

CAPÍTULO 20

Mecanismos de Sinalização Celular como Alvo para o Bloqueio da Transmissão de Doenças por Mosquitos: No Caminho do Fosfato.

Willy Jablonka, Rodrigo Dutra Nunes, Débora Monteiro Moretti, Cecília Cudishevitch e Mário Alberto C. Silva-Neto.

¹Laboratório de Sinalização Celular – LabSiCel - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro - CCS - Bloco D, Subsolo, Sala 05, Cidade Universitária – Ilha do Fundão, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ.

Copyright: © 2012 [Willy Jablonka, Rodrigo Dutra Nunes, Débora Monteiro Moretti, Cecília Cudishevitch, Mário Alberto C. Silva-Neto] This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações Iniciais.

2

A complexidade do ciclo de vida dos mosquitos, junto ao enorme impacto das doenças transmitidas por esses organismos, torna obrigatório o estudo de novos métodos para controle desses vetores. Os estudos de sinalização celular, especialmente aqueles que se concentram em fosforilação reversível de proteínas, podem ser a fonte de novas ferramentas moleculares para o controle dos mosquitos. A fosforilação reversível é o mais poderoso mecanismo de sinalização intracelular responsável pela modificação da atividade biológica da maioria das proteínas no interior das células (Cohen, 2000). Dessa forma, ao se mapear os circuitos de fosforilação-desfosforilação de proteínas pode-se identificar aqueles que desempenham papel mais central e importante na biologia de vetores de doenças humanas.. Em geral, o controle das das populações de vetores têm se baseado no uso de varias ferramentas incluindo inseticidas. No entanto, observa-se aumento da resistência dos mosquitos e também de danos causados, pela exposição tóxica, aos ecossistemas e seres humanos (Hemingway e Ranson, 2000). Para substituir os inseticidas, futuros repelentes, tratamentos e intervenções estão sendo pesquisados. Acreditamos que o "caminho" do fosfato represente uma nova fonte de dados científicos para promover o controle de vetores. As perspectivas dessa estratégia para o controle, em especial do mosquito *Aedes aegypti*, vetor da Dengue, serão apresentadas e discutidas no presente capítulo.

Sinalização Celular Mediada pelos Circuitos de Fosforilação de Proteínas.

O estudo da sinalização celular tem sua origem nos trabalhos sobre os mecanismos da ação hormonal. O nome hormônio, do grego “hormao” (que “estimula”, “excita”) foi introduzido em 1905 por Ernest Henry Starling, um importante pesquisador do campo da fisiologia, a partir de experimentos sobre o estímulo da secreção do suco pancreático pelo duodeno (Starling, 1905; Starling, 1914). Em 1922, Banting e Best fizeram uma série de experimentos que contribuíram para a descoberta da insulina (Banting e Best, 1922), demonstrando que extratos de pâncreas eram capazes de diminuir a glicemia de animais diabéticos. Hoje, se sabe que os hormônios são mensageiros celulares que trazem informações do ambiente externo às células que, por sua vez, respondem através da ativação e controle de diferentes vias de sinalização celular. Estas vias são estimuladas por diferentes mensageiros secundários, pelo estímulo hormonal ou por outras moléculas sinalizadoras, e mantêm a informação intracelular através de mecanismos de transdução de sinal que irão desencadear repostas tais como a proliferação e divisão celular,

síntese de proteínas, consumo de nutrientes, apoptose, etc. Os mecanismos de transdução que participam das vias de sinalização envolvem o controle da atividade proteínicas que, como enzimas, irão determinar a velocidade de diferentes reações químicas celulares.

A pesquisa sobre os mecanismos de transdução de sinal foi mais intensa nos últimos 40 anos e revelou-se muito eficaz na identificação de novos alvos para o desenho de novas drogas. Este é o caso das drogas dirigidas a receptores acoplados à proteína G. Mais de 50% dos medicamentos modernos foram projetados com base nesta única família de transdutores de sinalização celular (Flower, 1999). Esforços de laboratórios de investigação em todo o mundo, no entanto, ainda não forneceram novos medicamentos, quer para terapêutica ou para bloquear a transmissão de doenças por mosquitos. As enzimas conhecidas como proteínas quinases (PKs) são os efetores finais da esmagadora maioria das vias de transdução de sinal celular. Tais enzimas realizam a reação de fosforilação aonde o fosfato terminal de resíduos de ATP ou menos frequentemente GTP são transferidos para a hidroxila de aminoácidos como serina, treonina ou tirosina. As PKs foram descritas pela primeira vez por Earl Sutherland, Edmond Fisher e Edwin Krebs, nas décadas de 50 e 60. Nesse caso elas foram inicialmente envolvidas no mapeamento da via de sinalização celular que usa AMP cíclico como segundo mensageiro e ativa uma PK chamada de proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) (Sutherland e Wosilait, 1955; Fisher e Krebs, 1955; Walsh e cols, 1968). O mapeamento completo dessa única via levou três décadas de pesquisa de diversos laboratórios. Atualmente, um enorme esforço é feito por empresas farmacêuticas a fim de desenvolver inibidores seletivos de PKs com o objetivo de promover o tratamento de uma vasta gama de doenças humanas. Várias dessas drogas já estão em diferentes fases de ensaios clínicos. Estas drogas foram amplamente analisadas por Cohen (2002) e serão apenas brevemente mencionadas aqui:

- drogas imunossupressoras: como é o caso da rapamicina, um inibidor específico da enzima mTOR, PK envolvida na via de PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase) que desempenha um papel crucial na transição G1/S, na síntese de IL-2 e na proliferação de células-T. Este foi o primeiro medicamento aprovado para uso clínico em pacientes pós-transplante, e também em alguns casos de terapia antineoplásica.

- agentes anticancerígenos: este é o caso do Gleevec® fabricado pela Novartis, que é um inibidor específico da tirosina-quinase do vírus Abelson. Essa enzima é várias vezes ativada em pacientes com leucemia mielóide crônica.

- biologia vascular: HA1077 ou fasudil que é um inibidor de Rho-quinase que modula a constrição dos vasos sanguíneos. Tal medicamento é agora utilizado para o tratamento de pacientes com vasoespasm cerebral.

- doenças parasitárias: inibidores de PKs estão sendo investigados para gerar medicamentos antiparasitários (Doerig, 2004). Estas drogas incluem: o Composto 1, um inibidor da PK dependente de GMPc de um parasita do grupo Apicomplexa que infecta aves causando prejuízos a indústria de frangos (Donald e cols., 2002). Um outro exemplo são as paullonas e purvalanol, inibidores das PKs dependentes de ciclinas que estão sendo usados como potenciais drogas para bloquear a replicação de Leishmania, em macrófagos in vitro, e o desenvolvimento do Plasmodium (Doerig, 2004).

O desenho racional de medicamentos inibidores de PKs ocorreu através de duas estratégias diferentes nos últimos anos:

1 - identificação das PKs essenciais para a sobrevivência dos patógenos em seus estágios de desenvolvimento dentro do vetor artrópode (Silva-Neto e cols., 2002; Siden-Kiamos et cols., 2006);

2 - identificação das PKs essenciais para o desenvolvimento de parasitas intracelulares, enquanto nas fases do ciclo de vida que ocorrem no interior do hospedeiro vertebrado (Doerig e cols., 2005)

Nos vinte anos seguintes à descrição da PKA, todos os principais conceitos de sinalização celular foram descritos, incluindo: a fosforilação em tirosina, a identificação do inositol trifosfato ou IP3 e do cálcio como mensageiros intracelulares, a ubiquidade do óxido nítrico na sinalização no sistema vascular e a via de Ras/MAP quinase para citar alguns poucos exemplos (para uma revisão geral veja Burgoyne e Petersen, 1997). O papel das PKs na biologia celular foi reacendido após o conhecimento dos primeiros resultados do genoma humano onde os cerca de 500 genes que codificam PKs foram identificados (Manning e cols., 2002). Além disso, mais de 400 genes, associados com doenças humanas como câncer e inflamação, estão também associados com vias mediadas por PKs (Dunn, 2002).

A Regulação do Sistema Olfativo em Mosquitos.

O mecanismo da olfação é um bom exemplo de como funcionam vias de sinalização celular. Em 2004, Richard Axel e Linda Buck receberam o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina pela descoberta dos receptores olfativos em mamíferos. Partiram do princípio de que extratos de epitélio olfativo de mamíferos estimulados por moléculas de odor apresentavam elevação dos níveis de AMP cíclico (AMPc) em uma reação dependente de GTP. Assim, foi proposto que os receptores olfativos pertencessem à família dos receptores acoplados a proteína G (Buck e Axel, 1991). De acordo com esse modelo, a molécula de odor causa uma modificação estrutural da parte citoplasmática do

receptor, ativando uma proteína G estimulatória e a proteína adenilato ciclase, que gera o AMPc. O aumento dos níveis de AMPc ativa canais iônicos modificando o potencial elétrico da membrana dos neurônios olfativos. Assim é gerado um potencial de ação que é propagado para outros neurônios localizados em centros maiores de integração cerebral responsável pela interpretação dos sinais de odor (Zwiebel e Taken, 2004).

