

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**EFEITOS DA MORINA SOBRE O**  
**METABOLISMO LIPÍDICO DE *Aedes aegypti***  
**E SEUS EFEITOS NA FISIOLOGIA**  
**REPRODUTIVA**

**MATHEUS SILVA CAIADO**

**2024**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Efeitos da morina sobre o metabolismo lipídico de *Aedes aegypti* e seus efeitos na fisiologia reprodutiva**

**MATHEUS SILVA CAIADO**

*Sob a Orientação do Professor*

**Dr. Emerson Guedes Pontes**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica, RJ  
Abril de 2024

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

C133e Caiado, Matheus Silva, 1995-  
Efeitos da morina sobre o metabolismo lipídico de  
Aedes aegypti e seus efeitos na fisiologia  
reprodutiva / Matheus Silva Caiado. - Seropédica,  
2024.  
63 f.: il.

Orientador: Emerson Guedes Pontes.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química,  
2024.

1. triacilglicerol. 2. flavonoide. 3. ácido graxo  
sintase. I. Pontes, Emerson Guedes, 1974-, orient. II  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-Graduação em Química III. Título.

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

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MATHEUS SILVA CAIADO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/04/2024

Dr. Emerson Guedes Pontes  
UFRRJ  
(Orientador)

Dr. José Roberto da Silva  
UFRJ - NUPEM

Dr<sup>a</sup>. Cristiane Martins Cardoso  
UFRRJ



---

**TERMO Nº 296/2024 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

**(Assinado digitalmente em 02/05/2024 10:34 )**

**CRISTIANE MARTINS CARDOSO DE SALLES**

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

CoordCGQ (12.28.01.00.00.00.58)

Matrícula: ###817#0

**(Assinado digitalmente em 02/05/2024 18:35 )**

**EMERSON GUEDES PONTES**

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DBQ (11.39.00.24)

Matrícula: ###553#7

**(Assinado digitalmente em 02/05/2024 08:01 )**

**JOSE ROBERTO DA SILVA**

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.677-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **296**, ano: **2024**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **02/05/2024** e o código de verificação: **d22d99692f**

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pelo sustento;

A minha família por todo suporte emocional e financeiro me dado durante todos esses anos;

Ao meu namorado e melhor amigo, José;

Aos meus colegas de laboratório que tanto me ajudaram durante todos esses anos;

A CAPES pelo fomento, cujo sem eu não conseguiria desenvolver esta pesquisa;

E ao meu orientador que acompanha minha carreira desde a graduação.

## RESUMO

CAIADO, Matheus Silva. **Efeitos da morina sobre o metabolismo lipídico de *Aedes aegypti* e seus efeitos na fisiologia reprodutiva**. 2024. 63p Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

A utilização de aleloquímicos provenientes de plantas tem se destacado como uma alternativa promissora para o controle de insetos, devido à sua não toxicidade para humanos e ao meio ambiente. A morina, um flavonoide extraído principalmente de plantas da família Moraceae, tem demonstrado uma ampla gama de aplicações em organismos modelo. Este composto já mostrou eficácia na inibição da ácido graxo sintase e da ecdisona 20-monoxigenase, enzimas essenciais para o ciclo de vida de insetos. A ácido graxo sintase desempenha um papel fundamental no metabolismo lipídico, sintetizando ácidos graxos de cadeia longa a partir de moléculas de Malonil-CoA e formando lipídeos complexos, como os triacilgliceróis (TAGs). Nos insetos, essa síntese lipídica é crucial em diversos eventos do ciclo de vida, como reprodução, voo e desenvolvimento. Neste estudo, investigamos os efeitos da ingestão de morina em *Aedes aegypti*, o principal vetor de vários arbovírus, incluindo os agentes causadores da Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela. Para isto, foi utilizada uma abordagem em que os mosquitos eram alimentados e separados em 24, 48, 72 e 96h pós-emergência. Além disto, fêmeas e machos foram mantidos em gaiolas separadas durante todo o ensaio. A partir disto, foi possível avaliar o conteúdo de TAG do corpo inteiro e do corpo gorduroso dos insetos e os níveis de expressão relativa da ácido graxo sintase (*fasI*) e da triacilglicerol lipase (*tagII*). A partir desta abordagem foi possível observar que os efeitos da alimentação variaram de acordo com o sexo e idade dos mosquitos. Enquanto as fêmeas não apresentaram redução no conteúdo lipídico no corpo gorduroso após a ingestão de morina, os machos exibiram níveis menores de triacilgliceróis. Por isso, investigamos os efeitos nos machos alimentados com morina na cópula, constatando que fêmeas copuladas com machos tratados apresentaram menor número de ovos e uma taxa de eclosão reduzida. Em suma, nossas descobertas indicam que a alimentação com morina foi mais eficaz em machos do que no período pré-vitelogênico de fêmeas. Os resultados relacionados à fecundidade e fertilidade destacam a morina como uma molécula promissora para estudos de controle de insetos de interesse, tanto em saúde pública quanto em contextos agroeconômicos.

**Palavras-chave:** Flavonoide; triacilglicerol; ácido graxo sintase

## ABSTRACT

Morin effects on *Aedes aegypti* lipid metabolism and its effects on reproductive physiology. 2024. 63p Dissertation (master's in chemistry). Institute of Chemistry, Department of Biochemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

The use of plant-derived allelochemicals has emerged as a promising alternative for insect control, owing to their non-toxicity to humans and the environment. Morin, a flavonoid primarily extracted from plants of the Moraceae family, has exhibited a wide range of applications in model organisms. This compound has demonstrated efficacy in inhibiting fatty acid synthase and ecdysone 20-monooxygenase, enzymes crucial for the insect life cycle. Fatty acid synthase plays a fundamental role in lipid metabolism, synthesizing long-chain fatty acids from Malonyl-CoA molecules and forming complex lipids such as triacylglycerols (TAGs). In insects, this lipid synthesis is critical in various life cycle events including reproduction, flight, and development. In this study, we investigated the effects of morin ingestion in *Aedes aegypti*, the primary vector of several arboviruses, including those causing Dengue, Zika, Chikungunya, and Yellow Fever. For this purpose, a feeding approach was employed, with mosquitoes being fed and separated at 24-, 48-, 72-, and 96-hours post-emergence. Additionally, females and males were kept in separate cages throughout the assay. Through this, it was possible to assess the TAG content of the whole body and fat body of the insects, along with the relative expression levels of fatty acid synthase (*fasI*) and triacylglycerol lipase (*tagII*). This approach revealed that the effects of feeding varied according to the sex and age of the mosquitoes. While females did not show a reduction in lipid content in the fat body after morin ingestion, males exhibited lower levels of triacylglycerols. Therefore, we investigated the effects of morin-fed males on copulation, finding that females mated with treated males laid fewer eggs and had a reduced hatching rate. In summary, our findings indicate that morin feeding was more effective in males than in the pre-vitellogenic period of females. The results related to fecundity and fertility highlight morin as a promising molecule for studies on insect control of interest, both in public health and agro-economic contexts.

**Keywords:** Flavonoid; triacylglycerol; fatty acid synthase



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i> .....	4
Figura 2 – Distribuição de <i>A. aegypti</i> .....	6
Figura 3 – Estabelecimento de estoques energéticos em <i>A. aegypti</i> . ....	7
Figura 4 – Ciclo catalítico e organização de domínios da FAS.....	8
Figura 5 - Os picos de JH e 20-E mediam o ciclo gonadotrófico de <i>A. aegypti</i> .....	10
Figura 6 – Corpo gorduroso de fêmeas de <i>A. aegypti</i> . ....	12
Figura 7 – Estrutura molecular da morina. ....	15
Figura 8 - Adição de corante nas soluções oferecidas aos insetos. ....	19
Figura 9 - Desenho experimental da amostragem de corpo gorduroso de machos e fêmeas alimentados com morina.....	19
Figura 10 – TLC representativa.....	20
Figura 11 - Desenho experimental da avaliação da fecundidade de machos alimentados com morina.....	22
Figura 12 - Efeito da alimentação com morina no conteúdo de triacilglicerol no corpo inteiro de machos e fêmeas de <i>A. aegypti</i> . ....	23
Figura 13 - Comparação do conteúdo de triacilglicerol entre machos e fêmeas alimentados..	24
Figura 14 - Efeito da alimentação com morina no conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso em fêmeas de <i>A. aegypti</i> .....	25
Figura 15 - Efeito da alimentação com morina no conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso em machos de <i>A. aegypti</i> . ....	26
Figura 16 - Expressão diferencial da <i>fasI</i> e <i>tagII</i> no corpo gorduroso em fêmeas de <i>A. aegypti</i> alimentadas com morina.....	28
Figura 17 - Expressão diferencial da <i>fasI</i> e <i>tagII</i> no corpo gorduroso em machos de <i>A. aegypti</i> alimentados com morina.....	29
Figura 18 - Efeitos da alimentação com morina na fecundidade de machos. ....	30
Figura 19 - Efeitos da alimentação com morina na fecundidade de machos. ....	30

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequências utilizadas para análises de expressão.....	21
---	----

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

20-E	20-Hidroxiecdisona
ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACP	Proteína carregadora de acil
AKH	Hormônio adipocinético
ATP	Adenosina trifosfato
BMM	Lipase brummer
DH	Desidrogenase
ER	Enoil redutase
FAS	Ácido graxo sintase
ILP	Peptídeo semelhante a insulina
JH	Hormônio juvenil
KR	Cetoacil redutase
KS	Cetoacil sintase
MAG	Glândulas acessórias do macho
MAT	Malonil acetil transferase
MET	Receptor tolerante a metopreno
PE	Pós emergência
TAG	Triacilglicerol
TAGL	Triacilglicerol lipase
TE	Tioesterase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Biologia de <i>Aedes aegypti</i> .....	4
2.2 Importância de <i>A. aegypti</i> . ....	5
2.3 Metabolismo energético e regulação hormonal em <i>A. aegypti</i> . ....	6
2.3.1 Metabolismo de lipídeo. ....	7
2.3.2 Regulação do metabolismo de lipídeo através de hormônios em <i>A. aegypti</i> . ....	9
2.3.3 Corpo Gorduroso. ....	12
2.4 Morina.....	14
2.4.1 O efeito da morina sobre a ácido graxo sintase animal. ....	15
2.4.2 Utilização da morina no estudo de insetos. ....	16
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos .....	17
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
4.1 Manutenção da colônia de <i>A. aegypti</i> . ....	18
4.2 Alimentação de <i>A. aegypti</i> com morina.....	18
4.2.1 Avaliação do conteúdo de triacilglicerol do corpo inteiro de <i>A. aegypti</i> . ....	18
4.2.2 Avaliação do conteúdo de triacilglicerol do corpo gorduroso de <i>A. aegypti</i> .....	18
4.3 Extração de lipídeos e quantificação do triacilglicerol. ....	20
4.4 Extração do RNA e síntese de cDNA. ....	21
4.5 PCR quantitativa (qPCR).....	21
4.6 Verificação dos efeitos da morina sobre a fecundidade.....	22
4.7 Análise estatística.....	22
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
5.1 Determinação do triacilglicerol em adultos de <i>A. aegypti</i> alimentados com morina.....	23
5.2 Determinação do triacilglicerol no corpo gorduroso de <i>A. aegypti</i> alimentados com morina. ....	24
5.3 Expressão da <i>fas1</i> e <i>tag11</i> no corpo gorduroso de <i>A. aegypti</i> alimentados com morina. ....	27
5.4 Avaliação da fecundidade de machos de <i>A. aegypti</i> alimentados com morina. ....	30
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>

6.1 A alimentação com morina impacta o metabolismo lipídico em machos e fêmeas de <i>A. aegypti</i> de forma diferencial. ....	31
6.2 A alimentação com morina impacta na fecundidade e fertilidade de machos de <i>A. aegypti</i> . ....	38
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>41</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti*, pertencente à família dos culicídeos, tem sido objeto de atenção devido à sua relevância epidemiológica, sendo o principal vetor de diversos arbovírus, incluindo os responsáveis pela Zika, Chikungunya, febre amarela e dengue (Leta et al., 2018). Para reprodução, as fêmeas desse mosquito necessitam se alimentar de sangue, preferencialmente humano, facilitando a transmissão de vírus infecciosos (Ziegler; Ibrahim, 2001). Atualmente, encontra-se disseminado em todas as zonas tropicais e subtropicais do mundo, representando um sério risco para a saúde das populações locais (Kraemer et al., 2015).

Nos últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos para controlar essa espécie, priorizando métodos que não representem ameaças à saúde humana e ao meio ambiente. A utilização de compostos extraídos de plantas tem sido considerada uma alternativa promissora nesse sentido. Um desses candidatos é a morina. A morina (3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona) é um flavonoide pertencente à classe dos flavonóis, composto por dois anéis aromáticos ligados por um heterocíclico oxigenado. Encontra-se principalmente em folhas e frutos da família Moraceae, como taiúva (*Maclura tinctoria*), laranja-osage (*Maclura pomifera*) e diversas espécies de figos (*Ficus sp.*) (Chung et al., 2016). Sua eficácia no combate a insetos é respaldada por estudos que demonstraram sua capacidade de inibir enzimas cruciais em seu ciclo de vida, como a ácido graxo sintase e a ecdisona-20-monoxigenase (Alekseeva, 2004; Li; Tian, 2004). Embora a morina tenha se destacado como o mais potente inibidor da FAS entre os flavonoides, outros polifenóis também foram relatados como inibidores da FAS, inclusive em organismos procarióticos (Brown et al., 2007; Li & Tian, 2004; Tian, 2006).

Os ácidos graxos são unidades fundamentais na formação de lipídios mais complexos, essenciais como constituintes nos sistemas biológicos. Eles podem ser utilizados para a formação de fosfolipídios, componentes das membranas biológicas, ou armazenados como triacilglicerol. Quando transportados para o citosol das células, os ácidos graxos são ativados pela enzima acil-CoA sintetase, formando acil-CoA (Toprak et al., 2020). Essa molécula é então ligada à proteína ligante de acil-CoA e encaminhada para a  $\beta$ -oxidação mitocondrial, em condições de baixa energética, ou utilizada em vias de síntese, como a via do glicerol-3-fosfato, onde não apenas o triacilglicerol é sintetizado, mas também fosfolipídios e diacilglicerol (Gondim et al., 2018). O triacilglicerol sintetizado é armazenado na célula em gotículas de lipídeo e mobilizado quando há demanda energética (Ziegler; Ibrahim, 2001).

Duas enzimas desempenham um papel crucial na via biossintética dos ácidos graxos: a acetil-CoA carboxilase, responsável pela carboxilação do acetil-CoA para formar malonil-CoA, e a ácido graxo sintase, que inicia a biossíntese de ácidos graxos pela condensação de um malonil-CoA, proveniente da acetil-CoA carboxilase, com uma molécula de acetil-CoA no domínio cetoacil sintase (Alabaster et al., 2011). A ácido graxo sintase (FAS) apresenta sete domínios funcionais altamente integrados, e a inibição de qualquer um desses domínios compromete toda a reação de síntese do ácido graxo (Li; Tian, 2004). Assim, o efeito inibitório observado pela morina pode impactar a formação de reservas de triacilglicerol e fosfolipídios em insetos.

Além do efeito inibitório sobre a FAS, estudos também destacaram sua ação sobre a 20-monooxigenase, outra enzima essencial para insetos. Dentre os flavonoides analisados, a morina demonstrou ser um dos mais potentes inibidores da atividade dessa enzima, atuando de maneira dose-dependente (Mitchell et al., 1993). Em mosquitos, essa enzima desempenha um papel crucial no ciclo gonadotrófico das fêmeas, convertendo a ecdisona em sua forma mais ativa, a 20-Hidroxiecdisona (20-E) (Ling; Raikhel, 2020; Roy et al., 2016). A 20-E é um hormônio de suma importância para insetos. Em *A. aegypti*, a sinalização provocada por ele no corpo gorduroso desencadeia a mobilização de recursos energéticos armazenados durante as fases imaturas do mosquito para a maturação dos ovos, além da liberação de vitelogenina, uma proteína crucial para a maturação dos ovos (Alabaster et al., 2011; Roy et al., 2016).

O fato de a morina ter sido identificada como um excelente inibidor de vias importantes para a fisiologia dos insetos destaca a necessidade de estudos que explorem esse composto em diversas espécies, especialmente por ser um composto natural que oferece a possibilidade de desenvolver estratégias mais ecologicamente sustentáveis para controle. Uma aplicação potencial dessa molécula é no metabolismo do *A. aegypti*. Adicionalmente, estudos recentes conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa, ainda não divulgados, ressaltam os impactos da presença de morina nos criadouros de larvas desse inseto. Observou-se um retardo no desenvolvimento, redução da fecundidade das fêmeas, subexpressão de genes associados à síntese de lipídeos e uma alta taxa de mortalidade em larvas expostas à morina no ambiente. Essas descobertas têm impulsionado nossa investigação sobre os potenciais efeitos desse flavonoide quando introduzido na dieta de adultos.

Desta forma, neste estudo investigamos como a inclusão da morina na dieta do mosquito pode afetar sua homeostase energética e, conseqüentemente, sua capacidade reprodutiva. Para investigar os efeitos que este flavonoide pode ter no metabolismo do mosquito, avaliamos o conteúdo de triacilglicerol (TAG) em mosquitos alimentados com açúcar adicionado de morina e os níveis transcricionais da ácido graxo sintase 1 (*fasI*) e triacilglicerol lipase 1 (*tagII*). Utilizamos uma abordagem em que machos e fêmeas foram mantidos separados e alimentados em horas pós-emergência definidas. Esta abordagem permitiu avaliar de que forma a alimentação com morina impacta na formação das reservas de triacilglicerol diferencialmente, a depender do sexo e idade do mosquito.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Biologia de *Aedes aegypti*.

O *Aedes aegypti* é um mosquito da família dos culicídeos. Durante sua história evolutiva, o *A. aegypti* desenvolveu um comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico, sendo reconhecido como uma das espécies de mosquito com o comportamento mais dependente do homem (NATAL, 2002). O ciclo de vida de *A. aegypti* se divide em uma fase aquática e uma fase aérea (Figura 1). As formas jovens de *A. aegypti* apresentam temperatura ótima de desenvolvimento entre 20 e 30°C e seu período de maturação, de ovo a adulto, leva aproximadamente de 5 a 7 dias (NELSON, 1986), o que pode explicar o alto potencial de disseminação desta espécie. Além disto, os ovos deste culicídeo suportam longos períodos em estado quiescente (EPELBOIN et al., 2017), podendo suportar até 492 dias (SILVA; SILVA, 1999), à espera de água para a eclosão e consequente origem de novas larvas. Assim como outros culicídeos, as larvas deste mosquito são aquáticas e possuem quatro instares, culminando em um estágio de pupa (FORATTINI, 2002). Desta forma, o aumento de ambientes-reservatórios, com o potencial de acúmulo de água, existentes no meio humano promove o local requerido pelo mosquito para seu desenvolvimento (EPELBOIN et al., 2017).

