



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

André Martins Pólo

Efeito da cafeína no desenvolvimento de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae): o significado biológico das alterações do
padrão de síntese de esterases

São José do Rio Preto
2014

André Martins Pólo

Efeito da cafeína no desenvolvimento de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae): o significado biológico das alterações do
padrão de síntese de esterases

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração – Genética e Evolução de Insetos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Hermione Elly Melara de Campos Bicudo.

São José do Rio Preto
2014

Pólo, André Martins.

Efeito da cafeína no desenvolvimento de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) : o significado biológico das alterações do padrão de síntese de esterases / André Martins Pólo. -- São José do Rio Preto, 2014

96 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Hermione Elly Melara de Campos Bicudo
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética dos insetos. 2. Inseto – Hormônios. 3. *Aedes aegypti*. 4. Esterases. 5. Hormônios juvenis. 6. Cafeína. I. Bicudo, Hermione Elly Melara de Campos. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 595.7:575

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

André Martins Pólo

Efeito da cafeína no desenvolvimento de *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae): o significado biológico das alterações do
padrão de síntese de esterases

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração – Genética e Evolução de Insetos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Francisco Chiaravalloti Neto
Faculdade de Saúde Pública da USP (FSP-USP)

São José do Rio Preto
30 de maio de 2014

"É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota."
(Theodore Roosevelt).

Dedico este trabalho...

A toda minha família, especialmente meus pais João e Cláudia por todo carinho, apoio, conselhos e por sempre me auxiliar na conquista de meus objetivos;

À minha noiva Beatriz pelo amor, carinho, compreensão, amizade, paciência, cumplicidade e companheirismo durante os últimos seis anos.

À Prof.^a Dr.^a Hermione Elly Melara de Campos Bicudo por todo apoio, dedicação, orientação, amizade e contribuição para a minha formação acadêmica e pessoal.

Agradecimentos

Ao término desta etapa de minha vida quero agradecer a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho e de forma especial agradecer a:

À Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, pela sua incansável orientação e apoio, e por seu carinho e amizade que foram essenciais em meu crescimento pessoal e científico;

À minha amiga Me. Thais de França Patarro por todos os conselhos e auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro;

Aos professores do Curso de Ciências Biológicas e do Programa de Pós Graduação em Genética do IBILCE/UNESP, pelo papel essencial na minha formação e por propiciar condições para a realização deste trabalho;

Aos Prof. Drs. Maria Tercília V. de A. Oliveira e Francisco Chiaravalotti Neto pela atenção dispensada na análise desta Dissertação, pela disponibilidade em participar da minha banca examinadora e pelas sugestões apresentadas;

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP), pela oportunidade de adquirir conhecimentos valiosos e pela permissão do uso de suas dependências para realização de meu Mestrado;

Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral, professor do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, FCFRP-USP, pela colaboração e auxílio.

Aos funcionários do Instituto pelo seu trabalho árduo e atenção quando solicitados;

À Gerência de Vigilância Ambiental da Secretaria da Saúde de São José do Rio Preto - SP e de forma particular ao seu funcionário Sr. Reinaldo Defende, pela competência e prontidão em nos fornecer exemplares de *Aedes aegypti*.

À minha companheira Beatriz por estar sempre ao meu lado durante os últimos seis anos.

A minha família, principalmente aos meus pais pelo carinho e trabalho em me transformar no que sou hoje;

Aos demais familiares e amigos, pelo apoio e companheirismo em todas as etapas de minha vida.

E principalmente a Deus, por me conceder a vida, me guardar e guiar durante todos os meus passos.

