



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO PROTEICA DE LARVAS DE *Aedes aegypti* APÓS
INTOXICAÇÃO COM O LARVICIDA *m*-PENTADECADIENIL-FENOL ISOLADO
DE SEMENTES DE *Myracrodruon urundeuva***

TEREZINHA MARIA DE SOUZA

FORTALEZA

2013

TEREZINHA MARIA DE SOUZA

**ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO PROTEICA DE LARVAS DE *Aedes. aegypti* APÓS
INTOXICAÇÃO COM O LARVICIDA *m*-PENTADECADIENIL-FENOL ISOLADO
DE SEMENTES DE *Myracrodruon urundeuva***

Dissertação submetida à Coordenação do programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho

FORTALEZA

2013


TEREZINHA MARIA DE SOUZA

**ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO PROTEICA DE LARVAS DE *Aedes. aegypti* APÓS
INTOXICAÇÃO COM O LARVICIDA *m*-PENTADECADIENIL-FENOL ISOLADO
DE SEMENTES DE *Myracrodruon urundeuva***

Dissertação submetida à Coordenação do programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica

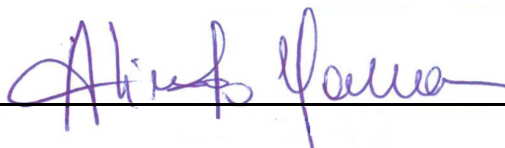
Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Renato de Azevedo Monteiro

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Às Marias da minha vida.

À minha irmã.

Ao meu marido.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. **Ana de Fátima Fontenele U. Carvalho**, pela orientação durante a graduação e o mestrado, pelas palavras sábias, pelos conselhos, pelo auxílio incondicional na minha nova jornada. Muito obrigada!

Ao professor Dr. **Arlindo de Alencar Araripe Moura**, do Laboratório de Fisiologia Animal (UFC) por ter cedido a estrutura do seu laboratório, sem a qual não seria possível realizar este trabalho. Obrigada!

À professora Dra. **Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira**, do Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais Aplicados à Saúde (UNIFOR), pelas análises finais deste trabalho, sem o qual não teria sido possível a concretização desses resultados. Muito obrigada!

Ao professor Dr. **Renato de Azevedo Monteiro**, do Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais Aplicados à Saúde (UNIFOR), pela valorosa contribuição como examinador deste trabalho. Obrigada!

À minha mãe **Maria Luzimar**, guerreira incansável das lutas diárias, que não mediu esforços para que chegássemos tão longe, e pelo apoio incondicional, que sei certo, no caminho que ainda há por vir. Obrigada, minha mãe!

À minha avó **Maria José Bomfim** (Masé Bomfim), pelo acolhimento, pelos ensinamentos, pelo amor, pelos puxões de orelha e alertas para a vida: com certeza moldaram o que sou hoje e o modelo de pessoa que quero ser. Obrigada, vó!

Ao meu avô **Bomfim**, que mesmo partindo cedo de minha vida, deixou lembranças de amor e carinho que nunca esquecerei.

À minha irmã **Izabel Cristina**, principalmente pela paciência, pela alegre convivência proporcionada, pelas palavras de motivação... Obrigada, irmã!

Ao meu marido **Geraldo Nogueira**, pelo apoio, pelas palavras de motivação nas horas mais difíceis, pela paciência, pelo amor, por me fazer tão feliz em um relacionamento que não poderia dar mais certo. Obrigada, meu amor!

Aos meus sogros **Aldemir dos Santos** e **Lucineide** (Beni) **Nogueira**, pelo acolhimento amoroso no seio de sua família e por me chamarem de “filha”. Obrigada!

À minha cunhada **Ingrid Nogueira**, pelas risadas proporcionadas por causa desse jeito meigo, mas ao mesmo tempo cheio de maturidade. Obrigada, Ding!

Aos meus tios e tias, postigos ou não, que em muito contribuíram para a minha formação, como pessoa e como profissional, em especial aos tios **Antônio de Andrade Bomfim** e **Fabíola Benevides** e **Francisco José Bomfim** (Titico) e **Celina Bomfim**.

Aos companheiros do Laboratório de Bioprospecção, antigo Fisiologia Animal. Meu ambiente de trabalho por pouco mais de 5 anos; onde conheci amigos que vou levar para toda vida, e lar de muitos aprendizados imprescindíveis. Aos que partiram em busca de outros objetivos: aos meus amigos **Bruno Soares**, **Glauber Pacelli**, **Sayonara Viana**, pelas ótimas risadas, pelo trabalho até altas horas da noite no Pici, pelo companheirismo. Aos que ficaram: **Martônio Viana**, **Davi Farias**, **Lady Clarissa** (Leidoca!), **Nathanna Mateus** (Nath!), **Luiz Carlos Almeida**, **Renata Maria Pereira** (Rennant!), meu muito obrigada pelas palavras amigas, pelas risadas, pelas conversas sérias e *interventions*, pelos conselhos, pelos cafés risonhos na copa todas as tardes, quando tirávamos uns minutos dos nossos experimentos e *papers* pra jogar conversa fora... Aos mais novos, **Nayana Soares**, **Gabrielle Freire**, **Leonardo Vieira**, **Pedro Matheus**, **Renalison Farias**, **Jackeline Medeiros** e **Thiago Almeida**, que também proporcionaram boas risadas e auxílio em muitos momentos, e pelos inúmeros “vai dar certo, Tê!” (especialmente do Sr. Léo). Obrigada a todos. E claro, à **Berenice Alves** pelo seu espírito de lutadora incansável e ativista política, que por trás desse jeito “valente” traz uma pessoa pronta pra lutar pelos seus, custe o que custar. Valeu, Berê! E ao **Valdenor**, por manter nosso ambiente de trabalho tão organizado...

Quero dizer, por fim, que o fim dessa jornada tão valorosa em minha vida não é um adeus, e sim um até logo. Amo a todos vocês!!!!

Aos integrantes do laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Zootecnia, **Jorge Matias** e **Eduardo Souza**, pelo auxílio com o temível PDQuest, com as análises estatísticas, com a digestão dos *spots*, com a análise dos espectros, enfim... com todo o trabalho! Obrigada, meninos! Obrigada especial ao **Rodrigo Oliveira** e **Érika Menezes**, pela grande

ajuda no estabelecimento do protocolo de 2D e pelas palavras de incentivo. Graças a vocês meus géis ficaram lindos! Obrigada!

Ao **Frederico Moreno** (Pepeu), do Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais Aplicados à Saúde (UNIFOR), pelo auxílio na análise dos *spots*, certamente foram essenciais. Obrigada!

Por fim, obrigada a todos que me ajudaram a findar mais essa etapa da minha vida!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições e órgãos:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,
Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal
do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,
Ceará.

Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará

Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Fortaleza, Fortaleza, Ceará

RESUMO

Atualmente, a dengue é considerada a arbovirose mais importante do mundo, emergindo em países onde a doença parecia erradicada e ressurgindo em países onde antes estava sob controle. Apesar de todos os esforços de pesquisa empreendidos na produção e desenvolvimento de uma vacina contra a doença, ainda não se dispõe de uma terapia preventiva eficaz; a única alternativa de manejo nos dias atuais se dá através do combate ao único elo vulnerável, o mosquito vetor *Aedes aegypti*. Apesar dos programas de manejo das populações de vetores disporem de várias opções de inseticidas sintéticos, o surgimento de populações resistentes apresenta-se como um entrave no controle desse mosquito vetor. Além do monitoramento dessas populações resistentes, tornou-se evidente que estudos moleculares podem ser a chave para o manejo sustentável desses vetores. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar as alterações na expressão proteica de larvas de *Ae. aegypti* tratadas com o larvicida orgânico *m*-pentadecadienil-fenol, um lipídeo fenólico isolado de sementes de *Myracrodruon urundeuva* a fim de elucidar os possíveis mecanismos de detoxificação e resposta molecular a esse composto. Para isso foi realizada eletroforese bidimensional (focalização isoeletrica seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes - SDS-PAGE) de larvas de terceiro estágio tratadas com *m*-pentadecadienil-fenol, em concentrações subletais (CL_{50} 10,16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), em comparação com um grupo controle não tratado. Treze *spots* foram identificados como diferencialmente expressos, e doze foram identificados consistentemente em bancos de dados após análise dos espectros obtidos por espectrometria de massas (ESI-Q-ToF). Após a análise das vias nas quais essas proteínas estão envolvidas, foi proposto que o larvicida *m*-pentadecadienil-fenol elicita a superexpressão de proteínas que promovem a formação de barreiras mais eficientes, e que uma vez dentro das células promove um estresse oxidativo que leva ao aumento do metabolismo de degradação lipídica, desestabilização da membrana lisossomal, aumento do metabolismo em resposta ao estresse tóxico e possivelmente resulta em morte celular programada (apoptose).

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, análise proteômica, *m*-pentadecadienil-fenol, rotas metabólicas, modo de ação, larvicida

ABSTRACT

Currently, dengue fever is considered the most important arboviral disease in the world, emerging in countries where the disease seemed eradicated and reappearing in countries where before was under control. Despite all the efforts to produce and develop a vaccine against the disease, there is not a preventive therapy. Nowadays, the disease management is through the eradication of the mosquito vector *Aedes aegypti*. Despite the several options of synthetic insecticides available for management programs of vector populations, the emergence of resistant populations is presented as an obstacle in mosquito control vector. In addition to monitoring these resistant populations, it became evident that molecular studies may be the key to the sustainable management of these vectors. Thus, the present study aimed to evaluate the changes in protein expression of *Ae. aegypti* larvae treated with the organic larvicide *m*-pentadecadienil-phenol, a phenolic lipid isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds to elucidate the putative mechanisms of detoxification and molecular response to this compound. For this, two-dimensional electrophoresis (isoelectric focusing followed by electrophoresis in polyacrylamide gel under denaturing conditions - SDS-PAGE) of third-instar larvae treated with *m*-pentadecadienil-phenol, at sublethal concentrations (LC₅₀ 10.16 microg.mL⁻¹) was performed. The results were compared to a non-treated group. Thirteen spots were identified as differentially expressed, and twelve were consistently identified in databases analysis of the spectra obtained by mass spectrometry (ESI-Q-ToF). After analysis of the pathways in which these proteins are involved, it was proposed that the larvicide *m*-pentadecadienil-phenol elicits the overexpression of proteins that promote the formation of more efficient barriers and that once inside the cells, it promotes oxidative stress which leads to increased lipid degradation metabolism, destabilization of lysosomal membrane, increased metabolism in response to stress due to the molecule's toxicity and possibly results in programmed cell death (apoptosis).

Keywords: *Aedes aegypti*, proteomics, *m*-pentadecadienil-phenol, metabolic routes, mode of action, larvicidal

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Número de casos de dengue no Brasil, no período entre 1990-2011	22
Figura 2 - Ciclo de vida de dípteros do gênero <i>Aedes</i>	24
Figura 3 - Estrutura do <i>m</i> -pentadecadienil-fenol (cardanol dieno).....	29
Figura 4 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12,5% em presença de SDS (SDS-PAGE) de proteínas totais de <i>Aedes aegypti</i> sob diferentes condições de extração e precipitação.....	48
Figura 5- Mapa proteômico bidimensional de larvas de <i>Aedes aegypti</i> (esquerda) e gel sintético gerado pelo <i>software</i> PDQuest. Foram aplicados 350 µg de proteína/tira de pH 3-10 linear e a corrida eletroforética foi realizada em géis de poliacrilamida 12,5%.	50
Figura 6 - Mapa proteômico bidimensional de larvas de <i>Aedes aegypti</i> utilizando-se tiras com faixa de pH linear variando de 3-10.	52
Figura 7 - Resultado do BLASTp (sequência proteica contra banco de dados proteicos) do <i>spot</i> 1203 utilizando-se o transcrito hipotético do gene anotado AAEL013766.....	60
Figura 8 - Representação da análise de anotação funcional para os grupos de genes ortólogos (KOGs) para todos os genes que apresentaram padrões de expressão de proteínas alterados de larvas de <i>Aedes aegypti</i> tratadas com <i>m</i> -pentadecadienil-fenol	63
Figura 9 - Mecanismo de ação proposto para o <i>m</i> -pentadecadienil-fenol após intoxicação de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de proteínas solúveis ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de soluções contendo as proteínas totais de larvas de <i>Aedes aegypti</i> extraídas com tampões English-Readdy e PBS e relação concentração de proteínas por massa seca de larvas	47
Tabela 2 - Identificação das proteínas com níveis de expressão alterados de larvas de <i>Aedes aegypti</i> tratadas com o larvicida <i>m</i> -pentadecadienil-fenol em relação ao grupo controle.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
COG	<i>Clusters of orthologous groups</i> , Cluster de grupos ortólogos
DTT	Ditiotreitol
EEB	Extrato etanólico bruto de <i>Myracrodruon urundeuva</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> , Ionização por eletrovaporação
GST	Glutathione-S-transferases
HSP	<i>Heat shock proteins</i> , Proteínas de choque térmico
KOG	<i>EuKaryotic orthologous groups</i> , Grupos ortólogos eucarióticos
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization</i> , Dessorção/ionização da matriz assistida por laser
Mr	Massa molecular
PAGE	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i> , Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampão fosfato-salino
pI	Ponto isoelétrico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
ToF	<i>Time of flight</i> , tempo de voo

LISTA DE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS

Resíduo	Símbolo de 3 letras	Símbolo de 1 letra	Massa monoisotópica (Da)	Ímônio (Da)
Ácido aspártico	Asp	D	115,027	88
Ácido glutâmico	Glu	E	129,042	102
Alanina	Ala	A	71,037	44
Arginina	Arg	R	156,101	129
Asparagina	Asn	N	114,042	87
Cisteína	Cys	C	103,009	76
Fenilalanina	Phe	F	147,068	120
Glicina	Gly	G	57,021	30
Glutamina	Gln	Q	128,058	101
Histidina	His	H	137,058	110
Isoleucina	Ile	I	113,084	86
Leucina	Leu	L	113,084	86
Lisina	Lys	K	128,094	101
Metionina	Met	M	131,040	104
Prolina	Pro	P	97,052	70
Serina	Ser	S	87,032	60
Tirosina	Tyr	Y	163,063	136
Treonina	Thr	T	101,047	74
Triptofano	Trp	W	186,079	159
Valina	Val	V	99,068	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Insetos vetores de doenças.....	18
1.2 Dengue.....	21
1.2.1 Considerações gerais.....	21
1.2.2 Vetores e ciclo de vida.....	23
1.3 Controle químico de vetores e mecanismos de resistência.....	25
1.4 <i>m</i> -pentadecadienil-fenol.....	28
1.5 Proteômica.....	30
1.5.1 Conceito e aplicação.....	30
1.5.2 Análise proteômica comparativa em insetos.....	32
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo geral.....	34
3 MATERIAIS.....	35
3.1 Material biológico.....	35
3.1.1 Sementes de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	35
3.1.2 Insetos e alojamento.....	35
3.2 Reagentes químicos.....	35
3.2.1 Reagentes para eletroforese.....	35
3.2.2 Outros reagentes.....	36
3.3 Equipamentos.....	36
4. MÉTODOS.....	37
4.1 Purificação do <i>m</i> -pentadecadienil-fenol de sementes de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	37
4.1.1 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) de <i>M. urundeuva</i>	37
4.1.2 Isolamento e purificação do <i>m</i> -pentadecadienil-fenol.....	37
4.1.2 Análise do <i>m</i> -pentadecadienil-fenol por CG/EM.....	38
4.2 Bioensaios contra <i>Aedes aegypti</i>	38
4.2.1 Ensaio larvicida e intoxicação das larvas com <i>m</i> -pentadecadienil-fenol.....	38
4.3 Análise proteômica.....	39
4.3.1 Obtenção das proteínas totais de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	39

4.3.2 Eletroforese bidimensional.....	40
4.3.3 Digitalização e análise dos géis.....	42
4.3.4 Digestão tríptica das proteínas	42
4.3.5 Identificação das proteínas por espectrometria de massas ESI-QUAD-ToF (<i>Electrospray Quadrupole Time of Flight</i>)	43
4.4 Identificação de grupos ortólogos e vias metabólicas	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Purificação do <i>m</i> -pentadecadienil-fenol de sementes de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	45
5.3 Análise proteômica	45
5.3.1 Obtenção das proteínas totais de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	45
5.3.2 Eletroforese bidimensional.....	49
5.3.3 Identificação das proteínas com níveis de expressão alterados e respectivos grupos ortólogos.....	51
6 DISCUSSÃO	64
6.1 Purificação do <i>m</i> -pentadecadienil-fenol de sementes de <i>Myracrodruon urundeuva</i> e atividade contra <i>Aedes aegypti</i>	64
6.2 Análise proteômica	66
6.2.1 Identificação das proteínas com níveis de expressão alterados e respectivos grupos ortólogos.....	67
6.3 Considerações finais	78
7 CONCLUSÃO.....	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 Insetos vetores de doenças

Vetores podem ser definidos como organismos intermediários no ciclo de um patógeno, atuando na propagação deste entre hospedeiros. Podem ser classificados como mecânicos, quando servem apenas para fim de transporte, ou biológicos, quando possuem papel importante na reprodução do patógeno (REY, 2011).

Historicamente, doenças transmitidas por vetores resultaram em inúmeras pragas, como a peste bubônica no século XIV. O agente etiológico, a bactéria *Yersinia pestis*, foi transportado da Ásia até o continente europeu através de ratos que servem como repositórios naturais desse microrganismo. As condições precárias de higiene e saneamento à época promoveram a proliferação desses roedores e conseqüentemente de seus ectoparasitas, as pulgas, que atuaram como vetores transmitindo a bactéria de ratos para humanos. Nestes, a doença mostrou-se tão letal que foi responsável pela morte de milhões de habitantes do continente europeu, chegando a 1/3 da população total (GUBLER, 2009).

Desde o final do século XIX, quando os artrópodes foram apontados como transmissores de doenças a humanos, centenas de espécies de vírus, bactérias, protozoários e helmintos foram apontados como organismos dependentes de artrópodes hematófagos para transmissão de patógenos entre hospedeiros (GUBLER, 1991). Hoje, estima-se que filariose, malária, leishmaniose, dengue, tifo, tripanossomíase e outras pragas foram as responsáveis por mais doenças humanas letais entre o século XVII e início do século XX do que todas as outras combinadas. Além disso, desde o século XIX tais doenças apresentaram-se como entraves no desenvolvimento de grandes áreas tropicais, especialmente a África; somente após o controle dessas doenças é que grandes obras, como o Canal do Panamá, puderam ser concluídas (PHILIP; ROZENBOOM, 1973).

Em geral, esses artrópodes hematófagos pertencem à classe Insecta, que inclui pulgas, piolhos, mosquitos, dentre outros. Os mosquitos, por sua vez, destacam-se pela presença em quase todos os habitats terrestres, exceto aqueles com baixas temperaturas. Das 3.500 espécies identificadas, aproximadamente 75% habitam regiões tropicais e subtropicais (REITER, 2001). Em quase todas as espécies, as fêmeas dos mosquitos obtêm as proteínas necessárias ao desenvolvimento de seus ovos através do repasto sanguíneo. Tais hospedeiros

podem ser limitados a um pequeno número de espécies ou podem estar distribuídos entre vários táxons, desde répteis a mamíferos. Durante o processo de repasto, o mosquito insere uma mistura salivar no hospedeiro que contém, entre outras substâncias, o patógeno que até então habitava as glândulas salivares do inseto. Embora muitos desses organismos sejam inócuos ao homem, alguns são patógenos de importantes doenças humanas (REITER, 2001).

Dentre essas doenças, destacam-se a malária, a dengue, filariose, febre amarela e encefalites que têm como vetores mosquitos do gênero *Anopheles* sp., *Aedes* sp. e *Culex* sp. Segundo a Organização Panamericana de Saúde, somente em 2008 foram relatados 243 milhões de casos que resultaram em 863.000 mortes, sendo as crianças africanas as maiores vítimas. Somente nas Américas, nesse mesmo ano, foram documentados 560.864 casos e 89 mortes (PAHO, 2012). Da mesma forma, a dengue também vem se destacando nos últimos anos como uma epidemia no cenário mundial: 2,5 bilhões de pessoas estão em áreas de risco. Em 2010, dos 2,2 milhões de casos relatados, 72,7% ocorreram nas Américas, dos quais 49.000 apresentaram-se na forma mais severa da doença (WHO, 2012).

No início do século XX, com a elucidação do ciclo de vida dos patógenos, os programas de saúde pública se voltaram para o controle populacional dos mosquitos vetores como medida de prevenção da transmissão do patógeno entre os hospedeiros humanos. Entre 1900 e 1950, inúmeros programas alcançaram esse objetivo através da eliminação de focos de reprodução aliado ao uso de inseticidas químicos. Em 1960, doenças transmitidas por vetores não eram mais consideradas um grande problema de saúde pública (GUBLER, 1998a).

Entretanto, os efeitos benéficos desses programas de controle tiveram uma vida curta. Doenças que pareciam erradicadas reemergiram na década de 70 e nos últimos 20 anos se intensificaram de forma assustadora (GUBLER, 1996; KROGSTAD, 1996). Embora tenha causa multifatorial, podem-se citar mudanças no cenário social e alterações inerentes aos vetores como as duas grandes causas desse processo. No cenário social, modificações de políticas de saúde pública que enfatizam programas emergenciais em detrimento de programas efetivos com visão em longo prazo, bem como mudanças no cenário econômico e demográfico, contribuíram para o aumento da população dos vetores.

A explosão populacional e a acomodação urbana não planejada favoreceu o aparecimento de novos focos de reprodução e aproximou hospedeiros sadios de contaminados, facilitando a transmissão. Mosquitos que antes habitavam florestas e perderam seus habitats em decorrência do desflorestamento migraram em direção a áreas de alta

densidade populacional, onde os hospedeiros são abundantes. Além disso, a popularização de viagens aéreas permitiu o carreamento de mosquitos dentro de aeronaves entre diferentes continentes. No que concerne à biologia do vetor, o surgimento de populações resistentes a inseticidas químicos que antes pareciam ser a solução (*e.g.* DDT) e aumento do fluxo gênico entre populações também favoreceu a proliferação de vetores resistentes (GUBLER, 1998a).

Assim, novas abordagens como rotações, mixagens e mosaicos foram propostos como ferramentas de manejo (CURTIS *et al.*, 1993). Estudos moleculares também têm sido propostos para avaliar e prever o estabelecimento de populações resistentes, com o intuito de controlar o número de casos de doenças transmitidas por esses vetores.

1.2 Dengue

1.2.1 Considerações gerais

A dengue é uma doença cujo agente etiológico é um vírus do gênero *Flavivirus*, com quatro sorotipos distintos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4), e tem como vetor mosquitos do gênero *Aedes*, como *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*.

Nas últimas quatro décadas a dengue tem sido reconhecida como uma das mais importantes doenças transmitidas por vírus, emergindo em países onde a doença parecia erradicada e ressurgindo em países onde antes estava sob controle (OOI; GUBLER, 2009). Tal fato deveu-se principalmente ao manejo inadequado do mosquito vetor, à urbanização intensa e não planejada e à dispersão intercontinental facilitada pelas viagens aéreas (SHEPARD *et al.*, 2011).

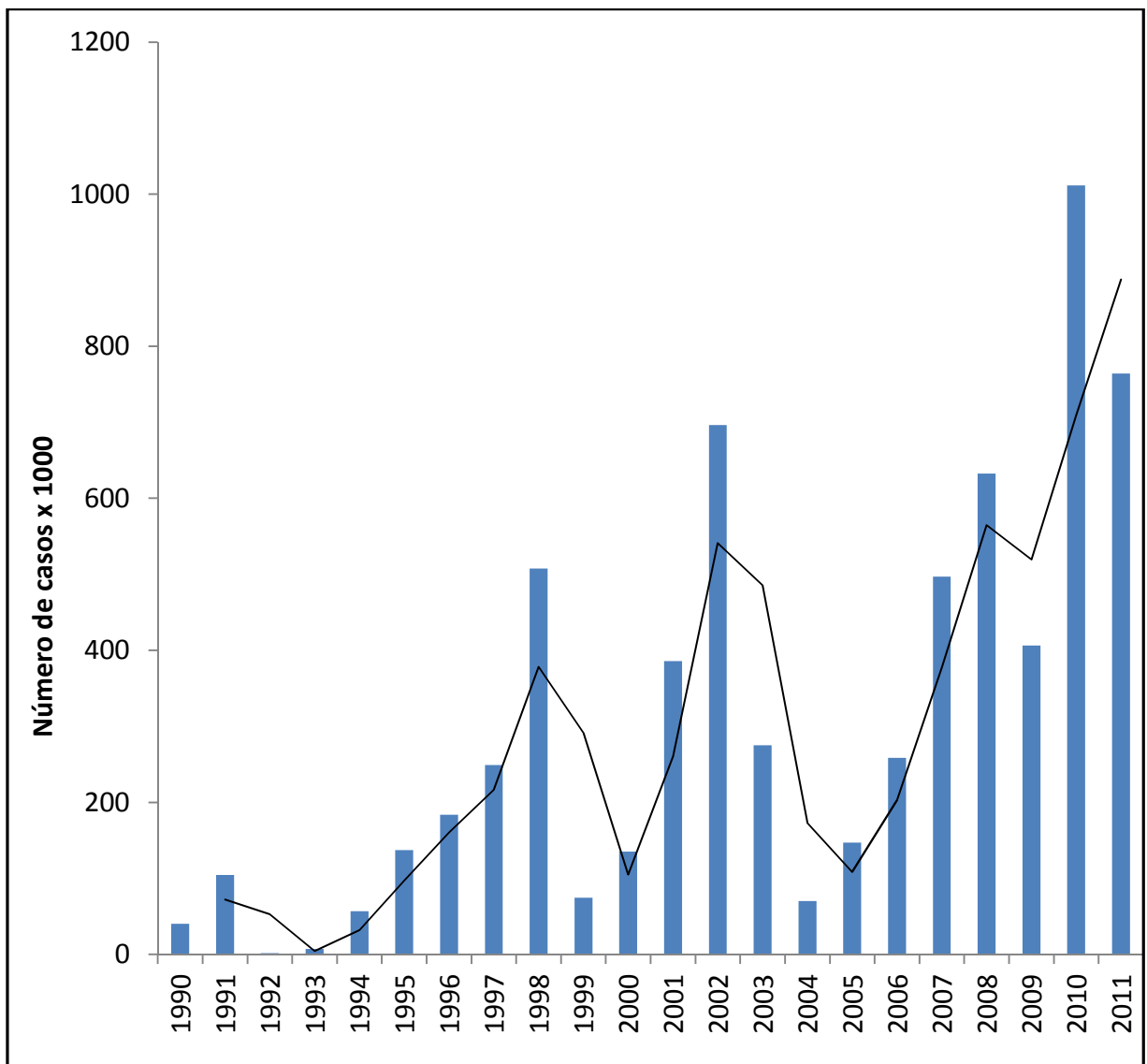
Dessa forma, cerca de três bilhões de habitantes de regiões intertropicais, bem como 120 milhões de turistas visitantes dessas áreas, são passíveis de contrair a doença. Estima-se que 50-100 milhões de pessoas sejam infectadas a cada ano, resultando em aproximadamente 24.000 mortes (SHEPARD *et al.*, 2011). Assim como no cenário mundial, a tendência de aumento do número de casos ano após ano se repete também no Brasil: desde a década de 1990 vêm ocorrendo epidemias (FIGURA 1). Durante o ano de 2010, que apresentou o maior número de casos até então, foram relatadas mais de um milhão de ocorrências; destas, 656 chegaram a óbito devido a complicações no quadro da doença (SES/SINAN, 2012).