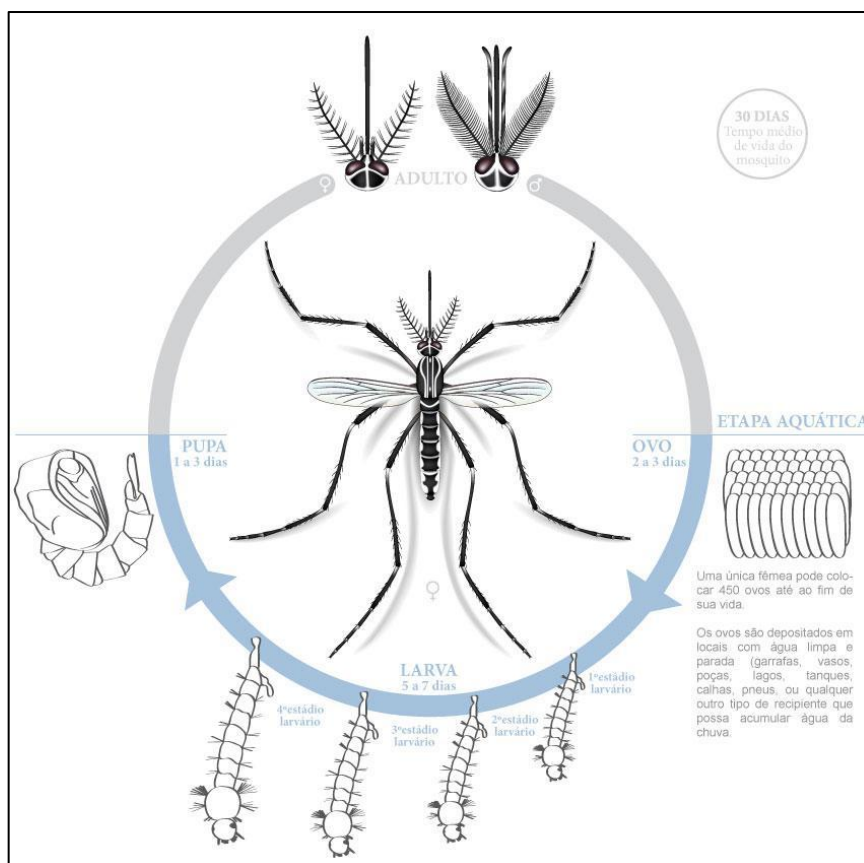


Figura 1 - Ciclo de vida do *Aedes aegypti*. Retirado de casadasciencias.org.

Após a emergência das pupas, as fêmeas adultas se alimentarão de seiva, serão fecundadas e então estimuladas a partir em procura de uma fonte para alimentação com sangue (MATTHEWS et al., 2016; NATAL, 2002). Embora não se alimentem de sangue, os machos de *A. aegypti* também respondem a sinais quimiossensoriais de humanos (MITCHELL et al., 1993a), provavelmente para alcançar os locais de alimentação sanguínea das fêmeas do mosquito e estabelecer a cópula. Segundo Natal (2002), a presença abundante de pessoas em centros urbanos elimina a necessidade de as fêmeas do mosquito realizarem voos prolongados em busca de fontes para realizar a hematofagia. Essa adaptação ao ambiente urbano demonstra a eficiência do *A. aegypti* em encontrar recursos essenciais para seu ciclo reprodutivo, ressaltando a relevância de estratégias de controle e prevenção em ambientes urbanos densamente povoados.

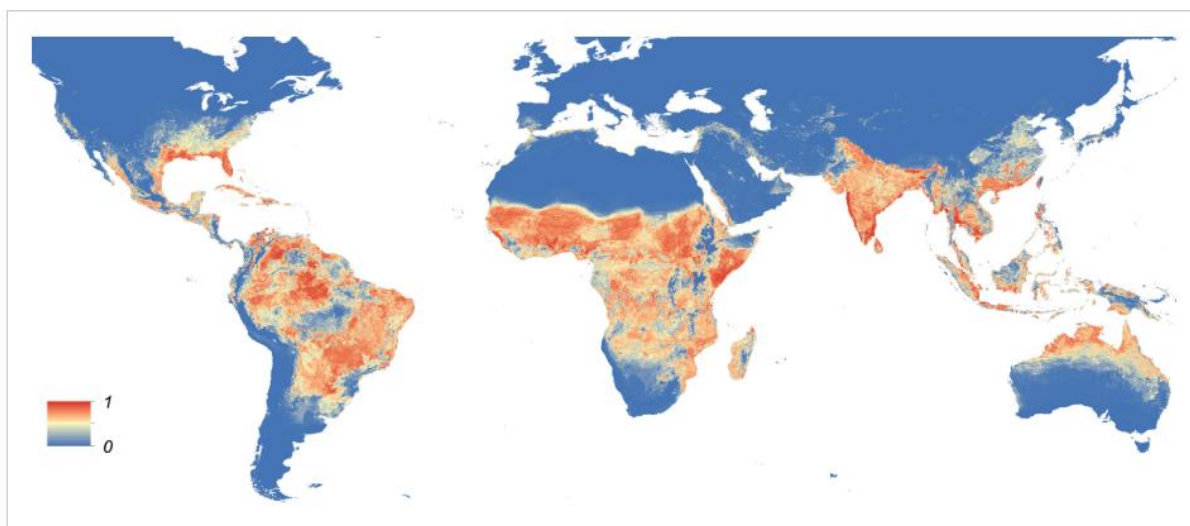
## **2.2 Importância de *A. aegypti*.**

Devido a sua alta proximidade com a população humana, o *A. aegypti* apresenta um alto potencial em transmitir arbovírus. Atualmente, se tem registros da transmissão dos vírus da Dengue, Chikungunya, Zika e febre amarela (LETA et al., 2018) pelo mosquito, se tornando um problema de saúde mundial (IWAMURA; GUZMAN-HOLST; MURRAY, 2020).

Populações ancestrais de *A. aegypti* tinham a preferência por se alimentar de sangue de outros vertebrados e depositavam seus ovos em cascas de árvore. No entanto, esse padrão comportamental foi alterado devido ao crescimento das comunidades humanas e à degradação dos ambientes naturais do mosquito (IWAMURA; GUZMAN-HOLST; MURRAY, 2020a). A transformação no comportamento desse inseto pode ser explicada pelo desenvolvimento de uma preferência por fontes de sangue mais abundantes e estáveis, associadas à presença humana (NATAL, 2002; POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018; POWELL; TABACHNICK, 2013).

Uma consequência evidente dessa mudança, da alimentação sanguínea em hospedeiros silvestres para fontes de alimentação em humanos, é a exposição dos seres humanos a agentes infecciosos que anteriormente estavam restritos aos ambientes selvagens (POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018; POWELL; TABACHNICK, 2013). Esse ajuste no comportamento alimentar do mosquito resultou em um aumento substancial no potencial vetorial do inseto, desencadeando a transmissão de doenças de maneira mais eficaz (KOTSAKIOZI et al., 2018; POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018).

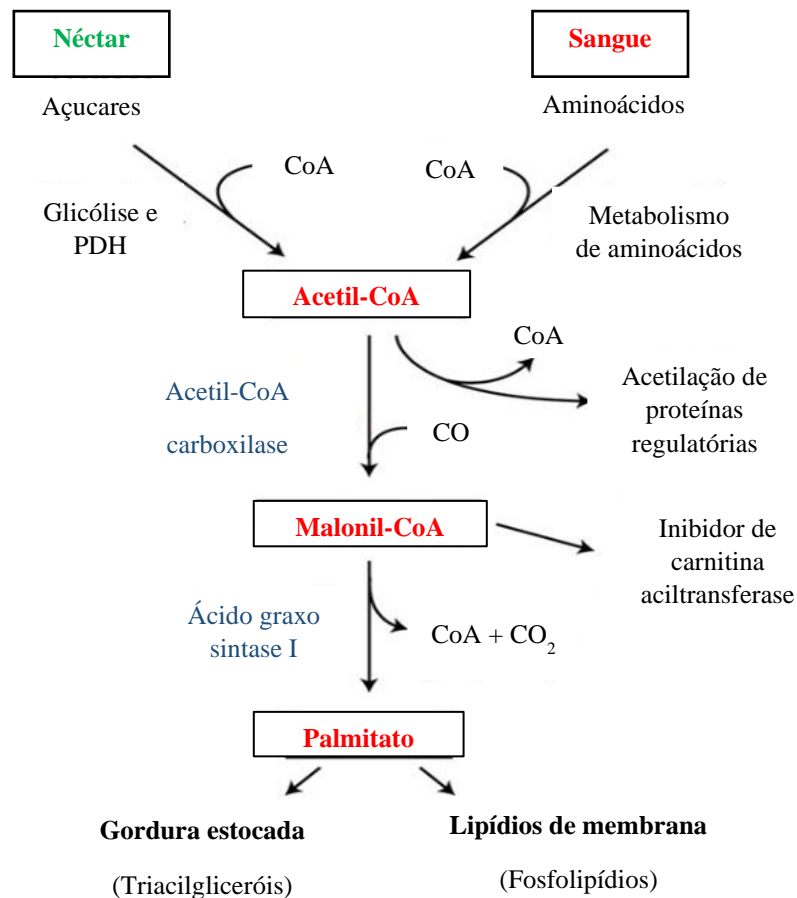
Atualmente, o *Aedes aegypti* se encontra disseminado por todas as zonas tropicais e subtropicais do mundo (Figura 2) (KRAEMER et al., 2015; LETA et al., 2018). Nessas regiões, o mosquito encontra condições ideais para estabelecer seus criadouros. Além disso, estudos sugerem que o planeta tem se tornado mais quente e úmido, criando condições ideais para a reprodução do mosquito (COFFEL; HORTON; DE SHERBININ, 2018; IWAMURA; GUZMAN-HOLST; MURRAY, 2020). Este aquecimento tem expandido as áreas onde o mosquito prospera, o que levanta preocupações sobre a crescente disseminação da espécie e, conseqüentemente, o aumento de casos de arboviroses (IWAMURA; GUZMAN-HOLST; MURRAY, 2020). Diante desse cenário, compreender a biologia do inseto torna-se cada vez mais crucial para identificar novos alvos e desenvolver métodos inovadores de controle.



**Figura 2 – Distribuição de *A. aegypti*.** Retirado de KRAEMER et al., (2015).

### **2.3 Metabolismo energético e regulação hormonal em *A. aegypti*.**

Previamente à alimentação sanguínea, as fêmeas do mosquito se alimentam do açúcar presente na seiva dos vegetais, enquanto os machos são estritamente fitófagos (RATNAYAKE et al., 2023). Estas cadeias carbônicas assimiladas pela dieta serão utilizadas como fonte de energia para os principais eventos biológicos do inseto, incluindo voo e reprodução (GONDIM et al., 2018). Em condições de alta energética, os açúcares e proteínas absorvidos na dieta do mosquito serão mobilizados para a formação de ácidos graxos (BRIEGEL; HEFTI; DIMARCO, 2002), que poderão ser utilizados para a formação de triacilglicerol, principal lipídeo de reserva, e fosfolipídeos (ALABASTER et al., 2008; GONDIM et al., 2018) (Figura 3).

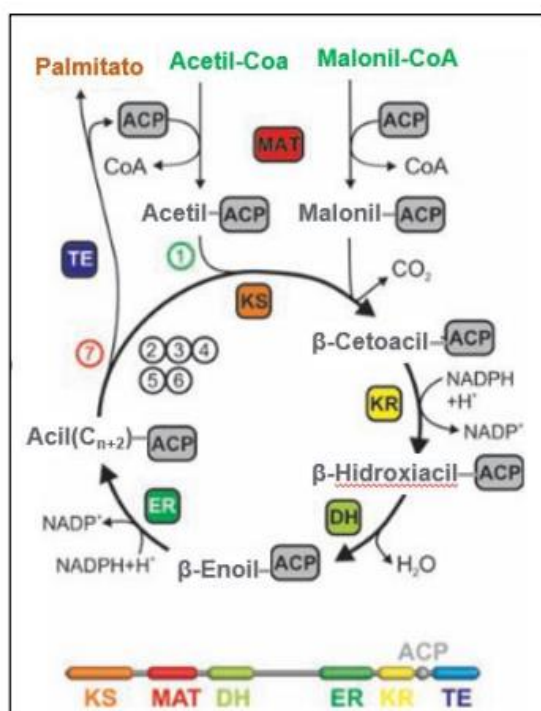


**Figura 3 – Estabelecimento de estoques energéticos em *A. aegypti*.** Os aminoácidos advindos da alimentação sanguínea e o açúcar advindo da alimentação por seiva podem ser utilizados para a formação de ácidos-graxo, que serão incorporados em triacilglicerol ou fosfolipídeos. Retirado de ALABASTER et al., (2008).

### 2.3.1 Metabolismo de lipídeo.

Lipídeos são a fonte de energia ideal para o metabolismo de *A. aegypti*, principalmente pelo seu alto valor calórico (RATNAYAKE et al., 2023). O principal lipídeo de reserva é o TAG, formado a partir de ácidos graxos (ALABASTER et al., 2008). Os ácidos graxos são unidades fundamentais na formação de lipídeos mais complexos. Eles exercem papel fundamental na integridade e dinâmica das membranas biológicas, além de serem os precursores da formação do triacilglicerol, lipídeo de reserva fundamental tanto em animais quanto em plantas (ANTELO et al., 2009). Os ácidos graxos também podem ser utilizados como fonte direta de energia em condições de baixa energética, sendo direcionados para sua

oxidação e consequente síntese de ATP (GONDIM et al., 2018). Esta diversidade de funções torna o metabolismo destas moléculas extremamente importante para a manutenção da vida. Em mosquitos, as reservas energéticas formadas por ácidos graxos participam de processos metabólicos importantes como o voo, a produção de ovos e o desenvolvimento nas diferentes fases de maturação (BRIEGEL; HEFTI; DIMARCO, 2002; GONDIM et al., 2018; RATNAYAKE et al., 2023).



**Figura 4 – Ciclo catalítico e organização de domínios da FAS.** Adaptado de MAIER; JENNI; BAN, (2006).

A síntese “de novo” de ácidos graxos ocorre a partir de moléculas de acetil-CoA derivadas de outras moléculas orgânicas, como aminoácidos e glicose. Este metabolismo é essencial para a formação de reservas quando se está em alta energética. Existem duas enzimas chaves para que a biossíntese de ácidos graxos ocorra, sendo elas a acetil coenzima a carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FAS) (TOPRAK et al., 2020). A ACC carboxila uma molécula de Acetil-CoA formando malonil-CoA, que será o precursor do alongamento da cadeia carbônica pela FAS.

Na etapa de iniciação da FAS (Figura 4), a malonil/acetil transferase (MAT) carrega o acetil-CoA no tiol terminal do cofator fosfopanteteína da proteína transportadora de acila

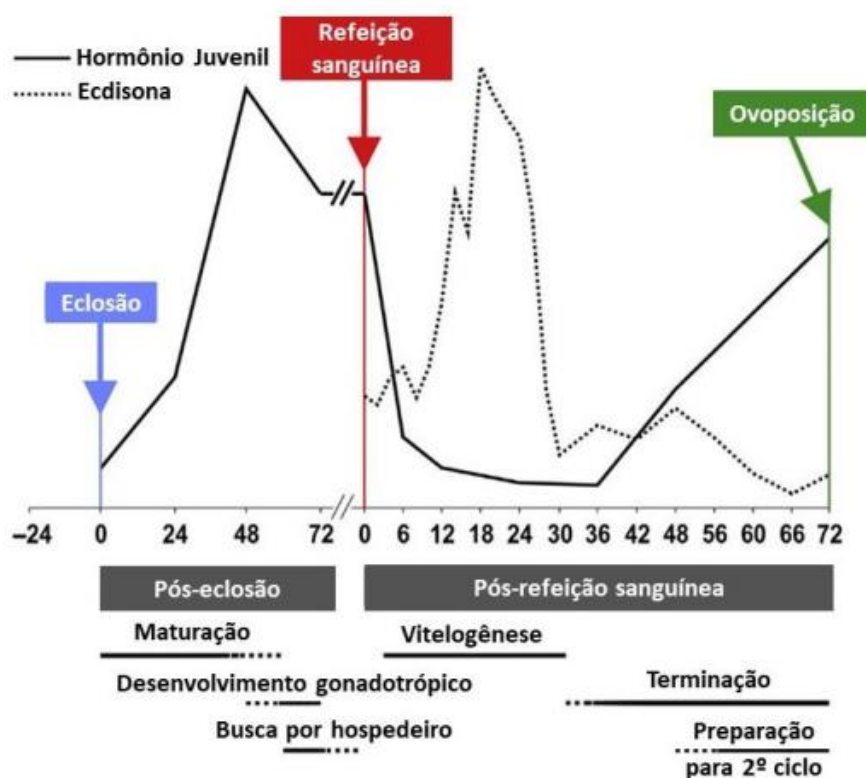
(ACP), que passa a acetila para o sítio ativo da  $\beta$ -cetoacil sintase (KS). A MAT transfere o malonil, de malonil-CoA, para a ACP, e a KS catalisa a condensação descarboxilativa do acetil e do malonil para um da  $\beta$ -cetoacil, ligado a ACP. Esta etapa é fundamental para que a reação de alongamento ocorra, sendo a catalisadora das outras subunidades da enzima. Ao final das etapas o ácido graxo será liberado pela tioesterase (TE) (ANTELO et al., 2009; MAIER; LEIBUNDGUT; BAN, 2008). O palmitato é o ácido graxo mais comumente formado e é a molécula base para a construção do triacilglicerol, mas também poderá ser mobilizado para a formação de fosfolípidos (ALABASTER et al., 2008). Sendo assim, a FAS pode ser um importante alvo na busca de novas formas de controle, visto sua participação chave no metabolismo energético e homeostase do inseto.

### **2.3.2 Regulação do metabolismo de lipídeo através de hormônios em *A. aegypti*.**

É possível observar um comportamento diferencial de alimentação por parte das fêmeas de *A. aegypti* (Figura 5), sendo eles nos períodos pré-vitelogênico e vitelogênico. Durante o período pré-vitelogênico, as fêmeas optam pela alimentação de seiva, enquanto ocorrem picos de hormônio juvenil (JH) e a maturação dos órgãos sexuais (ALABASTER et al., 2011; RATNAYAKE et al., 2023; ROY et al., 2016). A alimentação sanguínea desencadeia uma mudança metabólica significativa em fêmeas, resultando na redução dos níveis de JH, alterações na alocação de recursos metabólicos e um aumento no nível de 20-hidroxiecdisona (20-E) (RATNAYAKE et al., 2023; ROY et al., 2016). Enquanto no período pré-vitelogênico há um aumento no conteúdo lipídico no corpo gorduroso, durante o período vitelogênico, essas reservas são realocadas para os ovários, sendo esse processo desencadeado pela alimentação sanguínea (ROY et al., 2016). Para a regulação das diferentes necessidades do metabolismo do mosquito de acordo com o momento de vida, diferentes fatores endócrinos coordenam o estoque e mobilização das reservas energéticas. Em mosquitos podemos citar, além do JH e da 20-E, o hormônio adipocinético de inseto (AKH), os peptídeos *insulin-like* (ILP) e o hormônio ecdisterógeno dos ovários (OEH) (CONWAY; HASLITT; SWARTS, 2023; DOU et al., 2023; ROY et al., 2016a; ZOU et al., 2013).

