

DANIELE YUMI SASAKI

**AVALIAÇÃO DE UM INIBIDOR DE PROTEINASE SERÍNICA SOBRE
O DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *Aedes aegypti*: EFEITO DA
EXPOSIÇÃO CRÔNICA E AGUDA**

CAMPO GRANDE-MS
2014

DANIELE YUMI SASAKI

**AVALIAÇÃO DE UM INIBIDOR DE PROTEINASE SERÍNICA SOBRE
O DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *Aedes aegypti*: EFEITO DA
EXPOSIÇÃO CRÔNICA E AGUDA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Saúde e Desenvolvimento na Região
Centro-oeste da Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, para
obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Lígia
Rodrigues Macedo

Co-Orientador: Prof. Dr. Antônio
Pancrácio de Souza

CAMPO GRANDE-MS
2014

DANIELE YUMI SASAKI

**AVALIAÇÃO DE UM INIBIDOR DE PROTEINASE SERÍNICA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *Aedes aegypti*: EFEITO DA EXPOSIÇÃO
CRÔNICA E AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Campo Grande (MS), 20 de Março de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria Lígia Rodrigues Macedo (Orientadora)
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof.^a Dr.^a Eliana Janet Sanjinez Argandoña
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof.^a. Dr.^a. Simone Maria Neto
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof.^a. Dr.^a. Rosani do Carmo de Oliveira Arruda
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Suplente)

*Aos meus pais, Tânia e Haruo;
À minha irmã, Karine;
Ao meu namorado, Luan;
que são a minha força, minha base,
minha estrutura, minha família.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, namorado, irmã e toda minha família, por nunca medirem esforços para me apoiar, por sempre me incentivarem a realizar meu sonho sempre estando ao meu lado, por ser minha estrutura e por me amarem incondicionalmente.

*À minha orientadora, **Maria Lígia R. Macedo**, por ser minha mentora no mundo científico como na vida, pelos seus ensinamentos, por acreditar em mim, por me ensinar a ter amor pela ciência. Muito obrigada por todos esses anos de orientação e por me fazer crescer de uma forma que nem eu mesma imaginaria, mas você já acreditava.*

*Ao co-orientador, **Prof.º Pancrácio**, pela colaboração e apoio.*

A Dr.^a Simone M. Neto e Dr.^a Ana Cristina Jacobowski, pelas valiosas sugestões e correções.

A todos os funcionários e técnicos do DTA e UFMS, pela ajuda e convivência durante estes anos.

Aos meus colegas do LPPFB, pelas horas maravilhosas no laboratório, pela boa vontade em ajudar o outro, seja para discutir um resultado, seja para carregar um reagente, ou trocar uma dialise, por cometerem o mesmo erro no experimento e ninguém entender o porque, pela saga de pegar brindes no SBBq, por serem amigos, pela companhia no café e na frente da sala da Lígia, pelas festas, pelas risadas, choros, pelas idas no escobar, pelas conversas intermináveis sobre o laboratório. Agradeço por serem um grupo, por serem o LPPFB! O maior e melhor experimento que eu pude fazer todos esses anos foi conviver com vocês. Muito obrigada!

As agências de fomento: CAPES, CNPq e FINEP, pelo apoio financeiro.

*“Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre.”*
(Paulo Freire)

RESUMO

Uma das grandes preocupações da saúde pública global, atualmente, é o vetor da dengue e da febre amarela, *Aedes aegypti*. As enzimas digestivas mais abundantes no intestino médio das larvas são do tipo tripsina e quimotripsina. Neste estudo, investigamos os efeitos da exposição crônica e aguda do inibidor de protease de semente de *Adenanthera pavonina* (ApTI) sobre as larvas de *Ae. aegypti*, bem como um possível mecanismo de adaptação. ApTI em concentração não-letal teve um efeito significativo sobre as larvas de *Ae. aegypti*: houve diminuição na sobrevivência, peso e atividades proteolíticas do intestino médio. O perfil zimográfico das amostras demonstrou sete bandas, três das quais apresentaram atividade tríptica. A membrana peritrófica não foi rompida. As enzimas das larvas alimentadas continuaram sensíveis ao ApTI e as atividades enzimáticas voltavam ao normal na ausência de ApTI. Também as enzimas digestivas de larvas não foram capazes de degradar o inibidor. Adicionalmente, ApTI demonstrou atrasar o tempo de desenvolvimento larval. Além disso, os estudos histológicos demonstraram uma degeneração das microvilosidades das células epiteliais do intestino médio na região posterior, hipertrofia das células cecos gástricos e um aumento no espaço ectoperitrófico. Este estudo amplia a base de compreensão do modo de ação de inibidores de proteases em insetos e da maneira que os insetos se adaptam a estes. *Ae. aegypti* não demonstrou ter capacidade de superar os efeitos negativos da ApTI, indicando que esta proteína pode ser um agente promissor contra *Ae. aegypti* no campo da biotecnologia.

ABSTRACT

A current major global public health concern is the vector of dengue and yellow fever, *Aedes aegypti*. The most abundant digestive enzymes in midgut larvae are trypsin and chymotrypsin. In this study, we investigated the short- and long-term effects of *Adenanthura pavonina* seed proteinase inhibitor (ApTI) on *Ae. aegypti* larvae, as well as a possible mechanism of adaptation. ApTI had a significant effect on *Ae. aegypti* larvae exposed to a non-lethal concentration of ApTI during short- and long-duration assays, decreasing survival, weight and proteinase activities of midgut and fecal extracts of larvae. The zymographic profile of ApTI demonstrated seven bands, three bands had trypsin-like activity. The peritrophic membrane was not disrupted. The enzymes of ApTI-fed larvae were found to be sensitive to ApTI and to have a normal feedback mechanism; also, the larval digestive enzymes were not able to degrade the inhibitor. In addition to it, ApTI delayed larval development time. Furthermore, histological studies demonstrated a degeneration of the microvilli of the posterior midgut region epithelium cells, hypertrophy of the gastric caeca cells and an augmented ectoperitrophic space in larvae. Taken together, this study broadens the base of our understanding of the mode of action of proteinases inhibitors in insects and the way that insects adapt to them. *Ae. aegypti* larvae was incapable to overcome the negative effects of ApTI, indicating that this protein may hold promise as an agent against *Ae. aegypti* in biotechnological field.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparativo de casos de dengue notificados entre 2012 e 2013 no Brasil	
.....	16

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa das regiões com risco de transmissão da dengue no mundo	15
Figura 2 - <i>Ae. aegypti</i>	17
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Ae. aegypti</i>	18
Figura 4 - Ovos de <i>Ae. aegypti</i>	19
Figura 5 - <i>Adenanthera pavonina</i>	24
Figura 6 - Interação enzima-inibidor	25
Figura 7 - Morfologia da larva de <i>Ae. aegypti</i>	31
Figura 8 - Efeito biológico de ApTI em larvas de <i>Ae. aegypti</i> expostas	36
Figura 9 - Efeito da exposição crônica de ApTI em <i>Ae. aegypti</i>	39
Figura 10 - Estabilidade de ApTI.	40
Figura 11 - Análise das enzimas digestivas do intestino médio de larvas de <i>Ae. aegypti</i> expostas cronicamente ao ApTI	42
Figura 12 - Fezes de larvas de <i>Ae. aegypti</i>	45
Figura 13 - SDS - PAGE da digestão <i>in vitro</i> pelas proteases do intestino médio de larvas de <i>Ae. aegypti</i>	46
Figura 14 - Atividade proteolítica das enzimas do intestino médio de <i>Ae. aegypti</i> na presença de ApTI	48
Figura 15 - Sobrevivência de larva, pupa e adulto de <i>Ae. aegypti</i>	50
Figura 16 - Análise do efeito agudo de ApTI em diferentes instares de <i>Ae. aegypti</i>	52
Figura 17 - Efeito de ApTI nas larvas de 4º ínstar de <i>Ae. aegypti</i>	54
Figura 18 - Fotomicrografias de larvas de 4º ínstar de <i>Ae. aegypti</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ApTI	inibidor de proteinases de sementes de <i>Adenathera pavonina</i>
BAPNA	N- α -Benzoil-DL-arginil 4-nitroanilida
BSA	albumina sérica bovina
DENV	vírus da dengue
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
HE	hematoxilina-eosina
IM	intestino médio
IP	inibidor de proteinase
kDa	Kilodalton
CL	concentração letal
MP	membrana peritrófica
Nm	Nanômetro
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PSMF	fluoreto de -fenilmetilsulfonila
SAAPFpNA	N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilida
SDS	dodecil sulfato de sódio
TLCK	N- α -Tosil-L-lisina-clorometil cetona
TPCK	N- <i>p</i> -Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
Tris	hidroximetil aminometano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Epidemiologia.....	13
1.1.1 Febre amarela.....	13
1.1.2 Dengue.....	14
1.2 <i>Aedes aegypti</i>.....	17
1.3 Uso de Inseticida.....	19
1.4 Inibidores de Proteinase.....	20
1.5 Mecanismos de adaptação.....	21
1.6 Enzimas digestivas de <i>Ae. aegypti</i>.....	22
1.7 <i>Adenanthera pavonina</i>.....	23
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Comissão de Ética no Uso de Animais.....	27
3.2 Material Vegetal.....	27
3.3 Inseto.....	27
3.4 Obtenção do Extrato Bruto.....	28
3.5 Purificação do Inibidor de <i>Adenanthera pavonina</i>	28
3.6 Estabilidade de ApTI.....	29
3.7 Quantificação de Proteínas.....	29
3.8 Efeito Crônico e Agudo de ApTI no Desenvolvimento Larval de <i>Ae aegypti</i>	29
3.9 Obtenção de Enzimas do Intestino Médio.....	31
3.10 Ensaaios de Atividade Enzimática.....	32
3.11 Atividade Proteolítica do Extrato Enzimático do Intestino Médio em Gel de Eletroforese.....	33
3.12 Digestão <i>in vitro</i> de ApTI pelas Enzimas Digestivas de <i>Ae. aegypti</i>	33
3.13 Microscopia de Luz.....	34
3.14 Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Efeito Crônico de ApTI no Desenvolvimento Larval de <i>Ae aegypti</i>	35

4.2 Análise do Efeito de ApTI na Atividade Enzimática do Intestino Médio de <i>Ae. aegypti</i>	41
4.3 Análise Efeito de ApTI na Aparência Morfológica das Fezes de <i>Ae. aegypti</i>	44
4.4 Digestão <i>in vitro</i> de ApTI pelas Enzimas Digestivas de <i>Ae. aegypti</i>	46
4.5 Inibição da Atividade Proteolítica das Enzimas Digestivas de <i>Ae. aegypti</i> por ApTI	47
4.6 Efeito Crônico de ApTI na Emergência de Pupas e Adultos de <i>Ae. aegypti</i>	49
4.7 Efeito Agudo de ApTI em Diferentes Instares das Larvas de <i>Ae. aegypti</i> ...	51
4.8 Efeito Agudo de ApTI em Larvas de 4º ínstar de <i>Ae. aegypti</i>	53
4.9 Alterações Histológicas em Larvas de <i>Ae. aegypti</i> Expostas Cronicamente ao ApTI.....	55
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

O *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) se tornou uma das principais preocupações da saúde pública global, por ser o principal vetor da forma urbana da febre amarela e da dengue (NEVES *et al.*, 2005). A fêmea do mosquito transmite ao indivíduo picado o arbovírus, um agente etiológico do gênero Flavivírus da família Flaviviridae. Este mosquito é amplamente distribuído nas zonas tropicais e subtropicais (AKRAM & AHMED, 2005). Nos últimos 50 anos, a incidência de dengue aumentou 30 vezes; cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem em países endêmicos de dengue e estima-se que 50-100 milhões de novos casos de infecção ocorram anualmente (WHO, 2009).

1.1.1 Febre amarela

A febre amarela é uma doença infecciosa aguda, pode durar no máximo 10 dias. Seus sintomas são: febre, dor de cabeça, calafrios, náuseas, vômito, dores no corpo, icterícia (a pele e os olhos ficam amarelos) e hemorragias (de gengivas, nariz, estômago, intestino e urina). Não há tratamento específico, apenas tratamento sintomático e requer cuidados na assistência ao paciente. Este deve permanecer em repouso com reposição de líquidos. Nas formas graves, o paciente deve ser atendido numa Unidade de Terapia Intensiva. Sem assistência médica, a doença pode levar a morte. A única forma de evitar a febre amarela silvestre é a vacinação contra a doença. A vacina é gratuita e está disponível nos postos de saúde em qualquer época do ano (BRASIL, 2013a).

A febre amarela possui dois ciclos epidemiológicos: a forma urbana e a silvestre. A forma urbana é conhecida no Brasil desde 1685, quando a sua alta taxa de letalidade levou várias pessoas a óbito. Sua última ocorrência registrada no país foi em 1942, no Acre (BRASIL, 2013a).

A forma silvestre só foi descrita em 1932 e as áreas consideradas de riscos são: Regiões Norte, Centro-Oeste, no estado do Maranhão, parte dos estados do Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Hoje, no Brasil possui uma vacina totalmente eficaz contra a forma silvestre da doença. Geralmente, casos como esses ocorrem com pessoas que não foram vacinadas e estiveram em matas próximos de cidades. Registros mostram que no período de 1980 a 2004, foram confirmados 662 casos de febre amarela silvestre, com ocorrência de 339 óbitos, representando uma taxa de letalidade de 51% no período. Como medida de prevenção, o Ministério da Saúde adotou estratégias para evitar a ocorrência de surto na população humana. Dentre elas, a intensificação da vacinação das pessoas que irão entrar em contato com áreas de matas, florestas ou cerrado nas áreas de risco (BRASIL, 2013a).

1.1.2 Dengue

A dengue é uma doença infecciosa causada por um arbovírus com quatro tipos diferentes de vírus da dengue: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. Ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais do mundo, inclusive no Brasil (Figura 1). As epidemias geralmente ocorrem no verão, durante ou imediatamente após períodos chuvosos (BRASIL, 2002).

A dengue clássica se inicia de maneira súbita e pode ocorrer febre alta, dor de cabeça, dor atrás dos olhos, dores nas costas. Às vezes aparecem manchas vermelhas no corpo. A febre dura cerca de cinco dias com melhora progressiva dos sintomas em 10 dias. Em alguns poucos pacientes podem ocorrer hemorragias discretas na boca, na urina ou no nariz. Raramente há complicações. Assim, como a febre amarela, não existe tratamento específico, apenas tratamentos que aliviam os sintomas. Deve-se ingerir muito líquido. Os sintomas podem ser tratados com dipirona ou paracetamol. Não devem ser usados medicamentos à base de ácido acetilsalicílico e anti-inflamatórios, como aspirina e AAS, pois podem aumentar o risco de hemorragias (BRASIL, 2002).

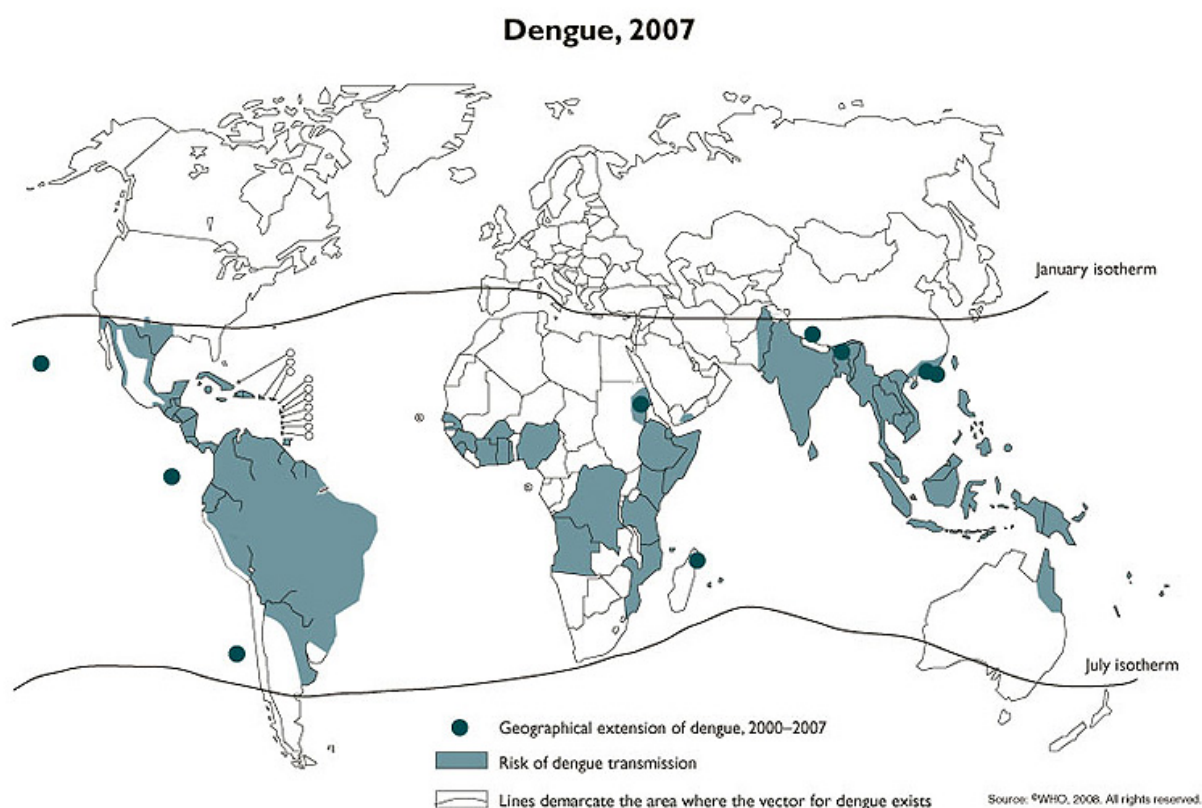


Figura 1 - Mapa das regiões com risco de transmissão da dengue no mundo. (BRASIL, 2013a)

A Secretária de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde registrou até 16 de Fevereiro de 2013, um total de 204.650 casos notificados de dengue no país, sendo confirmados 33 óbitos dos 324 casos graves. No mesmo período em 2012, foram notificados 70.489 casos confirmados, equivalendo a um aumento de 190% (BRASIL, 2013b).