No Ceará, até a 44ª semana epidemiológica de 2012 foram notificados 69.683 casos, sendo Fortaleza o município detentor do maior número de casos (76,8%). Comparado ao ano de 2011, os casos do corrente ano totalizam aproximadamente 84% dos casos do ano anterior (SMS/SESA, 2012).

Os custos gerados pelo tratamento de pacientes com sintomas nos casos de dengue clássica e dengue hemorrágica, especialmente no Brasil, são também notáveis: em 2010 foram gastos 1,35 milhões de dólares, 42% do custo total de todos os países da América juntos (SHEPARD *et al.*, 2011). Assim, tendo em vista a tendência no aumento de número de

casos, faz-se necessária a mobilização da população e das entidades de saúde pública a fim de controlar as epidemias que se repetem ao longo dos anos.

Figura 1 - Número de casos de dengue no Brasil, no período entre 1990-2011



Fonte: Adaptado de Secretarias Estaduais de Saúde (SES) e Sistemas de Informações de Agravos de Notificações (SINAN) (2012).

1.2.2 Vetores e ciclo de vida

Os vetores da dengue são fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* (Diptera:Culicidae), sendo apontados *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Ae. polynesiensis*, nos quais já foram isoladas o agente etiológico da doença. O principal vetor é, entretanto, *Ae. aegypti* e, em algumas regiões asiáticas, o *Ae. albopictus* apresenta uma importância secundária. Contudo, em algumas áreas rurais, o *Ae. albopictus* pode ser a espécie transmissora predominante, devido à predileção por ambientes de floresta. No Brasil, entretanto, não há evidência concreta de que *Ae. albopictus* seja vetor da doença (BRAGA; VALLE, 2007).

Os mosquitos se desenvolvem através de metamorfose completa e o ciclo de vida compreende quatro fases (estágios): ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto, das quais as três primeiras fases são aquáticas (FIGURA 2).

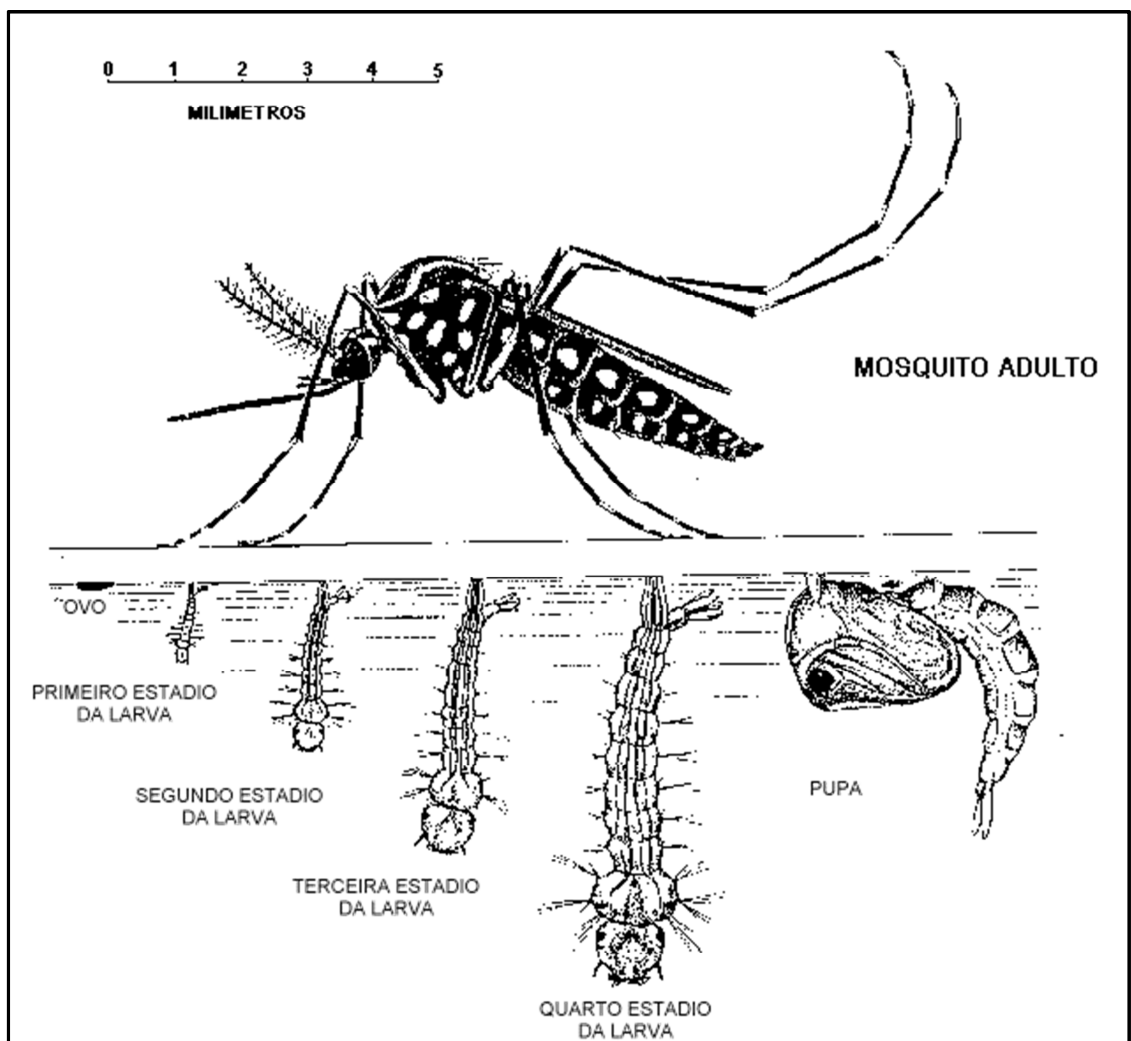
Os ovos são depositados dois a três dias após a alimentação sanguínea em superfícies úmidas logo acima da linha da água, havendo preferência por locais artificiais, comumente no peridomicílio. As fêmeas têm preferência alimentar por sangue humano em detrimento de outras espécies de mamíferos, e devido à inquietude durante a alimentação sanguínea, geralmente se alimentam de um número considerável de indivíduos, transmitindo o vírus para múltiplas pessoas em uma única refeição (GUBLER, 1998b).

As larvas são providas de grande mobilidade e não selecionam alimentos, podendo filtrar até dois litros de água por dia (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). As larvas passam por quatro estádios (L1, L2, L3 e L4), e a duração do desenvolvimento larval depende da temperatura, da disponibilidade de nutrientes e da densidade de larvas. Sob condições ótimas, o tempo necessário para completar o ciclo pode ser de somente sete dias, incluindo os dois dias da fase de pupa. A fêmea é capaz de realizar inúmeras posturas no decorrer de sua vida, mesmo copulando com um macho uma única vez, já que armazena os espermatozóides em suas espermatecas (reservatórios dentro do aparelho reprodutor) (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

Uma vez com o vírus da dengue (que pode adquirir através da picada de uma pessoa infectada), a fêmea torna-se vetor permanente da doença. As fêmeas infectadas podem transmitir o vírus a sua prole através de contaminação transovariana, mas sua importância

epidemiológica ainda não foi esclarecida (ROSEN *et al.*, 1983), embora se saiba que o vírus persiste em número suficiente para manter as gerações seguintes de mosquitos infectados (JOSHI; SHARMA, 2001).

Figura 2 - Ciclo de vida de dípteros do gênero *Aedes*



Fonte: Unicamp (2010)

1.3 Controle químico de vetores e mecanismos de resistência

Apesar de todos os esforços de pesquisa empreendidos na produção e desenvolvimento de uma vacina contra a dengue, ainda não se dispõe de uma terapia preventiva eficaz. Portanto, a única medida de manejo da doença é através do combate ao único elo vulnerável, o mosquito vetor. Entretanto, o controle e eliminação desse vetor são de difícil concretização, uma vez que essa espécie é altamente resiliente, mesmo em condições ambientais adversas. Além disso, a população de mosquitos pode rapidamente voltar aos números iniciais ainda que tenham seu ambiente perturbado por fenômenos naturais (*e.g.* condições de aridez extrema) ou por intervenções humanas (*e.g.* medidas de controle). Essas adaptações incluem a alta resistência do ovo à dessecação e a capacidade de sobrevivência na ausência de água por inúmeros meses, nas paredes de containeres ou outros recipientes que acumulem água. De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), um exemplo de resiliência e resistência dessa espécie é que mesmo após a eliminação de todas as larvas, pupas e adultos de *Ae. aegypti* de um criadouro ao mesmo tempo, a população de vetores se recuperaria em duas semanas como resultado da eclosão de novas larvas após a adição de água a contêineres contendo os ovos ou após a chegada da estação chuvosa (CDC, 2012). Apesar desses entraves biológicos que dificultam a erradicação da doença, são realizados esforços contínuos a fim de manter a população em números estáveis ou pelo menos evitar explosões populacionais que acarretam as epidemias. As medidas de controle incluem a eliminação dos criadouros potenciais, aplicação de larvicidas em depósitos de água de consumo e o uso de inseticidas para as formas adultas do mosquito, principalmente durante os períodos de transmissão (TAUIL, 2002).

O controle químico com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica é uma das metodologias mais adotadas como parte do manejo sustentável e integrado para o combate de vetores. Nessa categoria estão incluídos os organoclorados, organofosforados e piretróides.

Os organoclorados são inseticidas compostos de carbono, hidrogênio e cloro. Nesta categoria está incluso o DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil) etano), primeiro inseticida sintético utilizado em larga escala em meados do século XX no controle de dípteros vetores. Embora seu mecanismo de ação ainda não seja claramente estabelecido, sabe-se que ele atua nos canais de sódio, impedindo seu fechamento e causando alteração no

balanço dos íons sódio e potássio, impedindo a transmissão dos impulsos nervosos (WARE; WHITACRE, 2004) Entretanto, o surgimento de populações resistentes de mosquitos vetores de doenças de inúmeras espécies, e a comprovação do impacto negativo sobre o meio ambiente restringiu o seu uso e até resultou no seu banimento em diversos países (KALE *et al.*, 1999; FOGHT *et al.*, 2001).

Já os organofosforados incluem todos os inseticidas orgânicos que contêm fósforo em sua composição. Distinguem-se dos organoclorados por serem mais instáveis e, portanto, menos persistentes no ambiente, não se acumulando nos tecidos dos animais; em contrapartida, demandam uma renovação periódica de sua aplicação. São também considerados mais tóxicos para mamíferos que os organoclorados (WARE; WHITACRE, 2004). Neste grupo estão incluídos o paration, malation, fenitrothion, que atuam sobre insetos adultos, e o temephos, usado no combate às larvas e recomendado pela OMS para uso em água potável (CHAVASSE; YAP, 1997). Os organofosforados atuam fosforilando a enzima acetilcolinesterase, inativando-a de forma irreversível. Assim, impedem a interrupção do impulso elétrico, causando paralisia seguida de morte. No Ceará, os primeiros casos de resistência ao temephos foram registrados em 1999 (FUNASA, 1999), quando a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas (MoReNAa) entrou em vigor como parte do Programa Nacional de Controle à Dengue (PNCD). Apesar de ter sido proibido o seu uso em muitas cidades e realizada a substituição pelo biolarvicida *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), até 2010 o temephos ainda era utilizado em algumas cidades cearenses, incluindo Crato e Barbalha (LIMA *et al.*, 2011). Populações resistentes ao malation também foram detectadas, levando à substituição por novos inseticidas, agora da classe dos piretroides.

Os piretroides, embora tenham o mesmo mecanismo de ação dos organoclorados (através da abertura de canais de sódio dos neurônios), apresentam baixo impacto ambiental: são biodegradáveis, não cumulativos e não tóxicos para mamíferos e aves. Entretanto, em alguns casos podem causar hipersensibilidade em humanos e são considerados altamente tóxicos para animais aquáticos (BRAGA; VALLE, 2007). Nesse grupo se encaixam os adulticidas cipermetrina, deltametrina, zeta-cipermetrina, dentre outros, todos fotoestáveis.

Apesar dos programas de manejo das populações de vetores disporem de várias opções de inseticidas, o fenômeno da resistência tem se mostrado como um entrave no

controle dessas populações. “Resistência” pode ser definida como a habilidade de uma população de insetos de tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua morte (BRAGA; VALLE, 2007). Tal característica é genética; assim, alguns indivíduos podem apresentar alelos que lhe sejam favoráveis, como por exemplo, um gene que lhe confira resistência a um determinado grupo químico. Assim, as pressões seletivas impostas pelo uso contínuo desse inseticida permitem o aumento da frequência de indivíduos resistentes na população de vetores.

Inúmeros relatos de populações resistentes de *Ae. aegypti* a organofosforados e carbamatos têm se tornado recorrentes em diversos países, inclusive em cidades brasileiras (BRAGA *et al.*, 2004; LAURENTINO DE CARVALHO *et al.*, 2004). Os inúmeros estudos dos mecanismos de resistência mostram que estes são limitados e incluem, principalmente, uma diminuição na taxa de penetração do composto químico através da cutícula, detoxificação metabólica aumentada e diminuição da sensibilidade do sítio alvo (BRAGA; VALLE, 2007). Em geral esses mecanismos conferem resistência cruzada a outro inseticida estruturalmente relacionado.

De forma geral, a resistência a inseticidas é baseada em alguns mecanismos não mutuamente exclusivos: 1) mecanismos comportamentais, 2) espessamento da cutícula, 3) atividade aumentada da maquinaria metabólica e 4) mutações pontuais nos sítios alvo de inseticidas que reduzem ou eliminam a sensibilidade ao inseticida (ONSTAD, 2007; FRENCH-CONSTANT; DABORN; le GOFF, 2004; HEMINGWAY; FIEL; VONTAS, 2002; LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007).

Sob o aspecto bioquímico, a detoxificação enzimática detém o papel mais relevante: a alteração da enzima ou mesmo dos mecanismos reguladores aumentam a capacidade de metabolização dos xenobióticos. As principais enzimas pertencem ao grupo das glutathione-S-transferases (GSTs), mono-oxigenases (e.g. CYPs) e esterases (HEMINGWAY; RANSON, 2000), e atuam de forma mais eficiente em indivíduos resistentes ao se apresentarem em níveis mais altos e/ou com atividade metabólica aumentada. Lima *et al.* (2011), em um estudo de populações resistentes de *Ae. aegypti* em cidades do interior do Ceará (Crato e Barbalha), constataram que a razão de resistência ao organofosforado temephos chegou a 192.7 vezes a razão de resistência da linhagem controle Rockefeller. Além disso, 15 minutos de exposição ao piretroide cipermetrina não foi capaz de causar 100% de mortalidade em um grupo de fêmeas adultas, e foram observadas mutações (Ile1011Met) nos

canais de sódio voltagem dependentes (intrinsecamente relacionados à toxicidade de piretroides). Foram verificadas também alterações nas atividades enzimáticas: houve aumento de 1,55 vezes na atividade de α -esterases e 1,98 vezes na atividade de GSTs quando comparadas à linhagem não suscetível. Através desses resultados, torna-se evidente que os estudos moleculares podem ser a chave para o manejo sustentável desses vetores.

Segundo Li *et al.* (2007), o estudo dos mecanismos moleculares de resistência a xenobióticos (naturais ou sintéticos) é considerada uma prioridade urgente. Mais importante ainda é a utilização desses dados no desenvolvimento e implementação de programas de manejo sustentáveis.

1.4 *m*-pentadecadienil-fenol

O cardanol (MM = 300) é um fenol amplamente encontrado nas espécies vegetais da família Anacardiaceae, principalmente *Anacardium*, *Rhus* e *Mangifera*. (CORREIA *et al.*, 2006). Juntamente com o ácido anacárdico e o cardol compõem o líquido da castanha de caju (LCC), uma substância viscosa que impregna o mesocarpo da castanha e é liberado durante o processamento da amêndoa (CHAVES *et al.*, 2008).

Sua estrutura é referida como a de um lipídeo não convencional, devido à ligação entre o grupo fenol e uma cadeia alquílica com quinze carbonos (CORREIA *et al.*, 2006). A cadeia alifática pode conter até três insaturações (mono-, di- ou trieno), sendo o LCC constituído de uma mistura dessas variantes, e sua composição pode ser alterada conforme o método de extração (PRABHAKARAN; PAVITHRAN, 2000).

O cardanol é utilizado na manufatura de produtos industriais, como construção e pintura (MENON *et al.*, 1985) e como polímero (PARAMASHIVAPPA *et al.*, 2001). Na FIGURA 3 está representada a estrutura da molécula, que possui duas insaturações na cadeia alquílica, localizadas em C-8' e C-11'.

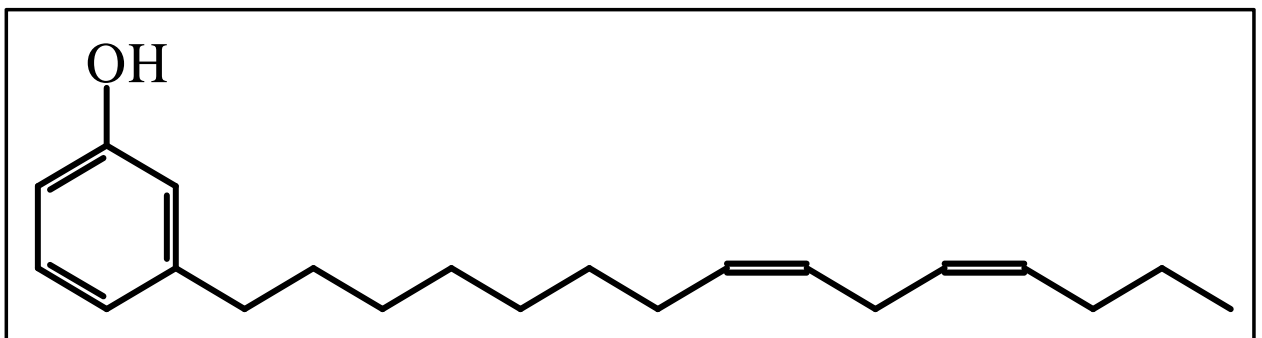
Estudos anteriores mostraram o cardanol como um potente larvicida. Segundo Oliveira *et al.* (2011), a mistura de cardanol obtida do LCC apresentou uma forte atividade larvicida contra *Ae. aegypti*, com uma LC_{50} de 8,20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Souza, T.M. *et al.* (2012), após purificação do cardanol com duas insaturações (*m*-pentadecadienil-fenol) de sementes de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão), constataram que além da potente atividade larvicida (LC_{50} 10,16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), o composto também apresenta atividade inibitória de eclosão

dos ovos (IC_{50} 49,79 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e pupicida (IC_{50} 99,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) contra o mesmo organismo. Este trabalho relatou pela primeira vez a presença deste composto em sementes de *M. urundeuva*, embora outros estudos tenham revelado a presença dessa substância em frutos de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-mansa), ambas pertencentes à família Anacardiaceae (STAHL; KELLER; BLINN, 1983).

Estudos de toxicidade contra organismos não alvo demonstram que a fração rica em *m*-pentadecadienil-fenol não é deletéria a mamíferos, não apresentando toxicidade contra camundongos fêmeas ($DL_{50} > 5.000 \text{ mg.kg}^{-1}$). Já o *m*-pentadecadienil-fenol isolado, apesar de apresentar-se altamente tóxico contra o microcrustáceo marinho *Artemia* sp. (LC_{50} 1,47 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), não causou hemólise de hemácias em amostras de sangue humano dos tipos A, B, O, nem em amostras de sangue de coelho (dados não publicados).

Assim sendo, tais estudos têm reforçado a eficácia do *m*-pentadecadienil-fenol como um larvicida passível de ser incorporado aos programas de manejo ao vetor da dengue, tendo em vista a facilidade de obtenção, a biodegradabilidade e a baixa atividade tóxica contra mamíferos quando comparada à atividade tóxica contra o vetor alvo, *Ae. aegypti*. Tendo em vista esta aplicabilidade em campo, estudos moleculares visando ao melhor entendimento dos processos que culminam com a morte da larva são necessários para melhorar o manejo e controle das populações submetidas ao tratamento com essa substância.

Figura 3 - Estrutura do *m*-pentadecadienil-fenol (cardanol dieno)



1.5 Proteômica

1.5.1 Conceito e aplicação

A proteômica visa à análise do conteúdo de proteínas de uma célula, tecido ou organismo. Ela se destaca como uma vertente única da biologia molecular porque lida com a análise simultânea de várias proteínas, distanciando-se da abordagem clássica, na qual uma proteína é isolada por vez e então caracterizada (KRAJ; SILBERRING, 2008). Estabelecida em 1985 como um conjunto de metodologias para identificar proteínas em larga escala, vem se expandindo desde então em diversas áreas com o desenvolvimento de métodos rápidos e ultrasensíveis para a separação de proteínas, bioinformática, cristalografia e espectroscopia (KRAJ; SILBERRING, 2008).

Embora a genômica tenha sido imprescindível para a biologia molecular ao fornecer o diagrama dos possíveis produtos gênicos - as proteínas -, é importante salientar, que desde o início do Projeto Genoma na década de 1990 tornou-se evidente que o comportamento desses produtos gênicos seria difícil ou até impossível de prever apenas com as informações da sequência do DNA, uma vez que um mesmo gene pode codificar diferentes polipeptídeos. Isso se deve ao fato de que alguns transcritos eucarióticos produzem RNA's mensageiros (mRNA) que podem ser processados em mais de uma forma para produzirem diferentes mRNA's, e assim diferentes polipeptídeos: transcritos complexos podem ter mais de um sítio para clivagem e poliadenilação ou padrões de *splicing* alternativo ou ambos (NELSON; COX, 2011). A escolha de diferentes sítios de clivagem para adição de 80-250 resíduos de adenina (poliadenilação) gera, por exemplo, a diversidade nos domínios variáveis de das cadeias pesadas das imunoglobulinas (SCHIBLER; MARCU; PERRY, 1978; TAKAGAKI; MANLEY, 1998). Os padrões de *splicing* produzem variantes proteicas distintas funcional e estruturalmente através da retirada de éxons em diferentes arranjos. Através desse processo são produzidas três formas diferentes de uma cadeia pesada de miosina nos diferentes estágios de desenvolvimento de *Drosophila melanogaster* a partir de um mesmo transcrito primário (BERNSTEIN *et al.*, 1986). Ambos os mecanismos (poliadenilação e *splicing* alternativo) atuam em conjunto quando um único transcrito de RNA é processado diferentemente para produzir dois hormônios distintos: o hormônio regulador de cálcio (calcitonina) na tireoide do rato e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) no cérebro do rato (LEFF; EVANS; ROENFELD, 1987). Existem muitos

padrões de *splicing* alternativo e muitos, talvez a maioria dos genes nos genomas de mamíferos, estão sujeitos ao *splicing* alternativo, aumentando substancialmente o número de proteínas por eles codificadas (BLENCOWE, 2006).

Assim, a detecção direta dos níveis das proteínas de um determinado sistema (célula, tecido ou órgão) reflete o ambiente e torna-se uma vantagem evidente ao detectar as mudanças que ocorrem após o passo de transcrição e tradução, dando respostas concretas sobre níveis de expressão proteica. Tais estudos também podem auxiliar na criação de mapas que representam a localização dessas proteínas em reações celulares (DHINGRA *et al.*, 2005). E, uma vez que o proteoma tem uma natureza muito dinâmica em resposta aos estímulos internos e externos, a definição mais apropriada para o termo seria o complemento proteico de um determinado sistema em um determinado momento, incluindo todo o conjunto de isoformas e modificações proteicas (de HOOG; MANN, 2004).

Dentre ferramentas que foram desenvolvidas para abordar o estudo do proteoma se encontra aquela que consiste de três etapas principais: 1. separação de proteínas através de eletroforese bidimensional (2-DE), 2. identificação destas por espectrometria de massas e 3. extração de informações de bancos de dados através da Bioinformática. A eletroforese bidimensional é um método fundamental de separação e identificação de proteínas, pois possibilita a visualização de um grande número de proteínas simultaneamente e suas diferentes isoformas (HAYNES; YATES, 2000; LOW; SEOW; CHUNG, 2002). Neste método, na primeira dimensão um *pool* proteico é submetido à focalização isoelétrica em tiras de pH imobilizado, durante a qual as proteínas são separadas entre si por seus pontos isoelétricos (pI). Na segunda dimensão, as proteínas são separadas em gel de poliacrilamida (PAGE) por suas massas moleculares (MM) (GÖRG *et al.*, 2009). Os polipeptídeos são então identificados nos géis após a coloração como pequenos pontos (*spots*), que podem conter isoformas com coordenadas específicas de pI e massa molecular.