O AKH pode ativar diversas lipases no corpo gorduroso do inseto, promovendo a conversão de TAG em ácidos graxos livres e glicerol (CONWAY; HASLITT; SWARTS, 2023; DOU et al., 2023). Os ácidos graxos liberados serão direcionados para a beta oxidação. As principais enzimas envolvidas na mobilização dessas reservas lipídicas incluem a lipase semelhante à Brummer (Bmm), a lipase sensível a hormônios (HSL) e a TAG lipase 1 (TAGL1)

(DOS SANTOS et al., 2024; DOU et al., 2023; LING; RAIKHEL, 2020). Além disto, a AKH já foi reportada como inibidora dos eventos de síntese de lipídeos no corpo gorduroso e nos ovários, demonstrando sua importância como reguladora dos estoques energéticos de *A. aegypti* (ZIEGLER, 1997). A AKH tem seu receptor expresso principalmente no corpo gorduroso, demonstrando a importância da sua sinalização para a mobilização das reservas energéticas obtidas durante o ciclo de vida do mosquito (DOU et al., 2023).



**Figura 5 - Os picos de JH e 20-E mediam o ciclo gonadotrófico de *A. aegypti*.** Retirado de ALABASTER et al., (2008).

O JH exerce diferentes papéis em machos e fêmeas. Em fêmeas, ele irá mediar o estágio pré-vitelogênico, estimulando a maturação dos folículos ovarianos, e começará a ser sintetizado no estágio de pupa, quando estas estiverem prestes a mudarem para adulto (NOUZOVA et al., 2019). Em machos, o JH começa a ser sintetizado após a emergência das pupas (NOUZOVA et al., 2019) e, embora ainda não estejam totalmente esclarecidos todos os papéis que este pode desempenhar em sua fisiologia, alguns estudos têm apontado que este hormônio media a síntese de diferentes moléculas nas glândulas acessória do macho (MAG) (CLIFTON et al., 2014; GILLOTT, 2003; NOUZOVA et al., 2019). Ainda nos machos, estas substâncias serão

armazenadas e transferidas para a fêmea durante a cópula, podendo influir na fecundidade e, portanto, no *fitness* reprodutivo da espécie (CLIFTON et al., 2014). Ademais, alguns trabalhos têm demonstrado que os machos também armazenam e transferem o JH para as fêmeas, influenciando a fisiologia do ovário pré-vitelogênico e afetando o sucesso reprodutivo da espécie (BOROVSKY et al., 1994; CLIFTON et al., 2014).

O pico de 20-E se inicia nas fêmeas a partir da alimentação sanguínea, onde se demarca o início do período vitelogênico e a utilização dos nutrientes ingeridos para a maturação dos ovos (DOHANIK, 2016). A atividade hematófaga é capaz de iniciar uma cascata de reações, através da liberação de ILPs que se ligam a seus respectivos receptores nas células foliculares do ovário da fêmea e desencadeiam a síntese de ecdisona a partir do colesterol (ROY et al., 2016). A partir disto, o hormônio será transportado até o corpo gorduroso, onde será convertido à sua forma mais ativa, a 20-E (MITCHELL et al., 1993a), que estimulará neste mesmo tecido a produção e liberação de vitelogenina. Esta glicolipofosfoproteína será incorporada pelos oócitos através de receptores específicos no epitélio folicular e armazenada na forma de vitelina, onde exercerá papel fundamental no desenvolvimento do embrião (DOHANIK, 2016; FALLON et al., 1974). É relevante destacar que a produção de vitelogenina no corpo gorduroso, até 24 horas após a alimentação sanguínea, ocorre em resposta aos aminoácidos presentes no sangue do hospedeiro (Clifton e Noriega, 2012). A ausência de aminoácidos essenciais, como leucina e triptofano, pode resultar em uma redução significativa na expressão da vitelogenina (ATTARDO et al., 2006). Este dado evidencia a crucial interação entre a dieta sanguínea e a expressão de proteínas vitais para o ciclo reprodutivo do mosquito.

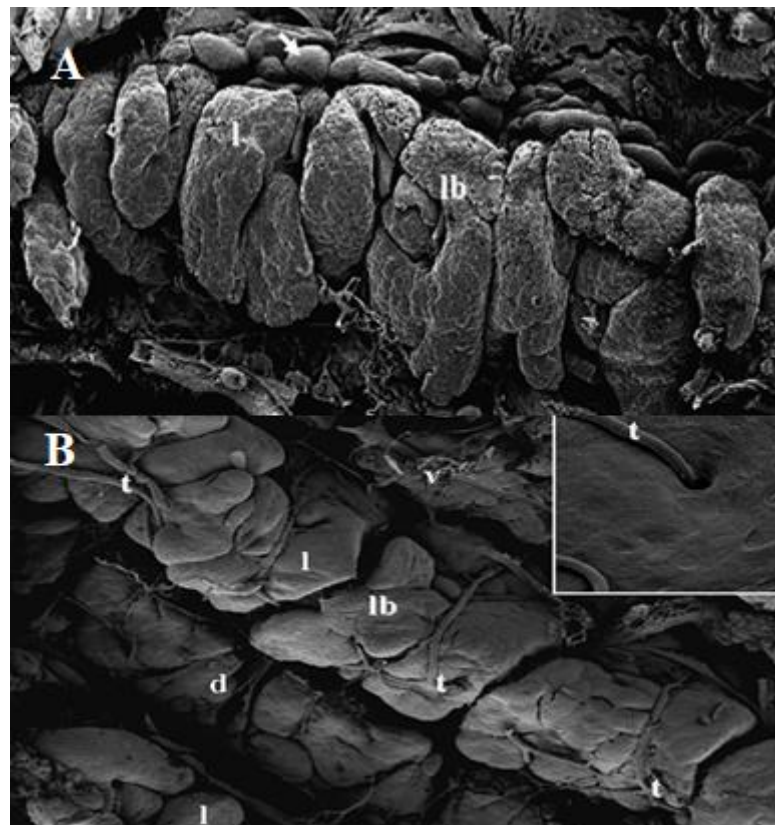
Os peptídeos semelhantes à insulina (ILPs) desempenham um papel fundamental na regulação mediada pelo JH e pela 20-E através de seus respectivos receptores (Ling; Raikhel, 2020). O fator de transcrição MET (tolerante ao metopreno) foi identificado como o receptor do JH, que transduz os sinais desse hormônio e modula a expressão de genes alvo, atuando por meio do homólogo *kruppel-1* (*Kr-h1*) (Ling; Raikhel, 2020). O mesmo ocorre com o receptor de ecdisona (*EcR*). Por meio desses fatores de transcrição, esses hormônios conseguem regular a expressão de diferentes ILPs, que, por sua vez, controlam ativamente os ciclos gonadotróficos, alterando a expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo energético do inseto (Ling; Raikhel, 2020; Roy et al., 2016). Em *A. aegypti* oito ILPs já foram descritas ao todo, sendo expressas diferencialmente a depende do hormônio de sinalização e tecido (LING; RAIKHEL, 2020).



Os receptores mediados pelos picos de JH e 20-E regulam de maneira diferencial diversas enzimas envolvidas no metabolismo energético de *A. aegypti*. No que diz respeito ao metabolismo lipídico, observam-se variações na expressão da lipase de triacilglicerol (TAGL) e da sintase de ácidos graxos (FAS) em resposta à estimulação pelos diferentes hormônios que modulam o ciclo de vida do mosquito (Dou et al., 2023). Esses achados reforçam o papel desses hormônios como os principais reguladores do metabolismo energético do mosquito.

### 2.3.3 Corpo Gorduroso.

Em mosquitos adultos, o corpo gorduroso é o principal local de síntese, degradação e estoque de energia (ARRESE; SOULAGES, 2010; GONDIM et al., 2018). Este tecido é considerado central na garantia da homeostase do inseto, sendo considerado uma estrutura homóloga ao tecido adiposo e hepático de vertebrados (ARRESE; SOULAGES, 2010; RATNAYAKE et al., 2023). Ele se encontra disperso pelo corpo do inseto, principalmente sob a cutícula e no entorno do intestino e órgãos reprodutivos (RATNAYAKE et al., 2023).



**Figura 6 – Corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti*.** Corte transversal do abdome de fêmeas antes (A) e após (B) uma alimentação com açúcar. l = lobo, lb = lobo central, t = traqueia, d = lado dorsal, v = lado ventral. Retirado de MARTINS; PIMENTA, (2008)

Seu conteúdo pode ser originado tanto das fases larvais do mosquito quanto ser sintetizado *de novo*, através da ingestão de açúcares ou proteínas pelos adultos (SILVA et al., 2020; ZIEGLER; IBRAHIM, 2001). Sua organização ao longo do abdômen dos mosquitos permite a distribuição do seu conteúdo em lóbulos, facilitando as dinâmicas de sinalização, mobilização e síntese de proteínas, hormônios e lipídeos (MARTINS; PIMENTA, 2008). Esta dinâmica de síntese é anatomicamente visível após alimentação com sacarose (Figura 6). Ao comparar o corpo gorduroso de fêmeas recém emergidas (Figura 6A) e após uma alimentação com sacarose (Figura 6B), é possível observar um aumento destes lóbulos representando a síntese de lipídeos a partir da alimentação dos carboidratos (MARTINS; PIMENTA, 2008).

As principais reservas energéticas do corpo gorduroso são lipídeos e o glicogênio, que se apresenta em menor quantidade (MARTINS; PIMENTA, 2008; RATNAYAKE et al., 2023). Além disto, este tecido é responsável pela síntese de proteínas, incluindo a lipoforina, responsável pelo transporte de lipídeos pela hemolinfa, e da vitelogenina, responsável pela maturação dos ovos nas fêmeas (CONWAY; HASLITT; SWARTS, 2023; RATNAYAKE et al., 2023). Além do seu papel central na homeostase energética do inseto, este tecido também exerce participação importante na secreção de hormônios e na regulação da resposta imune, como na liberação de defensinas (ARRESE; SOULAGES, 2010; DOS SANTOS et al., 2024; SADEKUZZAMAN; STANLEY; KIM, 2018).

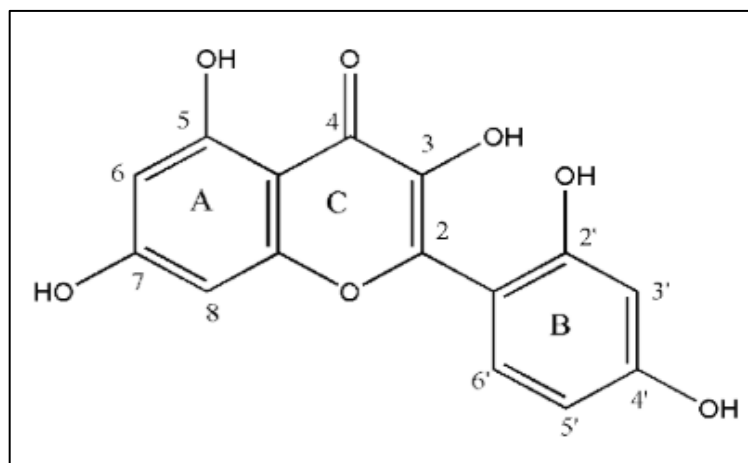
Em fêmeas, o corpo gorduroso assume extrema importância na maturação de ovos, visto ser responsável pela síntese e liberação de vitelogenina (ALABASTER et al., 2011; ROY et al., 2016). Além disso, as amplas reservas de TAG sintetizadas e armazenadas por esse tecido, a partir da ingestão de açúcares e aminoácidos, são redistribuídas para os ovários durante a maturação dos ovos (ZIEGLER; IBRAHIM, 2001). Isso é observado estruturalmente pela redução e achatamento do corpo gorduroso após a ingestão de sangue, causado tanto devida a compressão provocada pelo engorgitamento de sangue e aumento dos ovários, quanto pela mobilização de TAG (MARTINS; PIMENTA, 2008). Portanto, o estudo do metabolismo energético desta espécie envolve necessariamente este tecido, dada sua importância na provisão de reservas energéticas para o desenvolvimento e reprodução do inseto.

## 2.4 Morina.

A forma de vida sésil dos vegetais selecionou diferentes estratégias de defesa contra predadores. Entre elas, destaca-se a biossíntese de flavonoides, que está associada a vias metabólicas de resposta ao estresse em plantas, incluindo a herbivoria e a infecção por patógenos (WANG et al., 2021). Além disso, estudos recentes têm sublinhado a importância dessas vias, revelando uma correlação direta entre o aumento na produção de flavonoides e uma maior resistência das plantas aos insetos (YANG et al., 2023; ZHANG et al., 2022). Estas descobertas evidenciam o importante papel dos polifenóis na defesa dos vegetais e levantam hipóteses sobre os potenciais alvos fisiológicos nos insetos expostos a essas substâncias. Compreender quais são esses possíveis alvos pode resultar em diversas aplicações práticas para o controle de insetos, tanto em relação à saúde pública quanto à economia agrícola.

Dentre os flavonoides, se destaca a morina. A morina é um flavonoide da classe dos flavonóis, que consiste em dois anéis aromáticos ligados por um heterocíclico ligado a oxigênio (Figura 7). A morina já foi isolada de diferentes vegetais da família Moraceae, como a taiúva (*Maclura pomifera*) e em espécies de figos (*Ficus sp.*), principalmente das folhas e frutos (CHUNG et al., 2016; RAJPUT; WANG; YAN, 2021). Na sua forma natural exibe um gosto amargo e coloração amarelada, que foi usada como corante natural de tecidos por décadas (RAJPUT; WANG; YAN, 2021).

Nos últimos anos, o interesse no estudo deste flavonoide tem se tornando cada vez mais expressivo, principalmente por exibir notável diversidade de aplicações biológicas. Diversas pesquisas evidenciaram sua capacidade de prevenir a destruição de células beta em ratos, demonstrando sua ação antihiperlipidêmica. Além disso, revelou-se como um agente antitumoral de relevância, demonstrando eficácia *in vitro* contra cânceres de boca, mama e fígado, atuando em diversos mecanismos celulares (CHUNG et al., 2016; RAJPUT; WANG; YAN, 2021; ZHANG et al., 2018). Este flavonoide também já exibiu um alto potencial antioxidante, que é a primeira linha de defesa da célula contra espécies reativas de oxigênio (RAJPUT; WANG; YAN, 2021). Além disto, já foi demonstrada a sua atividade anti-inflamatória e cardioprotetora (CHUNG et al., 2016; ZHANG et al., 2018). A diversidade de aplicabilidade biológica destaca a promissora natureza desse composto, abrindo portas para futuras investigações em diferentes organismos-modelo.



**Figura 7 – Estrutura molecular da morina.** Retirado de GHOSH; PATWARI; DASGUPTA, (2017).

#### 2.4.1 O efeito da morina sobre a ácido graxo sintase animal.

Experimentos *in vitro* demonstraram que diversos flavonoides são potentes inibidores da FAS animal, tendo a morina o efeito mais significativo (LI; TIAN, 2004). Estudos posteriores comparando o potencial inibitório dos diferentes flavonoides e suas respectivas estruturas concluíram que as diferentes posições da hidroxila nos anéis aromáticos influenciam na sua atividade (LI; TIAN, 2004). A presença da hidroxila no anel B (Figura 7) parece ser fundamental para que o flavonoide exerça atividade inibitória na FAS (TIAN, 2006a), o que reafirma o potencial inibitório da morina.

A FAS animal é um complexo enzimático com diversas subunidades e se qualquer uma delas é inibida, toda a reação é comprometida. Desta forma, estudos investigativos sobre o possível domínio enzimático que sofreria a ação da morina foram realizados. Foi possível observar que este flavonoide tem alta afinidade pela zona de acoplamento do grupo Acetil-CoA, inibindo-o competitivamente (LI; TIAN, 2004b). Desta forma, ele age na primeira etapa de formação do ácido graxo, na zona de acoplamento de acil do domínio KS, impedindo a reação de condensação para a formação do  $\beta$ -cetoacil-ACP, comprometendo a síntese do ácido graxo e por consequência do triacilglicerol, além de inibir a malonil-CoA de forma não competitiva (LI; TIAN, 2004). Estes resultados *in vitro* estimulam a busca destes efeitos *in vivo*, podendo ser estudados em diferentes organismos.

#### 2.4.2 Utilização da morina no estudo de insetos.

A Ecdisona-20-Monoxigenase (E-20-M) é uma enzima chave para a conversão do hormônio ecdisona para a sua forma mais ativa, a 20-Hidroxiecdisona (MITCHELL et al., 2007). A 20-E exerce um papel importante na fisiologia de artrópodes, já que desencadeia a produção de vitelogenina que desencadeará a formação do embrião (MITCHELL et al., 2007). Desta forma, a E-20-M pode representar um excelente alvo de vulnerabilidade a ser explorado pelos vegetais ao longo da evolução a fim de se evitar a herbivoria. Diversos aleloquímicos extraídos de plantas afetam a atividade desta enzima, incluindo limonoides, salanina e flavonoides (MITCHELL et al., 2007). Em insetos, a morina apresentou um efeito inibitório satisfatório sobre a E-20-M em diferentes espécies de insetos, incluindo *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta* e *Aedes aegypti* (MITCHELL et al., 2007).

Foi possível observar a inibição da transidrogenase mitocondrial no intestino de *Manduca sexta* na presença de morina, evidenciando um efeito inseticida potencial de maneira dose-dependente (VANDOCK; MITCHELL; FIORAVANTI, 2012). Essa inibição é particularmente significativa devido à importância crucial dessa enzima no desenvolvimento de *M. sexta*. Estudos adicionais revelaram que a morina desempenha um papel inibitório nas ATPases quando incorporada à dieta da lagarta do milho (*Helicoverpa zea*), resultando em reduções significativas no peso corporal, na taxa de sobrevivência e na resistência a inseticidas (AURADE et al., 2011).

