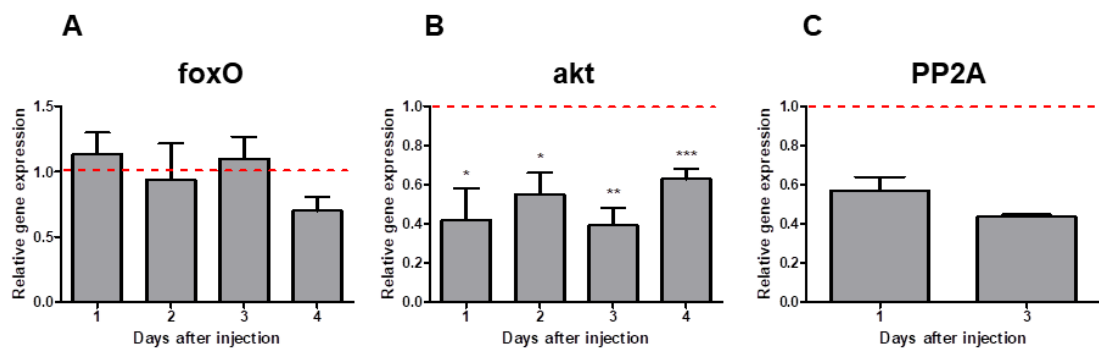


Figura 13: Validação do silenciamento de genes-chaves da via PI3K/AKT em fêmeas de *A. aegypti* microinjetadas com RNA dupla fita para os respectivos genes. qRT-PCR para *foxo*, *akt* e *pp2a* mostrando a expressão dos genes após injeção em 1, 2, 3 e 4 dias. A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de 2 réplicas biológicas independentes para *foxo*, 3 para *akt* e 1 para *pp2a*. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo *Rp49*. O teste t-Student foi aplicado para análise estatística. P-values: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

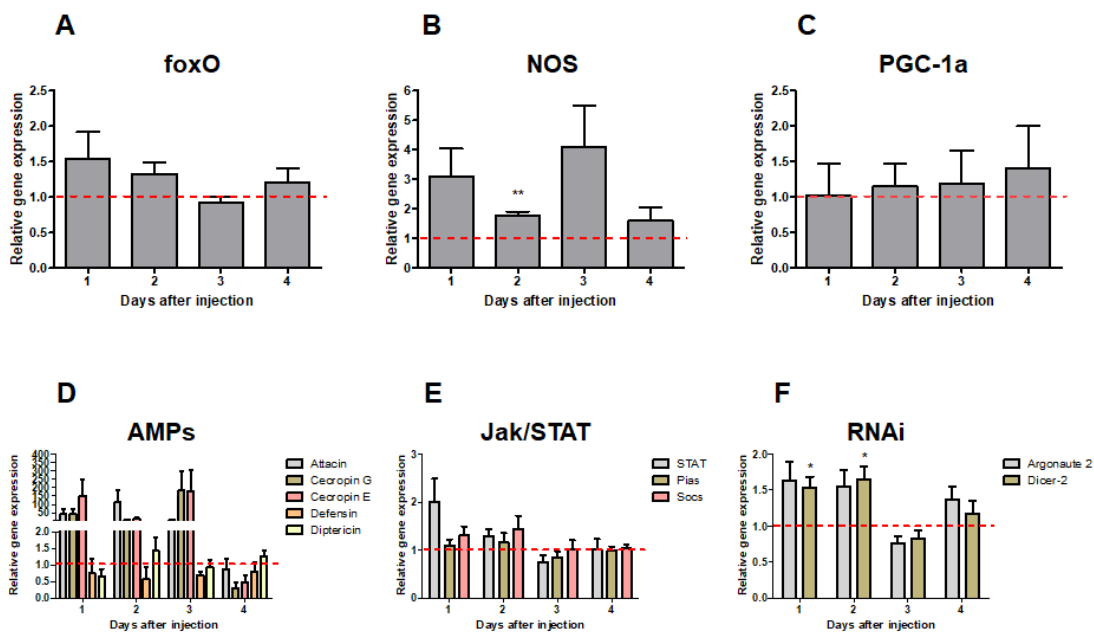


Figura 14: Análise do perfil de expressão de genes e vias modulados após o silenciamento de *akt*. qRT-PCR para *foxo*, *nos*, *pgc-1a*, *attacin*, *cecropin G*, *cecropin E*, *defensin*, *diphtericin*, *stat*, *pias*, *socs*, *argonaute-2* e *dicer-2* mostrando a expressão dos genes após injeção em 1, 2, 3 e 4 dias. A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de 3 réplicas biológicas independentes. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo *Rp49*. O teste t-Student foi aplicado para análise estatística. P-values: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

A análise da expressão gênica de peptídeos antimicrobianos em mosquitos silenciados para *akt* mostrou um drástico aumento no perfil da expressão dos AMPs *atacina*, *cecropina G* e *cecropina E* nos três primeiros dias após a microinjeção com RNA dupla fita para *akt* (Fig. 14 D). Por outro lado, *defensina* e *diptericina* não tiveram suas expressões moduladas em nossos experimentos.

Para avaliar se o funcionamento da via JAK-STAT, um importante componente da resposta antiviral em mosquitos (Souza-Neto et al., 2009), é influenciado pela via PI3K/AKT, a expressão dos genes repórteres STAT, PIAS e SOCS foi investigada. Embora tenhamos observado um aumento na expressão gênica de STAT no primeiro dia após o silenciamento de *akt* (Fig. 14 E), nenhuma mudança foi observada na expressão de *PIAS* e *SOCS*. Esses dados sugerem que a via JAK-STAT não é influenciada pela via PI3K/AKT.

A expressão gênica de componentes cruciais da via de RNA de interferência também foi avaliada no intuito de estabelecer alguma relação com a via PI3K/AKT, tendo em vista que semelhante relação foi descrita para *Drosophila* (Spellberg & Marr, 2015). O gene codificador da enzima Dicer-2 apresentou aumento estatisticamente significativo da expressão nos dois primeiros dias após o silenciamento de *akt*, aparentemente retornando a níveis basais a partir do terceiro dia após a injeção do dsRNA (Fig. 14 F). O perfil de expressão de *argonata-2* foi semelhante ao de *dicer-2* em todos os pontos observados, embora estatisticamente não.

4.1.3 Análise do perfil de expressão de genes e vias modulados após o silenciamento de *pp2a*

Com o intuito de complementar os dados de análise de expressão gênica gerados a partir do silenciamento de *akt*, análises similares foram realizadas após o silenciamento de *PP2A*, que codifica um inibidor de AKT na via PI3K/AKT (Fig. 15).

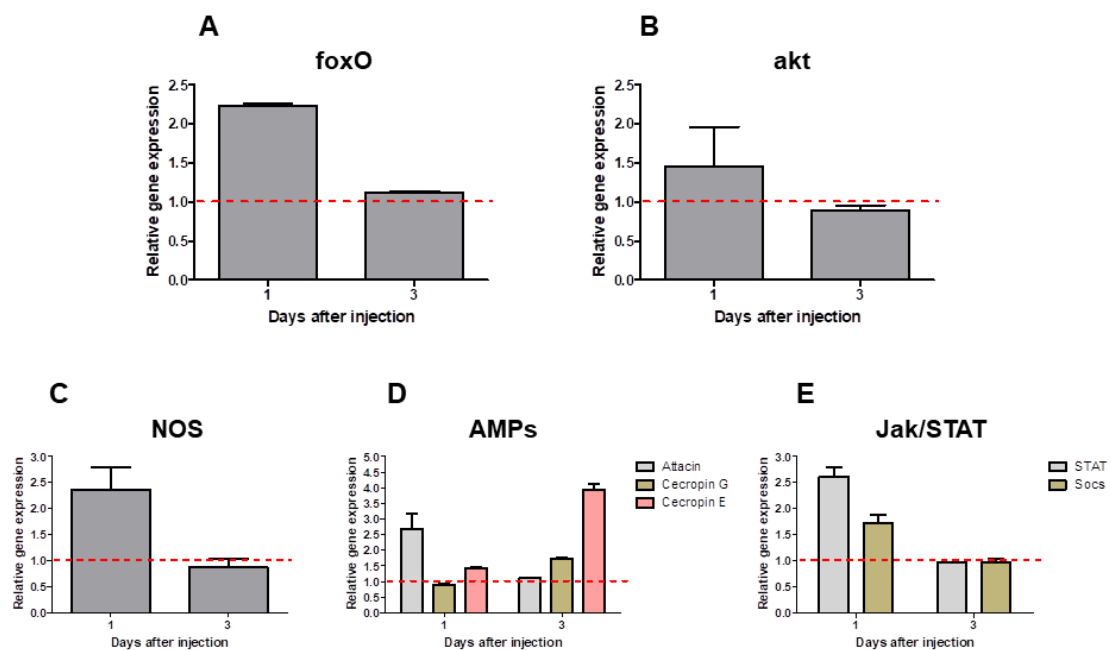


Figura 15: Análise do perfil de expressão de genes e vias modulados após o silenciamento de *pp2a*. qRT-PCR para *akt*, *foxO*, *16S*, *nos*, *attacin*, *cecropin G*, *cecropin E*, *stat* e *socs* mostrando a expressão dos genes após injeção em 1, 2, 3 e 4 dias. A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de 2 réplicas técnicas oriundas de 1 réplica biológica. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo *Rp49*.

Como esperado, nossos ensaios revelaram semelhanças no perfil de expressão de genes modulados pelo silenciamento de *pp2a* ou *akt*. O fator de transcrição *foxO* apresentou aumento da expressão um dia após o silenciamento de *pp2a*, aparentemente retornando a níveis basais no terceiro dia (Fig. 15 A), ao passo que *akt* não foi modulado após o silenciamento de *pp2a* nos dois pontos de tempo avaliados em nossos experimentos (Fig. 15 B). Por outro lado, a expressão de *nos* aumentou aproximadamente duas vezes no primeiro dia após silenciamento de *pp2a* (Fig. 15 C). Com relação aos peptídeos antimicrobianos, *atacina* e *cecropina E* foram regulados positivamente após 1 e 3 dias do silenciamento de *pp2a*, respectivamente (Fig. 15 D). O fator de transcrição *stat* e o repressor *socs* foram regulados positivamente após um dia da microinjeção com RNA dupla fita para *pp2a* (Fig. 15 E), retornando a níveis semelhantes àqueles observados no grupo controle, para o qual os mosquitos foram microinjetados com RNA dupla fita sequência inespecífica para *LacZ* (β -galactosidase).

4.1.4 Avaliação da carga bacteriana após o silenciamento de akt e PP2A

A possibilidade de eventuais alterações na carga bacteriana tanto dos mosquitos silenciados para *akt* quanto para *pp2a* foi avaliada (Fig 16). Para tanto, foi realizado qRT-PCR com o uso de um par de *primers* capazes de amplificar um fragmento do gene RNA ribossomal 16S (16S rRNA). Desta forma, pôde-se estimar a carga bacteriana nos mosquitos injetados com dsRNA para *akt* ou *pp2a* em relação aos controles.

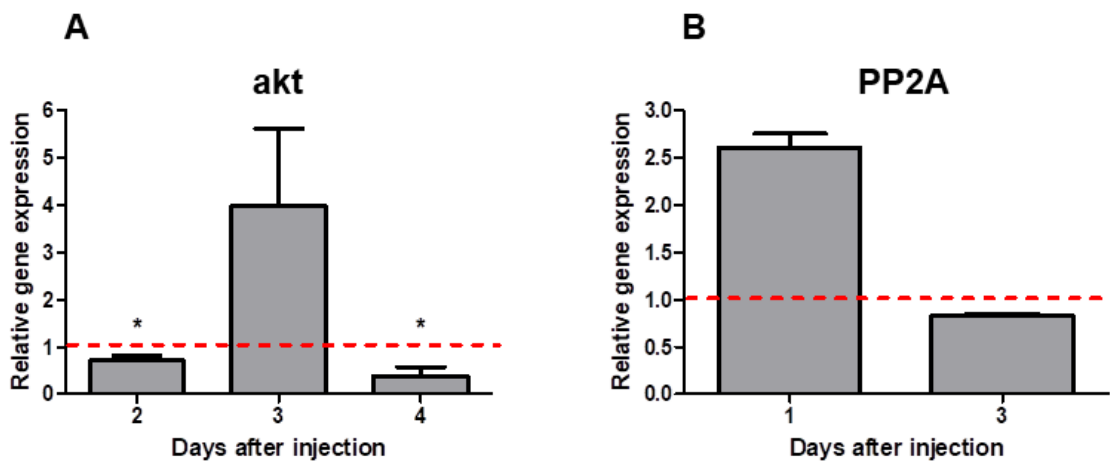


Figura 16: Avaliação da carga bacteriana após o silenciamento de *akt* e *pp2a*. qRT-PCR para o transcrito 16S do rRNA bacteriano após injeção em 2, 3 e 4 dias (*akt*) e 1 e 3 dias (*pp2a*). A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de 3 réplica biológica independentes para *akt* e 1 para *pp2a*. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo *Rp49*. O teste t-Student foi aplicado para análise estatística. P-values: *, $p < 0.05$.

Claramente houve um efeito em ambas as condições experimentais realizadas. No caso dos mosquitos silenciados para *akt*, houve diminuição da carga bacteriana em dois e quatro dias após o silenciamento, sendo estas variações estatisticamente significativas. Por outro lado, é possível observar um aumento não significativo da carga bacteriana no terceiro dia, muito provavelmente devido a uma alta variabilidade entre as réplicas biológicas, neste caso. No que se refere aos mosquitos silenciados para *PP2A*, houve um aumento da carga bacteriana apenas no primeiro dia, ao passo que níveis semelhantes aos do grupo controle foram observados no terceiro dia. Esses dois dados sugerem que a via PI3K/AKT de alguma forma contribui para a manutenção da homeostase intestinal de *A. aegypti* através de modulação de importantes genes codificadores de AMPs, relacionados a reações REDOX e da carga bacteriana.

4.2 Parte II – Análise da expressão gênica global em *A. aegypti* com o gene *akt* silenciado

O fato de termos visto por qRT-PCR que o silenciamento de *akt* gerou modulação em genes e vias importantes para a fisiologia de *A. aegypti*, assim como uma evidente modulação da carga bacteriana, suscitou-nos o interesse em investigar mais profundamente quais processos metabólicos estão sob influência da via FOXO, direta ou indiretamente. Para tanto, utilizamos a abordagem do sequenciamento de RNAs em alta vazão (RNA-seq), conforme descrito anteriormente. Tal abordagem nos permitiu analisar a expressão gênica global em mosquitos sob o silenciamento de *akt*, fornecendo evidências com detalhes dos principais genes e processos regulados pela via PI3K/AKT em *A. aegypti*.

4.2.1 Análise dos genes diferencialmente expressos

Uma lista com todos os genes diferencialmente expressos (DEGs – differentially expressed genes) nos mosquitos sob o silenciamento do gene *akt* em relação ao grupo controle foi gerada pelo *software CLC Genomics Workbench 10* e está disponível na tabela S1 deste trabalho. A partir desta lista, apenas os genes que tiveram $-2 \geq fold$

$change \geq 2$ e $FDR\ p\text{-value} \leq 0,05$, foram arbitrariamente selecionados para as análises subsequentes. Seguindo esse critério, um diagrama de Venn, representando os genes diferencialmente expressos de modo exclusivo ou compartilhado, entre os pontos de tempo analisados, foi gerado (Fig. 17 A).

Um total de 345 DEGs foram identificados dentro de nossos critérios de filtragem. Destes, 201 foram modulados dois dias após o silenciamento de *akt*, sendo 88 regulados positivamente e 113 negativamente. No terceiro dia, dos 69 genes modulados, 32 foram induzidos, ao passo que 37 tiveram seus níveis transcricionais reprimidos. Finalmente, no quarto dia, foram identificados 97 genes modulados, sendo 24 regulados positivamente e 73 negativamente. A maioria dos genes modulados durante o silenciamento de *akt*, em relação ao grupo controle, teve sua expressão reprimida, em todos os pontos de tempo (Fig. 17 B).

Como se pode observar na figura 17 B, a maior parte dos genes modulados durante o silenciamento de *akt* se manteve reprimida, como pode ser exemplificado pelo grupo de 11 profenoloxidasas (PPOs) identificadas (Fig. 18 A). Todas as PPOs foram reguladas negativamente, em todos os pontos de tempos analisados. Uma pequena parte dos genes, contudo, foi altamente ativada durante todos os dias analisados (Fig. 17 B), como pode ser observado para subunidades da enzima NADH desidrogenase (Fig. 18 B).

Outros grupos de genes, no entanto, apresentaram perfil de modulação da expressão gênica tanto induzido quanto reprimido, em diferentes momentos. Como se pode observar na figura 19, nosso transcriptoma revelou a modulação de 5 *odorant binding proteins* (OBP26, OBP27, OBP38, OBP39, OBP55), das quais todas foram reprimidas no quarto dia após o silenciamento de *akt*. Além disso, foram identificadas duas opsinas de onda longa (*long wavelength sensitive opsins*) (GPROP1 e GPROP2), ambas reprimidas após dois e quatro dias em mosquitos silenciados para *akt*.