Um passo importante no ciclo de vida dos mosquitos após a emergência da fase de pupa e formação do adulto é a localização da fonte de néctar e de sangue (Lehane, 2005). Diversas moléculas liberadas por seres humanos já foram identificadas como atraentes aos mosquitos, como o lactato, CO₂, e octenol (Steib e cols, 2000; Taken e Kline, 1989). Várias outras moléculas liberadas pelo suor humano também foram identificadas como atraentes a partir de separação por cromatografia gasosa e eletroantenograma em diferentes sensilas das antenas de mosquitos (Ghaninia e cols, 2007). Nesse sentido, o sistema olfativo se constitui em alvo importante para o desenho de drogas que bloqueiem a capacidade dos mosquitos em realizar a primeira refeição com sangue.

Nos insetos, os receptores olfativos foram inicialmente procurados por similaridade com os receptores acoplados a proteína G (Vosshall et al, 1999). No entanto, diversos estudos apontaram diferenças importantes entre os receptores olfativos dos insetos e dos mamíferos, como a baixa similaridade e a topologia inversa (N-terminal intracelular e o C-terminal extracelular nos insetos) (Bargmann, 2006). Devido a estas e outras diferenças, os receptores olfativos de insetos foram classificados como pertencentes a uma outra classe de receptores. Outra diferença marcante na arquitetura do sistema olfativo de insetos é a proteína ORCO, inicialmente descrita em *Drosophila* como “OR83b”, que age como co-receptor, acompanhando todos os outros receptores olfativos nos insetos (Nakagawa e Vosshall, 2009; Vosshall e Hansson, 2011). Em 2008, Sato e colaboradores descreveram que o receptor ORCO é capaz de funcionar como canal iônico junto dos outros receptores estimulado sem a necessidade de ativação por proteína G (Sato e cols., 2008).

No mosquito *A. aegypti*, o receptor ORCO foi identificado e inicialmente denominado AaOR7 (Melo e cols, 2004).

Ele possui resíduo de tirosina em sua porção C-terminal proposto como possível sítio de fosforilação (Melo e cols, 2004). Essa fosforilação seria capaz, possivelmente, de regular sua atividade no transporte iônico, visto que outros canais iônicos, como o de potássio no bulbo olfativo de mamíferos, também são regulados por fosforilação em tirosina (Fadool, 1998). Além disso, é reconhecido que receptores neuronais em mamíferos tais como os NMDA são regulados a curto e em longo prazo por Proteínas Tirosina Fosfatases (PTPs, veja discussão adiante) (Kandell, 2000). Desta forma, é possível que no

mosquito *A. aegypti*, PTPs participem da modulação de seus receptores olfativos ou mesmo da dinâmica de redistribuição dos sítios de fosforilação em tirosina (Jablonka e cols, 2011). Recentemente, foi observado que mutantes da proteína ORCO de *Drosophila* para sítios de PKC tem diminuição da atividade iônica, o que favorece a visão de que quinases e fosfatases regulem a função olfativa em insetos (Sargsyan e cols, 2011).

Vitelogênese e a Sinalização Celular mediada por Peptídeos do tipo Insulina.

Após a primeira refeição sanguínea, na maioria dos mosquitos será disparado um processo conhecido como Vitelogênese que culminará na formação dos ovos nas fêmeas (Hagedorn, 1974). A produção da Vitelogenina (Vg), a principal proteína dos ovos, e que serve de fonte nutricional do embrião durante a embriogênese, compreende dois períodos extremamente importantes na vida da fêmea. No primeiro período, os ovários, o corpo gorduroso e o intestino médio sofrem uma série de mudanças para receber uma alimentação sanguínea e então produzir ovos. Neste período, o mosquito fica sob a ação de um hormônio, o hormônio juvenil (HJ) que é produzido e secretado pela corpora allata – glândula situada no tórax do mosquito. O HJ é sintetizado principalmente nos dois primeiros dias de vida, tendo sua quantidade diminuída nos dias posteriores até a alimentação com sangue, quando apresenta uma queda mais vertiginosa (Noriega, 2004). Dentre as mudanças ocasionadas pelo HJ estão:

- aumento da expressão do receptor de Vg nas células ovarianas, tornando esse tecido capaz de endocitar tal proteína (Cho e Raikhel, 2001);
- Preparação do corpo gorduroso para o período vitelogênico – ativação nucleolar e grande acúmulo de RNA ribossomal (Raikhel, e Lea , 1990);
- O comportamento de picada em *Culex* (Meola e Petralia, 1980).

Após estas mudanças, já na fase do decaimento do HJ, os ovários e seus folículos entram em um estado de pré-vitelogênese até a alimentação sanguínea. Uma vez encontrado o hospedeiro, a alimentação com sangue inicia o segundo período – o período de vitelogênese. Nas primeiras horas, uma série de fatores – como a distensão do intestino médio, o aumento de

aminoácidos na hemolinfa e um fator desconhecido liberado pelos ovários – sinaliza o início da fase trófica para células mediais neurosecretórias. Estas produzem e liberam um hormônio ecdisteroidogênico ovariano (OEH) (Brown e cols, 1998) que estimula os ovários a produzirem ecdisteróides, mais precisamente ecdisona, que por sua vez sinalizará para o corpo gorduroso produzir Vg (revisado em Raikhel e Dhadialla, 1992). O corpo gorduroso, então, secreta a Vg que cai na hemolinfa e é captada em larga escala pelos folículos em desenvolvimento (**Figura 1**). A produção da Vg pelo corpo gorduroso não é apenas induzida pela ecdisona; a alimentação sangüínea, que fornece um aporte protéico enorme, é extremamente importante nessa sinalização. Os aminoácidos resultantes desta alimentação ativam a cascata do complexo TOR/S6k, culminando na produção de vitelogenina (Hansen e cols, 2004; Hansen e cols, 2005).

Quanto ao combate ao vetor, a vitelogênese ainda é bastante utilizada como fonte de novas ferramentas como, por exemplo, a criação de organismos geneticamente modificados, levando à geração de mosquitos que se tornam inviáveis ou mesmo refratários a patógenos após a alimentação com sangue; alguns trabalhos exploram a capacidade de superexpressão do promotor de vitelogenina após a alimentação com sangue para expressar genes da resposta imune que têm a capacidade de matar o parasita (Kokoza e cols, 2000; Kokoza e cols, 2010) ou genes que podem reduzir o fitness do mosquito, alterando sua capacidade de postura de ovos e até mesmo sua capacidade reprodutiva.

Da mesma maneira que a ecdisona e os aminoácidos agem em conjunto no corpo gorduroso na produção de Vg, o OEH, cujo mecanismo de ação não se conhece, e os peptídeos insulín-like (ILPs) agem no ovário através da via de insulina. A liberação de ecdisona pelas células ovarianas é dependente da ativação da via de insulina (Riehle e Brown, 1999, Brown e cols, 2008). A partir deste achado a via de insulina passou também a ser alvo de pesquisas nos mosquitos sendo relacionada não apenas à vitelogênese (Gulia-Nuss e cols, 2011, Arik e cols, 2009), mas também à resistência a patógenos (Corby-Harris e cols, 2010, Surachetpong e cols, 2011) e à longevidade do mosquito e outros insetos (Tatar e cols, 2001).

Em vertebrados, a cascata de sinalização ativada por insulina é uma das vias hormonais mais estudadas, principalmente pela ocorrência da Diabetes mellitus tipo 2 (Van Obberghen e cols, 2001). Esta doença do mundo moderno afeta mais 340 milhões de pessoas no mundo (OMS, 2012), sendo estimado em mais de 3 milhões de mortes em 2004, por suas complicações. A Diabetes mellitus tipo 2, caracterizada basicamente pelo quadro de resistência à ação da insulina, é geralmente ocasionada pela falha na via de insulina em decorrência da obesidade (Noguchi e Tanaka, 1995). O que tem sido mostrado é que, mesmo podendo desempenhar diferentes funções nos diferentes organismos, a

via de sinalização disparada por insulina é bastante conservada ao longo evolução. Esta via surgiu há milhões de anos e é restrita ao reino animal – em oposição à via TOR, uma via anabólica que age em conjunto com a via de insulina, mas que se estende às plantas e aos fungos (Oldham, 2010).

A via de sinalização disparada por insulina divide-se basicamente em dois ramos: a via das PKs ativadas por mitógenos/Ras (MAPK), regulando os principais efeitos mitogênicos da insulina (Kwon e cols, 2002); e a via PI3k/Akt, que controla diversos efeitos metabólicos como o acúmulo de triacilgliceróis (Di Angelo e Birnbaum, 2009).