Essas descobertas somadas consolidam a morina como uma molécula de grande relevância a ser explorada no combate a insetos. Os resultados dessas pesquisas não apenas oferecem *insights* valiosos sobre os mecanismos de ação da morina, mas também incentivam a busca por abordagens mais ecologicamente amigáveis no controle de insetos pragas. Essa busca é crucial tanto no âmbito da saúde pública quanto no contexto agroeconômico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da alimentação de fêmeas e machos de *A. aegypti* com morina e avaliar seus efeitos sobre o metabolismo de lipídio.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar o conteúdo de triacilglicerol de machos e fêmeas de *A. aegypti* alimentados com morina;
- Avaliar os impactos da ingestão de morina sobre a expressão diferencial de genes relacionados a síntese e mobilização de lipídeo em *A. aegypti*;
- Avaliar os impactos da ingestão da morina sobre a fecundidade e fertilidade de machos de *A. aegypti* através de fêmeas copuladas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Manutenção da colônia de *A. aegypti*.**

Todos os experimentos foram realizados com mosquitos de colônias de *Aedes aegypti* (Rockfeller) mantidas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Artrópodes (LBBMA), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Os ovos são armazenados em papel filtro seco e incubados seguindo o protocolo de Farnesi et al. (2006). Larvas e adultos são mantidos a 16h de luz e 8h de escuro sob temperatura constante de 28°C e umidade entre 70-80%. As larvas são alimentadas com ração de gato macerada. Os adultos são alimentados com solução sacarose 10% *ad libitum*. O repasto sanguíneo é realizado através de camundongos anestesiados que são disponibilizadas às fêmeas. Todos os protocolos de cuidados com animais e experimentais são conduzidos seguindo as diretrizes do comitê de cuidado e uso institucional (Comitê de Avaliação de Uso de Animais para Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, CEUA-IB-UFRRJ) sob o registro 005/2017.

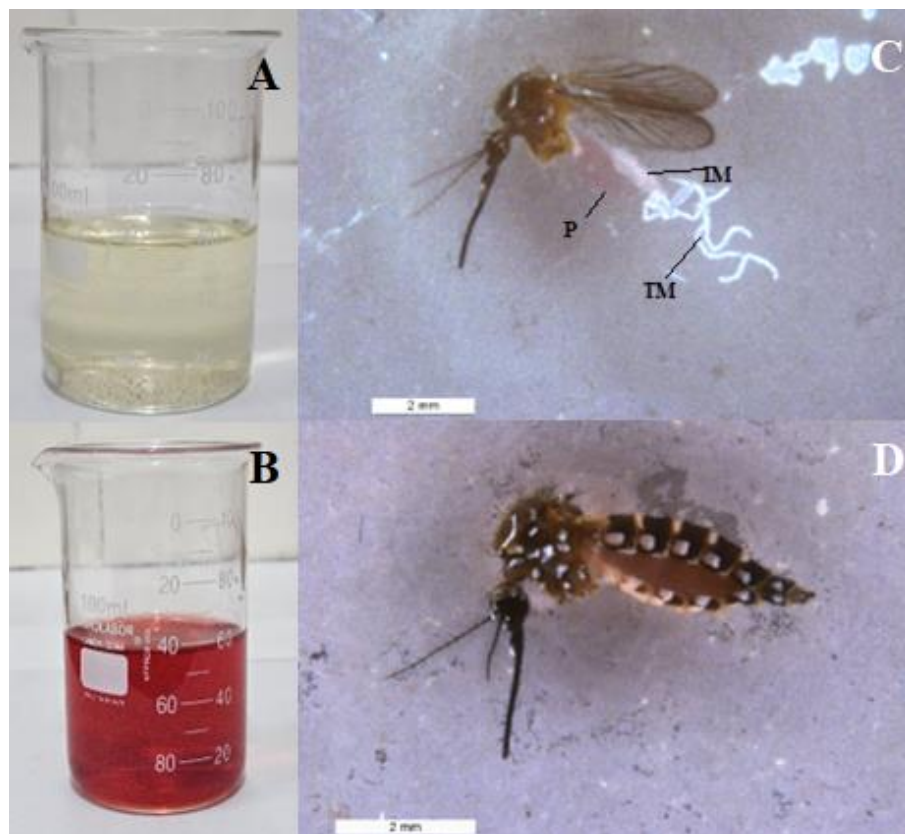
### **4.2 Alimentação de *A. aegypti* com morina.**

#### **4.2.1 Avaliação do conteúdo de triacilglicerol do corpo inteiro de *A. aegypti*.**

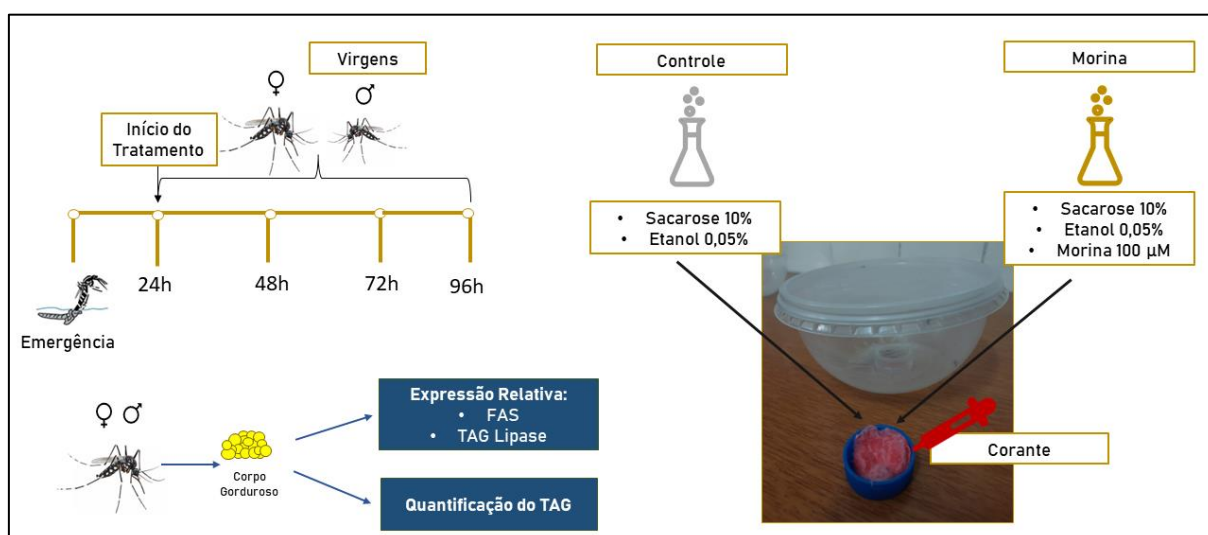
Os grupos para o estudo foram divididos de acordo com seu estágio de desenvolvimento e sexo. Os insetos foram coletados em 24, 48 e 72 horas pós-emergência. Os mosquitos em estágio de pupa foram separados em grupos de machos ou fêmeas e colocados em copinhos de café preenchidos de água desclorada dentro de gaiolas de plástico contendo um algodão até atingirem o estágio adulto. Ao emergirem, foi disponibilizado 5ml de uma solução 100 µM de morina (Sigma Aldrich), contendo sacarose a 10% e etanol a 0,005%. Para indivíduos usados como controle, uma solução 10% de sacarose com etanol a 0,005% foi oferecida. Estas soluções foram repostas a cada 24h.

#### **4.2.2 Avaliação do conteúdo de triacilglicerol do corpo gorduroso de *A. aegypti*.**

Para a análise do conteúdo lipídico no corpo gorduroso dos insetos, as soluções foram disponibilizadas a partir de 24h pós emergência. Além disto, um tempo adicional de 96 horas pós emergência foi adicionado. Para controlar os insetos que se alimentaram, uma gota de corante alimentício vermelho Soft Gel foi adicionada à solução. Ao dissecar os insetos, o conteúdo do trato intestinal foi avaliado e, caso apresentasse coloração avermelhada, o corpo gorduroso era separado para amostragem (Figura 8).



**Figura 8 - Adição de corante nas soluções oferecidas aos insetos.** A adição de corante permitiu a separação dos animais que se alimentaram da solução ou não. Em (A) a solução açucarada contendo morina, exibindo sua coloração amarelo-amarronzada natural. Em (B) a solução após adição de corante. Após a alimentação é possível observar a coloração avermelhada tanto no abdômen (D), quanto no trato digestivo (C). P = Papão; IM = intestino médio; TM = túbulos de malpighi.

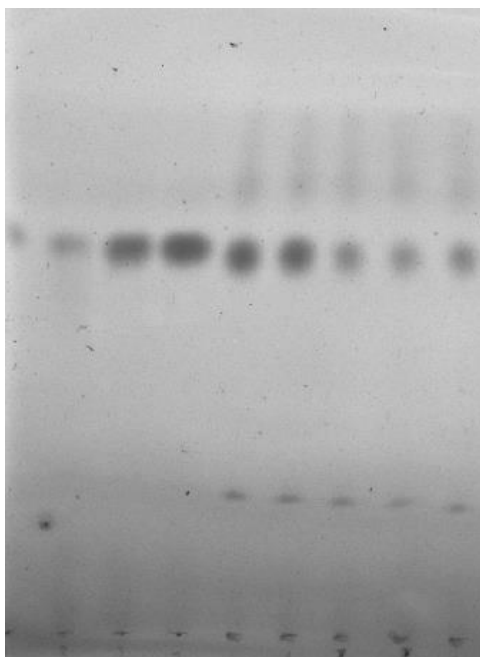


**Figura 9 - Desenho experimental da amostragem de corpo gorduroso de machos e fêmeas alimentados com morina.**



#### 4.3 Extração de lipídeos e quantificação do triacilglicerol.

Para a quantificação do conteúdo lipídico no corpo inteiro de animais tratados, e corpo gorduroso isolados de machos alimentados com morina, foi utilizada metodologia de extração de lipídeo segundo BLIGH & DYER, 1959. Os lipídios foram separados por cromatografia de camada fina (TLC) em placa de sílica (Sílica para TLC com 13% de gesso, Macherey Nagel) usando os solventes hexano, éter etílico e ácido acético (90:60:1) e depois imersos em solução aquosa contendo 14% de sulfato de cobre e 8% de ácido fosfórico. Após a secagem, a placa foi aquecida em estufa por cerca de 200°C por 5 minutos, onde as bandas se tornaram visíveis (Figura 10). A quantificação do triacilglicerol foi determinada através de uma análise densitométrica das bandas correspondentes de acordo com um padrão (RUIZ; OCHOA, 1997) através do Image Lab Software 5.1 (Bio-Rad).



**Figura 10 – TLC representativa.** Placa de TLC após secagem, onde é possível observar as bandas contendo o triacilglicerol, assim como o padrão utilizado para quantificação.

Para a determinação do conteúdo de triacilglicerol em corpos gordurosos de fêmeas foi utilizado o kit comercial de quantificação de triglicérides monoreagente (Bioclin). Este método permite o processamento de diversas amostras de uma só vez. Neste kit o reagente provoca uma cascata de reações que originam um composto de coloração cereja. A intensidade desta coloração é proporcional a abundância de TAG. Esta coloração pode ser captada a 500 nm (490 - 540 nm). Para esta leitura foi utilizado The iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad).

#### 4.4 Extração do RNA e síntese de cDNA.

As amostras foram homogeneizadas com um pistilo em 1ml de TRIzol Reagent (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). A extração de RNA total foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA foi quantificado em NanoDrop spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fischer Scientific). A integridade e qualidade do RNA foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1,5%. Todas as amostras tiveram taxas de A260/A280 de  $2,0 \pm 0,1$ . Depois da extração, 1µg de RNA foi tratado com 1µl de DNase I (SigmaAldrich) por 30 minutos a 37°C em um volume final de 10µl. Depois disso, a reação foi interrompida com a incubação em 70°C e adição de 50mmol de EDTA. O RNA tratado foi utilizado para sintetizar o cDNA com random primers e 50µl de reverse transcriptase MultiScribe™ MuLV do High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) em um volume final de 20µl.

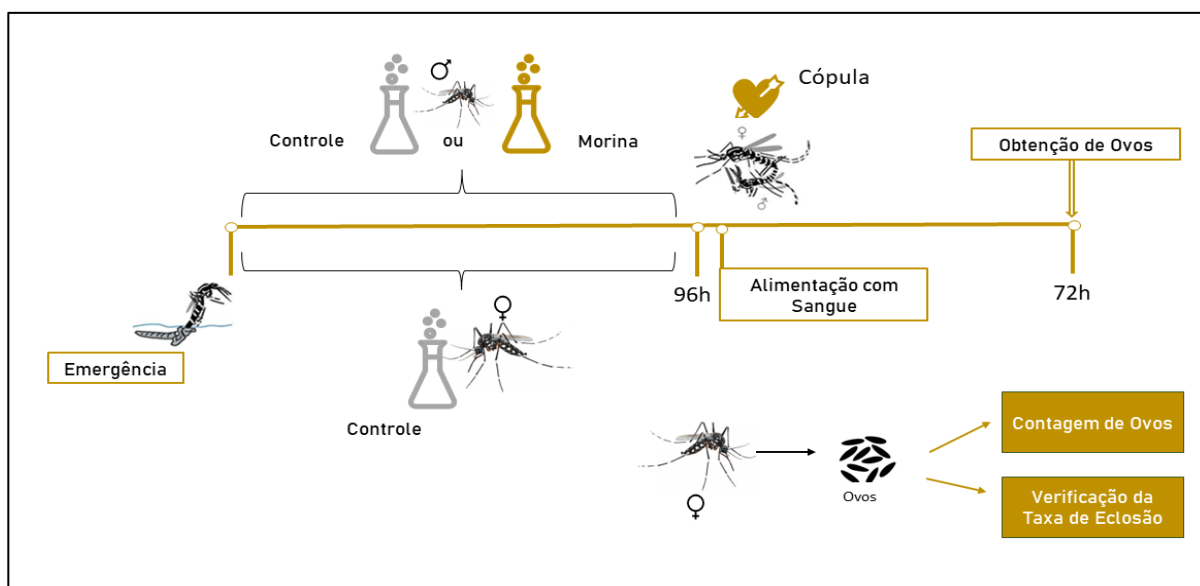
#### 4.5 PCR quantitativa (qPCR).

A qPCR foi realizada em um sistema StepOnePlus (Thermo Fischer Scientific) com Power SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems). A reação contendo 7,5µl do Mix citado anteriormente, 0,3µl dos primers *forward* e *reverse* sintetizados e 0,75µl de cDNA em um volume final de 15µl. As reações foram realizadas em MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems), com a programação padrão do equipamento. A quantificação relativa de genes relacionados ao metabolismo lipídico do inseto foi realizada utilizando as medidas de expressão em tempo real normalizadas em função da expressão do gene constitutivo tubulina de *A. aegypti*. Os primers utilizados estão descritos na tabela 1. Os níveis relativos de RNA foram calculados utilizando o método  $\Delta\Delta CT$  (quantificação relativa) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Todas as amostras foram ensaiadas em triplicatas.

**Tabela 1.** Sequências utilizadas para análises de expressão.

Gene	Forward	Reverse	Código VectorBase	Referência
<i>α-tubulin</i> <i>a</i>	CTGCTTCAAAATGCGTGAA T	GGTTCCAGATCGACGAAA	AAEL01322 9	DZAKI et al., (2017).
<i>fasI</i>	GAGGTCGTCCGATTGGTTTC	AGGACAACCTTGCCGATGT G	AAEL00119 4	ALABASTE R et al., (2008).
<i>tagI</i>	CATTGGGCACTTGGATTCT	GGGCACTTGGTACGCATACT	AAEL01455 3	DOU et al., (2023).

#### 4.6 Verificação dos efeitos da morina sobre a fecundidade.



**Figura 11 - Desenho experimental da avaliação da fecundidade de machos alimentados com morina.**

Para avaliar os efeitos da morina sobre a fecundidade de *Aedes aegypti*, fêmeas virgens foram mantidas separadas dos machos e alimentadas com uma solução de sacarose a 10% ao longo de 4 dias pós emergência. Simultaneamente, os machos foram alimentados com uma solução açucarada contendo morina (Figura 11). Para o controle, foi oferecido aos machos apenas uma solução de sacarose a 10%. Após esse período, fêmeas e machos foram colocados em uma mesma gaiola na proporção de 1:1, permitindo a observação da cópula. As fêmeas foram então alimentadas com sangue e individualmente alocadas em copinhos contendo um papel filtro sobre algodão umedecido, onde depositaram seus ovos por até 72 horas após a alimentação sanguínea. Os papéis foram posteriormente coletados e os ovos submetidos à contagem e avaliação da taxa de eclosão (Figura 11).

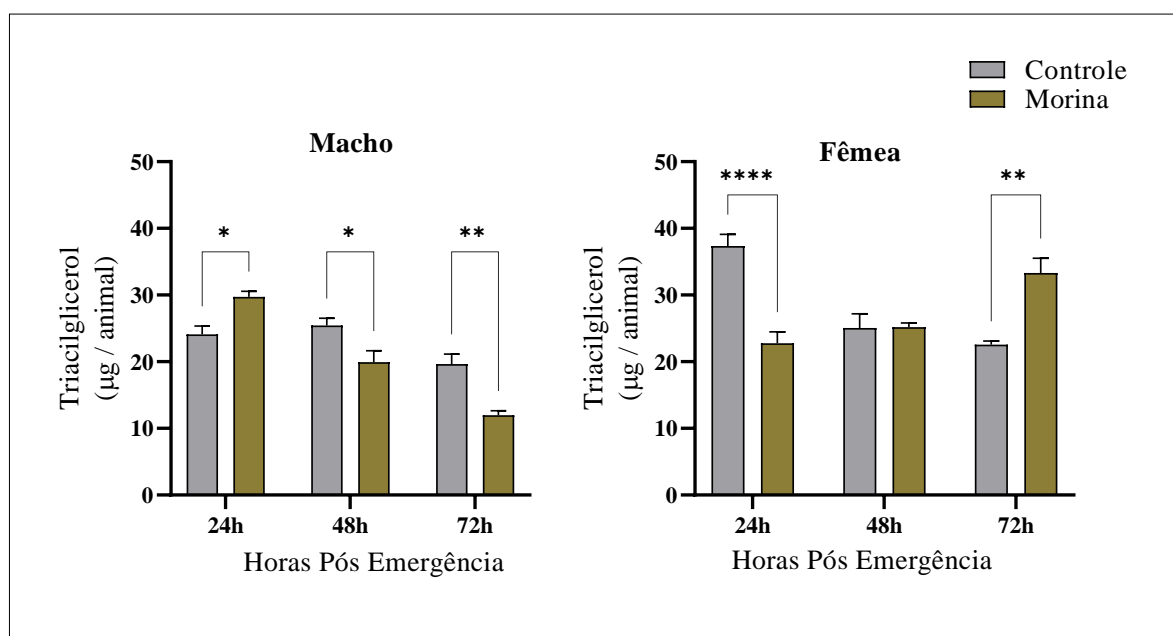
#### 4.7 Análise estatística

Todos os testes estatísticos foram realizados no programa GraphPad Prism 9.0 de acordo com a distribuição dos dados. Para as análises temporais dos tratamentos, foi realizado 2wayANOVA seguido de teste de Tukey ou Sidak para múltiplas comparações. Para análises não-paramétricas foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Determinação do triacilglicerol em adultos de *A. aegypti* alimentados com morina.