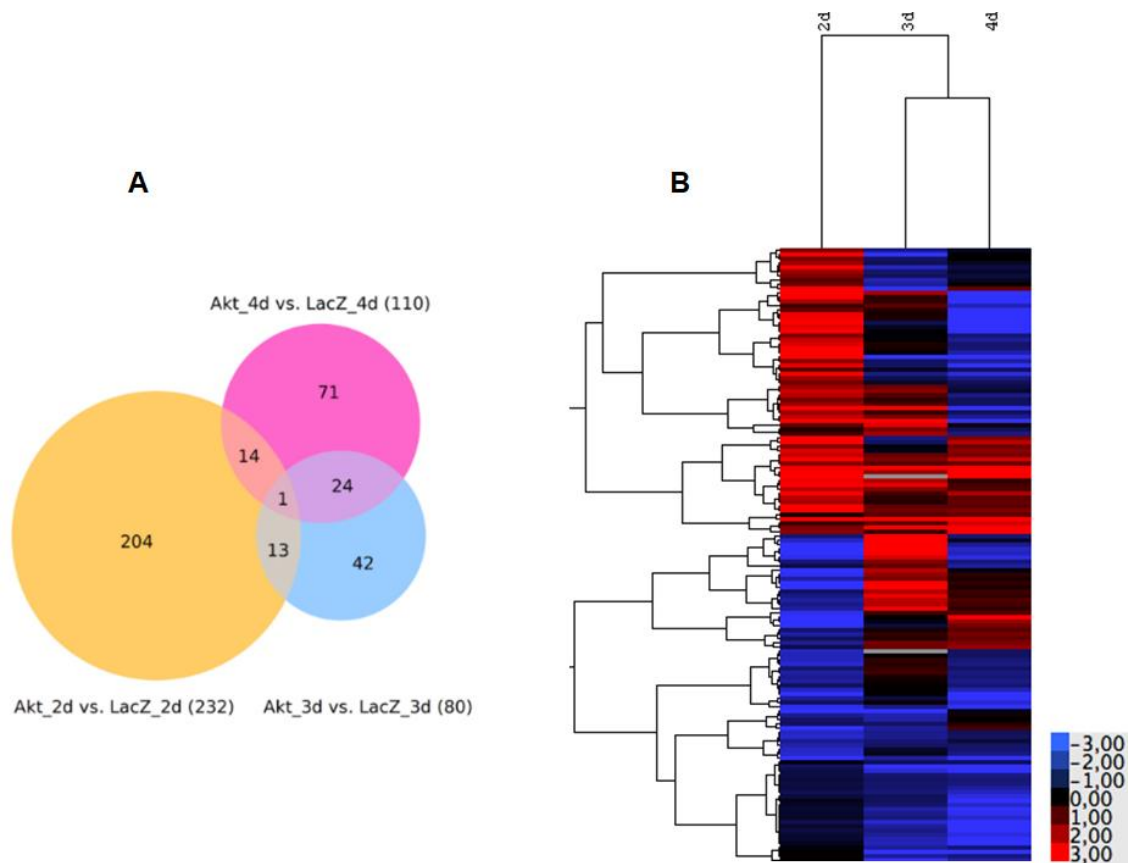


Figura 17: Análise do transcriptoma de *A. aegypti* durante o silenciamento de *akt*. (A) Diagrama de Venn gerado pelo *software* CLC Genomics Workbench 10 dos genes modulados em 2, 3 e 4 dias após silenciamento de *akt*. (B) Heatmap gerado pelos softwares Java TreeView e Cluster 3.0. O resultado representa a modulação da expressão gênica nos insetos silenciados (dsAKT) em relação ao grupo controle (dsLacZ). A regulação positiva está representada pela cor vermelha, enquanto a regulação negativa pela cor azul. Para ambas as figuras, foram adotados os seguintes critérios estatísticos: $-2 \geq \text{fold change} \geq 2$ e $\text{FDR p-value} \leq 0,05$.

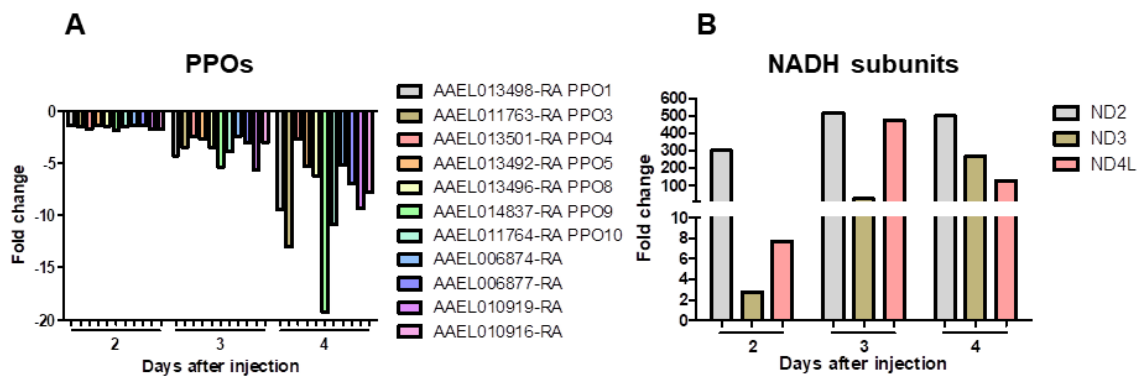


Figura 18: Avaliação do perfil transcricional de profenoloxidasases e subunidades da enzima NADH desidrogenase modulados durante o silenciamento de *akt* em *A. aegypti*. Os valores de fold change para cada gene gerados no CLC Genomics Workbench 10 foram usados para a construção dos gráficos pelo *software* GraphPad Prism 6. Os gráficos representam a modulação da expressão gênica nos insetos silenciados (dsAKT) em relação ao grupo controle (dsLacZ) em 2, 3 e 4 dias após silenciamento de *akt*.

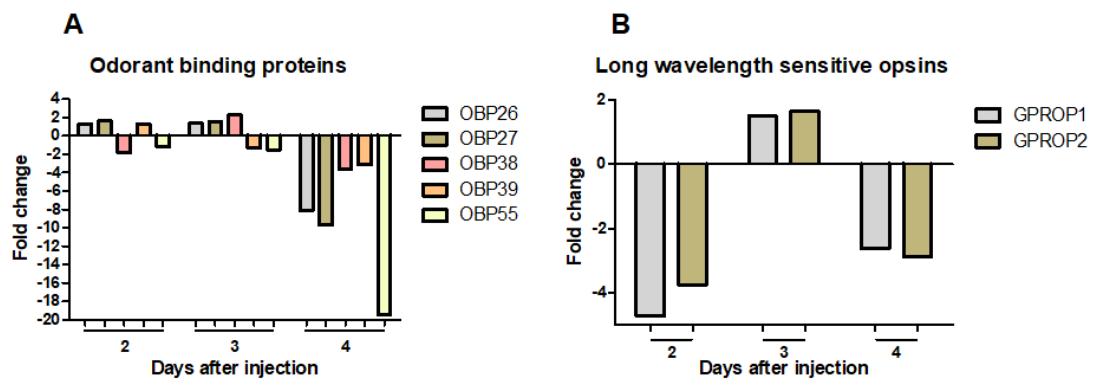


Figura 19: Avaliação do perfil transcricional de odorant binding proteins e long wavelength sensitive opsins modulados durante o silenciamento de *akt* em *A. aegypti*. Os valores de *fold change* para cada gene gerados no CLC Genomics Workbench 10 foram usados para a construção dos gráficos pelo *software* GraphPad Prism 6. Os gráficos representam a modulação da expressão gênica nos insetos silenciados (dsAKT) em relação ao grupo controle (dsLacZ) em 2, 3 e 4 dias após silenciamento de *akt*.

4.2.2 Análise de *Gene Ontology* (GO) dos genes diferencialmente expressos

Com o intuito de melhor avaliar a função básica dos genes diferencialmente expressos durante o silenciamento de *akt*, foi confeccionado o gráfico abaixo (Fig. 20). A tabela de referência, com as funções de cada gene, previamente anotadas, foi gentilmente cedida pelo Dr. George Dimopoulos, da Johns Hopkins School of Public Health.

Conforme apontado anteriormente, houve predominância de genes reprimidos quando comparados aos transcritos regulados positivamente, fato que pode ser melhor visualizado na figura 20. De todos os genes analisados, de acordo com a tabela de referência, a maioria foi classificada como tendo função desconhecida ou diversa. O terceiro maior grupo refere-se aos genes de imunidade, a respeito dos quais podemos afirmar que houve intensa repressão nos terceiro e quarto dias. No quarto dia, por exemplo, dos 25 genes classificados como tendo função imune, todos foram regulados negativamente, sugerindo que o silenciamento de *akt*, de alguma maneira, levou à imunossupressão dos mosquitos.

4.3 Parte III – Investigação da hipótese de ativação mitocondrial

A potente indução de subunidades da enzima NADH desidrogenase, em consequência do silenciamento de *akt*, levantou ao questionamento se a ativação da via PI3K/AKT poderia de alguma maneira ativar a biogênese e atividade mitocondriais. Com o intuito de tentar entender o motivo que acarretou no aumento das subunidades da enzima NADH, foram realizados dois tipos de experimentos: 1. Um ensaio de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) liberado pelo intestino médio dos mosquitos com o gene *akt* silenciado, em comparação com os microinjetados com *lacZ*, e 2. Experimentos de duplos silenciamentos com *akt* e *pgc-1a*, ou *akt* e *nos*, a fim de avaliar a expressão das subunidades da enzima NADH desidrogenase. Além disso, também foi avaliado o efeito dos duplos silenciamentos sobre a microbiota bacteriana de *A. aegypti*.

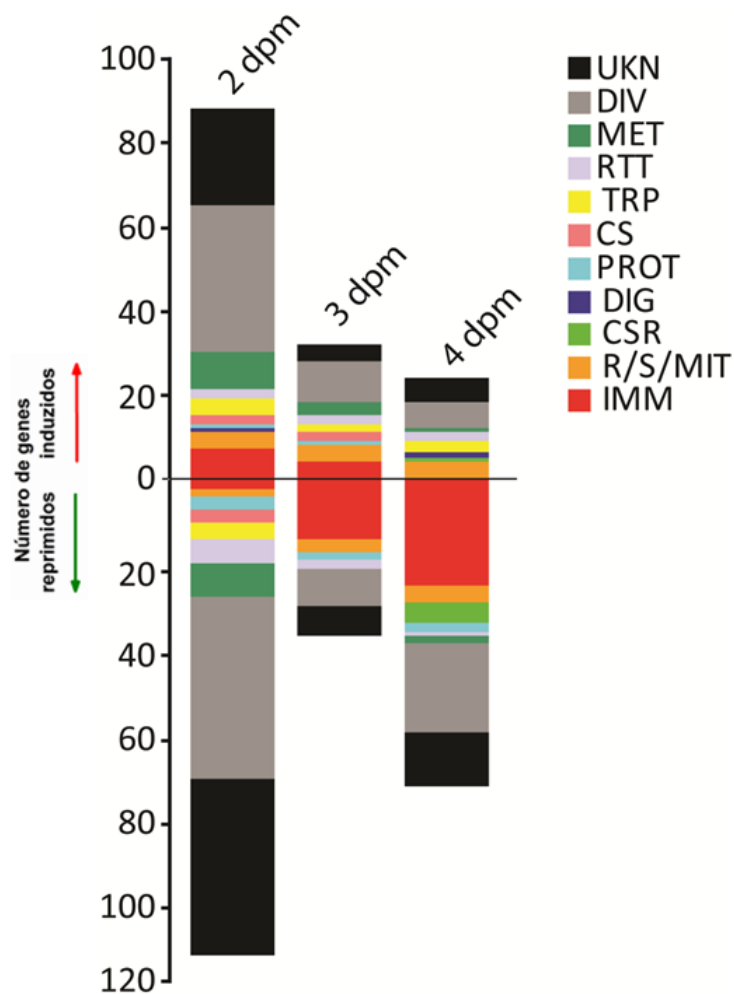


Figura 20: Análise de *Gene Ontology* dos genes modulados durante o silenciamento de *akt* em *A. aegypti*. Distribuição funcional dos genes diferencialmente expressos nos mosquitos silenciados para *akt*, em relação ao grupo controle. Uma tabela completa de todos os genes e seus respectivos valores de *fold change* está disponível na tabela S1. Abreviação dos grupos funcionais: UKN, função desconhecida; DIV, funções diversas; MET, metabolismo; RTT, replicação, transcrição e tradução; TRP, transporte; CS, estrutural e citoesqueleto; PROT, proteólise; DIG, digestão; CSR, recepção quimiosensorial; R/S/MIT, redox, estresse e mitocôndria; IMM, imunidade.

4.3.1 Ensaio de H₂O₂ liberado

Para avaliar se o silenciamento de *akt*, além de induzir a expressão de subunidades da enzima NADH desidrogenase, também está associado a um aumento da quantidade de peróxido de hidrogênio liberado a partir do intestino médio dos mosquitos silenciados, foi realizado um ensaio de H₂O₂ (Fig. 21).

O silenciamento de *akt* claramente levou a um aumento na produção de H₂O₂ no intestino médio dos mosquitos, quando comparado ao respectivo grupo controle (Fig. 21). Considerando que as mitocôndrias constituem a principal fonte de produção de H₂O₂ nas células animais, este resultado corrobora a hipótese de que o aumento da expressão de subunidades da enzima NADH desidrogenase está associado a um aumento da atividade mitocondrial.

4.3.2 Ensaios de duplos silenciamentos

Para avaliar se o aumento da expressão de subunidades da enzima NADH desidrogenase é mediado por PGC-1a ou por NOS, foram realizados dois ensaios de duplos silenciamentos com dsAKT e dsPGC-1a ou dsAKT e dsNOS, e dsLacZ como grupo controle.

O resultado dos duplos silenciamentos tanto para dsAKT e dsPGC-1a (Fig. 22 A) quanto para dsAKT e dsNOS (Fig. 22 C) se mostrou eficiente após 1 e 3 dias de microinjeção. Interessantemente, ao analisar o perfil de expressão das três subunidades da enzima NADH desidrogenase, nos dois duplos silenciamentos, foi possível verificar que a pontente ativação de ND2, ND3 e ND4L, observada no transcriptoma (Fig. 18 B), durante o silenciamento de *akt*, foi revertida, apresentando níveis basais após o primeiro dia de silenciamento e um aumento discreto da expressão no terceiro dia (Fig. 22 B e D). Este resultado sugere que a ostensiva indução de subunidades da enzima NADH desidrogenase, quando da ativação da via PI3K/AKT, é mediada tanto por PGC-1a quanto por NOS.

O resultado do perfil de expressão de subunidades da enzima NADH desidrogenase foi semelhante nos dois duplos silenciamentos realizados, sinalizando para uma eventual relação entre PGC-1a e NOS. Por esse motivo, avaliamos tanto a expressão de PGC-1a nos grupos dsAKT e dsNOS quanto de NOS nos grupos dsAKT e dsPGC-1a (Fig. 23).

Como podemos observar, durante o duplo silenciamento de dsAKT e dsNOS, a expressão de *pgc-1a* não sofreu alterações (Fig. 23 A). Interessantemente, contudo, *nos* foi marcadamente modulado durante o duplo silenciamento de dsAKT e dsPGC-1a, sendo reprimido no terceiro dia (Fig. 23 B). Estes resultados sugerem que a expressão de *nos* é dependente da expressão de *pgc-1a*, mas não o oposto.

4.3.3 Avaliação do efeito dos duplos silenciamentos sobre a microbiota bacteriana

Conforme vimos anteriormente (Fig. 16 A), o silenciamento de *akt* acarretou em sensíveis alterações na carga total da microbiota bacteriana, em *A. aegypti*. Para avaliar se tal modulação foi condicionada a um sugestivo aumento da atividade mitocondrial, a carga bacteriana foi avaliada durante os duplos silenciamentos de dsAKT e dsPGC-1a e dsAKT e dsNOS (Fig. 24).

Como esperávamos, houve modulação da microbiota bacteriana três dias após as duas condições experimentais de duplos silenciamentos, consistente entre as duas réplicas biológicas independentes. Este resultado sugere que a modulação da microbiota bacteriana observada quando do silenciamento de *akt* não foi condicionada a um possível aumento da atividade mitocondrial.

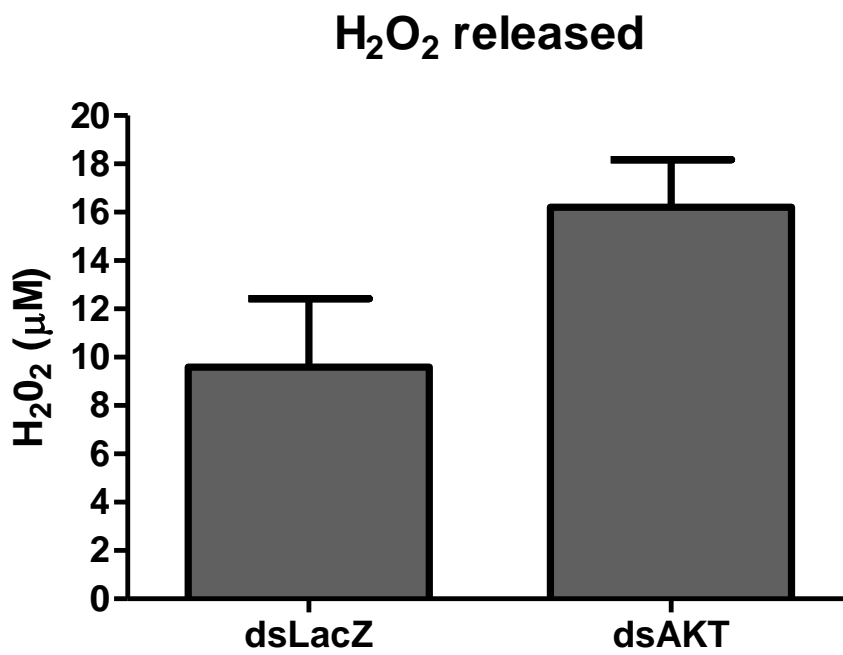


Figura 21: Peróxido de hidrogênio liberado a partir do intestino médio de mosquitos silenciados para *akt* e microinjetados para *lacZ*. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de duas réplicas biológicas independentes.

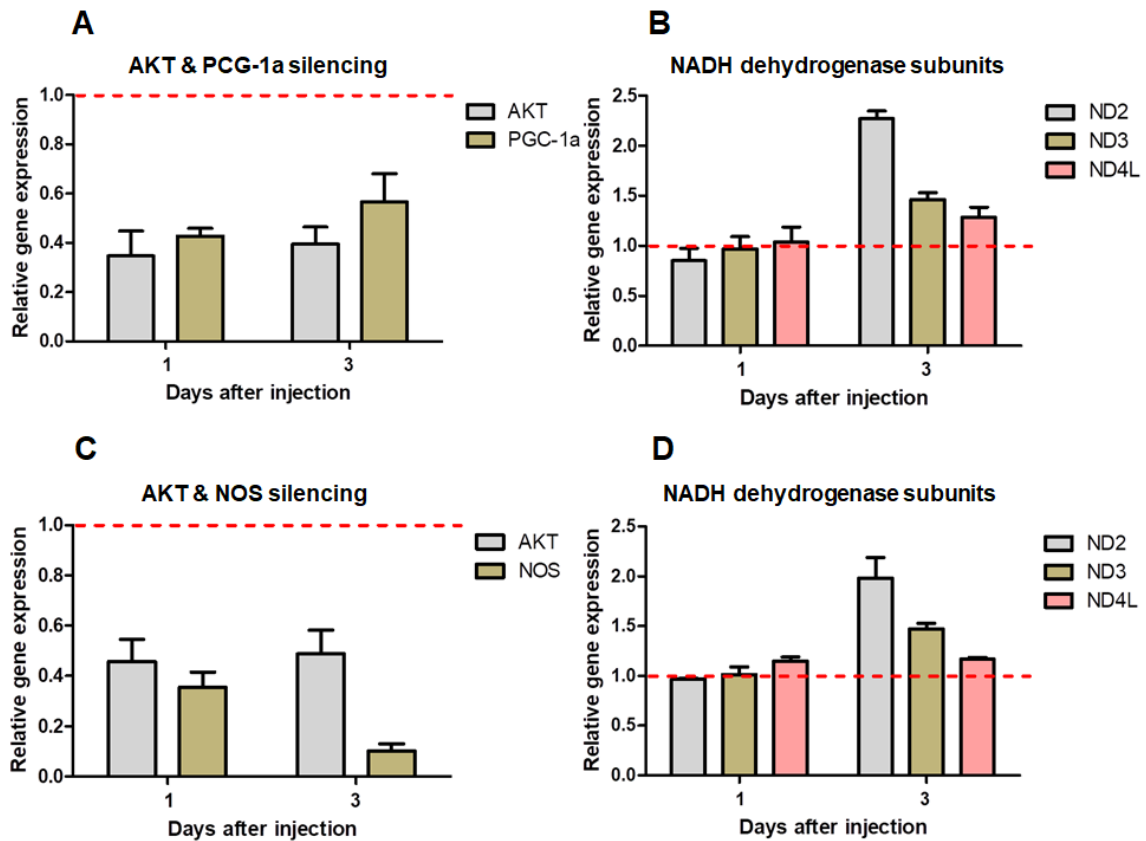


Figura 22: Validação dos duplos silenciamentos e análise do perfil de expressão de subunidades da enzima NADH desidrogenase após microinjeção em 1 e 3 dias. (A e B) Validação do duplo silenciamento de dsAKT e dsPGC-1a e análise do perfil de expressão de subunidades da enzima NADH desidrogenase ND2, ND3 e ND4L. (C e D) Validação do duplo silenciamento de dsAKT e dsNOS e análise do perfil de expressão de subunidades da enzima NADH desidrogenase ND2, ND3 e ND4L. A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de duas réplicas biológicas independentes. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo *Rp49*.