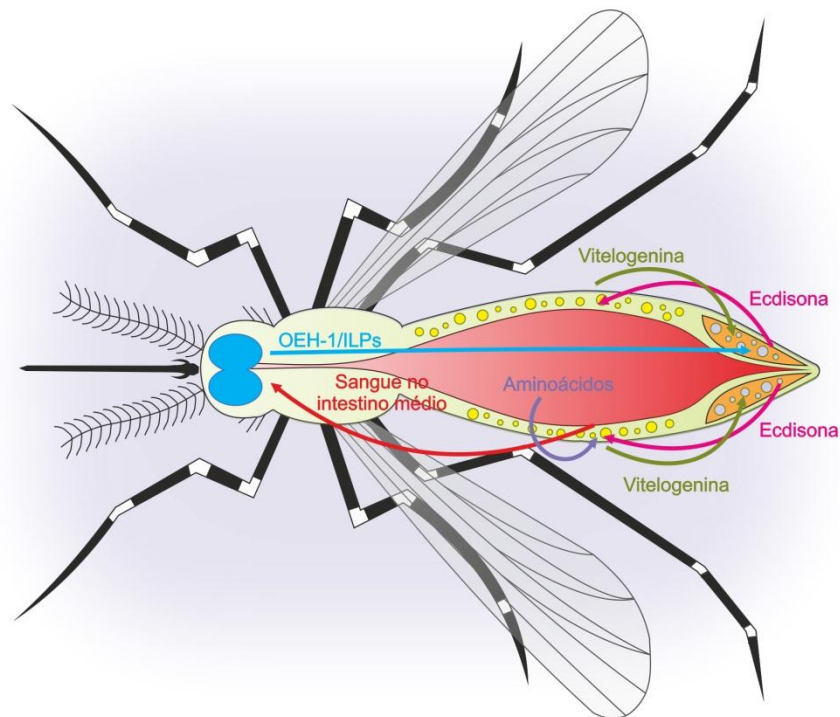


Figura 1. Sinalização hormonal mediada pela alimentação com sangue. No momento seguinte à ingestão de sangue, diversos fatores como a distensão abdominal e os nutrientes oriundos do sangue sinalizam aos diferentes tecidos o início do período vitelogênico. Em poucas horas após a alimentação, células neurosecretórias do mosquito secretam hormônios como o OEH-1 e ILPs que serão importantes para a ativação da produção de ecdisona pelo ovário. Este tecido, por sua vez, lançará ecdisona na hemolinfa, culminando na produção de vitelogenina pelo corpo gorduroso. Aminoácidos provenientes da digestão protéica do sangue também sinalizam para o corpo gorduroso produzir vitelogenina. O corpo gorduroso exportará a vitelogenina, que será captada pelos folículos ovarianos em crescente desenvolvimento.

O primeiro peptídeo similar a insulina (insulin-like peptide) foi descrito em 1986 no bicho da seda, *Bombyx mori* (Nagasawa e cols., 1986). O PTTH é um hormônio que desencadeia uma série de mudanças no bicho da seda e, assim como a insulina de vertebrados, possui duas cadeias, A e B, ligadas por pontes dissulfeto e por uma região de conexão (Nagasawa e cols., 1986). Desde então já foram descritos ILPs em diversos invertebrados, incluindo 8 isoformas para *A. aegypti* e 7 para *An. gambiae* (Riehle e cols, 2006, Krieger e cols, 2004). Independente do organismo e do órgão que produz esses peptídeos, sua sinalização depende da ligação do peptídeo em um receptor e como já dito anteriormente, esta cascata é bastante conservada, sendo representada na **Figura 2**.

O receptor de insulina é um receptor transmembrana que possui um domínio tirosina cinase (TK). Na presença de insulina, ocorre a dimerização do receptor e ativação do domínio cinase, através do qual o receptor se autofosforila. A fosforilação em resíduos de tirosina do receptor permite que este mesmo domínio quinase atue fosforilando outras proteínas, os chamados substratos do receptor de insulina (IRS). As proteínas IRS, quando fosforiladas também em tirosina, ativam duas vias separadas: 1) ativação da proteína Ras que age na via das MAPK, culminando na fosforilação e na ativação de ERK, que por sua vez induz a transcrição de uma série de genes envolvidos na diferenciação e crescimento celular; 2) ativação do complexo PI3k, responsável pela fosforilação de um lipídeo de membrana, o fosfatidilinositol fosfato (PIP2), convertendo PIP2 em PIP3 (Van Obberghen e cols, 2001).

Seguindo por essa segunda via, PIP3 ativa a PK PDK1, que por sua vez fosforila PKB/Akt, que constitui o ponto efetor central da via de insulina e o ponto principal da amplificação de sinal, com ativação de outras diferentes vias. PKB/Akt possui uma série de alvos diretos e indiretos como a GSK-3 e o complexo mTOR, resultando basicamente na ativação das vias de síntese e reserva, tanto de lipídeos, quanto de carboidratos e proteínas. Naturalmente as vias secundárias ativadas pela insulina variam de tecido para tecido, mas a resposta a ela sempre se constitui em uma resposta anabólica. Nos invertebrados, a ação da insulina está ligada à produção de ecdisteróides e de HJ (Riehle e Brown, 1999; Tu e cols, 2005). Além de controlar o nível de carboidratos na hemolinfa (Belgacem e Martin, 2006; Matsumoto e cols, 2011). A via TOR por sua vez mostra-se bastante importante na produção da Vg (Roy e Raikhel, 2012; Gulia-Nuss e cols, 2011; Hansen e cols., 2004; Hansen e cols., 2005; Brandon e cols, 2008; Arsic e cols. 2008). Juntas, essas vias estão intimamente ligadas, e basicamente controlam a vitelogênese em muitos invertebrados (**Figura 2**). As enzimas PTP1B e SHP2, ambas PTPs são reguladoras negativas da via em mamíferos conforme mostrado na **Figura 2**. Tais enzimas, tão importantes e estudadas em mamíferos ainda não tem

função descrita em mosquitos. Em *Drosophila melanogaster*, já foi visto que o ortólogo da PTP1B, dPTP61F, é detectado nos ovários apenas a partir do estágio 6 da ovogênese, sendo o próprio RNA mensageiro transportado para os folículos, como uma doação materna para o embrião (Fitzpatrick e cols, 1995). Outro trabalho analisa a importância da atividade catalítica da dPTP61F para o direcionamento do crescimento axonal (Clemens e cols, 1996; Muda e cols. , 2002). Quanto à SHP-2, também conhecida como PTPn11, tal enzima já foi estudada também em *Drosophila* quanto em síndromes humanas como a de LEOPARD e Noonan (Oishi e cols, 2009; Oishi e cols, 2006), mas pouco foi relacionada à via de insulina com poucos trabalhos disponíveis na literatura (Poltilove e cols, 2000; James e cols., 2007).

Frente à carência de dados sobre a importância de tais enzimas nos eventos controlados pela insulina nos invertebrados, novos estudos são necessários. O conhecimento tanto dos substratos quanto as atividades de PTPs em insetos nos diferentes quadros biológicos em que eles se encontram é importante visto que a modulação farmacológica de tais enzimas envolvidas diretamente com a via de insulina o que pode afetar a produção de ovos. Além disso, pode representar um novo alvo para o controle do ciclo de vida dos mosquitos.

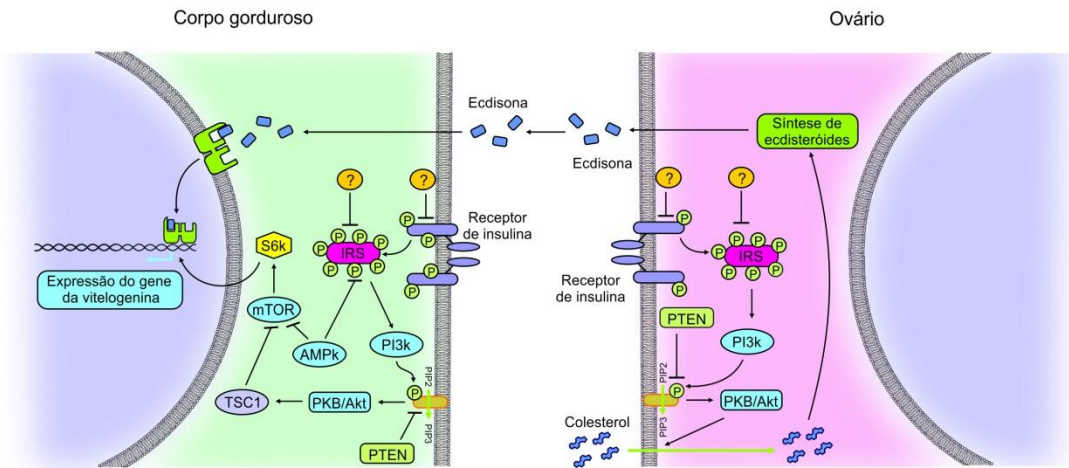


Figura 2. Via de sinalização da insulina. Na presença da insulina ou de peptídeos do tipo insulina em mosquitos, há a formação de dímeros do receptor de insulina (azul na superfícies das duas células), sendo ativado o seu domínio tirosina cinase, que realiza a autofosforilação das suas cadeias intracelulares e dos substratos IRS. Tais substratos ativam a via canônica PI3k/Akt, que ativam vias anabólicas, síntese de reservas e a via das MAPK, que favorece a transcrição de genes de crescimento e divisão celular que ativam a via TOR, passo crítico para a síntese de vitelogenina pelo corpo gorduroso, e também parece apresentar papel na captação de colesterol, passo crítico para a produção de ecdisteróides pelo ovário. Vale ressaltar que as PTPs (Proteínas Tirosinas Fosfatases, círculos laranjas no esquema) aqui tiveram seus nomes substituídos por interrogações uma vez que ainda não tem sua descrição em mosquitos, o que esta sendo realizado por nosso grupo, exceção feita para as PTENs (em retângulos verdes). As principais PTPs em mamíferos que atuam na via seriam a PTP1B e SHP2 em estudo em nosso grupo. (IRS, insulin receptor substrate; PI3k, phosphatidil inositol 3-phosphate kinase; AMPk, AMP-dependent kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; TSC, tuberous sclerosis complex; PKB, protein kinase B; S6k, ribosomal protein p70 S6 kinase).