No contexto da proteômica comparativa, onde o objetivo é observar diferenças qualitativas e quantitativas entre amostras proteicas, a técnica de 2-DE em geral é o método de escolha e gera dados em um formato que possibilita boa avaliação visual (com a observação do aparecimento ou desaparecimento dos *spots*) e comparações quantitativas (por meio da intensidade dos *spots*, medida por ferramentas de bioinformática).

Melhorias na área de identificação de produtos biológicos através da espectrometria de massas (MS), também promoveram o avanço da proteômica. O método de

MS baseia-se na mensuração da relação carga massa (m/z) de íons na fase gasosa, e embora seja um método destrutivo, isto é, a amostra é consumida durante o processo, tudo isto é suplantado pela velocidade, acurácia e sensibilidade da técnica (JONSSON, 2001). As técnicas de ionização desenvolvidas para ionização de proteínas e peptídeos dividem-se em duas categorias que incluem o MALDI (*Matrix-assisted laser desorption ionization* - desorção/ionização a laser auxiliada por matriz) e o ESI (*Electrospray ionization* – ionização por eletrovaporização). Combinados com os analisadores de massa, como o TOF (*time-of-flight* – tempo de voo) e quadrupolos (Q), houve um aumento na sensibilidade e acurácia (AEBERSOLD; MANN, 2003).

Somando-se a isso, as ferramentas de bioinformática tornaram-se parte fundamental dos estudos proteômicos. Programas de computador facilitaram a análise simultânea de vários géis em um período de tempo razoável, e inúmeros bancos de dados com informações sobre proteínas já sequenciadas e identificadas permitiram o fácil reconhecimento desses produtos biológicos (*e.g.* NCBI, TrEMBL, Swiss-Prot).

1.5.2 Análise proteômica comparativa em insetos

Um dos primeiros estudos envolvendo a análise proteômica comparativa em insetos foi o de Levy, Bulet e Ehret-Sabatier (2004), no qual foi realizada a caracterização das proteínas da hemolinfa de *Drosophila melanogaster* entre um grupo não tratado e um grupo infectado com bactérias ou fungos após horas de inoculação desses micro-organismos. Em um estudo similar, Vierstraete *et al.* (2003), analisam o proteoma da hemolinfa do mesmo organismo minutos após desafio com leveduras e bactérias. Em ambos os estudos os autores foram capazes de identificar flutuações nos níveis de uma proteína em particular, e foram também capazes de lhes atribuir um papel funcional, como por exemplo, antimicrobianos responsivos a stress oxidativo.

Desde então, alguns trabalhos enfocando o estudo comparativo do proteoma entre grupos submetidos a algum tratamento e um grupo controle de organismos já foram publicados (BIRON *et al.*, 2005; LEFEVRE *et al.*, 2007; BAYYAREDY *et al.*, 2009; PATRAMOOL *et al.*, 2011; CANCINO-RODEZNO *et al.*, 2012; DUNCAN *et al.*; 2012).

Tais trabalhos abordam principalmente a resposta dos insetos a infecções por micro-organismos. Biron *et al.* (2005) observaram o efeito da infecção do microsporídeo *Vavraia culicis* sobre as proteínas de larvas de *Ae. aegypti*, encontrando cerca de 30 proteínas que tiveram suas expressões alteradas em relação ao grupo controle. Duncan *et al.* (2012), ao infectar larvas de *Ae. aegypti* com duas espécies de microsporídios, parasitas naturais dessa espécie, encontraram alterações nos padrões de expressões de cerca de 10 proteínas. Estudos envolvendo outros insetos vetores, como o de Lefevre *et al.* (2007), enfocam as alterações causadas pelo agente etiológico da malária, o protozoário *Plasmodium* sp., no proteoma da cabeça do inseto vetor da doença, *Anopheles gambiae*. Assim como outros estudos anteriores, também foram encontradas alterações que podem apontar o modo de ação.

Tendo em vista esses resultados obtidos em estudos anteriores, não há dúvida de que a proteômica pode fornecer informações relevantes acerca do modo de ação a nível celular e molecular, ao apontar alterações nos padrões de expressão de moléculas chave daquele organismo em diferentes condições. A aplicabilidade desses dados em programas de manejo de resistência a inseticidas de insetos vetores, por exemplo, é uma grande aliada na supressão de novas epidemias.

Assim, este estudo tem por objetivo o estudo proteômico de larvas de *Ae. aegypti* intoxicadas com o inseticida *m*-pentadecadienil-fenol, com o intuito de entender seu modo de ação, os possíveis mecanismos de detoxificação e as vias bioquímicas elicítadas durante o processo. Os resultados obtidos serão utilizados como subsídios em futuros estudos que possam usar essa promissora substância nos programas de controle do vetor da dengue, *Ae. aegypti*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar as alterações na expressão proteica de larvas de *Aedes aegypti* após intoxicação com o larvicida m-pentadecadienil-fenol isolado de sementes de *Myracrodruon urundeuva* como estratégia na elucidação dos mecanismos de ação larvicida.

2.2 Objetivos específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- Purificar o composto m-pentadecadienil-fenol de sementes de *M. urundeuva*;
- Avaliar a atividade larvicida do m-pentadecadienil-fenol contra larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti*;
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas após eletroforese bidimensional de larvas submetidas ao tratamento com doses subletais de m-pentadecadienil-fenol;
- Identificar as rotas bioquímicas afetadas através de ferramentas de bioinformática e a relação com o modo de ação e a resposta à intoxicação.

3 MATERIAIS

3.1 Material biológico

3.1.1 Sementes de *Myracrodruon urundeuva*

Sementes de *M. urundeuva* foram coletadas na região de caatinga arbórea no município do Crato, Ceará, no mês de agosto de 2006, e depositadas no banco de sementes do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais do Departamento de Biologia (Bioprospec). Partes aéreas da planta também foram coletadas e prensadas para posterior depósito no Herbário Prisco Bezerra e obtenção do número de voucher (EAC 4356).

3.1.2 Insetos e alojamento

As larvas em 3º estágio de *Ae. aegypti* foram obtidos da colônia de mosquitos mantida no Insetário de Culicídeos do Bioprospec. As larvas, anteriormente aos bioensaios, foram mantidas em bandejas de plástico (30 cm x 45 cm) contendo água declorinada, sendo alimentadas diariamente com ração para tartaruga (Reptolife, Alcon®, Camboriú, Brasil), sob condições ótimas para desenvolvimento, com umidade 70 - 80%, temperatura 27 – 30 °C e fotoperíodo 12 h claro/12 h escuro. Os insetos remanescentes dos experimentos foram sacrificados por fervura em água por 15 min.

3.2 Reagentes químicos

3.2.1 Reagentes para eletroforese

Os reagentes para eletroforese tris-hidroximetil aminometano (TRIS) e glicina foram obtidos comercialmente junto à Vetec Química Fina Ltda (Duque de Caxias, Brasil). Outros reagentes como a acrilamida, azul de bromofenol, coomassie G, iodoacetamida foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich Co (Saint Louis, USA).

Agarose, uréia, tirouréia, dititotreitól (DTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), glicerol, CHAPS, IPG buffer, *Immobiline strips* 3-10 lineares de 18 cm, foram obtidos junto à GE lifesciences (São Paulo, Brasil). Bisacrilamida, tetrametiletlenodiamina (TEMED) e persulfato de amônio foram obtidos junto à Amresco (Solon, EUA).

3.2.2 Outros reagentes

O fosfato de sódio monobásico e dibásico, cloreto de sódio, sacarose, ácido tricloroacético (TCA), ácido fosfórico, dimetilsulfóxido (DMSO) e sulfato de amônio, hidróxido de potássio, sílica gel G60 e sílica gel para cromatografia em camada delgada foram obtidos junto à Vetec Química Fina Ltda (Duque de Caxias, Brasil). Acetonitrila, bicarbonato de amônio, ácido trifluoroacético (TFA), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich Co (Saint Louis, EUA). O kit de precipitação de proteínas 2D-CleanUp foi adquirido junto à GE lifesciences (São Paulo, Brasil).

3.3 Equipamentos

- Concentrador a vácuo Vacufuge Plus (Eppendorf, Hamburg, Alemanha)
- Cromatógrafo a gás Shimadzu TGA-50 (Shimadzu, Kioto, Japão)
- Espectrômetro de massas Synapt G2 HDMS (Waters Co., Milford, EUA)
- Focalizador Isoelétrico Ettan IPGphor 3 (GE lifesciences, San Francisco, EUA)
- Liofilizador Edwards L4KR (Edwards B.O.C. do Brasil, São Paulo, Brasil)
- Scanner ImageScanner II (GE lifesciences, San Francisco, EUA)
- Sistema de eletroforese Ettan DaltSix (GE lifesciences, San Francisco, EUA)
- Sistema de eletroforese miniVE (GE lifesciences, San Francisco, EUA)

4. MÉTODOS

4.1 Purificação do m-pentadecadienil-fenol de sementes de *Myracrodruon urundeuva*

4.1.1 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) de *M. urundeuva*

Sementes foram moídas até a obtenção de um pó fino, e a 500 g da farinha foi adicionado 1,5 L de etanol 95%. A mistura foi então deixada em repouso à temperatura ambiente por 72 h para extração dos compostos. Foram realizadas três extrações, sendo o sobrenadante filtrado e submetido à evaporação a vácuo para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB).

4.1.2 Isolamento e purificação do m-pentadecadienil-fenol

O processo de obtenção do composto m-pentadecadienil-fenol foi realizado de acordo com o descrito previamente por Souza, T.M. *et al.* (2012). O EEB de *M. urundeuva* foi submetido a uma coluna filtrante após sua mistura homogênea com sílica G-60, sendo lavado exaustivamente com hexano e o solvente retirado por evaporação a vácuo. A fração hexânica foi submetida a um processo de transmetilação segundo o método descrito pela IUPAC (1987), com algumas modificações. A 500 mg da fração hexânica foram adicionados 5 mL de hexano e 5 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio (KOH) 0,1M. A mistura foi então incubada em banho-maria e deixada em repouso a 50 °C por 1 h. Após esse período, deixou-se a solução chegar à temperatura ambiente e adicionou-se 5 mL de hexano e 15 mL de HCl 5%. O sobrenadante (fase mais fluida) foi retirado cuidadosamente e o solvente evaporado, obtendo-se assim a fração saponificável da fração transmetilada.

A fração saponificável foi submetida a uma coluna cromatográfica contendo sílica G-60 como adsorvente e as frações eluídas com partições hexano:clorofórmio. O perfil dos constituintes foi realizado através de cromatografia em camada delgada (CCD) de cada uma das frações eluídas da coluna. Frações com perfis iguais foram reunidas, tiveram o solvente evaporado e foram testadas quanto à atividade biológica. O m-pentadecadienil-fenol foi eluído da coluna com partição hexano:clorofórmio (70:30 v/v) e a purificação constatada

pela existência de um único *spot* após a realização de cromatografia em camada delgada e coloração com vanilina sulfúrica.

4.1.2 Análise do *m*-pentadecadienil-fenol por CG/EM

A análise química por CG/EM da fração contendo o *m*-pentadecadienil-fenol foi desenvolvida em instrumento Shimadzu TGA-50 com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 ms com dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m); gás de arraste: He (1 mL/min) no modo de velocidade linear constante. A temperatura de injeção foi de 80 °C e a temperatura do detector foi de 200°C. O espectro de massa foi obtido por impacto de elétrons a 70 eV. O composto foi identificado pelo tempo de retenção e por comparação dos espectros de massa obtidos com aqueles presentes no banco de dados (Instituto nacional de padrão tecnológico - NIST-147.198) e por comparação visual como os espectros publicados em catálogo de espectros de massas (SILVERSTEIN, 2006).

4.2 Bioensaios contra *Aedes aegypti*

4.2.1 Ensaio larvicida e intoxicação das larvas com *m*-pentadecadienil-fenol

O ensaio de avaliação da atividade larvicida contra *Ae. aegypti* foi realizado como descrito em Souza, T.M. *et al.* (2012). Vinte larvas em 3º estágio larval foram coletadas com pipetas Pasteur, colocadas em papel filtro para remover o excesso de água e então transferidas com um pincel para copos plásticos descartáveis contendo, cada um, 50 mL das soluções-teste *m*-pentadecadienil-fenol solubilizado em 1,5% de DMSO .

Os testes foram realizados em triplicata, sob condições ideais de temperatura (27 ± 2 °C) e umidade ($80\% \pm 10$), com fotoperíodo de 12h claro/12 h escuro. O número de indivíduos mortos foi contabilizado após 24 h. O controle negativo foi realizado nas mesmas condições das soluções-teste, mas esse consistia apenas de água destilada contendo DMSO 1,5%. Os dados de mortalidade obtidos foram usados para o cálculo da CL_{50} através de teste estatístico Probit (FINNEY, 1971).

A concentração letal média foi a concentração de escolha para testar alterações em nível de expressão das proteínas. Assim, as larvas foram intoxicadas com *m*-pentadecadienil-fenol por 24 h, sob as mesmas condições previamente descritas. Após esse período, as larvas vivas foram selecionadas para análises posteriores e as larvas mortas foram descartadas. Larvas do grupo controle foram sempre testadas sob as mesmas condições e concomitantemente aos experimentos com o grupo testado, a fim de minimizar os possíveis efeitos da influência ambiental sob a expressão proteica.

4.3 Análise proteômica

4.3.1 Obtenção das proteínas totais de larvas de Aedes aegypti

Inicialmente foram realizados experimentos a fim de se escolher o melhor método de obtenção de proteínas de *Ae. aegypti*. Dois tampões foram escolhidos para o processo extração de proteínas: tampão PBS pH 7,4 (0,07 M de fosfato de sódio monobásico, 0,03 M de fosfato de sódio dibásico, 1,3 M de cloreto de sódio) e tampão English-Readdy pH 7,4 (2 mM de Tris-HCl, 50 mM de sacarose). Cinquenta larvas de terceiro estágio foram utilizadas em cada teste para avaliar a eficácia de extração das proteínas. As larvas foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur, congeladas em microtubos Eppendorf® e liofilizadas. Após esse processo, as larvas liofilizadas foram maceradas em banho de gelo com o auxílio de um pistilo de microtubos em 240 µL de tampão (PBS ou English-Readdy), sendo adicionados 10 µL de PMSF 50 mM logo em seguida. Após a maceração, a suspensão foi centrifugada a 10.000 \times g, por 10 minutos a 4 °C, e ao final o sobrenadante foi retirado e o precipitado descartado. Uma alíquota de cada solução foi retirada para a dosagem de proteínas solúveis segundo a metodologia de Bradford (1976). Em seguida foram separadas duas alíquotas independentes das soluções obtidas de cada tampão: uma alíquota foi utilizada para precipitar as proteínas com solução de TCA/acetona e outra foi utilizada para precipitação de proteínas utilizando o kit 2D-CleanUp.

A precipitação com TCA/acetona foi realizada adicionando-se lentamente 600 µL de uma solução de 10% de TCA diluído em acetona gelada, agitando brevemente o microtubo paulatinamente. Em seguida a mistura foi colocada em freezer a -20 °C *overnight*, e após esse período foi centrifugada a 10.0000 \times g por 5 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente foram realizadas lavagens com acetona gelada apenas, na qual o sobrenadante foi retirado, descartado, substituído por acetona e centrifugado a $10.000 \times g$ por 5 min. à temperatura ambiente. Esse passo foi repetido três vezes. Após a última centrifugação o excesso de acetona foi retirado e o *pellet* proteico remanescente seco a vácuo. Já a precipitação com o kit 2D-CleanUp foi realizado conforme o manual do fabricante: ao tampão contendo as proteínas foram adicionados precipitante e co-precipitante, seguido de lavagens com água e tampão de lavagem. Ao final do processo de precipitação foi obtido também um *pellet* contendo as proteínas precipitadas.

Foi realizado um processo alternativo de obtenção das proteínas totais de larvas, no qual um grupo independente (400 larvas) foi macerado em nitrogênio líquido. Após a maceração, foram adicionados 1,5 mL de 10% de TCA em acetona, e a mistura foi deixada sob repouso a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. Foram realizadas lavagens com acetona gelada e ao final foi obtido também um *pellet*.

Aos *pellets* obtidos foram adicionados 60 μL de uma solução contendo 7 M de ureia e 2 M de tiorureia. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas e o sobrenadante retirado. A partir da dosagem de proteínas segundo Bradford (1976) foram separadas alíquotas contendo cada uma 15 μg de proteínas para observação do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12,5%, conforme a metodologia de Laemmli (1970), de 5 grupos distintos: 1. proteínas extraídas de larvas com tampão PBS e precipitadas com TCA/acetona; 2. proteínas extraídas de larvas com tampão PBS e precipitadas com kit 2D-CleanUp; 3. proteínas extraídas de larvas com tampão English-Ready e precipitadas com TCA/acetona; 4. proteínas extraídas de larvas com tampão English-Ready e precipitadas com kit 2D-CleanUp e 5. larvas maceradas com nitrogênio líquido seguida de precipitação com TCA/acetona.

4.3.2 Eletroforese bidimensional

A partir da escolha do melhor método de extração e precipitação das proteínas, foi realizada a eletroforese bidimensional das amostras de larvas controle e de larvas tratadas com o m-pentadecadienil-fenol.

Aos *pellets* de proteínas obtidos após extração com tampão PBS 7,4 e precipitação com kit 2D-CleanUp foram adicionadas soluções de 9 M de ureia/tiourea e a concentração de proteínas solúveis foi calculada através do método de Bradford (1976). Após ajuste de concentrações de proteína para 350 µg, foram adicionados à solução 1% de DTT, 1% de CHAPS e 0,5% de IPG *buffer* (3-10) e traços de azul de bromofenol.

A solução obtida foi então utilizada para reidratação de tiras de pH 3-10 linear imobilizado (*Immobiline strips* GE) *overnight*, sendo aplicadas 340 µL de solução de reidratação por cada tira. As tiras foram cobertas com óleo mineral a fim de se evitar a evaporação dos reagentes. Após 16 h, as tiras foram submetidas à focalização isoeletrica em focalizador Ettan IPGphor (GE) a 20 °C, sendo aplicados 28.000 Vh, 75 µA por tira, em 4 passos: *step* 500 V – 820 V/h; gradiente 500-1000 V – 800 V/h; gradiente 1000 – 5000 V – 7000 V/h; *step* 6000 V – 19380 V/h). Após a focalização, as tiras foram alocadas em tubos e mantidas em freezer até a realização da segunda dimensão.

Imediatamente antes da segunda dimensão as proteínas focalizadas nas tiras foram reduzidas com 1% de DTT em solução de equilíbrio (75 mM Tris-HCl pH 8,8, 6M de ureia, 29,3% de glicerol v/v, 2% de SDS p/v, traços de bromofenol) por 15 minutos sob agitação suave, conforme Souza *et al.* (2010). Após esse período, a solução foi descartada e em seguida foi adicionada uma solução contendo 2,5% de iodoacetamida em tampão de equilíbrio.

Após 15 min. de agitação suave em contato com o agente alquilante, as tiras foram lavadas rapidamente em tampão de corrida concentrado 10 vezes e colocadas cuidadosamente sobre os géis de poliacrilamida 12,5% em sistema de eletroforese Daltsix (GE). O espaço foi selado com solução de agarose fundida (tampão de corrida, agarose 0,5%, traços de azul de bromofenol). A amperagem inicial foi de 15 mA por gel, aumentando-se para 60 mA por gel após 1 h de corrida. Ao total foram preparados 6 géis para cada tratamento (larvas intoxicadas e não intoxicadas com m-pentadecadienil-fenol).

Após o fim da corrida, procedeu-se o processo de coloração com Coomassie coloidal, de acordo com a metodologia descrita por Candiano *et al.* (2004). Inicialmente os géis foram fixados com 30% de etanol e 2% de ácido fosfórico em água destilada (*overnight*). Após esse período, os géis foram lavados com solução de ácido fosfórico 2% por 15 minutos, sendo o processo realizado ao total de 3 vezes. Imediatamente após a análise os géis foram imersos em uma solução contendo 2% de ácido fosfórico, 18% de álcool etílico e 15% de

sulfato de amônio em água destilada por 20 min., e ao final desse período foi adicionado 2% de solução de Coomassie (2% de Coomassie G-250 com 0,2% de azida) por 72 h. Ao fim desse período, a solução foi desprezada e os géis mantidos em água destilada até a digitalização.

4.3.3 Digitalização e análise dos géis

As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando-se o ImageScanner II (GE lifesciences, São Paulo, Brasil) na resolução de 300 dpi, de acordo com a metodologia descrita por Moura *et al.* (2006). As imagens foram salvas como arquivo de extensão TIFF (.tif) e analisadas com o *software* PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, USA). A análise dos géis foi realizada de acordo com o descrito por Souza *et al.* (2010). Um gel sintético foi criado a partir dos mapas géis de cada tratamento, e os *spots* foram marcados em diferentes regiões dos géis a fim de alinhar corretamente cada *spot* nos géis de diferentes tratamentos. A análise da intensidade de cada *spot* foi realizada pelo *software* através da quantificação em partes por milhão (ppm) da densidade ótica integrada total de cada gel.

Os valores da intensidade de cada *spot* em cada um dos tratamentos foram importados para o programa estatístico Statview versão 5.0 (SAS Institute Inc., Nesbit, EUA) e submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, onde a hipótese nula era de que o *spot* pertencia a um grupo de distribuição normal. Após a análise, aqueles que não tinham distribuição normal foram normalizados. Em seguida foi realizado o teste de Tukey ($p > 0,05$) com todos os *spots* a fim de se detectar aqueles em que houve diferença significativa nos padrões de densidade ótica, indicativos proporcionais ao da densidade de proteínas naquele *spot*. Aqueles cuja densidade apresentou-se diferenciada na comparação de médias entre controle e tratamento foram conduzidos para um passo posterior de digestão e identificação das proteínas.

4.3.4 Digestão trípica das proteínas

A digestão das proteínas contidas nos *spots* foi realizada de acordo com Moura *et al.* (2006). Os *spots* selecionados foram cuidadosamente excisados com o auxílio de bisturi em secções de aproximadamente 1 mm³. Estes foram depositados em microtubos contendo

400 μL de solução de 50% de acetonitrila (ACN) em solução de bicarbonato de amônio 50 mM, sob agitação por 10 min. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem repetido. Após a terceira lavagem, os géis ficaram na solução ACN/bicarbonato de amônio por aproximadamente 16 h. Ao final desse tempo, a solução foi descartada e substituída por 200 μL de acetonitrila, e a mistura permaneceu sob agitação constante por 5 min. A acetonitrila foi então descartada e remanescentes desse solvente foram evaporados a vácuo em SpeedVac Eppendorf® (Gaithersburg, EUA) durante 30 min.

Com os pedaços de géis descorados e desidratados foi então realizada a digestão enzimática. 15 μL de solução de tripsina diluída em bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados aos microtubos contendo os géis. A mistura foi deixada em repouso por 60 min. para que a solução da enzima penetrasse completamente nos géis. Foram adicionados ainda 20 μL de bicarbonato de amônio 50 mM. Todo o procedimento foi realizado em banho de gelo. Posteriormente as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C *overnight* e em seguida deixadas sob agitação por 30 min. Após a retirada de uma alíquota de 20 μL dos microtubos, foram adicionados 30 μL de solução de extratora de peptídeos (50% de acetonitrila e 5% de ácido trifluoroacético em água destilada) e a mistura foi novamente deixada sob agitação por 30 min. Ao fim de três lavagens, a solução contendo os peptídeos extraídos foi concentrada a vácuo até um volume final de aproximadamente 10 μL e acondicionada a -4 °C até a análise.

Todo o procedimento acima foi realizado adicionalmente com um pedaço do gel em que não havia a presença de *spots* (controle negativo) e com um pedaço do gel contendo uma proteína conhecida excisada do marcador molecular utilizado (controle positivo, ovoalbumina, 45 KDa)

4.3.5 Identificação das proteínas por espectrometria de massas ESI-QUAD-ToF (Electrospray Quadrupole Time of Flight)

Para análise espectrométrica dos peptídeos obtidos, foi seguida a metodologia descrita proposta em estudos anteriores (SOUZA, C.E. *et al.* (2012). Inicialmente, as amostras digeridas foram injetadas em uma coluna UPLC C18 (75 μm \times 10 cm), com fluxo de 0.6 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os espectros foram obtidos em instrumento Synapt G2 HDMS usando uma aquisição dependente de dados onde os três picos majoritários eram submetidos a

espectrometria de massas. Fases móveis A e B consistiram de 0,1% de ácido fórmico em água e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila, respectivamente. O gradiente utilizado foi de 0 min. com 3% de B, aumentando linearmente para 30% de B em 20 min. e então aumentando para 70% de B em 40 min., permanecendo até 50 min. e no próximo minuto diminuindo para 3% de B. Os espectros obtidos foram utilizados para análise no banco de dados Mascot 2012 (Matrix Science, Boston, EUA).

Os parâmetros utilizados no modo Ion Search MS/MS incluíam a pesquisa no banco de dados NCBIr, considerando os valores de carga com +1, +2 e +3, tolerância dos fragmentos de $\pm 0,6$ KDa e tendo apenas uma clivagem perdida. As modificações variáveis foram fixadas como carbamidometilação dos resíduos de cisteína e oxidação dos resíduos de metionina. A identificação foi considerada não ambígua quando o escore da proteína foi significativo ($p < 0,05$), e pela coincidência próxima da massa molecular e pI teóricos e experimentais.