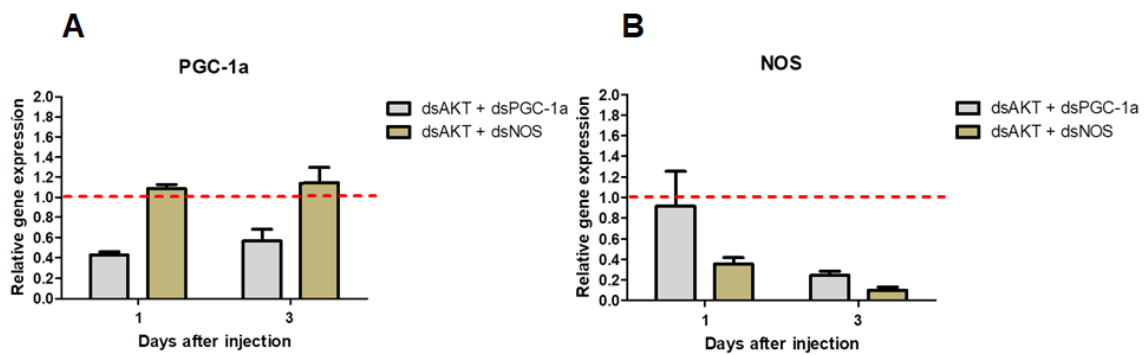


Figura 23: Análise do perfil de expressão gênica de *pgc-1a* e *nos* nas duas condições experimentais de duplos silenciamentos. A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de duas réplicas biológicas independentes. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo *Rp49*.

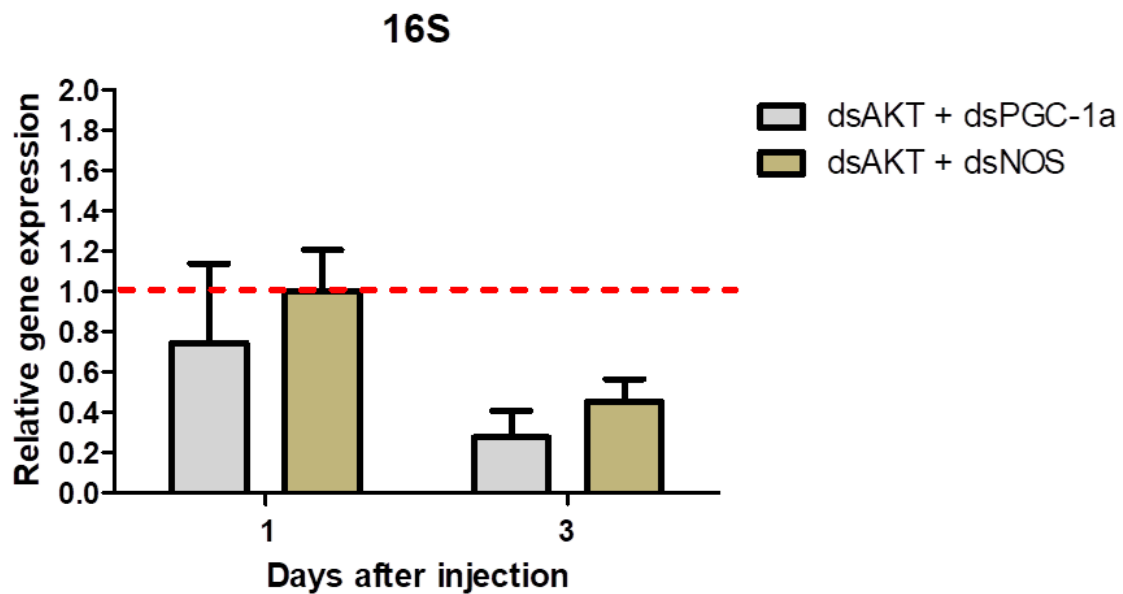


Figura 24: Avaliação da carga bacteriana durante os duplos silenciamentos de dsAKT e dsPGC-1a e dsAKT e dsNOS. qRT-PCR para o transcrito 16S do rRNA bacteriano após microinjeção em 1 e 3 dias. A linha vermelha pontilhada representa a expressão gênica observada no grupo de insetos controle, que foram microinjetados com RNA dupla fita para β -galactosidase. As barras representam a média e o desvio padrão a partir de 2 réplicas biológicas independentes. A expressão da sequência alvo foi normalizada em função da expressão do gene constitutivo *Rp49*.

4.4 Parte IV – Avaliação do efeito do silenciamento de *akt* gerado na microbiota de *A. aegypti*

Os resultados de expressão gênica diferencial, tanto por qRT-PCR quanto por RNA-seq, nos trouxeram luz sobre os processos metabólicos influenciados pelo funcionamento da via PI3K/AKT em *A. aegypti*. Diversos genes associados à resposta imune e à manutenção da microbiota foram induzidos ou reprimidos quando do silenciamento de *akt*, tais como AMPs e *nos*. Somado a este fato, o silenciamento desses reguladores claramente provocou alterações na carga total de bactérias do mosquito. Tais dados nos conduziram a questionar se essa modulação poderia, de alguma maneira, afetar a diversidade da microbiota bacteriana do mosquito, modulando táxons específicos. Para tentar solucionar essa hipótese, nós avaliamos a diversidade bacteriana nos mosquitos silenciados para *akt*, sempre em comparação com o grupo controle (dsLacZ).

4.4.1 Análise de diversidade alfa

Com a análise de diversidade alfa, é possível determinar a diversidade dentro de uma determinada comunidade amostral, atribuindo índices de heterogeneidade para cada amostra. Esses índices levam em conta tanto a uniformidade quanto a riqueza de táxons baseados na abundância proporcional das espécies. O gráfico da figura 25 foi gerado com auxílio do módulo *Microbial Genomics* do *software CLC Genomics Workbench* 10, seguindo a metodologia já descrita anteriormente, e representa a análise de diversidade alfa de todas as 18 amostras utilizadas no sequenciamento do microbioma.

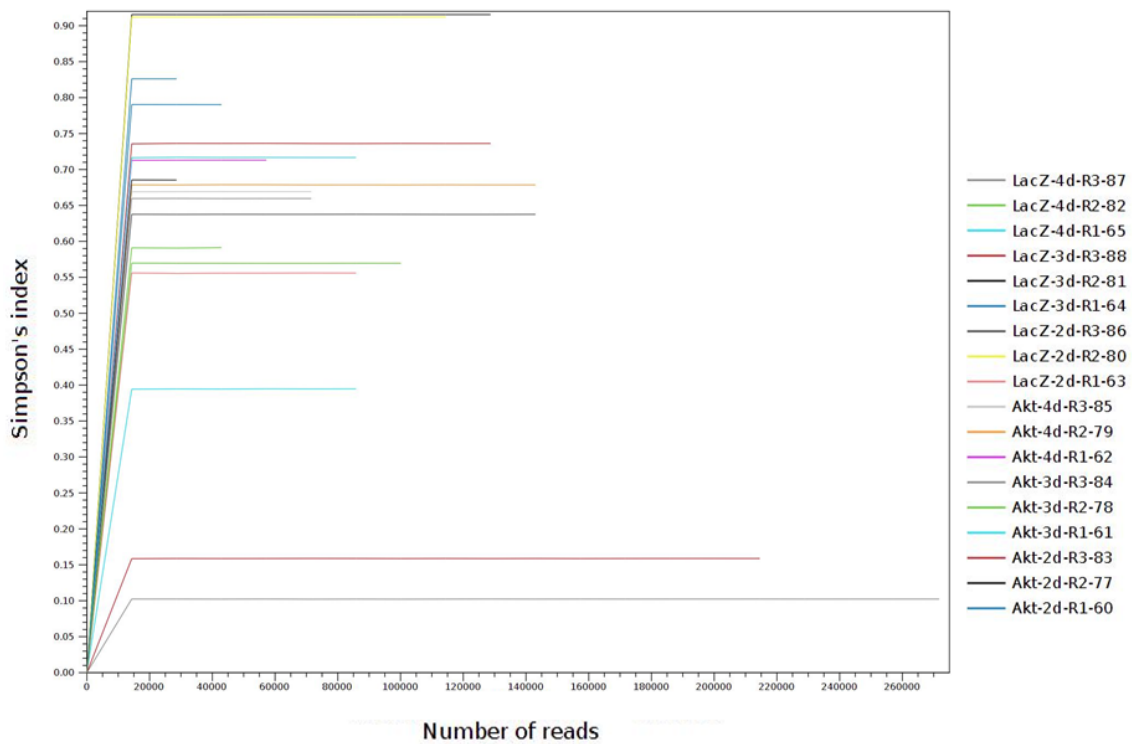


Figura 25: Gráfico resultante da análise de diversidade alfa. Cada amostra está disposta no gráfico de forma que o eixo horizontal representa o número de reads sequenciados, enquanto o eixo vertical os índices de heterogeneidade de Simpson.

O gráfico gerado revelou que nossas amostras foram adequadas para representar a diversidade bacteriana (Fig. 25), uma vez que não foi observado o decréscimo do índice de heterogeneidade conforme a quantidade de *reads* aumentou, para nenhuma amostra. Além disso, todas as amostras apresentaram uma região de platô, que se iniciou próxima a 15.000 *reads*, indicando que o sequenciamento conseguiu resolver a diversidade microbiana das amostras estudadas.

4.4.2 Análise de diversidade beta

A diversidade β é uma medida de como a variedade e abundância de espécies diferem entre amostras ao longo de gradientes. Para estabelecer estas relações, neste estudo, utilizamos a Análise de Coordenadas Principais (PCoA), uma variação da Análise de Componentes Principais (PCA). Na PCA os conjuntos formados apresentam relação linear entre si, enquanto a PCoA utiliza relações relativas entre esses conjuntos, de modo que pode ser aplicada em casos não lineares (PRADO et al., 2002). Nessa análise, os parâmetros presentes no arquivo de metadados serviram de base para construir eixos independentes, isto é, que não possuem correlação entre si, chamados de componentes.

Em nossos estudos, os componentes foram construídos por meio de uma matriz de distância, cujos elementos escolhidos para análise são aqueles que explicam a maior variância dos dados.

Cada amostra possui três coordenadas definidas pela matriz de distância e é ajustada pelos coeficientes de importância para cada eixo. Como resultado, foram gerados agrupamentos ou *clusters* entre as diferentes amostras, de modo que é possível avaliar como a diversidade bacteriana de cada uma se relaciona com as demais.

Quando comparamos as três diferentes réplicas biológicas em uma mesma análise de PCoA, para a nossa surpresa, percebemos que as amostras foram agrupadas, prioritariamente, por réplicas, e não pelas condições experimentais (dsAkt vs. dsLacZ) (Fig. 26). Tal fato indica que fatores ambientais foram mais determinantes para as diferenças na diversidade taxonômica bacteriana entre as amostras do que a modulação gerada em consequência do silenciamento de *akt*.

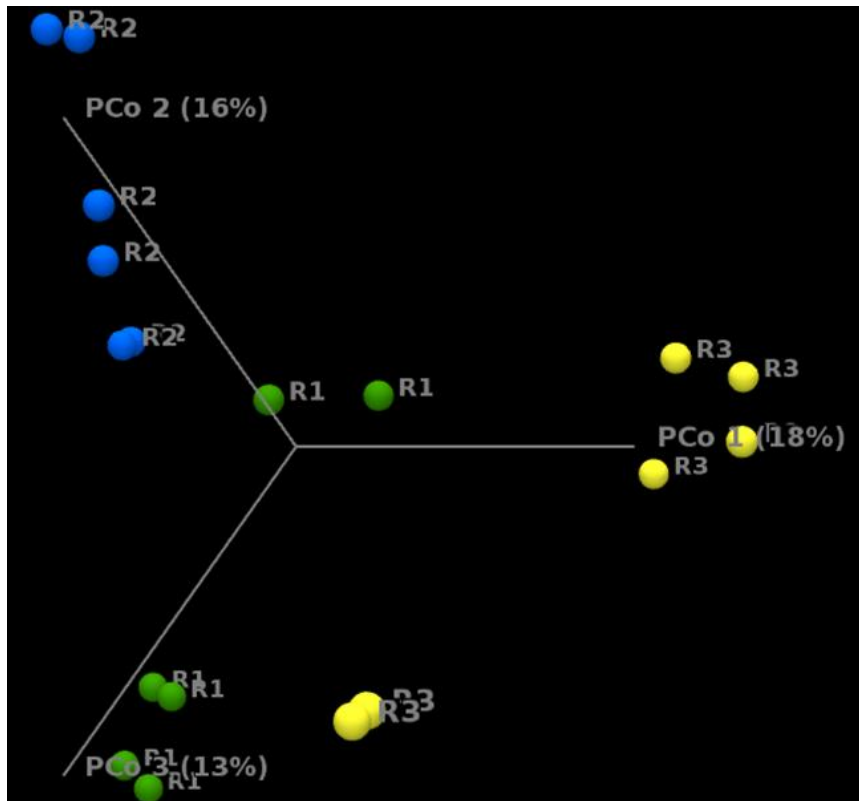


Figura 26: Análise de diversidade Beta contendo todos os dados das 3 réplicas biológicas: réplica 1 (verde); réplica 2 (azul); e réplica 3 (amarelo). Cada qual com 6 pontos referentes aos dias 2, 3 e 4 após o silenciamento de *akt*.

Com o intuito de minimizar eventuais fatores com potencial para criar vieses em nossas análises, as amostras de cada réplica biológica foram analisadas de forma independente por PCoA (Fig. 27). Com esta nova análise é possível observar um agrupamento mais marcante entre as amostras “testes” (injetadas com dsAKT) ou controle (injetadas com dsLacZ) de cada réplica biológica. Por este motivo, as análises foram realizadas par a par (teste x respectivo controle) para cada réplica biológica.

4.4.3 Análise da composição taxonômica bacteriana

No que diz respeito à modulação da abundância relativa entre os táxons identificados, em consequência do silenciamento de *akt*, até o momento, apenas o quarto dia foi analisado. Os gráficos das figuras 28 a 32 mostram a abundância relativa de cada nível taxonômico tanto para os mosquitos microinjetados com dsAKT, quanto para com dsLacZ, nas três réplicas biológicas, independentemente.

Dos 6 Filos identificados em nosso estudo (Fig. 28), focamos nossas análises em Proteobacteria. Justamente por ser o Filo mais representativo em nosso modelo experimental, foi possível analisar as modulações na microbiota de *A. aegypti* no quarto dia após o silenciamento de *akt*, em comparação com o grupo controle. Tais modulações se tornam evidentes quando analisamos as classes taxonômicas Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria (Fig. 29). É possível observar uma notória repressão de Betaproteobacteria nos mosquitos silenciados para *akt*, em comparação com os microinjetados para LacZ. Ao mesmo tempo, houve predominância de Gammaproteobacteria nos mosquitos silenciados para *akt*, em todas as réplicas biológicas independentes. Novamente, a Ordem Burkholderiales foi de alguma maneira desfavorecida durante o silenciamento de *akt*. Em contrapartida, é possível observar que houve predominância da Ordem Pseudomonadales quando do silenciamento de *akt*, em todas as réplicas biológicas (Fig. 30). Quando analisamos as famílias de bactérias identificadas em nossas condições experimentais, também notamos menor abundância relativa do grupo Alcaligenaceae nos mosquitos silenciados para *akt* (Fig. 31), fato que se repete quando observamos o gênero *Achromobacter* (Fig. 32).

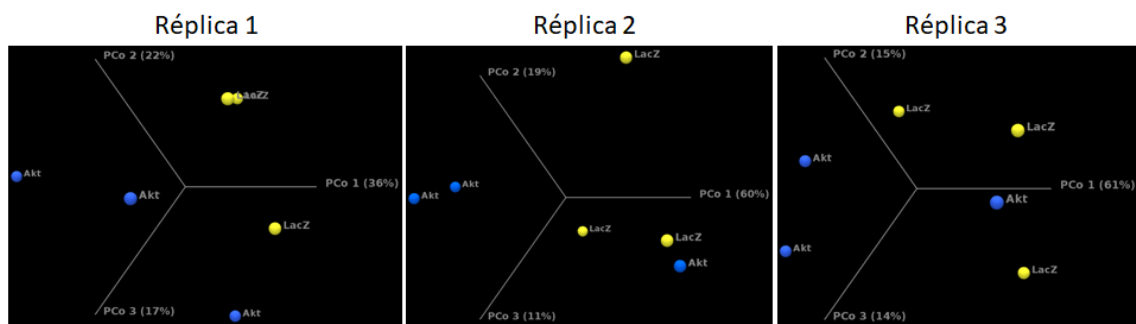


Figura 27: Análises de beta diversidade para as três diferentes réplicas biológicas, contendo cada uma 3 pontos referentes aos 2, 3 e 4 dias após a microinjeção para o silenciamento com dsAKT (azul) e para o controle dsLacZ (amarelo).