O Sistema Imune de Mosquitos e o Papel da Fosforilação em Tirosina.

Acredita-se que a fosforilação de proteínas em tirosina surgiu recentemente ao longo da evolução em organismos eucarióticos multicelulares. Porém, sabe-se que vários organismos unicelulares, incluindo bactérias, apresentam este tipo de fosforilação (Graneasse, 2007, Kirstein e Tugart, 2005). A fosforilação em tirosina possui papel de extrema importância em organismos multicelulares, na comunicação intercelular, mantendo a coordenação e desenvolvimento de diferentes tecidos (Lim e Pawson, 2010). Comparadas às Proteínas Tirosina quinases (PTKs) as PTPs só começaram a ser profundamente estudadas muito tempo depois. Apesar de conhecida a atividade fosfotirosil fosfatase desde 1981, medida a partir de extratos de vesículas na ausência de Zn^{2+} (Brautigan, 1981), a primeira PTP só foi purificada (Tonks et cols., 1988, Charbonneau et cols. 1989) e clonada 8 a 9 anos depois da primeira PTK, (Guan et cols., 1990, Gilmer, 1981). Atualmente, são conhecidas várias vias de sinalização que incluem a participação de fosfotirosina fosfatases como a cascata de insulina (na utilização de combustíveis celulares e síntese de proteínas) e a cascata das MAPK que atuam no controle da proliferação e divisão celular (Theodosiou e Ashworth, 2002). Em seres humanos, 107 PTPs já foram descritas e, destas, 11 são inativas cataliticamente, 2 defosforilam mRNAs e 13 defosforilam fosfolipídeos de inositol (Alonso e cols., 2004), restando 81 PTPs ativas para defosforilação de outras proteínas. Nos humanos, o sistema nervoso e os tecidos hematopoiéticos são os que mais expressam PTPs (Alonso e cols., 2004).

As PTPs são classificadas de acordo com a sua sequência de aminoácidos. Assim podem ser divididas em cinco grupos: (1) PTPs clássicas (do tipo receptoras ou não receptoras), (2) as de dupla especificidade relacionadas à proteína VH1, (3) as de dupla especificidade relacionadas à proteína cdc25, (4) as de baixo peso molecular ou LMPTP do inglês "Low Molecular Weight PTP" e (5) as baseadas em ácido aspártico em seu sítio ativo (Kolmodin e Aqvist, 2001; Alonso e cols., 2004). Quanto ao seu mecanismo catalítico, as PTP baseadas em cisteína (os quatro primeiros grupos) agem basicamente em duas etapas: o ataque nucleofílico da cisteína ligada a fosfatase ao fosfato do substrato e a formação de um intermediário fosforilado que é hidrolisado por uma molécula de água ativada por um resíduo de aspartato que age como uma base (Kolmodin e Aqvist, 2001). A sequência catalítica conservada das PTPs, C-X5-R-(S/T), se localiza num motivo estrutural "P-loop" onde átomos de nitrogênio de diferentes resíduos de aminoácidos orientam os átomos de oxigênio do fosfato para interação com a cisteína (Kolmodin e Aqvist, 2001).

As PTPs exercem um papel importante na regulação da resposta imunológica (Mustelin e cols., 2005). As PTPs SHP-1, SHP-2, TC-PTP e CD45 têm papel importante na regulação negativa da via JAK/STAT em humanos. SHP-1 e CD45 podem afetar a fosforilação da PK JAK (que precisa estar fosforilada para se tornar ativa), enquanto SHP-2 e TC-PTP podem defosforilar as moléculas STATs e desativá-las, impedindo-as de promover a transcrição gênica (Johnson e Cross, 2009). As PTPs SHP-1 e SHP-2 são citosólicas e também estão envolvidas na regulação de sinalização de citocinas e ativação dos receptores dos linfócitos B (BCRs), sendo SHP-1 um regulador negativo de sinalizações nos linfócitos B, células NK e mielóides. Sua super-expressão reduz a produção de TNF em macrófagos e seu silenciamento promove aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF sob estímulo de LPS. Apesar disso, o silenciamento desta PTP promove queda nos níveis de IFN em alguns modelos experimentais, mostrando que esta PTP também está envolvida na produção desta citocina. O silenciamento de SHP-1 também promove aumento de fosforilação da sub-unidade p65 de NF-κB e queda de fosforilação de STAT1. SHP-2 parece exercer efeitos antagonistas a SHP-1. Seu silenciamento promove aumento nos níveis de IFN e outras citocinas pró-inflamatórias sob estímulo de agonistas do receptor TLR 3 (Johnson e Cross, 2009).

A PTP1B, uma PTP do tipo clássica, que também está envolvida na via de sinalização do receptor de insulina (veja seção anterior), quando silenciada em macrófagos, promove aumento nos níveis de IFN em resposta a LPS. Isso, porque esta proteína pode defosforilar uma JAK associada ao receptor de IFN. Porém, quando silenciada, esta PTP também promove aumento das citocinas TNF e IL-6. Outra proteína importante é a CD45, sendo uma PTP transmembrana em leucócitos. Ela controla a defosforilação de Lck em sítios de regulação positivos e negativos, sendo esta, uma proteína adaptadora ativada quando há reconhecimento de antígeno (Johnson e Cross, 2009).

Existem, no mínimo 57 genes codificantes de PTPs em comum entre todas as linhagens de células imunes de mamíferos. Além disso, cada linhagem de célula imune possui ainda um conjunto específico de genes de PTPs expressos, que variam de 58 a 76 transcritos diferentes, de acordo com o tipo celular. Muitas destas PTPs apresentam sua expressão aumentada ou diminuída, horas após o estímulo destas células imunes através de anticorpos ou LPS, por exemplo (Arimura e Yagi, 2010). Com relação ao sistema imune de insetos, existem pontos de fosforilação que são cruciais para a ativação das vias imunes (Lemaitre e Hoffman, 2007). Sabe-se que a fosforilação em tirosina se encontra bastante alterada em diversos tecidos (intestino médio, abdômen e cabeça) do mosquito *A. aegypti* quando infectado com malária (Cudishevitch, Senna e cols. Em preparação FALTA DAR O NOME DESTA REFERENCIA). Além disso, foi mostrado também que a fosforilação em tirosina nesta mesma

espécie de mosquitos é alterada na cabeça ao longo dos dias de vida após sua emergência. (Jablonka e cols, 2011). Tal evidência pode indicar uma mudança de fosforilação em tirosina na exposição dos mosquitos a diferentes populações de bactérias endógenas. Ou seja, a saída da pupa do ambiente aquático seguida da emergência do adulto e a exposição ao ambiente terrestre pode induzir uma alteração súbita na composição da microbiota que, ao ser percebida pelos mosquitos, gera um novo padrão de resposta imune, que pode ser refletido na alteração de seu perfil de fosforilação.

A microbiota intestinal é muito importante para o controle de infecções em mosquitos não só por outras bactérias como também por protozoários e vírus. Mosquitos tratados com antibiótico para remoção da microbiota intestinal e infectados em seguida com *P. falciparum*, apresentam maiores níveis de oocinetos e oocistos de *Plasmodium* no intestino do que os não-tratados (Dong e al., 2009). Além disso, mosquitos tratados com antibiótico e infectados com vírus dengue apresentam maior carga viral do que os não-tratados (Xi e cols., 2008). Isso mostra que as bactérias intestinais são importantes para o controle de infecções. Um dos fatores que possivelmente contribui para isto é por elas exercerem um estímulo imunológico constante, de modo a manter a imunidade ativa, através da produção de peptídeos antimicrobianos e outras moléculas importantes no controle inicial de invasores patogênicos, até que uma resposta mais eficaz seja montada (Dong e cols., 2009) (Cirimotich e cols., 2011).

O papel das PTPs na ativação da resposta imune de mosquitos, no entanto, ainda é desconhecido. Apesar disso, dados de microarranjos disponíveis na literatura mostram que existem PTPs em *A. aegypti* que apresentam sua expressão alterada em diferentes modelos experimentais de manipulação do sistema imune. Essas flutuações na expressão de PTPs são semelhantes às variações de alguns peptídeos antimicrobianos, como mostram as tabelas abaixo:

Tabela 1: Genes com sua expressão significativamente alterada em mosquitos com a via Toll ativada em comparação com mosquitos normais. Fonte: Xi e cols., 2008. Destacado em azul um dos genes em estudo em nosso grupo.

Gene	Número de Acesso
Proteína Tirosina Fosfatase Não-Receptora Tipo NT1	AAEL001919
Proteína Tirosina Fosfatase n9	AAEL005492
Defensina	AAEL003849
Defensina	AAEL003857
Defensina C - precursor	AAEL003832
Defensina A - precursor	AAEL003841
Cecropina	AAEL015515
Gambicina	AAEL004522

Tabela 2: Transcritos em mosquitos alimentados com sangue ou sacarose. Fonte: Bonizzoni e cols., 2011. Destacado em azul um dos genes em estudo em nosso grupo.