Dentre todas as regiões do Brasil, as regiões Centro-Oeste (80.976 casos) e Sudeste (80.876 casos) lideram em número de notificações em 2013. Este mesmo estudo revela que os estados com maior incidência são Mato Grosso do Sul, Goiás, Acre, Mato Grosso, Tocantins, Espírito Santo, Rondônia e Minas Gerais. O Estado do Mato Grosso do Sul teve o maior percentual de aumento de casos notificados do país, chegando a um alarmante aumento de 4757%, entre 2012 e 2013 (

Tabela 1).

A Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul divulgou um levantamento dos dados de dengue do ano de 2013, da semana 46 (10/11/2013 a

16/11/2013), o qual mostrou que as notificações de casos de dengue somam 100.844, sendo que Campo Grande teve um maior número de registros de notificações neste período (MATO GROSSO DO SUL, 2013).

Tabela 1 - Comparativo de casos de dengue notificados entre 2012 e 2013 no Brasil (BRASIL, 2013b).

UF	CASOS NOTIFICADOS		INCIDÊNCIA (nº de casos por 100 mil habitantes)		PERCENTUAL DE AUMENTO
	2012	2013	2012	2013	
Norte	11.446	18.435	70	112,8	61%
RO	514	3.711	32,3	233,4	622%
AC	688	3.116	90,7	410,7	353%
AM	1.883	4.866	52,4	135,5	158%
RR	218	155	46,4	33	-29%
PA	4.819	1.985	61,6	25,4	-59%
AP	78	181	11,2	25,9	132%
TO	3.46	4.421	229	311,8	36%
Nordeste	24.574	11.943	45,6	22,2	-51%
MA	1.128	313	16,8	4,7	-72%
PI	1.154	346	36,5	10,9	-70%
CE	3.481	1.711	40,4	19,9	-51%
RN	2.310	955	71,6	29,6	-59%
PB	244	522	6,4	13,7	114%
PE	6.837	476	76,6	5,3	-93%
AL	2.316	378	73,2	11,9	-84%
SE	835	199	39,6	9,4	-76%
BA	6.269	7.043	44,2	49,7	12%
Sudeste	25.062	80.876	30,7	99,2	223%
MG	3.755	35.334	18,9	178	841%
ES	1.445	9.013	40,4	251,9	524%
RJ	16.398	14.838	101	91,4	-10%
SP	3.464	21.691	8,3	51,8	526%
Sul	423	12.420	1,5	44,8	2836%
PR	361	12.040	3,4	113,8	3235%
SC	30	172	0,5	2,7	473%
RS	32	208	0,3	1,9	550%
Centro-Oeste	8.984	80.976	62,3	561,4	801%
MS	865	42.015	34,5	1677,2	4757%
MT	3.791	10.765	121,7	345,5	184%
GO	4.080	27.376	66,3	444,8	571%
DF	248	820	9,4	31	231%
Total	70.489	204.650	36,3	105,5	190%

1.2 *Aedes aegypti*

O *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) possui origem africana e foi introduzido nas Américas durante sua colonização (FUNASA, 2001). O mosquito, ao longo do tempo, desenvolveu uma trajetória evolutiva compartilhando os mesmos ambientes e horários de atividade com os humanos, levando-o a um comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico, sendo reconhecido entre os culicídeos como a espécie mais associada ao homem (NATAL, 2002).

Este inseto hematofogo de clima tropical e subtropical possui uma coloração preta, com listras e manchas brancas, adaptado ao ambiente urbano (TAVEIRA *et al.*, 2001). São holometábolos e seu desenvolvimento pode ser dividido em fase aquática e aérea, passando pelo estágio de ovo, larva (quatro instares), pupa e adulto (Figura 2).

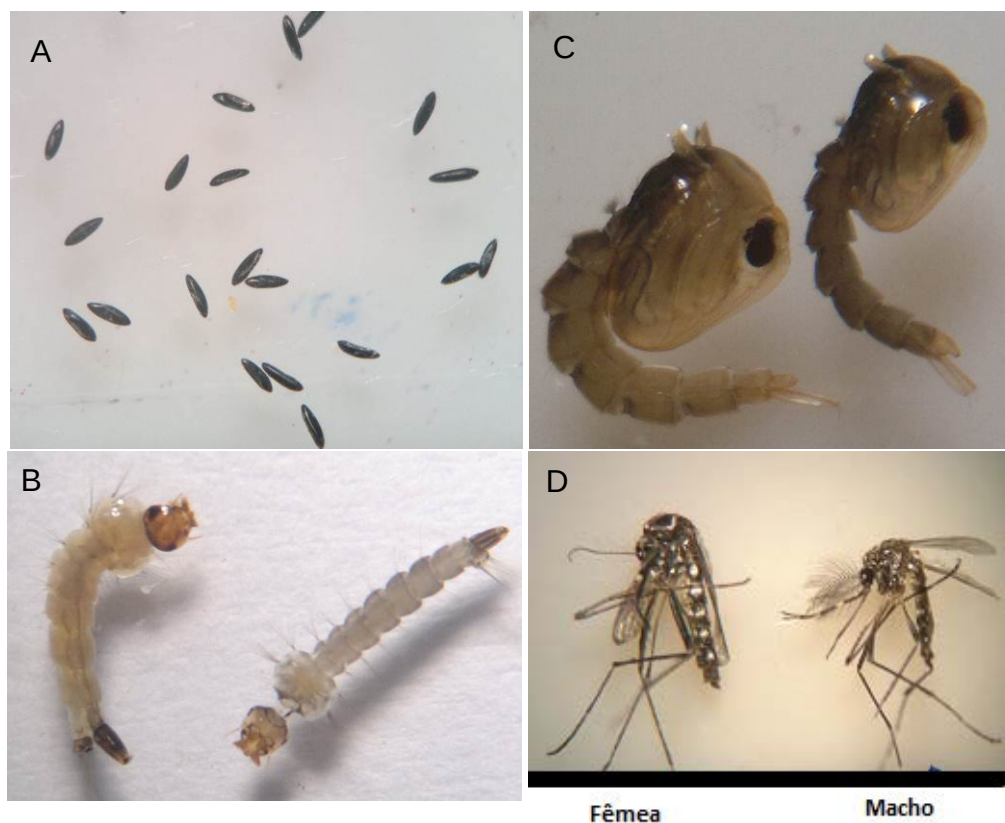


Figura 2 - *Ae. aegypti* : (A) Ovos; (B) Larvas de 4º instar; (C) Pupas; (D) Adultos. (Fonte: Daniele Sasaki)

As larvas de *Ae. aegypti* saem dos ovos e vivem na água por aproximadamente uma semana, já no estágio de pupa estes permanecem por 1 ou 2 dias e após este período surge o mosquito adulto, podendo viver de 1 a 2 meses (Figura 3) (NEVES *et al.*, 2005).

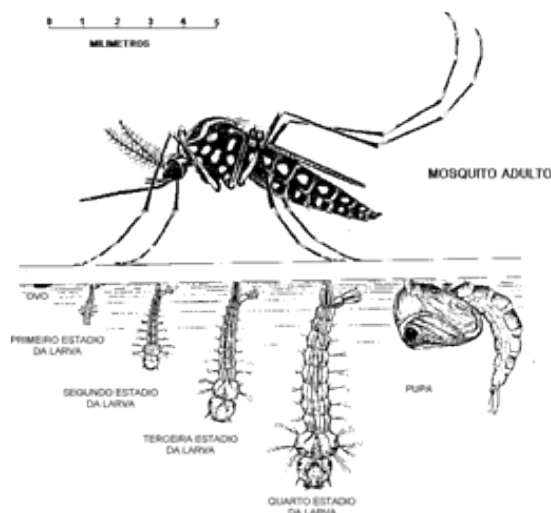


Figura 3 - Ciclo de vida de *Ae. aegypti*. (Fonte: Domínio público)

Os ovos de *Ae. aegypti* medem aproximadamente 0,4 mm de comprimento e possuem uma capacidade de resistir ao ressecamento por grandes períodos, podendo chegar a 450 dias (IOC, 2013) (Figura 4). As fêmeas deste mosquito garantem a dispersão e a preservação dos ovos distribuindo-os em diversos criadouros, cada uma pode dar origem a 1500 mosquitos durante sua vida.

Esta condição dificulta a erradicação do mosquito, pois permite que estes sejam transportados a grandes distâncias em recipientes secos, tornando-se assim o principal meio de dispersão do inseto (FUNASA, 2001).

A transmissão do vírus pelas fêmeas do mosquito pode ocorrer de duas maneiras: transmissão horizontal, entre mosquito-vetor e hospedeiros humano, sendo este o principal mecanismo para a manutenção do vírus em áreas urbanas; e, mais raramente, por transmissão vertical, através da via transovariana, o que significa que, se a fêmea estiver infectada pelo vírus, quando realizar a postura de ovos, as larvas podem nascer com o vírus. Estes mecanismos são particularmente importantes para a manutenção do vírus, uma vez que os ovos de mosquitos são

capazes de sobreviver no meio ambiente, mesmo em condições adversas durante longos períodos (JOSHI *et al.*, 2002; LEE & ROHANI, 2005).

Por estas razões, além dos adultos dos mosquitos, é importante atingir a forma larval do mosquito para garantir o controle da transmissão de doenças endêmicas (COELHO, 2012).



Figura 4 - Ovos de *Ae. aegypti*. (A) Fêmea de *Ae. aegypti* depositando ovos que possuem coloração branca logo após a postura. (B) Ovos de *Ae. aegypti*. Algum tempo após a postura adquire a coloração escura devido ao contato com o oxigênio. (Fonte: Genilton Vieira/IOC).

1.3 Uso de Inseticida

A melhor forma de erradicar as doenças transmitidas pelo o *Ae. aegypti* é interferir no seu ciclo de reprodução. As medidas de controle são programas destinados ao combate do mosquito-vetor mediante a vistoria nos imóveis, conscientização da comunidade e aplicação de inseticidas. Este último vem apresentando baixa eficácia e altos custos.

O uso frequente de inseticidas, tanto na agricultura e agropecuária, como na área de Saúde Pública tem provocado o desenvolvimento de populações resistentes

a estes compostos, comprometendo assim o controle do vetor (TEIXEIRA *et al.*, 1999; BARBOSA *et al.*, 2002; TAUIL, 2002; PENNA, 2003).

Os inseticidas químicos podem ser de origem orgânica ou inorgânica. Os compostos orgânicos atuam no sistema nervoso central dos insetos e são classificados em quatro grupos: organoclorados, destacando-se o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), organofosforados, carbamatos e piretróides (BRAGA & VALLE, 2007).

Segundo Brogdon & McAliister (1998), a resistência tem sido detectada para todas as classes de inseticidas afetando diretamente a re-emergência das doenças transmitidas por vetores. Dessa forma, uma nova alternativa para utilização de inseticidas convencionais necessita ser desenvolvida; destacando-se assim, a utilização de inibidores de enzimas digestivas vegetais.

1.4 Inibidores de Proteinase

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa que lhe dão proteção ao serem atacadas por herbívoros e/ou patógenos, podendo ocorrer constitutivamente ou, após uma indução. Dentre os compostos envolvidos nestes mecanismos de defesas de plantas estão as proteínas inseticidas como as lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIP), canatoxinas, inibidores de α -amilase e inibidores de enzimas proteolíticas (CARLINI & GROSSI DE SA, 2002).

Os inibidores de proteinases (IPs) vegetais são peptídeos ou proteínas, cuja massa molecular varia de 10 a 90 kDa. São encontrados em sementes e tubérculos, geralmente, nas famílias de leguminosas, gramíneas e solanáceas, estas possuem um alto percentual de proteínas totais (OLIVA *et al.*, 1988; RICHARDSON, 1991; XAVIER-FILHO, 1992). Estes são capazes de interagir especificamente e reversivelmente com diferentes enzimas proteolíticas, isto é, enzimas que rompem as ligações peptídicas entre as proteínas; inibindo-as competitivamente (RICHARDSON, 1991; BODE & HUBER, 1992). São consideradas moléculas extremamente estáveis, resistentes a variações de pH, ao calor e à proteólise por proteinases. Sendo que essa estabilidade pode ser atribuída à presença de pontes dissulfeto e a outras interações não covalentes (BIRK, 2003).

Os IPs podem ser classificados em inibidores de serino, cisteino, aspártico e metaloprotease, dependendo da composição de aminoácidos encontrados na região molecular chamado sítio reativo, responsável pela formação do complexo enzima-inibidor. Esta diferença de composição de aminoácidos determina a especificidade de um inibidor para uma determinada classe de enzimas (RICHARDSON, 1977; MACEDO *et al.*, 2007).

O inseto, ao ingerir uma dieta artificial contendo IPs específicos para a principal classe de proteases de seus intestinos, poderá ter seu crescimento e desenvolvimento retardados, interferindo assim na sua sobrevivência (FRANCO *et al.*, 1999).

Dentre as serino-proteinases, destacam-se as tripsinas e quimotripsinas, que são importantes enzimas digestivas presentes praticamente em todos os organismos vivos (GEOFFROY *et al.*, 1990). Nos insetos, as tripsinas e quimiotripsinas são responsáveis por cerca de 95% da proteólise (JOHNSTON *et al.*, 1995), como mostram estudos realizados com a presença dessas enzimas digestivas em insetos das ordens Lepidoptera, como em *Spodoptera frugiperda* (TERRA & FERREIRA, 1994) e Diptera, como em *Ceratitis capitata* (GOMES *et al.*, 2005), *Mayetiola destructor* (SHUKLE *et al.*, 1985) e *Stomoxys calcitrana* (HOUSEMAN *et al.*, 1987). Neste sentido, Haq *et al.* (2004) chamam a atenção para o fato de que para se obter sucesso no uso de IPs como inseticida, deve-se conhecer o perfil digestivo do inseto-alvo, garantindo assim estratégias eficazes para que se dificulte o aparecimento de resistência.

1.5 Mecanismos de adaptação

Os IPs têm a capacidade de se ligar e de inibir a ação de proteases digestivas nos insetos, podendo interferir desta maneira em seu crescimento e desenvolvimento. Entretanto, em resposta a esta ação, os insetos desenvolveram mecanismo para sobrepujar esses efeitos negativos. Até o presente momento foram identificados três mecanismos.

O primeiro mecanismo consiste em um aumento da expressão da enzima inibida, após a ingestão do inibidor. Broadway & Duffey (1986) observaram que,

após uma ingestão crônica do inibidor de tripsina de soja e inibidor de proteinase de batata II, as larvas de *Spodoptera exigua* e de *Helicoverpa zea* mostraram um aumento na atividade proteolítica das enzimas digestivas. Resultados semelhantes foram obtidos por Gatehouse *et al.* (1999) e Brito *et al.* (2001).

O segundo mecanismo utilizado pelos insetos, é a capacidade de sintetizar enzimas insensíveis ou menos sensíveis aos inibidores. Bolter & Jongsma (1995) observaram o efeito da ingestão crônica de folhas de batata em larvas de *Leptinotarsa decemlineata*. Os resultados demonstraram que houve uma atividade proteolítica reduzida em 42%, porém, um aumento da atividade trípica insensível ao inibidor de cerca de 2,5 vezes, quando comparadas aos insetos controle. Broadway (1995) demonstrou que a exposição crônica dos insetos aos inibidores de proteinases promove a produção de enzimas digestivas parcialmente resistentes. O mecanismo regulatório responsável pela secreção de diferentes enzimas não é conhecido, e pode ser um conjunto de fatores indutores, cada um responsável pela produção de uma enzima ou um grupo de enzimas.

O terceiro mecanismo de defesa consiste na degradação do inibidor no intestino dos insetos através das próprias enzimas digestivas do inseto-alvo. Giri *et al.* (1998) observaram que *Helicoverpa armigera*, além de ser capaz de produzir enzimas insensíveis ao inibidor, sintetizou proteinases capazes de degradar os inibidores de sementes de *Cicer arietinum*. Michaud (1997) mostrou também a degradação proteolítica de orizacistatina II por proteinases de *Otiorynchus sulcatus*.

1.6 Enzimas digestivas de *Ae. aegypti*

As enzimas digestivas identificadas em *Ae. aegypti* são tripsina, quimotripsina, aminopeptidases e carboxipeptidases (YANG & DAVIES, 1971a; ISOE *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2011). Os mosquitos possuem um complexo ciclo de vida e com múltiplos estágios de desenvolvimento. As tripsinas e quimotripsinas são as principais enzimas responsáveis pela digestão e estão presentes em todos os estágios de desenvolvimento do mosquito. Estas enzimas são bastante ativas na fase larval, sendo a tripsina mais abundante que a quimotripsina (BOROVKY & MEOLA, 2004).

Já no estágio entre larva-pupa, há uma diminuição na atividade quimotríptica. Yang & Davies (1971a) relataram uma queda na atividade enzimática do intestino médio nesta fase, observando um aumento da atividade quimotríptica nas excretas de *Ae. aegypti* (YANG & DAVIES, 1971b).

Após esta queda nas atividades proteolíticas, no estágio pupa-adulto, as fêmeas do mosquito volta a expressar dois tipos de tripsina, a inicial (early trypsin – AaET, GenBank acesso nº X64362) e tardia, (late trypsin – AaLT, GenBank acesso nº M77814), principais responsáveis pela digestão de sangue (BOROVSKY, 1995; YANG & DAVIES, 1971a). A síntese das AaET atinge seu pico após 4-6 horas após a refeição sanguínea e, a AaLT após 8-36 horas após a ingestão de sangue (NORIEGA & WELLS, 1999).