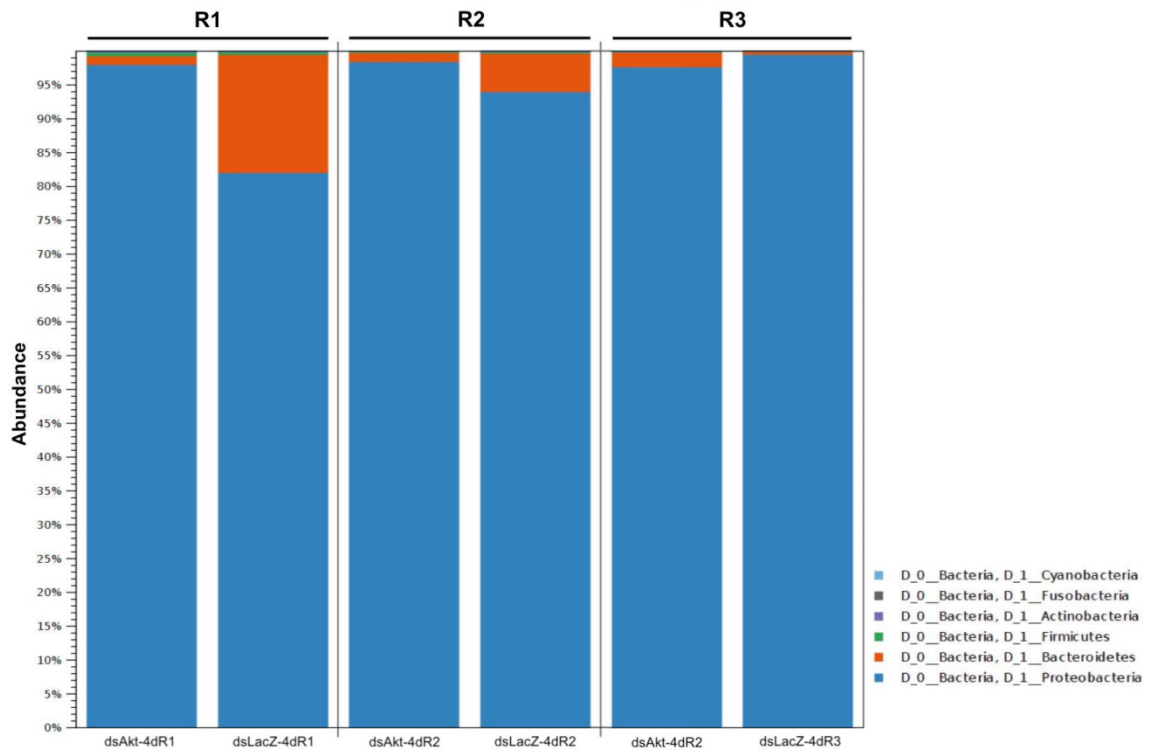


Figura 28: Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Filo. O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada Filo bacteriano, enquanto o eixo horizontal apresenta par a par as três réplicas biológicas independentes, cada qual contendo a condição experimental referente ao silenciamento de *akt* e o controle *LacZ*, respectivamente.

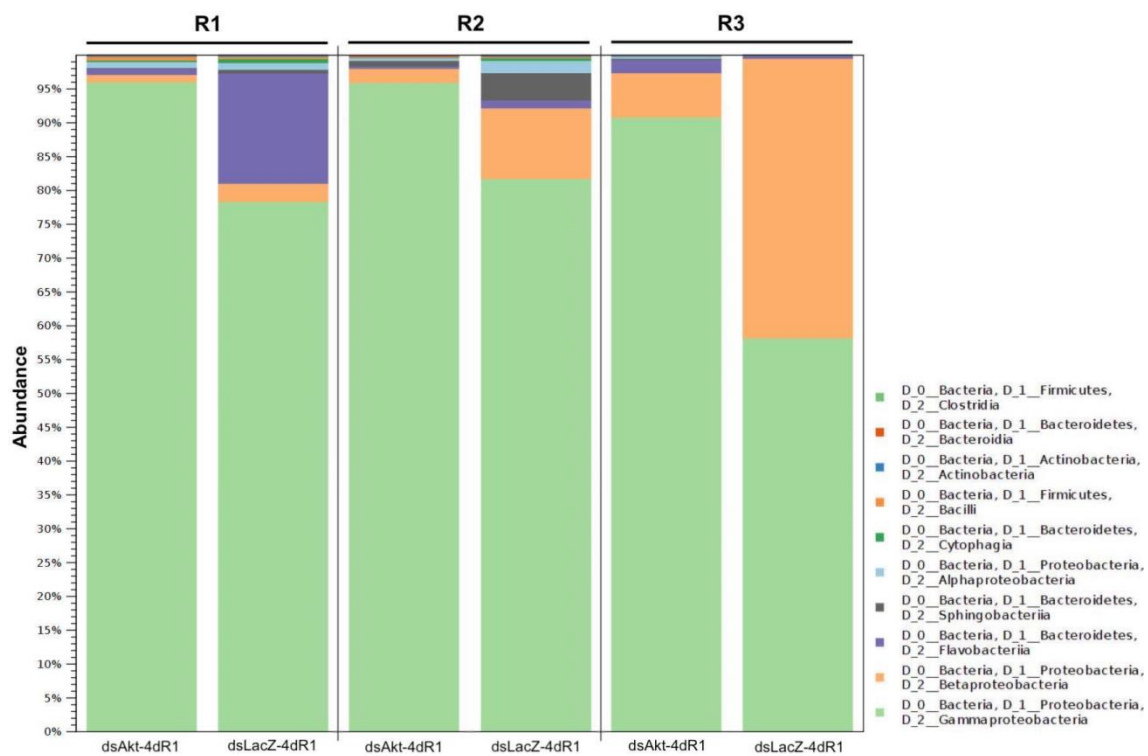


Figura 29: Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Classe. O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada Classe bacteriana, enquanto o eixo horizontal apresenta par a par as três réplicas biológicas independentes, cada qual contendo a condição experimental referente ao silenciamento de *akt* e o controle *LacZ*, respectivamente.

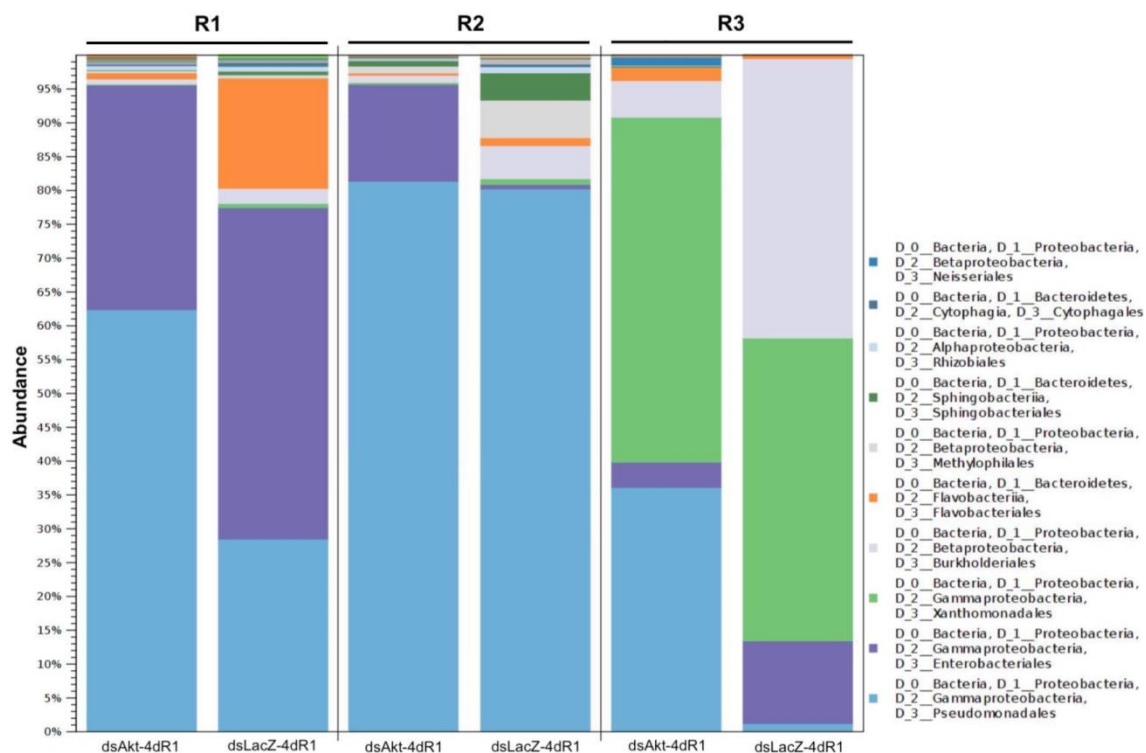


Figura 30: Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Ordem. O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada Ordem bacteriana, enquanto o eixo horizontal apresenta par a par as três réplicas biológicas independentes, cada qual contendo a condição experimental referente ao silenciamento de *akt* e o controle *LacZ*, respectivamente.

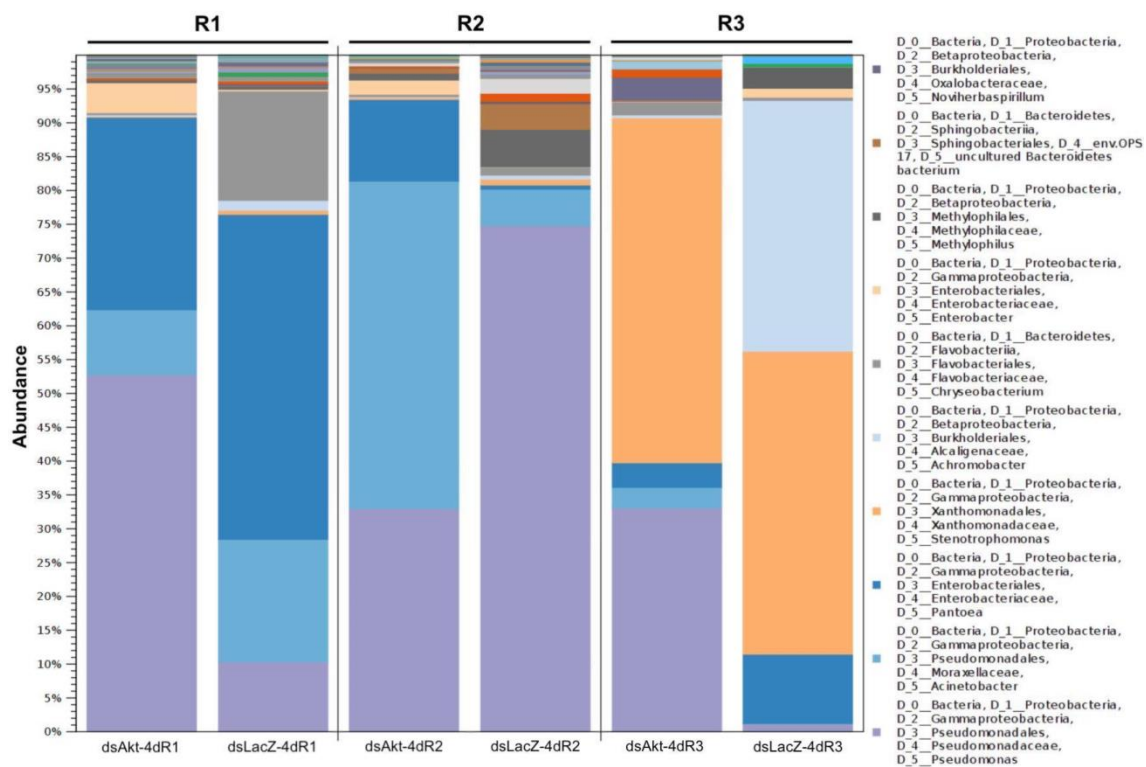


Figura 32: Gráfico de barras gerado pela análise de abundância relativa em nível de Gênero. O eixo vertical apresenta a abundância relativa de cada Gênero bacteriano, enquanto o eixo horizontal apresenta par a par as três réplicas biológicas independentes, cada qual contendo a condição experimental referente ao silenciamento de *akt* e o controle *LacZ*, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

Em *A. aegypti* são escassos os relatos sobre o papel desempenhado pela via PI3K/AKT. Apesar disso, foi visto que mosquitos transgênicos, capazes de superexpressar *akt* no corpo gorduroso, apresentaram maior taxa de sobrevivência quando comparados a mosquitos selvagens (Arik et al., 2015). Em um amplo trabalho, que envolveu a caracterização de membros da família *forkhead box* (Fox) em *A. aegypti*, foi demonstrado que o silenciamento de *foxO* levou a uma diminuição da expressão de vitelogenina, resultando em significativamente menos ovos depositados (Hansen et al., 2007).

Em nosso estudo, analisamos como o silenciamento de *akt* e *pp2a* foi capaz de modular a expressão gênica global de *A. aegypti* e os impactos gerados na microbiota bacteriana do mosquito em consequência destes silenciamentos. Além disso, investigamos uma provável ativação mitocondrial, gerada em consequência do silenciamento de *akt*.

Apesar de termos adotado o mesmo par de *primers* utilizado por Hansen et al. (2007), em nosso estudo não obtivemos sucesso em nossas duas tentativas de silenciar o fator de transcrição *foxO*. É possível que parte desse insucesso se deva aos já bem documentados intrínsecos mecanismos associados à regulação de fatores de transcrição (Akhavanaghdam et al., 2016; Benito et al., 2017; Kuntz et al., 2012; Wu & Lai, 2015).

Após validação do silenciamento de *akt*, observamos que não houve modulação na expressão do fator de transcrição *foxO*. Isso pode ser explicado pelo fato de que AKT age fosforilando FOXO, não tendo necessariamente influência sobre os mecanismos que regulam seus níveis transcricionais.

Para modelos vertebrados, é conhecida a relação da via PI3K/AKT/FOXO com espécies reativas de oxigênio (ROS) (de Keizer et al., 2010). Em *D. melanogaster*, a ativação de FOXO foi aumentada em consequência da superexpressão de NOS (Kanao et al., 2012). Nossos resultados revelaram aumento da expressão do transcrito que codifica a enzima óxido nítrico sintetase (NOS), enzima associada à produção de ROS, mais especificamente de óxidos nítricos (NO).

As vias Toll e Imd estão fortemente associadas ao controle da produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), tais quais Atacinas, Cecropinas e Defensinas (Michel et al., 2001, Hoffmann & Reichhart 2002, Hultmark 2003). Membros destas famílias gênicas já foram relacionados à resposta anti-dengue em *A. aegypti* (Xi et al.,

2008; Pan *et al.*, 2012). Em *Drosophila*, Becker *et al.* (2010) demonstraram que a ativação de AMPs pode ocorrer independentemente das vias clássicas de imunidade Toll e Imd, pelo fator de transcrição FOXO. Em nosso modelo de estudo, observamos que o silenciamento de *akt* levou a um drástico aumento da expressão de três AMPs, uma atacina e duas cecropinas, nos três primeiros dias após injeção, indicando que a ativação da via PI3K/AKT/FOXO foi capaz de induzir a expressão de AMPs, possivelmente por um mecanismo semelhante ao que foi observado em *Drosophila*. Para que pudéssemos estabelecer semelhante mecanismo em *A. aegypti*, no entanto, seria necessário a realização de experimentos adicionais, como por exemplo ensaios de co-silenciamento com *akt* e genes cruciais das vias Toll e Imd.

Em insetos, as vias JAK-STAT e RNAi, além de outras funções, estão intimamente atreladas à resposta antiviral. Em *A. aegypti* infectado com DENV-2, por exemplo, a via JAK-STAT se mostrou altamente responsiva à infecção, tendo diversos genes ativados (Souza-Neto *et al.*, 2009). No mesmo trabalho, mosquitos com o gene *Dome* silenciado apresentaram aumento da carga viral, ao passo que aqueles com o gene *Pias* silenciado se mostraram mais resistentes. A via de RNAi, por sua vez, é de suma importância para a defesa antiviral em adultos de *D. melanogaster*. Moscas mutantes nulas para os genes *Dicer-2* e *Ago-2* apresentaram baixa taxa de sobrevivência quando da infecção por DCV e FHV (van Rij *et al.* 2006). Spellberg & Marr (2015), por suas vezes, demonstraram que o fator de transcrição FOXO é ativado por infecção viral em *Drosophila*. Os mesmos autores mostraram que a linhagem celular S2 superexpressando FOXO foi mais eficiente para silenciar moléculas de RNA dupla fita. Esses dados fazem uma conexão direta entre a via FOXO, possivelmente sob o controle de PI3K/AKT, e a via de RNA de interferência, em *Drosophila*. Recentemente, foi relatado que a via PI3K/AKT foi ativada em consequência da infecção por dois *Alphavirus* (Mazzon *et al.*, 2017). Tal ativação ocorreu por meio do domínio YXXM da proteína viral nsP3, cuja ligação a PI3K levou a ativação de AKT, resultando em uma infecção mais virulenta. Por outro lado, a mutação deste domínio, incapacitando o vírus de ativar AKT, levou a uma menor taxa de replicação viral. Recentemente, a via PI3K/AKT foi associada à infecção por ZKV, em um estudo que comparou o proteoma de 79 indivíduos, divididos entre infectados e não infectados (Melo *et al.*, 2017).

De posse dessas informações, investigamos se, em *A. aegypti*, a ativação da via PI3K/AKT de alguma maneira modularia a expressão de alguns importantes genes das vias JAK-STAT e RNAi. Em nosso estudo, nós não observamos modulação ostensiva

da via JAK-STAT, apesar do discreto aumento da expressão de *stat*, um dia após o silenciamento de *akt*. Por outro lado, dois cruciais componentes da via de RNAi, Dicer-2 e Ago-2, se mostraram semelhantes acerca de seus perfis de expressão, ambos sendo ativados principalmente nos dois primeiros dias após o silenciamento de *akt*. Apesar de discreta, a indução da expressão de Dicer-2 foi consistente entre as diferentes réplicas biológicas e fornece evidência para uma possível conexão entre essas duas vias em nosso modelo de estudo.

O silenciamento de *pp2a*, um inibidor de AKT no citoplasma, modulou um grupo de genes de maneira semelhante àquela observada quando do silenciamento de *akt*. O fato de termos o resultado, por enquanto, de apenas uma réplica biológica, nos fornece pouco embasamento para melhor interpretação dos dados. Apesar de a lógica mais intuitiva apontar para um efeito antagonista ao que fora verificado para *akt*, o resultado pode ser compreendido sob a ótica de que se trata de um sistema complexo de regulações, muitas das quais ainda desconhecidas.

O transcriptoma de *A. aegypti* silenciado para *akt*, além de confirmar resultados obtidos a partir de qRT-PCR, como AMPs e NOS, por exemplo (vide tabela S1), trouxe luz sobre outras implicações que uma eventual ativação da via PI3K/AKT é capaz de gerar no mosquito. Dentre os 345 transcritos identificados, muitos dos quais de funções ainda desconhecidas, daremos destaque nesta seção aos que julgamos mais relevantes.