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	13
1.2. Cafeína no controle de <i>Aedes aegypti</i>	16
1.3. Esterases e seu papel.	18
1.4. Esterases e o hormônio juvenil.	20
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo Geral.	23
3.2. Objetivos Específicos.	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Obtenção e manutenção dos mosquitos em laboratório	24
4.2. Tratamento dos mosquitos com a CAF e preparo das amostras para eletroforese	24
4.3. Eletroforese.	25
4.4. Análise das bandas.	27
4.5. Extração das esterases para análise e sequenciamento	28
4.5.1. Isolamento das bandas e extração das esterases.	28
4.5.2. Número de amostras utilizadas e período de envio.	29
4.6. Purificação das esterases.	30
4.6.1. Cromatografias de troca iônica e exclusão de massa molecular.	31
4.6.2. Sequenciamento da região N-terminal da peptidase.	32
4.7. Análise das sequencias de aminoácidos visando ao reconhecimento das proteínas	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1. Padrão geral de bandas de <i>A. aegypti</i>	33
5.2. O padrão de bandas esterásicas da população de São José do Rio Preto.....	35

5.3. Avaliação do grau de expressão das esterases	36
5.4. Variação da expressão das bandas sob o efeito da CAF.....	36
5.5. Análise da intensidade de coloração das bandas β – esterásicas.	41
5.6. Análise da intensidade de coloração do conjunto de bandas α - esterásicas.	42
5.7. Resultados parciais da purificação e extração de esterases de interesse.....	50
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS	59
9. APÊNDICE: ARTIGO.....	67

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é vetor dos vírus causadores de doenças humanas entre as quais incluem-se a dengue, a dengue hemorrágica e a febre amarela. A transmissão dessas doenças é feita pelas fêmeas adultas, as quais necessitam de repasto sanguíneo para amadurecimento de seus óvulos. Ao picar indivíduos doentes e depois indivíduos não infectados, as fêmeas transmitem os vírus absorvidos dos primeiros, juntamente com o sangue. Vários estudos mostraram que o tratamento com cafeína (CAF) bloqueia o desenvolvimento e mata *A. aegypti* na fase larval, impedindo a produção de adultos e, conseqüentemente, a transmissão das doenças mencionadas. Paralelamente, trabalhos preliminares indicaram que o tratamento do mosquito com CAF altera o padrão de síntese das enzimas esterases. São enzimas que desempenham papel importante em vários processos fisiológicos dos organismos, estando inclusive envolvidas no controle da metamorfose dos insetos. No presente trabalho, as esterases foram analisadas em géis de poliacrilamida corados com α -naftil e β -naftil acetatos e Fast Blue RR. As amostras foram preparadas com larvas L2/L3, L4, pupas e adultos, porém, tendo em vista que a fase L4 foi a que permitiu melhor observação das bandas, o estudo praticamente restringiu-se à mesma. A comparação das amostras dos mosquitos tratados e controle envolveu a observação da presença e da frequência das bandas esterásicas nos géis. Foi também analisado o grau de expressão das bandas com base na intensidade de coloração avaliada pelo programa computacional Global Lab Image. A presente análise mostrou que a CAF altera cinco bandas β -esterásicas (EST-17A a EST-21) e um grupo de bandas α -esterásicas (EST-12 a EST-14). As bandas EST-17A a EST-20 apresentaram redução em ambas as características, enquanto EST-21 e as α -esterases apresentaram aumento. Tendo em vista as variações do grau de expressão das esterases, paralelamente ao bloqueio do desenvolvimento

larval aventou-se a hipótese de que essas esterases estejam relacionadas com a regulação dos hormônios controladores do desenvolvimento. Desta forma, por exemplo, as β -esterases poderiam constituir esterases do hormônio juvenil que seriam expressas em níveis mais baixos sob tratamento com a cafeína. Esses níveis de expressão não seriam suficientes para desdobrar o hormônio juvenil, que é um processo necessário para ocorrer a muda. A classificação dessas bandas como carboxilesterases, a mesma classificação da esterase do hormônio juvenil descrita na literatura, incentiva a continuidade do teste dessa hipótese. Nesse sentido algumas das bandas que se alteram sob ação da CAF foram isoladas do gel e as enzimas correspondentes sofreram uma primeira purificação para posterior sequenciamento a ser realizado no Laboratório de Tecnologia Enzimática da FCFRP-USP por cromatografia de troca iônica e exclusão de massa molecular.