A quantidade de triacilglicerol foi determinada em fêmeas e machos alimentados com morina e determinados em 3 tempos diferentes pós-emergência (PE) (Figura 12). Para isso fêmeas e machos foram mantidos separados desde antes da emergência dos adultos a partir das pupas. Os animais PE foram alimentados com uma solução de sacarose 10% contendo morina 100 $\mu$ M em etanol 0,005% e, como controle, solução de sacarose 10% contendo etanol a 0,005%. Para determinação do triacilglicerol, foram extraídos os lipídeos do corpo inteiro de machos e fêmeas separadamente nos tempos de 24, 48 e 72h.

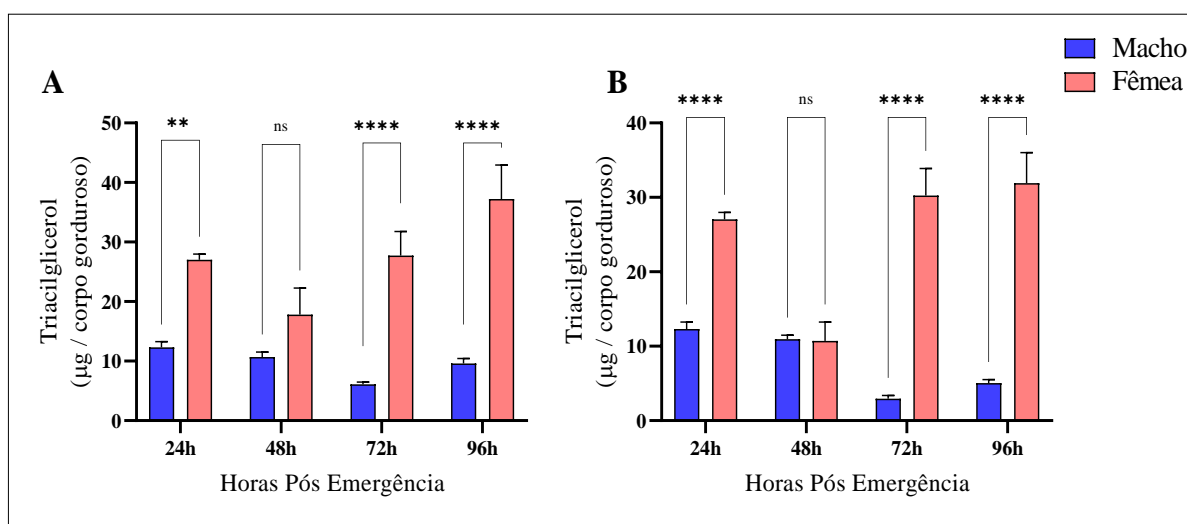


**Figura 12 - Efeito da alimentação com morina no conteúdo de triacilglicerol no corpo inteiro de machos e fêmeas de *A. aegypti*.** Os mosquitos foram alimentados com uma solução contendo 100 $\mu$ M de morina, 10% de sacarose e 0,05% de etanol durante três dias após a emergência. Para o controle apenas uma solução contendo 10% de sacarose e 0,05% de etanol foi oferecida. Os valores representam a média de três réplicas biológicas  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas foram determinadas usando o método 2way ANOVA, seguido de teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Os resultados apresentados na Figura 12 revelam diferenças na distribuição de triacilglicerol entre as fêmeas e machos controle no tempo de 24 PE, onde foi observado que as fêmeas acumulam muito mais lipídios. Os níveis de triacilglicerol nas fêmeas nos tempos de 48 e 72h diminuíram a níveis observados nos machos. Internamente, nos grupos de machos, foi possível observar também uma diferença entre os alimentados com morina em relação ao controle nos tempos de 24h, 48h e 72 h. No tempo de 24 h é possível observar um aumento no grupo que ingeriu a morina, enquanto nos tempos de 48h e 72h o conteúdo de triacilglicerol diminui (Figura 12).

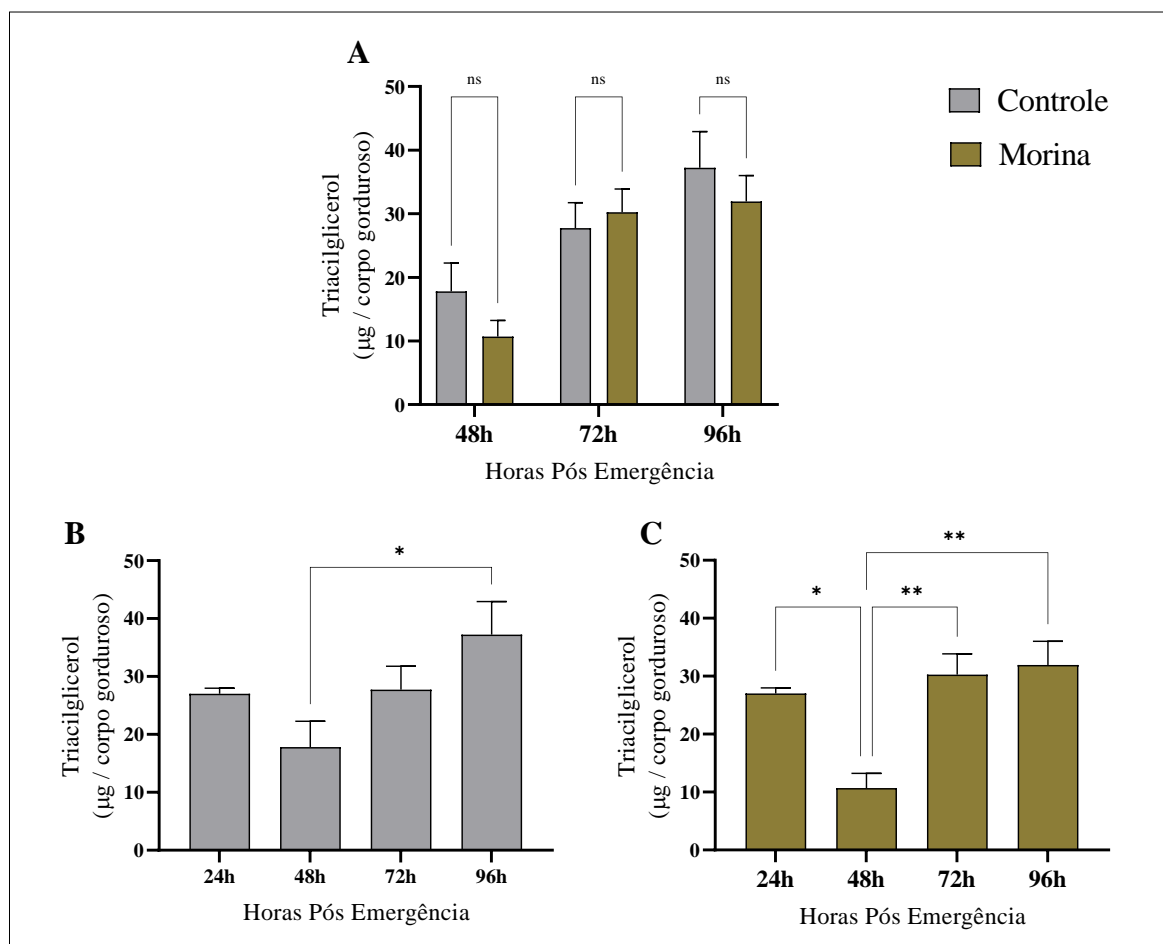
Na análise do conteúdo de triacilglicerol em fêmeas, foram observados efeitos distintos da morina sobre a quantidade de lipídios armazenados em comparação com os resultados observados em machos. Em fêmeas alimentadas com morina ocorre uma diminuição no conteúdo de triacilglicerol no tempo de 24h. Em 48h não se observa diferença. No tempo de 72h é observado um aumento no conteúdo de triacilglicerol (Figura 12).

## 5.2 Determinação do triacilglicerol no corpo gorduroso de *A. aegypti* alimentados com morina.



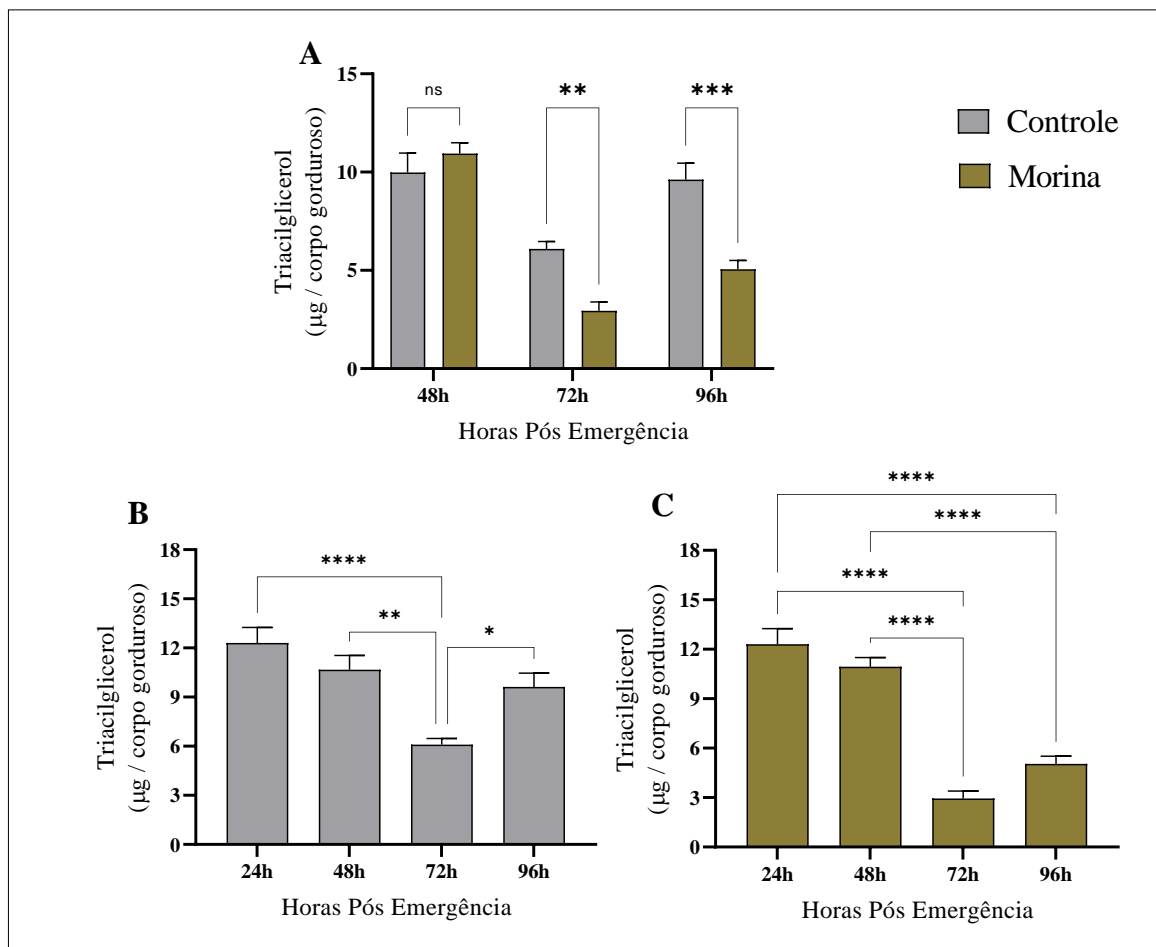
**Figura 13 - Comparação do conteúdo de triacilglicerol entre machos e fêmeas alimentados.** Os animais foram alimentados com uma solução 100µM de morina com sacarose 10% e etanol 0,05% durante três dias após a emergência (B). Para o controle apenas uma solução contendo 10% de sacarose e 0,05% de etanol foi oferecida (A). Os valores representam a média de três réplicas biológicas  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas foram determinadas usando o método 2way ANOVA, seguido de teste de Šidák. \*\* $p < 0,005$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  e ns = não significante.

O corpo gorduroso é o principal órgão de estocagem de lipídios nos insetos. Nesse sentido, a distribuição de triacilglicerol nesse tecido, entre machos e fêmeas, e em animais alimentados com morina, foi avaliada. Para essa análise as alimentações foram oferecidas aos insetos adultos a partir de 24h PE.



**Figura 14 - Efeito da alimentação com morina no conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso em fêmeas de *A. aegypti*.** As fêmeas foram alimentadas com uma solução 100 $\mu\text{M}$  de morina contendo sacarose 10% e etanol 0,05% durante três dias após a emergência. Para o controle apenas uma solução contendo 10% de sacarose e 0,05% de etanol foi oferecida. Em (A) foi realizada uma comparação entre tratamento e controle em diferentes tempos pós-emergência. Em (B) e (C) foi realizada uma comparação temporal intragrupos, não tratados e tratados, respectivamente. Os valores representam a média de três réplicas biológicas  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas foram determinadas usando o método 2way ANOVA, seguido de teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e ns = não significativo.

Quando comparamos machos e fêmeas alimentados com sacarose (Figura 13A) e alimentados com sacarose acrescida de morina (Figura 13B), podemos observar uma maior quantidade de triacilglicerol nas fêmeas. Além disso, é possível observar comparativamente que as dinâmicas de conteúdo do triacilglicerol entre controle e animais que ingeriram a morina é parecida. É importante destacar que em 48h PE tanto fêmeas controle, quanto as que ingeriram a morina apresentaram redução no conteúdo lipídico se igualando ao visto em machos



**Figura 15 - Efeito da alimentação com morina no conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso em machos de *A. aegypti*.** Os machos foram alimentados com uma solução 100µM de morina contendo sacarose 10% e etanol 0,05% durante três dias após a emergência. Para o controle apenas uma solução sacarose 10% e etanol 0,05% foi oferecida. Em (A) foi realizada uma comparação entre tratamento e controle em diferentes tempos pós-emergência. Em (B) e (C) foi realizada uma comparação temporal intragrupos, não tratados e tratados, respectivamente. Os valores representam a média de três réplicas biológicas  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas foram determinadas usando o método 2way ANOVA, seguido de teste de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  e ns = não significante.

A avaliação no conteúdo de TAG no corpo gorduroso de fêmeas de *A. aegypti* revelou um perfil diferente daquele observado ao quantificar o TAG no corpo inteiro (Figura 14). É possível observar que a comparação entre controle e tratamento não obteve diferenças significativas no conteúdo de TAG ao longo das 96h PE (Figura 14A). Apesar disto, ao comparar os grupos controle e tratamento separadamente ao longo do tempo, é possível observar algumas diferenças. Nas fêmeas alimentadas com morina, diferente dos animais alimentados apenas com sacarose, foi observada uma diferença de todos os tempos em relação ao tempo de 48h.

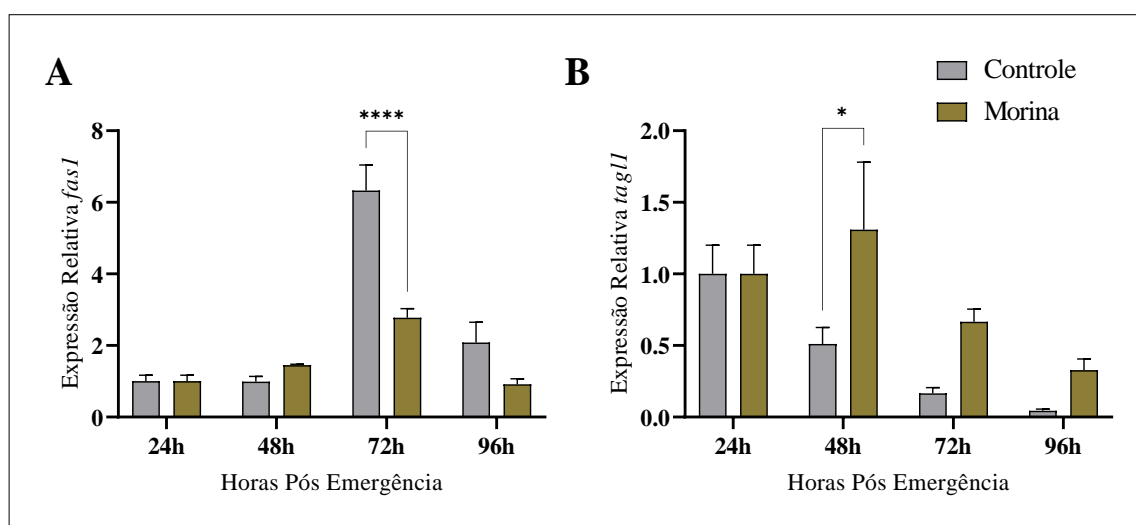
Em relação aos efeitos da morina no conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso de machos, foi observada mudanças assim como no corpo inteiro, mas com algumas diferenças. Em 48h PE não foi observada diferença, mas no tempo de 72h a diferença se manteve como observado em animais inteiros. Foi incluído um tempo adicional de 96h aonde a diminuição do conteúdo triacilglicerol se mantém (Figura 15A).

Considerando o tempo controle de 24h PE, não foram observadas mudanças no tempo de 48h PE, tanto em tratados, quanto no controle. Porém, uma diminuição no conteúdo de triacilglicerol ocorreu de forma expressiva em 72h PE, tanto nos animais que ingeriram a morina quanto no controle. É possível observar que essa redução foi mais acentuada em animais que ingeriram a morina. Em 96h PE, os animais do grupo controle reestabelecem o conteúdo de TAG no corpo gorduroso a níveis similares ao observado em 48h PE (Figura 15B). Já os animais alimentados com morina mantêm os níveis de TAG baixos em 96h PE (Figura 15C).