Além do envolvimento com a resposta imune, a via PI3K/AKT também está associada a fatores comportamentais. Em vertebrados esta via está associada, entre outros, a ansiedade e depressão (Polter et al., 2009). Recentemente, em insetos, a via PI3K/AKT foi associada ao comportamento de migração e reprodução (Lin et al., 2010). Nosso transcriptoma revelou a modulação de 5 *odorant binding proteins* (OBP26, OBP27, OBP38, OBP39, OBP55), das quais todas foram reprimidas no quarto dia após o silenciamento de *akt*. OBPs são conhecidas pela função de interpretar sinais químicos ambientais, tais como feromônios, voláteis de plantas e odores animais. Isso implica diretamente em fatores comportamentais como identificação de parceiros, localização de fontes de alimentos e locais de oviposição, identificação de predadores, etc. Em insetos, os fatores moleculares que regulam a expressão de OBPs ainda não são bem esclarecidos (Brito et al., 2016). Este estudo, portanto, fornece a primeira evidência de uma possível ligação entre a via PI3K/AKT e a regulação de OBPs. É oportuno lembrar que os mosquitos utilizados para o sequenciamento tiveram suas cabeças excisadas, de modo que, se assim não o fosse, é possível que tivéssemos identificado

outras OBPs, uma vez que a via PI3K/AKT é sabidamente ativada no sistema nervoso de insetos (Antonova et al., 2012). Ainda no contexto comportamental, além das OBPs, identificamos duas opsinas de onda longa (*long wavelengh sensitive opsins*) (GPROP1 e GPROP2), ambas reprimidas após dois e quatro dias em mosquitos silenciados para *akt*. Opsinas são receptores sensíveis à luz, associados a processos visuais. Em insetos, as opsinas são estimuladas por radiações de ondas curtas e longas, sendo possível encontrar seis opsinas de ondas longas em *A. aegypti* (Giraldo-Calderón et al., 2017). Juntos, esses dados reforçam a importância da via PI3K/AKT no controle de mecanismos moleculares associados a fatores comportamentais, em *A. aegypti*.

Além dos genes associados a fatores comportamentais, outros importantes grupos de genes foram modulados em nosso transcriptoma, como alguns componentes do complexo de citocromo P oxidase. Vários destes genes já foram associados à resistência contra inseticidas piretróides em *Anopheles* (Yan et al., 2018; Yunta et al., 2016; Balabanidou et al., 2016; Ibrahim et al., 2016) e *Aedes* (Estep et al., 2017; Ishak et al., 2017; Avicor et al., 2014; Bariami et al., 2012). Convém mencionar, portanto, que três genes deste complexo (CYP325S2, CYP9J23 e AAEL009122) foram modulados em *A. aegypti* silenciado para *akt*.

É de se destacar que, das 11 profenoloxidasas (PPOs) identificadas em nosso transcriptoma, absolutamente todas foram reprimidas, em todos os pontos de tempo analisados durante o silenciamento de *akt*, em *A. aegypti*. Em insetos, as PPOs são intermediárias da cascata de melanização, cujas funções envolvem desde defesa contra patógenos, (encapsulação) em adultos, a pigmentação do ovo (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Em adultos de *D. melanogaster*, foi visto que a via PI3K/AKT/FOXO controla diretamente a pigmentação cuticular (Shakhmantsir et al., 2014). Este estudo demonstrou que o silenciamento de receptores para insulina acarretou em diminuição da pigmentação, mostrando que a sinalização por insulina regula a melanização cuticular em moscas adultas. Nossos resultados sugerem que, assim como ocorre em *Drosophila*, há uma íntima relação entre a via PI3K/AKT e a cascata de melanização, sendo este o primeiro relato para esta associação em *A. aegypti*. Estudos futuros, testando a habilidade de mosquitos encapsularem *beads*, quando do silenciamento de *akt*; ou, ainda, a avaliação da pigmentação em ovos de mosquitos mutantes para *akt*, em comparação com mosquitos selvagens, por exemplo, poderão reforçar estas primeiras evidências.

No que se referem aos genes da cascata de MAP quinases, seus principais componentes incluem RAS, Raf, MEK, e as posteriormente ativadas quinases de sinalização MAPK (ERK), JNK e p38MAPK. A relação entre a via PI3K/AKT e a cascata de MAPK foi demonstrada em *Drosophila*, quando Ras foi necessário para a máxima sinalização de PI3K (Orme et al., 2006). Em nosso trabalho, observamos que a quinase p38MAPK foi reprimida na ordem de 17 vezes em relação ao grupo controle, dois dias após o silenciamento de *akt*. Em *A. stephensi*, a inibição da quinase p38MAPK resultou na redução da maquinaria de síntese proteica (Wang et al., 2015). É interessante perceber que, em nosso caso, verificamos que 7 subunidades de RNAs ribossomais foram todas reprimidas, em todos os pontos de tempos analisados, possivelmente em resposta à repressão de p38MAPK. Curiosamente, Wang et al. (2015) também observaram que, em mosquitos inibidos para p38MAPK, o metabolismo mitocondrial foi reduzido. Convém mencionar que, em *A. aegypti*, a quinase p38MAPK já foi associada à regulação da expressão de defesina A (Chen-Chih Wu et al., 2007), e cecropina A1 (Moon et al., 2011).

Para modelos vertebrados, é bem estabelecida a relação da via PI3K/AKT/FOXO com a biogênese e atividade mitocondriais (Kim & Koh, 2017). Inclusive, Fernandez-Marcos & Auwerx (2011) mostraram que, na ausência de FOXO, não há indução de PGC-1a, um mediador chave da biogênese mitocondrial em células de mamíferos. Em artrópodos, por outro lado, há poucos trabalhos que elucidam semelhante envolvimento. Os poucos disponíveis, entretanto, nos ajudam a entender o que acontece com o mosquito *A. aegypti* quando ativamos a via PI3K/AKT mediante o silenciamento do repressor de FOXO, a quinase AKT. Em um esclarecedor estudo, Luckhart et al. (2013) utilizaram *Anopheles stephensi* superexpressando constitutivamente AKT para investigar as consequências geradas nas mitocôndrias dos mosquitos quando a via PI3K/AKT estava reprimida. Eles demonstraram que, nos mosquitos transgênicos, as mitocôndrias foram afetadas negativamente tanto em número quanto em forma, sugerindo que tal efeito tenha sido gerado em consequência da repressão de FOXO. Em *Drosophila*, a superexpressão de PGC-1a levou ao aumento da atividade mitocondrial e dos complexos respiratórios I, III, IV e V (Rera et al., 2011). Em nosso transcriptoma, identificamos que 3 subunidades da enzima NADH desidrogenase (ND2, ND2, ND4L) foram fortemente ativadas quando do silenciamento de *akt*, além de uma subunidade da enzima ATP sintase mitocondrial (AAEL018667), sugerindo aumento da atividade mitocondrial. Dentro de nosso critério de filtragem para

os genes diferencialmente expressos, a subunidade ND2, inclusive, foi o único transcrito presente nos 3 dias analisados. Faz-se indispensável argumentar que, em mamíferos, estudos com linhagens celulares demonstraram que óxidos nítricos são potentes indutores da atividade e biogênese mitocondriais. Tal indução ocorre porque óxidos nítricos ativam a enzima guanilato ciclase (identificada em nosso transcriptoma como AAEL007359), a qual induz a expressão de PGC-1a (Nisoli et al., 2003; Nisoli et al., 2004; Nisoli et al., 2005). É oportuno citar que, em nosso caso, no entanto, a expressão de PGC-1a não foi modulada em consequência do silenciamento de *akt*. Ainda assim, experimentos de co-silenciamento com os genes *akt* e *pgc-1a* e com *akt* e *nos* foram capazes de reverter a potente indução da expressão gênica de subunidades da enzima NADH desidrogenase, observada em nosso transcriptoma, sugerindo que, em *A. aegypti*, tanto PGC-1a quanto NOS são indutores da atividade mitocondrial. Além disso, em nossos resultados, a expressão de *nos* se mostrou dependente da de *pgc-1a*, o que em parte explica o semelhante perfil de expressão das subunidades ND2, ND2 e ND4L, quando dos ensaios de co-silenciamento.

A produção de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) já foi relacionada a diversos processos fisiológicos, incluindo transdução de sinal (Nakamura et al., 1997; Suzuki et al., 1997), resposta a estresse oxidativo (Aslund & Beckwith, 1999; Zheng et al., 1998), desenvolvimento (Pierce et al., 1991), proliferação celular (Burdon, 1995; Murrell et al., 1990; Novogrodsky et al., 1982) e apoptose (Pierce et al., 1991; Lennon et al., 1991). Em nosso modelo, o aumento da produção de H_2O_2 no intestino médio dos mosquitos silenciados para *akt*, em comparação com o grupo controle, também corrobora a hipótese de que a ativação da via PI3K/AKT está associada a um aumento da atividade mitocondrial. É importante lembrar que, em modelos vertebrados, as mitocôndrias são consideradas a principal fonte celular de produção de H_2O_2 (Chance et al., 1979). Em determinados tecidos, como pulmão, coração e músculo, a contribuição mitocondrial de H_2O_2 no citosol é em torno de 70%, 92% e 96%, respectivamente (Chance et al., 1979; Boveris et al., 1972). Além disso, o aumento da produção mitocondrial de H_2O_2 , no citosol, leva a ativação de c-jun quinases N-terminal (identificada em nosso transcriptoma como AAEL014747), as quais são críticas indutoras de apoptose (Frisch et al., 1996; Xia et al., 1995).

Vale ressaltar que NADH desidrogenase é uma enzima chave da cadeia respiratória envolvida na produção de peróxido de hidrogênio, assim como óxidos nítricos (NO) são potentes indutores da produção de H_2O_2 mitocondrial (Poderoso et al.,

1996; Poderoso et al., 1999). Portanto, nosso conjunto de dados fornece evidências sólidas de que a ativação da via PI3K/AKT está associada ao aumento da atividade mitocondrial em *A. aegypti* (Fig. 33). Interessantemente, em *Anopheles gambiae*, Gonçalves et al. (2011) descobriram que espécies reativas de oxigênio mitocondriais modularam a susceptibilidade do mosquito frente à infecção por *Plasmodium berghei*. Os autores deste estudo demonstraram que o silenciamento de AgMC1, uma proteína transportadora de membrana da mitocôndria, resultou em diminuição da produção de ROS no intestino médio dos mosquitos, acarretando em aumento da susceptibilidade do mosquito em relação ao protozoário.

Em nosso modelo, é possível, ainda, que tanto o aumento da expressão de *nos*, quanto o aumento da produção de H_2O_2 no intestino médio dos mosquitos, em consequência do silenciamento de *akt*, tenha gerado estresse oxidativo no mosquito. Tal fato pode ser corroborado pelo aumento da expressão de Manganês Superóxido Dismutase (MnSOD), em nosso transcriptoma, quando sob análise de $-1,5 \geq \textit{fold change} \geq 1,5$ (dados não mostrados). MnSOD é uma enzima antioxidante, que, apesar de ser codificada pelo DNA genômico, atua nas mitocôndrias com a função de detoxificar radicais livres $O_2^{\cdot-}$, oriundos da respiração mitocondrial.

Os dados referentes às PPOs e aos transcritos mitocondriais sugerem que tais genes são potenciais marcadores da via PI3K/AKT, em *A. aegypti*.

Finalmente, é importante observar que a grande maioria dos transcritos, de maneira geral, tenha sido regulada negativamente durante o silenciamento de *akt*. Ainda, se observarmos apenas os genes de imunidade, verificamos que, no terceiro dia, dos 18 genes modulados, 14 foram reprimidos. No quarto dia, de maneira ainda mais ostensiva, dos 25 genes modulados, absolutamente todos foram regulados negativamente. É válido lembrar, também, que os genes classificados como “diversos”, segundo nossa análise de GO, também foram predominantemente reprimidos. No quarto dia, por exemplo, dos 27 genes modulados, 21 sofreram diminuição dos níveis transcricionais. Nós propomos que o aumento da atividade mitocondrial, somado ao aumento da expressão de genes associados à produção de ROS tenha gerado estresse oxidativo no mosquito, fazendo com que o consumo energético fosse usado de forma a reprimir determinadas funções (imunes, por exemplo).

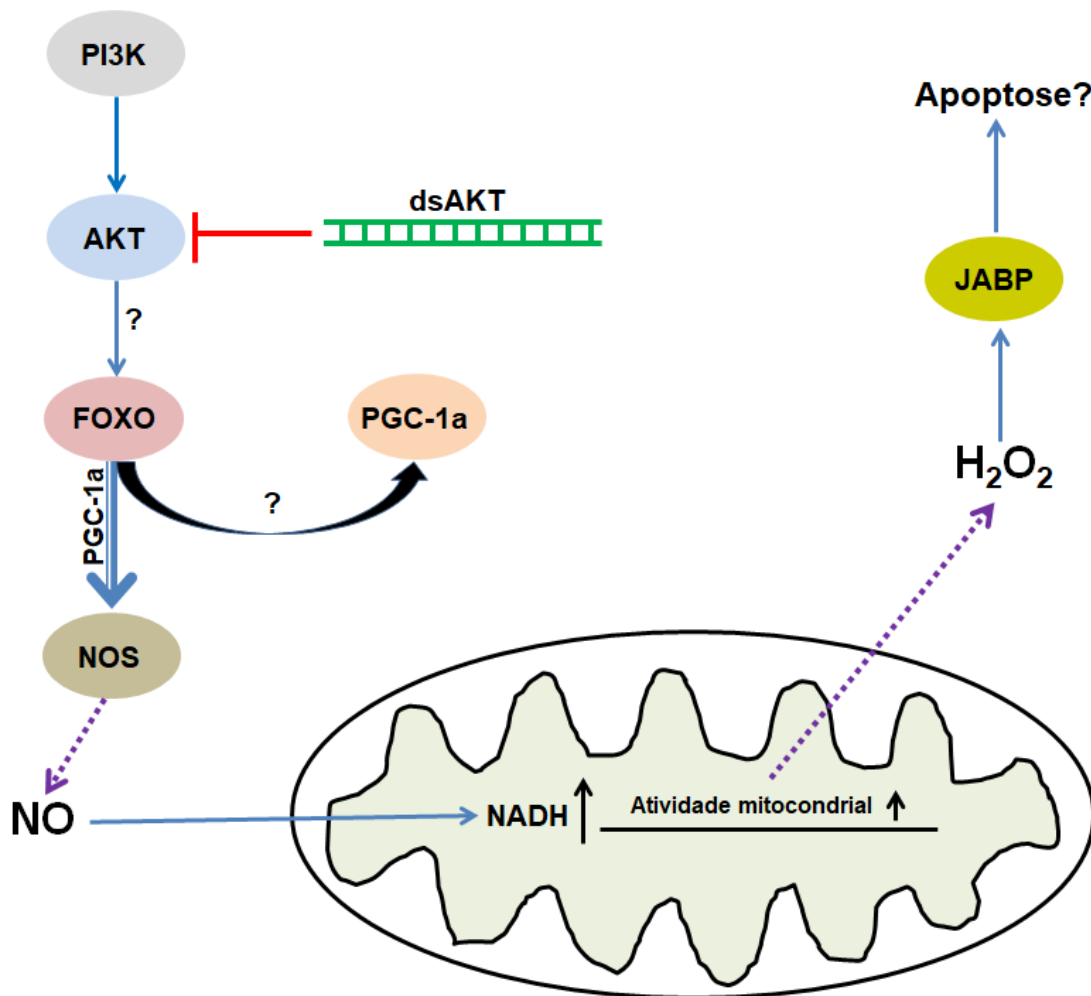


Figura 33: Esquema proposto para ativação mitocondrial em consequência do silenciamento de *akt*, em *A. aegypti*. A ativação da via PI3K/AKT, mediante o silenciamento de *akt*, permite a translocação nuclear do fator de transcrição FOXO e a consequente ativação de um grupo de genes. Dentre esses genes, a ativação de NOS, de maneira dependente de PGC-1a, gera óxidos nítricos (NO) que induzem aumento da atividade mitocondrial. Tal aumento acarreta em maior produção de H₂O₂ no citosol, ativando JABP (jun activation binding protein), que por sua vez induziria apoptose celular. Esquema baseado no conjunto de dados gerado neste estudo e em informações oriundas de trabalhos citados nesta tese.

Em nível transcricional, muitas foram as consequências geradas em virtude do silenciamento de *akt*. Cabe recordar, pois, que muitos transcritos identificados em nossas análises já foram amplamente associados ao controle da microbiota bacteriana e homeostase intestinal, em artrópodes, tais como AMPs e NOS (Buchon et al., 2013). Tal fato nos fez questionar, portanto, quais seriam os impactos que essas modulações gerariam na microbiota bacteriana de *A. aegypti* quando da ativação da via PI3K/AKT.

Ficou evidente, a partir dos dados de qRT-PCR, que a carga total de bactérias do mosquito foi modulada, tanto para o silenciamento de *akt* quanto de *pp2a*. Da mesma forma, os ensaios de co-silenciamentos tanto para *akt* e *pgc-1a* quanto para *akt* e *nos*, foram capazes de modular a microbiota bacteriana do mosquito, demonstrando que a ativação da via PI3K/AKT gera consequências para a microbiota independentemente de uma eventual ativação mitocondrial. Esses resultados sugerem que a via PI3K/AKT de alguma forma influencia na homeostase e manutenção da microbiota bacteriana de *A. aegypti*.

O microbioma desses mosquitos silenciados nos permitiu compreender em nível taxonômico quais os efeitos da ativação da via PI3K/AKT sobre a microbiota bacteriana.

O fato de as três réplicas biológicas terem se segregado, em diferentes coordenadas, quando da análise de diversidade beta, sinaliza para uma forte influência do meio externo em nossos experimentos. Apesar disso, ficou evidente, após a análise de diversidade beta das três réplicas, separadamente, que as amostras foram capazes de se separar prioritariamente com base nas condições experimentais (dsAKT vs. dsLacZ). Tal fato nos sugere que essa separação tenha de fato ocorrido em função dos efeitos gerados na microbiota do mosquito em consequência da ativação da via PI3K/AKT.

Em nossas análises de abundância relativa dos táxons, observamos que determinados grupos de bactérias foram favorecidos enquanto outros foram reprimidos, no quarto dia após o silenciamento de *akt*. Em nosso microbioma, verificamos que a Classe Gammaproteobacteria foi claramente favorecida pelo silenciamento de *akt*, em todas as réplicas biológicas. A Classe Gammaproteobacteria já foi relacionada ao aumento de açúcares livres para o hospedeiro através da degradação de polissacarídeos, em *Drosophila* (Chen et al., 2016; Engel et al., 2013). Além disso, é interessante citar que, no mesmo modelo, a desregulação da homeostase intestinal favoreceu Gammaproteobacteria (Clark et al., 2015). Em contrapartida, a Classe Betaproteobacteria foi sempre menos abundante no grupo de mosquitos silenciados.

Dentro da Classe Gammaproteobacteria, a Ordem Pseudomonadales foi mais predominante nas três réplicas biológicas, no grupo de mosquitos silenciados para *akt*. A Ordem Burkholderiales, por sua vez, foi visivelmente menos predominante em relação ao nosso grupo controle, sendo o Gênero *Achromobacter* seu único representante em ambas as condições experimentais. Em *Drosophila*, a alta abundância relativa desse Gênero foi relacionada com altas quantidades de glicogênio livre (Chaston et al., 2016).