Palavras-chave: hormônio juvenil, esterase do hormônio juvenil, ecdisona, grau de expressão de bandas esterásicas, eletroforese.

ABSTRACT

The mosquito Aedes aegypti is a vector of human disease-causing virus, including dengue, dengue hemorrhagic fever and yellow fever. The transmission of these diseases is made by the adult females, which require blood repast for completing their eggs maturation. When females bite sick individuals and later bite healthy individuals, they transmit the virus absorbed with the blood from the first. Several studies have shown that treatment with caffeine (CAF) blocks development and kills A. aegypti in the larval phase, preventing the production of adults and, consequently, the transmission of the mentioned diseases. In addition, preliminary work indicated that CAF treatment of A. aegypti changes the pattern of synthesis of esterase enzymes. The esterase enzymes play important roles in various physiological processes of the organisms, including among them the control of the metamorphosis of insects. In the present study, the esterases were analyzed in polyacrylamide gels stained with α and β naphthyl acetates and Fast Blue RR. The samples were prepared with L2, L3 and L4 larval stages, pupae and adults. However, considering that the L4 stage was the one that allowed better observation of the bands, the study was almost restricted to it. The comparison of the treated and control mosquitoes involved observations of the presence and frequency of the esterase bands in the gels. The degree of expression of the bands was also analyzed on the basis of the staining intensity evaluated by the Global Lab Image computer program. The analysis showed that CAF changed five β -esterase bands (EST-17A to EST-21) and a group of α -esterase bands (EST-12 to EST-14). The bands EST-17A to EST-20 showed reduction in both characteristics, while EST-21 and the α -esterases showed increase of them. In view of the changes occurred in the degree of expression of the esterases, parallel to the larval development block we thought in the hypothesis that these esterases are related to the regulation of the hormones that control development. For

example, the β -esterases could be juvenile hormone esterases expressed at lower levels under treatment with CAF. These decreased expression levels could not be sufficient to metabolize the juvenile hormone, a process that is necessary to the occurrence of metamorphosis. The fact that these esterases were classified as carboxylesterases, the same classification of the esterase of juvenile hormone described in the literature, encourage continuing the tests for this hypothesis. In this way, some bands that change under the effect of CAF were isolated from the gels and subjected to initial purification of the enzymes for subsequent sequencing in the Enzyme Technology Laboratory from FCFRP-USP, using the ion-exchange chromatography and molecular mass exclusion.

Keywords: juvenile hormone, esterase of the juvenile hormone, ecdysone, expression degree of esterases, electrophoresis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O mosquito *Aedes aegypti*

1.1.1. Dados gerais sobre a biologia.

O gênero *Aedes* (Diptera: Culicidae) compõe-se de aproximadamente 700 espécies, entre as quais algumas são vetoras de doenças humanas. Uma dessas espécies é o mosquito *Aedes aegypti* (*A. aegypti*) que é vetor dos vírus causadores de doenças humanas graves, como a dengue, a dengue hemorrágica e a febre amarela. *A. aegypti* é originário da África de onde se alastrou para diversos países, principalmente nas áreas tropicais (SLOSEK, 1986; REYES-VILLANUEVA, 1990; RODHAIN, 1996).

A distribuição geográfica de *A. aegypti* está diretamente relacionada à temperatura do ambiente. Para os adultos desse mosquito, exposições a temperaturas inferiores a 6° C ou superiores a 42° C são consideradas letais. Para larvas, o intervalo de temperatura não letal é de 8° C a 46° C e para ovos, de 20° C a 46° C (SLOSEK, 1986). A disponibilidade de água é também fator preponderante para a presença do mosquito, uma vez que os ovos se desenvolvem nesse meio até à fase adulta.