Gene	Número de Acesso	Transcritos Sacarose	Transcritos Sangue
Proteína Tirosina Fosfatase	AAEL000845	498	608
Proteína Tirosina Fosfatase Não-Receptora Tipo NT1	AAEL001919	81	285
Proteína Tirosina Fosfatase Não-Receptora Tipo 23 (putativa)	AAEL010916	284	744
Proteína Tirosina Fosfatase n9	AAEL005492	496	1441
Proteína Tirosina Fosfatase Não-Receptora Tipo NT5	AAEL003108	727	2391
Defensina	AAEL003849	882	1424
Gambicina	AAEL004522	929	1470
Atacina	AAEL003389	32	12

Tabela 3: Alterações no transcriptoma de intestino médio de mosquitos alimentados com sangue infectado com *P. gallinaceum* em comparação com mosquitos alimentados com sangue. Fonte: Zou e cols., 2011. Destacado em azul um dos genes em estudo em nosso grupo.

Nome do Gene	Número de Acesso	Alteração de Expressão
Proteína Tirosina Fosfatase Receptora	AAEL013105	0,558643569
Proteína Tirosina Fosfatase Não-Receptora Tipo NT5	AAEL003108	0,543367431
Defensina	AAEL003857	0,524858342
Defensina	AAEL003849	0,438302861
Cecropina	AAEL000777	0,329876978

AMPK: Um modulador potencial da Longevidade de Vetores.

Longevidade é o tempo de vida de um organismo, sendo inversamente dependente do processo intrínseco e único de cada ser, denominado envelhecimento. A longevidade funcional é especialmente relevante na determinação da longevidade de insetos vetores de doenças, já que não basta apenas o inseto estar vivo, é necessário que o mesmo esteja apto durante tempo suficiente para transmitir a doença. Os mosquitos *A. aegypti*, em regiões urbanas, como o Rio de Janeiro, apresentam uma média populacional de sobrevivência um pouco abaixo de cinco dias (Maciel de Freitas e cols, 2007), sendo que menos de um sexto da população sobrevive 12 ou mais dias (Muir e Kay 1998, Maciel de Freitas et al, 2007) tendo influência também a distribuição populacional local (Maciel de Freitas, 2007). O outro mosquito, possível vetor da Dengue, do gênero *Aedes*, o *Aedes albopictus*, também apresenta essa faixa de média de sobrevivência (Niebylski e Craig, 1994).

Para que um organismo seja considerado um vetor biológico, seu tempo de vida deve ser maior que o período de incubação extrínseco do patógeno, ou seja, deve englobar o tempo em que esse possível vetor não entra em contato com o alimento infectado mais o tempo de maturação do patógeno, no caso, o vírus da dengue. Por exemplo, nas fêmeas de *A. aegypti* que não se alimentam de sangue durante os dois primeiros dias de vida, o tempo de transmissão deste vírus é em média 12 dias (Maciel de Freitas e cols., 2011). Apesar de nenhum trabalho até o momento ter demonstrado modificar, através de intervenção humana, a pirâmide etária de mosquitos na natureza, trabalhos teóricos mais recentes tem demonstrado que a diminuição da longevidade de vetores apresenta imensa importância epidemiológica (Smith e McKenzie, 2004; Cohuet e cols., 2010). A PK ativada por AMP (AMPK) é uma enzima

heterotrimérica formada por uma subunidade catalítica (α) e duas subunidades regulatórias (β e γ). Existem diferentes isoformas de cada subunidade ($\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2$ e $\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$), cada uma codificada por um gene diferente (Steinberg e Kemp, 2009). Essa enzima foi descrita pela primeira vez em 1973 em dois estudos independentes. Como uma proteína induzida por AMP que inativa as enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMG-CoA redutase) (Beg et cols., 1973) e a acetil CoA carboxilase (ACC) (Carlson e Kim, 1973), passos limitantes para a síntese de colesterol e de ácidos graxos respectivamente. A AMPK é uma enzima que induz uma cascata de eventos intracelulares em resposta a mudança da carga energética celular (Hardie, 2003, Carling, 2004). Exemplos desses eventos são o metabolismo de glicose (PFK/FBP), metabolismo de lipídio (HMG-Coa redutase e ACC), crescimento celular (IRS1 e TSC2) e autofagia (ULK1), todos com forte relação de causalidade com a longevidade de organismos (Hardie, 2011). O principal papel da AMPK no metabolismo celular é a manutenção da homeostasia energética (Carling, 2004). Todas as células vivas devem continuamente manter alta a relação entre ATP e ADP para sobreviver (**Figura 3**). Isso é obtido por intermédio do catabolismo que aumenta a energia celular convertendo ADP e fosfato em ATP, enquanto o anabolismo diminui, por converter ATP em novamente ADP e fosfato. Convém ressaltar o fato de que a relação ATP/ADP nas células geralmente permanece quase constante, indicando que o mecanismo que regula esse processo é muito eficiente. A AMPK é um componente-chave desse equilíbrio fisiológico (Hardie, 2003, Carling, 2004, Schimmack et al, 2006). O sistema da AMPK é, portanto, ativado por qualquer estresse que cause aumento na relação intracelular AMP/ATP (tanto aqueles que interferem com a produção de ATP quanto também aqueles que aumentam o consumo de ATP). Acreditamos que tal enzima represente um alvo promissor para o bloqueio da transmissão de doenças humanas por vetores justamente pela sua posição central no metabolismo e sua associação com outros aspectos da biologia e bioquímica como a imunidade e o ciclo celular. Tais possibilidades estão em investigação em nosso grupo (Nunes et cols. Em preparação, 2012).

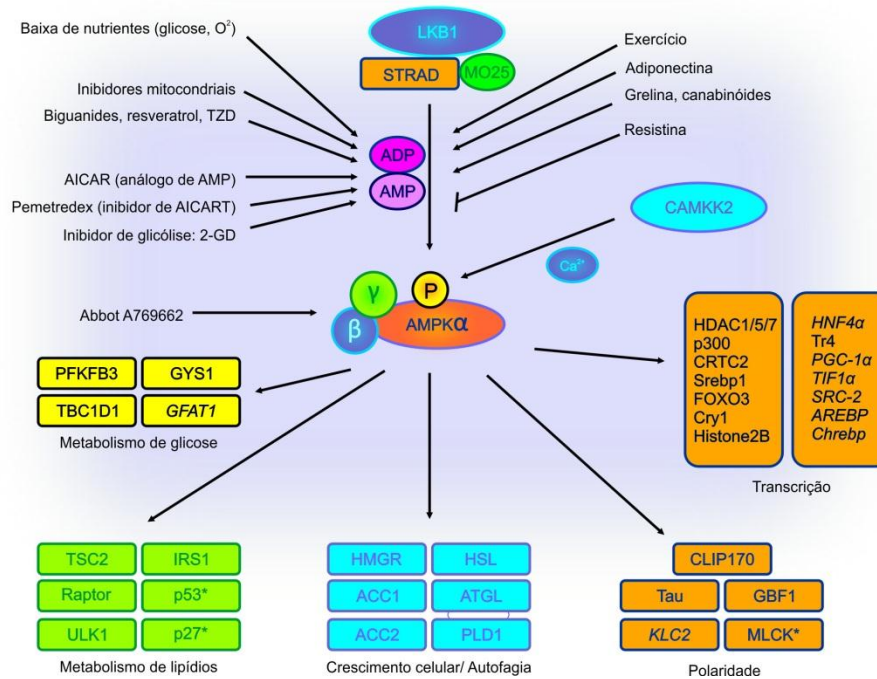


Figura 3: Reguladores e efeitos bioquímicos da AMPK. A AMPK é ativada quando os níveis de AMP e ADP aumentam em resposta a uma variedade de estresses fisiológicos e indutores farmacológicos. LKB1 é a quinase responsável pela fosforilação da AMPK em resposta ao aumento de AMP. Os substratos da AMPK em itálico ainda necessitam de maiores confirmações in vivo e os em vermelho também podem ser fosforilados por outros membros da família da AMPK (SIK1, SIK2, MARKs, SADs). Adaptado de Mihaylova e Shaw, 2011.

O Caminho do Fosfato ou o que os Quinomas, Fosfomas e Fosfoproteomas Podem dizer sobre a Biologia dos Mosquitos.

Apesar do envolvimento de mosquitos como vetores de doenças e da conclusão do genoma de *An. gambiae* em 2002 (Holt e cols., 2002) e *A. aegypti* em 2007 (Nene e cols., 2007), não existem dados disponíveis sobre seus quinomas, fosfomas ou fosfoproteomas. Iremos discutir aqui, inicialmente, os quinomas. As PKs são hoje a fonte mais promissora de alvos para desenho de drogas e são consideradas os principais alvos de drogas do século XXI como previsto por Cohen (2002). Uma estratégia complementar a obtenção dos genomas seria a identificação de PKs de mosquito necessárias para a infecção por patógenos. A identificação do conjunto de genes que codifica PKs em um organismo é chamada Quinoma do inglês "Kinome". A obtenção do Quinoma dos mosquitos vetores pode ser seguida por uma estratégia de genoma funcional, a fim de testar a expressão / atividade de PKs cruciais para a infecção dos tecidos dos mosquitos por diferentes patógenos. Por fim pode-se realizar uma outra abordagem farmacológica através do desenvolvimento de inibidores de PK novos especificamente capazes de bloquear PKs de mosquitos moduladas pelo patógeno ou no curso da infecção.

Os quinomas concluídos até hoje em outros organismos forneceram três tipos principais de conclusões que irão apoiar futuras investigações sobre a biologia daqueles organismos:

1 - "Novas" PKs envolvidos em "velhas" funções. Este é o caso de *Drosophila* aonde o envolvimento dos genes que codificam o quinoma no ciclo celular foi claramente demonstrado (Bettencourt-Dias et al, 2004 FALTA ESTA REFERENCIA). Os autores utilizaram a abordagem de RNAi para validar o papel de PKs anteriormente conhecidas no ciclo celular. Surpreendentemente, novas enzimas envolvidas nesse processo foram identificadas.