Os resultados obtidos a partir do microbioma nos permitem estabelecer que a via PI3K/AKT exerce um importante papel no controle e manutenção da microbiota bacteriana em *A. aegypti*.

6 CONCLUSÕES

- ✚ O silenciamento de *akt* induziu a expressão dos AMPs *atacina*, *cecropina G* e *cecropina E* nos três primeiros dias após injeção, sugerindo que, assim como ocorre em *Drosophila*, é possível que a via PI3K/AKT/FOXO ative AMPs independentemente das vias clássicas de imunidade, em *A. aegypti*;
- ✚ Nossos resultados sugerem que o silenciamento de *akt* induz aumento da atividade mitocondrial, em *A. aegypti*. Aparentemente, tal indução é mediada tanto por PGC-1a quanto por NOS, quando da ativação da via PI3K/AKT;
- ✚ A maciça repressão de 11 PPOs sugere que, assim como observado em outros organismos, também em *A. aegypti* há uma íntima relação entre a via PI3K/AKT e a cascata de melanização;
- ✚ O fato de termos observado modulação em 5 OBPs e 2 opsinas sugere que, em *A. aegypti*, a via PI3K/AKT seja uma das importantes vias responsáveis pela regulação de mecanismos moleculares associados a fatores comportamentais;
- ✚ Nossa análise de GO sugere que a ativação da via PI3K/AKT, em consequência do silenciamento de *akt*, acarretou na imunossupressão dos mosquitos, talvez como uma medida de compensação do consumo energético;
- ✚ O silenciamento gênico de *akt* claramente modulou a carga e a diversidade bacterianas em *A. aegypti*, de modo que, enquanto alguns táxons foram favorecidos diante da ativação da via PI3K/AKT, outros foram reprimidos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aghdam Z, Sinha J, Tabbaa OP, Hao N. Dynamic control of gene regulatory logic by seemingly redundant transcription factors. *Elife*. 2016 Sep 30;5. pii: e18458. doi: 10.7554/eLife.18458.
2. Antonova Y, Arik A, Moore W, Riehle M, Brown M. (2012) Insulin-like peptides: structure, signaling, and function. In *Insect Endocrinology* (Gilbert, L., ed.), pp. 63–92, Elsevier, New York
3. Arik AJ, Hun LV, Quicke K, Piatt M, Ziegler R, Scaraffia PY, Badgandi H, Riehle MA. Increased Akt signaling in the mosquito fat body increases adult survivorship. *FASEB J*. 2015 Apr;29(4):1404-13. doi: 10.1096/fj.14-261479. Epub 2014 Dec 30.
4. Avicor SW, Wajidi MF, El-Garj FM, Jaal Z, Yahaya ZS. Insecticidal activity and expression of cytochrome P450 family 4 genes in *Aedes albopictus* after exposure to pyrethroid mosquito coils. *Protein J*. 2014 Oct;33(5):457-64. doi: 10.1007/s10930-014-9580-z.
5. Balabanidou V, Kampouraki A, MacLean M, Blomquist GJ, Tittiger C, Juárez MP, Mijailovsky SJ, Chalepakis G, Anthousi A, Lynd A, Antoine S, Hemingway J, Ranson H, Lycett GJ, Vontas J. Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 16;113(33):9268-73. doi: 10.1073/pnas.1608295113. Epub 2016 Jul 20.
6. Bariami V, Jones CM, Poupardin R, Vontas J, Ranson H. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6):e1692. doi: 10.1371/journal.pntd.0001692. Epub 2012 Jun 12.
7. Belvin, M.P. and Anderson, K.V. (1996) A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12, 393–416.
8. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc.*, v.57, n.1, p.289–300, 1995.
9. Beserra EB, Fernandes CRM, Sousa JT, Freitas EM, Santos KD. Efeito da qualidade da água no ciclo de vida e na atração para oviposição de *Aedes aegypti* (L.)

- (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology*, v. 39, n. 6, p. 1016–1023, 2010.
10. Boissière A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango SE, Shahbazkia HR, Awono-Ambene PH, Levashina EA, Christen R, Morlais I 2012. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog*, 8, e1002742.
 11. Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med*. 2003 Sep;254(3):197-215.
 12. Boutros, M., Agaisse, H. and Perrimon, N. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev. Cell* 2002;3, 711-722.
 13. Braga, I. A.; Valle, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviço de Saúde*, v. 16, n. 2, p. 113–118, 2007a.
 14. Braga, I. A.; Valle, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007b.
 15. Brito NF, Moreira MF, Melo AC. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. *J Insect Physiol*. 2016 Dec;95:51-65. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.09.008. Epub 2016 Sep 14.
 16. Buchon N, Broderick N, Lemaitre, B. Gut homeostasis in a microbial world: insights from *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 615–626, 2013.
 17. Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol*. 1999 Jun-Jul;23(4-5):329-44.
 18. Caporaso, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 23, n. 108, p. 4516–4522, 2010.
 19. Castro DP, Seabra SH, Garcia ES, de Souza W, Azambuja P 2007. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural studies of adhesion, lysis and biofilm formation by *Serratia marcescens*. *Exp Parasitol*, 117, 201-207.
 20. Chaston JM, Dobson AJ, Newell PD, Douglas AE. Host genetic control of the microbiota mediates the *Drosophila* nutritional phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 82, n. 2, p. 671–679, 2016.
 21. Chaston JM, Dobson AJ, Newell PD, Douglas AE. Host Genetic Control of the Microbiota Mediates the *Drosophila* Nutritional Phenotype. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Nov 13;82(2):671-9. doi: 10.1128/AEM.03301-15.
 22. Chen B, Teh BS, Sun C, Hu S, Lu X, Boland W, Shao Y. Biodiversity and

Activity of the Gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*. *Sci Rep*. 2016 Jul 8;6:29505. doi: 10.1038/srep29505.

23. Chen-Chih Wu R, Shaio MF, Cho WL. A p38 MAP kinase regulates the expression of the *Aedes aegypti* defensin gene in mosquito cells. *Insect Mol Biol*. 2007 Aug;16(4):389-99. Epub 2007 May 27.
24. Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol Rev*. 2004 Apr;198:127-48.
25. Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, Dimopoulos G 2011a. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science*, 332, 855-858.
26. Cirimotich CM, Ramirez JL, Dimopoulos G 2011b. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe*, 10, 307-310.
27. Clark RI, Salazar A, Yamada R, Fitz-Gibbon S, Morselli M, Alcaraz J, Rana A, Rera M, Pellegrini M, Ja WW, Walker DW. Distinct shifts in microbiota composition during *Drosophila* aging impair intestinal function and drive mortality. *Cell Rep*. 2015 Sep 8; 12(10): 1656–1667. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.004
28. Costa A, Jan E, Sarnow P, Schneider D. The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*. *PLoS One*. 2009 Oct 15;4(10):e7436.
29. de Keizer PL, Burgering BM, Dansen TB. Forkhead box o as a sensor, mediator, and regulator of redox signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Mar 15;14(6):1093-106. doi: 10.1089/ars.2010.3403. Epub 2010 Sep 20.
30. Dillon RJ, Dillon VM 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol*, 49, 71-92.
31. Dionne MS, Pham LN, Shirasu-Hiza M, Schneider DS. Akt and FOXO dysregulation contribute to infection-induced wasting in *Drosophila*. *Curr Biol*. 2006 Oct 24;16(20):1977-85.
32. Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, Dimopoulos G 2006. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog.*, 2, e52.
33. Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog*, 5, e1000423.
34. Dutra HL, Rocha MN, Dias FB, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA. *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti*

- Mosquitoes. *Cell Host Microbe*. 2016 Jun 8;19(6):771-4. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.021. Epub 2016 May 4.
35. Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, v. 37, n. 5, p. 699–735, 2013.
 36. Estep AS, Sanscrainte ND, Waits CM, Louton JE, Becnel JJ. Resistance Status and Resistance Mechanisms in a Strain of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Puerto Rico. *J Med Entomol*. 2017 Nov 7;54(6):1643-1648. doi: 10.1093/jme/tjx143.
 37. Farhan M, Wang H, Gaur U, Little P, Xu J, Zheng W. FOXO Signaling Pathways as Therapeutic Targets in Cancer. *Int J Biol Sci* 2017; 13(7):815-827. doi:10.7150/ijbs.20052
 38. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2011 Apr;93(4):884S-90. doi: 10.3945/ajcn.110.001917. Epub 2011 Feb 2.
 39. Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811 (1998).
 40. Fritz JH, Girardin SE, Philpott DJ. Innate immune defense through RNA interference. *Sci STKE*. 2006 Jun 13;2006(339):pe27.
 41. Gaio AdO, Guamão DD, Santos AV, Berbert-Molina MA, pimenta PF, Lemos FJ 2011. Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). *Parasit. Vectors*, 105.
 42. Gentile C, Lima JBP, Peixoto AA. Isolation of a fragment homologous to the rp49 constitutive gene of *Drosophila* in the neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p. 545–547, 2005.
 43. Giraldo-Calderón GI, Zanis MJ, Hill CA. Retention of duplicated long-wavelength opsins in mosquito lineages by positive selection and differential expression. *BMC Evol Biol*. 2017 Mar 21;17(1):84. doi: 10.1186/s12862-017-0910-6.
 44. Hansen M, Taubert S, Crawford D, Libina N, Lee SJ, Kenyon C. Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 2007 Feb;6(1):95-110.
 45. Hay N. Interplay between FOXO, TOR, and Akt. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1813, n. 11, p. 1965–1970, 2011.
 46. Hoffmann JA, Reichhart JM. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary

- perspective. *Nat Immunol.* 2002 Feb;3(2):121-6.
47. Hoffmann, JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature.* 2003 Nov 6;426(6962):33-8.
 48. Horst A, Burgering BM. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 6, n. 8, p. 440–450, 2007.
 49. Hultmark D. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol.* 2003 Feb;15(1):12-9.
 50. Hurst GD, Hutchence KJ 2010. Host defence: getting by with a little help from our friends. *Curr Biol*, 20, R806-808.
 51. Ibrahim SS, Riveron JM, Stott R, Irving H, Wondji CS. The cytochrome P450 CYP6P4 is responsible for the high pyrethroid resistance in knockdown resistance-free *Anopheles arabiensis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2016 Jan;68:23-32. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.10.015. Epub 2015 Nov 6.
 52. Ishak IH, Kamgang B, Ibrahim SS, Riveron JM, Irving H, Wondji CS. Pyrethroid Resistance in Malaysian Populations of Dengue Vector *Aedes aegypti* Is Mediated by CYP9 Family of Cytochrome P450 Genes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Jan 23;11(1):e0005302. doi: 10.1371/journal.pntd.0005302. eCollection 2017 Jan.
 53. Joyce JD, Nogueira JR, Bales AA, Pittman KE, Anderson JR 2011. Interactions between La Crosse virus and bacteria isolated from the digestive tract of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 48, 389-394.
 54. Juliana Benito, Hao Zheng, Fanny S. Ng, and Paul E. Hardin. Transcriptional feedback loop regulation, function, and ontogeny in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, v. 72, n. 1, p. 437–444, 2007.
 55. Kanao T, Sawada T, Davies S-A, Ichinose H, Hasegawa K, et al. (2012) The Nitric Oxide-Cyclic GMP Pathway Regulates FoxO and Alters Dopaminergic Neuron Survival in *Drosophila*. *PLoS ONE* 7(2): e30958. doi:10.1371/journal.pone.0030958
 56. Keene, K.M., Foy, B.D., Sanchez-Vargas, I., Beaty, B.J., Blair, C.D., and Olson, K.E. 2004. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 17240–17245.
 57. Kim S, Koh H. Role of FOXO transcription factors in crosstalk between mitochondria and the nucleus. *J Bioenerg Biomembr.* 2017 Aug;49(4):335-341. doi: 10.1007/s10863-017-9705-0.
 58. Kuntz SG, Williams BA, Sternberg PW, Wold BJ. Transcription factor

redundancy and tissue specific regulation: Evidence from functional and physical network connectivity. *Genome Res.* 2012 Oct;22(10):1907-19. doi: 10.1101/gr.133306.111. Epub 2012 Jun 22.

59. Lamberty M, Zachary D, Lanot R, Bordereau C, Robert A, Hoffmann JA, Bulet P. Insect immunity. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. *J Biol Chem.* 2001 Feb 9;276(6):4085-92. Epub 2000 Oct 26.

60. Lehane MJ. Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol.* 1997;42:525-50.

61. Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:697-743.

62. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

63. Luckhart S, Giulivi C, Drexler AL, Antonova-Koch Y, Sakaguchi D, Napoli E, Wong S, Price MS, Eigenheer R, Phinney BS, Pakpour N, Pietri JE, Cheung K, Georgis M, Riehle M. Sustained activation of Akt elicits mitochondrial dysfunction to block *Plasmodium falciparum* infection in the mosquito host. *PLoS Pathog.* 2013 Feb;9(2):e1003180. doi: 10.1371/journal.ppat.1003180. Epub 2013 Feb 28.

64. Luo H, Dearolf CR. The JAK/STAT pathway and *Drosophila* development. *Bioessays* 2001;23:1138–1147.

65. Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 18, n. 3, p. 411–415, 1969.

66. Mazzon M, Castro C, Thaa B, Liu L, Mutso M, Liu X, Mahalingam S, Griffin JL, Marsh M, McInerney GM. Alphavirus-induced hyperactivation of PI3K/AKT directs pro-viral metabolic changes. *PLoS Pathog.* 2018 Jan 29;14(1):e1006835. doi: 10.1371/journal.ppat.1006835. eCollection 2018 Jan.

67. McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AW, Sidhu M, Wang YF, O'Neill SL. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science.* 2009 Jan 2;323(5910):141-4. doi: 10.1126/science.1165326.

68. Medzhitov e Janeway, 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 2002 Apr 12;296(5566):298-300

69. Meister S, Agianian B, Turlure F, Religio A, Morlais I, Kafatos FC,

Christophides GK 2009. *Anopheles gambiae* PGRPLC-mediated defense against bacteria modulates infections with malaria parasites. *PLoS Pathog*, 5, e1000542.

70. Meister, G. and Tuschl, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343–349.

71. Melo CFOR1, Delafiori J, de Oliveira DN, Guerreiro TM, Esteves CZ, Lima EO, Pando-Robles V, Catharino RR; Zika-Unicamp Network. Serum Metabolic Alterations upon Zika Infection. *Front Microbiol*. 2017 Oct 10;8:1954. doi: 10.3389/fmicb.2017.01954. eCollection 2017.

72. Michel T, Reichhart J-M, Hoffmann JA, Royet J: *Drosophila* Toll is activated by Gram positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 2001, 414:756-759.

73. Minard G, Mavingui P, Moro CV. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors*. 2013 May 20;6:146. doi: 10.1186/1756-3305-6-146.

74. Moon AE, Walker AJ, Goodbourn S. Regulation of transcription of the *Aedes albopictus* cecropin A1 gene: A role for p38 mitogen-activated protein kinase. *Insect Biochem Mol Biol*. 2011 Aug;41(8):628-36. doi: 10.1016/j.ibmb.2011.04.001. Epub 2011 Apr 8.

75. Moraes CS, Seabra SH, Castro DP, Brazil RP, de Souza W, Garcia ES, Azambuja P 2008. *Leishmania (Leishmania) chagasi* interactions with *Serratia marcescens*: ultrastructural studies, lysis and carbohydrate effects. *Exp Parasitol*, 118, 561-568.

76. Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*. 2009 Dec 24;139(7):1268-78. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.042.

77. Mortazavi A, Williams BA, Mccue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods*, v.5, n.7, p.621-628, 2008.

78. Nene V, Wortman JR, Lawson D, et. al 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*, 316, 1718.

79. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, et al. (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*

299: 896–899.

80. Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, et al. (2004) Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 16507–16512.

81. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*. 2005 Oct 14;310(5746):314-7.

82. Oliveira, N. *Aedes aegypti*: conheça a história do mosquito no Brasil e suas características, de 11 de dezembro de 2015. Agência Brasil de Comunicação s/a. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2015-12/aedes-aegypti-conheca-historia-do-mosquito-no-brasil-e-suas-caracteristicas>. Acesso em: 27 de agosto de 2017.

83. Olmo, R. P. Análise da resposta do vetor *Aedes aegypti* à infecção por Dengue vírus: foco na barreira do intestino. 110 f. Tese (Doutorado em Bioinformática) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

84. Orme, M. H., Alrubaie, S., Bradley, G. L., Walker, C. D., & Leever, S. J. (2006). Input from Ras is required for maximal PI(3)K signalling in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.*, 8, 1298–1302.

85. Oxitec. Oxitec's vector control solution: A paradigm shift in mosquito control, de 7 de abril de 2016. Intrexon Corporation. Disponível em: <http://cdn.oxitec.com/wp-content/uploads/Oxitecs-Vector-Control-Solution-A-Paradigm-Shift-in-Mosquito-Control.pdf>. Acesso em: 27 de setembro de 2017.

86. Pan X, Zhou G, Wu J, Bian G, Lu P, Raikhel AS, Xi Z 2012. Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E23-31.

87. Polter A, Yang S, Zmijewska AA, van Groen T, Paik JH, Depinho RA, Peng SL, Jope RS, Li X. Forkhead box, class O transcription factors in brain: regulation and behavioral manifestation. *Biol Psychiatry*. 2009 Jan 15;65(2):150-9. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.08.005. Epub 2008 Sep 27.

88. Prado, P. et al. Ordenação multivariada na ecologia e seu uso em ciências ambientais. *Ambiente & Sociedade*, v. 5, n. 10, p. 1–15, 2002.

89. Ramirez JL, Dimopoulos G. The Toll immune signaling pathway control

conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. *Dev Comp Immunol.* 2010 Jun;34(6):625-9. doi: 10.1016/j.dci.2010.01.006. Epub 2010 Jan 19.

90. Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, Dimopoulos G 2012. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1561.

91. Rera M, Bahadorani S, Cho J, Koehler CL, Ulgherait M, Hur JH, Ansari WS, Lo T Jr, Jones DL, Walker DW. Modulation of longevity and tissue homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 homolog. *Cell Metab.* 2011 Nov 2;14(5):623-34. doi: 10.1016/j.cmet.2011.09.013.

92. Sanchez-Vargas, I., Travanty, E.A., Keene, K.M., Franz, A.W., Beaty, B.J., Blair, C.D., and Olson, K.E. 2004. RNA interference, arthropod-borne viruses, and mosquitoes. *Virus Res.* 102: 65–74.

93. Shakhmantsir I, Massad NL, Kennell JA. Regulation of cuticle pigmentation in *drosophila* by the nutrient sensing insulin and TOR signaling pathways. *Dev Dyn.* 2014 Mar;243(3):393-401. doi: 10.1002/dvdy.24080. Epub 2013 Nov 7.

94. Silva, H. H. G.; Silva, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n. 4, p. 349–355, 1999.

95. Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Oct 20;106(42):17841-6.