4.4 Identificação de grupos ortólogos e vias metabólicas

As sequências das proteínas identificadas de *Ae. aegypti* no banco de dados NCBI foi confirmada pelas sequências depositadas no banco de dados VectorBase. O banco de dados para grupos ortólogos (COG, *Cluster for Orthologous Groups*) para genoma completo de eucarióticos (KOG, *EuKaryotic Orthologous Groups*) foi utilizado para determinar a categoria funcional das proteínas. Todas as sequências foram submetidas a uma pesquisa do tipo BLASTp no banco de dados de KOG com uma inclusão o *e*-valor de e^{-12} e um limiar de identidade de sequência de aminoácidos de 30%.

A Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomas (KEGG) conecta a informação genômica com informações de ordem funcional (KANEHISA & GOTO, 2000). O banco de dados KEGG *Pathway* reúne inúmeros mapas metabólicos representando os diferentes processos celulares. Assim, as sequências obtidas no NCBI e confirmadas no banco de dados VectorBase foram utilizadas para análise no Servidor de Anotação Automática KEEG (KAAS) utilizando-se o parâmetro de melhor sequência bi-direcional, a fim de se obter os mapas completos das vias metabólicas nas quais as proteínas diferencialmente expressas estejam envolvidas.

5 RESULTADOS

5.1 Purificação do *m*-pentadecadienil-fenol de sementes de *Myracrodruon urundeuva*

O processo de purificação do larvicida seguiu o protocolo descrito anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa e resultou em apenas uma entidade química após a obtenção de um perfil idêntico ao obtido anteriormente, com mesmo valor de Rf (fator de retenção) após a realização de cromatografia em camada delgada e perfil de fragmentação em espectrômetro de massas idêntico ao obtido anteriormente (SOUZA, T.M. *et al.*, 2012).

Essa fração, contendo o composto, apresentou um rendimento de 1,53% e mostrou apenas um pico na análise CG/EM, com um perfil de fragmentação típico dessa molécula.

5.2 Atividade larvicida do *m*-pentadecadienil-fenol contra *Aedes aegypti*

Esse composto apresentou atividade contra todos os estágios de vida, incluindo ovo (IC_{50} 49,79 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), larva (CL_{50} 10,16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e pupa (CL_{50} 99,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo a atividade contra o 3º estágio larval a mais potente.

Assim, os estudos com este inseticida foram concentrados no estágio larval, que além de ter se apresentado como o mais susceptível ao tratamento com a molécula, é também o estágio de vida imaturo de maior duração, favorecendo a mortalidade durante esse período.

5.3 Análise proteômica

5.3.1 Obtenção das proteínas totais de larvas de *Aedes aegypti*

Inicialmente, foi escolhido o melhor método de extração e precipitação de proteínas totais de larvas de *Ae. aegypti*. Foram escolhidos dois tampões de extração (English-Readdy e PBS, ambos pH 7,4) combinados com dois métodos de precipitação (TCA/acetona e

kit 2D- CleanUp). Além disso, adicionalmente foi realizado um método de precipitação das proteínas utilizando-se TCA/acetona em larvas maceradas em nitrogênio líquido.

Na TABELA 1 estão descritas as concentrações de proteínas solúveis mensuradas após a extração com os tampões descritos acima. A partir dos valores iniciais de massa seca das larvas utilizadas, foi feita uma razão entre a concentração de proteínas solúveis após a extração com os tampões distintos e a massa seca das larvas que foram utilizadas em cada bateria de extração. Foi observado que o tampão PBS extraiu em média 30% a mais de proteínas que o tampão English-Readdy (0,30 mg de proteína por massa seca contra 0,21 de mg proteína).

Além disso, foi realizada uma eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 12,5% em presença de SDS (SDS-PAGE) de cada uma das alíquotas obtidas sob diferentes combinações de extração e precipitação de proteínas (FIGURA 4). Nas raias 2 e 3 encontram-se as amostras nas quais as proteínas foram extraídas com tampão PBS e English-Readdy, respectivamente, e precipitadas com solução TCA/acetona; nas raias 4 e 5 encontram-se as amostras nas quais as proteínas foram extraídas com tampão PBS e English-Readdy, respectivamente, e precipitadas com o kit 2D-CleanUp; e nas raias 6 e 7 as amostras nas quais as larvas foram maceradas em nitrogênio líquido e submetidas à precipitação em solução de TCA/acetona. Foi observado que, dentre os tratamentos, aqueles das raias 4 e 5 apresentaram os perfis de melhor resolução e aparentemente semelhantes em sua composição, sendo evidenciadas uma maior diversidade de bandas em relação aos outros tratamentos. Embora o tratamento das raias 6 e 7 tenha mostrado uma variedade proteica com bandas individualizadas, a diversidade é bem menor quando comparada às raias 4 e 5, especialmente na faixa entre 30 e 66 KDa. Assim, o método de extração/precipitação escolhido em testes posteriores foi composto de extração com tampão PBS seguida de precipitação com kit 2D-CleanUp.

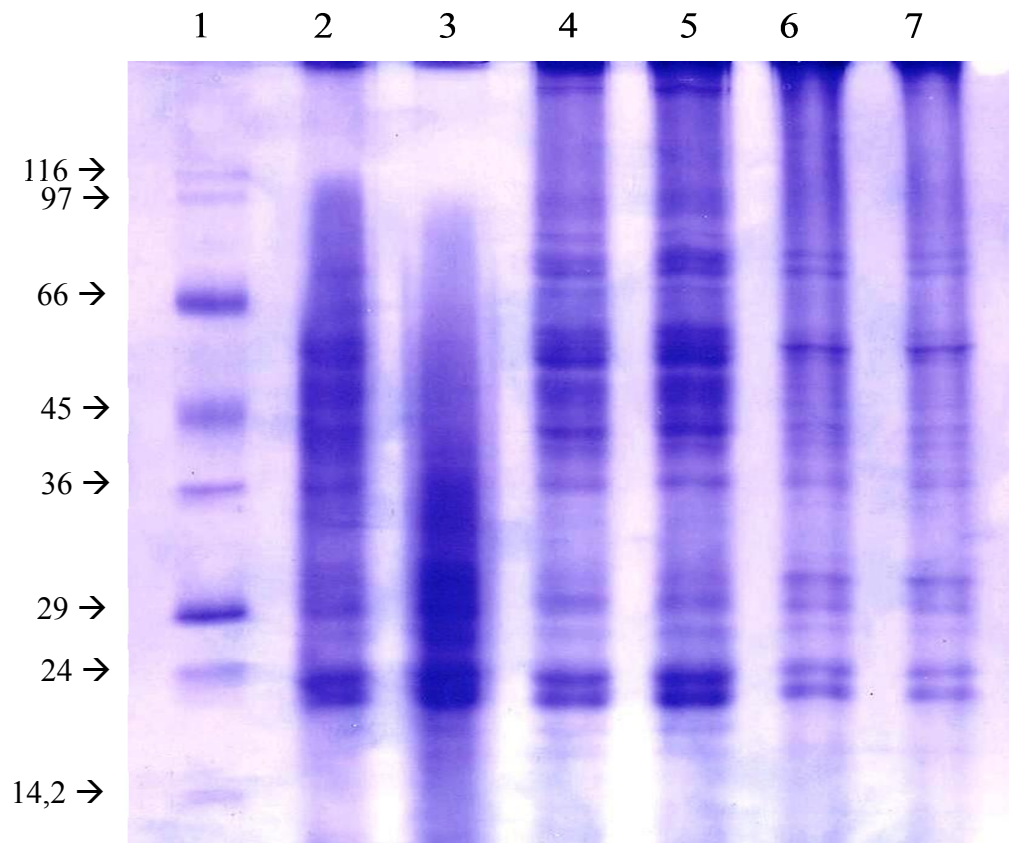
Tabela 1 - Concentração de proteínas solúveis ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de soluções contendo as proteínas totais de larvas de *Aedes aegypti* extraídas com tampões English-Ready e PBS e relação concentração de proteínas por massa seca de larvas

Tampão	Massa seca de larvas utilizadas (mg)	Concentração de proteínas solúveis ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Relação mgP por massa seca de larvas
English-Ready ¹	$2,7 \pm 0,4$	$0,58 \pm 0,05$	0,21
PBS ²	$1,8 \pm 0,28$	$0,54 \pm 0,07$	0,30

¹ Tampão English-Ready : 2mM de Tris-HCl, 50 mM de sacarose, pH 7,4.

² Tampão PBS: 0,07 M de fosfato de sódio monobásico, 0,03 M de fosfato de sódio dibásico, 1,3 M de cloreto de sódio, pH 7,4

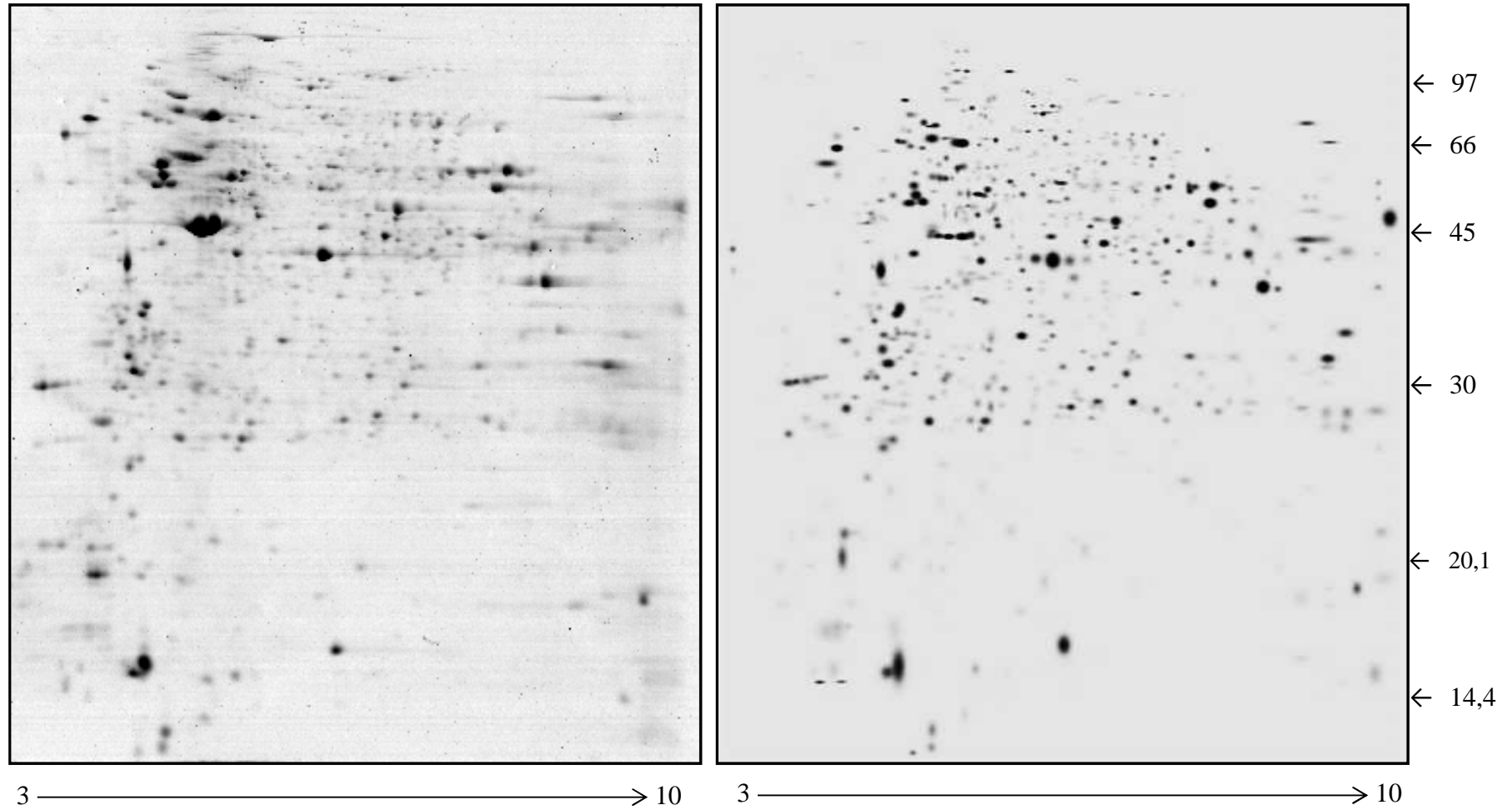
Figura 4 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12,5% em presença de SDS (SDS-PAGE) de proteínas totais de *Aedes aegypti* sob diferentes condições de extração e precipitação Raia 1: marcador molecular; Raia 2: extração com tampão PBS e precipitação com TCA/acetone; Raia 3: extração com tampão English-Readdy e precipitação com TCA/acetone; Raia 4: extração com tampão PBS e precipitação com kit 2D-CleanUp; Raia 5: extração com tampão English-Readdy e precipitação com kit 2D-CleanUp; Raias 6 e 7: larvas maceradas com nitrogênio líquido e proteínas precipitadas com TCA/acetona. Foram aplicados 15 µg de proteína/poço.



5.3.2 Eletroforese bidimensional

Após o estabelecimento do melhor protocolo de extração e precipitação das proteínas, foi também estabelecido o protocolo de focalização isoeletrica no qual os *spots* seriam visualizados distintamente, e em maior resolução. Inicialmente optou-se por uma focalização nas quais as primeiras horas seriam realizadas em baixas voltagens (500 V, 1000 V/h), com um gradiente suave até 1000 V (800 V/h), seguido de um gradiente de 1000 a 10.000 V (16.500 V/h) e por fim um *step* a 10.000 V (6.200 V/h). Entretanto, foi observado que após alcançar a voltagem máxima, a *tira* tinha o gel partido no lado básico, impedindo a focalização completa. Assim, adotou-se um método no qual a voltagem máxima seria diminuída, passando de 10.000 para 5.000, tendo por fim a seguinte configuração: *step* de 500 V – 820 V/h; gradiente 500-1000 V – 800 V/h; gradiente 1000 – 5000 V – 7000 V/h; *step* 6000 V – 19380 V/h, com o total de V/h igual a 28.000. Assim, foram realizados 6 géis de cada tratamento (grupo tratado com *m*-pentadecadienil-fenol e grupo controle) utilizando-se esses parâmetros. Em média, foram detectados 588 spots, sendo $592,8 \pm 8,61$ spots no grupo tratado e $585 \pm 8,74$ spots no grupo controle. O gel de referência e o gel sintético, gerado pelo aplicativo PDQuest estão representados na Figura 5, e apresenta todos os *spots* encontrados no gel de referência, além de outros *spots* adicionados de outros géis. Ao todo, 493 spots foram detectados consistentemente em todos os géis.

Figura 5- Mapa proteômico bidimensional de larvas de *Aedes aegypti* (esquerda) e gel sintético gerado pelo *software* PDQuest. Foram aplicados 350 μg de proteína/tira de pH 3-10 linear e a corrida eletroforética foi realizada em géis de poliacrilamida 12,5%.



5.3.3 Identificação das proteínas com níveis de expressão alterados e respectivos grupos ortólogos

Após as análises estatísticas, foram detectados 13 *spots* diferencialmente expressos, seja no grupo controle ou tratado. Destes, 12 foram identificados consistentemente em bases de dados. Na Figura 7 estão apontados os *spots* com expressão diferenciada entre os grupos. Na Tabela 3 constam informações sobre cada um dos *spots* identificados, com dados referentes às massas moleculares e pontos isoelétricos das proteínas, tanto teóricos como obtidos experimentalmente, bem como o escore e a cobertura dos peptídeos identificados por espectrometria de massas. Esses dados, aliados a um alto valor de escores individuais dos íons e um baixo valor de *expect*, permitem a identificação consistente das proteínas estudadas.

O *spot* de número 1204 foi identificado nos bancos de dados como uma proteína hipotética de *Aedes aegypti*, isto é, uma proteína cuja existência foi predita através do sequenciamento do seu genoma, sem, no entanto, ter sido comprovada a sua expressão *in vivo* (ZAREMBINSKI *et al.*, 1998). Tal proteína figura como um transcrito hipotético do gene anotado AAEL013766, e uma pesquisa BLASTp a partir da sequência predita revela a presença de 3 motivos peritrofina-A, ligantes a quitina (FIGURA 7). Os valores de massa molecular teórica (29,4 KDa), bem como o pI teórico (4,5), são muito próximos daqueles obtidos experimentalmente (Mr 29,8 e pI 3,8), e apesar da cobertura proteica dos peptídeos ter sido de apenas 7%, o peptídeo ⁽¹²⁰⁾YQCSPGLAYDR⁽¹³⁰⁾ apresenta um alto escore (82) e um baixo valor de *expect* ($3.8e^{-05}$). Tais evidências apontam, portanto, a possível identidade dessa proteína.

Figura 6 - Mapa proteômico bidimensional de larvas de *Aedes aegypti* utilizando-se tiras com faixa de pH linear variando de 3-10. Em vermelho estão marcados os spots diferencialmente expressos com os respectivos números de identificação. Foram aplicados 350 μ g de proteína/tira e a corrida eletroforética foi realizada em géis de poliacrilamida 12,5%. Barras vermelhas indicam *pixels* dos spots de géis de larvas tratadas e barras verdes de larvas controle

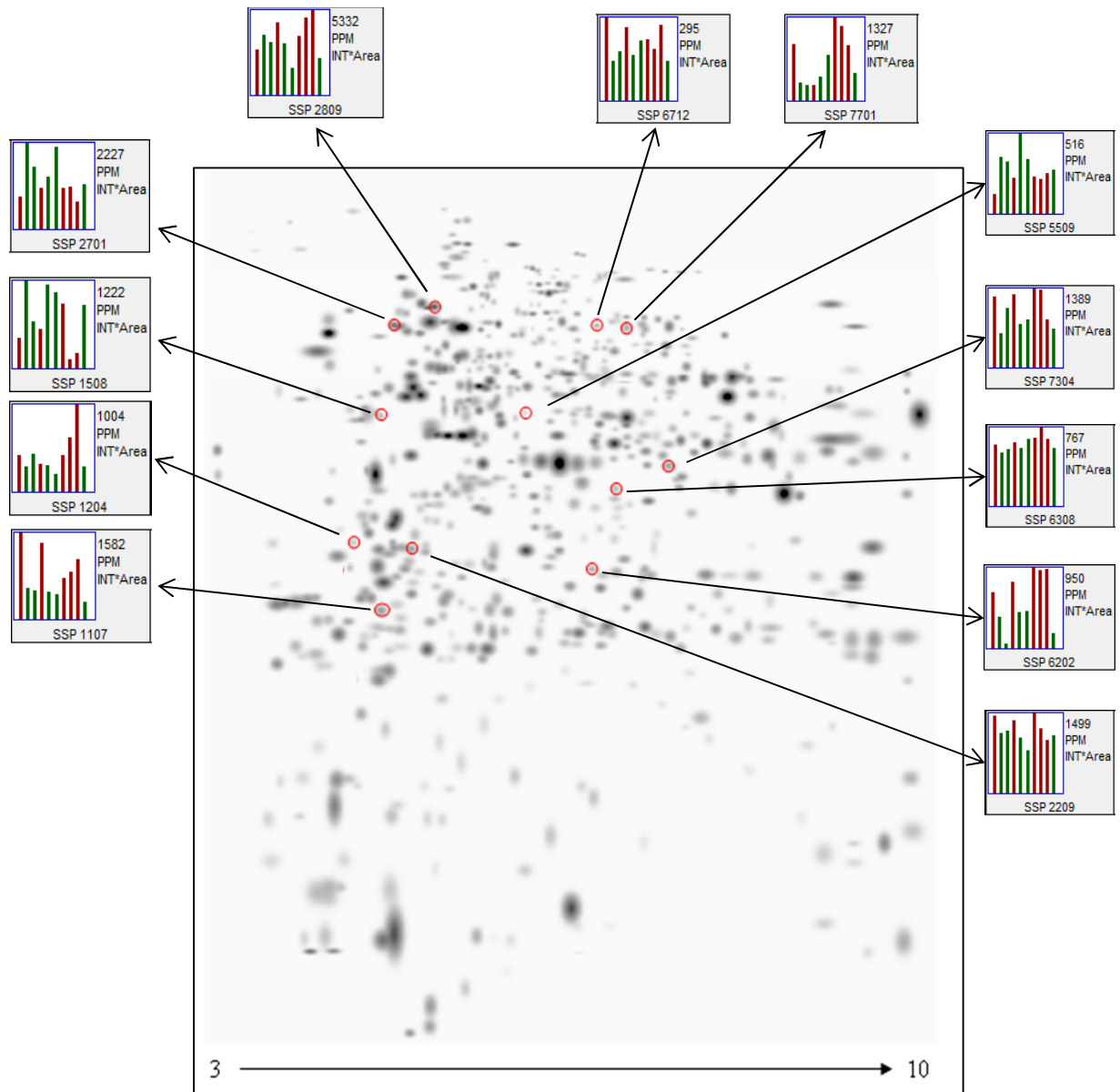


Tabela 2 - Identificação das proteínas com níveis de expressão alterados de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com o larvicida *m*-pentadecadienil-fenol em relação ao grupo controle

<i>Spot</i>	Proteína identificada	ID da proteína (gi)	Mr/pI teórico 1	Mr/pI exper. 2	Escore MS/MS	Cobertura da sequência (%)	<i>Expect</i> ³	Peptídeos correspondidos	Escore do íon ⁴
1107	Glutathiona-S-transferase teta (GST)	14495354	24,0/ 4,6	27,4/ 3,6	177	30	0.12	⁽²⁾ APIVLYHFPMSPPSR ⁽¹⁶⁾	46
							5.3	⁽¹⁷⁾ SALLVAR ⁽²³⁾	31
							72	⁽²⁴⁾ NLGLDVEVK ⁽³²⁾	19
							49	⁽³³⁾ ILNLMAGEHMQEEFVK ⁽⁴⁸⁾	19
							0.94	⁽¹¹¹⁾ AYAAVAPLMR ⁽¹²⁰⁾	38
67	⁽¹²¹⁾ QGATSIPQDK ⁽¹³⁰⁾	20							
1204	Proteína hipotética AaeL ⁵	157137284	28,9/ 4,7	29,8/ 3,8	107	7	17	⁽⁹⁶⁾ LYGIFADPAK ⁽¹⁰⁵⁾	25
							3.8e ⁻⁰⁵	⁽¹²⁰⁾ YQCSPGLAYDR ⁽¹³⁰⁾	82
1508	Proteína Rad23 de reparo por excisão	157126297	38,2/ 4,7	51,1/ 4,0	360	25	1.7e ⁺⁰²	⁽⁶⁹⁾ FVVVMNK ⁽⁷⁵⁾	15
							2.9e ⁻⁰⁶	⁽⁷⁶⁾ KPTTAPAEPAAASSATAPAESK ⁽⁹⁷⁾	92
							0.064	⁽¹⁰³⁾ SESGAQSEATAAASK ⁽¹¹⁷⁾	49
							1.1e ⁻⁰⁶	⁽¹⁵⁶⁾ ITEMGYSLEEAR ⁽¹⁶⁷⁾	97
							0.00017	⁽¹⁶⁸⁾ I ALEICDNNPDR ⁽¹⁷⁹⁾	75
6.2e ⁺⁰²	⁽²²⁴⁾ EHPTFLEMK ⁽²³²⁾	10							
43	⁽²⁴⁹⁾ IQSSNPDLMR ⁽²⁵⁸⁾	22							

Tabela 2 (CONTINUAÇÃO) - Identificação das proteínas com níveis de expressão alterados de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com o larvicida *m*-pentadecadienil- fenol em relação ao grupo controle

<i>Spot</i>	Proteína identificada	ID da proteína (gi)	Mr/pI teórico 1	Mr/pI exper. 2	Escore MS/MS	Cobertura da sequência (%)	<i>Expect</i> ³	Peptídeos correspondidos	Escore do íon ⁴
2209	Catepsina L	157132324	38,0/ 5,7	29,2/ 4,6	200	17	7.6e ⁻⁰⁶	⁽¹⁶⁶⁾ LVSLSEQNLVDCSGK ⁽¹⁸⁰⁾	88
							28	⁽²⁰⁹⁾ SYPYEAIDDTCHFNP ⁽²²⁴⁾	22
							16	⁽²³²⁾ GYVDIPQGDDEEALKK ⁽²⁴⁶⁾	25
							0.00079	⁽³²⁵⁾ DNHCGVATCASYPLV ⁽³³⁹⁾	68
2701	β-galactosidase	157106611	73,9/ 4,9	69,5/ 4,2	68	3	2.2	⁽⁴⁹¹⁾ LSILVENQGR ⁽⁵⁰⁰⁾	34
							1.4	⁽⁵⁷³⁾ GNIIDSSPIR ⁽⁵⁸³⁾	36
2809	HSP70	94468818	72,2/ 5,1	77,4/ 5,9	834	29	0.0029	⁽⁵¹⁾ VEIANDQGGR ⁽⁶¹⁾	63
							0.97	⁽⁶²⁾ ITPSYVAFTADGER ⁽⁷⁵⁾	37
							0.57	⁽⁸³⁾ NQLTTNPENTVFD ⁽⁹⁷⁾	39
							1.3e ⁺⁰³	⁽¹⁰³⁾ EFTDSTVQHDAK ⁽¹¹⁴⁾	6
							3e ⁻⁰⁵	⁽¹³⁹⁾ VFAPEEISAMVLGK ⁽¹⁵²⁾	82
							0.26	⁽¹⁵⁵⁾ ETAEAYLGK ⁽¹⁶³⁾	44
0.00066	⁽¹⁸⁵⁾ VTHAVVTVPAYFNDAQR ⁽¹⁸¹⁾	68							

Tabela 2 (CONTINUAÇÃO) - Identificação das proteínas com níveis de expressão alterados de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com o larvicida *m*-pentadecadienil- fenol em relação ao grupo controle