2 - Confinamento de PKs a uma única espécie organismo: Este é o caso clássico das tirosina-quinases eucarióticas (já foi escrito "quinase" – parte Débora) (PKs que fosforilam somente em resíduos de tirosina) que estão ausentes do genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Tais enzimas são provavelmente uma aquisição de organismos multicelulares em que a comunicação química entre tecidos provavelmente surgiu pela primeira vez (Manning e cols., 2002). Além disso, das cerca de 500 PKs humano, 13 não são encontrados em *Drosophila* ou *C. elegans*. Finalmente, *C. elegans* possui 15 PKs atípicas.

3 - Restrição de um grupo completamente de PKs ou "Novel" para um único organismo ou espécie: Este é o caso da família FIKK de PKs onde 19 dos seus 20 membros estão presentes apenas em *Plasmodium* e um único gene foi encontrada em outras espécies de Apicomplexa (Ward e cols., 2004).

O único quinoma de inseto concluído é o de *D. melanogaster* que é composto de 239 genes o que corresponde a aproximadamente a metade dos 518 genes descritos no quinoma humano (Manning e cols. 2002). Uma análise posterior dos genes de tirosinas quinases revelou que *D. melanogaster* contém 31 genes codificando tais enzimas e apresentou uma visão geral dos mesmo genes anotados para *An. gambiae* checando a um total de 32 genes para esse mosquito (Shiu e Li, 2004). Isso sugere um núcleo total de genes de tirosinas quinases relativamente pequeno para os dípteros o que facilita uma investigação funcional no futuro.

Os resultados dos projetos de Quinomas são muito interessantes. Eles fornecem um ponto único de partida para o desenvolvimento de drogas altamente seletivas para lidar com PKs específicas de alguns organismos. Quando combinado com os possíveis alvos de tais enzimas a possibilidade de descobrir novos alvos moleculares é exponencial. Os alvos de tais enzimas são justamente as proteínas que sofrem fosforilação direta mediada pelas PKs. A obtenção do conjunto completo de proteínas fosforiladas em uma célula em função de um determinado sinal ou via de sinalização se chama Fosfoproteoma. Com o advento da tecnologia de Proteoma hoje é possível se conhecer todo o repertório de proteínas expressas em um determinado ponto da biologia de uma célula (Conrad e cols., 2001). A conjugação das ferramentas já disponíveis do proteoma com aquelas desenvolvidas nas últimas duas décadas nos estudos de sinalização celular leva ao fosfoproteoma (Mann et al, 2002). Nessa estratégia é possível se conhecer todas as vias de sinalização disparadas por um único estímulo e as proteínas fosforiladas/defosforiladas em resposta a esse estímulo. Até o momento não existem fosfoproteomas concluídos para nenhum dos vetores de doenças humanas. No futuro, será possível reconstruir uma via inteira utilizando as bases do Genoma, Quinoma e seus alvos descritos no Fosfoproteoma. O Fosfotoma corresponde a coleção de genes que codifica proteínas fosfatases. Em *Drosophila* o fosfotoma reúne cerca de 86 genes (Tabela 4). No entanto análises funcionais ainda precisam ser realizadas e comparadas com os genes ortólogos em dípteros vetores.

Tabela 4: Comparação dos Fosfatomas de *Drosophila*, *C. elegans* e Humano. Fonte: Morrison e cols. 2000.

Família	<i>Drosophila</i>	<i>C. elegans</i>	<i>H. sapiens</i>
S/TP	28	65	21
PTP	20	83	47
DSP	18	26	51

S/TP = fosfatases que defosforilam resíduos de Ser ou Thr; PTP = fosfatases que defosforilam resíduos de Tyr, DSP= fosfatases que defosforilam resíduos de Ser, Thr ou Tyr.

Considerações Finais.

No presente capítulo apresentamos uma visão geral de sistemas biológicos em investigação em nosso grupo e para os quais a base bioquímica e molecular responsável pela determinação de circuitos de fosforilação-de fosforilação de proteínas pode fornecer novos alvos para o controle de vetores como o mosquito *A. aegypti*. Nesse sentido a conclusão dos genomas desses vetores aliada ao desenvolvimento de tecnologias capazes de analisar quantidades diminutas de material biológico será fundamental para avançarmos nessa área. A semelhança do ocorrido com o mapeamento das rotas de sinalização celulares humanas pretende-se encontrar alvos exclusivos dos vetores em duas frentes principais aqui apresentadas. Nesse caso circuitos de sinalização celular envolvidos com as fases que **antecedem** a primeira refeição sanguínea como a olfação, o amadurecimento endocrinológico e a própria longevidade do vetor são bastante atraentes. Em um segundo grupo destacamos circuitos relacionados com os mecanismos imunes que garantem a integridade do vetor **após** a primeira refeição sanguínea em especial aqueles que lidam com a produção de peptídeos antimicrobianos. Um outro desafio após a demonstração do papel dessas moléculas será alia-las a terapias ou métodos já disponíveis (Wolbachia, transgenese etc) ou desenvolver novas tecnologias de dispersão de moduladores seletivos com o objetivo de bloquear a transmissão de patógenos.

Referências Bibliográficas.

Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T. 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117, 699-711.

Arik, A.J., Rasgon, J.L., Quicke, K.M., Riehle, M.A., 2009. Manipulating insulin signaling to enhance mosquito reproduction. *BMC Physiol.* 9:15.

Arimura, Y., Yagi, J., 2010. Comprehensive Expression Profiles of Genes for Protein Tyrosine Phosphatases in Immune Cells. *Sci. Signal.* 3, (137):rs1.

Arsic, D., Guerin, P.M., 2008 Nutrient content of diet affects the signaling activity of the insulin/target of rapamycin/p70 S6 kinase pathway in the African malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *J Insect Physiol.* 54,1226-1235.

Banting F. G., Best C. H., 1922. The Internal Secretion of the Pancreas. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 7, 251- 266.

Bargmann, C.I., 2006. Comparative chemosensation from receptors to ecology. *Nature.* 444, 295-301.

Beg, Z. H., Allmann, D. W., Gibson, D. M., 1973. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 1362–1369

Belgacem, Y.H., Martin, J.R., 2006. Disruption of insulin pathways alters trehalose level and abolishes sexual dimorphism in locomotor activity in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* 66, 19-32.

Bonizzoni, M., Dunn, W. A., Campbell, C. L., Olson, K. E., Dimon, M. T., Marinotti, O., James, A. A. 2011. RNA-seq analyses of blood-induced changes

in gene expression in the mosquito vector species, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*. 12:82.

Brandon, M.C., Pennington, J.E., Isoe, J., Zamora, J., Schillinger, A.S., Miesfeld, R.L., 2008. TOR signaling is required for amino acid stimulation of early trypsin protein synthesis in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 38, 916-22.

Brautigan, D. L., Bornstein, P., Gallis, B., 1981. Phosphotyrosyl-protein Phosphatase specific inhibition by Zn²⁺. *J. Biol. Chem*. 256, 6519-6522.

Brown, M.R., Graf, R., Swiderek, K.M., Fendley, D., Stracker, T.H., Champagne, D.E., Lea, A.O., 1998. Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes. *J. Biol. Chem*. 273, 3967-3971.

Brown, M.R., Clark, K.D., Gulia, M., Zhao, Z., Garczynski, S. F., Crim, J.W., Suderman, R.J., Strand, M.R., 2008. An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 105, 5716-5721.

Buck, L., Axel, R., 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*. 65, 175-187.

Burgoyne, R.D. e Petersen O.H. 1997, *Landmars in Intracellular Signalling*. Portland Press Ltd, London.

Carling, D., 2004. AMPK. *Curr. Biol*. 14,R220.

Carlson, C. A., Kim, K. H. 1973. Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem*.248, 378-380.

Charbonneau, H., Tonks, N., K., Kumar, S., Diltz, C., D., Harrylock, M., Cool, D. E., Krebs, E., G., Fischer, E. H., Walsh, K. A., 1989. Human placenta protein-tyrosine- phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 86, 5252–5256.

Cho, K.H., Raikhel, A.S., 2001. Organization and developmental expression of the mosquito vitellogenin receptor gene. Insect Mol. Biol.10, 465-474.

Clemens, J.C., Ursuliak, Z., Clemens, K.K., Price, J.V., Dixon, J.E., 1996. A *Drosophila* protein-tyrosine phosphatase associates with an adapter protein required for axonal guidance. J. Biol. Chem. 271,17002-17005.

Cohen, P., 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation- a 25 year update. Trends Biochem. Sci. 25, 596-601.

Cohen, P., 2002. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? Nat. Rev. Drug Discov. 1, 309-315.

Cohuet A., Harris C., Robert V., Fontenille D. 2010. Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector? Trends Parasitol. Mar;26(3):130-136. Epub Jan 6.

Conrad, C. C., Malakowsky, C. A., Talent, J., Rong, D., Lakdawala, S., Gracy, R. W., 2001. Chemiluminescent standards quantitative comparison of two-dimensional electrophoresis western blots. Proteomics. 1,365-369.