96. Spellberg MJ, Marr MT 2nd. FOXO regulates RNA interference in *Drosophila* and protects from RNA virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Nov 24;112(47):14587-92. doi: 10.1073/pnas.1517124112. Epub 2015 Nov 9.

97. Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292: 246-248. 1981. *J Immunol.* 2009 Jun 1;182(11):6635-7.

98. van Rij, R.P. and Andino, R. 2006. The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection in mammals. *Trends Biotechnol.* 24: 186–193.

99. Veja-Rúa, A. et al. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten american countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya

- virus. *Journal of Virology*, v. 88, n. 11, p. 6294–6306, 2014.
100. Wang B, Pakpour N, Napoli E, Drexler A, Glennon EK, Surachetpong W, Cheung K, Aguirre A, Klyver JM, Lewis EE, Eigenheer R, Phinney BS, Giulivi C, Luckhart S. *Anopheles stephensi* p38 MAPK signaling regulates innate immunity and bioenergetics during *Plasmodium falciparum* infection. *Parasit Vectors*. 2015 Aug 19;8:424. doi: 10.1186/s13071-015-1016-x.
101. Weiss BL, Wang J, Aksoy S 2011. Tsetse immune system maturation requires the presence of obligate symbionts in larvae. *PLoS Biol*, 9, e1000619.
102. Wu W, Lai F. Functional redundancy of transcription factors explains why most binding targets of a transcription factor are not affected when the transcription factor is knocked out. *Biomed Central Systems Biology*, v. 9, n. 6, S2, 2015.
103. Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS.Pathog.*, 4, e1000098.
104. Yan ZW, He ZB, Yan ZT, Si FL, Zhou Y, Chen B. Genome-wide and expression-profiling analyses suggest the main cytochrome P450 genes related to pyrethroid resistance in the malaria vector, *Anopheles sinensis* (Diptera Culicidae). *Pest Manag Sci*. 2018 Feb 2. doi: 10.1002/ps.4879.
105. Yunta C, Grisales N, Nász S, Hemmings K, Pignatelli P, Voice M, Ranson H, Paine MJ. Pyriproxyfen is metabolized by P450s associated with pyrethroid resistance in *An. gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2016 Nov;78:50-57. doi: 10.1016/j.ibmb.2016.09.001. Epub 2016 Sep 7.
106. Zara, A. L. S. A. et al. *Aedes aegypti* control strategies: a review. *Epidemiologia e Serviço de Saúde*, v. 25, n. 2, p. 391–404, 2016.
107. Zeidler MP, Bach EA, Perrimon N. The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway. *Oncogene* 2000;19:2598–2606.
108. Zou Z, Souza-Neto J, Xi Z, Kokoza V, Shin SW, Dimopoulos G, Raikhel A 2011. Transcriptome analysis of *Aedes aegypti* transgenic mosquitoes with altered immunity. *PLoS Pathog*, 7, e1002394.
109. Zouache K, Michelland RJ, Failloux AB, Grundmann GL, Mavingui P 2012. Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. *Mol Ecol*, 21, 2297-2309.

ANEXOS

Tabela S 1: Genes diferencialmente expressos nos mosquitos dsAKT em relação aos dsLacZ.

Gene ID	Gene description	dsAKT vs dsLacZ 2d		dsAKT vs dsLacZ 3d		dsAKT vs dsLacZ 4d	
		Fold change	FDR p-value	Fold change	FDR p-value	Fold change	FDR p-value
AAEL000021	hypothetical protein	-1,07	1	1,33	1	-6,99	0,01
AAEL000068	RpS25: 40S ribosomal protein S25	-2,26	0,03	1,34	0,89	1,23	0,95
AAEL000152	hypothetical protein	-9,05	0,05	-12,49	0,25	-1,2	1
AAEL000304	hypothetical protein	-24,23	0,03	9,18	0,12	-4,5	0,35
AAEL000325	CYP325S2: cytochrome P450	-2,17	0,25	4,36	0,05	1,64	0,66
AAEL000364	glycine cleavage system h protein	-7,99	0,000516	-2,49	0,37	-1,5	0,92
AAEL000372	myo inositol monophosphatase	-1,13	0,44	-2,07	5,69E-13	-2,04	1,03E-10
AAEL000379	cysteine-rich venom protein, putative	-4,19	0,02	-1,41	0,98	1	1
AAEL000448	hypothetical protein	2,12	0,04	-1,56	0,6	1,37	0,81
AAEL000521	hypothetical protein	2,51	0,00571	-3,53	0,000645	1,06	1
AAEL000574	hypothetical protein	-1,87	0,03	-1,48	0,48	-2,36	0,00392
AAEL000611	CECE: cecropin anti-microbial peptide	6,46	0,13	-1,31	1	-18,52	0,04
AAEL000621	CECN: cecropin anti-microbial peptide	8,89	0,03	1,45	1	-16,85	0,06
AAEL000752	hypothetical protein	10,31	0,13	-1,97	0,97	-49,21	0,02
AAEL000758	ubiquitin-activating enzyme E1	8,29	0,00951	-1,48	0,99	-1,35	1
AAEL000934	clathrin light chain	8,46	0,04	-3,11	0,68	-6,12	0,63
AAEL000946	hypothetical protein	-2,28	0,04	1,1	1	1,58	0,64
AAEL000971	smile protein	-2,41	0,01	-1,3	0,91	1,01	1
AAEL001079	fgf receptor activating protein	2,28	0,05	-1,08	1	-1,03	1
AAEL001093	PHD finger protein	-4,5	0,00181	1,01	1	-2,19	0,32
AAEL001196	cadherin	2,5	0,00301	-1,44	0,73	1,32	0,88
AAEL001208	ubiquitin-conjugating enzyme variant	-2,21	0,00261	1,88	0,09	1,31	0,74
AAEL001225	glycoside hydrolases	2,33	0,000352	1,29	0,78	-1,92	0,07
AAEL001279	merozoite surface protein, putative	9,52	0,01	-4,64	0,29	-1,72	0,94
AAEL001279	merozoite surface protein, putative	-2,05	0,00834	1,39	0,64	-1,13	1
AAEL001392	hypothetical protein	2,03	0,3	-4,35	0,00544	-1,35	1
AAEL001495	hypothetical protein	-1,24	0,55	-2,18	0,000633	-1,84	0,02
AAEL001654	hypothetical protein	4,66	0,04	-1,05	1	1,99	0,84
AAEL001701	serine-type endopeptidase	1,47	0,05	1,36	0,35	-2,14	0,0000736
AAEL001833	juvenile hormone-inducible protein, putative	1,47	0,46	-2,52	0,03	1,51	0,63
AAEL001908	hypothetical protein	-2,03	0,01	1,62	0,38	1,22	0,93
AAEL002022	protein serine/threonine kinase, putative	1,04	1	1,81	0,07	2,08	0,01
AAEL002224	hypothetical protein	-1,46	0,17	-2,03	0,00717	-1,44	0,42
AAEL002315	hypothetical protein	-2,4	0,0000697	-1,4	0,45	-1,83	0,03
AAEL002347	serine-type endopeptidase	1,23	0,66	-1,12	1	2,04	0,03

AAEL002370	hypothetical protein	21,01	0,0084	-1,74	1	-1,79	0,99
AAEL002381	hypothetical protein	-2,02	0,0013	-1,1	1	1,18	0,92
AAEL002394	hypothetical protein	2,37	0,00335	-1,72	0,26	1,22	0,95
AAEL002515	lipase 1 precursor	3,58	0,02	-2,08	0,5	-1,34	1
AAEL002593	serine protease	6,69	0,05	-2,24	0,84	-12,7	0,02
AAEL002616	hypothetical protein	-4,92	0,05	-3,15	0,39	-2,12	0,71
AAEL002650	hypothetical protein	-2,48	0,68	10,46	0,04	-2,58	0,94
AAEL002726	D7 protein, putative	2,13	0,000951	1,57	0,28	1,97	0,07
AAEL002738	synaptic vesicle protein	1,54	0,21	2,21	0,02	1,85	0,14
AAEL002762	hypothetical protein	-1,1	1	-1,1	1	-3,09	0,05
AAEL002763	hypothetical protein	-1,07	1	-1,52	0,43	-2,42	0,00522
AAEL002882	hypothetical protein	1,16	0,97	-1,07	1	4,48	0,00301
AAEL002884	hypothetical protein	-2,03	0,00669	1,28	0,77	1,17	0,93
AAEL002889	hypothetical protein	2,11	0,0000776	1,64	0,06	1,6	0,08
AAEL002920	hypothetical protein	2,02	0,000254	1,01	1	1,65	0,08
AAEL002970	hypothetical protein	-2,08	0,02	1,48	0,59	-1,28	0,87
AAEL003058	glucosyl/glucuronosyl transferases	-2,41	0,02	1,58	0,57	-2,2	0,09
AAEL003116	phosrestin i (arrestin b) (arrestin 2)	-3,21	0,00975	1,2	1	-2,58	0,13
AAEL003167	echinoid	-2,32	0,05	1,2	1	2,1	0,25
AAEL003251	serine protease snake, putative	2,76	0,05	-1,06	1	-2,63	0,36
AAEL003267	hypothetical protein	-2,68	0,02	1,1	1	-1,09	1
AAEL003389	ATT: attacin anti-microbial peptide	189,41	0,000000242	11,96	0,02	-16,25	0,06
AAEL003441	hypothetical protein	-2,17	0,03	-2,27	0,06	1,34	0,8
AAEL003448	GPRNNA13: GPCR Orphan/Putative Class A Family	1,62	0,35	4,94	0,00647	1,38	0,89
AAEL003545	carboxylesterase	2,01	0,04	1,51	0,65	-1,66	0,4
AAEL003585	hypothetical protein	-2,16	0,000158	1,47	0,38	-1,13	0,98
AAEL003603	transcription factor, putative	-2,13	0,000285	1,01	1	-1,43	0,34
AAEL003619	sodium/chloride dependent amino acid transporter	1,16	0,83	2,51	0,000221	1,1	1
AAEL003665	hypothetical protein	-2,24	0,0000109	-1,29	0,6	1,06	1
AAEL003740	hypothetical protein	5,53	0,00535	-1,31	1	1,91	0,71
AAEL003748	CYP9AE1: cytochrome P450	-1	1	-126,33	0,000000155	-44,32	0,03
AAEL003816	hypothetical protein	-1,25	0,79	1,78	0,29	-2,39	0,04
AAEL003832	DEFC: defensin anti-microbial peptide	2,26	0,35	1,35	1	-12,1	0,00019
AAEL003841	DEFA: defensin anti-microbial peptide	7,18	0,02	1,2	1	-53,57	0,00000263
AAEL003843	hypothetical protein	4,15	0,1	1,51	0,99	-10,67	0,02
AAEL003857	DEFD: defensin anti-microbial peptide	7,46	0,02	1,3	1	-35,84	0,0000537
AAEL003967	calpain 4, 6, 7, invertebrate	-1,65	0,04	-2,02	0,02	-6,4	4,05E-08
AAEL004088	aldo-keto reductase	15,59	0,00258	-13,82	0,24	1,02	1
AAEL004092	deoxyribonuclease I, putative	2,79	0,04	-1,11	1	2,5	0,24
AAEL004130	hypothetical protein	5,01	0,00587	1,02	1	-3,39	0,13
AAEL004173	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	-7,36	0,000194	3,28	0,11	1,47	0,92

AAEL004182	hypothetical protein	-2,53	0,02	1,95	0,3	1,32	0,89
AAEL004266	pre-mRNA cleavage factor im, 25kD subunit	2,62	0,02	-1,1	1	1,06	1
AAEL004301	hypothetical protein	1,15	1	1,24	1	-11,26	0,0000168
AAEL004307	n-myc downstream regulated	3,01	0,0000487	2,05	0,09	2,33	0,05
AAEL004555	hypothetical protein	-17,31	0,04	1,01	1	8,16	0,46
AAEL004591	hypothetical protein	-1,12	0,97	-1,17	1	-2,69	0,04
AAEL004606	Mod(mdg4)-54.5, putative	2,1	0,02	-1,2	1	-1,09	1
AAEL004991	protein 4.1 (band 4.1) (EPB4.1)	2,72	0,03	-1,44	0,91	-1,35	0,93
AAEL005011	roundabout 1	-4,28	0,0000036	-1,01	1	-1,43	0,63
AAEL005129	RpS30: 40S ribosomal protein S30	1,11	0,71	-1,3	0,17	-2,6	0
AAEL005194	fibrinogen and fibronectin	-1,63	0,000288	-1,54	0,00963	-2,67	3,52E-12
AAEL005374	SCRB1: Class B Scavenger Receptor (CD36 domain)	1,06	1	1,2	1	-13,88	0,02
AAEL005433	hypothetical protein	20,05	0,02	-12,11	0,02	-14,42	0,22
AAEL005437	transient receptor potential channel	-3,67	0,03	1,14	1	-3,14	0,19
AAEL005506	hypothetical protein	10,24	0,00398	-2,71	0,62	2,76	0,74
AAEL005533	synaptic vesicle protein	1,82	0,07	1,3	0,86	2,21	0,03
AAEL005553	hypothetical protein	-1,31	0,65	2,21	0,03	1,29	0,91
AAEL005641	CTLGA5: C-Type Lectin (CTL) - galactose binding	1,32	0,63	2,77	0,00146	-2,05	0,1
AAEL005693	mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase B16.6 subunit, putative	1,49	0,33	-2,14	0,04	1,01	1
AAEL005782	hypothetical protein	3,59	0,000039	2,41	0,12	-1,76	0,31
AAEL005786	hypothetical protein	2,93	0,03	-1,8	0,46	-1,5	0,89
AAEL005974	homeobox protein dbx	-2,08	0,02	1,44	0,65	-1,32	0,82
AAEL005996	hypothetical protein	-3,37	0,04	-1,98	0,6	1,03	1
AAEL006048	interleukin enhancer binding factor	-1,62	0,46	-1,41	0,9	-3,05	0,04
AAEL006106	OBP26: odorant binding protein OBP26	1,27	0,97	1,34	1	-8,1	0,00912
AAEL006111	hypothetical protein	8,55	0,04	-2,25	0,86	4,9	0,3
AAEL006115	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K (eIF3k)(eIF-3 p25)	-3,55	0,18	-1,69	0,96	-34,8	0,00000198
AAEL006126	hypothetical protein	1,65	0,45	2,07	0,43	5,74	0,01
AAEL006130	hypothetical protein	-2,09	0,02	1,1	1	1,16	1
AAEL006138	hypothetical protein	-6,71	0,00852	5,77	0,03	-6,54	0,12
AAEL006176	OBP27: odorant binding protein OBP27	1,62	0,72	1,5	1	-9,68	0,00000179
AAEL006259	GPROP2: long wavelength sensitive opsin	-3,74	0,0051	1,66	0,74	-2,89	0,09
AAEL006327	sulfotransferase (sult)	-2,18	0,00841	-1,01	1	1,62	0,44
AAEL006381	sphingomyelin phosphodiesterase	5,21	0,00000106	3,04	0,01	-1,46	0,7
AAEL006382	trypsin-eta, putative	3,84	0,04	1,11	1	-1,04	1
AAEL006498	GPROP1: long wavelength sensitive opsin	-4,73	0,00138	1,5	0,89	-2,63	0,19

AAEL006542	retinoid-inducible serine carboxypeptidase	-2,15	4,89E-11	-1,01	1	-1,33	0,15
AAEL006603	hypothetical protein	1,04	1	1,42	0,61	-2,18	0,02
AAEL006628	hypothetical protein	12,57	0,00194	2,86	0,61	5,47	0,2
AAEL006850	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	-3,76	0,04	2,73	0,51	1,25	1
AAEL006874	prophenoloxidase	-1,34	0,05	-2,4	1,23E-10	-5,2	0
AAEL006877	prophenoloxidase	-1,42	0,17	-3,08	0,0000152	-6,95	1,59E-09
AAEL006971	hypothetical protein	1,07	1	2,1	0,02	2,23	0,00947
AAEL007040	lozenge	4,87	0,000116	2,81	0,09	-3,2	0,03
AAEL007072	hypothetical protein	2,56	0,0011	-1,66	0,37	1,43	0,58
AAEL007108	hypothetical protein	-2,34	0,00618	-1,97	0,12	-1,65	0,35
AAEL007147	hypothetical protein	1	1	1,21	1	3,41	0,00756
AAEL007173	hypothetical protein	-1,15	0,97	-1,29	0,95	2,66	0,03
AAEL007225	dynein heavy chain	14,17	0,000425	1,73	0,91	4,28	0,27
AAEL007298	fatty acyl-CoA reductase	7,27	0,02	10,06	0,07	14,02	0,03
AAEL007323	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	-4,16	0,00139	-1,32	0,9	1,11	1
AAEL007359	retinal guanylate cyclase	2,68	0,00379	-2,19	0,23	1,02	1
AAEL007397	E75: Ecdysone-induced protein 75B isoform A Nuclear receptor	8,33	0,00174	-1,62	0,94	-1,1	1
AAEL007432	serine collagenase 1 precursor, putative	-2,41	0,00051	-1,2	0,95	1,05	1
AAEL007444	hypothetical protein	50,85	0,00382	28,28	0,11	-28,49	0,11
AAEL007453	hypothetical protein	-1,57	0,34	2,54	0,04	-1,42	0,75
AAEL007491	hypothetical protein	-3,65	0,00652	1,51	0,83	2,63	0,15
AAEL007591	hypothetical protein	-3,32	0,00117	-1,8	0,46	-1,15	1
AAEL007617	serine/threonine-protein kinase vrk	-2,21	4,8E-12	-1,28	0,25	1,07	0,99
AAEL007753	hypothetical protein	15,1	0,000516	3,57	0,76	28,09	0,07
AAEL007887	ornithine decarboxylase	-1,26	0,86	2,9	0,05	1,13	1
AAEL007989	hypothetical protein	1,24	0,75	1,17	1	-2,67	0,01
AAEL008013	OBP38: odorant binding protein OBP38	-1,78	0,56	2,27	0,51	-3,64	0,03
AAEL008119	hypothetical protein	-2,15	0,04	1,03	1	-2,48	0,04
AAEL008191	hypothetical protein	1,56	0,03	-2,07	0,000493	1,64	0,06
AAEL008334	hypothetical protein	2,15	0,02	1,21	1	-1,17	1
AAEL008379	P38 mapk	-17,05	0,04	1,01	1	1,02	1
AAEL008516	RNA-binding protein, putative	-3,72	0,01	4,7	0,00767	1,9	0,54
AAEL008646	fibrinogen and fibronectin	-1,09	0,62	-1,02	1	-2,54	0
AAEL008757	carboxylic ester hydrolase	1,17	0,85	1,78	0,16	-2,08	0,05
AAEL008778	hypothetical protein	-1,4	0,71	-1,23	1	3,08	0,02
AAEL008780	serine-type endopeptidase	-2,3	0,12	-3,87	0,04	1,01	1
AAEL008798	hypothetical protein	-3,13	0,0000242	1,13	1	-1,64	0,17
AAEL008803	nice-3	2,4	0,000303	1,29	0,82	1,33	0,69
AAEL008812	hypothetical protein	-2,19	0,0000395	-1,47	0,22	-1,62	0,07
AAEL008879	KH: Kynurenine 3- monoxygenase (EC 1.14.13.9)(Kynurenine 3-	-17,29	0,00824	7,87	0,41	1,47	1