<i>Spot</i>	Proteína identificada	ID da proteína (gi)	Mr/pI teórico 1	Mr/pI exper. 2	Escore MS/MS	Cobertura da sequência (%)	<i>Expect</i> ³	Peptídeos correspondidos	Escore do íon ⁴
2809	HSP70	94468818	72,2/ 5,1	77,4/ 5,9	834	29	0.055	⁽¹⁸⁶⁾ DAGVIAGLNVMR ⁽¹⁹⁷⁾	50
							8.4e ⁻⁰⁵	⁽¹⁹⁸⁾ IINEPTAAAIAYGLDK ⁽²¹³⁾	54
							0.024	⁽³²⁷⁾ FEELNMDLFR ⁽³³⁶⁾	77
							0.0028	⁽³⁵⁴⁾ DVDEIVLVGGSTR ⁽³⁶⁷⁾	63
							1.9e ⁺⁰²	⁽³⁷⁷⁾ EFFNGKEPSR ⁽³⁸⁶⁾	15
							0.25	⁽⁴⁸²⁾ FDLTGIPPAPR ⁽⁴⁹²⁾	44
							0.018	⁽⁵²⁴⁾ IVITNDQNR ⁽⁵³²⁾	55
							0.36	⁽⁵³³⁾ LTPEDIER ⁽⁵⁴⁰⁾	42
1.2	⁽⁵⁶³⁾ NELESYAYSLK ⁽⁵⁷³⁾	37							
5509	Ornitina aminotransferase	157109474	52,1/ 7,9	51,4/ 6,2	107	4	0.6	⁽¹³¹⁾ IVQALTEQAK ⁽¹⁴⁰⁾	40
							0.0006	⁽⁴⁰⁹⁾ GLLNAIVINSK ⁽⁴¹⁹⁾	70
6202	Lipase	157115027	36,4/ 5,1	27,4/ 7,1	180	8	0.0026	⁽⁷³⁾ RNPVHEQLIR ⁽⁸²⁾	64
							8.3e ⁻⁰⁵	⁽¹⁵²⁾ VGGVGMIVSR ⁽¹⁶¹⁾	79
							0.35	⁽³²⁹⁾ TNAQSPFAR ⁽³³⁷⁾	43

Tabela 2 (CONTINUAÇÃO) - Identificação das proteínas com níveis de expressão alterados de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com o larvicida *m*-pentadecadienil- fenol em relação ao grupo controle

<i>Spot</i>	Proteína identificada	ID da proteína (gi)	Mr/pI teórico 1	Mr/pI exper. 2	Escore MS/MS	Cobertura da sequência (%)	<i>Expect</i> ³	Peptídeos correspondidos	Escore do íon ⁴
							0.14	⁽²⁹⁾ RLPNFEDR ⁽³⁶⁾	47
							3.7	⁽³⁷⁾ VTMYVFEEMIDGK ⁽⁴⁹⁾	31
							0.04	⁽⁵¹⁾ LTEIINTTHENVK ⁽⁶³⁾	51
							5.8e ⁻⁰⁵	⁽⁷⁰⁾ LPENVVAVPDVVEAAK ⁽⁸⁵⁾	79
							18	⁽¹⁰¹⁾ GLGAQLLGK ⁽¹⁰⁹⁾	25
6308	Glicerol-3-fosfato-desidrogenase	157120297	39,2/ 6,7	35,1/ 7,4	515	40	0.017	⁽¹¹²⁾ TSAVGLSLIK ⁽¹²¹⁾	56
							4	⁽¹²²⁾ GFDVAEGGGMELISHITK ⁽¹⁴⁰⁾	30
							0.91	⁽¹⁶³⁾ FCETTIGCR ⁽¹⁷¹⁾	38
							0.23	⁽¹⁸¹⁾ DLFQTPNFR ⁽¹⁸⁹⁾	44
							25	⁽²⁰⁷⁾ NIVACGAGFVDGMGLGDNTK ⁽²²⁶⁾	23
							1.6	⁽²³²⁾ LGLMEMIK ⁽²³⁹⁾	22
							0.57	⁽²⁴⁰⁾ FVDVFYPGSK ⁽²⁴⁹⁾	36

Tabela 2 (CONTINUAÇÃO) - Identificação das proteínas com níveis de expressão alterados de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com o larvicida *m*-pentadecadienil- fenol em relação ao grupo controle

<i>Spot</i>	Proteína identificada	ID da proteína (gi)	Mr/pI teórico ¹	Mr/pI exper. ²	Escore MS/MS	Cobertura da sequência (%)	<i>Expect</i> ³	Peptídeos correspondidos	Escore do íon ⁴
							0.0002	⁽⁶³⁾ STAPPDLSFADGIDR ⁽⁷⁷⁾	74
							54	⁽⁷⁹⁾ GPFSLFIPK ⁽⁸⁷⁾	21
							20	⁽¹¹⁹⁾ VNPVLFQYALAVAIQHRPDTK ⁽¹³⁹⁾	22
							6.6	⁽¹⁶³⁾ LREEGSVVQR ⁽¹⁷²⁾	29
							1.7	⁽²⁶⁴⁾ EPIPEAYFPK ⁽²⁷³⁾	36
							0.00097	⁽²⁸⁷⁾ HANITLQDVNR ⁽²⁹⁷⁾	68
							2.3e ⁻⁰⁵	⁽²⁹⁸⁾ VDNNTNVQVNDLER ⁽³¹¹⁾	83
6712	Profenoloxidase	157130480	78,3/ 5,9	69,3/ 7,2	840	27	2e ⁻⁰⁵	⁽³¹⁶⁾ ILEAIDQGFVLDTQGNR ⁽³³²⁾	83
							0.61	⁽³³³⁾ ITLDETR ⁽³³⁹⁾	41
							6.7e ⁻⁰⁵	⁽³⁴⁰⁾ GIDILGDIVEASSLSPNQR ⁽³⁵⁸⁾	78
							2	⁽³⁸¹⁾ YLEDYGVMGDVTTAMR ⁽³⁹⁶⁾	33
							3e ⁻⁰⁷	⁽⁴⁸⁹⁾ VEINNDTGAVR ⁽⁴⁹⁹⁾	103
							0.0023	⁽⁵¹⁵⁾ GTPLTFQEQR ⁽⁵²⁴⁾	64
							0.0015	⁽⁵⁴⁸⁾ SDQSSVTIPYER ⁽⁵⁵⁹⁾	66
							0.5	⁽⁶⁴⁶⁾ AMGFPPFDR ⁽⁶⁵³⁾	41

Tabela 2 (CONTINUAÇÃO) - Identificação das proteínas com níveis de expressão alterados de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com o larvicida *m*-pentadecadienil- fenol em relação ao grupo controle

<i>Spot</i>	Proteína identificada	ID da proteína (gi)	Mr/pI teórico 1	Mr/pI exper. 2	Escore MS/MS	Cobertura da sequência (%)	<i>Expect</i> ³	Peptídeos correspondidos	Escore do íon ⁴
7304	Álcool desidrogenase	157132518	36,5/ 6,75	37,8/ 8,2	209	15	71	⁽⁵⁸⁾ FPVGLMIGGQVAK ⁽⁷¹⁾	19
							1.1	⁽¹⁷⁰⁾ GCQVIGIAGSDDK ⁽¹⁸²⁾	37
							0.47	⁽¹⁹⁹⁾ TENVLEALKK ⁽²⁰⁸⁾	41
							14	⁽²³²⁾ LMNLYGR ⁽²³⁸⁾	26
							0.017	⁽²⁶⁹⁾ MEGFIVSR ⁽²⁷⁶⁾	55
7701	Cadeia pesada da miosina	157111095	22,4/ 5,74	69,1/ 7,6	288	2	33	⁽⁴⁶⁾ EGYVLGEIK ⁽⁵⁴⁾	23
							0.0002	⁽¹⁹³⁾ VIA YFATIGASTK ⁽²⁰⁵⁾	74
							3e ⁻⁰⁵	⁽²⁵⁸⁾ LAGADIETYLLEK ⁽²⁷⁰⁾	82
							0.0004	⁽²⁷³⁾ VISQQSLER ⁽²⁸¹⁾	72
							0.27	⁽⁴¹⁸⁾ DQVTNAVGALCK ⁽⁴²⁹⁾	43

Tabela 2 (CONCLUSÃO) - Identificação das proteínas com níveis de expressão alterados de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com o larvicida *m*-pentadecadienil- fenol em relação ao grupo controle

<i>Spot</i>	Proteína identificada	ID da proteína (gi)	Mr/pI teórico ¹	Mr/pI exper. ²	Escore MS/MS	Cobertura da sequência (%)	<i>Expect</i> ³	Peptídeos correspondidos	Escore do íon ⁴
Spot controle	Ovoalbumina	28566340	-	-	794	35	0.0011	⁽⁸⁶⁾ DILNQITKPNDVYSFSLASR ⁽¹⁰⁵⁾	78
							12	⁽¹⁰⁶⁾ LYAEER ⁽¹¹¹⁾	40
							16	⁽¹¹²⁾ YPILPEYLQCVK ⁽¹²³⁾	38
							9.5e ⁻⁰⁷	⁽¹²⁸⁾ GGLEPINFQTAADQAR ⁽¹⁴³⁾	110
							0.0043	⁽¹⁶⁰⁾ NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK ⁽¹⁸²⁾	72
							0.00077	⁽¹⁸⁸⁾ AFKDEDTQAMPFR ⁽²⁰⁰⁾	81
							1.3e ⁻⁰⁵	⁽²⁰¹⁾ VTEQESKPVQMMYQIGLFR ⁽²¹⁹⁾	98
							8.5e ⁻⁰⁶	⁽³²⁴⁾ ISQAVHAAHAEINEAGR ⁽³⁴⁰⁾	100
0.0098	⁽³⁷¹⁾ HIATNAVLFVGR ⁽³⁸²⁾	71							

¹ Massa molecular e ponto isoelétrico teóricos da proteína

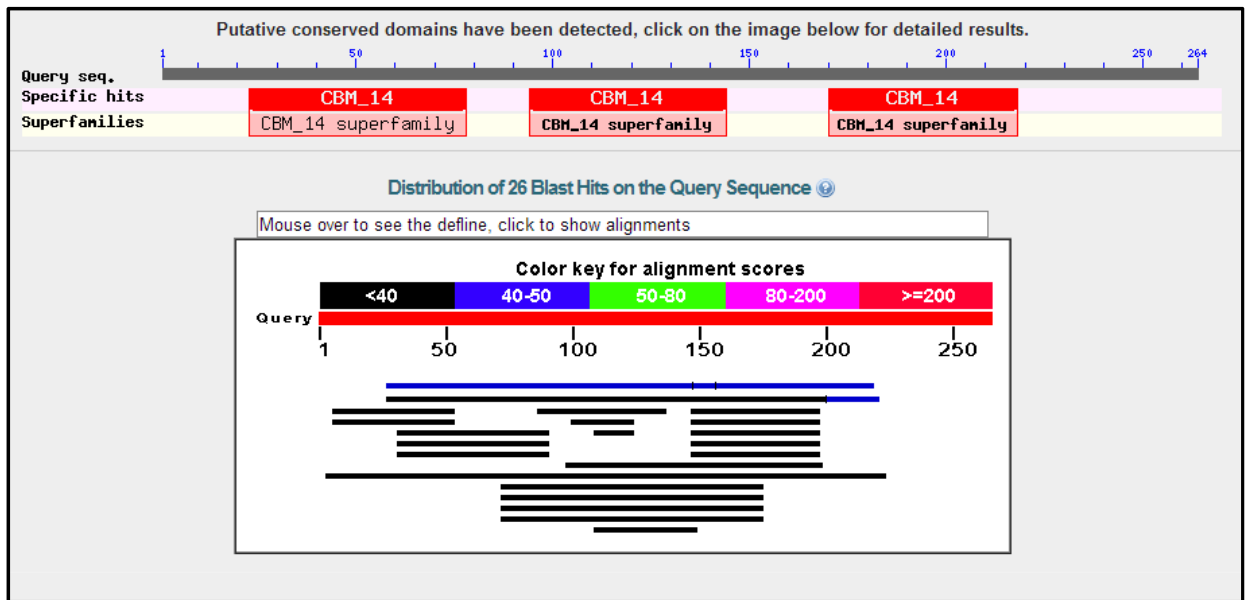
² Massa molecular e ponto isoelétrico da proteína, obtidos através de análise dos géis no software PDQuest

³ Valor que indica a probabilidade do grau de correspondência seja devido ao acaso

⁴ Medida de correspondência entre o espectro teórico e o espectro observado

⁵ Grande similaridade com domínios de peritrofina-A ligante a quitina (ORF AAEL013766-PA.1)

Figura 7 - Resultado do BLASTp (sequência proteica contra banco de dados proteicos) do *spot* 1203 utilizando-se o transcrito hipotético do gene anotado AAEL013766. O resultado mostrou a presença de domínios tipo peritrofina-A, encontrados em proteínas ligantes a quitina, e baixa similaridade com organismos não artrópodes presentes no banco de dados de genes ortólogos de eucariotos (KOG)



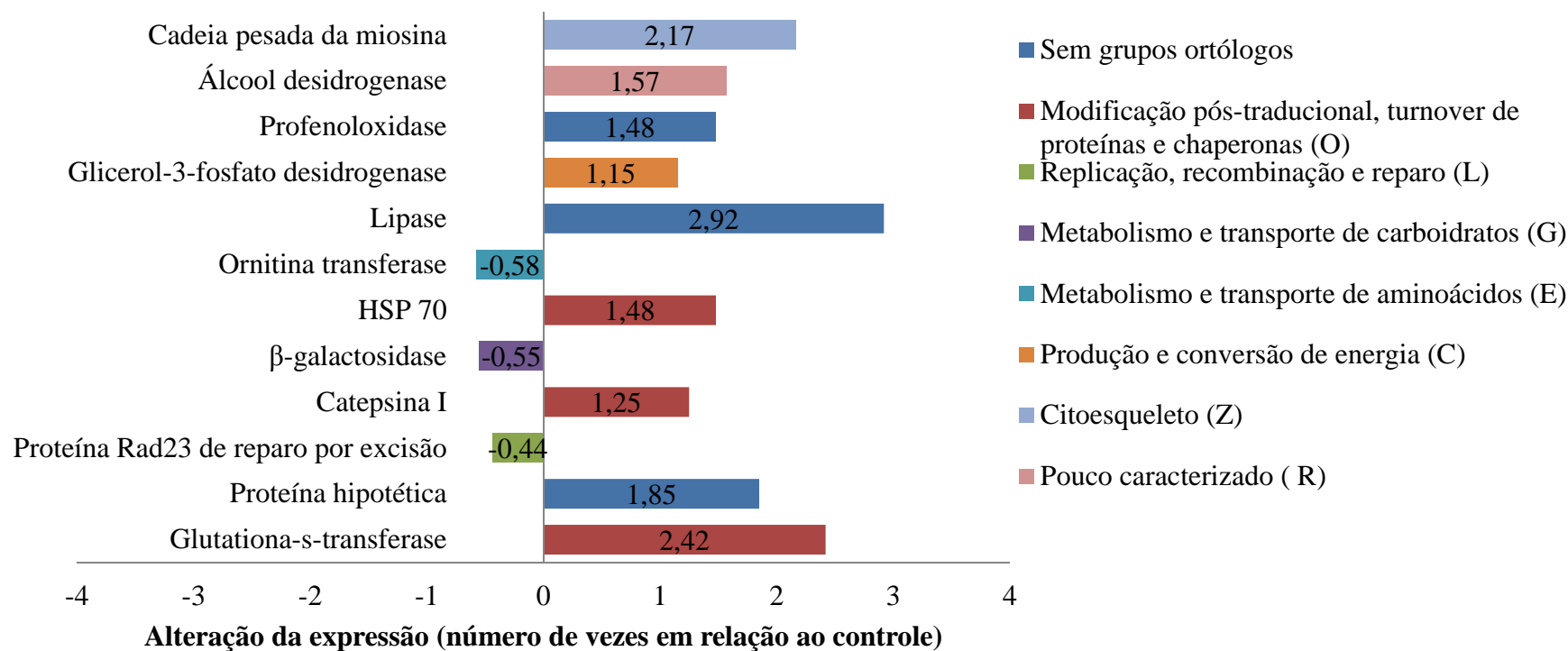
Na Figura 8 está representada a anotação funcional para os grupos ortólogos de eucarióticos de todos os genes que apresentaram padrões de expressão proteica alterados. O *cluster* de genes ortólogos de eucarióticos (KOG) é um banco de dados que tem por meta classificar filogeneticamente o complemento das proteínas (tanto as preditas quanto as caracterizadas) codificadas por um genoma completo. Em adição à abordagem filogenética, este banco também inclui o programa *KOGnitor*, que ordena as proteínas de genomas recém-sequenciados a KOGs específicos já existentes e atribui as funcionalidades que permitem ao usuário selecionar e analisar inúmeras categorias de KOGs. Assim, existem 4 categorias principais (divididas em subcategorias): 1. Armazenamento de informações e processamento (J – Tradução, estrutura ribossomal e biogênese; A - Processamento e modificação do RNA; K - Transcrição; L – Replicação, recombinação e reparo; B – Estrutura e dinâmica da cromatina); 2. Sinalização e processos celulares (D – Controle do ciclo celular, divisão celular, partição dos cromossomos; Y – Estrutura nuclear; V – Mecanismos de defesa; T – Mecanismos de transdução de sinal; M – Biogênese de parede celular/membrana/envelope; N – Motilidade celular; Z – Citoesqueleto; W – Estruturas extracelulares; U – Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; O – Modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas); 3. Metabolismo (C – Produção e conversão de energia; G – Metabolismo e transporte de carboidratos; E – Metabolismo e transporte de aminoácidos; F – Metabolismo e transporte de nucleotídeos; H – Metabolismo e transporte de coenzimas; I – Metabolismo e transporte de lipídeos; P – Metabolismo e transporte de íons inorgânicos; Q – Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários); 4. Pouco caracterizados (R – Somente predição de função geral; S – Função desconhecida).

Após a análise, as proteínas identificadas nesse estudo foram classificadas nas seguintes classes: modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas (glutathione-s-transferase, catepsina L e HSP 70); replicação, recombinação e reparo (proteína Rad23 de reparo por excisão); transporte e metabolismo de carboidratos (β -galactosidase); metabolismo e transporte de aminoácidos (ornitina aminotransferase); conversão e produção de energia (glicerol-3-fosfato desidrogenase); citoesqueleto (cadeia pesada da miosina) e de predição de função geral (álcool desidrogenase).

Três proteínas não se encaixaram em nenhum dos *clusters* ortólogos, sendo estas a lipase, a profenoloxidase e a proteína hipotética de *Ae. aegypti*. Dentre as proteínas que foram identificadas, evidenciou-se que as classes mais afetadas incluem aquelas nas quais estão envolvidos os processos celulares e de sinalização (3 proteínas) e metabolismo (3 proteínas).

A fim de identificar as vias metabólicas envolvidas que foram ativadas após a ingestão do larvicida, foi realizado o mapeamento das proteínas na Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomas (KEGG) utilizando-se o Servidor de Anotação Automática KEEG (KAAS). Observou-se que as vias ativadas incluem aquelas do metabolismo de carboidratos e lipídeos, de exportação de proteínas, reparo de danos ao DNA, metabolismo de xenobióticos processamento e degradação de proteínas e metabolismo de aminoácidos, corroborando assim os resultados obtidos anteriormente nas análises dos COGs.

Figura 8 - Representação da análise de anotação funcional para os grupos de genes ortólogos (KOGs) para todos os genes que apresentaram padrões de expressão de proteínas alterados de larvas de *Aedes aegypti* tratadas com *m*-pentadecadienil-fenol



6 DISCUSSÃO

6.1 Purificação do *m*-pentadecadienil-fenol de sementes de *Myracrodruon urundeuva* e atividade contra *Aedes aegypti*

Os passos de fracionamento a partir do extrato etanólico bruto de sementes de *M. urundeuva* levaram à purificação do composto larvicida *m*-pentadecadienil-fenol. Embora nunca antes relatado nessa espécie, esse composto é abundante no líquido da castanha do caju (LCC) e em outras espécies do gênero *Anacardiaceae* (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006). Essa diversidade de fontes vegetais para obtenção desse composto, aliada à forte atividade inseticida contra o inseto vetor da dengue, encoraja estudos que incluam o *m*-pentadecadienil-fenol nos programas nacionais de controle da doença.

Estudos anteriores comprovaram a atividade larvicida (OLIVEIRA *et al.*, 2011) e estudos mais recentes confirmam e atestam também a eficácia no combate contra outros estágios de vida imaturos do mosquito, como ovos e pupas (SOUZA, T.M. *et al.*, 2012).

A atividade larvicida desse composto baseia-se na sua constituição química, na qual figura um fenol ligado a uma cadeia alquílica de 15 carbonos e duas insaturações entre os carbonos 8-9 e carbonos 11-12. Os compostos fenólicos de origem vegetal são descritos na literatura como grupos de moléculas essenciais para a manutenção de processos morfológicos e fisiológicos em plantas, tendo papel essencial no crescimento, reprodução e defesa contra patógenos e predadores (BRAVO, 1988). Dentre os compostos que possuem esse grupo funcional em sua composição, podem ser citadas inúmeras classes: benzoquinonas, ácido fenólico, ácido fenilacético, ácido hidroxicinâmico, cumarinas, fenilpropanos, cromonas, naftoquinonas, xantonas, antraquinonas, taninos, flavonoides e isoflavonoides, além de lignanas e ligninas (LATTANZIO *et al.*, 2006). Trabalhos anteriores afirmaram o papel dos fenóis e seus derivados como importantes mecanismos de defesa de plantas (BERBEHENM; MARTIN, 1994; BERBEHENM; MARTIN; HAGERMAN, 1996; HENN, 1997). Como exemplo de composto fenólico com atividade contra insetos pode-se citar a lignana isolada de raízes da planta herbácea *Phryma leptostachya* L., que apresentou atividade letal contra os mosquitos *Culex pipiens pallens*, *Ae. aegypti* e *Ocheratatos togoi*, em concentrações não superiores a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (PARK *et al.*, 2005).

Da mesma forma, já foi demonstrada a atividade tóxica do fenol sobre larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti*, obtendo-se uma CL_{50} de $194,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SANTOS *et al.*, 2010). Nesse mesmo estudo, foi comprovado que substituições no anel aromático por grupos lipofílicos aumentou em até 3 vezes a eficácia letal: o timol e o carvacrol, fenóis com substituições idênticas mas em posições distintas, apresentaram CL_{50} de $81,0$ e $69,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A mesma tendência foi observada após a adição de grupos lipofílicos como grupos metila e etila.

Adicionado à toxicidade intrínseca ao fenol, tem-se a cadeia alquílica de 15 carbonos que, conforme outros estudos, também aponta o efeito deletério de moléculas estruturalmente similares. Ácidos graxos como o linoleico (C18:2) e oleico (C18:1) apresentam-se como compostos primários potentes contra as fases aquáticas de dípteros, tais como *Cx. quinquefasciatus* (CL_{50} $18,20$ e $27,24 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) e *Ae. aegypti* (CL_{50} $8,80$ e $7,66 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) (RAHUMAN; VENKATESAN, GOPALAKRISHNAN, 2008).

A toxicidade do fenol está relacionada à toxicidade inespecífica relacionada à hidrofobicidade do composto em si e à formação de radicais livres (ANSCH *et al.*, 2000). A hidrofobicidade afeta a solubilidade do fenol e assim possibilita a interação do composto com os tecidos e células. Após a penetração, os fenóis sofrem uma transformação ativa, principalmente devido à participação de oxidases do citocromo P450, e muitas vezes tais processos resultam em um aumento individual da toxicidade através da formação de metabólitos eletrofílicos que podem se ligar e causar danos ao DNA e enzimas (MICHAŁOWICZ; DUDA, 2007). A evidente hidrofobicidade causada pela cadeia alquílica do m-pentadecadienil-fenol, age, portanto, de forma a facilitar a interação da molécula com sistemas biológicos. Estudos apontam que há uma correlação positiva entre o tamanho da cadeia alquílica e a toxicidade quando testada contra cultura de células (RANKE *et al.*, 2004).

Dessa forma, a estrutura da molécula favorece a sua atividade contra larvas, uma vez que estas se encontram no meio aquático em que a molécula está solúvel e, portanto, a ingerem por filtração ou a absorvem através da cutícula. Assim, estudos que forneçam dados para o entendimento do seu modo de ação e pistas sobre o possível mecanismo de defesa ou resistência a esse larvicida fornecerão dados valiosos no desenvolvimento de um produto natural no combate à dengue.

6.2 Análise proteômica

A fim de se obter o melhor método de extração das proteínas totais de *Ae. aegypti*, foram testados 2 métodos de extração distintos combinados com dois métodos de precipitação das proteínas extraídas. Foram utilizados dois tampões de composição distinta (PBS e English-Ready), porém com mesmo pH, baseando-se em estudos anteriores que realizaram extração de proteínas de insetos (PAUCHET *et al.*, 2008; POPOVA-BUTLER; DEAN, 2009). Da mesma forma foram seguidas metodologias previamente descritas para precipitação de proteínas, sendo uma através da utilização de 10% de TCA em acetona e outra através da utilização do kit comercial 2D-CleanUp (PEREIRA, 2007; POPOVA-BUTLER; DEAN, 2009). Além disso, uma metodologia à parte foi realizada, através da maceração com nitrogênio líquido de larvas recém coletadas seguida de precipitação com 10% de TCA em acetona *overnight*. Constatou-se (como descrito na Tabela 1) que o tampão PBS foi mais eficiente ao extrair as proteínas (30% a mais que o tampão English-Ready). Ambos os tratamentos foram realizados em baixas temperaturas e em ambos foi utilizado o inibidor irreversível de proteases do tipo serínicas PMSF, uma vez que aproximadamente 90% das proteases de larvas de *Ae. aegypti* são do tipo tripsina (BOROVSKY; MEOLA, 2004). Dessa forma, foram minimizadas possíveis clivagens proteolíticas devido às proteases endógenas, garantindo a integridade das proteínas durante o processo eletroforético.