Corby-Harris, V., Drexler, A., Watkins de Jong, L., Antonova, Y., Pakpour, N., Ziegler, R., Ramberg, F., Lewis, E. E., Brown, J. M., Luckhart, S., Riehle, M. A, 2010. Activation of Akt signaling reduces the prevalence and intensity of malaria parasite infection and lifespan in *Anopheles stephensi* mosquitoes. Corrected and republished in: PLoS Pathog. 6, doi: 10.1371/annotation/738ac91f-8c41-4bf5-9a39-bddf0b777a89.

Cirimotich C. M., , Ramirez, J. L., Dimopoulos, G. 2011. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe*. 10, 307-310

Di Angelo, J.R., Birnbaum, M.J., 2009. Regulation of fat cell mass by insulin in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*. 29, 6341-6352.

Doerig, C., 2004. Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta*. 1697, 155-168.

Doerig, C., Billker, O., Pratt, D., Endicott, J., 2005. Protein kinases as targets for antimalarial intervention: kinomics, structure-based design, transmission-blockade, and targeting host cell enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1754, 132-150.

Donald, R.G.K, Allocco J., Singh, S.B., Nare, B., Salowe, S.P., Wiltsie, J., Liberator, P.A., 2002. *Toxoplasma gondii* Cyclic GMP-Dependent Kinase: chemotherapeutic targeting of an essential parasite protein kinase. *Eukaryot Cell*. 1, 317-328.

Dong, Y., Manfredini, F., Dimopoulos, G. 2009. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *Plos pathogens*. 5:e10000423

Dunn D.A., 2002. Mining the human "kinome"., *Drug Discov. Today*. 7, 1121-1123.

Fadool, D.A., 1998. Tyrosine phosphorylation downregulates a potassium current in rat olfactory bulb neurons and a cloned Kv1.3 channel. *Ann. N. Y. Acad Sci*. 30, 529-532.

Fischer, E. H., Krebs, E. G., 1955. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J. Biol. Chem*. 216, 121-132

Fitzpatrick, K.A., Gorski, S.M., Ursuliak, Z., Price, J. V., 1995. Expression of protein tyrosine phosphatase genes during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev.* 53, 171-183.

Flower, D. R., 1999. Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta.* 1422, 207-234.

Ghaninia M., Larsson M., Hansson B.S., Ignell R., 2007. Natural odor ligands for olfactory receptor neurons of the female mosquito *Aedes aegypti*: use of gas chromatography-linked single sensillum recordings. *J. Exp. Biol.* 211, 3020-3027.

Gilmer, T. M., Erikson, R. L., 1981. Rous sarcoma virus transforming protein, p60src, expressed in *E. coli*, functions as a protein kinase. *Nature.* 294,771-773.

Guan, K., Haun, R. S., Watson, S. J., Geahlen, R. L., Dixon, J. E., 1990. Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87,1501- 1505.

Gulia-Nuss, M., Robertson, A. E., Brown, M.R., Strand, M.R., 2011. Insulin-like peptides and the target of rapamycin pathway coordinately regulate blood digestion and egg maturation in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS One.* 6, e20401.

Hagedorn, H.H., 1974. The control of vitellogenesis in the mosquito, *Aedes aegypti*., *Am. Soc. Zool.* 14, 1207-1217.

Hansen, I.A., Attardo, G.M., Park, J.H., Peng, Q., Raikhel, A.S. 2004. Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101, 10626-10631.

Hansen, I.A., Attardo, G.M., Roy, S.G., Raikhel, A.S., 2005. Target of rapamycin-dependent activation of S6 kinase is a central step in the

transduction of nutritional signals during egg development in a mosquito. *J. Biol. Chem.* 280, 20565-20572.

Hardie, D. G., 2003. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*.144, 5179-83.

Hardie DG. 2011. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* Sep 15;25(18):1895-908.

Hemingway, J., Ranson, H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol.* 45, 371-391.

Holt, R. A., Subramanian, G. M., Halpern, A., Sutton, G. G., Charlab, R., Nusskern, D. R., Wincker, P., Clark, A. G., Ribeiro, J. M., Wides, R., Salzberg, S. L., Loftus, B., Yandell, M., Majoros, W. H., Rusch, D. B., Lai, Z., Kraft, C. L., Abril, J. F., Anthouard, V., Arensburger, P., Atkinson, P. W., Baden, H., de Berardinis, V., Baldwin, D., Benes, V., Biedler, J., Blass, C., Bolanos, R., Boscus, D., Barnstead, M., Cai, S., Center, A., Chaturverdi, K., Christophides, G. K., Chrystal, M. A., Clamp, M., Cravchik, A., Curwen, V., Dana, A., Delcher, A., Dew, I., Evans, C. A., Flanigan, M., Grundschober-Freimoser, A., Friedli, L., Gu, Z., Guan, P., Guigo, R., Hillenmeyer, M. E., Hladun, S. L., Hogan, J. R., Hong, Y. S., Hoover, J., Jaillon, O., Ke, Z., Kodira, C., Kokoza, E., Koutsos, A., Letunic, I., Levitsky, A., Liang, Y., Lin, J. J., Lobo, N. F., Lopez, J. R., Malek, J. A., McIntosh, T. C., Meister, S., Miller, J., Mobarry, C., Mongin, E., Murphy, S. D., O'Brochta, D. A., Pfannkoch, C., Qi, R., Regier M. A., Remington, K., Shao, H., Sharakhova, M. V., Sitter, C. D., Shetty, J., Smith, T. J., Strong, R., Sun, J., Thomasova, D., Ton, L. Q., Topalis, P., Tu, Z, Unger, M. F., Walenz, B., Wang, A., Wang, J., Wang, M., Wang, X., Woodford, K. J., Wortman, J. R., Wu, M., Yao, A., Zdobnov, E. M., Zhang, H., Zhao, Q., Zhao, S., Zhu, S. C., Zhimulev, I., Coluzzi, M., della Torre, A., Roth, C. W., Louis, C., Kalush, F., Mural, R. J., Myers, E. W., Adams, M. D., Smith, H. O., Broder, S., Gardner, M. J., Fraser, C. M., Birney, E., Bork, P., Brey, P. T., Venter, J. C., Weissenbach, J., Kafatos, F. C., Collins, F. H., Hoffman, S. L., 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science.* 298,129-149.

Jablonka, W., Senna, R., Nahu, T., Ventura, G., Menezes, L., Silva-Neto, M. A., 2011. A transient increase in total head phosphotyrosine levels is observed

upon the emergence of *Aedes aegypti* from the pupal stage. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 106, 546-552.

Johnson, P., Cross, J. L., 2009. Tyrosine phosphorylation in immune cells: direct and indirect effects on toll-like receptor-induced proinflammatory cytokine production. Crit. Rev. Immunol. 29,347-67.

Kandel, E. 2000 Principles of Neural Science. McGraw-Hill Medical, 4 edition.

Kirstein, J., Turgay, K., 2005. A new tyrosine phosphorylation mechanism involved in signal transduction in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 9,182-188.

Kokoza, V., Ahmed, A., Cho, W. L., Jasinskiene, N., James, A. A., Raikhel, A., 2000. Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97, 9144-9149.

Kokoza, V., Ahmed, A., Woon Shin, S., Okafor, N., Zou, Z., Raikhel, A.S. 2010. Blocking of Plasmodium transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 107, 8111-8116.

Kolmodin, K., Aqvist, J., 2001. The catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases. Febs Letter. 498,208 – 213.

Krieger, M. J., Jahan, N., Riehle, M. A., Cao, C., Brown, M. R. 2004. Molecular characterization of insulin-like peptide genes and their expression in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. Insect Mol Biol. 13,305-315.

Kwon, H. B., Kim, S. H., Kim, S. E., Jang, I. H., Ahn, Y., Lee, W. J., Choi, K. Y., 2002. Drosophila extracellular signal-regulated kinase involves the insulin-mediated proliferation of Schneider cells. J. Biol. Chem. 277,14853-14858.

Lemaitre, B., Hoffman, J. 2007. The host defense of *Drosophila Melanogaster*. *Annual Review of Immunology* 25:697-743

Lim WA, Pawson T. Phosphotyrosine signaling: evolving a new cellular communication system. *Cell*. 2010 Sep 3;142(5):661-7.

Maciel-De-Freitas, R., Codeço, C. T., Lourenço-De-Oliveira, R., 2007. Body size-associated survival and dispersal rates of *Aedes aegypti* in Rio de Janeiro. *Med. Vet. Entomol.* 21, 284-292.

Maciel-de-Freitas, R., Koella, J. C., Lourenço-de-Oliveira, R., 2011. Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 105, 452-458.

Mann, M., Ong, S. E., Grønborg, M., Steen, H., Jensen, O. N., Pandey, A. 2002. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* 20, 261-268.

Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T., Sudarsanam, S., 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 27, 514-520.

Matsumoto, Y., Sumiya, E., Sugita, T., Sekimizu, K., 2011. An invertebrate hyperglycemic model for the identification of anti-diabetic drugs. *PLoS One.* 6, e18292.

Melo, A.C., Rützler, M., Pitts, R.J., Zwiebel, L.J., 2004. Identification of a chemosensory receptor from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, that is highly conserved and expressed in olfactory and gustatory organs. *Chem. Senses.* 29, 403-410.

Meola R. W., Petralia R. S., 1980. Juvenile hormone induction of biting behavior in *Culex* mosquitoes. *Science* . 209, 1548-1550.