### **5.3 Expressão da *fasI* e *tagII* no corpo gorduroso de *A. aegypti* alimentados com morina.**

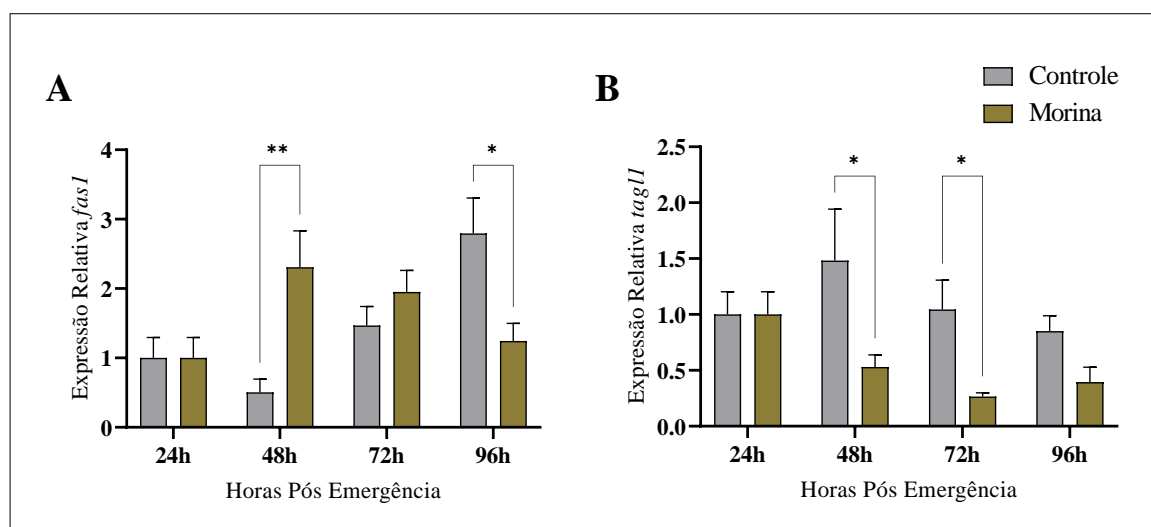
As etapas de síntese e mobilização de triacilglicerol são muito bem reguladas. Como foi observada variação no conteúdo de triacilglicerol em ambas as condições de alimentação, fomos observar se a expressão gênica de enzimas chaves nesses processos estavam sendo moduladas. Avaliamos a expressão das enzimas envolvidas com a síntese, a ácido graxo sintase (*fasI*), e mobilização de triacilglicerol, triacilglicerol lipase (*tagII*). A expressão foi avaliada nas mesmas condições de determinação do conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso. Para a determinação dos níveis de expressão relativa da *fasI* e *tagII* no corpo gorduroso de adultos alimentados com morina, foi utilizado o método de delta-delta Ct (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A abundância relativa dos transcritos foi normalizada a partir do gene constitutivo tubulina e comparados aos adultos 24h PE.





**Figura 16 - Expressão diferencial da *fasI* e *tagII* no corpo gorduroso em fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com morina.** As fêmeas foram alimentadas com uma solução de morina 100μM contendo sacarose 10% e etanol 0,05% durante três dias após 24h de emergência. Para o controle apenas uma solução contendo 10% de sacarose e 0,05% de etanol foi oferecida. A abundância relativa da *fasI* (A) e da *tagII* (B) foi normalizada através dos genes de referência *α-tubulina* e comparados com as fêmeas 24 pós emergência. Os valores representam a média de três réplicas biológicas ± SEM. As diferenças estatísticas foram determinadas usando o método 2way ANOVA, seguido de teste de Šidák. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas no conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso de fêmeas entre tratados e controle, a análise de expressão revelou um pico de expressão da *fasI* em 72h PE que não foi observado nas fêmeas que se alimentaram com morina (Figura 16A). Em relação a *tagII*, é possível observar que a partir de 24h PE ocorre uma subexpressão nos animais controle em todos os tempos observados. É possível observar que em 48h pós emergência o nível de expressão da *tagII* é maior em fêmeas que se alimentaram com morina (Figura 16B).

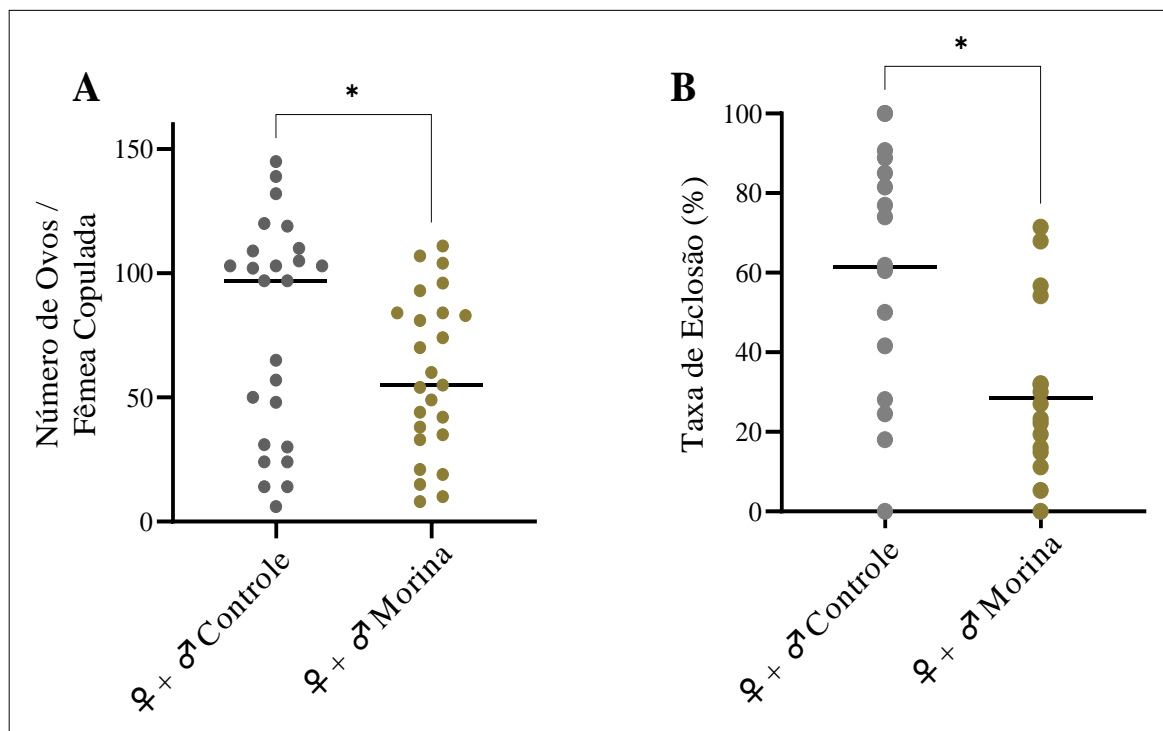


**Figura 17 - Expressão diferencial da *fasI* e *tagII* no corpo gorduroso em machos de *A. aegypti* alimentados com morina.** Os machos foram alimentados com uma solução 100 $\mu$ M de morina contendo sacarose 10% e etanol 0,05% durante três dias após 24h de emergência. Para o controle apenas uma solução contendo 10% de sacarose e 0,05% de etanol foi oferecida. A abundância relativa da *fasI* (A) e da *tagII* (B) foi normalizada através dos genes de referência  *$\alpha$ -tubulina* e comparados com os machos 24 pós emergência. Os valores representam a média de três réplicas biológicas  $\pm$  SEM. As diferenças estatísticas foram determinadas usando o método 2way ANOVA, seguido de teste de Šidák. \* $p < 0,05$ .

Em machos foi observado um aumento da expressão da *fasI* em 48h PE no grupo alimentado com morina e uma diminuição no tempo de 96h PE (Figura 17A). Em relação a *tagII*, foi observada uma diminuição na expressão nos animais alimentados com morina nos tempo de 48 e 72h PE (Figura 17B). Comparando a expressão da *fasI* em machos não tratados é possível observar uma tendência de subida nos níveis de expressão que se estabelece no pico observado em 96h PE (Figura 17A), que não acontece em machos alimentados com morina. No caso da *tagII*, em animais alimentados apenas com sacarose, é observado uma tendência de manutenção da expressão a partir de 24h PE, enquanto os animais que estão ingerindo a morina mantém os níveis de expressão mais baixos (Figura 17B).

#### 5.4 Avaliação da fecundidade de machos de *A. aegypti* alimentados com morina.

Os machos alimentados com morina por 96h apresentam menor conteúdo lipídico no corpo gorduroso. Assim, fomos observar se essa diminuição influenciava na fecundidade de fêmeas. Os resultados observados indicam um efeito negativo na fecundidade e fertilidade de machos de *A. aegypti* submetidos a uma alimentação com morina. Observou-se que, ao acasalar com machos alimentados com morina, as fêmeas depositam uma quantidade reduzida de ovos (Figura 18A). É possível verificar que a mediana da quantidade de ovos postos por fêmeas copuladas com machos alimentados com morina é duas vezes menor. Além disto, os ovos coletados e submetidos para eclosão apresentaram menor taxa de eclosão (Figura 18B).



**Figura 18 - Efeitos da alimentação com morina na fecundidade de machos.** Postura (A) e viabilidade (B) de ovos de fêmeas de *A. aegypti* copuladas com machos tratados com morina. Os machos e fêmeas foram mantidos virgens até 96 horas pós emergência e realocados para gaiolas onde foi disposto um macho para cada fêmea (1:1). As fêmeas foram alimentadas com sangue, individualizadas em copos de postura e os ovos foram separados 72h pós alimentação sanguínea. Para a análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico Kolmogorov-Smirnov. \* $p < 0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 A alimentação com morina impacta o metabolismo lipídico em machos e fêmeas de *A. aegypti* de forma diferencial.

O armazenamento de energia na forma de TAG é a principal forma de energia nos insetos (GONDIM et al., 2018; RATNAYAKE et al., 2023). O corpo gorduroso do *A. aegypti* acumula TAG durante períodos de abundância, como após a alimentação com seiva e sangue (GONDIM et al., 2018; RATNAYAKE et al., 2023). Estas reservas de TAG podem ser mobilizadas posteriormente para fornecer energia durante períodos de jejum ou alta demanda metabólica, como por exemplo nos processos reprodutivos. Compreender o papel dos triacilgliceróis e do metabolismo lipídico no corpo gorduroso dos mosquitos *A. aegypti* é importante para o desenvolvimento de estratégias para controlar as populações de mosquitos e combater doenças transmitidas por mosquitos. Inibir as vias do metabolismo lipídico pode potencialmente perturbar a reprodução dos mosquitos e reduzir a sua capacidade de transmitir doenças como dengue, Zika e febre amarela. Um possível inibidor a ser observado é a morina.

A morina é um polifenol pertencente à classe dos flavonóis e tem se mostrado um potente inibidor da FAS (LI; TIAN, 2004; TIAN, 2006), agindo competitivamente com o acetil-CoA na região de acil-transferência do domínio KS da FAS. Esse mecanismo impede a reação de condensação com o malonil-CoA, resultando na inibição da síntese bem-sucedida de ácidos graxos e, conseqüentemente, na formação de reservas lipídicas, as quais desempenham um papel crucial na manutenção da vida. Resultados ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa demonstraram os impactos que a morina exerce ao ser adicionada aos criadouros de larvas, influenciando negativamente no seu desenvolvimento e aumentando a mortalidade. A partir disto, no sentido de avaliar o potencial da morina na fisiologia de adultos de *A. aegypti*, optamos por realizar alimentação de fêmeas e machos com sacarose acrescida de morina 100µM e avaliar seus efeitos sobre o metabolismo de lipídios.

A análise do metabolismo lipídico, tanto pelo conteúdo de TAG quanto pela expressão de genes relacionados a síntese e mobilização, perpassa necessariamente o corpo gorduroso. Embora seja possível observar triacilglicerol em diferentes partes dos órgãos internos de *A. aegypti*, o corpo gorduroso é o principal tecido sintetizador e armazenador desta molécula (MARTINS; PIMENTA, 2008). As enzimas envolvidas na síntese e quebra dos TAGs são ativas neste tecido. Por exemplo, as lipases são responsáveis pela hidrólise dos TAGs em ácidos graxos e glicerol quando existe a necessidade de energia. Já a enzima ácido graxo sintase tem um importante papel na síntese *de novo* de ácido graxos e nos restabelecimentos de outros

lipídios complexos, em especial a formação de reservas de TAG. Desta forma, selecionamos o corpo gorduroso para uma análise mais minuciosa dos efeitos que a ingestão por morina poderia causar neste tecido central para o metabolismo lipídico do inseto. Além disto, para a avaliação do conteúdo lipídico no corpo gorduroso e níveis de expressão gênica relativa da *fasI* e da *tagII* de animais tratados, adicionamos um corante alimentício de coloração vermelha. Essa adição permite selecionar os animais que se alimentaram e, portanto, certificar a ingestão do flavonoide de interesse (Figura 8).

Nossos resultados mostram que a ingestão de morina pelo *A. aegypti* está influenciando na síntese e na mobilização de reservas de TAG. Isto foi observado tanto na análise do conteúdo do corpo inteiro, quanto no conteúdo de TAG do corpo gorduroso de machos (Figura 15). Em fêmeas, a observação do conteúdo de TAG do corpo gorduroso não apresentou diferenças significativas entre controle e tratamento nos tempos PE analisados, enquanto no corpo inteiro, foi possível observar uma mudança em 24 e 72h PE (Figura 11 e Figura 14).

Apesar das fêmeas apresentarem um conteúdo de TAG maior em todos os tempos analisados (Figura 13), não podemos desconsiderar essas reservas em machos. É possível observar que o TAG possui uma dinâmica própria nos períodos PE apresentando uma redução significativa em 72h PE que se reestabelece novamente em 96h PE (Figura 15B). Essa redução é mais pronunciada nos animais alimentados com morina no tempo de 72h PE e esses animais ficam impossibilitados de restabelecer essa reserva no tempo de 96h, diferente do observado nos animais que não foram alimentados com morina (Figura 15B e Figura 15C). Importante destacar que, nos machos, o TAG armazenado no corpo gorduroso pode ser usado para as atividades de uso intensivo de energia associadas ao acasalamento, como comportamentos de fuga e cortejo (CLIFTON; NORIEGA, 2011; TOSE et al., 2021).

Em fêmeas é possível observar que existe um aumento bastante expressivo da *fasI* em 72h PE o que não é acompanhado pelos animais alimentados com morina (Figura 16A). Em relação a *tagII*, as fêmeas do grupo controle apresentaram uma tendência de subexpressão durante todo o tempo PE, enquanto um aumento significativo é observado em 48h PE nos animais alimentados com morina (Figura 16B).

Em machos, a ingestão de morina provoca um pico de expressão da *fasI* em 48h PE que não ocorre no grupo controle. É possível observar também que em 96h PE ocorre um pico de expressão desta enzima que não é acompanhado pelos animais que estão ingerindo a morina

(Figura 17A). Em relação a *tagl1*, foi observado uma subexpressão nos tempos de 48 e 72 horas PE (Figura 17B), que se manteve no tempo de 96h PE.

Para entender as dinâmicas de síntese e mobilização de lipídeos em *A. aegypti* deve-se considerar os diversos fatores que envolvem a fisiologia do mosquito nos primeiros dias PE. Estas dinâmicas são comandadas principalmente por hormônios (LING; RAIKHEL, 2020; ROY et al., 2016). Nas fêmeas, as fases de alimentação desempenham um papel crucial no ciclo reprodutivo, com destaque para a participação dos JH e 20-E. Esses hormônios estão intimamente ligados às etapas nutricionais e são essenciais para o sucesso da reprodução. Por outro lado, nos machos, os hormônios exercem funções diferenciadas, com o hormônio juvenil desempenhando um papel particularmente importante. No caso dos machos, o JH desempenha uma função crucial no sucesso reprodutivo da espécie. Ele está diretamente envolvido na maturação dos órgãos sexuais e na estimulação da produção de secreções nas MAGs. O corpo gorduroso é um tecido central nestes processos de sinalização e mobilização das reservas lipídicas na forma de TAG.

As dinâmicas de síntese, quebra e mobilização de lipídeos ocorrem diferencialmente a depender do tecido, idade e estado nutricional do inseto (CLIFTON; NORIEGA, 2011; TOSE et al., 2021). Embora seja vantajoso para as fêmeas uma alimentação prévia rica em sacarose, estudos garantem que as reservas trazidas das fases imaturas são suficientes para completar o primeiro ciclo gonadotrófico. A manutenção destas reservas pode ser observada nos nossos dados durante os primeiros dias PE (Figura 14B e Figura 14C). Embora tenha ocorrido mobilização em 48h PE, os níveis de TAG se estabelecem em 96h PE. Esses dados estão em linha com as observações feitas por Dou et al. (2023), os quais demonstraram que durante o primeiro ciclo gonadotrófico, especificamente no período pré-vitelogênico, há uma mobilização mais acentuada do glicogênio em comparação com o TAG para a maturação sexual. Esse padrão indica que o glicogênio desempenha um papel mais significativo nessa fase em relação ao TAG, possivelmente fornecendo energia necessária para os processos metabólicos associados à maturação sexual.

Ainda em fêmeas, a tendência de aumento do conteúdo de TAG, de 48 a 72h, observada na figura 14B e 14C, bate com o observado nos níveis transcricionais de *fasI*, e a manutenção destas reservas em 96h pode estar associada aos níveis mais baixos de expressão de *tagl1* observados neste tempo de vida (Figura 16B). A manutenção de níveis transcricionais de *tagl1* mais altos em 48h PE em fêmeas alimentadas com morina (Figura 16B), pode explicar a queda

mais acentuada do conteúdo de TAG observada no conteúdo lipídico no corpo gorduroso neste mesmo período PE (figura 14C). Esses resultados, embora não corroborem com a hipótese de inibição da FAS em fêmeas pela morina, podem indicar a ação da morina em outros aspectos da fisiologia da fêmea que precisam ser investigados mais a fundo afim de entender a dinâmica das reservas de TAG observadas.

Visando compreender melhor a dinâmica das reservas de TAG observadas, é crucial ressaltar a influência ativa do JH nas fêmeas, especialmente nas 48 horas. Este período marca o auge da concentração deste hormônio no organismo feminino no período pré-vitelogênico (ROY et al., 2016; ZOU et al., 2013). Paralelamente, a partir das 48 horas, é desencadeada a transcrição de mais de 5 mil genes em até 72 horas (ZOU et al., 2013). Esses indícios evidenciam a importância desse intervalo no estado pré-vitelogênico das fêmeas. O pico de JH observado desempenha um papel central na maturação dos folículos ovarianos, preparando a fêmea para a ingestão de sangue e, conseqüentemente, a entrada no período vitelogênico. Portanto, os resultados aqui apresentados abrem possibilidades futuras de investigação sobre esse período, que demonstrou uma redução mais acentuada no conteúdo de TAG no corpo gorduroso em relação ao controle, embora ambas as alimentações tenham reestabelecido estas reservas em até 96 horas. Assim, os efeitos da alimentação com morina antes da primeira alimentação sanguínea não foram significativos, porém isso abre possibilidades para investigações futuras, especialmente sobre o possível impacto que sua ingestão pode ter no segundo ciclo gonadotrófico das fêmeas.

O silenciamento de *fasI*, a partir de RNA de interferência, teve seus efeitos mais expressivos durante o segundo ciclo gonadotrófico, impactando de forma direta a diminuição das reservas lipídicas e a viabilidade de ovos postos (ALABASTER et al., 2011). Além disto, DOU et al., (2023) demonstraram que as reservas de TAG são mais ativamente mobilizadas após a primeira alimentação sanguínea. Esses dados sugerem que as reservas energéticas na forma de TAG no corpo gorduroso são mais importantes para o segundo ciclo gonadotrófico. Desta forma, os efeitos da ingestão de morina podem ser mais significativos após o primeiro ciclo gonadotrófico.