O sequenciamento do genoma do *Ae. aegypti* demonstrou ser composto por 1,376 bilhões de pares de bases, sendo cinco vezes maior que o genoma de *Anopheles gambiae*, mosquito da malária (NENE *et al.*, 2007). Venâncio *et al.* (2009) identificaram 66 genes putativos de tripsina em larvas e adultos de *Ae. aegypti*. Somente cinco serino-proteinases são expressas no intestino médio de fêmeas adultas de *Ae. aegypti*, três tripsinas e duas quimotripsina (NORIEGA *et al.*, 1996). Brackney *et al.* (2010), descreveram a clonagem, sequenciamento e perfil de expressão de sete serino-proteases adicionais, também em fêmeas adultas de *Ae. aegypti*.

1.7 *Adenanthera pavonina*

Pertencente à família das Fabaceae (Mimosoideae), *Adenanthera pavonina*, é conhecida popularmente como olho de pavão, olho de dragão e carolina. É originária da Ásia tropical e está presente no Brasil, nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sul e Sudeste. É uma espécie pioneira com crescimento rápido, possui uma madeira marrom-avermelhada, pesada e compacta. Sua árvore pode atingir 15 a 20 metros de altura e produz vagens estreitas, achatadas e espiraladas quando se abrem (Figura 5A e B). Sua semente é de cor vermelha e são usadas como ornamento decorativo (Figura 5C). Possui flores pequenas de cor amarela com pontos marrons

(Figura 5D). Esta espécie é comumente utilizada para ornamentos, arborização, sombreamento, artesanato e fitoterápicos.



Figura 5- *Adenanthera pavonina*: (A) Árvore, (B) Fruto com semente, (C) Sementes, (D) Folhas e flores (Fonte: Domínio público).

O inibidor de proteinase de *A. pavonina* (ApTI), isolado a partir de sementes da árvore de Carolina, tem o peso molecular de aproximadamente 21 kDa, possui duas cadeias de polipeptídeo ligados entre si por uma ponte de dissulfeto (MIGLIOLO *et al.*, 2010).

Este inibidor foi purificado pela primeira vez por Pranhui & Pattabiraman (1980). Estudos demonstraram que as sementes de *A. pavonina* continham um alto nível de inibidor de proteinase, 3-16 vezes maior que de *Glycine max* (soja) (RICHARDSON *et al.*, 1986).

A sequência completa de aminoácidos do principal inibidor de tripsina de *A. pavonina* apresentou um percentual de 36% e 37% de identificação com o inibidor de tripsina do tipo Kunitz de *G. max* e com o inibidor da quimotripsina da *Psophocarpus tetragonolobus*, respectivamente (RICHARDSON *et al.*, 1986)

Além disso, o inibidor de proteinases de *A. pavonina* demonstrou uma qualidade rara dos IPs: uma forte atividade inibitória não-competitiva contra tripsina e moderada contra papaína (Figura 6), ou seja, o ApTI tem a habilidade de se ligar com proteinases de classes diferentes, serino (tripsina e quimotripsina) e cisteíno (papaína) (MACEDO *et al.*, 2004; MIGLIOLO *et al.*, 2010).

Adicionalmente, ApTI demonstrou ter efeito tóxico no desenvolvimento de coleópteros (*Callosobruchus maculatus*) (MACEDO *et al.*, 2004) e lepidópteros (*Anagasta kuehniella* e *Diatraea saccharalis*) (MACEDO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012).



Figura 6 - Visualização da interação enzima-inibidor do complexo ternário formado por tripsina (azul), papaína (verde) e o inibidor de proteinase de *A. pavonina* (amarelo) (MIGLIOLO *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

Compreender o efeito de um inibidor de proteinase de sementes de *Adenanthera pavonina* sobre o desenvolvimento larval de *Aedes aegypti* e os possíveis mecanismos de adaptação que garantem a implementação bem sucedida de novos inibidores de proteases como bioinseticida.

- a. Avaliar a atividade inseticida;
- b. Verificar o efeito do ApTI na sobrevivência e peso das larvas de *Ae. aegypti* após exposição crônica e aguda ao inibidor;
- c. Analisar alterações nos padrões de atividade proteolítica das enzimas frente à exposição crônica e aguda ao ApTI em diferentes estágios de desenvolvimento do inseto;
- d. Analisar efeito do inibidor nos parâmetros histológicos do inseto;
- e. Avaliar o efeito da exposição crônica e aguda do inibidor com intuito de elucidar uma possível resposta do inseto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comissão de Ética no Uso de Animais

Todos os procedimentos e condições no uso de animais estão de acordo com a legislação vigente sobre o uso de animais e dos preceitos éticos (Protocolo CEUA/UFMS nº 415/2012) (ANEXO A).

3.2 Material Vegetal

As sementes de *A. pavonina* (Fabaceae) foram obtidas do banco de sementes do Laboratório de Purificação de Proteína e suas Funções Biológicas (LPPFB), UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

3.3 Inseto

Os ovos de *Aedes aegypti* utilizados neste estudo foram fornecidos da colônia mantida pelo Prof. Dr. Antônio Pancrácio de Souza (Departamento de Morfofisiologia, CCBS, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil).

Os insetos adultos foram mantidos em gaiolas vedadas para a obtenção de novos ovos. Para a alimentação dos adultos foi oferecido mel a 10%, como fonte de carboidrato. Já para as fêmeas adultas foi fornecido, duas vezes por semana, hamsters para o repasto sanguíneo.

Os hamsters foram anestesiados previamente com 0,70 mg/kg de solução de Pentobarbital sódico a 10%, via intraperitoneal e colocados dentro da gaiola com os *Ae. aegypti*, por aproximadamente 30 minutos. Esses animais foram criados no biotério da UFMS e fornecidos ao proponente durante o ano. Durante o uso, os hamsters foram mantidos individualmente em mini-isoladores (Modelo

ALE.MIL.01.03 - Alesco®) em ambiente controlado com temperatura de 22 ± 2 °C, umidade entre 55%, iluminação artificial com fotoperíodo de 12 h. Receberam água fresca e dieta comercial (Nuvital®) à vontade. A limpeza das gaiolas foi feita uma vez por semana ou quando necessário. Cada animal foi utilizado para o repasto sanguíneo uma vez a cada três semanas, sendo este um período de descanso aconselhado. Após a anestesia, o animal era colocado em sua gaiola para a recuperação com água e ração em abundância, eram observados até que seus sinais vitais ficassem estáveis.

Os ovos de *Ae. aegypti* foram eclodidos em água declorada. As larvas foram mantidas a uma temperatura de 25-28 °C, com umidade relativa de 80% e ciclo de 12:12 h (claro/escuro); ração para gato (Whiskas®) foi oferecida como fonte de alimento (PÉREZ *et al.*, 2004). Larvas de todos os instares (LI, LII, LIII, LIV) foram separadas para uso nos bioensaios.

3.4 Obtenção do Extrato Bruto

As sementes de *A. pavonina*, livres de tegumento, foram trituradas em um moinho elétrico até a obtenção de uma farinha fina. Em seguida, foi feita uma delipidação com hexano, para a retirada de lipídeos. A extração do extrato bruto ocorreu com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 (1:10, p/v), sob agitação constante durante 2 h a 4 °C. O extrato bruto foi centrifugado durante 30 min. a 10 000 x g e o sobrenadante foi recolhido dialisado e liofilizado.

3.5 Purificação do Inibidor de *Adenanthera pavonina*

O inibidor de tripsina de *A. pavonina* foi purificado, de acordo com Macedo *et al.* (2004), com algumas modificações. O extrato bruto liofilizado foi dissolvido em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6, contendo NaCl 0,1 M e aplicado a uma coluna Sephadex G-75 (2,9 × 50 cm) equilibrada com o mesmo tampão. Foram coletadas frações de 3 mL por tubo, em um fluxo de 40 mL/h. O perfil cromatográfico foi

determinado acompanhando-se a absorbância num comprimento de onda de 280 nm. Um único pico de atividade anti-trípica obtido foi recolhido, dialisado e liofilizado. Subsequentemente, armazenado a -20 °C, para posterior uso.

3.6 Estabilidade de ApTI

Para determinar a estabilidade da atividade inibitória do ApTI durante os bioensaios, uma solução de inibidor (ApTI em água destilada) foi mantida a 27 ± 2 °C durante diferentes tempos (0, 12, 24, 48, 72 e 96 h). As amostras foram congeladas e armazenadas para uso posterior. Para medir a atividade proteolítica residual (ERLANGER *et al.*, 1961), as amostras de inibidor foram pré-incubadas com uma solução de tripsina bovina e tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, a 37 °C durante 15 min. Em seguida, foi adicionado 200 µL de substrato BAPNA durante 30 min a 37 °C. A absorbância resultante foi lida a 405 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são a média dos ensaios.

3.7 Quantificação de Proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas segundo método de Bradford (1976). BSA foi utilizado como proteína padrão (1 mg/mL).

3.8 Efeito Crônico e Agudo de ApTI no Desenvolvimento Larval de *Ae. aegypti*

Em todos os ensaios biológicos realizados, o efeito de ApTI no desenvolvimento de *Ae. aegypti* foram avaliados colocando-se 25 larvas em copos de plástico descartáveis contendo 20 mL de água destilada, com ou sem ApTI, a uma temperatura de 25-28 °C, com umidade relativa de 80% e ciclo de 12:12 h

(claro/escuro). Ração para gato (Whiskas®) foi oferecida às larvas (PÉREZ *et al.*, 2004). O tempo de incubação foi ajustado para cada experimento.

Os parâmetros medidos para avaliar o desenvolvimento das larvas foram sobrevivência e peso, monitorados ao longo de todo ensaio biológico a cada 24 h. Larvas mantidas em água destilada foram usadas como controle. Para analisar a sobrevivência, as larvas foram consideradas mortas quando, ao toque, não houvesse movimento ou ficassem moribundas, conforme descrito no relatório de técnicas da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1981).

Para analisar o peso das larvas, lotes de larvas foram recolhidos e colocados em uma rede fina e, cuidadosamente, secos com papel de filtro. O peso médio calculado foi dividido o peso total pelo número de indivíduos por lote. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Em um primeiro momento, para observar a atividade biológica de ApTI em *Ae. aegypti*, larvas LI foram expostas a várias concentrações do inibidor (0,06, 0,12, 0,25, 0,5 e 1 mg/mL) durante 96 h. A partir deste bioensaio, foi feita uma análise para obter a curva de dose-resposta da ingestão crônica de ApTI em *Ae. aegypti*. A concentração letal correspondeu à dose de ApTI que reduziu o número de insetos em 50% (CL₅₀), quando comparado com o controle.

Uma vez que a CL₅₀ de ApTI foi determinada, um ensaio com *Ae. aegypti* (LI), cronicamente exposto a uma solução de ApTI foi feito durante 96 h, a fim de avaliar o peso, sobrevivência e o perfil das enzimas digestivas. As fontes de enzimas foram recolhidas a partir de larvas incubadas durante 72 h e 96 h e, foram imediatamente congeladas para uso posterior. Com a mesma dose (CL₅₀), outro ensaio biológico foi realizado para investigar os parâmetros biológicos, tais como a duração do período larval e de pupa, a emergência de adultos, sobrevivência, viabilidade e malformação, controle e larvas alimentadas, foram observados por 240 h, a cada 24 h.

Para o bioensaio de exposição aguda, todos os instares da larva (LI, LII, LIII e LIV), previamente mantidas em água foram expostas a solução de ApTI (CL₅₀) durante 24 h. Cada grupo foi comparado com o respectivo grupo de controle. A sobrevivência e o peso das larvas foram determinados como descrito acima. Cada grupo de tratamento foi dissecado e os homogenatos de enzimas digestivas foram usados para os ensaios enzimáticos e eletroforese.

Em segundo bioensaio de exposição aguda, larvas de 4º ínstar foram introduzidas em copos de plástico descartáveis contendo água destilada, com e sem

solução ApTI (CL_{50}), durante 12 h. Após este tempo de exposição, metade das larvas em ambos os tratamentos foram dissecadas e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à sua utilização posterior. A outra metade das larvas foi colocada em água destilada por mais 12 h. As larvas de 4º ínstar dos grupos controle e alimentado foram dissecadas e utilizadas nos ensaios enzimáticos e eletroforese.

3.9 Obtenção de Enzimas do Intestino Médio

Larvas de *Ae. aegypti* foram coletadas e imobilizadas com gelo para a dissecação. O intestino médio (Figura 7) de cada larva foi removido com auxílio de pinças e imediatamente macerado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo 0,02 M de CaCl_2 0,1 M e NaCl 0,15 M (5 mL/ larva). Os homogenatos foram centrifugados a $10\,000 \times g$, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 20 min. Os sobrenadantes foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e usados posteriormente como fonte de enzimas.

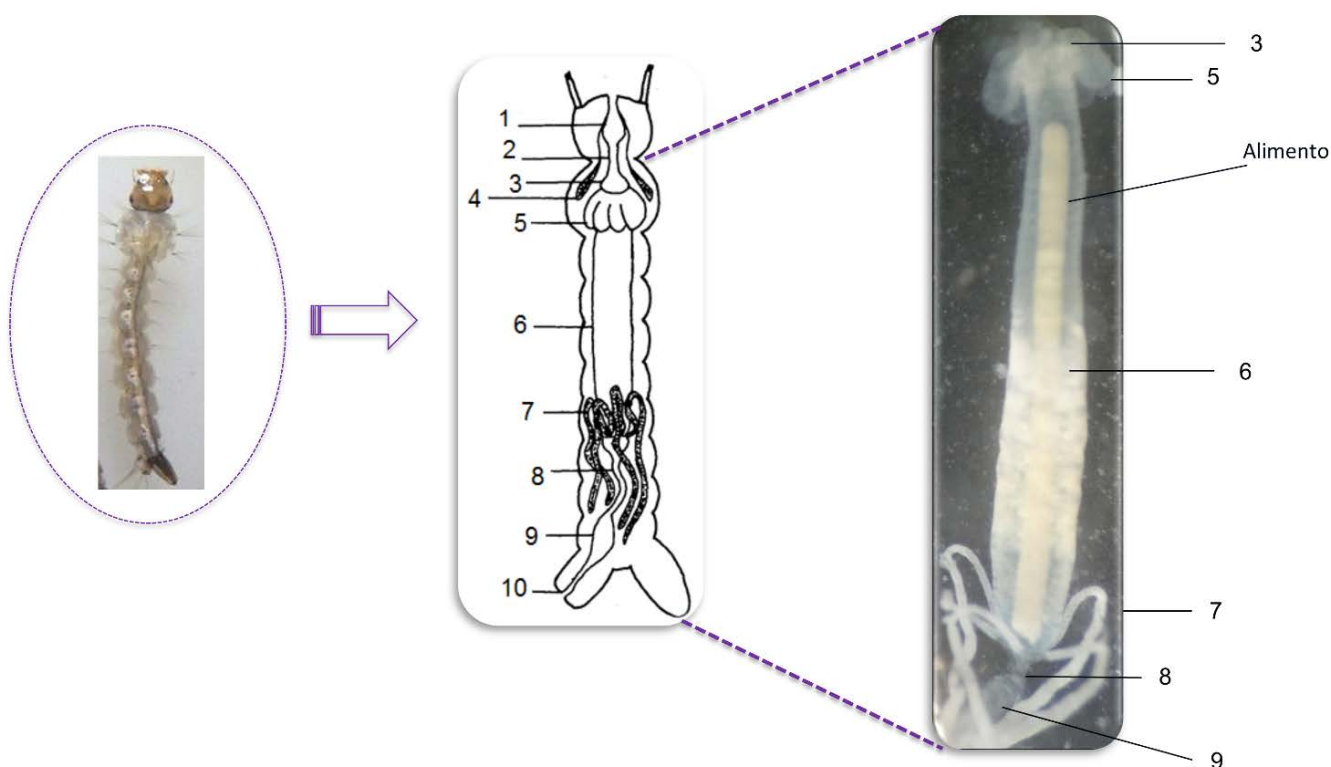


Figura 7 - Morfologia da larva de *Ae. aegypti*: 1- faringe; 2- esôfago; 3- proventrículo; 4- glândula salivar; 5- cecos gástricos; 6- estômago ou intestino médio; 7- tubos de Malpighi; 8- íleo/cólon; 9- reto; 10- ânus.

3.10 Ensaios de Atividade Enzimática

As amostras de enzimas digestivas do intestino médio de larvas de *Ae. aegypti* foram testadas usando os substratos sintéticos cromogênicos: BAPNA (ERLANGER *et al.*, 1961) para tripsina e, SAAPFpNA (DELMAR *et al.*, 1979) para quimotripsina. As amostras de enzimas (2-5 µg de proteína) foram pré-incubados com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, durante 15 min. a 37 °C.

Para o ensaio de atividade do tipo tripsina, 200 µL de BAPNA 1 mM diluído em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 foi adicionado a amostras pré-incubadas e o ensaio foi realizado durante mais 30 min. a 37 °C. Para o ensaio da atividade do tipo quimotripsina, 20 µL de solução de SAAPFpNA (100 mM SAAPFpNA estoque diluído em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) foi adicionado, completando um volume final de 120 µL. O ensaio foi então incubado durante 5 min. a 37 °C. Em ambos os ensaios, a liberação do cromóforo *p*- foi monitorada através da variação da absorbância a 405 nm. Todas as incubações foram realizadas em triplicatas e os controles apropriados foram feitos.

Para a avaliação da sensibilidade das proteases do intestino médio frente à inibição por ApTI, uma curva de inibição foi realizada com o aumento gradual das concentrações de ApTI (0-0,2 µg). A capacidade de ApTI para inibir as atividades do tipo quimotripsina e tripsina a partir de extratos de larvas de controle e alimentado com ApTI-CL₅₀ (2 µg) foi medida pela atividade enzimática residual, tal como descrito acima. Os ensaios foram feitos em triplicatas com os devidos controles e brancos.