	hydroxylase)						
AAEL008884	hypothetical protein	-2,77	0,000000133	-1,53	0,16	1,04	1
AAEL008922	hypothetical protein	-9,41	0,00304	-1,02	1	-1,3	1
AAEL009045	amine oxidase	-1,65	0,04	-2,45	0,00102	-3,61	0,00000263
AAEL009046	hypothetical protein	-2,24	0,03	-1,01	1	-1,47	0,69
AAEL009063	hypothetical protein	3,05	0,03	-2,23	0,62	-3,6	0,49
AAEL009122	cytochrome P450	-2,38	0,02	1,33	0,86	-1,62	0,42
AAEL009140	hypothetical protein	-5,49	0,04	-3,22	0,88	-2,2	0,63
AAEL009184	hypothetical protein	-7,58	0,01	-1	1	1,78	0,86
AAEL009212	lola	1,28	0,68	2,64	0,00366	1,67	0,32
AAEL009227	kinesin heavy chain	-2,3	0	1,07	0,98	1,38	0,00649
AAEL009233	zinc metalloprotease	-2,92	0,00175	1,21	1	-1,05	1
AAEL009251	hypothetical protein	2,54	0,01	1,12	1	1,23	1
AAEL009384	fibrinogen and fibronectin	1,08	1	-1,43	0,59	-2,28	0,00365
AAEL009422	hypothetical protein	-2,04	0,000107	-1,29	0,6	-1,3	0,51
AAEL009449	OBP39: odorant binding protein (OBP39)	1,28	0,86	-1,27	1	-3,13	0,00796
AAEL009471	hypothetical protein	-2,2	0,04	-1,37	0,8	-1,28	0,91
AAEL009473	hypothetical protein	-2,75	0,04	-1,1	1	-1,71	0,65
AAEL009537	hypothetical protein	2,16	0,48	6,17	0,01	1,17	1
AAEL009552	hypothetical protein	4,66	0,02	1,09	1	1,27	1
AAEL009624	hypothetical protein	-2,05	0,03	-1,25	0,95	1,31	0,83
AAEL009680	chymotrypsin, putative	-1,2	0,88	-2,38	0,05	1,02	1
AAEL009719	hypothetical protein	-7,92	0,04	-3,48	0,52	1,74	0,95
AAEL009745	nitric oxide synthase	1,14	0,9	2,27	0,00224	1,05	1
AAEL009848	hypothetical protein	-3,24	0,03	-2,58	0,19	-1,59	0,71
AAEL009858	SIFa: SIFamide	-2,13	0,31	1,1	1	-5,47	0,02
AAEL009875	alanine aminotransferase	-6,99	0,05	1,67	0,98	2,04	0,87
AAEL009896	hypothetical protein	-2,12	0,76	-10,22	0,16	-11,93	0,03
AAEL010046	maintenance of ploidy protein mob1 (mps1 binder 1)	9,67	0,03	1,28	1	-1,21	1
AAEL010117	fibrinogen and fibronectin	-1,09	1	-3,5	0,01	-2,54	0,25
AAEL010137	ketoreductase, putative	3,72	0,000319	-2,37	0,06	-1,37	0,9
AAEL010365	lamin, putative	-7,75	0,14	14,06	0,02	-3,26	0,57
AAEL010377	hypothetical protein	-2,43	0,03	-1,73	0,43	-1,1	1
AAEL010442	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	2,54	0,0000798	1,46	0,43	-2,13	0,00734
AAEL010454	hypothetical protein	-3,15	0,02	-4,15	0,02	1,14	1
AAEL010547	hypothetical protein	-2,34	0,02	-1,02	1	-1,32	0,87
AAEL010651	skp1	-4,97	0,04	-1,38	1	-2,42	0,51
AAEL010678	hypothetical protein	7,3	0,000105	4,28	0,02	1,47	0,92
AAEL010682	armc4	-2,7	0,000591	1,33	0,77	-1,76	0,21
AAEL010902	cation efflux protein/ zinc transporter	-2,31	0,00136	1,12	1	-1,23	0,9
AAEL010919	prophenoloxidase	-1,75	0,00593	-5,64	0	-9,35	0
AAEL010920	hypothetical protein	-2,72	0,00000509	1,15	1	-1,43	0,43
AAEL010990	hypothetical protein	-2,05	0,000016	-1,11	0,99	-1,13	0,91
AAEL011183	hypothetical protein	3,25	0,01	-1,19	1	-1,19	1
AAEL011224	hypothetical protein	1,04	1	1,16	0,99	2,26	0,02

AAEL011296	hypothetical protein	-3,35	0,01	2,53	0,22	2,79	0,2
AAEL011468	protein kinase C inhibitor, putative	-2,43	5,82E-11	-1,12	0,92	1,17	0,7
AAEL011574	hypothetical protein	-4,6	0,01	1,05	1	-4,2	0,03
AAEL011587	RpL27: 60S ribosomal protein L27, putative	-2,26	0,00646	-1,44	0,65	-1,53	0,47
AAEL011612	CTLMA6: C-Type Lectin (CTL) - mannose binding. Transcript A	-2,39	0,01	-1,36	0,94	-1,29	0,92
AAEL011633	fibrinogen and fibronectin	-1,99	0,00000156	-2,68	1,72E-11	-4,7	0
AAEL011634	fibrinogen and fibronectin	-1,24	0,69	-2,11	0,06	-9,14	0,0000112
AAEL011763	PPO3: prophenoloxidase	-1,45	0,000881	-3,5	0	-13,02	0
AAEL011764	PPO10: prophenoloxidase	-1,48	0,000951	-3,87	0	-10,9	0
AAEL011793	aspartyl beta-hydroxylase, putative	-1,04	1	-2,34	0,0000267	-1,05	1
AAEL011801	hypothetical protein	-3,55	0,00887	1	1	-1,97	0,46
AAEL011846	hypothetical protein	-3,2	0,00092	1,54	0,53	1,21	0,94
AAEL012049	signal recognition particle, 9kD- subunit, putative	-1,18	0,99	-1,35	1	7,59	0,03
AAEL012082	NF-180, putative	-1,16	0,87	-1,35	0,73	-2,56	0,00239
AAEL012197	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 6	-2,49	0,0035	-1,05	1	1	1
AAEL012243	hypothetical protein	3,78	0,03	1,34	1	2,34	0,45
AAEL012315	hypothetical protein	-2,62	0,02	2,87	0,03	-2,67	0,06
AAEL012353	CTL15: C-Type Lectin (CTL)	-1,2	0,83	-1,19	0,99	-2,67	0,02
AAEL012374	hypothetical protein	-2,26	0,0000885	1,02	1	1,22	0,8
AAEL012377	OBP55: odorant binding protein OBP55	-1,16	1	-1,51	1	-19,46	0,000597
AAEL012406	hypothetical protein	2,86	0,04	-2,13	0,56	-1,7	0,73
AAEL012529	hypothetical protein	2,18	0,04	-1,04	1	1,16	1
AAEL012534	hypothetical protein	-2,21	0,000244	1,91	0,01	-1,24	0,82
AAEL012572	synaptic vesicle protein	1,59	0,09	-1,07	1	3,04	0,000449
AAEL012626	hypothetical protein	3,58	0,04	-1,91	0,64	-2,91	0,31
AAEL012801	sphingolipid delta 4 desaturase/c-4 hydroxylase protein des2	-4,03	0,01	-2,37	0,43	-2,34	0,51
AAEL012858	hypothetical protein	-6,89	0,06	-2,99	0,77	-13,49	0,04
AAEL012941	hypothetical protein	1,92	0,00194	-1,33	0,54	-2,23	0,000428
AAEL012947	hypothetical protein	-3,11	0,00763	1,43	0,87	-1,9	0,37
AAEL012984	hypothetical protein	-1,15	0,86	-3,05	0,000158	-1,62	0,32
AAEL013252	hypothetical protein	-10,1	0,03	-1,14	1	3,6	0,54
AAEL013284	LT1: late trypsin 1, serine-type endopeptidase	-2,78	0,0000545	1,23	0,91	1,22	0,89
AAEL013373	Kir2B': inward-rectifying potassium channel	17	0,03	1,01	1	-3,93	0,51
AAEL013395	hypothetical protein	2,11	0,00000166	1,34	0,35	1,34	0,38
AAEL013492	PPO5: prophenoloxidase	-1,37	0,00841	-2,71	0	-5,33	0
AAEL013496	PPO8: prophenoloxidase	-1,48	0,000826	-3,46	0	-6,22	0
AAEL013498	PPO1: prophenoloxidase	-1,43	0,00621	-4,28	0	-9,48	0
AAEL013501	PPO4: prophenoloxidase	-1,78	0,00229	-2,42	0,0000304	-2,69	0,000038
AAEL013532	hypothetical protein	2,52	0,00909	1,2	1	1,06	1

AAEL013535	phosrestin ii (arrestin a) (arrestin 1)	-5,42	0,00221	1,39	1	-2,99	0,18
AAEL013575	KING-TUBBY2: Protein king tubby 2	1,17	0,68	-2,22	0,0000197	-1,12	0,97
AAEL013577	hypothetical protein	-3,64	0,38	32,82	0,02	1,48	1
AAEL013577	hypothetical protein	-9,87	0,03	9,16	0,00127	1,28	1
AAEL013614	clathrin heavy chain	3,24	0,35	1,58	1	79,22	0,00979
AAEL013717	sphingomyelin phosphodiesterase	-2,13	0,00000843	-1,08	1	1,31	0,44
AAEL013764	WD-repeat protein	2,16	0,01	-1,13	1	1,06	1
AAEL013783	protein farnesyltransferase alpha subunit	-2,11	0,000107	-1,05	1	1,21	0,79
AAEL013783	protein farnesyltransferase alpha subunit	1,51	0,17	-1,13	1	-2,08	0,01
AAEL013799	hypothetical protein	1,64	0,36	2,11	0,37	-4,4	0,00148
AAEL013859	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3, mapkkk3, mekk3	1,13	0,79	-2	0,000511	-1,06	1
AAEL013992	hypothetical protein	-13,84	0,04	-1,66	1	2,54	0,68
AAEL014052	endoplasmic reticulum protein erp29	16,84	0,04	6,54	0,24	1,7	0,96
AAEL014070	vacuolar protein sorting	2,23	0,00197	-1,21	0,95	-1,06	1
AAEL014185	hypothetical protein	-217,1	0,00000268	1,01	1	-273,63	0,0000155
AAEL014215	nicotinate phosphoribosyltransferase	-2,31	0,00466	1,18	1	1,11	1
AAEL014265	hypothetical protein	2,03	0,000000105	-1,28	0,37	-2,15	2,19E-07
AAEL014270	hypothetical protein	5,25	0,05	-1,74	0,88	-1,71	0,87
AAEL014271	hypothetical protein	1,78	0,00124	-1,26	0,62	-2,1	0,000105
AAEL014315	hypothetical protein	-2,54	0,04	1,37	0,96	-1,89	0,33
AAEL014338	hypothetical protein	-2,23	0,000171	1,05	1	-1,16	0,93
AAEL014376	hypothetical protein	-1,54	0,72	5,45	0,04	-1,37	0,98
AAEL014399	hypothetical protein	-3,43	0,00000632	-1,83	0,12	1,39	0,71
AAEL014403	hypothetical protein	-2,05	0,00468	-1,22	0,91	1,18	0,95
AAEL014488	hypothetical protein	-2,37	0,00206	-1,01	1	1,42	0,56
AAEL014615	hypothetical protein	-1,01	1	1,65	1	-60,78	0,00217
AAEL014680	pseudogene	5,15	0,00678	1,74	0,8	-1,97	0,83
AAEL014741	serine/threonine-protein kinase ripk4	-2,13	0,03	1,35	0,81	2,22	0,06
AAEL014742	ankyrin 2,3/unc44	-2,03	0,01	1,04	1	1,28	0,83
AAEL014747	jun activation domain binding protein	9,09	0,01	-1,04	1	-1,32	1
AAEL014766	hypothetical protein	5,56	0,03	-1,34	1	-1,27	1
AAEL014813	viral IAP-associated factor, putative	1,05	0,99	-1,5	0,1	2,18	0,00000715
AAEL014818	sil1	2,6	0,0000209	-1,11	1	1,01	1
AAEL014819	hypothetical protein	2,57	0,000000133	-1,39	0,42	-2,06	0,01
AAEL014837	PPO9: prophenoloxidase	-1,87	0,00000577	-5,36	0	-19,27	0
AAEL014911	synaptic vesicle protein	3,93	0,000951	-1,05	1	-1,8	0,8
AAEL014912	RrnaAD, ribosomal RNA adenine dimethylase	1,88	0,04	-1,28	0,86	-2,97	0,0018
AAEL014914	hypothetical protein	1,73	0,04	1,43	0,48	-2,31	0,00331

AAEL015005	hypothetical protein	-3,76	0,04	1,96	0,52	1,44	0,91
AAEL015006	RpL23: 60S ribosomal protein L23 (L17A)(AeRpL17A)	-1,84	0,09	2,41	0,02	3,39	0,0000802
AAEL015011	hypothetical protein	-1,36	0,24	-1,31	0,66	-2,24	0,00293
AAEL015099	sumo ligase	-1	1	-75,91	0,0026	-3,96	0,69
AAEL015116	prophenoloxidase	-1,73	0,02	-2,97	0,000000929	-7,79	0
AAEL015219	hypothetical protein	-2,96	0,19	6,92	0,03	1,52	0,97
AAEL015264	alpha-esterase	1,99	0,02	1,53	0,61	2,48	0,03
AAEL015285	hypothetical protein	1,1	1	-1,75	0,8	6,48	0,02
AAEL015302	hypothetical protein	-2,95	0,08	4,31	0,04	1,74	0,8
AAEL015344	hypothetical protein	-2,96	0,000399	-1,16	1	-1,41	0,64
AAEL015425	hypothetical protein	1,25	0,79	-3,01	0,01	1,8	0,41
AAEL015454	hypothetical protein	-2,12	0,00742	1,19	0,98	1,33	0,72
AAEL015458	Tf1: transferrin	1,73	0,05	3,83	5,62E-09	-2,97	0,0000111
AAEL015487	zinc finger protein, putative	-2,82	0,02	1,75	0,53	-1,15	1
AAEL015537	hypothetical protein	2,01	0,02	2,03	0,08	-1,26	0,9
AAEL015555	hypothetical protein	-1,01	1	-1,22	0,86	2,39	0,00281
AAEL015627	LRIM29: leucine-rich immune protein (Coil-less)	2,5	0,000105	-1,69	0,24	1,31	0,82
AAEL015639	transferrin	1,29	0,67	4,31	9,32E-08	-1,91	0,16
AAEL015645	RNA binding motif protein	-42,52	0,00139	-3,6	0,23	-9,24	0,35
AAEL016994	hypothetical protein	2,85	0	1,4	0,16	1,7	0,00417
AAEL017046	hypothetical protein	4,47	0,02	2,95	0,36	1,98	0,88
AAEL017234	hypothetical protein	-1,27	0,26	-4,4	0	-10,97	0
AAEL017262	hypothetical protein	-5,37	0,04	-1,29	1	-2,98	0,35
AAEL017291	hypothetical protein	14,44	0,02	-1,7	0,94	1,35	1
AAEL017342	hypothetical protein	4,49	0,04	1,44	1	2,06	0,71
AAEL017422	hypothetical protein	-5,52	0,00678	1,04	1	1,34	0,98
AAEL017433	hypothetical protein	-2,48	0,00567	1,06	1	-1,41	0,68
AAEL017455	hypothetical protein	1,27	0,14	1,46	0,02	2,03	5,67E-09
AAEL017464	hypothetical protein	-1,11	1	1,5	0,89	-4,19	0,03
AAEL017480	hypothetical protein	-2,24	0,03	1,2	1	1,04	1
AAEL017514	hypothetical protein	-1,14	0,85	2,53	0,0000414	-1,07	1
AAEL017556	hypothetical protein	3,62	0,04	1,49	0,95	-2,09	0,69
AAEL017811	RNase_MRP: RNase MRP	-1,16	0,86	-2,49	0,00136	-1,42	0,54
AAEL017975	HSP70Ba: heat shock protein HSP70	-1,31	0,83	1,01	1	-3,37	0,05
AAEL017980	HSP70Ab': heat shock protein HSP70	-1,05	1	-1,32	1	-5,53	0,000812
AAEL017987	hypothetical protein	17,7	0,02	2,14	0,88	2,12	0,84
AAEL018039	hypothetical protein	15,69	0,00962	2,49	0,79	2,79	0,68
AAEL018064	hypothetical protein	6,26	0,00719	-1,3	1	2	0,75
AAEL018135	hypothetical protein	10,03	0,00322	-22,64	0,03	2,25	0,83
AAEL018316	hypothetical protein	-5,33	0,01	1,27	1	1,71	0,66
AAEL018349	CECD: cecropin anti-microbial peptide	10,59	0,02	-1,03	1	-42,54	0,00115
AAEL018658	ND2: NADH dehydrogenase subunit 2hypothetical protein	300,49	0,00000901	512,66	0,0000197	498,39	0,0000271
AAEL018667	ATP8: ATP synthase F0 subunit 8	6,24	0,01	-1,2	1	3,18	0,36

AAEL018671	ND3: NADH dehydrogenase subunit 3	2,78	0,3	23,69	0,0000138	270,29	0
AAEL018681	ND4L: NADH dehydrogenase subunit 4L	7,7	0,07	473,25	0,0000217	125,28	0,000243
AAEL019045	LSU_rRNA_eukarya: Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	1,08	1	-3,42	0,04	-2,73	0,11
AAEL019064	SSU_rRNA_eukarya: Eukaryotic small subunit ribosomal RNA	-1,58	0,07	-2,21	0,000965	-2,64	0,00000268
AAEL019276	LSU_rRNA_eukarya: Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	-1,24	0,74	-1,96	0,08	-2,8	0,00102
AAEL019332	LSU_rRNA_eukarya: Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	-1,15	0,77	-1,94	0,0017	-2,2	0,000041
AAEL019347	LSU_rRNA_eukarya: Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	-1,69	0,07	-1,98	0,04	-2,67	0,000103
AAEL019350	LSU_rRNA_eukarya: Eukaryotic large subunit ribosomal RNA	-8,59	0,01	-1,08	1	-1,52	0,93
AAEL019375	SSU_rRNA_eukarya: Eukaryotic small subunit ribosomal RNA	-1,09	0,99	-1,89	0,08	-2,15	0,01