Uma outra enzima de importância para o ciclo gonadotrófico em fêmeas de *A. aegypti* que podem sofrer inibição pela morina é a ecdisona 20-monoxigenase. Foi relatado que este flavonoide tem efeito inibitório sobre a 20-monoxigenase em *A. aegypti* de maneira dose-dependente (MITCHELL et al., 1993). A formação de 20-E é essencial para a mobilização das

reservas lipídicas e vitelogenina do corpo gorduroso aos ovários (LING; RAIKHEL, 2020; ROY et al., 2016; WANG et al., 2017). Dessa maneira, tanto a mobilização de TAG pela sinalização da 20-E, quanto a síntese *de novo*, podem ser impactadas pela ingestão de morina. Portanto, um estudo investigando os efeitos da ingestão de morina em fêmeas a partir da primeira alimentação sanguínea, seguido da observação desses efeitos após o primeiro ciclo gonadotrófico, torna-se essencial.

Enquanto a fêmea do mosquito tem a tendência de manter suas reservas das fases larvais estáveis até completar o primeiro ciclo gonadotrófico, os machos da espécie exibem uma dinâmica divergente. O macho do mosquito é estritamente fitófago, e se alimenta de refeições ricas em carboidratos, que são assimilados em sua grande parte em TAG no corpo gorduroso. Este hábito pode indicar a importância desta alimentação para o macho dessa espécie. Isso pode ser observado também na maior expressão de *fasI* em machos quando comparado com a fêmea (CHOTIWAN et al., 2022). Enquanto as reservas da fêmea serão utilizadas principalmente para a transferência aos ovos, em machos estas reservas precisam ser mobilizadas logo nos primeiros dias pós emergência, principalmente para a maturação sexual, o voo, a busca pela fêmea e a cópula. Um macho do mosquito pode copular com até 3 fêmeas, enquanto as fêmeas são monogâmicas (ALFONSO-PARRA et al., 2022). Estas observações podem demonstrar a importância desta alimentação e, por isto, o efeito da ingestão de morina somado a alimentação com sacarose foi observado.

Nos machos, foi observada uma queda sucessiva do conteúdo lipídico no corpo gorduroso daqueles que ingeriram morina, conforme evidenciado na Figura 15A. Essa redução nos níveis lipídicos do corpo gorduroso começa a ser notada a partir de 72h PE e se intensifica em 96h PE. Em comparação, os resultados da análise do conteúdo lipídico no corpo inteiro indicam uma diminuição acentuada já em 48 horas PE (Figura 12). É fundamental destacar que, para a análise do corpo inteiro, a alimentação com morina foi iniciada logo nas primeiras horas PE, enquanto para a análise do corpo gorduroso isolado, essa alimentação teve início somente após 24 horas PE. Esses dados sugerem que o flavonoide pode começar a exercer seus efeitos a partir de 48 horas após o início da alimentação. Somado a isto, é possível observar um aumento da expressão da *fasI* em machos alimentados por morina em 48h (Figura 17A). Isto poderia explicar uma resposta às primeiras 24h de tratamento, que pode ser observada tanto ao avaliar o corpo inteiro (Figura 12), cujo tratamento se iniciou logo nas primeiras 24h, quanto ao avaliar o corpo gorduroso, cujo tratamento começou depois de 24h PE (Figura 15A). Esta resposta, embora ainda como uma tendência, poderia explicar a reação imediata do



metabolismo do macho do mosquito, acionando mecanismos moleculares para suprir a inibição da FAS através da ocupação do seu sítio catalítico pela morina. Esta hipótese explicaria a diferença observada entre os resultados de TAG do corpo inteiro e do corpo gorduroso em 48h PE.

É necessário pontuar que os ensaios de inibição da FAS na presença com morina foram realizados utilizando uma abordagem de mecanismo de ação sobre a enzima (LI; TIAN, 2004; TIAN, 2006). Desta forma, para corroborar com nossas hipóteses e os dados observados na Figura 15, é de suma importância a avaliação desses efeitos sobre a FAS de forma direta, avaliando a assimilação de acetil-CoA em ácidos graxos, como visto por ALABASTER et al., (2011). Além disto, existe uma grande expressão da *fasI* no intestino de machos de *A. aegypti* (CHOTIWAN et al., 2022). Caso os efeitos inibitórios da morina afetem os níveis transcricionais de enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico, a ingestão pode estar afetando o tecido digestivo, mais especificamente o intestino médio, primariamente.

Os resultados da expressão de *taglI* em machos demonstrou uma tendência de subexpressão desta enzimas em machos alimentados com morina (Figura 17B). Este resultado pode sinalizar a modulação responsiva ao tratamento, mantendo as reservas de TAG advindas das fases imaturas. É importante destacar que em 72h PE em machos é possível observar a mobilização das reservas de TAG tanto no tratamento, quando no grupo controle (Figura 15B e Figura 15C). Não foi possível obter picos de expressão desta enzima, o que sugere que essa lipase pode não ser modulada pelo JH durante os primeiros dias após a emergência em machos para a maturação das MAGs como observado por ZOU et al., 2013. Algumas lipases já foram identificadas em *Aedes aegypti*, como a brummer, que demonstrou ser responsiva ao jejum e ao hormônio adipocinético em fêmeas do mosquito, e a lipase sensível ao hormônio, que foi demonstrada ser regulada pela 20-E, também em fêmeas (DOS SANTOS et al., 2024; DOU et al., 2023).

Assim, a manutenção de níveis mais altos de *taglI* era esperado em machos em 72h PE. Sendo uma lipase, esse período de vida dos machos dessa espécie tem sido descrito como um momento de mobilização de reservas lipídicas para a maturação sexual, além dos eventos relacionados à busca por fêmeas e cópula (LEAGUE et al., 2021; LYU et al., 2023). Além disso, a redução nas reservas também foi observada em nossos resultados de avaliação do conteúdo de TAG no corpo gorduroso às 72h PE, tanto no tratamento quanto no controle (Figura 15B e Figura 15C). Esses resultados acendem uma possibilidade de estudo sobre as diferentes

lipases supracitadas e seu papel regulador dos primeiros dias pós emergência de machos pré-cópula.

A mobilização de TAG que ocorre em 72h em machos já foi documentada por LYU et al., (2023). Esse estudo destaca que as reservas de TAG do corpo gorduroso de machos diminuem quando há inibição do receptor do JH. Além disto, em 72h também ocorre a maturação das MAGs, que são responsáveis pelo armazenamento e síntese de compostos. Estes resultados indicam que o JH é diretamente responsável pela mobilização destas reservas. É interessante observar que no grupo controle (FIGURA 15B), além destas reservas serem mobilizadas, em até 96h através da alimentação açucarada o macho do mosquito consegue reestabelecer aos níveis observados anteriormente, o que não ocorre quando a morina é adicionada na refeição. Além disto, ao comparar os diferentes tempos de tratamento, é possível observar um aumento na expressão de *fasI* em 96h PE no grupo controle, que corroboram com a hipótese de reestabelecimento de estoques nesse período de vida, enquanto os mosquitos que ingeriram a morina mantêm os níveis de expressão da *fasI* mais baixos (Figura 17A).

Além disto, a inibição do receptor de hormônio juvenil demonstrada por LYU et al., (2023), juntamente com estudos que relacionam o estado nutricional dos machos, a qualidade/quantidade dos compostos armazenados nas glândulas acessórias do macho e os níveis de hormônio juvenil circulantes (BOROVSKY et al., 1994; CLIFTON et al., 2014; NOUZOVA et al., 2019), acendem uma possibilidade futura sobre o perfil hormonal que os machos que se alimentaram com morina podem apresentar. Este estudo pode elucidar de que forma a alimentação com este flavonoide pode interferir em processos básicos do ciclo de vida deste culicídeo.

A queda brusca observada nos machos tratados, que não conseguem retornar as quantidades anteriores de TAG, pode estar provocando mudanças fisiológicas no organismo como um todo, visto que as reservas de TAG acumuladas pelos machos do mosquito ao longo de sua vida, tanto durante o estágio de larva quanto por meio da ingestão de açúcares, desempenham um papel crucial na qualidade de vida do inseto. Apesar do tamanho menor dos machos de *A. aegypti*, a quantidade total de lipídeos é proporcionalmente 2-4 vezes maior que a observada nas fêmeas (BRIEGEL; HEFTI; DIMARCO, 2002). Essas reservas energéticas na forma de lipídeos são fundamentais para os principais comportamentos reprodutivos do macho pós emergência, incluindo voo, a busca por uma fêmea e a cópula (NOUZOVA et al., 2019).

Considerando que a realização desses eventos reprodutivos demanda considerável energia, a quantidade de TAG produzida ao longo da vida pode ser determinante para o sucesso reprodutivo do indivíduo. Desta forma, os resultados obtidos a partir da ingestão de morina em machos, especialmente em 96h PE, incentivaram a observação do efeito das menores reservas lipídicas obtidas sobre a fecundidade de machos.

## **6.2 A alimentação com morina impacta na fecundidade e fertilidade de machos de *A. aegypti*.**

Os machos alimentados com morina, especialmente por 96h, demonstraram menor conteúdo lipídico no corpo gorduroso. Desta forma, este tratamento foi utilizado a fim de avaliar os efeitos que esses machos podem ter na fisiologia reprodutiva das fêmeas através do acasalamento. Observou-se que, ao acasalar com machos alimentados com morina, as fêmeas depositam uma quantidade reduzida de ovos (Figura 18A), os quais apresentam uma taxa de eclosão menor (Figura 18B). Esses achados corroboram com estudos recentes que destacam o potencial dos machos na influência sobre a fecundidade das fêmeas.

A importância da cópula para o *fitness* reprodutivo de *A. aegypti* é bem documentada (CLIFTON et al., 2014; CONWAY; HASLITT; SWARTS, 2023; LYU et al., 2023; TARACENA et al., 2023; YEH; KLOWDENT, 1990). Não só pela fecundação de gametas que viabilizam a reprodução, mas pelas mudanças comportamentais e fisiológicas provocadas nas fêmeas que recebem dos machos o sêmen, mas também compostos secretados pelas MAGs e o próprio JH. Neste contexto, o estado nutricional dos machos, em particular, emerge como um ponto crucial chave para o sucesso reprodutivo, uma vez que existe uma interconexão entre o estado nutricional, as secreções e compostos armazenados nas MAGs e a quantidade de JH produzida e transferida às fêmeas durante a cópula (NOUZOVA et al., 2019). Somado a isto, estudos recentes sugerem que a limitação de TAG em machos provoca uma diminuição das MAGs (CONWAY; HASLITT; SWARTS, 2023).

Ademais, as MAGs modulam ativamente o comportamento das fêmeas pós-cópula, estimulando-as a procurar locais apropriados para ovoposição (YEH; KLOWDENT, 1990). Foi documentado também que a cópula, por meio da ação desses compostos, diminui a frequência de voo e a procura por hospedeiros em fêmeas (LEAGUE et al., 2021). Esses eventos podem representar uma economia de energia por parte das fêmeas, poupando recursos energéticos e otimizando os processos de reprodução da espécie.

O impacto que o macho exerce sobre a fecundidade de fêmeas através da cópula de diferentes espécies de culicídeos tem sido avaliado nos últimos anos. Em *Aedes albopictus*, foi observado que o tamanho dos machos interfere na produção de esperma e fêmeas copuladas com machos maiores tendem a colocar mais ovos (DE JESUS; REISKIND, 2016). Em *Anopheles gambiae* foi relatado que o macho transfere para as fêmeas durante a cópula o hormônio 20-E (PONDEVILLE et al., 2008), recebendo este importante hormônio previamente à síntese pós alimentação sanguínea. Ademais, a transferência de compostos através da cópula pode induzir a mudança de comportamento das fêmeas, que já vêm sendo denominadas mudança pós pareamento pelos estudos (ALFONSO-PARRA et al., 2022; GILLOTT, 2003).

É plausível que machos submetidos a uma dieta de morina durante 96 horas possam não ser capazes de restabelecer as reservas energéticas consumidas durante o processo de maturação sexual e os eventos associados à busca pela cópula, ocorridos dentro de um período de 72 horas. Nesse contexto, é provável que ocorra uma deficiência tanto no conteúdo quanto na qualidade dos compostos transferidos às fêmeas. Somado a isto, a motilidade de espermatozoides requer a utilização de carboidratos e lipídeos (WERNER; SIMMONS, 2008), o que poderia estar prejudicado em machos com conteúdo menor de TAG. O déficit na transferência de recursos para as fêmeas, e sua subsequente utilização, poderiam comprometer seu comportamento e fisiologia pré-alimentação sanguínea, impactando, assim, na alocação de recursos nos ovários. Para corroborar essa hipótese, uma avaliação anatômica e de conteúdo das MAGs de machos tratados com morina se faz necessária.

Embora a maioria dos compostos transferidos pelos machos às fêmeas ainda não estejam completamente elucidados na literatura científica, foi observado que os machos de *A. aegypti* transferem o JH as fêmeas durante o acasalamento (CLIFTON et al., 2014). Essa transferência tem o potencial de influenciar o estado pré-vitelogênico das fêmeas, uma vez que o JH desempenha um papel crucial no desenvolvimento e na maturação sexual. É importante destacar que a quantidade de JH sintetizada, armazenada e, consequentemente, transferida durante o acasalamento, está relacionada à nutrição dos machos (GILLOTT, 2003).

A transferência de JH durante a cópula induz mudanças fisiológicas não apenas nos tecidos reprodutivos, mas também no intestino. Foi observado que fêmeas copuladas apresentam um aumento no diâmetro do intestino médio, tanto em resposta à cópula quanto à administração prévia de JH (TARACENA et al., 2023). Essa adaptação no tamanho do intestino pode otimizar a ingestão e absorção de nutrientes durante a alimentação sanguínea. Esses

resultados evidenciam o papel crucial do JH transferido durante a cópula, uma vez que uma maior ingestão de sangue está associada a uma maior produção de ovos (TARACENA et al., 2023).

A transferência de JH não está restrita apenas a espécies de culicídeos, como demonstrado em estudos anteriores em espécies de coleópteros (*Apriona germari*) e lepidópteros (*Heliothis virescens*) (PARK et al., 1998; TIAN et al., 2010). Estas descobertas sugerem que esta característica pode ser conservada em insetos, destacando sua relevância evolutiva e funcional. Esses achados enfatizam a importância de estudos que considerem o acasalamento como um evento regulador da fisiologia de fêmeas, incluindo seu comportamento, metabolismo hormonal e energético e, conseqüentemente, sua fecundidade. Essa compreensão mais aprofundada dos efeitos do acasalamento na fisiologia de fêmeas de insetos pode fornecer *insights* valiosos para estratégias inovadoras de controle.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados observados no corpo gorduroso de fêmeas alimentadas com morina apresentaram um efeito divergente do esperado, especialmente em comparação com os experimentos que envolviam o corpo inteiro de *A. aegypti*. No entanto, esses resultados fornecem *insights* sobre os mecanismos biológicos cuja aplicação de morina na dieta pode impactar em fêmeas, principalmente devido ao amplo espectro de aplicabilidade biológica desta molécula já reportado na literatura. Vale ressaltar a necessidade de investigar os efeitos da ingestão prévia de morina em fêmeas alimentadas com sangue, dada sua conhecida capacidade inibitória sobre a formação da 20-hidroxiecdisona, um hormônio crucial para a fisiologia reprodutiva do inseto.

Os resultados obtidos quanto ao conteúdo lipídico em machos alimentados com morina, tanto no corpo inteiro quanto no corpo gorduroso, apontam para uma possível melhoria na eficácia da ingestão deste composto na síntese de triacilglicerol, possivelmente mediada pela disponibilidade de açúcar. Adicionalmente, as análises de expressão sugerem uma perturbação nos transcritos associados à síntese e mobilização de TAG em machos alimentados com morina. A investigação de outros genes envolvidos no metabolismo lipídico desses machos pode contribuir para uma compreensão mais aprofundada do fenótipo observado no corpo gorduroso, conferindo maior robustez às hipóteses aqui propostas.

O estado nutricional reduzido dos machos alimentados com morina parece ter influenciado negativamente na fertilidade das fêmeas com as quais estes copularam. Esses achados se alinham com estudos recentes que enfatizam a importância do evento de cópula para a aptidão reprodutiva de *A. aegypti*. Os resultados obtidos abrem novas perspectivas sobre os diversos mecanismos fisiológicos em que a morina pode exercer sua influência. A avaliação do JH e das MAGs em machos alimentados com este flavonoide emerge como uma abordagem promissora para compreender os efeitos dessa alimentação e os mecanismos envolvidos nos resultados obtidos após a cópula.

Os resultados deste estudo destacam a morina como uma poderosa ferramenta no controle de insetos, especialmente em vetores de doenças de importância para a saúde pública. Ao enfatizar a busca por moléculas que não comprometam a saúde humana nem o meio ambiente, este estudo se destaca na pesquisa por alternativas seguras e eficazes para o controle de insetos. Além disso, reforça a necessidade de mais atenção aos machos do *A. aegypti*, muitas vezes negligenciado devido à sua não-competência vetorial.

Ao adotar uma abordagem integrada no manejo de pragas, este estudo contribui para a busca de ferramentas de controle mais sustentáveis e menos propensa ao desenvolvimento de resistência por parte dos insetos. Ao posicionar o macho dessa espécie como um alvo importante para estratégias de controle, ele se alinha com pesquisas anteriores que destacam a importância de abordagens abrangentes para combater o *A. aegypti*. Essa abordagem não se limita apenas à consideração de um aspecto isolado, como a erradicação de larvas ou o uso de inseticidas, mas sim a uma compreensão ampla e integrada de todos os fatores envolvidos, incluindo a biologia, comportamento e ecologia do mosquito. Assim, este estudo busca por soluções que considerem todas as complexidades para um controle eficaz e sustentável do vetor e das doenças por ele transmitidas.