Mihaylova, M.M., Shaw, R.J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.* 2011 Sep 2;13(9):1016-23.

Morrison, D.K., Murakami, M.S., Cleghon, V. Protein kinases and phosphatases in the *Drosophila* genome. *J Cell Biol.* 2000 Jul 24;150(2):F57-62.

Lehane, M.J., 2005. Blood Sucking insects. Cambridge University Press. 2 edition

Muda, M., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Clemens, J. C., Dixon, J. E., 2002. Use of double-stranded RNA-mediated interference to determine the substrates of protein tyrosine kinases and phosphatases. *Biochem. J.* 366,73-77.

Muir, L. E., Kay, B. H., 1998. *Aedes aegypti* survival and dispersal estimated by mark-release-recapture in northern Australia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 277-282.

Mustelin, T., Vang, T., Bottini, N., 2005. Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 5,43-57.

Nagasawa H, Kataoka H, Isogai A, Tamura S, Suzuki A, Mizoguchi A, Fujiwara Y, Suzuki A, Takahashi SY, Ishizaki H., 1986. Amino acid sequence of a prothoracicotropic hormone of the silkworm *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:5840-5843.

Nakagawa, T., Vosshall, L.B., 2009. Controversy and consensus: noncanonical signaling mechanisms in the insect olfactory system. *Curr Opin Neurobiol.* 19, 284-292.

Nene, V., Wortman, J. R., Lawson, D., Haas, B., Kodira, C., Tu, Z. J., Loftus, B., Xi, Z., Megy, K., Grabherr, M., Ren, Q., Zdobnov, E. M., Lobo, N. F., Campbell, K. S., Brown, S. E., Bonaldo, M. F., Zhu, J., Sinkins, S. P., Hogenkamp, D. G., Amedeo, P., Arensburger, P., Atkinson, P. W., Bidwell, S., Biedler, J., Birney, E., Bruggner, R. V., Costas, J., Coy, M. R., Crabtree, J., Crawford, M., Debruyn,

B., Decaprio, D., Eiglmeier, K., Eisenstadt, E., El-Dorry, H., Gelbart, W. M., Gomes, S. L., Hammond, M., Hannick, L. I., Hogan, J. R., Holmes, M. H., Jaffe, D., Johnston, J. S., Kennedy, R. C., Koo, H., Kravitz, S., Kriventseva, E. V., Kulp, D., Labutti, K., Lee, E., Li, S., Lovin, D. D., Mao, C., Mauceli, E., Menck, C. F., Miller, J. R., Montgomery, P., Mori, A., Nascimento, A. L., Naveira, H. F., Nusbaum, C., O'leary, S., Orvis, J., Perteza, M., Quesneville, H., Reidenbach, K. R., Rogers, Y. H., Roth, C. W., Schneider, J. R., Schatz, M., Shumway, M., Stanke, M., Stinson, E. O., Tubio, J. M., Vanzee, J. P., Verjovski-Almeida, S., Werner, D., White, O., Wyder, S., Zeng, Q., Zhao, Q., Zhao, Y., Hill, C. A., Raikhel, A. S., Soares, M. B., Knudson, D. L., Lee, N. H., Galagan, J., Salzberg, S. L., Paulsen, I. T., Dimopoulos, G., Collins, F. H., Birren, B., Fraser-Liggett, C. M., Severson, D. W., 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*. 316, 1718-1723.

Niebylski, M. L., Craig, G. B. Jr., 1994. Dispersal and survival of *Aedes albopictus* at a scrap tire yard in Missouri. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 10, 339-343.

Noriega, F.G., 2004. Nutritional regulation of JH synthesis: a mechanism to control reproductive maturation in mosquitoes? *Insect Biochem Mol Biol.* 34, 687-693.

Noguchi, T., Tanaka, T., 1995. Insulin resistance in obesity and its molecular control. *Obes Res. Suppl 2*:195S-198S.

Nunes, R. D. e cols. Em preparação. Polyphenols modulate AMPK pathway and enhance mosquito lifespan.

Oldham, S., 2011. Obesity and nutrient sensing TOR pathway in flies and vertebrates: Functional conservation of genetic mechanisms. *Trends Endocrinol Metab.* 22, 45-52.

OMS - <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>

Raikhel, A. S., Dhadialla, T. S., 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 217-251.

Riehle, M. A., Brown, M. R., 1999. Insulin stimulates ecdysteroid production through a conserved signaling cascade in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 855-860.

Riehle, M. A., Fan, Y., Cao, C., Brown, M. R., 2006. Molecular characterization of insulin-like peptides in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: expression, cellular localization, and phylogeny. *Peptides*. 27,2547-2560.

Roy, S.G., Raikhel, A.S., 2012. Nutritional and hormonal regulation of the TOR effector 4E-binding protein (4E-BP) in the mosquito *Aedes aegypti*. *FASEB J.* 26, 1334-1342.

Sargsyan, V., Getahun, M.N., Llanos, S.L., Olsson, S. B., Hansson BS, Wicher, D., 2011. Phosphorylation via PKC Regulates the Function of the *Drosophila* Odorant Co-Receptor. *Front. Cell. Neurosci.* 5, Epub 2011 Jun 16.

Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L.B., Touhara, K., 2008. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*. 452, 1002-1006.

Schimmack, G., DeFronzo, R. A., Musi, N., 2006. AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes Obes. Metab.* 8, 591-602.

Shiu, S.H., Li, W.H. Origins, lineage-specific expansions, and multiple losses of tyrosine kinases in eukaryotes. *Mol Biol Evol.* 2004 May;21(5):828-40.

Siden-Kiamos, I., Ecker, A., Nybäck, S., Louis, C., Sinden, R. E., Billker, O., 2006. *Plasmodium berghei* calcium-dependent protein kinase 3 is required for ookinete gliding motility and mosquito midgut invasion. *Mol Microbiol.* 60, 1355-1363.

Silva-Neto, M.A., Atella, G.C., Shahabuddin, M., 2002. Inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase blocks morphological differentiation of *Plasmodium gallinaceum* zygotes to ookinetes. *J. Biol. Chem.* 277,14085-14091.

Smith DL, McKenzie FE. 2004. Statics and dynamics of malaria infection in *Anopheles* mosquitoes. *Malar J.* Jun 4;3:13.

Starling E. H., 1905. The Croonian Lectures On The Chemical Correlation of the Functions of the Body. *The Lancet.* 166, 579-583.

Starling E. H., 1914. Discussion on the Therapeutic Value of hormones. *Proc R Soc. Med.* 7, 29-31.

Steib, B. M., Geier, M., Boeckh, J., 2001. The effect of lactic acid on odour-related host preference of yellow fever mosquitoes. *Chem Senses.* 26, 523-528.

Steinberg, G. R., Kemp, B. E., 2009. AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev.* 89, 1025-1078.

Surachetpongs, W., Pakpour, N., Cheung, K. W., Luckhart, S., 2011 Reactive oxygen species-dependent cell signaling regulates the mosquito immune response to *Plasmodium falciparum*. *Antioxid. Redox.* 14, 943-955.

Sutherland, E. W., Wosilait, W. D., 1955. Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* 175, 169–170

Takken, W., Kline, D.L., 1989. Carbon dioxide and 1-octen-3-ol as mosquito attractants. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5, 311-316.

Tatar, M., Bartke, A., Antebi, A., 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science.* 299, 1346-1351.

Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M. P., Yin, C. M., Garofalo, R. S. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*. 2001.292,107-10.

Theodosiou, A., Ashworth, A., 2002. MAP kinase phosphatases. *Genome Biology*. 3, 3009.1–3009.10.

Tonks, N. K., Charbonneau, H., Diltz, C. D., Fischer, E. H., Walsh, K. A., 1988. Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry*. 24,8695-701.

Tu, M. P., Yin, C. M., Tatar, M., 2005. Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 347-356

Van Obberghen, E., Baron, V., Delahaye, L., Emanuelli, B., Filippa, N., Giorgetti-Peraldi, S., Lebrun, P., Mothe-Satney, I., Peraldi, P., Rocchi, S., Sawka-Verhelle, D., Tartare-Deckert, S., Giudicelli, J., 2001. Surfing the insulin signaling web. *Eur. J. Clin. Invest.* 31, 966-977.

Vosshall, L. B., Hansson, B. S., 2011. A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor. *Chem. Senses*. 36, 497-498.

Vosshall, L.B., Amrein, H., Morozov, P. S., Rzhetsky, A., Axel, R., 1999. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*. 96, 725-736.

Walsh, D.A., Perkins J.P., Krebs E.G., 1968. An Adenosine 3',5' Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 243, 3763-3765.

Ward, P., Equinet, L., Packer, J., Doerig, C., 2004. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. *BMC Genomics*. 12, 5:79.

Zwiebel, L.J., Takken, W., 2004. Olfactory regulation of mosquito-host interactions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 645-652.

35

Xi Z., Ramirez J. L., Dimopoulos G. 2008. The *Aedes aegypti* Toll pathway controls dengue virus infection. *Plos pathogens*. 4:e1000098

Zou, Z., Souza-Neto, J., Xi, Z., Kokoza, V., Shin, S. W., Dimopoulos, G., Raikhel, A. 2011. Transcriptome Analysis of *Aedes aegypti* Transgenic Mosquitoes with Altered Immunity. *PLoS Pathog.* 7:e1002394.