O perfil eletroforético em sistema unidimensional (FIGURA 4) demonstrou, portanto, que a combinação dos métodos de extração com tampão PBS e precipitação com o kit 2D-CleanUp forneceria o melhor plano de elaboração dos géis, aliado a uma focalização isoeétrica que promoveu uma boa separação das proteínas, inclusive aquelas de alta massa molecular (FIGURAS 6 e 7). Além disso, o número de *spots* com correspondência em todos os géis obtido nesse estudo (493) se assemelha ao obtido em estudos anteriores que utilizaram extrato total de larvas (DUNCAN *et al.*, 2012; BIRON *et al.*, 2005): 646 e 419, respectivamente. Vale ressaltar que em ambos os estudos foi utilizada uma técnica mais sensível (eletroforese de fluorescência diferencial em 2D – DIGE), que consiste na utilização de diferentes corantes fluorescentes entre diferentes tratamentos, permitindo assim uma maior sensibilidade e a utilização de menores quantidades de amostra. Assim, a metodologia aplicada foi eficaz na extração das proteínas totais de *Ae. aegypti*, permitindo a visualização em alta resolução de uma grande diversidade de *spots*.

6.2.1 Identificação das proteínas com níveis de expressão alterados e respectivos grupos ortólogos

Dos 13 spots diferencialmente expressos em relação ao controle, apenas 1 não foi identificado após a fragmentação em espectrômetro de massas e análise dos peptídeos em bancos de dados. Apesar da excisão e digestão do mesmo *spot* em vários géis, não foi possível a identificação devido à pequena concentração de proteína.

A identificação e análise em *clusters* resultou na organização das proteínas em classes com funções celulares diferenciadas: glutational-s-transferase, catepsina, e HSP70 foram incluídas no *cluster* de polipeptídeos envolvidos com modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas; a proteína Rad23 no *cluster* de replicação, recombinação e reparo; a β -galactosidase no *cluster* de produção e conversão de energia; a ornitina aminotransferase no *cluster* de metabolismo e transporte de aminoácidos; a glicerol-3-fosfato desidrogenase no *cluster* de conversão e produção de energia; a miosina no *cluster* de citoesqueleto e a álcool desidrogenase no *cluster* de predição de função geral. Esta apresentou alta similaridade com domínios da proteína humana leucotrieno B4 12-hidroxi-dehidrogenase sendo, portanto, uma enzima tipo oxidoreductase dependente do cofator NAD⁺ (JÖRNVALL *et al.*, 1987).

Três proteínas não se encaixaram em nenhum dos *clusters*, sendo elas a lipase, a profenoloxidase e a proteína hipotética de *Ae. aegypti*. A lipase é uma enzima lipolítica que hidrolisa ligações tipo éster de triacilgliceróis, sendo amplamente distribuída em plantas, animais e procariotos (CHAPUS *et al.*, 1988). Assim, era previsível a inclusão dessa proteína em algum dos *clusters* do KOG. Mas tal fato não ocorreu, provavelmente devido a uma baixa ou nenhuma similaridade com lipases de algumas espécies que compõem o baixo repertório de organismos que formam o *cluster* de eucariotos (apenas 7, no qual figuram 2 leveduras, 1 planta, 1 artrópode, 1 protozoário, 1 nematódeo e o de humano). Essa lipase apresenta grande similaridade (>98%), entretanto, com aquelas de espécies do gênero *Anopheles* e *Culex*, ambos pertencentes à mesma ordem do *Ae. aegypti*. Já a profenoloxidase (pPO) é um zimogênio presente na hemolinfa de insetos que pode ser ativada por processos endógenos ou agentes artificiais, como xenobióticos. Após a ativação da enzima por proteases serínicas, a forma ativa fenoloxidase apresenta-se como uma enzima multifuncional, desempenhando um papel importante na esclerotização, formação de melanina e elicitação do sistema humoral (ASHIDA; YAMAZAKI, 1990). Devido a isso, não foi encontrada similaridade significativa

(<15%) com alguma proteína do KOG, exceto com as do artrópode *Drosophila melanogaster*, o que impediu a inclusão da pPO em alguma categoria de KOG. Por fim, a proteína hipotética identificada no *spot* 1203, que foi caracterizada com a presença de 3 domínios peritrofina-A ligantes a quitina, também não foi categorizada em nenhum KOG por não apresentar similaridade significativa com os organismos do KOG.

A seguir cada uma das classes das proteínas identificadas serão discutidas tendo em vista seus papéis nas rotas bioquímicas nas quais estão inseridas e relacionando-as a resposta à intoxicação com o larvicida *m*-pentadecadienil-fenol.

6.2.1.1 Sinalização e processos celulares

6.2.1.1.1 Glutathione-S-transferase (GST)

As glutathione transferases (EC 2.5.1.18) ou GSTs (também conhecidas como glutathione-S-transferases) são uma família de proteínas homo- ou heterodiméricas multifuncionais, de aproximadamente 25 KDa (BOYER, 1989; ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005). Elas são divididas em duas categorias principais, que diferem entre si quanto à localização celular: microsomais ou citosólicas (esta última sendo a mais comum). Um terceiro grupo de GSTs, a classe Kappa, localiza-se nas mitocôndrias ou peroxissomos de mamíferos (LANDER *et al.*, 2004; MOREL *et al.*, 2004). Em adição ao seu papel na catálise da conjugação de substratos eletrofílicos à glutathione (GSH), essas enzimas também desempenham outras funções, devido às atividades do tipo peroxidase e isomerase, inibição da quinase Jun N-terminal (prevenindo, portanto, a morte celular devido a espécies reativas de oxigênio) e à ligação não catalítica a uma grande quantidade de ligantes exógenos e endógenos (SHEEHAN *et al.*, 2001).

Apesar da múltipla funcionalidade, a principal atividade desse grupo de enzimas reside na catálise da adição de grupos tiol da glutathione reduzida (GSH) a uma grande quantidade de sítios eletrofílicos de moléculas lipofílicas (HABIG *et al.*, 1974) com o intuito de transformá-las em moléculas mais solúveis e, portanto, mais facilmente excretáveis (BOYLAND; CHASSEAUD, 1969). Além disso, as GSTs são ubíquas entre organismos

aeróbicos, tendo sua presença já confirmada em plantas, peixes, insetos, fungos, leveduras e bactérias (LEE, 1991).

Em insetos, as GSTs já foram purificadas em mais de 24 espécies e, assim como em animais e plantas, são expressas em altos níveis, em múltiplas isoformas e em diferentes padrões em diversos estágios de desenvolvimento (YU, 1996; ZHOU; SYLVANEN, 1997). Devido à potente atividade detoxificadora (que inclui um vasto número de moléculas diferentes), as GSTs já foram implicadas no surgimento de resistência a inseticidas e têm, em geral, expressão induzida em linhagens resistentes (FOURNIER *et al.*, 1992; TANG; TU, 1994; RANSON; PRAPANTHADARA; BROGDON; McALLISTER, 1998; HEMINGWAY, 2000; HEMINGWAY; RANSON, 2000). Em muitos insetos, por exemplo, a desidrocloração catalisada por GSTs é o principal mecanismo responsável pela resistência ao DDT (BROWN, 1986), e a conjugação com GSH é ainda considerada um segundo mecanismo de resistência a organofosforados (HEMINGWAY; MIYAMATO, HERATH, 1991).

Assim como em outras espécies de insetos, um tipo de GST também já foi purificado em larvas de *Ae. aegypti* (GRANT; MATSUMURA, 1988). Desde então, estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de demonstrar a evidente importância dessa família de enzimas nos processos de detoxificação de xenobióticos de origem natural ou sintética (VONTAS; SMALL; HEMINGWAY, 2001; BOYER *et al.*, 2006). Boyer *et al.* (2006) mostraram um aumento significativo (4x em relação ao grupo controle) na atividade enzimática de GST em larvas de *Ae. aegypti* que foram incubadas com doses subletais de xenobióticos. Mais interessante ainda é o fato de que o xenobiótico em questão é uma molécula complexa formada de lignina, associada a 4 peptídeos, demonstrando que (poli)fenóis atuam de forma a aumentar a atividade dessas enzimas. Foi demonstrado que orto-fenóis têm a capacidade de induzir a atividade de GSTs em cultura de células de mamíferos (FIANDER; SCHNEIDER, 2000) e, além disso, a intoxicação com o fenol puro provoca o aumento dos níveis de GSTs, atingindo quase o dobro da atividade quando comparado ao grupo não tratado após nove gerações em *Drosophila melanogaster* (SHEN *et al.*, 2003).

Apenas um estudo de proteômica diferencial utilizando larvas de *Ae. aegypti* constatou a superexpressão de GSTs: Biron *et al.* (2005) demonstraram a superexpressão dessas enzimas após 15 dias de infecção das larvas com o parasita intracelular *Vavraia culicis*,

uma vez que de acordo com Khush e Lemaître (2000), essas moléculas também estão envolvidas nos processos de resposta imune dos insetos.

Em suma, é bem possível que a expressão exacerbada de GST constatada no presente estudo (2,42 vezes mais em relação ao grupo não tratado com a substância teste) esteja diretamente envolvida no processo de mitigação dos efeitos nocivos do fenol presente na molécula *m*-pentadecadienil-fenol após o adentramento desta no ambiente celular.

6.2.1.1.2 HSP70

HSPs (*Heat shock proteins*, proteínas de choque térmico) são uma família de proteínas que são induzidas por inúmeros estímulos além do choque térmico em si: radiação UV, substâncias tóxicas (*e.g.* álcoois, arsênio, metais pesados), ambiente muito redutor ou oxidativo, baixas concentrações de ATP ou glucose, choque osmótico, excesso de íons Ca^{2+} , infecções virais, fúngicas ou bacterianas, proliferação celular excessiva, dentre outras (LINDQUIST, 1986; WELCH, 1992). Tais proteínas são altamente conservadas, sendo encontradas em procariotos e eucariotos e são expressas em graus variáveis em resposta ao estresse (CRAIG, 1985; MUKHOPADHYAY; SAXENA; CHOWDHURI, 2003).

As HSPs são nomeadas de acordo com as suas respectivas massas moleculares, *e.g.* HSP10, pequenas HSPs (sHSP), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100, etc. Assim, as HSP70 têm massa molecular variando 70-78 kDa (ZHAO; JONES, 2012).

Insetos respondem ao estresse, tanto biótico como abiótico, através do aumento da síntese de HSPs. Estudos comprovam que a expressão dessa proteína é elevada nessa classe de organismos em resposta a estresse abiótico, como temperaturas elevadas (GARCIA *et al.*, 2003, HUANG; CHEN; KANG, 2007; WANG *et al.*, 2008; KOSTAL; TOLLAROVA-BOROVANSKA, 2009; ZHAO *et al.*, 2009, 2010a), radiação UV (RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2008, NGUYEN; MICHAUD; CLOUTIER, 2009), seca e desidratação (XU; SHU; ZHANG, 2010, CORNETTE; KIKAWADA 2011), intoxicação química (PLANELLO; MARTINEZ-GUITARTE; MORCILLO, 2008; PLANELLO *et al.*, 2011), e por metais (SHU; DU; WANG, 2010; ZHAO *et al.*, 2010b), diminuição no aporte de nutrientes (BENOIT *et al.*, 2011), injúria ou adaptação (COLINET; LEE; HOFFMANN, 2010; KOSTAL; TOLLAROVA-BOROVANSKA, 2009), hipóxia (MICHAUD *et al.*, 2011) e

RNA dupla fita (BENOIT *et al.*, 2009, KOSTAL; TOLLAROVA-BOROVANSKA, 2009; LU; WAN, 2011).

Alguns estudos já relacionaram o efeito de pesticidas sobre a expressão de HSP70 com o estresse causado por substâncias químicas (CHOWDHURI *et al.*, 1999; NAZIR *et al.*, 2001; YOSHIMI *et al.*, 2009). Mais recentemente Silva *et al.* (2012) demonstraram a superexpressão do mRNA referente à HSP70 em espécies de *Myzus persicae* (um hemíptero) susceptíveis ou com baixa resistência a inseticidas convencionais. Powell *et al.* (2011) mostraram resultados semelhantes em um estudo proteômico envolvendo a elucidação dos efeitos de um novo inseticida químico, o Pyridalyl® sobre cultura de células de *Bombyx mori* (um lepidóptera). Segundo Kukreja *et al.*, (1994), essa indução está ligada ao estresse oxidativo, que leva à oxidação de aminoácidos e leva ao desenovelamento parcial de proteínas. A partir desse ponto, elas podem se ligar a HSP70 e serem estabilizadas nesse estado semi-desenovelado e em seguida levadas a uma via de reenovelamento (HARTL, 1996) ou, se a proteína estiver danificada além do reparo, ela será removida pelo sistema de proteassoma (MARY *et al.*, 2004). Outra importante função de HSPs70 é a estabilização da membrana lisossomal, impedindo a liberação do seu conteúdo no citoplasma (*e.g.* proteases, lipases, glicosidasas) (NYLANDSTED *et al.*, 2004; KIRKEGAARD *et al.*, 2010).

Em *Ae. aegypti*, já foi confirmada expressão de HSPs, dentre as quais as HSP26, HSP70, HSP83 e HSP90 (ZHAO *et al.*, 2009; BENOIT *et al.*, 2009). No presente estudo, a HSP70 apresentou-se cerca de 1,5x mais expressa no grupo tratado que no grupo controle. Tal fato deve-se possivelmente ao forte estresse oxidativo causado pelo fenol (corroborado ainda pela expressão aumentada de GST).

6.2.1.1.3 Catepsina L

As catepsinas compõem uma ampla classe de endopeptidases que podem ser do tipo serínicas, cisteínicas ou aspárticas. As catepsinas cisteínicas são as mais abundantes, existindo 11 classes, representadas por letras do alfabeto (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X) (REPNIK *et al.*, 2012). Essas enzimas, que são comumente encontradas em lisossomos de animais, não só digerem proteínas que devem ser descartadas, como também participam de

processos de apoptose e outros processos biológicos ainda não completamente elucidados (REPNIK *et al.*, 2012).

A catepsina identificada neste estudo foi anotada com o produto gênico catepsina L de *Ae. aegypti*, que apresenta grande similaridade (>90%) com aquelas presentes na classe L de *Anopheles gambiae* e *Culex quinquefasciatus*. Catepsinas L já foram encontradas em outras classes de insetos e já foram descritas como importantes agentes na embriogênese (YAMAMOTO; TAKAHASHI, 1993; CHO *et al.*, 1999; UCHIDA *et al.*, 2001), e no remodelamento de tecidos durante a metamorfose (KURATA *et al.*, 1992; HOMMA; KURATA; NATORI, 1994; HEGEDUS *et al.*, 2002). A respeito do papel no catabolismo de proteínas, muitas hipóteses foram levantadas a respeito da correlação entre os níveis de degradação proteica em insetos sobre a ação de inseticidas. Shakoori *et al.* (1994) constataram a presença de níveis de proteases mais elevados em espécies de *Tribolium castaneum* (um coleóptera) resistentes a inseticida que em espécies susceptíveis. Tal fato contrasta com o obtido por Silva *et al.* (2012) que encontraram níveis elevados de expressão de catepsina B em espécies susceptíveis, enquanto houve uma subexpressão no grupo resistente tratado com o mesmo inseticida.

No presente estudo a catepsina foi superexpressa 1,25 vezes a mais que em relação ao grupo controle não tratado. Duas hipóteses são propostas para o modelo de aumento de proteases durante a resposta do inseto. Primeiro, as peptidases devem estar envolvidas na degradação proteica a fim de cumprir a demanda energética imposta pelo estresse (PEDRA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2010). Segundo, as peptidases podem ter um papel essencial na biossíntese proteica ou na modificação de enzimas relacionadas com a detoxificação de xenobióticos (SALEEM *et al.*, 1994; AHMED; WILKINS; MANTLE, 1998). Outra hipótese para essa maior detecção de catepsina pode referir-se ao aumento dessa enzima após o rompimento da membrana lisossomal. Sabe-se que a membrana lisossomal, apesar de ser estabilizada por inúmeras outras moléculas (dentre elas a HSP70), pode ser rompida em presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CONUS; SIMON, 2008; IVANOVNA *et al.*, 2008; STOKA; TURK; TURK, 2007). Assim, existe a possibilidade do estresse oxidativo causado pelo fenol da molécula ter resultado na desestabilização da membrana lisossomal com consequente liberação de enzimas no citosol. A partir daí, as catepsinas assumem um papel importantíssimo na apoptose, agindo como efetores da morte celular programada ou mesmo amplificando os sinais apoptóticos (REPNIK *et al.*, 2012).

6.2.1.2 Estocagem e processamento da informação

6.2.1.2.1 Proteína Rad23 de reparo por excisão

A proteína Rad23 é uma proteína conservada de grande importância no reparo por excisão de bases (WATKINS *et al.*, 1993; MASUTANI *et al.*, 1994; van der SPEK *et al.*, 1994). Tal proteína está diretamente envolvida no reparo de dano ao DNA, estando envolvida na patologia humana xeroderma pigmentoso (HIYAMA *et al.*, 1999), e no desenvolvimento de esterilidade em ratos machos (NG *et al.*, 2003). Estudos subsequentes conectaram a Rad23 ao sistema de degradação proteica ubiquitina-proteossoma (UPS) do retículo endoplasmático, que remove proteínas incorretamente enoveladas (RAASI; WOLF, 2007).

No presente estudo, foi observada uma diminuição de expressão de -0,44 vezes da Rad23 em relação ao controle. Em humanos, foi observado que a Rad23 tem papel essencial na degradação da proteína pró-apoptótica p53, agindo como uma ponte entre a p53 ubiquitinada e o proteossoma 26S (MARITSI *et al.*, 2006). Dessa forma, uma diminuição nos níveis da Rad23 resulta no acúmulo de p53 não-ubiquitinada, impedindo sua degradação pelo sistema UPS (GLOCKZIN *et al.*, 2003). A comprovação experimental da existência do gene *p53*, bem como seu produto p53 em *Ae. aegypti* (NEDELCO; TAN, 2007) mostram que a supressão da Rad23 em resposta ao tratamento com *m*-pentadecadienil-fenol deve-se provavelmente ao acúmulo de p53 elicitando respostas de parada do ciclo celular e/ou apoptose.

6.2.1.3 Metabolismo

Três proteínas diferencialmente expressas foram identificadas como pertencentes ao KOG de metabolismo, sendo elas: glicerol-3-fosfato desidrogenase, β -galactosidase e ornitina aminotransferase. Destas, apenas a glicerol-3-fosfato desidrogenase foi mais expressa em relação ao controle (1,15 vezes a mais), enquanto as outras duas foram subexpressas (0,55 e 0,58 vezes a menos, respectivamente).

6.2.1.3.1 Glicerol-3-fosfato desidrogenase

A função da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.8) já foi bem estabelecida em insetos, tendo por função acoplar o metabolismo de carboidratos ao de lipídeos (BEWLEY; MILLER, 1979). As larvas tratadas com o *m*-pentadecadienil-fenol apresentaram um aumento na expressão de 1,95 vezes em relação ao controle. Além disso, foi observado que a lipase (enzima que catalisa a clivagem de triglicerídeos liberando ácidos graxos e álcoois) teve sua expressão aumentada 2,92 vezes a mais que o controle. Apesar dessa enzima não ter sido encontrada em nenhum KOG, isto pode ser explicado pela existência de uma isoforma de lipase presente apenas em insetos, a ser corroborado pela ausência de similaridade significativa com lipases de outros animais exceto os da classe Insecta. Tal fato deve-se à existência de um órgão de armazenamento exclusivo nesse animais: o corpo gorduroso. Essa estrutura não é só um depósito de nutrientes (glicogênio e lipídeos), mas também é local de síntese de inúmeras proteínas e da hemolinfa e outros metabólitos circulantes (ARRESE; SOULAGES, 2010). Em larvas de *Ae. aegypti*, essa estrutura já foi descrita como presente em inúmeras regiões corporais, tanto parietais quanto viscerais (WIGGLESWORTH, 1942).

Estudos em *Drosophila* sob desafio imune apontaram a superexpressão de proteínas envolvidas no metabolismo energético, inclusive lipase e glicerol-3-fosfato desidrogenase. Dessa forma, é provável que tenha havido um aumento na demanda energética, imposta pelo estresse causado pela toxicidade do *m*-pentadecadienil-fenol, levando a um aumento exacerbado de proteínas envolvidas na geração de grande quantidade de ATP.

6.2.1.3.2 β -galactosidase

A enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23) é uma glicosidase que catalisa a hidrólise de β -galactosídeos em monossacarídeos (PDB, 2012). Tais proteínas localizam-se no compartimento lisossomal e dentre os substratos podem ser citados inúmeras substâncias artificiais e naturais, como gangliosídeos, glicoproteínas e glicosaminoglicanos (YUE *et al.*, 2009).

A estrutura complexa desses substratos, especialmente dos glicosaminoglicanos (GAGs) e evidências crescentes indicando seu papel multifuncional na regulação de processos biológicos complexos, aponta o seu potencial envolvimento em outro importante processo: apoptose. Nos últimos anos, o uso de GAGs em altas doses mostraram claramente o seu potencial antioxidante, tanto em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*; eles são capazes de reduzir a formação de radicais hidroxila, inibir peroxidação lipídica e melhorar defesas antioxidantes (CAMPO *et al.*, 2004a; 2004b, 2004c). Após a análise das vias metabólicas da sequência obtida da β -galactosidase no Servidor de Anotação Automática KEGG (KAAS), foi demonstrado que essa enzima está inserida em vias de degradação de GAGs, esfingolipídeos e outros glicanos em *Ae. aegypti*. Como discutido anteriormente, os GAGs têm papel crucial na estabilização da membrana lisossomal, e portanto a subexpressão da β -galactosidase parece estar ligada a um mecanismo de proteção através da manutenção de níveis mais altos de GAGs intralisossomal.

6.2.1.3.3 Ornitina aminotransferase

Ornitina aminotransferases (OATs, E.C. 2.6.1.13) são enzimas presentes na matriz mitocondrial (IP *et al.*, 1974) que desempenham o papel de conversão da ornitina em prolina e glutamato através da pirrolina-5-carboxilato (SHIH, 1981). Em insetos, as OATs são pouco conhecidas, e são encontradas principalmente nos corpos gordurosos (YOSHIDA; JUNI; HORI, 1997).

No presente estudo, a OAT apresentou-se subexpressa em relação ao controle. Assim, é de se esperar que seu substrato, a ornitina, tenha se acumulado ou tenha sido desviada para outras vias metabólicas. Além da transaminação, a ornitina pode sofrer descarboxilação pela ornitina descarboxilase, primeiro passo na formação de poliaminas (TABOR; TABOR, 1984; PEGG, 1986). As poliaminas interagem com moléculas negativamente carregadas, incluindo DNA, RNA, proteína e fosfolipídeos de membrana (KHAN; MEI; WILSON, 1992; FRYDMAN *et al.*, 1992; THOMAS; THOMAS, 1993; MATTHEWS, 1993). As poliaminas são imprescindíveis para crescimento e proliferação celulares normais, estando envolvidas nas mudanças conformacionais no DNA, na atividade da topoisomerase, síntese macromolecular e reciclagem da membrana (MATTHEWS, 1993; SJÖHOLM, 1993).

Estudos com variantes adultas *Ae. aegyti* mostraram uma relação positiva entre a concentração de poliaminas e a síntese de DNA, RNA e proteína (KOGAN; HAGEDORN, 2000). Assim, é provável que a OAT tenha sofrido *downregulation* a fim de desviar a ornitina excedente para a síntese de poliaminas que tomariam parte nos processos fisiológicos de crescimento e replicação nas larvas intoxicadas pelo *m*-pentadecadienil-fenol.

6.2.1.4 Citoesqueleto

6.2.1.4.1 Cadeia pesada da miosina (não muscular)

A cadeia pesada da miosina é o principal constituinte de filamentos grossos do aparato contrátil, sendo considerado um “motor” que se liga a filamentos finos de actina. Após a ligação com a actina, a miosina sofre mudanças conformacionais dependentes de ATP que propõem os filamentos finos a deslizarem sobre os filamentos grossos, resultando em contração (ZHANG; BERNSTEIN, 2001). Entretanto, a miosina pode apresentar também uma atividade não relacionada à atividade muscular, ao regular a barreira paracelular no complexo juncional apical (CJA) (IVANOV *et al.*, 2007).

A miosina identificada nesse estudo foi superexpressa em relação ao controle e sua classificação refere-se à variante não muscular. Essa via foi confirmada pelo KAAS. Assim, é provável que a superexpressão dessa proteína esteja ligada à formação de uma barreira mais impermeável à passagem do *m*-pentadecadienil-fenol através de espaços entre as células.

6.2.1.5 Pouco caracterizadas

6.2.1.5.1 Álcool desidrogenase

A álcool desidrogenase identificada pertence à superfamília das MDRs (desidrogenase/reductase de cadeia média), o qual inclui as álcool desidrogenases dependentes de zinco, quinona reductases, leucotrieno B4 desidrogenases e muitas outras famílias (PERSSON; HEDLUND; JÖRNVALL, 2008).

Embora tenha apresentado similaridade com domínios leucotrieno B4, essa proteína é a mesma identificada em um estudo recente de proteômica diferencial em *Ae. aegypti* (RODEZNO-CANCINO *et al.*, 2012), sendo portanto uma enzima envolvida no metabolismo de lipídeos. A sua superexpressão, juntamente com outras proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos como a lipase e a glicerol-3-fosfato desidrogenase, corrobora o aumento na demanda energética imposta pela intoxicação com o *m*-pentadecadienil-fenol.

6.2.1.6 Não caracterizadas

6.2.1.6.1 Profenoloxidase

A profenoloxidase (pPO) é um zimogênio presente na hemolinfa de insetos que é ativada tanto por agentes internos quanto agentes artificiais, como temperatura, detergentes, concentração de íons de cálcio, atividade de enzimas, componentes microbianos como LPS, beta-glucanos e oligodesoxinucleotídeos (HALL *et al.*, 1989; SUGUMARAN; NELLAIAPPAN, 1991; ASADA *et al.*, 1993; HERNANDEZ; GOLLAS; VARGAS, 1996; GOLLAS; HERNANDEZ; VARGAS, 1997; PERAZZOLO; BARRACCO; 1997; SUNG *et al.*, 1998; SRITUNYALUCKSANA; SÖDERHÄLL, 2000; CHUO; LIANG; SUNG, 2005). Esta proteína também está envolvida na resposta imune, sendo ativada após o reconhecimento de patógenos e levando à melanização ao redor do parasita (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1998).