Para a avaliação das enzimas do tipo papaína, foi utilizando uma solução de azocaseína 1% (ZHAO *et al.*, 1996). Alíquotas de 30 µL do extrato intestinal foram incubados com 40 µL de uma solução de ativação contendo EDTA 0,02 M e cisteína 0,05 M, pH 8,0, e 40 µL de tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, durante 10 min. a 45 °C. Em seguida, 390 µL de tampão de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, foram adicionado e incubado por mais 10 min. A reação foi iniciada pela adição de 200 µL de solução de azocaseína 1%. Após 10 min., a reação foi interrompida pela adição de 300 µL de TCA 10%. As amostras foram centrifugadas e 800 µL de cada sobrenadante foi alcalinizada com 800 µL de NaOH 0,1 N. A absorbância resultante foi detectada a 440 nm e a atividade de protease foi expressa em absorbância/min.

3.11 Atividade Proteolítica do Extrato Enzimático do Intestino Médio em Gel de Eletroforese

Para a análise zimográfica das proteínas, o extrato do intestino médio de larvas dos grupos controle e alimentado com ApTI-CL₅₀ foi incubado durante 30 min., a 37 °C, com um dos seguintes inibidores de protease: TLCK (100 mM), inibidor de tripsina diluída em água; TPCK (100 mM), inibidor de quimotripsina diluído em 0,1% de DMSO, e PSMF (250 mM), inibidor de proteases do tipo serino/cisteíno diluído em isopropanol. Estas amostras (5 µg de proteína) foram preparadas em um tampão não redutor e não-desnaturante, sem a adição de SDS, que mantém a estrutura secundária da proteína e densidade da carga nativa. Em seguida, foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida nativo 10%, como descrito por Laemmli (1970). As bandas de proteína foram detectadas com corante Coomassie Brilliant Blue R-50. Bandas de atividade proteolítica aparecem como zonas claras contra um fundo azul.

3.12 Digestão *in vitro* de ApTI pelas Enzimas Digestivas de *Ae. aegypti*

A digestão *in vitro* de ApTI por enzimas digestivas de inseto foi realizada como descrito por Macedo *et al.* (2002). Os intestinos médio de larvas de 4º instar (controle e alimentado com ApTI-CL₅₀) foram dissecados e extraídos em tampão Tris (0,1 M Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo CaCl₂ 0,02 M e NaCl 0,15 M). Estas amostras foram incubadas com ApTI em tampão Tris-HCl, em uma proporção de 1:5. A digestão foi realizada por 0, 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas a 37 °C e, foi parada pela imersão dos tubos em água fervente por 2 min., seguida de imediato congelamento dos tubos a -20 °C. A degradação de BSA foi usada como um controle positivo para analisar atividade proteolítica das amostras.

Posteriormente, a análise das massas moleculares relativas aos produtos da digestão foi feita através de SDS-PAGE 12,5%, como descrito por Laemmli (1970). As proteínas usadas como marcadores de peso molecular foram albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), pepsina (34,7 kDa), tripsinogênio (24 kDa), β - lactoglobulina

(18,4 kDa) e lisozima (14,3 kDa). Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250.

3.13 Microscopia de Luz

Para analisar os efeitos histomorfológicos de ApTI em larvas de *Ae. aegypti*, um bioensaio foi realizado utilizando uma solução de ApTI (CL₅₀) durante 96 h. As larvas de 4º ínstar do controle e alimentado foram fixadas em formaldeído a 4% durante 2 h à temperatura ambiente. As amostras foram preparadas como descrito por Silva *et al.* (2008). Seções de 3 µm de espessura foram obtidas utilizando um micrótomo e corados com hematoxilina-eosina (HE). O material foi analisado com o auxílio de um microscópio (Leica Biosystems®) e fotodocumentado.

3.14 Análise Estatística

O efeito de ApTI sobre as atividades enzimáticas, peso e sobrevivência foi examinado através da análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (ANOVA). A concentração letal necessária para matar 50% (CL₅₀) de larvas foi calculada pela análise Probit (FINNEY, 1947) com intervalo de confiança de 95%, utilizando o software, StatPlus® 2009 (AnalystSoft, Vancouver, Canadá).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito Crônico de ApTI no Desenvolvimento Larval de *Ae aegypti*

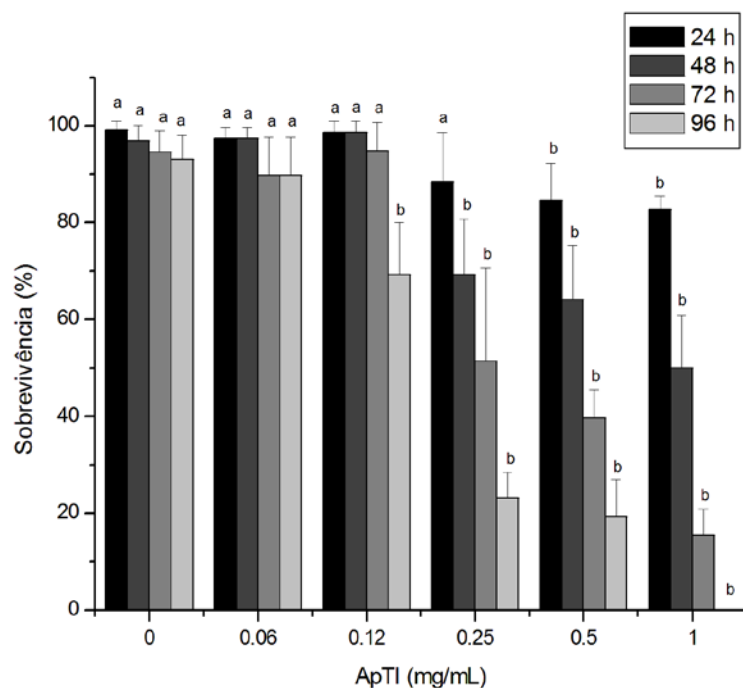
O efeito biológico do inibidor em larvas de *Ae. aegypti* cronicamente expostas a várias concentrações de ApTI (0,06 a 1 mg/mL) demonstrou ter efeito tóxico significativo em todas as concentrações superiores a 0,06 mg/mL, como demonstra Figura 8.

A taxa de sobrevivência das larvas do grupo alimentado diminuiu com o aumento da concentração de ApTI (Figura 8A). Quando comparado o grupo controle com o alimentado com ApTI 0,12 mg/mL foi observada uma diminuição significativa na sobrevivência após 96 h de tratamento, de $93,08 \pm 5,01\%$ para $69,22 \pm 10,88\%$, respectivamente. No grupo ApTI 1 mg/mL foi observado 100% de mortalidade com 96 h de tratamento, enquanto o controle demonstrou atingir uma mortalidade de um máximo de 10%.

A ação do ApTI no desenvolvimento de *Ae. aegypti* demonstrou também influenciar no peso das larvas em todas as concentrações acima de 0,06 mg/mL (Figura 8B). O peso larval aparentemente dobrou a cada 24 h. Depois de 48, 72 e 96 h de incubação, os pesos de larvas foram $0,60 \pm 0,09$, $1,54 \pm 0,17$ e $2,90 \pm 0,20$ mg, respectivamente, para o grupo controle e; $0,25 \pm 0,02$, $0,50 \pm 0,08$ e $1,05 \pm 0,36$ mg, respectivamente, para o grupo alimentado ApTI 0,25 mg/mL. Os resultados indicam que a eficácia da atividade biológica de ApTI é concentração- e tempo-dependente.

IPs frequentemente têm efeitos deletérios sobre as larvas que o ingerem, tais como o retardo no crescimento e desenvolvimento, aumento da mortalidade e deformações graves (MACEDO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2013; SASAKI *et al.*, 2013; JAMAL *et al.*, 2013). A forte ligação entre inibidores com tripsina e outras proteases digestivas pode causar uma depleção de aminoácidos essenciais, levando o inseto à fome e, conseqüentemente, à morte (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; RYAN, 1990).

A



B

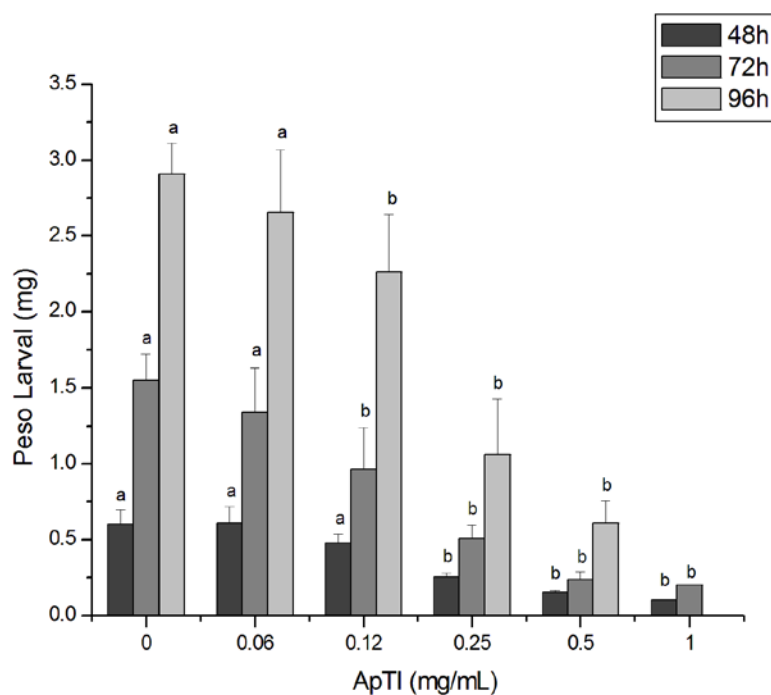


Figura 8 - Efeito biológico de ApTI em larvas de *Ae. aegypti* expostas cronicamente. (A) Taxa de sobrevivência e (B) Peso larval. Larvas de 1º ínstar em copos de plástico descartáveis contendo água destilada, com ou sem, ApTI foram incubadas em diversas concentrações de ApTI, durante 96 h. Os dados foram coletados a cada 24 h. As médias dos tratamentos foram comparadas com os respectivos controles e tempos. Letras diferentes indicam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p < 0,05$).

Ao investigar o efeito exposição crônica de ApTI em larvas de *Ae. aegypti* em uma concentração não-letal, a dose-resposta calculada foi $CL_{50} = 0,20$ (0,16-0,25) mg/mL, com 96 h de tratamento, analisada por Probit com 95% de limite de confiança, utilizando o software StatPlus® 2009 (dados não mostrados).

Uma das abordagens para diminuir a população de mosquitos constitui na interrupção do ciclo de vida do mosquito em sua fase larval (HEMINGWAY & KARUNARATNE, 1998). Por isso compostos vegetais ou extratos vegetais tornaram-se meios atraentes para combater os mosquitos. Seus efeitos nocivos relativamente baixos quando comparados os inseticidas químicos, ou ausentes, sobre organismos não-alvo e sobre o ambiente, impulsionaram vários estudos, os quais relataram atividade larvicida de extratos e óleos de diferentes partes das plantas (casca da raiz, madeira de raiz, folhas e sementes) contra *Ae. aegypti* (LUNA *et al.*, 2005; MENDONCA *et al.*, 2005; OMENA *et al.*, 2007; KOVENDAN *et al.*, 2012; KOODALINGAM *et al.*, 2013; KABIR *et al.*, 2013). Dentre estes estudos, Omena *et al.* (2007) demonstrou a atividade larvicida de extratos etanólicos de 84 plantas brasileiras, sendo que onze demonstraram significativa atividade contra as larvas de *Ae. aegypti* ($CL_{50} < 100$ µg/mL).

Apesar de vários estudos com extratos, há apenas alguns com proteínas vegetais purificadas envolvidas nos mecanismos de defesa, contendo diferentes princípios ativos, tais como as lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos - RIPs, inibidores de proteases, glicohidrolases, arcelinas, quitinases, canatoxina e formas modificadas de proteínas de armazenamento. O efeito dessas proteínas em larvas de *Ae. aegypti* foi demonstrado por Coelho *et al.* (2009) e Santos *et al.* (2012) com lectina de sementes de *Moringa oleifera*, e por Napoleão *et al.* (2012) com lectina de *Myracrodruon urundeuva*. Nunes *et al.* (2013), analisou o efeito de uma cisteíno proteinase, chamada de tegupain, purificado a partir de *Carica papaya*, assim como Nuchsuk *et al.* (2012), que purificou RIP tipo 1, isolado de sementes de *Jatropha curcas*. Recentemente, um inibidor de tripsina de flores de *M. oleifera* foi testado em ovos de *Ae. aegypti* nas concentrações entre 0,06-0,5 mg/mL, onde não demonstrou afetar a eclosão dos ovos e a sobrevivência das pupas. A mortalidade das larvas neonatas de *Ae. aegypti* em presença do inibidor foi de 0,3 mg/mL (CL_{50}) (PONTUAL *et al.*, 2014).

O bioensaio com concentração não-letal de ApTI ($CL_{50} = 0,2$ mg/mL), demonstrou que as larvas de *Ae. aegypti* cronicamente expostas tiveram uma

diferença significativa na taxa de sobrevivência após 48, 72 e 96 h. No entanto, após 24 h não foi observada nenhuma diferença significativa.

Após 96 horas, a sobrevivência das larvas do controle foi de 96%, enquanto a das larvas alimentadas foi de 46%, corroborando os resultados de tempo-resposta (Figura 9A). Pontual *et al.* (2014) observou, após 72 h de tratamento de 0,2 mg/mL de inibidor de tripsina de *M. oleifera* em ovos de *Ae. aegypti*, uma mortalidade de $25 \pm 1,5\%$ nas larvas.

O efeito de ApTI demonstrou alterar significativamente o peso médio durante o desenvolvimento larval. A Figura 9B mostra um decréscimo de 36,38% no peso de *Ae. aegypti* quando comparado com os grupos controle e alimentado, após exposição de 96 h (Inserção: 1 e 2, respectivamente).

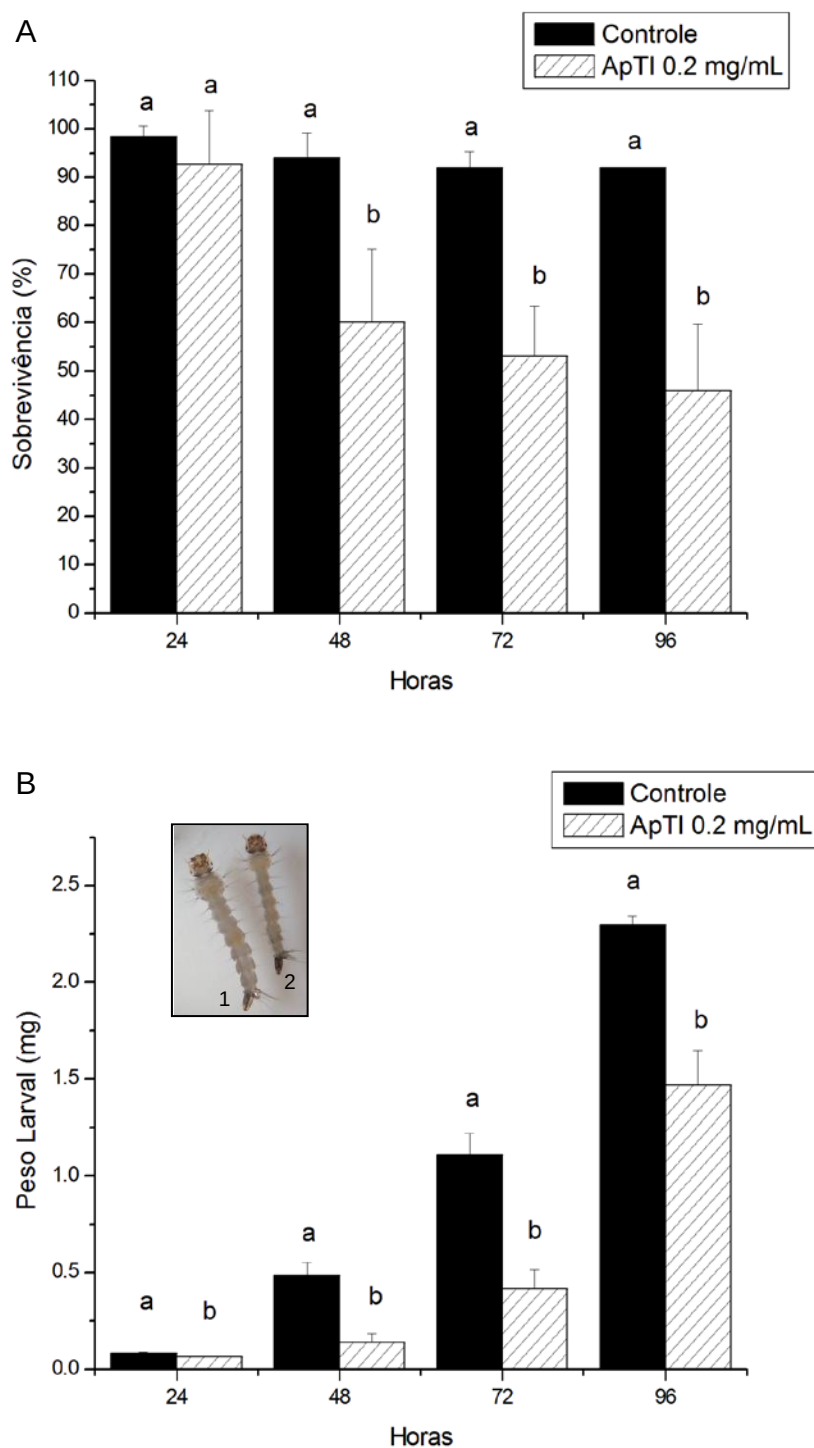


Figura 9 - Efeito da exposição crônica de ApTI 0,2 mg/ mL em *Ae. aegypti*. (A) Taxa de sobrevivência e (B) peso larval de *Ae. aegypti* exposto a concentração não-letal de ApTI (CL_{50} = 0,2 mg/ mL) durante 96 h. Inserção: foto ilustrando a variação do tamanho das larvas com 96 horas de tratamento no grupo controle (1) e no grupo alimentado (2). As barras mostram a média $\pm$ DP. As médias dos tratamentos foram comparadas com os respectivos controles. Letras diferentes indicam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p < 0,05$).