## 8. CONCLUSÃO

- Os efeitos negativos da ingestão de morina foram mais significativos em machos do que em fêmeas;
- Machos alimentados com morina apresentam menor conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso e exibem maior dificuldade de reestabelecer estoques energéticos;
- Fêmeas copuladas com machos que ingeriram morina colocam menor ovos e esses ovos por sua vez exibem menor taxa de eclosão;
- A morina se demonstrou uma molécula promissora para o estudo em *A. aegypti*.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALABASTER, Amy; ISOE, Jun; ZHOU, Guoli; LEE, Ada; MURPHY, Ashleigh; DAY, W. Anthony; MIESFELD, Roger L. Deficiencies in acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase 1 differentially affect eggshell formation and blood meal digestion in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 41, n. 12, p. 946–955, 2011. DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.09.004.
- ALFONSO-PARRA, Catalina; OSORIO, Jessica; AGUDELO, Juliana; DIAZ, Sebastian; RAMIREZ-SANCHEZ, Luis Felipe; AVILA, Frank W. More than sperm and egg: Male, female and environmental factors that influence reproduction of *Aedes* and *Anopheles* mosquitoes. **Revista Colombiana de Entomologia**, [S. l.], v. 48, n. 2, 2022. DOI: 10.25100/socolen.v48i2.11405.
- ANTELO, Luis; SCHLIPP, Angela; HOF, Carolin; EISFELD, Katrin; BERG, Holger; HORNBOGEN, Till; ZOCHER, Rainer; ANKE, Heidrun. The fatty acid synthase of the basidiomycete *Omphalotus olearius* is a single polypeptide. **Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, [S. l.], v. 64, n. 3–4, p. 244–250, 2009. DOI: 10.1515/znc-2009-3-416.
- ARRESE, Estela L.; SOULAGES, Jose L. **Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation**. **Annual Review of Entomology**, 2010. DOI: 10.1146/annurev-ento-112408-085356.
- ATTARDO, Geoffrey M.; HANSEN, Immo A.; SHIAO, Shin Hong; RAIKHEL, Alexander S. Identification of two cationic amino acid transporters required for nutritional signaling during mosquito reproduction. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 209, n. 16, p. 3071–3078, 2006. DOI: 10.1242/jeb.02349.
- AURADE, Ravindra M.; AKBAR, S. M. D.; GOUD, Hanumanth; JAYALAKSHMI, Senigala K.; SREERAMULU, Kuruba. Inhibition of P-glycoprotein ATPase and its transport function of *Helicoverpa armigera* by morin, quercetin and phloroglucinol. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 101, n. 3, p. 212–219, 2011. DOI: 10.1016/j.pestbp.2011.09.008.
- BOROVSKY, Dov; CARLSON, D. A.; HANCOCK, R. G.; REMBOLD, H.; VAN HANDEL, E. De novo biosynthesis of juvenile hormone III and I by the accessory glands of the male mosquito. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 437–444, 1994. b. DOI: 10.1016/0965-1748(94)90038-8.
- BRIEGEL, H.; HEFTI, M.; DIMARCO, E. Lipid metabolism during sequential gonotrophic cycles in large and small female *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 48, n. 5, p. 547–554, 2002. a. DOI: 10.1016/S0022-1910(02)00072-0.
- CHOTIWAN, Nunya; BRITO-SIERRA, Carlos A.; RAMIREZ, Gabriella; LIAN, Elena; GRABOWSKI, Jeffrey M.; GRAHAM, Babara; HILL, Catherine A.; PERERA, Rushika. Expression of fatty acid synthase genes and their role in development and arboviral infection of *Aedes aegypti*. **Parasites and Vectors**, [S. l.], v. 15, n. 1, 2022. DOI: 10.1186/s13071-022-05336-1.

CHUNG, Seyung S.; OLIVA, Bryant; DWABE, Sami; VADGAMA, Jaydutt V. Combination treatment with flavonoid morin and telomerase inhibitor MST312 reduces cancer stem cell traits by targeting STAT3 and telomerase. **International Journal of Oncology**, [S. l.], v. 49, n. 2, p. 487–498, 2016. DOI: 10.3892/ijo.2016.3546.

CLIFTON, Mark E.; CORREA, Stefano; RIVERA-PEREZ, Crisalejandra; NOUZOVA, Marcela; NORIEGA, Fernando G. Male *Aedes aegypti* mosquitoes use JH III transferred during copulation to influence previtellogenic ovary physiology and affect the reproductive output of female mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 40–47, 2014. b. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2014.03.006.

CLIFTON, Mark E.; NORIEGA, Fernando G. Nutrient limitation results in juvenile hormone-mediated resorption of previtellogenic ovarian follicles in mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 57, n. 9, p. 1274–1281, 2011. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.06.002.

COFFEL, Ethan D.; HORTON, Radley M.; DE SHERBININ, Alex. **Temperature and humidity based projections of a rapid rise in global heat stress exposure during the 21st century**. **Environmental Research Letters**Institute of Physics Publishing, , 2018. DOI: 10.1088/1748-9326/aaa00e.

CONWAY, Michael J.; HASLITT, Douglas P.; SWARTS, Benjamin M. **Targeting Aedes aegypti Metabolism with Next-Generation Insecticides**. **Viruses**MDPI, , 2023. DOI: 10.3390/v15020469.

DE JESUS, Carrie E.; REISKIND, Michael H. The importance of male body size on sperm uptake and usage, and female fecundity in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Parasites and Vectors**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2016. DOI: 10.1186/s13071-016-1734-8.

DOHANIK, Virgínia Teles. **O Transporte de Vitelogenina é mediado por receptores de membranas nas células foliculares da abelha *Apis mellifera* e da vespa *Polistes simillimus***. 2016. Universidade Federal de Viçosa, MG, [S. l.], 2016.

DOS SANTOS, Luan Valim; SILVA, Elaine Rodrigues Miranda Nery Da; CAIADO, Matheus Silva; REZENDE, Sabrina Rita da Fonseca; DE CARVALHO, Mario Geraldo; PONTES, Emerson Guedes. Differential expression of brummer and levels of TAG in different developmental stages *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), including fasted adults. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 115, n. 1, 2024. DOI: 10.1002/arch.22084.

DOU, Xiaoyi; CHEN, Kangkang; BROWN, Mark R.; STRAND, Michael R. Multiple endocrine factors regulate nutrient mobilization and storage in *Aedes aegypti* during a gonadotrophic cycle. **Insect Science**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 425–442, 2023. DOI: 10.1111/1744-7917.13110.

DZAKI, Najat; RAMLI, Karima N.; AZLAN, Azali; ISHAK, Intan H.; AZZAM, Ghows. Evaluation of reference genes at different developmental stages for quantitative real-time PCR in *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, 2017. DOI: 10.1038/srep43618.

EPELBOIN, Yanouk; TALAGA, Stanislas; EPELBOIN, Loïc; DUSFOUR, Isabelle. Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 1–22, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005933.

FALLON, Ann Marie; HAGEDORN, H. H.; WYATT, G. R.; LAUFER, Hans. Activation of vitellogenin synthesis in the mosquito *Aedes aegypti* by ecdysone. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 1815–1823, 1974. DOI: 10.1016/0022-1910(74)90211-X.

GHOSH, Pooja; PATWARI, Jayita; DASGUPTA, Swagata. Complexation with Human Serum Albumin Facilitates Sustained Release of Morin from Polylactic-Co-Glycolic Acid Nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, [S. l.], v. 121, n. 8, p. 1758–1770, 2017. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b08559.

GILLOTT, Cedric. Male Accessory Gland Secretions: Modulators of Female Reproductive Physiology and Behavior. **Annual Review of Entomology**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 163–184, 2003. a. DOI: 10.1146/annurev.ento.48.091801.112657.

GONDIM, Katia C.; ATELLA, Georgia C.; PONTES, Emerson G.; MAJEROWICZ, David. Lipid metabolism in insect disease vectors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 101, n. July, p. 108–123, 2018. a. DOI: 10.1016/j.ibmb.2018.08.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.08.005>.

IWAMURA, Takuya; GUZMAN-HOLST, Adriana; MURRAY, Kris A. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, 2020. b. DOI: 10.1038/s41467-020-16010-4.

KOTSAKIOZI, Panayiota; GLORIA-SORIA, Andrea; SCHAFFNER, Francis; ROBERT, Vincent; POWELL, Jeffrey R. *Aedes aegypti* in the Black Sea: Recent introduction or ancient remnant? **Parasites and Vectors**, [S. l.], v. 11, n. 1, 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2933-2.

KRAEMER, Moritz UG et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife**, [S. l.], p. 1–18, 2015. DOI: 10.7554/eLife.08347.001.

LEAGUE, Garrett P. et al. The impact of mating and sugar feeding on blood-feeding physiology and behavior in the arbovirus vector mosquito *aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 15, n. 9, 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009815.

LETA, Samson; BEYENE, Tariku Jibat; DE CLERCQ, Eva M.; AMENU, Kebede; KRAEMER, Moritz U. G.; REVIE, Crawford W. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 67, p. 25–35, 2018. a. DOI: 10.1016/j.ijid.2017.11.026.

LI, Bing Hui; TIAN, Wei Xi. Inhibitory Effects of Flavonoids on Animal Fatty Acid Synthase. **Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 135, n. 1, p. 85–91, 2004. a. DOI: 10.1093/jb/mvh010.

LING, Lin; RAIKHEL, Alexander S. Cross-talk of insulin-like peptides, juvenile hormone, and 20-hydroxyecdysone in regulation of metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. **PNAS**, [S. l.], p. 1–7, 2020. DOI: 10.1073/pnas.2023470118/-DCSupplemental. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2023470118>.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

- LYU, Xiang Yang; WANG, Xue Li; GENG, Dan Qian; JIANG, Hong; ZOU, Zhen. Juvenile hormone acts on male accessory gland function via regulating l-asparaginase expression and triacylglycerol mobilization in *Aedes aegypti*. **Insect Science**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 81–94, 2023. DOI: 10.1111/1744-7917.13084.
- MAIER, Timm; JENNI, Simon; BAN, Nenad. Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. **Science**, [S. l.], v. 311, n. 5765, p. 1258–1262, 2006. DOI: 10.1126/science.1123248.
- MAIER, Timm; LEIBUNDGUT, Marc; BAN, Nenad. The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. **Science**, [S. l.], v. 321, n. 5894, p. 1315–1322, 2008. DOI: 10.1126/science.1161269.
- MARTINS, G. F.; PIMENTA, P. F. P. Structural changes in fat body of *Aedes aegypti* caused by aging and blood feeding. **Journal of Medical Entomology**, [S. l.], v. 45, n. 6, p. 1102–1107, 2008. DOI: 10.1603/0022-2585(2008)45[1102:SCIFBO]2.0.CO;2.
- MATTHEWS, Benjamin J.; MCBRIDE, Carolyn S.; DEGENNARO, Matthew; DESPO, Orion; VOSSHALL, Leslie B. The neurotranscriptome of the *Aedes aegypti* mosquito. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–20, 2016. DOI: 10.1186/s12864-015-2239-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-2239-0>.
- MITCHELL, Martin J.; BRESCIA, Aaron I.; SMITH, Stan L.; MORGAN, E. David. Effects of the compounds 2-methoxynaphthoquinone, 2-propoxynaphthoquinone, and 2-isopropoxynaphthoquinone on ecdysone 20-monooxygenase activity. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 45–52, 2007. DOI: 10.1002/arch.20196.
- MITCHELL, Martin J.; KEOGH, Daniel P.; CROOKS, John R.; SMITH, Stan L. Effects of plant flavonoids and other allelochemicals on insect cytochrome P-450 dependent steroid hydroxylase activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 65–71, 1993. a. DOI: 10.1016/0965-1748(93)90083-5.
- NATAL, Delsio. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico, São Paulo**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 205–207, 2002.
- NELSON, Michael J. *Aedes aegypti*: Biology and Ecology. Em: PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION 1986, Washington D.C. **Anais [...]**. Washington D.C.: Pan American Health Organization, 1986.
- NOUZOVA, Marcela; MICHALKOVA, Veronika; RAMIREZ, Cesar E.; FERNANDEZ-LIMA, Francisco; FERNANDO, G.; SOBRE, De Investigaciones; INFECCIOSAS, Enfermedades; PAZ, La. JH biosynthesis and hemolymph titers in adult male *Aedes aegypti* mosquitoes. **Insect Biochem Mol Biol.**, [S. l.], p. 10–16, 2019. DOI: 10.1016/j.ibmb.2018.02.005.JH.
- PARK, Yong Ihl; SHU, Shengqiang; RAMASWAMY, Sonny B.; SRINIVASAN, Asoka. **Mating in *Heliothis virescens*: Transfer of Juvenile Hormone During Copulation by Male to Female and Stimulation of Biosynthesis of Endogenous Juvenile Hormone** *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. [s.l: s.n.].

- PONDEVILLE, Emilie; MARIA, Annick; JACQUES, Jean Claude; BOURGOUIN, Catherine; DAUPHIN-VILLEMANT, Chantal. Anopheles gambiae males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-hydroxyecdysone to females during mating. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 105, n. 50, p. 19631–19636, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0809264105.
- POWELL, Jeffrey R.; GLORIA-SORIA, Andrea; KOTSAKIOZI, Panayiota. Recent History of Aedes aegypti : Vector Genomics and Epidemiology Records . **BioScience**, [S. l.], v. 68, n. 11, p. 854–860, 2018. a. DOI: 10.1093/biosci/biy119.
- POWELL, Jeffrey R.; TABACHNICK, Walter J. History of domestication and spread of Aedes aegypti--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 108, p. 11–17, 2013. DOI: 10.1590/0074-0276130395.
- RAJPUT, Shahid Ali; WANG, Xiu qi; YAN, Hui Chao. **Morin hydrate: A comprehensive review on novel natural dietary bioactive compound with versatile biological and pharmacological potential. Biomedicine and Pharmacotherapy**Elsevier Masson s.r.l., , 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111511.
- RATNAYAKE, Oshani C.; CHOTIWAN, Nunya; SAAVEDRA-RODRIGUEZ, Karla; PERERA, Rushika. **The buzz in the field: the interaction between viruses, mosquitoes, and metabolism. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**Frontiers Media S.A., , 2023. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1128577.
- ROY, S.; SMYKAL, V.; JOHNSON, L.; SAHA, T. T.; ZOU, Z.; RAIKHEL, A. S. Regulation of Reproductive Processes in Female Mosquitoes. *Em: Advances in Insect Physiology*. [s.l.] : Academic Press Inc., 2016. a. v. 51p. 115–144. DOI: 10.1016/bs.aiip.2016.05.004.
- RUIZ, José Ignacio; OCHOA, Begoña. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. **Journal of Lipid Research**, [S. l.], v. 38, n. 7, p. 1482–1489, 1997.
- SADEKUZZAMAN, Md; STANLEY, David; KIM, Yonggyun. Nitric Oxide Mediates Insect Cellular Immunity via Phospholipase A2 Activation. **Journal of Innate Immunity**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 70–81, 2018. DOI: 10.1159/000481524.
- SILVA, Heloisa Helena Garcia Da; SILVA, Ionizete Garcia Da. 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**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 349–355, 1999. DOI: 10.1590/s0037-86821999000400003.
- SILVA, Elaine R. M. N.; SANTOS, Luan V; CAIADO, Matheus S.; HASTENREITER, Luana S. N.; FONSECA, Sabrina R. R.; CARBAJAL, Ana L.; FUENTE, De; CARVALHO, Mario G.; PONTES, Emerson G. The influence of larval density on triacylglycerol content in Aedes aegypti ( Linnaeus ) ( Diptera : Culicidae ). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], n. September, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1002/arch.21757.
- TARACENA, Mabel; WALTER-NUNO, Ana; BOTTINO-ROJAS, Vanessa; DOTSON, Ellen; OLIVEIRA, Pedro; PAIVA-SILVA, Gabriela. Aedes aegypti midgut microbiota establishment in adult females is regulated by Juvenile Hormone to enhance fecundity and

fitness. **Nature Portfolio**, [S. l.], 2023. DOI: 10.21203/rs.3.rs-3115486/v1. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3115486/v1>.

TIAN, Ling; JI, Bao zhong; LIU, Shu wen; JIN, Feng; GAO, Jie; LI, Sheng. Juvenile hormone III produced in male accessory glands of the longhorned beetle, *Apriona Germari*, is transferred to female ovaries during copulation. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 75, n. 1, p. 57–67, 2010. DOI: 10.1002/arch.20385.

TIAN, Wei-xi. Inhibition of Fatty Acid Synthase by Polyphenols. **Current Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. 967–977, 2006. a. DOI: 10.2174/092986706776361012.

TOPRAK, Umut; HEGEDUS, Dwayne; DOĞAN, Cansu; GÜNEY, Gözde. A journey into the world of insect lipid metabolism. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], n. April, p. e21682, 2020. DOI: 10.1002/arch.21682.

TOSE, Lilian Valadares; WEISBROD, Chad R.; MICHALKOVA, Veronika; NOUZOVA, Marcela; NORIEGA, Fernando G.; FERNANDEZ-LIMA, Francisco. Following de novo triglyceride dynamics in ovaries of *Aedes aegypti* during the previtellogenic stage. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-89025-6.

VANDOCK, Kurt P.; MITCHELL, Martin J.; FIORAVANTI, Carmen F. Effects of plant flavonoids on *manduca sexta* (tobacco hornworm) fifth larval instar midgut and fat body mitochondrial transhydrogenase. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 15–25, 2012. DOI: 10.1002/arch.21022.

WANG, Dan Dan; LI, Pai; CHEN, Qiu Yi; CHEN, Xue Ying; YAN, Zi Wei; WANG, Mu Yang; MAO, Ying Bo. Differential Contributions of MYCs to Insect Defense Reveals Flavonoids Alleviating Growth Inhibition Caused by Wounding in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fpls.2021.700555.

WANG, Xueli; HOU, Yuan; SAHA, Tusar T.; PEI, Gaofeng; RAIKHEL, Alexander S.; ZOU, Zhen. Hormone and receptor interplay in the regulation of mosquito lipid metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 114, n. 13, p. E2709–E2718, 2017. DOI: 10.1073/pnas.1619326114.

WERNER, Michael; SIMMONS, Leigh W. **Insect sperm motility**. **Biological Reviews**, 2008. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2008.00039.x.

YANG, Fengbo et al. Flavonoid production in tomato mediates both direct and indirect plant defences against whiteflies in tritrophic interactions. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 79, n. 11, p. 4644–4654, 2023. DOI: 10.1002/ps.7667.

YEH, Chinchang; KLOWDENT, Marc J. Effects of Male Accessory Gland Substances on the Pre-Oviposition Behaviour of *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 36, n. 11, p. 799–803, 1990.

ZHANG, Qi; ZHANG, Fang; THAKUR, Kiran; WANG, Jun; WANG, Hao; HU, Fei; ZHANG, Jian Guo; WEI, Zhao Jun. Molecular mechanism of anti-cancerous potential of Morin extracted from mulberry in Hela cells. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 112, p. 466–475, 2018. DOI: 10.1016/j.fct.2017.07.002.

ZHANG, Yongxing et al. CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of GmUGT Enhanced Soybean Resistance Against Leaf-Chewing Insects Through Flavonoids Biosynthesis. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 13, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.802716.

ZIEGLER, Rolf. Lipid synthesis by ovaries and fat body of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Europe Journal of Entomology**, [S. l.], v. 94, n. 3, p. 385–391, 1997.

ZIEGLER, Rolf; IBRAHIM, Mohab M. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 47, n. 6, p. 623–627, 2001. a. DOI: 10.1016/S0022-1910(00)00158-X.

ZOU, Zhen; SAHA, Tusar T.; ROY, Sourav; SHIN, Sang Woon; BACKMAN, Tyler W. H.; GIRKE, Thomas; WHITE, Kevin P.; RAIKHEL, Alexander S. Juvenile hormone and its receptor, methoprene-tolerant, control the dynamics of mosquito gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 110, n. 24, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1305293110.