Foi comprovado que moléculas orgânicas também podem elicitar resposta na cascata de ativação da pPO, estando inclusas nessa categoria álcoois (glicerol, metanol, etanol), dodecil sulfato de sódio, triton, uréia, e ácidos graxos como o oleico (18:1) e esteárico (18:0) (ASADA *et al.*, 1993). Assim, é provável que a superexpressão da pPO (1,48 vezes a mais que no controle) deva-se à alguma interação com a cadeia lipídica do *m*-pentadecadienil-fenol. Entretanto, os vastos estudos estão focados na resposta imune a parasitas desses insetos, não esclarecendo o motivo da ativação desse zimogênio em presença de moléculas orgânicas não relacionadas a microrganismos.

6.2.1.6.2 Proteína hipotética

A proteína hipotética foi identificada por similaridade como um polipeptídeo com 3 motivos peritrofina A, ligantes a quitina. Essas proteínas estão inseridas na matriz peritrófica de insetos, uma “peneira” molecular elástica e resistente formada por glicoproteínas, proteoglicanos e fibrilas de quitina que reveste todo o sistema digestório de insetos (WIJFELLS *et al.*, 2001).

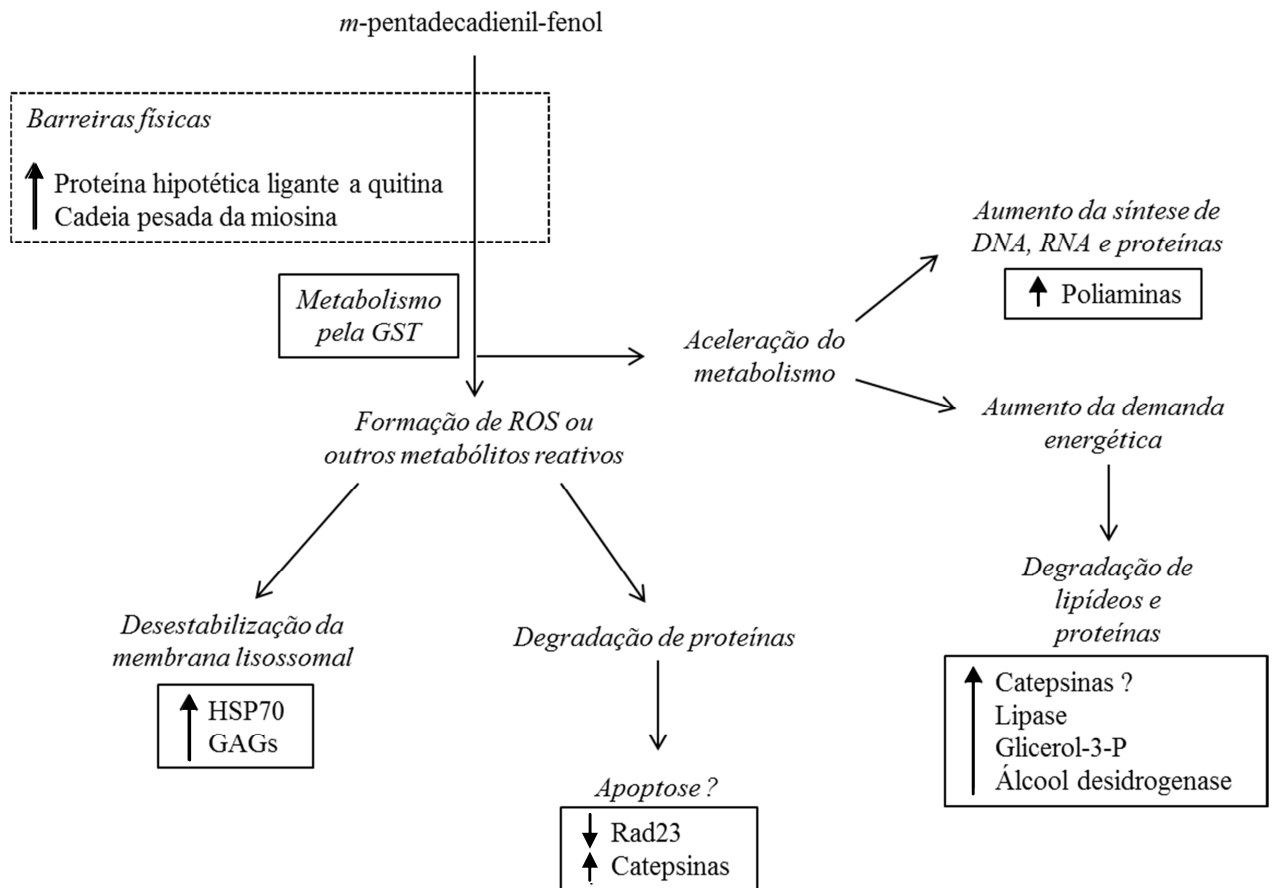
Aparentemente as peritrofinas parecem estar envolvidas com a proteção da membrana peritrófica, através do capeamento individual de cadeias do polímero de quitina, dentro de uma fibrila de quitina ou de uma rede dentro da matriz peritrófica (WIJFELLS *et al.*, 2001). Além do senso comum de que as peritrofinas estão envolvidas na manutenção da estrutura e integridade da membrana peritrófica, pouco se sabe acerca das funções e outras interações moleculares (YANG *et al.*, 2010).

Assim, é possível que a superexpressão dessa proteína seja uma tentativa de impedir a passagem do *m*-pentadecadienil-fenol através da membrana peritrófica, através do capeamento da quitina e, conseqüentemente, diminuição dos poros.

6.3 Considerações finais

Em resumo, o *m*-pentadecadienil é um potente agente larvicida que teve seu mecanismo de ação/resposta à intoxicação proposto pela análise das proteínas diferencialmente expressas em relação a um grupo não tratado. Foi proposto que essa molécula elicit a superexpressão de proteínas que promovem a formação de barreiras mais eficientes e que, uma vez dentro das células, promove um estresse oxidativo que leva ao aumento do metabolismo de degradação lipídica, desestabilização da membrana lisossomal, aumento do metabolismo em resposta ao estresse tóxico e possivelmente resulta em morte celular programada (apoptose) (FIGURA 9).

Figura 9 - Mecanismo de ação proposto para o *m*-pentadecadienil-fenol após intoxicação de larvas de *Aedes aegypti*



7 CONCLUSÃO

As conclusões do presente trabalho são:

- O composto *m*-pentadecadienil-fenol, um lipídeo fenólico isolado de sementes de *M. urundeuva*, apresenta atividade larvicida contra larvas de 3º estágio de *Ae. aegypti*, com uma CL_{50} de $10,16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
- Os mapas proteômicos de larvas intoxicadas com *m*-pentadecadienil em comparação com o grupo não tratado resultou na identificação de 13 proteínas diferencialmente expressas, das quais 12 foram identificadas consistentemente em bancos de dados como sendo glutationa-S-transferase, proteína hipotética – que apresentou grande similaridade com domínios ligantes a quitina tipo peritrofina-A, proteína Rad23 de reparo, catepsina, β -galactosidase, HSP70, ornitina aminotransferase, lipase, glicerol-3-fosfato desidrogenase, profenoloxidase, álcool desidrogenase e cadeia pesada da miosina
- A análise das rotas bioquímicas aponta para um modelo teórico de modo de ação/resposta à intoxicação em larvas de *Ae. Aegypti*, onde o *m*-pentadecadienil elicit a superexpressão de proteínas que promovem a formação de barreiras mais eficientes, mas que, uma vez dentro das células, promove um estresse oxidativo que leva ao aumento do metabolismo de degradação lipídica, desestabilização da membrana lisossomal, aumento do metabolismo em resposta ao estresse tóxico e, possivelmente, resulta em morte celular programada (apoptose).

REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass-spectrometry based proteomics. **Nature**, v. 422, N. 6928, p. 198-207, mar. 2003.
- AHMED, S.; WILKINS, R.M.; MANTLE, D. Comparison of proteolytic enzyme activities in adults of insecticide resistant and susceptible strains of the housefly *Musca domestica* L. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 28, n. 8, p. 629–639, set. 1998.
- ANSCH, C. H.; McCARNS, S.; SMITH, C.; DODITTLE, D. Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. **Chem. Biol. Interact.**, v. 127, n.1, p. 61-72, jun. 2000.
- ARIARATNAM, V.; GEORGHIOU, G.P. Carbamate resistance in *Anopheles albimanus*. Cross-resistance spectrum and stability of resistance. **Bull. WHO**, v. 51, p. 655–59, 1974.
- ARRESE, E.L.; SOULAGES, J.L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 55, p. 207-225, 2010.
- ASADA, N.; FUKUNITSU, T.; FUJIMOTO, K.; MASUDA, K.I. Activation of prophenoloxidase with 2-propanol and other organic compounds in *Drosophila melanogaster*. **Insect Biochem.**, v. 23, n. 4, p. 515-520, jun. 1993.
- ASHIDA, M.; YAMAZAKI, I. Y. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation. In: **Molting and Metamorphosis**. Editor: OHNISHI E.; LSHIZAKI H., 1990. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, p. 239-265.
- BAYYAREDDY, K.; ANDACHT, T.M.; ABDULLAH, M.A.; ADANG, M.J. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 39, n.4, p. 279-286, abr. 2009.

BENOIT, J.B.; LOPEZ-MARTINEZ, G.; PATRICK, K.R.; PHILLIPS, Z.P.; KRAUSE, T.B.; DENLINGER, D.L. Drinking a hot blood meal elicits a protective heat shock response in mosquitoes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, n. 19, p. 8026-8029, mai. 2011.

BENOIT, J.B.; LOPEZ-MARTINEZ, G.; PHILLIPS, Z.P.; PATRICK, K.R.; DENLINGER, D.L. Heat shock proteins contribute to mosquito dehydration tolerance. **J. Insect Physiol.**, v. 56, n. 2, p. 151-156, fev. 2009.

BERBEHENN, R.V.; MARTIN, M.M. Tannin sensitivity in larvae of *Malacosoma disstria* (Lepidoptera): roles of the peritrophic envelope and midgut oxidation. **J. Chem. Ecol.**, v. 20, n. 8, p. 1985-2001, mar. 1994.

BERBEHENN, R.V.; MARTIN, M.M.; HAGERMAN, A.E. Reassessment of the roles of the peritrophic envelope and hydrolysis in protecting polyphagous grasshoppers from ingested hydrolysable tannins. **J. Chem. Ecol.**, v.22, n. 10, p. 1901-1919, jan. 1996.

BERNSTEIN, S.I.; HANSEN, C.J.; BECKER, K.D.; WASSENBERG II, D.R.; ROCHE, E.S.; DONADY, J.J.; EMERSON, C.P. Jr. Alternative RNA splicing generates transcripts encoding a thoraxspecific isoform of *Drosophila melanogaster* myosin heavy chain. **Mol. Cell. Biol.**, v. 6, n. 7, p. 2511-2519, jul. 1986.

BEWLEY, G.C.; MILLER, S. Origin and differentiation of soluble alpha-glycerophosphate dehydrogenase isozyme in *Drosophila melanogaster*. **Isozymes-Curr. T. Biol.**, v.3, p. 23-52, 1979.

BIRON, D.G.; AGNEW, P.; MARCHÉ, L.; RENAULT, L.; SIDOBRE, C.; MICHALAKIS, Y. Proteome of *Aedes aegypti* larvae in response to infection by the intracellular parasite *Vavraia culicis*. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, n. 13, p. 1385-1397, nov. 2005.

BLENCOWE, B.J. Alternative splicing: new insights from global analyses. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 37-47, jul. 2006.

BOROVSKY, D.; MEOLA, S.M. Biochemical and cytoimmunological evidence for the control of *Aedes aegypti* larval trypsin with Aea-TMOF. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 55, n. 3, p. 124–139., mar. 2004.

BOYER, S.; DAVID, J-P.; REY, D.; LEMPERIERE, G.; RAVANEL, P. Response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae to three xenobiotic exposures: larval tolerance and detoxifying enzyme activities. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 25, n. 2, p. 470–476, fev. 2006.

BOYER, T.D. Special article the glutathione S-transferases: An update. **Hepatology**, v. 9, n. 3, p. 486–496, mar. 1989.

BOYLAND, E.; CHASSEAUD, L.F. The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. **Adv. Enzymol.**, v. 32, 173-219, 1969.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 218-254, 1976.

BRAGA, I.A.; LIMAI, J.B.P.; SOARES, S.S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 199-203, mar. 2004.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde.**, v. 16, n. 4, p. 295-302, out-dez. 2007.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolismo and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, v. 56, n. 11 p. 317-333, nov. 1998.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J.C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infect. Dis.**, v. 4, n.4, p. 605-613, out.-dez. 1998.

BROWN, A.W.A. Insecticide resistance in mosquitoes: A pragmatic review. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 2, n. 2, p. 123-140, jun. 1986.

CAMPO, G.M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; FERLAZZO, A.M.; CALATRONI, A. Administration of hyaluronic acid and chondroitin-4-sulfate limits endogenous antioxidant depletion and reduces cell damage in experimental acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 28, n. 2, p. E45–E53, mar. 2004a.

CAMPO, G.M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; FERLAZZO, A.M.; MICALI, C.; ZANGHI, L.; CALATRONI, A. Hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate treatment reduces damage in carbon tetrachloride-induced acute rat liver injury. **Life Sci.**, v. 74, n. 10, p. 1289–1305, jan. 2004b.

CAMPO, G.M.; D'ASCOLA, A.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; FERLAZZO, A.M.; MICALI, C.; ZHANGI, L.; CALATRONI, A. Glycosaminoglycans reduce oxidative damage induced by copper (Cu⁺²), iron (Fe⁺²) and hydrogen peroxide (H₂O₂) in human fibroblast cultures. **Glycoconj. J.**, v. 20, n. 2, p. 133-141, 2004c.

CANCINO-RODEZNO, A.; LOZANO, L.; OPPERT, C.; CASTRO, J.I.; LANZMENDOZA, H.; ENCARNACIÓN, S.; EVANS, A.E.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M.; JURATFUENTES, J.L.; BRAVO, A. Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. **PLoS One**, v. 7, n. 5, e37034, mai. 2012.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, B.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, N. 9, p.1327–1333, mai. 2004.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Dengue homepage, Entomology and Ecology. Atlanta, 2012. Disponível em <<http://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/index.html>> Acessado em: 20 dez. 2012.

CHAPUS, C.; ROVERY, M.; SARDA, L.; VERGER, R. Minireview on pancreatic lipase and colipase. **Biochimie**, v. 70, n. 9, p. 1223-1234, set. 1988.

CHAVASSE, D.C.; YAP, H.H. **Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance**. Geneve:97.

CHAVES, M.H.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.D.; COSTA, D.A.; OLIVEIRA, C.A.A.; COSTA, Q.F.C.; BRITO JÚNIOR, E.F.M. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 1, p. 106-112, jan.-mar. 2008.

CHO, W.L.; TSAO, S.M.; HAYS, A.R.; WALTER, R.; CHEN, J.S.; SNIGIREVSKAYA, E.S.; RAIKHEL, A.S. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n.19, p. 13311–13321, mai. 1999.

CHOWDHURI, D.K., SAXENA, D.K., VISHWANATHAN, P.N. Effect of hexachloro-cyclohexane (HCH), its isomers, and metabolites on Hsp70 expression in transgenic *Drosophila melanogaster*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 63, n. 1, p. 15–25, jan. 1999.

CHUO, C.P.; LIANG, S.M.; SUNG, H.H. Signal transduction of the prophenoloxidase activating system of prawn haemocytes triggered by CpG oligodeoxynucleotides. **Fish Shellfish Immunol.**, 2005, v. 18, n. 2, p. 149-162, fev. 2005.

COLINET, H.; LEE, S.F.; HOFFMANN, A. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. **FEBS J.**, v. 277, n.1, p. 174-185, jan. 2010.

CONSOLI, R.A.G.B.; OLIVEIRA, R.L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Ed. Fiocruz, RJ, 1994, 228p.

CONUS, S.; SIMON, H.U. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. **Biochem. Pharmacol.**, v. 76, n.11, p. 1374– 1382, dez. 2012.

CORNETTE, R.; KIKAWADA, T. The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: current status of our knowledge. **IUBMB Life**, v. 63, n.6, p. 419-429, jun. 2011.

CORREIA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Metabólitos secundários de espécies de anacardiaceae. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p.1287-1300, abr. 2006.

CRAIG, E.A. 1985. The heat shock response. **CRC Crit. Rev. Biochem.**, v. 18, n. 3, p. 239 - 80, 1985.

CURTIS, C.F.; HILL, N., KASIM, S.H. Are there effective resistance management strategies for vectors of human disease? **Biol. J. Linn. Soc.**, v. 48, n. 1, p. 3–18, jan. 1993.

de HOOG, C.L., MANN, M. Proteomics. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 5, p. 267–293, 2004.

DHINGRA, V.; GUPTA, M.; ANDACHT, T.; FU, Z.F. New frontiers in proteomic research: a perspective. **Int. J. Pharm.**, v. 299, n. 1-2, p. 1-18, ago. 2005.

DUNCAN, A.B.; AGNEW, P.; NOEL, V.; DEMETTRE, E.; SEVENO, M.; BRIZARD, J-P.; MICHALAKIS, Y. Proteome of *Aedes aegypti* in response to infection and coinfection with microsporidian parasites. **Ecol. Evol.**, v. 2, n. 4, p. 681–694 abr. 2012.

ENAYATI, A.A.; RANSON. H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Mol. Biol.**, v. 14, n. 1, p. 3-8, jan. 2005.

FIANDER, H.; SCHNEIDER, H. Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics. **Cancer Lett.**, v. 156, n. 2, p. 117-124, ago. 2000.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Third Edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1971, 350p.

FOGHT, J.; APRIL, T.; BIGGAR, K.; AISLABIE J. Bioremediation of DDT-contaminated soils: a review. **Bioremediat. J.**, v. 5, n. 3, p. 225–246, out. 2001.

FOURNIER, D.; BRIDE, J.-M.; POIRIE, M.; BERGE, J. B.; PLABB, F. W. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 3, p. 1840-1845, jan. 1992.

FRENCH-CONSTANT, R.H.; DABORN, P.J., LE GOFF, G. The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends Genet.**, v. 20, n. 3, p. 163–170, mar. 2004.

FRYDMAN, L.; ROSSOMANDO, P.C.; FRYDMAN, V.; FERNANDEZ, C.O.; FRYDMAN, B.; SAMEJIMA, K. Interactions between natural polyamines and tRNA: an ¹⁵N NMR analysis. **PNAS**, v. 89, n. 19, p. 9186- 9109, out. 1992.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Reunião técnica para discutir status deresistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, 30 pp, 1999.

GARCIA, S.L.; GARCIA, N.L.; OLIVEIRA, L.R.; RODRIGUES, V.L.; MELLO, M.L. Experimentally induced heat- and cold-shock tolerance in adult *Panstrongylus megistus* (Burmeister) (Hemiptera, Reduviidae). **Braz. J. Biol.**, v. 63, n.3, p. 449-455, ago. 2003.

GLOCKZIN, S.; OGI, F.X.; HENGSTERMANN, A.; SCHEFFNER, M.; BLATTNER, C. Involvement of the DNA repair protein hHR23 in p53 degradation. **Mol. Cell Biol.**, v. 23, n. 24, p. 8960-8969, dez. 2003.

GOLLAS, G.T.; HERNANDEZ, L.J.; VARGAS, A.F. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). **Comp. Biochem. Physiol. A.**, v. 117, n. 3, p. 419-425, jul. 1997.

GÖRG, A.; DREWS, O.; LÜCK, C.; WEILAND, F.; WEISS, W. 2-DE with IPGs. **Electrophoresis**, supl. 1, p. 122-132, jun. 2009.

GRANT, D.F.; MATSUMURA, F. Glutathione s-transferase-1 in aedes aegypti larvae: purification and properties. **Insect Biochem.**, v. 18, n. 6, p. 615-622, abr. 1988.

GUBLER, D.J. Insects in Disease Transmission. *In*: STRICKLAND, G.T., editor. **Hunter's tropical medicine**, 7th edition. Philadelphia (PA): W. B. Saunders; 1991. p. 981-1000.

GUBLER, D.J. The global resurgence of arboviral diseases. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, n.5, p. 449-51, set./out. 1996.

GUBLER, D.J. Ressurgent vector-borne diseases as a global health problem. **Emerg. Infect Dis.**, v. 4, n. 3, p. 442-450, jul./set. 1998a.

GUBLER, D.J. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. **Clin. Microb. Rev.**, v. 11, n. 3, p. 480-496, ago. 1998b.

GUBLER, D.J. **Vector-borne diseases**. Program in Emerging Infectious Diseases, Duke-NUS Graduate Medical School Singapore, 8 College Road, Singapore. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics), v. 28, n. 2, p. 583-588, 2009.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, nov. 1974.

HALL, M.; SÖDERHÄLL, K.; SOTTRUP-JENSEN, L. Amino acid sequence around the thiolester of alpha sub(2)-macroglobulin from plasma of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. **FEBS Letters**, v. 254, n. 1-2, p. 111-114, ago. 1989.

HARTL, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 13, n. 6583, p. 571-579, jun. 1996.

HAYNES, P.A., YATES, J.R. Proteome profiling-pitfalls and progress. **Yeast**. v. 17, p.81-87, 2000.

HEGEDUS, D.; O'GRADY, M.; CHAMANKHAH, M.; BALDWIN, D.; GEDDIE, S.; BRAUN, L.; ERLANDSON, M. Changes in cysteine protease activity and localization during midgut metamorphosis in the crucifer root maggot (*Delia radicum*). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 11, p. 1585-1596, nov. 2002.

HEMINGWAY, J.; MIYAMATO, J.; HERATH, P.R.J. A possible novel link between organophosphorous and DDT insecticide resistance genes in *Anopheles* supporting evidence from fenitrothion metabolism studies. **Pestic. Biochem. Physiol.** 39, n. 1, p. 49-56, jan. 1991.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, n. 11, p. 1009-1015, nov. 2000.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annu Rev Entomol.**, v. 45, p. 371-391, 2000.

HEMINGWAY, J.; FIEL, L.; VONTAS, J. An overview of insecticide resistance. **Science**, v. 298, n. 5591, p. 96–97, out. 2002.

HENN, M.W. Adsorption von Tanninen aus eichenblättern an kohlen – hydrathatilger verbindungen. **Mitt. Dtsch. Entomol. Ges.**, v. 11, p. 495-499, out. 1997.

HERNANDEZ, L.J.; GOLLAS, G.T.; VARGAS, A.F. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). **Comp. Biochem. Physiol. C** v. 113, n. 1, p. 61-66, jan. 1996.

HIYAMA, H., YOKOI, M., MASUTANI, C., SUGASAWA, K., MAEKAWA, T., TANAKA, K., HOEIJMAKERS, J.H., AND HANAOKA, F. Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26S proteasome. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 39, p. 28019 –28025, set. 1999.

HOMMA, K.; KURATA, S.; NATORI, S. Purification, characterization, and cDNA cloning of procathepsin L from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* (Flesh Fly), and its involvement in the differentiation of imaginal discs. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 21, p. 15258–15264, mai. 1994.

HUANG, L.H.; CHEN, B.; KANG, L. Impact of mild temperature hardening on thermotolerance, fecundity, and Hsp gene expression in *Liriomyza huidobrensis*. **J. Insect Physiol.**, v. 53, n. 12, p., 1199-1205, dez. 2007

IP, M.M.; CHEE, P.Y.; SWICK, R.W. Turnover of hepatic mitochondrial ornithine aminotransferase and cytochrome oxidase using (14C)carbonate as tracer. **Biochim Biophys Acta.**, v. 354, n.1, p. 29-38, jun. 1974.

IUPAC. **Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives.** IUPAC Method 2.301. Report of IUPAC Working Group WG 2/87. Blackwell Scientific Publications, 7th ed., 1987.

IVANOV, A.I.; BACHAR, M.; BABBIN, B.A.; ADELSTEIN, R.S.; NUSRAT, A.; PARKOS, C.A. A unique role for nonmuscle myosin heavy chain IIA in regulation of epithelial apical junctions. **PLoS One.**, v. 2, n. 7, p. 658, ago. 2007.

IVANOVA, S.; REPNIK, U.; BOJIČ, L.; PETELIN, A.; TURK, V.; TURK, B. Lysosomes in apoptosis. **Methods Enzymol.**, v. 442, p. 183– 199, 2008.

JONSSON, A.P. Mass spectrometry for peptide and protein characterization. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 58, n. 7, p. 868-884, jun. 2001.

JÖRNVALL, H.; PERSSON, B.; JEFFERY, J. Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. **Eur. J. Biochem.**, v. 167, n. 2, p. 195-201, set. 1987.

JOSHI, V.; SHARMA, R.C. Impact of vertically-transmitted dengue virus on viability of eggs of virus-inoculated *Aedes aegypti*. **Dengue Bull.**, n. 25, p. 103-106, 2001.

KALE, S.P.; MURTHY, N.B.K.; RAGHU, K.; SHERKHANE, P.D.; CARVALHO, M. F.P. Studies on degradation of ¹⁴C-DDT in the marine environment. **Chemosphere**, v. 39, n.6, p. 959–968, set. 1999.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and genomes. **Nucleic Acid Res.**, v. 28, n.1, p. 27–30, jan. 2000.

KHAN, A.U.; MEI, Y.H.; WILSON, T. A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. **PNAS**, v. 89, n. 23, p. 11426-11427, dez. 1992.