Adicionalmente, para compreender o comportamento do inibidor sob as mesmas condições e tempo dos ensaios biológicos, a estabilidade da atividade inibitória de ApTI foi avaliada na presença de BAPNA. O pico de atividade inibitória permaneceu com a média máxima de aproximadamente 100% nas primeiras 24 h, após este tempo a atividade residual diminuiu para 40%, como mostra a Figura 10. É importante destacar que, embora a atividade inibitória de ApTI não permaneça no máximo de sua capacidade, os bioensaios demonstraram que o inibidor ainda mantém a capacidade de afetar o peso e sobrevivência das larvas de *Ae. aegypti*.

Estudos anteriores mostraram uma atividade inibitória dos IPs de sementes de *A. pavonina* em diferentes insetos-praga, como *Callosobruchus maculatus* (MACEDO *et al.*, 2004), *Anagasta kuehniella* (MACEDO *et al.*, 2010) e *Diatraea saccharalis* (SILVA *et al.*, 2012).

Os altos níveis de IPs contidos em sementes de *A. pavonina* são 3-16 vezes mais abundante nesta espécie do que em sementes de soja (RICHARDSON *et al.*, 1986). Além disso, por ApTI ser um inibidor não competitivo de tipo Kunitz, possui uma alta capacidade de inibir enzimas do tipo tripsina e quimotripsina e, mais moderadamente, enzimas do tipo papaína (MACEDO *et al.*, 2004; MIGLIOLO *et al.*, 2010).

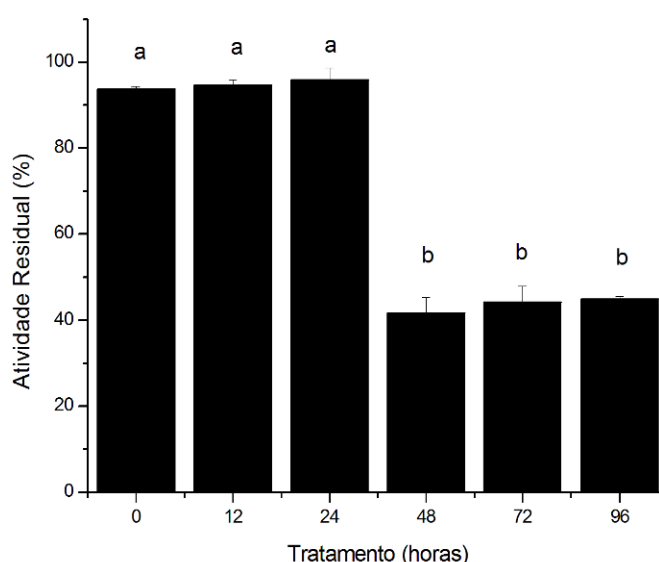


Figura 10 - Estabilidade de ApTI. Atividade residual da solução de inibidor (ApTI 0,2 mg/ ml em água destilada) a 27 ± 2 °C em diferentes tempos. BAPNA foi usado como substrato. As barras mostram a média $\pm$ DP. Letras diferentes indicam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p < 0,05$).

4.2 Análise do Efeito de ApTI na Atividade Enzimática do Intestino Médio de *Ae. aegypti*

As atividades das enzimas digestivas do tipo tripsina (Figura 11A), quimotripsina (Figura 11B) e papaína (Figura 11C) de larvas de *Ae. aegypti* expostas cronicamente ao ApTI (CL₅₀) foram medidas utilizando BAPNA, SAAPFpNA e azocaseína como substrato, respectivamente.

Foi observada uma diminuição nas atividades da tripsina e da quimotripsina do grupo alimentado quando comparado com o grupo controle. Após 72 h e 96 h de tratamento, houve um decréscimo de 39% e 44% na atividade tríptica e, de 43% e 30% na atividade quimotríptica, respectivamente. Contudo, a atividade da papaína demonstrou uma diminuição significativa somente após 72 h de tratamento. Após 96 h, não houve diferença significativa observada entre o grupo controle e o alimentado. Esses resultados sugerem que ApTI possui um efeito tóxico sobre as larvas de *Ae. aegypti*, demonstrando ser capaz de bloquear as enzimas envolvidas na digestão deste inseto.

A redução na atividade tríptica em larvas alimentadas com ApTI já foi observada em *Diatraea saccharalis*, onde foi relatada uma diminuição de 30% da atividade em larvas alimentadas quando comparadas com o controle. Todavia, não foi observada nenhuma alteração na atividade quimotríptica (SILVA *et al.*, 2012).

Na literatura, apesar da vasta quantidade de estudos com *Ae. aegypti*, há poucos focados sobre as enzimas digestivas das larvas deste inseto, nesta área destacam-se estudos sobre atividades de serino-proteases (tripsina, quimotripsina, elastase e serino-colagenase) (YANG & DAVIES, 1971a; KUNZ, 1978; HORLER & BRIEGEL, 1997; MESQUITA-RODRIGUES *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2011) e, atividade de cisteíno protease (papaína) (NUNES *et al.*, 2013). Estudos prévios reportaram a síntese de tripsina e quimotripsina durante todo o desenvolvimento larval em *Ae. aegypti*, seguido de um decréscimo na biossíntese dessas enzimas quando a larva está próxima de empupar (YANG & DAVIES, 1971a).

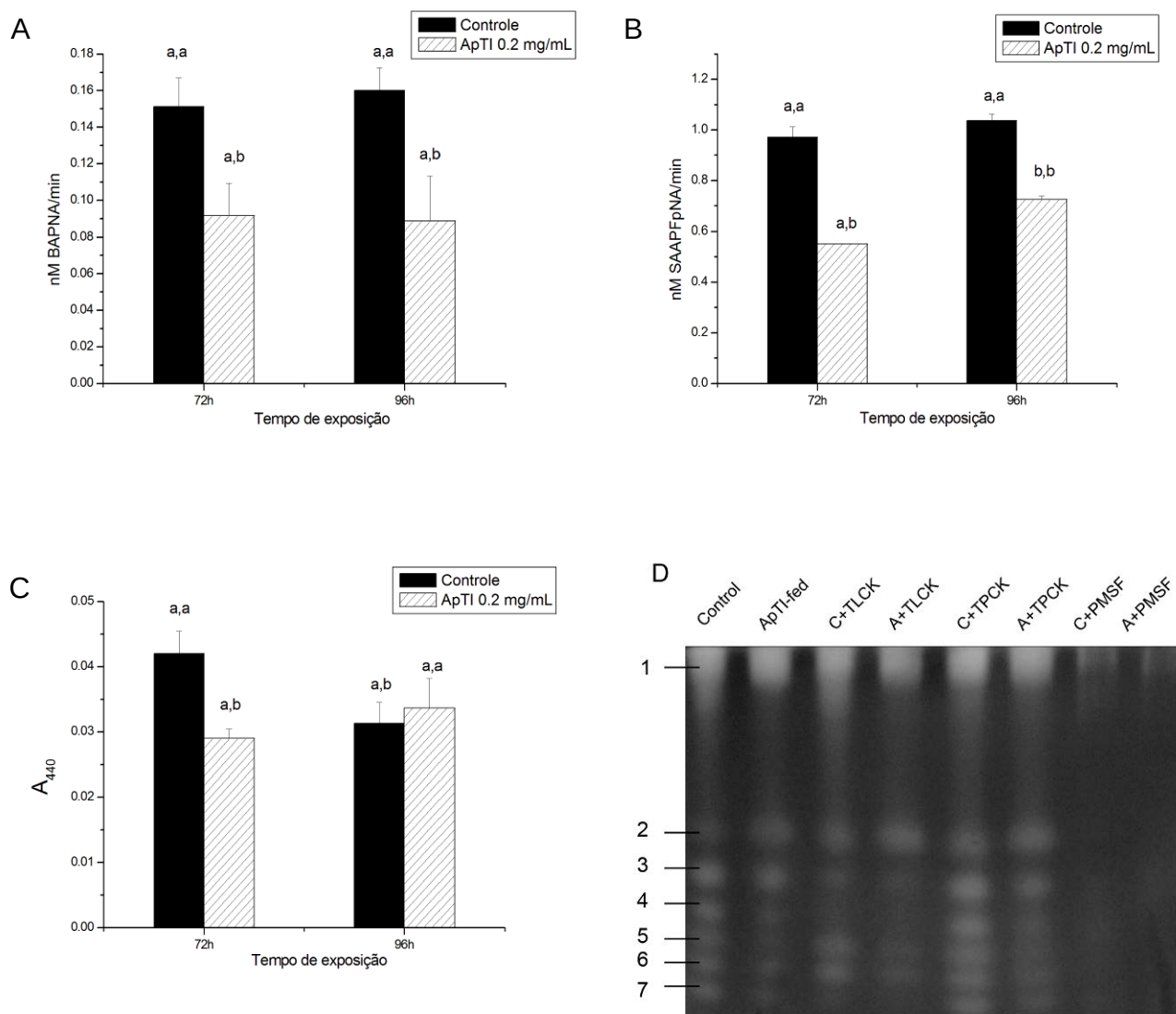


Figura 11 - Análise das enzimas digestivas do intestino médio de larvas de *Ae. aegypti* expostas cronicamente ao ApTI. Atividade enzimática de (A) tripsina, (B) quimotripsina e (C) papaína. BAPNA, SAAPFpNA e azocaseína foram utilizados como substrato, respectivamente. As barras mostram a média $\pm$ DP. As médias dos tratamentos foram comparadas com os respectivos controles e entre si. Letras diferentes indicam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p < 0,05$). (D) Zimograma em eletroforese de gel de poliacrilamida nativo. Intestino médio de controle e larvas alimentadas, expostos por 96 h em ApTI (ambos os grupos representados pela letra inicial no texto da figura). As amostras de proteínas foram tratadas com inibidores de proteases, antes da corrida: TLCK 100 mM (inibidor de tripsina); TPCK 100 mM (inibidor de quimotripsina); PMSF 250 mM (serino / cisteíno proteases do inibidor). Atividade proteolítica aparece como uma zona clara contra um fundo azul escuro. Os números à esquerda indicam as proteases de bandas ativas.

Segundo o estudo de Borovsky & Meola (2004), no qual quantificaram a síntese das enzimas do tipo tripsina e quimotripsina de larvas e pupas de *Ae.*

aegypti em todos os estágios, a biossíntese de tripsina em larvas persisti ao longo de todos os estágios de desenvolvimento, atingindo um pico no 3º ínstar e um platô entre o 3º ínstar e o estágio de pupa. Semelhante aos resultados de Borovsky & Meola (2004), os dados encontrados neste trabalho, também demonstraram que não há diferença significativa entre o tratamento com 72 h e 96 h do grupo controle (Figura 11A). Já a síntese de quimotripsina atinge seu pico no 4º ínstar, seguido de uma redução de aproximadamente duas vezes no estágio de pupa.

No zimograma visualiza-se o perfil proteolítico do extrato de intestino médio de larvas expostas cronicamente ao ApTI por 96 h, dos grupos controle e alimentado. As amostras foram tratadas com inibidores de protease antes da corrida eletroforética: TLCK 100 mM (inibidor de tripsina), TPCK 100 mM (inibidor de quimotripsina) e; PMSF 250 mM (serino / cisteíno proteases do inibidor) (Figura 11D). A atividade proteolítica aparece como uma zona clara contra um fundo escuro.

Os padrões de atividade de protease resultaram no aparecimento de sete proteases, tanto no controle quanto no alimentado. Não foram observadas diferenças no perfil do grupo controle e do alimentado. Quando os extratos enzimáticos foram tratados com TLCK, três bandas foram inibidas (proteínases 3, 4 e 7), o que sugere a presença de três proteases do tipo tripsina. O perfil proteolítico do controle e das larvas alimentadas foram fracamente inibidas por TPCK. No entanto, quando as amostras foram tratadas com PMSF, todas as bandas foram aparentemente inibidas, demonstrando uma alta atividade de proteases do tipo serino / cisteíno nos homogenatos intestinais.

Mesquita-Rodrigues *et al.* (2011) observaram seis a oito bandas no perfil enzimático em larvas de *Ae. aegypti*, corroborando com os nossos dados. Neste mesmo estudo, os autores também observaram o mesmo padrão quando as enzimas de *Ae. aegypti* foram incubadas com inibidores de protease: uma forte inibição por TLCK e PMSF e fraca inibição por TPCK. Esta fraca inibição pode ser explicado pelo fato de que a biossíntese de quimotripsina é menor do que a de tripsina, indicando que as enzimas do tipo tripsina são as principais enzimas proteolíticas no intestino médio de larvas de *Ae. aegypti* (BOROVSKY & MEOLA, 2004).

Em outro estudo com larvas de *Ae. aegypti*, Kunz (1978) observou pelo menos doze diferentes serino-proteases com atividade proteolítica em eletroforese,

sendo três bandas prováveis isoenzimas do tipo tripsina purificadas com cromatografia.

Além disso, uma análise transcricional de enzimas do tipo tripsina presente no intestino médio de larvas de *Ae. aegypti* foi realizada. As principais tripsinas nativas presentes neste órgão foram purificadas. As quais foram AAEL005607, AEL006371, AAEL008097, AAEL005614 e AAEL005609 no genoma de *Ae. aegypti*, representando 40%, 27,8%, 16,5%, 7,8% e 2,6%, respectivamente (SOARES *et al.*, 2011).

Por meio de uma técnica molecular, “phage display”, que seleciona proteínas e peptídeos com propriedades biológicas específicas, utilizado em terapias anticâncer e em inibidores no tratamento de doenças neurodegenerativas. Soares *et al.* (2012), utilizou esta técnica para selecionar os inibidores de enzimas digestivas de larvas de 4º ínstar de *Ae. aegypti*. Os resultados obtidos demonstraram que os inibidores seletivos foram os específicos para as enzimas do tipo tripsina, quimotripsina e elastase.

É importante notar que neste estudo, foi utilizada eletroforese em gel de poliacrilamida nativo, sem SDS, ou seja, as proteínas foram preparadas em tampão não desnaturante e não redutor de amostra, o qual mantém as estruturas secundárias das proteínas e densidade de carga nativa. Por conseguinte, a massa molecular não pode ser avaliada, mas as isoformas podem ser claramente vistas.

4.3 Análise Efeito de ApTI na Aparência Morfológica das Fezes de *Ae. aegypti*

Para analisar a presença da membrana peritrófica (MP) nas fezes, foram analisados morfológicamente as fezes das larvas do grupo controle e alimentado (72 e 96 h) com auxílio de um microscópio estereoscópico (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Não foram observadas alterações na aparência morfológica das fezes entre os tratamentos, sendo considerado a forma de bastonetes bem delineados, como aparência normal das fezes de *Ae. aegypti*.

A membrana peritrófica (MP) desempenha um papel importante na defesa e proteção do epitélio do intestino médio contra a invasão por vírus, bactérias, protozoários e helmintos (GUSMAO *et al.*, 2002). Substâncias químicas tóxicas

ingeridas podem atravessar passivamente ou perturbar a estrutura da MP, afetando negativamente o inseto. Gusmão *et al.* (2002) relataram as larvas de *Ae. aegypti*, que haviam ingerido extrato de *Derris urucu* (Leguminosae), excretaram fezes amorfa, provavelmente devido a uma modificação estrutural da matriz peritrófica causada pelo extrato aquoso e, associada também, a mortalidade das larvas.

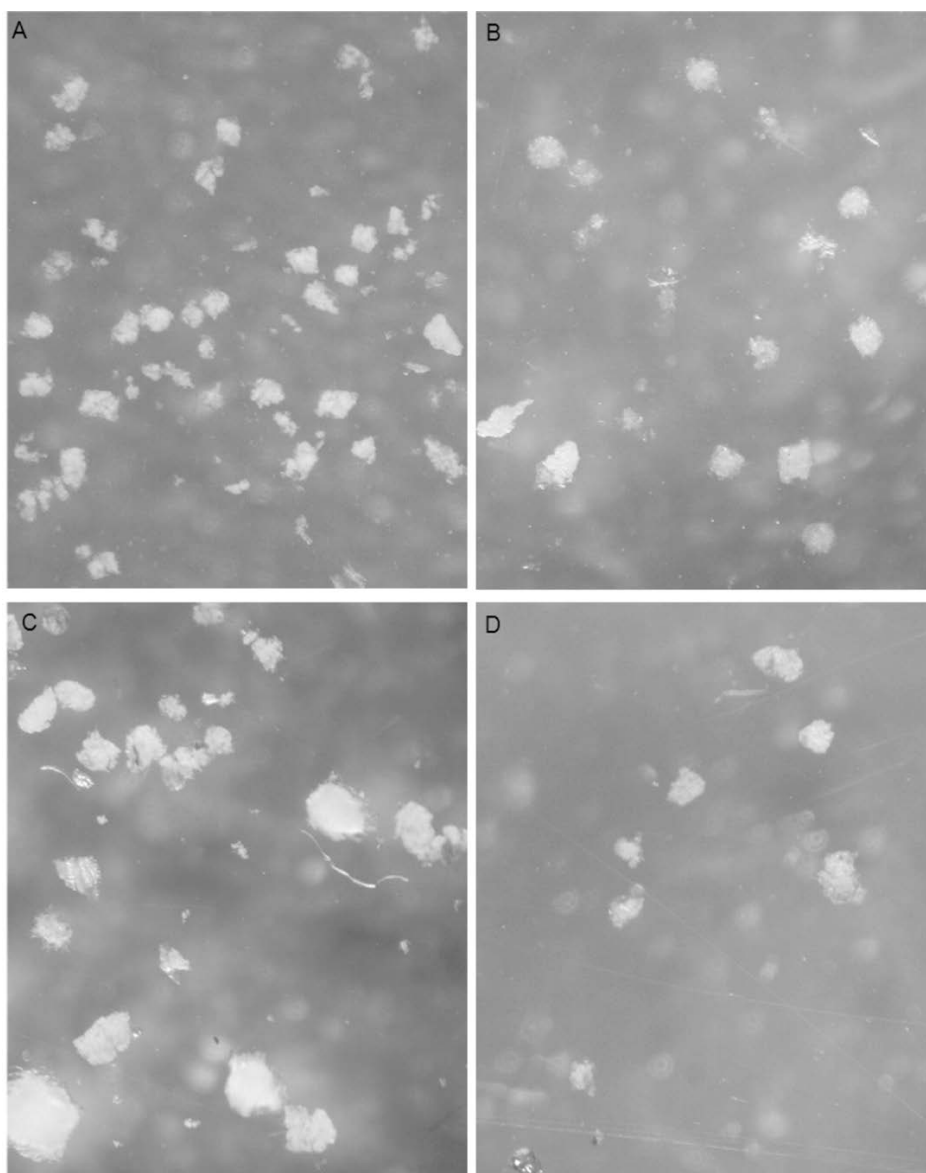


Figura 12 - Fezes de larvas de *Ae. aegypti*. (A) Grupo controle e (B) Grupo alimentado com ApTI 0,2 mg/ mL durante 72 h de tratamento. (C) Grupo controle e (D) Grupo Alimentado com ApTI 0,2 mg/ mL durante 96 h de tratamento (40X).

4.4 Digestão *in vitro* de ApTI pelas Enzimas Digestivas de *Ae. aegypti*

Para garantir o sucesso do efeito inseticida, um inibidor deve ser resistente à ação proteolítica das proteases do intestino médio do próprio inseto. Esta é uma das estratégias do inseto para ultrapassar o efeito dos IPs (BRIOSCHI *et al.*, 2007). Para avaliar a susceptibilidade de ApTI à degradação pelas enzimas digestivas de *Ae. aegypti*, uma digestão *in vitro* de ApTI / BSA foi feita e visualizada por SDS -PAGE (Figura 13).

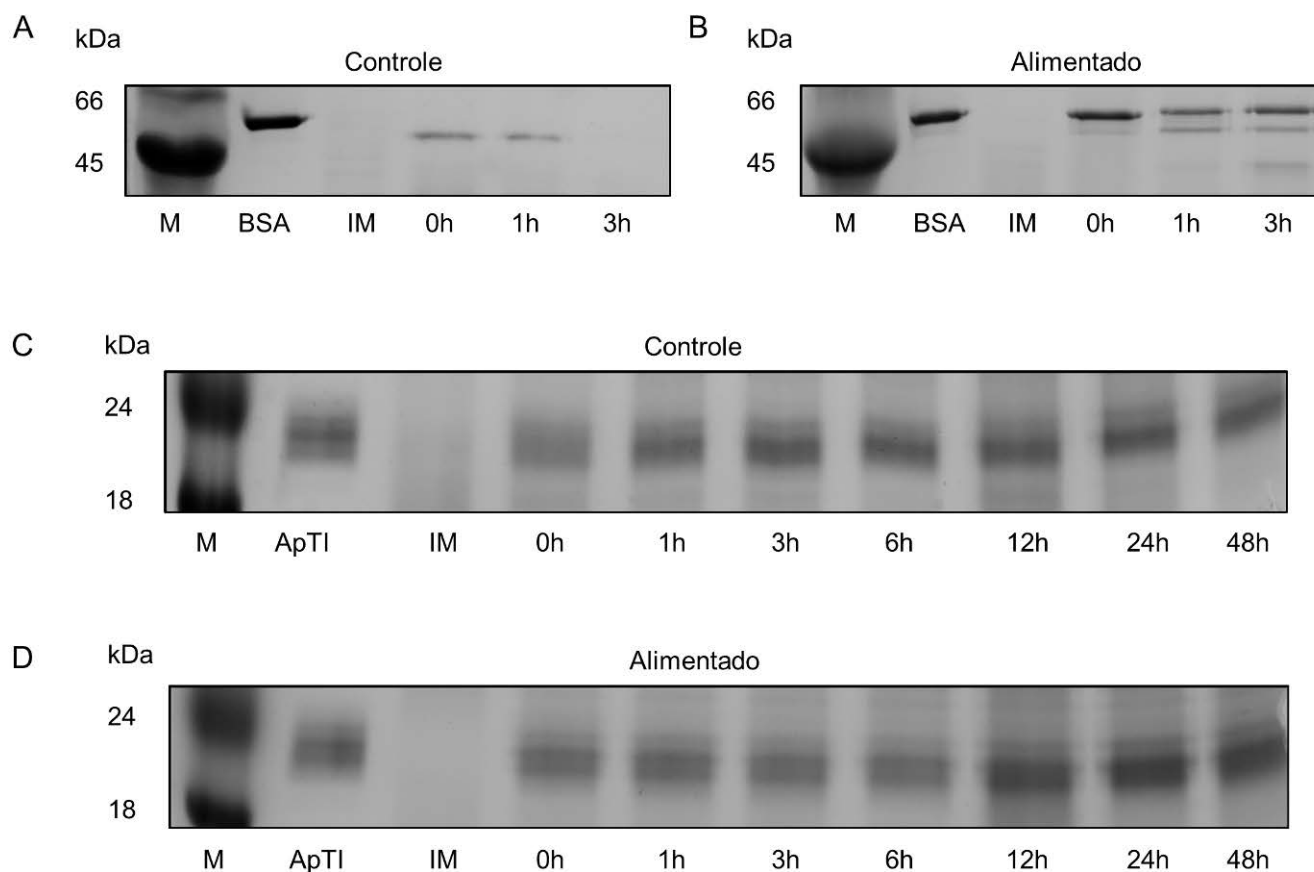


Figura 13 - SDS - PAGE da digestão *in vitro* pelas proteases do intestino médio de larvas de *Ae. aegypti*. Digestão de BSA pelas enzimas digestivas do grupo (A) controle e (B) alimentado cronicamente com ApTI 0,2 mg/ mL durante 96 h. Digestão de ApTI pelas enzimas digestivas do grupo (C) controle e (D) alimentado cronicamente com ApTI 0,2 mg/ mL durante 96 h. M - padrões de massa molecular; IM – intestino médio.

ApTI foi incubado com homogenato de intestino médio de larvas expostas durante 96 h. Como controle positivo, a degradação total de BSA pelo grupo controle ocorreu dentro de 3 h (Figura 13A). Todavia, não foi observada a total degradação do BSA quando digerido pelas proteases das larvas alimentadas, após o mesmo período de 3 h (Figura 13B). O BSA-padrão visualizado com uma banda e com peso molecular de cerca de 66 kDa, após 3 h, mostra três bandas, como mostra a Figura 13B.

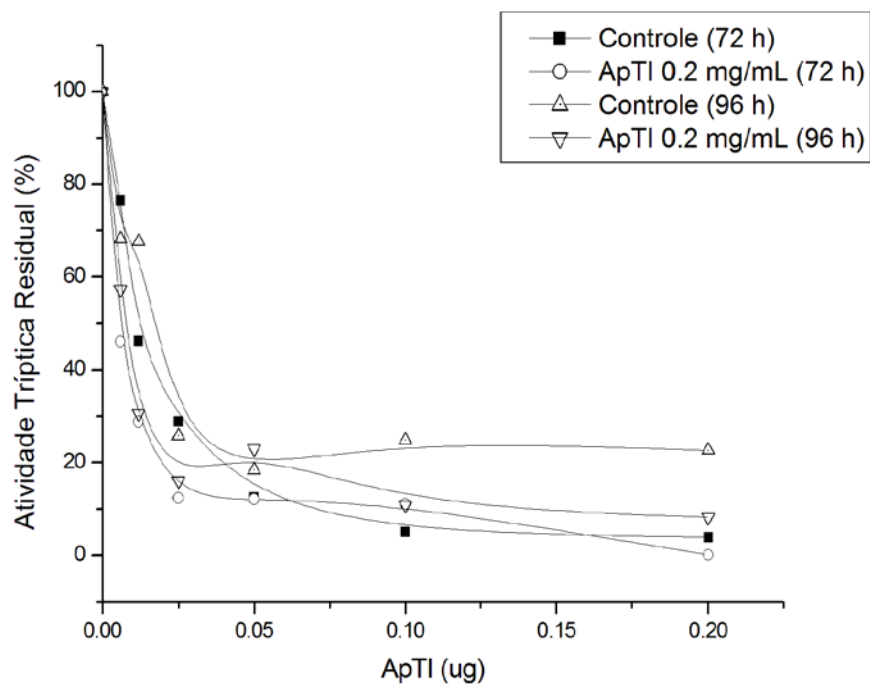
Assim, conclui-se que as proteinases das larvas do grupo alimentado ainda possuem certa capacidade de clivar a proteína, sugerindo uma aparente dificuldade em degradar o BSA. Quando incubado ApTI com as enzimas do intestino médio de larvas do grupo controle (Figura 13C) e do grupo alimentado (Figura 13D), não houve degradação do inibidor até 48 h. Dessa forma, ApTI se mostra resistente à proteólise das enzimas digestivas de larvas de *Ae. aegypti* no tempo testado, incluindo as enzimas previamente expostas ao inibidor.

4.5 Inibição da Atividade Proteolítica das Enzimas Digestivas de *Ae. aegypti* por ApTI

Para avaliar se as enzimas digestivas de *Ae. aegypti* continuam sensíveis ao inibidor após uma exposição prévia ao ApTI, as atividades proteolíticas das enzimas do intestino médio das larvas do grupo controle e do alimentado foram medidos na presença de BAPNA e SAAPFpNA, como substrato (Figura 14). Foi observado que ao aumentar as concentrações de inibidor, diminui exponencialmente a atividade trípica (Figura 14A) e quimotríptica (Figura 14B).

Como resposta à presença de IPs, alguns insetos produzem novas proteases insensíveis, a fim de sobrepujar os efeitos negativos do inibidor (JONGSMA *et al.*, 1996). Estudos anteriores com ApTI, demonstraram a mesma capacidade deste IPs em continuar a inibir as atividades proteolíticas das enzimas digestivas das larvas de *Anagasta kuehniella* e, de *D. saccharalis*, ambas ainda sensíveis à ação do inibidor (MACEDO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012).

A



B

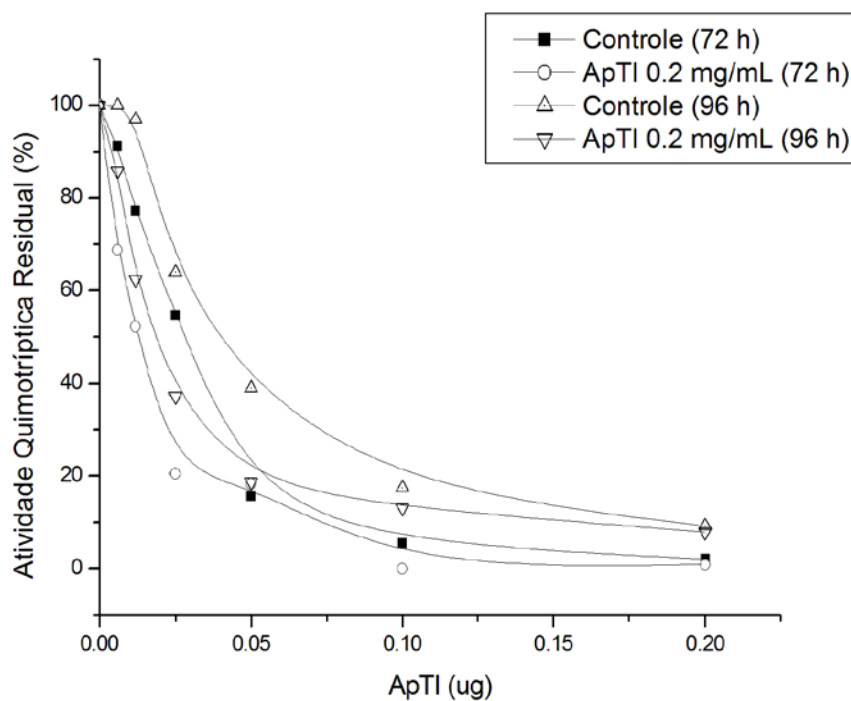


Figura 14 - Atividade proteolítica das enzimas do intestino médio de *Ae. aegypti* na presença de ApTI: (A) Tripsina e (B) quimotripsina. BAPNA e SAAPFpNA foram usado como substrato. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 Efeito Crônico de ApTI na Emergência de Pupas e Adultos de *Ae. aegypti*

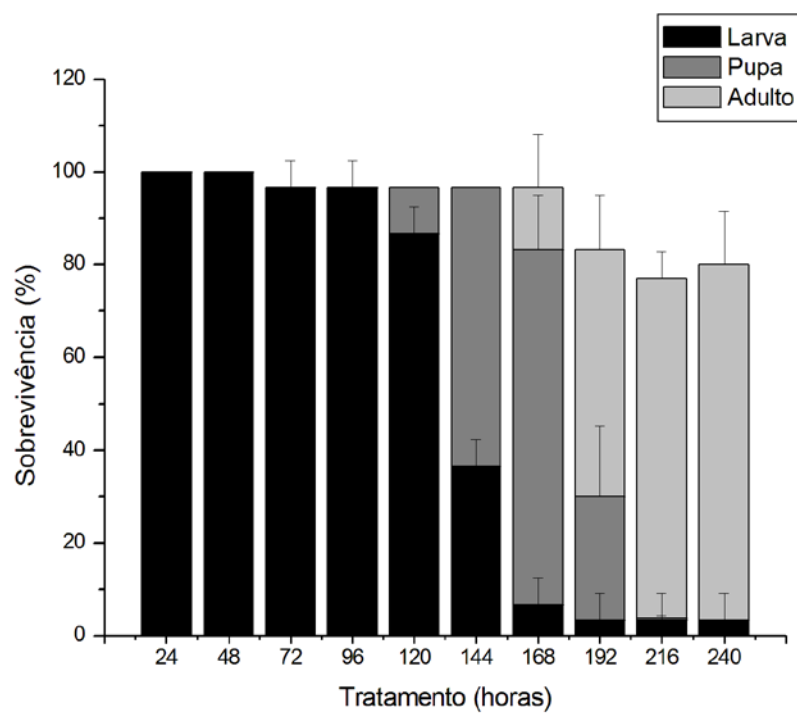
Os efeitos da exposição crônica de ApTI 0,2 mg/mL contra o *Ae. aegypti* foram monitorados através da determinação da sobrevivência de cada uma das fases de desenvolvimento larval (Figura 15). O grupo controle apresentou uma alta taxa de sobrevivência até 240 h, diminuindo para cerca de 80% após 240 h, como demonstrado na Figura 15A. Todavia, o grupo alimentado demonstrou uma redução na sobrevivência total de 35% após 240 h (Figura 15B). Confirmando os dados anteriores, a taxa de sobrevivência das larvas alimentadas foi de 52,5% em 96 h.

A primeira observação da formação de pupa foi com 120 h no grupo controle, e no grupo alimentado ocorreu após 144 h de tratamento. O mesmo padrão ocorreu em adultos, onde foi observado um atraso no surgimento de tratamentos de 24 h no grupo alimentado, quando comparado com o controle. Não foram observadas deformações morfológicas em nenhum indivíduo. Esses dados sugerem que *Ae. aegypti* pode sobreviver em presença de ApTI nesta concentração e completar com sucesso o seu ciclo de vida. Porém, com um atraso para emergir como pupa e consequentemente, como adulto.

Resultados semelhantes foram relatados no efeito da lectina de *Moringa oleifera* no desenvolvimento de *Ae. aegypti*, onde foi observado que os extratos com menor atividade hemaglutinante atrasavam o desenvolvimento larval, e aqueles com a maior atividade cessavam o seu desenvolvimento no 3º ínstar (COELHO *et al.*, 2009).

No estudo de Pontual *et al.* (2014), após 72 h em contato com o inibidor de tripsina de *M. oleifera*, as larvas de *Ae. aegypti* permaneceram no primeiro ínstar em todas as concentrações testadas no estudo. Porém, não demonstrou afetar a sobrevivência das pupas, quando em contato com o inibidor em exposição aguda (24 h).

A



B

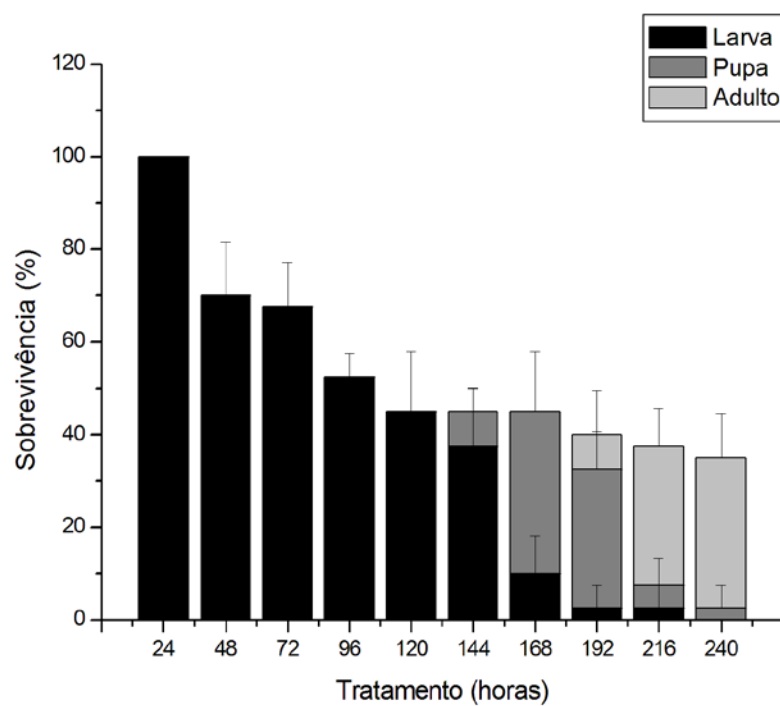


Figura 15 - Taxa de sobrevivência de larva, pupa e adulto de *Ae. aegypti* do grupo (A) Controle e (B) do grupo alimentado com ApTI 0,2 mg/ mL. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As barras mostram a média $\pm$ DP.