KHUSH, R.S.; LEMAITRE, B. Genes that fight infection: what the *Drosophila* genome says about animal immunity. **Trends Genet.**, v. 16, n. 10, p. 442-449, out. 2000.

KIRKEGAARD, T.; ROTH, A.G.; PETERSEN, N.H.; MAHALKA, A.K.; OLSEN, O.D.; MOILANEN, I.; ZYLICZ, A.; KNUDSEN, J.; SANDHOFF, K.; ARENZ, C.; KINNUNEN, P.K.; NYLANDSTED, J.; JÄÄTTELÄ, M. Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann–Pick disease-associated lysosomal pathology. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 549 – 553, jan. 2010.

KOGAN, P.H.; HAGEDORN, H.H. Polyamines, and effects from reducing their synthesis during egg development in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **J. Insect Physiol.**, v. 46, p. 1079 -1095, 2000.

KOSTAL, V.; TOLLAROVA-BOROVANSKA, M. The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus*. **Plos ONE**, v. 4, n.2, p. 4546, fev. 2009.

KRAJ, A.; SILBERRING, J. **Proteomics: Introduction to methods and applications**. 1a edição. Reino Unido: Wiley Interscience, 2008. 376p.

KROGSTAD, D.J. Malaria as a reemerging disease. **Epidemiol. Rev.**, v. 18, n. 1, p. 77-89, jul.1996.

KUKREJA, R.C.; KONTOS, M.C.; LOESSER, K.E.; BATRA, S.K.; QIAN, Y.Z.; GBUR, C.J.; NASEEM, S.A.; JESSE, R.L.; HESS, M.L. Oxidant stress increases heat shock protein 70 Mrna in isolated perfused rat heart. **Am. J. Physiol.**, v. 267, n. 6, parte 2, p. H2213-H2219, dez. 1994.

KURATA, S.; SAITO, H.; NATORI, S. The 29-kDa hemocyte proteinase dissociates fat body at metamorphosis of Sarcophaga. **Dev. Biol.**, v. 153, n. 1, p. 115–121, set. 1992.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, ago. 1970.

LANDER, J.E., PARSONS, J.F., RIFE, C.L., GILLILAND, G.L. AND ARMSTRONG, R.N. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanisms of the mitochondrial class Kappa enzyme rGSTK1-1. **Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 352–261, jan. 2004.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V.M.T.; CARDINALI, A. **Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects**. In: IMPERATO, F. *Phytochemistry: advances in research*. 1^a Edição. Trivandrum, Kerala; 2006, p. 23-66.

LAURENTINO DE CARVALHO, M.S.; CALDAS, E.D.; DEGALLIER, N.; VILARINHOS, P.T.R.; SOUZA, L.C.K.R.; YOSHIZAWA, M.A.C.; KNOX, M.B.; OLIVEIRA, C. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n.5, out. 2004.

LEE, K. Glutathione s-transferase activities in phytophagous insects: induction and inhibition by plant phototoxins and phenols. **Insect Biochem.** v. 21, n. 4, p. 353-361, mar. 1991

LEFEVRE, T.; THOMAS, F.; SCHWARTZ, A.; LEVASHINA, E.; BLANDIN, S.; BRIZARD, J.P.; LE BOURLIGU, L.; DEMETTRE, E.; RENAUD, F.; BIRON, D.G. Malaria *Plasmodium* agent induces alteration in the head proteome of their *Anopheles* mosquito host. **Proteomics**, v. 7, n. 11, p. 1908-1915, jun. 2007.

LEFF, S.E.; EVANS, R.M.; ROENFELD, M.G. Splice commitment dictates neuron-specific alternative RNA processing in calcitonin/CGRP gene expression. **Cell**, v. 48, n. 3, p. 517-524, fev. 1987.

LEVY, F.; BULET, P.; EHRET-SABATIER, L. Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. **Mol. Cell Proteomics**, v. 3, n. 2m p. 156-166, fev. 2004.

LI, X.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, p. 231-253, jan. 2007.

LIMA, E.P.; PAIVA, M.H.S.; ARAÚJO, A.P.; SILVA, E.V.G.; SILVA, U.M.; OLIVEIRA, L.M.; SANTANA, A.E.G.; BARBOSA, C.N.; NETO, C.C.P; GOULART, M.O.F; WILDING, C.S.; AYRES, C.F.J.; SANTOS, M.A.V.M. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. **Parasit. Vectors**, v.4, n.5, jan. 2011.

LINDQUIST, S. The heat shock response. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 55, p. 1151–1191, 1986.

LOW, T.Y., SEOW, T.K., CHUNG, M.C. Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. **Proteomics**, v. 2, p.1229-1239, 2002.

LU, Z.C.; WAN, F.H. Using double-stranded RNA to explore the role of heat shock protein genes in heat tolerance in *Bemisia tabaci* (Gennadius). **J. Exp. Biol.**, v. 214, parte 5, p. 764-769, mar. 2011.

MARITSI, D.; STAGIKAS, D.; CHARALABOPOULOS, K.; BATISTATOU, A. What's new in p53? **Hippokratia.**, v. 10, n.3, p. 116-119, jul. 2006.

MARY, J.; VOUGIER, S.; PICOT, C.R.; PERICHON, M.; PETROPOULOS, I.; FRIGUET, B. Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins. **Exp. Gerontol.**, v. 39, n. 8, p. 1117 -1123, ago. 2004.

MASUTANI, C.; SUGASAWA, K.; YANAGISAWA, J.; SONOYAMA, T.; UI, M.; ENOMOTO, T.; TAKIO, K.; TANAKA, K.; van der SPEK, P.J.; BOOTSMA, D., *et al.* Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. **EMBO J.**, v. 13, n. 8, p. 1831 – 1843, abr. 1994.

MATTHEWS, H.R. Polyamines, chromatin structure and transcription. **Bioessays**, v. 15, n. 8, p. 561-566, ago. 1993.

MENON, A.R.R.; PILLAI, C.K.S.; SUDHA, J.D.; MATHEW, A.G. Cashewnut shell liquid-its polymeric and other industrial products. **J. Sci. Ind. Res.**, v. 44, p. 324–338, jun. 1985.

MICHAŁOWICZ, J.; DUDA, W. Phenols – Sources and Toxicity. **Polish J. of Environ. Stud.**, v. 16, n. 3, p. 347-362, abr. 2007.

MICHAUD, M.R.; TEETS, N.M.; PEYTON, J.T.; BLOBNER, B.M.; DENLINGER, D.L. Heat shock response to hypoxia and its attenuation during recovery in the fleshfly, *Sarcophaga crassipalpis*. **J. Insect Physiol.**, v. 57, n. 1, p. 203-210, jan. 2011.

MOREL, F.; RAUCH, C.; PETIT, E.; PITON, A.; THERET, N.; COLES, B.; GUILLOUZO, A. Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 16, p. 16246 –16253, abr. 2004.

MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN G.J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **J. Androl.**, v.27, n.2, p.201–211, 2006.

MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D.K.; CHOWDHURI, D.K. Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ). **Environ Health Perspect.**, v.111, n.16, p. 1926-1932, dez. 2003.

NAZIR, A.; MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D.K.; CHOWDHURI, D.K. Chlorpyrifos induced hsp70 expression and effect on reproductive performance in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 41, n.4, 443–449.nov. 2001.

NEDELCO, A.M.; TAN, C. Early diversification and complex evolutionary history of the p53 tumor suppressor gene family. **Dev. Genes Evol.**, v. 217, n. 11-12, p. 801-806, out. 2007.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1273p.

NG, J.M.; VERMEULEN, W.; VAN DER HORST, G.T.; BERGINK, S.; SUGASAWA, K.; VRIELING, H.; HOEIJMAKERS, J.H. A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23 –dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. **Genes Dev.**, v. 17, n. 13, p. 1630–1645, jul. 2003.

NGUYEN, T.T.; MICHAUD, D.; CLOUTIER, C. A proteomic analysis of the aphid *Macrosiphum euphorbiae* under heat and radiation stress. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v 39, n.1, p. 20-30, jan. 2009.

NYLANDSTED, J.; GYRD-HANSE M.N.; DANIELEWICZ A.; FEHRENBACHER, N.; LADEMANN U.; HØYER-HANSEN M.; WEBER, E.; MULTHOFF, G.; ROHDE, M.; JÄÄTTELÄ, M. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. **J. Exp. Med.**, v. 200, n. 4, p. 425– 435, ago 2004.

OLIVEIRA, M.S.C; MORAIS, S.M.; MAGALHÃES, D.V.; BATISTA, W.P.;VIEIRA, I.G.P.; CRAVEIRO, A.A.; MANEZES, J.E.S.A.; CARVALHO, A.F.U.; LIMA, G.P.G. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica**, v.117, n.3, p. 165-170, ago. 2011.

ONSTAD, D.W. **Insecticide Resistance Management: Biology, Economics and Prediction**. London, UK: Academic Press, 2007. 320 p.

OOI, E-E; GUBLER, D.J. Global spread of epidemic dengue: the influence of environmental change. **Future Virol.**, v. 4, n.6, p.571-580, nov. 2009.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Malaria key facts. Washington DC, 2012. Disponível em: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2573&Itemid=2060. Acessado em: 08 out. 2012.

PARAMASHIVAPPA, P.; KUMAR, P.P.; VITHAYATHIL, P.J.; RAO, A.S. Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, 2548–2551, mai. 2001.

PARK, I.-K.; SHIN, S.-C.; KIM, C.-S.; LEE, H.-J.; CHOI, W.-S.; AHN, Y.-J. Larvicidal activity of lignans identified in *Phryma leptostachya* var. *asiatica* roots against three mosquito species. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 4, p. 969-972, fev. 2005.

PATRAMOOL, S.; SURASOMBATPATTANA, P.; LUPLERTLOP, N.; SÉVÉNO, M.; CHOUMET, V.; THOMAS, F.; MISSÉ, D. Proteomic analysis of an *Aedes albopictus* cell line infected with Dengue serotypes 1 and 3 viruses. **Parasit. Vectors.**, v. 4, jul. 2011.

PAUCHET, Y.; MUCK, A.; SVATOS, A.; HECKEL, D.G.; PREISS, S. Mapping the larval midgut lumen proteome of *Helicoverpa armigera*, a generalist herbivorous insect. **J. Proteome Res.**, v. 7, n. 4, p. 1629-1639, abr. 2008.

PEDRA, J.H.F.; MCINTYRE, L.M.; SCHARF, M.E.; PITTENDRIGH, B.R. Genom-wide transcription profile of field- and laboratory-selected dichlorodiphenyltrichlor-oethane (DDT)-resistant *Drosophila*. **PNAS**, v. 101, n. 18, p. 7034–7039, mai. 2004.

PEGG, A.E. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. **Bioch. J.**, v. 234, n. 2, p. 249–262, mar. 1986.

PERAZZOLO, L.M.; BARRACCO, M.A. The prophenoloxidase activity system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 21, n. 5, p. 385-395, set.-out. 1997.

PEREIRA, K.L. **Análise do perfil proteico do intestino médio de machos e fêmeas de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera:Culicidae), em diferentes condições alimentares.** 2007. 80 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia). Universidade do Amazonas, Manaus, 2007.

PERSSON, B.; HEDLUND, J.; JÖRNVALL H. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. The MDR superfamily. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 65, n. 24, p. 3879-3894, dez. 2008.

PHILIP, C.B.; ROZENBOOM, L.E. Medico-veterinary entomology: a generation of progress. *In*: SMITH, R.F.; MITTLER, T.E.; SMITH, C.N. **History of entomology**. Palo Alto (CA): Annual Reviews Inc; 1973, p. 333-359.

PLANELLO, R.; HERRERO, O.; MARTINEZ-GUITARTE, J.L.; MORCILLO, G. Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. **Aquat. Toxicol.**, v. 105, n. 1-2, p. 62-70, set. 2011.

PLANELLO, R.; MARTINEZ-GUITARTE, J.L.; MORCILLO, G. The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. **Chemosphere**, v. 71, n. 10, p. 1870-1876, mai. 2008.

POPOVA-BUTLER, A.; DEAN, D.H. Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. **J. Insect Physiol.**, v. 55, n. 3, p. 264-272, mar. 2009.

POWELL, G.F.; WARD, D.A.; PRESCOTT, M.C.; SPILLER, D.G.; WHITE, M.R.H.; TURNER, P.C.; EARLEY, F.G.P.; PHILLIPS, J.; REES, H.W. The molecular action of the novel insecticide, Pyridalyl. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 41, n. 7p, 459-469, jul. 2011.

PRABHAKARAN, K.; PAVITHRAN, C. Cardanol: A New Dispersant for Alumina in Toluene. **J. Am. Ceram. Soc.**, v. 83, n.6, p. 1533-35, dez. 2000.

PROTEIN DATA BANK. Beta-galactosidase. Disponível em: http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-in/enzymes/GetPage.pl?ec_number=3.2.1.23. Acessado em: 28 dez. 2012.

RAASI, S.; WOLF, D.H. Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 18, n. 6, p. 780-791, dez. 2007.

RAHUMAN, A.A.; VENKATESAN, P.; GOPALAKRISHNAN, G. Mosquito larvicidal activity of oleic and linoleic acids isolated from *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad. **Parasitol. Res.**, v. 103, p. 1383-1390, ago. 2008.

RANGEL, D.E.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycol. Res.**, v. 112, parte 11, p. 1362-1372, nov. 2008.

RANKE, J.; MÖLTER, K.; STOCK, F.; BOTTIN-WEBER, U.; PO CZOBUTT, J.; HOFFMANN, J.; ONDRUSCHKA, B.; FILSER, J.; JASTORFF, B. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 58, n. 3, 396–404, jul. 2004.

RANSON, H.; PRAPANTHADARA, L.; HEMINGWAY, J. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT-resistant strain of *Anopheles gambiae*. **Biochem. J.**, v. 324, n., p. 97-102, mai. 1997.

REITER, P. Climate change and mosquito-borne disease. **Environ. Health Perspect.** March; 109, n.1 p. 141–161, mar. 2001.

REPNIK, U.; STOKA, V.; TURK, V.; TURK, B. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. **Biochim. Biophys. Acta**, 1824, n. 1, p. 22–33, jan. 2012.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 4ª edição. São Paulo: Guanabara Koogan, 2011. 410 p.

ROSEN, L.; SHROYER, D.A.; TESH, R.M.; FREIR, J.E.; JIN, J.C. Transovarian transmission of dengue viruses: *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 5, p. 1108-1119, set. 1983.

SALEEM, A.M.; SHAKOORI, A.R.; WILKINS, R.M.; MANTLE, D. *In vivo* effect of Lambda-cyhalothrin and malathion on the proteolytic enzymes of malathion-resistant and susceptible strains of *Musca domestica*. **Pakistan J. Zool.**, v. 26, p. 327–333, 1994.

SANTOS, S.R.L.; SILVA, V.B.; MELO, M.A.; BARBOSA, J.D.F.; SANTOS, R.L.C.; SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H. Toxic effects on and structure-toxicity relationships

of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 10, p. 1-6, fev. 2010.

SCHIBLER, U.; MARCU, K.B.; PERRY, R.P. The synthesis and processing of the messenger RNAs specifying heavy and light chain immunoglobulins in MPC-11 cells. **Cell**, v.15, n. 4, p. 1495-1509, dez. 1978.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE/SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SES/SINAN). **Incidência de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2011.** Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_de_dengue_classica_brasil_1990_2011.pdf. Acesso em 08 nov. 2012.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE/SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ (SMS/SESA). **Boletim da dengue no Ceará em 2012.** Disponível em: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CEkQFjAD&url=http%3A%2F%2Fsalasituacao.saude.ce.gov.br%2Fagravos%2Fresources%2Fdownload&ei=ecfkUPWTLYm69gSD3ICQBQ&usg=AFQjCNFUOHl3juY2X55FjMiHxGYj5Bjg-A&sig2=I5Gd2Wn9bUVzzq55uf73-A&bvm=bv.1355534169,d.eWU&cad=rja> > Acesso em 08 nov. 2012.

SHAKOORI, A.R.; AGHA, S.; SALEEM, M.A.; ALI, S.S. Biochemical abnormalities produced by sublethal doses of synthetic pyrethroid, Sumicidim Super, on the sixth instar larvae of red flour beetle, *Tribolium castaneum*, **Pakistan J. Ent. Karachi.**, v. 9, p. 5-20, 1994.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V.M.; DOWD, C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem. J.**, v. 360, p. 1-16, nov. 2001.

SHEN, S.; CHIEN, Y.; CHIEN, C. Induction of glutathione s-transferases activities in *Drosophila melanogaster* exposed to phenol. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 53, n. 2, p. 80-91, jun. 2003.

SHEPARD, D.S.; COUDEVILLE, L.; HALASA, Y.A.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G.H. Economic impact of dengue illness in the Americas. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.84, n.2, p.200-207, fev. 2011.

SHIH, V.E. Regulation of ornithine metabolism. **Enzyme**, v. 26, n. 5, p. 254-258, 1981.

SHU, Y.; DU, Y.; WANG, J. Molecular characterization and expression patterns of *Spodoptera litura* heat shock protein 70/90, and their response to zinc stress. **Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.**, v. 158A, n. 1, p. 102-110, jan. 2010.

SILVA, L.B.; REIS, A.P.; PEREIRA, E.J.G.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C. Altered cysteine proteinase activity in insecticide-resistant strains of the maize weevil: Purification and characterization. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 157, n.1, p. 80-87, set. 2010.

SILVA, A.X.; BACIGALUPE, L.D.; LUNA-RUDLOFF, M.; FIGUEROA, C.C. Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) II: costs and benefits. **PLoS One.**, v. 7, n.6, e36810, jun. 2012.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Ed. LTC, 2006. 506 p.

SJÖHOL, A. Role of polyamines in the regulation of proliferation and hormone production by insulin-secreting cells. **Am J Physiol.**, v. 264, v. 3, parte 1, p. 501-518, mar. 1993.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 10, n. 1, p. 23-28, fev. 1998.

SOUZA, C.E.; REGO, J.P.; LOBO, C.H.; OLIVEIRA, J.T.; NOGUEIRA, F.C.; DOMONT, G.B.; FIORAMONTE, M.; GOZZO, F.C.; MORENO, F.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; FIGUEIREDO, J.R.; MOURA, A.A. Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams. **J. Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4436-4456, jul. 2012.

SOUZA, T.M.; CUNHA, A.P.; FARIAS, D.F.; MACHADO, L.K.; MORAIS, S.M.; RICARDO, N.M.P.S.; CARVALHO, A.F.U. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. **Pest. Manag. Sci.**, v. 68, p. 1380-1384, jun. 2012.

SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. The proPO and clotting system in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, n.1, p. 53-69, nov. 2000.

STAHL, E.; KELLER, K.; BLINN, C. Cardanol, a skin irritant in pink pepper. **Planta Med.**, v. 48, n. 5, p. 5-9, mai. 1983.

STOKA, V.; TURK, V.; TURK, B. Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis. **Biol. Chem.**, v. 388, n. 6, p. 555–560, jun. 2007.

SUGUMARAN, M.; NELLAIAPPAN, K. Lysolecithine a potent activator of prophenoloxidase from the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 176, v. 3, p. 1371-1376, mai. 1991.

SUNG, H.H.; CHANG, H.J.; HER, C.H.; CHANG, J.C.; SONG, Y.L. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 71, n. 1, p. 26-33, jan. 1998.

TABOR, C.W., TABOR, H. Polyamines. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 53, p. 749–790, 1984.

TAKAGAKI, Y.; MANLEY, J.L. Levels of polyadenylation factor CstF-64 Control IgM heavy chain mRNA accumulation and other events associated with B cell differentiation. **Mol. Cell.**, v. 2, n. 6, p. 761-771, dez. 1998.

TANG, A.H.; TU, C.P.D. Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D2. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 45, p. 27876-27884, nov. 1994.

TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-871, mai-jun. 2002.

THOMAS, T.; THOMAS, T.J. Selectivity of polyamines in triplex DNA stabilization. **Biochemistry** v. 32, n. 50, p. 14068-14074, dez. 1993.

UCHIDA, K.; OHMORI, D.; UENO, T.; NISHIZUKA, M.; ESHITA, Y.; FUKUNAGA, A.; KOMINAMI, E. Preoviposition activation of cathepsin-like proteinases in degenerating ovarian follicles of the mosquito *Culex pipiens pallens*. **Dev. Biol.**, v. 237, n.1, p. 68–78, set. 2001.

van der SPEK, P.J.; EKER, A.; RADEMAKERS, S.; VISSER, C.; SUGASAWA, K.; MASUTANI, C.; HANAOKA, F.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J.H. XPC and human homologs of RAD23: intracellular localization and relationship to other nucleotide excision repair complexes. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, 13, p. 2551 – 2559, jul. 1996.

VIERSTRAETE, E.; VERLEYEN, P.; SAS, F.; van den BERGH, G.; de LOOF, A.; ARCKENS, L.; SCHOOF, L. The instantly released *Drosophila* immune proteome is infection-specific. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 317, n. 4, p. 1052-1060, mai. 2004.

VONTAS, J.G.; SMALL, G.J.; HEMINGWAY, J. GlutathioneS -transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance. **Biochem J.**; v. 357, parte 1, p. 65-72, jul. 2001.

WANG, H.; DONG, S.Z.; LI, K.; HU, C.; YE, G.Y. A heat shock cognate 70 gene in the endoparasitoid, *Pteromalus puparum*, and its expression in relation to thermal stress. **BMB Rep.**, v. 41, n.5, p. 388-393, mai. 2008.

WARE, G.W.; WHITACRE, D.M. An Introduction to Insecticides. *In*: WARE, G.W. **The pesticide book**. Tucson (AR): MeisterPro Information Resources, 2004, pp. 225-247.

WATKINS, J. F.; SUNG, P.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. **Mol. Cell. Biol.**, v. 13, n. 12, p. 7757 – 7765, dez. 1993.

WELCH, W.J. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiol. Rev.**, v. 72, n. 4, p. 1063–1081, out. 1992.

WIGGLESWORTH, V.B. The storage of protein, fat, glycogen and uric acid in the fat body and other tissues of mosquito larvae. **J. Exp. Biol.**, v. 19, p. 56-77, mai. 1942.

WIJFFELS, G.; EISEMANN, C.; RIDING, G.; PEARSON, R.; JONES, A.; WILLADSEN, P.; TELLAM, R. A novel family of chitin-binding proteins from insect type 2 peritrophic matrix. cDNA sequences, chitin binding activity, and cellular localization. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 18, p. 15527-15536, mai. 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue and severe dengue. Washington DC, 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> Acessado em: 08 out. 2012.

XU, J.; SHU, J.; ZHANG, Q. Expression of the *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) hsp83 gene and its relation to oogenesis during ovarian maturation. **J. Genet. Genomics**, v. 37, n.8, p. 513-522, ago. 2010.

YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, S.Y. Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 106, n. 1, p. 35–45, out. 1993.

YANG, H-J.; ZHOU, F.; MALIK, F.A.; BHASKAR, R.; LI, X.H.; HU, J-B.; SUN, C-G.; MIAO, Y-G. Identification and characterization of two chitin-binding proteins from the peritrophic membrane of the silkworm, *Bombyx mori* L. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 75, n. 4, p. 221-230, dez. 2010.

YOSHIDA, K.M.; JUNI, N.; HORI, S.H. Molecular cloning and characterization of *Drosophila* ornithine aminotransferase gene. **Genes Genet. Syst.**, v. 72, n. 1, p. 9-17, fev. 1997.

YOSHIMI, T.; ODAGIRIA, K.; HIROSHIGE, Y.; YOKOBORI, S.; TAKAHASHI, Y.; SUGAYA, Y.; MIURA, T. Induction profile of HSP70-cognate genes by environmental pollutants in Chironomidae. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 28, n. 2, p. 294–301, set. 2009.

YU, S. J. Insect glutathione S-transferases. **Zool. Stud.**, v. 35, p. 9-19, 1996.

YUE, X.L.; LEHRI, S.; LI, P.; FIÈRE V.B.-C.; PETIT, E.; HUANG, Q.F.; ALBANESE, P.; BARRITAU, D.; CARUELLE, J.P.; PAPY-GARCIA, D.; MORIN, C. Insights on a new

path of pre-mitochondrial apoptosis regulation by a glycosaminoglycan mimetic, **Cell Death Differ**, v. 16, p. 770-781, 2009.

ZAREMBINSKI, T.I.; HUNG, L.W.; MUELLER-DIECKMANN, H.J.; KIM, K.K.; YOKOTA, H.; KIM, R.; KIM, S.H. Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: A test case of structural genomics. **PNAS**, v. 95, n. 26, p. 15189-15193, dez. 1998.

ZHANG, S.; BERNSTEIN, S. Spatially and temporally regulated expression of myosin heavy chain alternative exons during *Drosophila* embryogenesis. **Mech. Dev.**, v. 101, n. 1-2, p. 35-45, mar. 2001.

ZHAO, L.; BECNEL, J.J.; CLARK, G.G.; LINTHICUM, K.J. Expression of AeaHsp26 and AeaHsp83 in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae and pupae in response to heat shock stress. **J. Med. Entomol.**, v. 47, n. 3, p. 367-375, mai. 2010a.

ZHAO, L.; BECNEL, J.J.; CLARK, G.G.; LINTHICUM, K.J.; CHEN, J., JIN, X. Identification and expression profile of multiple genes in response to magnesium exposure in *Culex quinquefasciatus* larvae. **J. Med. Entomol.**, v. 47, n. 6, p. 1053-1061, nov. 2010b.

ZHAO, L.; JONES, W. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. **ISJ**, v. 9, p. 93-101, mai. 2012.

ZHAO, L.; PRIDGEON, J.; BECNEL, J.J.; CLARK, G.G.; LINTHICUM, K.L. Identification of genes differentially expressed during heat shock treatment in *Aedes aegypti*. **J. Med. Entomol.**, v. 46, n.3, p. 490-495, mai. 2009.

ZHOU, Z. H.; SYLVANEN, M. A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 256, n. 2, p. 187-194, set. 1997.