4.7 Efeito Agudo de ApTI em Diferentes Instares das Larvas de *Ae. aegypti*

Larvas de *Ae. aegypti* em diferentes instares (LI, LII, LIII e LIV) mantidas previamente em água foram expostas a uma solução de ApTI (CL₅₀) durante 24 h. Esta exposição aguda não teve influência sobre a sobrevivência das larvas em qualquer ínstar (Figura 16A). No entanto, houve diferenças significativas no peso larval, entre o controle e alimentado, no LI (19,75%), LII (24,9%) e LIII (21,51%) e não houve diferença no LIV (Figura 16B).

Para investigar a atividade proteolítica das enzimas digestivas de *Ae. aegypti*, BAPNA e SAAPFpNA foram usadas como substratos. Foi observada uma redução significativa na atividade trípica entre os tratamentos (grupo controle e alimentado) nos instares (LI, LII e LIII), exceto no LIV, onde não houve diferença significativa (Figura 16C), o mesmo foi observado na atividade quimotríptica (Figura 16D).

Na análise zimográfica, os perfis proteolíticos mostraram a atividade de sete proteases, tanto no controle quanto no alimentado, porém mais fracamente no grupo alimentado. Pode-se observar também o mesmo padrão dos ensaios bioquímicos, onde a intensidade proteolítica no LI se encontra mais fraca do que nos outros instares (Figura 16D). A Figura 16E mostrou os perfis proteolíticos das amostras tratadas com TLCK (inibidor de tripsina). Os extratos enzimáticos do intestino médio tratados mostraram três bandas inibidas (proteínase 3, 4 e 7), sugerindo assim que essas enzimas são do tipo tripsina.

Estudos anteriores, Murugan *et al.* (2007; 2012), investigaram diferentes concentrações de extrato de planta em larvas de *Ae. aegypti* em diferentes instares, onde aparentemente há uma correlação entre estágio larval e sensibilidade ao princípio ativo de certo composto. Murugan *et al.* (2012) demonstraram que o valor de CL₅₀ do extrato de casca de laranja de *Citrus sinensis* em larvas de primeiro ínstar foi de 204,87 ppm e, de 436,93 ppm para quarto ínstar. Assim, esta correlação pode explicar a susceptibilidade de larvas expostas a ApTI por 24 h, em LI, LII e LIII e nenhum efeito em LIV. O efeito agudo de ApTI não foi capaz de afetar a taxa de sobrevivência das larvas de *Ae. aegypti*, porém, afetou os demais parâmetros analisados, como peso e atividade proteolítica.

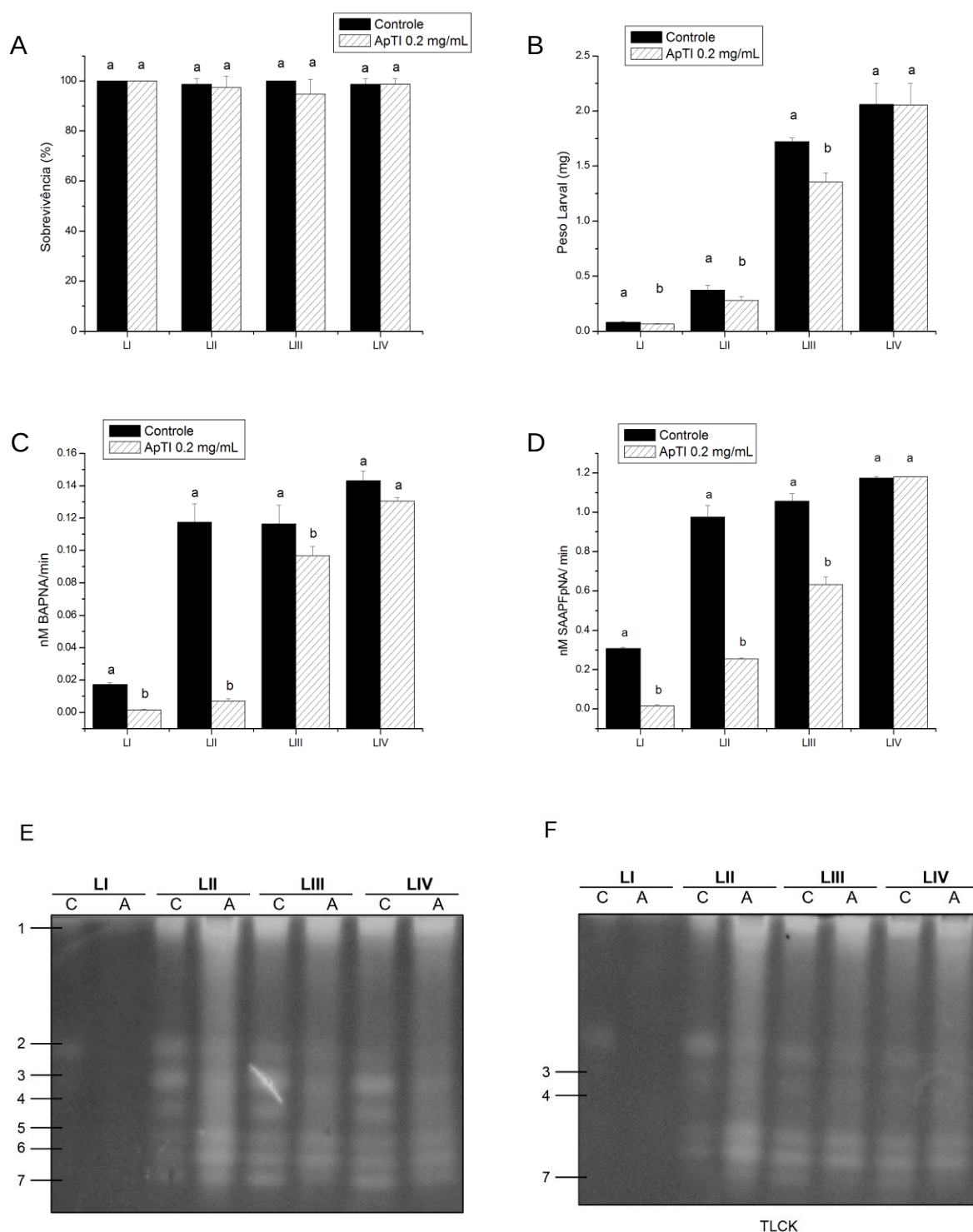


Figura 16 - Análise do efeito agudo de ApTI em diferentes instares de *Ae. aegypti*. (A) Taxa de sobrevivência; (B) Peso; (C) Atividade tríptica, (D) Atividade quimotríptica, usando BAPNA e SAAPFpNA como substrato. Letras diferentes indicam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p < 0,05$). Análise zimográfica em eletroforese em gel de poliacrilamida nativa: (E) extrato de intestino médio de larvas do grupo controle e alimentado; (F) extrato de intestino médio de larvas do grupo controle e alimentado tratados com TLCK 100 mM. Ambos os grupos representados letra inicial no texto na figura. Os números à esquerda indicam as proteases ativas. Bandas de atividade proteolítica aparecer como uma zona clara contra um fundo azul escuro.

4.8 Efeito Agudo de ApTI em Larvas de 4º ínstar de *Ae. aegypti*

Este bioensaio foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, larvas de 4º ínstar previamente mantidas em água destilada foram expostas a uma solução de ApTI 0,2 mg/mL durante 12 h (grupo controle e alimentado). Após 12 horas de incubação, o extrato do intestino médio de larvas alimentadas demonstrou uma diminuição significativa de 82,5% na atividade trípica (Figura 17A) e, 77% na atividade quimotríptica (Figura 17B), quando comparada com o controle.

Na segunda etapa do bioensaio, as larvas de 4º ínstar previamente expostas por 12 h em ApTI, foram colocadas novamente em água destilada durante um período adicional de 12 horas. O comportamento enzimático analisado foi para entender como as larvas se comportam quando anteriormente expostas ao inibidor e colocadas de volta em água destilada. Atividade trípica do grupo alimentado demonstrou uma diminuição significativa de 30%, quando comparado com o controle (Figura 17A). No entanto, na atividade quimotríptica não houve diferenças entre os tratamentos (Figura 17B). Nenhuma mortalidade larval foi observada.

Este resultado sugere que, quando o ApTI entra em contato com as enzimas digestivas das larvas de *Ae. aegypti*, há uma resposta à presença do inibidor, ocorrendo uma diminuição nas atividades proteolíticas. Subsequentemente, na ausência do inibidor, as atividades proteolíticas tendem a voltar ao normal, ou seja, se igualam ao controle. Os efeitos negativos dos inibidores de proteases sobre o inseto vão além da redução das atividades proteolíticas das enzimas digestivas. O complexo enzima-inibidor pode interferir na normal degradação de peptídeos, o qual, em seguida, de forma anormal ativa os mecanismos de “feedback” que desencadeiam respostas fisiológicas (RYAN, 1990; BROADWAY, 1995).

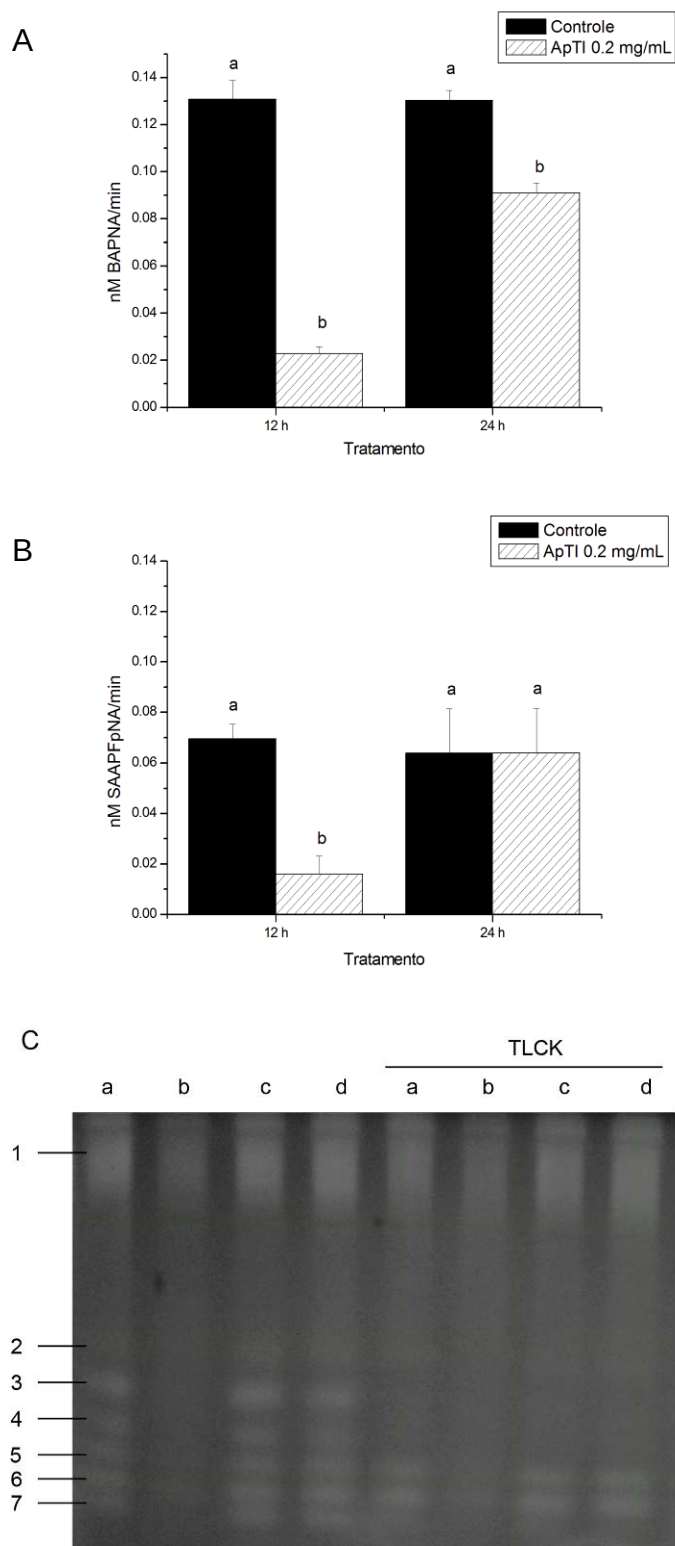


Figura 17 - Efeito de ApTI nas larvas de 4º instar de *Ae. aegypti*. (A) Atividade trípica e (B) quimotríptica de larvas expostas durante 12 h e, posteriormente de volta a água destilado por mais 12 h (completando 24 h de tratamento). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p < 0,05$). (E) Análise zimográfica em eletroforese em gel de poliacrilamida nativa. Note: a – IM do controle com 12 h; b – IM do alimentado com 12 h; c – IM do controle com 24 h; d – IM do alimentado com 24 h; TLCK 100 mM (inibidor de tripsina) foi utilizado nas amostras descritas.

Na análise zimográfica, o intestino médio das larvas de 4º ínstar do controle e do alimentado mostraram diferenças qualitativas nas atividades proteolíticas entre os tratamentos (Figura 17C). Da mesma forma que o observado nos ensaios bioquímicos, a intensidade da proteólise diminuiu na presença do inibidor e, voltando a igualar ao controle, quando na ausência do inibidor. Tanto as larvas do controle como as do alimentado, apresentaram a atividade de sete proteases. Quando os extratos enzimáticos foram tratados com TLCK, três bandas foram inibidas (proteínase 3, 4 e 7), sugerindo que a atividade dessas proteases seja do tipo tripsina, semelhante aos resultados anteriormente descritos.

4.9 Alterações Histológicas em Larvas de *Ae. aegypti* Expostas Cronicamente ao ApTI

Larvas de 4º ínstar de *Ae. aegypti* expostas cronicamente CL₅₀ de ApTI e seu controle foram observadas histologicamente utilizando a coloração de hematoxilina-eosina (Figura 18). O epitélio do intestino médio das larvas do controle apresentou uma única camada de células colunares (células digestivas) ao longo do ventrículo; os núcleos eram grandes e geralmente, ocupavam as partes médias ou distais dos corpos celulares. Havia presença de lâmina basal do intestino médio, aumentado por microvilosidades e membranas em forma de borda de escova. Em geral, a organização estrutural do epitélio era semelhante à de outros dípteros (SNODGRASS, 1935).

Nenhuma alteração morfológica foi observada na membrana peritrófica, após a exposição das larvas ao ApTI. As alterações observadas nas larvas alimentadas foram referentes à degeneração das microvilosidades das células epiteliais do intestino médio na região posterior, à hipertrofia das células dos cecos gástricos e à um aumento no espaço ectoperitrófico.

A hipertrofia das células dos cecos gástricos e a degeneração das microvilosidades das células epiteliais do intestino médio foram previamente relatadas por Ruiz *et al.* (2004), que observaram que a localização preferida da toxina Cry11Bb estava no ceco gástrico e no intestino posterior de larvas de *Ae. aegypti*, *Anopheles albimanus* e *Culex quinquefasciatus*. Os autores sugerem que

isto se deva à concentração mais elevada de moléculas de receptor ou de moléculas com afinidade de ligação mais elevada. Além disso, a observação do aumento do espaço ectoperitrófico foi relatado por Arruda *et al.* (2003), no estudo com extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Ae. aegypti*. Outros estudos com *Ae. aegypti* tratados com ácido tânico e de taninos de catequina isolada da planta *M. pubescens* mostraram alterações histopatológicas semelhantes às observadas neste estudo (REY *et al.*, 1999; VALOTTO *et al.*, 2011).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ação do inibidor de proteinase serínica de *A. pavonina* no desenvolvimento larval de *Ae. aegypti* mostrou que ApTI tem capacidade de influenciar na sobrevivência e no peso das larvas do mosquito, o que indica que esta proteína tem um grande potencial tóxico para o inseto.

Nossos dados sugerem que as enzimas envolvidas na digestão do inseto têm reduzido a sua capacidade de realizar a proteólise na presença de uma concentração não-letal de ApTI (CL₅₀). Uma vez que as larvas de *Ae. aegypti* respondem a ingestão de IP com o decréscimo das atividades proteolíticas do intestino médio.

No entanto, não foi observado nenhum mecanismo proteolítico de resistência à ApTI produzidos nas larvas expostas a este inibidor. Este não demonstrou produzir novas ou insensíveis proteases no intestino médio após a ingestão aguda e crônica do inibidor. As enzimas digestivas de *Ae. aegypti* também não foram capazes de digerir ApTI e ainda, se mostravam sensíveis à inibição. ApTI atrasou o tempo de desenvolvimento larval e, conseqüentemente, a emergência das pupas e adultos. Além disso, o inseto mostrou não ter seu mecanismo “feedback” afetado por ApTI, uma vez na ausência do inibidor ocorre a regulação da atividade das enzimas.

O efeito tóxico do ApTI em larvas mostrou influenciar na degeneração das microvilosidades das células epiteliais do intestino médio na região posterior, a hipertrofia das células cecos gástricos e um aumento no espaço ectoperitrófico. Nenhuma alteração morfológica foi observada na membrana peritrófica.

Neste trabalho, demonstramos que *Ae. aegypti* não emprega os mecanismos de regulação a fim de superar o efeito negativo de ApTI. Por isso, sugerimos que ApTI têm potencial biotecnológico para garantir uma implementação bem sucedida como um agente contra o vetor da dengue e da febre amarela, *Ae. aegypti*.

REFERÊNCIAS

AKRAM, D.S.; AHMED, S. Dengue fever. *Journal of Infectious Diseases*, v. 14, p. 124-125. 2005.

ARRUDA, W.; OLIVEIRA, G.M.C.; SILVA, I.G. Toxicity of the ethanol extract of *Magonia pubescens* on larvae *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, p. 36, v. 17-25. 2003.

BARBOSA, J.Jr.; SIQUEIRA, J.B.Jr.; COELHO, G.E.; VILARINHOS, P.T.; PIMENTA, F.G.Jr. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. *Epidemiology Bulletin*, v. 23, p. 3-6. 2002.

BIRK, Y. Plant protease inhibitor: significance in nutrition, plant protection, cancer prevention and genetic engineering. Springer, New York, p.170. 2003.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal Biochemical*, v. 204, p. 433-451. 1992.

BOLTER, C.J.; JONGSMA, M.A. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *Journal of Insect Physiology*, v. 41, p. 1071-1078. 1995.

BOROVSKY, D.; MAHMOOD, F. Feeding the mosquito *Aedes aegypti* with TMOF and its analogs: effect on trypsin biosynthesis and egg development. *Regulatory Peptides*, v. 57, p. 273-281. 1995.

BOROVSKY, D.; MEOLA, S. M. Biochemical and cytoimmunological evidence for the control of *Aedes aegypti* larval trypsin with Aea-TMOF. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 55, p. 124-139. 2004.

BRACKNEY, D.E.; ISOE, J.; BLACK, W.C. IV; ZAMORA, J.; FOY, B.D. Expression profiling and comparative analyses of seven midgut serine proteases from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Journal of Insect Physiology, v. 56, p. 736-744. 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254. 1976.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 16, p. 279-293. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. – Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Febre amarela. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/sobre.php>>. Acesso em: 26 Jan. 2013a.

BRASIL. Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue. Balanço Dengue Semana epidemiológica 1 a 7 de 2013. Brasília. 2013b.

BRIOSCHI, D.; NADALINI, L.D.; BENGTSON, M.H.; SOGAYAR, M.C.; MOURA, D.S.; *et al.* General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 37, p. 1283-1290. 2007.

BRITO, L.O.; LOPES, A.R.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors maybe mediated by the synthesis of new proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 128, p. 365-375. 2001.

BROADWAY, R.M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitor? *Journal of Insect Physiology*, v. 41, p. 107-116. 1995.

BROADWAY, R.M.; DUFFEY, S.S. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exiqua*. *Journal of Insect Physiology*, v. 32, p. 827-833. 1986.

BROGDON, W.G.; MCALIISTER, J.C. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, p. 605-613. 1998.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SA, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, v. 40, p. 1515-1539. 2002.

COELHO, G.E. Challenges in the control of *Aedes aegypti*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 54, p. 13-14. 2012.

COELHO, J.S.; SANTOS, N.D.; NAPOLEAO, T.H.; GOMES, F.S.; FERREIRA, R.S.; *et al.* Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. Chemosphere, v. 77, p. 934-938. 2009.

DELMAR, E.G.; LARGMAN, C.; BRODRICK, J.W.; GEOKAS, M.C. A sensitive new substrate for chymotrypsin. Analytical Biochemistry, v. 99, p. 316-320. 1979.

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 95, p. 271-278. 1961.

FINNEY, D.J. Probit Analysis; a statistical treatment of the sigmoid response curve. Oxford, Englad: Macmillan. xiii 256 pp. 1947.

FRANCO, O.L.; MELO, F.R., SILVA, M.C.M., GROSSI DE SA, M.F. Resistência de plantas a insetos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 10, p. 36–40. 1999.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Vigilância Epidemiológica. Dengue: instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. 3 ed. Brasília. 2001.

GATEHOUSE, A.M.R.; NORTON, E.; DAVISON, G.M.; BABBE, S.M.; NEWELL, C.A.; GATEHOUSE, J.A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*: effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. Journal of Insect Physiology, v. 45, p. 545-558. 1999.

GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITING, B. Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-microbe Interactions*, v. 3, p. 327-333. 1990.

GIRI, A.P.; HARSULKAR, A.M.; DESHPANDE, V.V.; SAINANI, M.N.; GUPTA, V.S.; RANJEKAR, P.K. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. *Plant Physiology*, v. 116, p. 393-401. 1998.

GOMES, A.P.G.; DIAS, S.C.; BLOCH JR, C.; MELO, F.R.; FURTADO-JR, J.R.; *et al.* Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 140, p. 313-319. 2005.

GUSMAO, D.S.; PASCOA, V.; MATHIAS, L.; CURCINO VIEIRA, I.J., BRAZ-FILHO, R.; *et al.* *Derris* (Lonchocarpus) *urucu* (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* v. 97, p. 371-375. 2002.

HAQ, S.K.; ATIF, S.M.; KHAN, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 431, p. 145-159. 2004.

HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S.H. Mosquito carboxylesterases: A review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Journal of Medical and Veterinary Entomology*, v.12, p. 1-12. 1998.

HORLER, E.; BRIEGEL, H. Chymotrypsin inhibitors in mosquitoes: Activity profile during development and after blood feeding. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 36, p. 315-333. 1997.

HOUSEMAN, J.G.; CAMPBELL, F.C.; MORRISON, P.E. A preliminary characterization of digestive proteases in the posterior midgut of the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Insect Biochemistry*, v. 17, p. 213-218. 1987.

IOC. Instituto Oswaldo Cruz. Dengue Vírus e Vetor: Vetor. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html>> Acesso em: 25 Jan. 2013.

ISOE, J.; ZAMORA, J.; MIESFELD, R.L. Molecular analysis of the *Aedes aegypti* carboxypeptidase gene family. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, v. 39, p. 68–73. 2009.

JAMAL, F.; PANDEY, P.K.; SINGH, D.; KHAN, M.Y. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Pytochemistry Reviews*, v. 12, p. 1-34. 2013.

JOHNSTON, K.A.; LEE, M.J.; BROUGH, C.; HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Proteinase activities in the larval midgut of *Heliothis virescens*: Evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 25, p. 375-383. 1995.

JONGSMA, M.A.; STIEKEMA, W.J.; BOSCH, D. Combatting inhibitor-insensitive proteases of insect pests. *Trends Biotechnology*, v. 14, p. 331-333. 1996.

JOSHI, V.; MOURYA, D.; SHARMA, R.C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 67, p. 158-161. 2002.

KABIR, K.E.; CHOUDHARY, M.I.; AHMED, S.; TARIQ, R.M. Growth-disrupting, larvicidal and neurobehavioral toxicity effects of seed extract of *Seseli diffusum* against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 90, p. 52-60. 2013.

KOODALINGAM, A.; MULLAINADHAN, P.; ARUMUGAM, M. Immuno-suppressive effects of aqueous extract of soapnut *Sapindus emarginatus* on the larvae and pupae of vector mosquito, *Aedes aegypti*. Acta Tropical, v.126, p. 249-255. 2013.

KOVENDAN, K.; MURUGAN, K.; SHANTHAKUMAR, S.P.; VINCENT, S.; HWANG, J.S. Larvicidal activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni) (Family: Rubiaceae) leaf extract against *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. Parasitology Reserch, v. 111, p. 1481-1490. 2012.

KUNZ, P.A. Resolution and properties of the proteinases in the larva of the mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry, v. 8, p. 43-51. 1978.

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

LEE, H.L.; ROHANI, A. Transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to dengue outbreak in an urban area in Malaysia. Dengue Bulletin, v. 29, p. 106. 2005.

LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C. *et al.* A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 97, p. 199-206. 2005.

MACEDO, M.L.; GARCIA, V.A.; FREIRE, M.G.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, v. 68, p. 1104-11. 2007.

MACEDO, M.L.R.; DURIGAN, R.A.; SILVA, D.S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M.G.M.; *et al.* *Adenanthera pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 73, p. 213-231. 2010.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1571, p. 83-88. 2002.

MACEDO, M.L.R.; SÁ, C.M; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J.R.P. A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 2533-2540. 2004.

MACHADO, S.W.; OLIVEIRA, C.F.R.; BEZERRA, C.S.; FREIRE, M.G.M.; KILL, M;R; *et al.* Purification of a Kunitz-type inhibitor from *Acacia polyphylla* DC seeds: Characterization and insecticidal properties against *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 2469-2478. 2013.

MATO GROSSO DO SUL. Ministério da saúde: Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul. Boletim Epidemiológico nº40 - Dengue – Semanas 1 a 46. Mato Grosso do Sul, 2013. Disponível em:<http://www.saude.ms.gov.br/index.php?templat=vis&site=116&id_comp=544&id_reg=221076&voltar=lista&site_reg=116&id_comp_orig=544>. Acesso em: 25 de Jan. 2013.

MENDONCA, F.A.; SILVA, K.F.; SANTOS, K.K.; RIBEIRO JUNIOR, K.A.; SANTANA, A.E. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. Fitoterapia, v. 76, p. 629-636. 2005.

MESQUITA-RODRIGUES, C.; SABOIA-VAHIA, L.; CUERVO, P.; LEVY, C.M.; HONORIO, N.A.; *et al.* Expression of trypsin-like serine peptidases in pre-imaginal stages of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 76, p. 223-235. 2011.

MICHAUD, D. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. Trends in Biotechnology, v. 15, p. 4-6. 1997.

MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, A.S.; SANTOS, E.A.; FRANCO, O.L.; SALES, M.P. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine- and cysteine-proteinases. Journal of Molecular Graphics and Modelling, v. 29, p. 148-156. 2010.

MURUGAN, K.; KUMAR, P.M.; KOVENDAN, K.; AMERASAN, D.; SUBRMANIAM, J.; *et al.* Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of *Citrus sinensis* orange peel extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitology Research, v. 111, p. 1757-1769. 2012.

MURUGAN, K.; MURUGAN, P.; NOORTHEEN, A. Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta:Diptera:Culicidae). Bioresource Technology, v. 98, p. 198-201. 2007.

NAPOLEÃO, T.H.; PONTUAL, E.V.; LIMA, T.A.; SANTOS, N.D.; SÁ, R. A.; COELHO, L.C.; NAVARRO, D. M.; PAIVA, P. M. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. Parasitology Research, v. 110, p. 609-616. 2012.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. Biológico, São Paulo, v. 64, p. 205-207, jul./dez., 2002.

NENE V.; WORTMAN, J.R.; LAWSON, D.; HAAS, B.; KODIRA, C., *et al.* Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. Science, v. 316, p. 1718-1723. 2007.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11. Ed. São Paulo: Atheneu, p. 383-397. 2005.

NORIEGA, F. G.; WANG, X.Y.; PENNINGTON, J. E.; BARILLAS-MURY, C. V.; WELLS, M. A. Early trypsin, a female-specific midgut protease in *Aedes aegypti*: isolation, amino-terminal sequence determination, and cloning and sequencing of the gene. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 26, p.119 – 126. 1996.

NORIEGA, F.G.; WELLS, M.A. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. Journal of Insect Physiology, v.45, p. 613–620. 1999.

NUCHSUK, C.; WETPRASIT, N.; ROYTRAKU, L.S.; RATANAPO, S. Larvicidal activity of a toxin from the seeds of *Jatropha curcas* Linn. against *Aedes aegypti* Linn. and *Culex quinquefasciatus* Say. Tropical Biomedicine, v. 29, p. 286-296. 2012.

NUNES, N.N.; SANTANA, L.A.; SAMPAIO, M.U.; LEMOS, F.J.; OLIVA, M.L. The component of *Carica papaya* seed toxic to *Aedes aegypti* and the identification of tegupain, the enzyme that generates it. Chemosphere, v. 92, p. 413-420. 2013.

OLIVA, M.L.V.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. Purification and partial characterization of thiol proteinase inhibitor from *Enterolobium contortililiquum* Beans. Biological Chemistry Hoppe-Seyler, v. 369: p. 229-232. 1988.

OLIVEIRA, C.F.R.; SOUZA, T.P.; PARRA, J.R.P.; MARANGONI, S.; SILVA-FILHO, M.C.; *et al.* Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 165, p. 19-25. 2013.

OMENA, M.C.; NAVARRO, D.M.; PAULA, J.E.; LUNA, J.S.; FERREIRA DE LIMA, M.R.; *et al.* Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. Bioresource Technology, v. 98, p. 2549-2556. 2007.

PENNA, M.L. A challenge for the public health system in Brazil: dengue control. Cadernos de Saúde Publica, v. 19, p. 305-309, 2003.

PÉREZ, O.; RODRÍGUEZ, J.; BISSET, J. A.; LEYVA, M.; DÍAZ, M.; FUENTES, O.; RAMOS F.; GONZÁLEZ, R.; GARCÍA, I. Manual de indicaciones técnicas para insectarios. Ciudad de la Habana: Ciências médicas, p.59, 2004.

PONTUAL, E.V.; SANTOS, N.D.L.; MOURA, M.C.M.; COELHO, L.C.B.B.; NAVARRO, D.M.M.F.; *et al.* Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. Parasitology Research, v. 113, p. 727-733. 2014.

PRABHU, K.S.; PATTABIRAMAN, T.N. Natural plant enzyme inhibitors Isolation and characterization of a trypsin/chymotrypsin inhibitor from indian red wood (*Adenanthera pavonina*) seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 31, p. 967–80. 1980.

REY, D.; PAUTOU, M.P.; MEYRAN, J.C. Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic Diptera larvae. Journal of Invertebrate Pathology, v. 73, p. 173-181.1999.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: Methods in Plant Biochemistry. (Dey, P.M. & Harborne, J.B. eds). Vol. 5 Academic Press, New York, 1991.

RICHARDSON, M. The protease inhibitors of plants and microorganisms. Phytochemistry, v. 16, p. 159–169. 1977.

RICHARDSON, M.; CAMPOS, F.A.P.; XAVIER-FILHO, J.; MACEDO, M.L.R.; MAIA, G.M.C.; YARWOOD, A. The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin isoinhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian carolina tree (*Adenanthera pavonina* L.). Biochimica et Biophysica Acta, v.872, p.134–40. 1986.

RUIZ, L.M.; SEGURA, C.; TRUJILLO, J.; ORDUZ, S. *In vivo* binding of the Cry11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 99, p. 73-79, 2004.

RYAN, C.A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annual Review of Phytopathology, v. 28, p. 425-449. 1990.

SANTOS, N.D.; MOURA, K.S.; NAPOLEAO, T.H.; SANTOS, G.K.; COELHO, L.C.; *et al.* Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. PLoS One, v. 7, p. 1-8. 2012.

SASAKI, D.Y.; ANTUNES, A.F.; FREIRE, M.G.M; MACEDO, M.L.R. Potencial bioinseticida de um inibidor de tripsina de sementes de *Capparis flexuosa*. Perspectiva online: biológica & saúde, v. 3, p. 16-27. 2013.

SHUKLE, R.H.; MURDOCK, L.L.; GALLUN, R.L. Identification and partial characterization of a major gut proteinase from larvae of the Hessian fly *Mayetiola destructor* (Say) (Diptera: Cecidomyiidae). Insect Biochemistry, v. 15, p. 93-101. 1985.

SILVA, V.C.; PINHEIRO, N.L.; SCHERER, P.O.; FALCAO, S.S.; RIBEIRO, V.R., *et al.* Histology and ultrastructure of *Aedes albopictus* larval midgut infected with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Microscopy Research and Technique, v. 71, p. 663-668. 2008.

SILVA, W.; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J.RP.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Evaluation of the *Adenanthera pavonina* seed proteinase inhibitor (ApTI) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of *Diatraea saccharalis*. Process Biochemistry, v. 47, p. 257-263. 2012.

SNODGRASS, R.E. Principles of insect morphology. 1935.

SOARES, T. S.; WATANABE, R.M.; LEMOS, F. J.; TANAKA, A.S. Molecular characterization of genes encoding trypsin-like enzymes from *Aedes aegypti* larvae and identification of digestive enzymes. The Journal of. Gene, v. 489, p. 70-75. 2011.

TAUIL, P. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. Cadernos de Saúde Pública, v. 18, p. 867-871. 2002.

TAVEIRA, L.A.; FONTES, L.R.; NATAL, D. Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*. Ribeirão Preto: Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto, 2001.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M.L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. Informe Epidemiológico do SUS, v. 8, p. 5-33. 1999.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comparative Biochemistry and Physiology B, v. 109, p. 1-62. 1994.

VALOTTO, C.F.B.; CAVASIN, G.C.; SILVA, H.H.G.; GERIS, R.; SILVA, I.G. Alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera, Culicidae) causadas pelo tanino catéquico isolado da planta do cerrado *Magonia pubescens* (Sapindaceae). Revista de Patologia Tropical, v. 39, p. 309-321. 2011

VENANCIO, T.M.; CRISTOFOLETTI, P.T.; FERREIRA, C.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; TERRA, W.R. The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. *Insect Molecular Biology*, v.18, p.33-44. 2009.

WHO. Instructions for determining susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC-81. 1981.

WHO Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization. 2009.

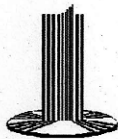
XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plant. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 4: p. 1-6. 1992.

YANG, Y.J.; DAVIES, D.M. Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of chymotrypsin. *Journal of Insect Physiology*, v. 17(1), p. 117-31. 1971a.

YANG, Y.J.; DAVIES, D.M. Digestive enzymes in the excreta of *Aedes aegypti* larvae. *Journal of Insect Physiology*, v. 17, p. 2119-2123. 1971b.

ZHAO, Y.; BOTELLA, M.A.; SUBRAMANIAN. L.; NIU, X.M.; NIELSEN, S.S., *et al.* Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than constitutive homolog. *Journal of Plant Physiology*, v. 111, p. 1299-1306. 1996.

ANEXOS



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 415/2012 da Pesquisadora Maria Lígia Rodrigues Macedo referente ao projeto de pesquisa “**Estudo do Potencial Biotecnológico de um inibidor de proteinase sobre o desenvolvimento larval de *Aedes aegypti***”, está de acordo com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária de 5 de julho 2012.

Campo Grande (MS), 5 de julho de 2012.

Dr.ª Joice Stein
Coordenadora da CEUA