No Brasil, essa espécie foi eliminada do País, na década de 1950, mas foi reintroduzida e disseminou-se a partir dos meados de 1980, estando hoje presente em todos os Estados brasileiros. Muitas regiões sofrem com a incidência da dengue, algumas com índices elevados de dengue hemorrágica. Como já foi mencionado, são doenças graves, sendo que a dengue, embora geralmente não fatal, causa sofrimentos enormes, como descrevem as pessoas que já a contraíram. Além disso, frequentemente deixa sequelas caracterizadas por dores musculares e articulares e dificuldades digestivas, entre outras. A dengue hemorrágica, com alto índice de mortalidade, pode ocorrer na primeira vez em que o indivíduo é contaminado, mas, com maior frequência, atinge indivíduos reinfetados por um

tipo de vírus diferente daquele que o contaminou na primeira vez (REBELO et al., 1999; BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

São conhecidos, atualmente, quatro tipos de vírus que podem ser transmitidos pelo *A. aegypti*, denominados de DEN1, DEN2, DEN3 e DEN4 (FIGUEIREDO et al., 2008). A presença de vários tipos virais aumenta a probabilidade de reinfeção por outro vírus e, conseqüentemente, aumenta as chances do aparecimento do quadro sintomático mais grave da doença, a dengue hemorrágica.

A morfologia dos adultos de *A. aegypti* permite distingui-los dos demais mosquitos por vários aspectos. O clipeo é revestido de escamas, o mesonoto apresenta duas linhas longitudinais medianas de escamas amareladas, e de cada lado, uma linha prateada curva que se torna reta no terço posterior e se prolonga até o escutelo formando, no conjunto, o desenho de uma lira, característica da espécie. As patas apresentam anéis brancos. A larva possui um sifão respiratório castanho-escuro, quase negro e curto. Devido a este sifão, ela permanece em posição quase vertical em relação à superfície líquida (PESSOA; MARTINS, 1982).

O ciclo de desenvolvimento do *A. aegypti* inclui as fases de ovo, larva (L1, L2, L3, L4), pupa e adulto, com duração dependente da temperatura (em geral de cinco a 12 dias, em nossa região).

A oviposição de *A. aegypti* é feita em recipientes onde ocorre o acúmulo de água. Na natureza, os principais locais de criação são lagoas, pântanos e outros ambientes alagáveis, buracos em árvores e plantas como bromélias e bambus, que possuem estruturas que acumulam água. No entanto, devido principalmente à devastação de áreas naturais e acúmulo de lixo, esse inseto acabou se estabelecendo na área urbana onde qualquer tipo de recipiente pode tornar-se um criadouro (LEMOS et al., 2010).

Os ovos são depositados separadamente uns dos outros, em lotes, nas proximidades da água ou na sua superfície, com intervalos de um ou mais dias. Os ovos que estiverem depositados fora da água podem permanecer viáveis por muitos meses, resistindo à dessecação. Quando houver água no local,

desenvolvem-se, liberando as larvas. Esta característica da biologia do *Aedes* é uma das causas da dificuldade do seu controle. Outra dificuldade no controle é que os locais de postura podem ser grandes reservatórios com água parada como piscinas não tratadas e caixas d'água e até um pedaço de plástico ou uma tampinha de garrafa que se enchem de água da chuva ou da rega de plantas (BICUDO, 2008)

1.1.2 Transmissão dos vírus pelo *A. aegypti*

A transmissão das doenças virais dá-se por meio da fêmea adulta, que é o sexo hematófago. As fêmeas precisam alimentar-se de sangue para que seus óvulos completem a maturação, enquanto os machos alimentam-se exclusivamente de néctar doce. Quando a fêmea pica o indivíduo doente, os vírus são ingeridos com o sangue e, após se reproduzirem no seu organismo, são inoculados juntamente com a saliva na picada de outro indivíduo.

1.1.3. Formas de controle: o uso da cafeína

Presentemente, sem vacina e sem tratamento específico, o controle da dengue depende de combater os mosquitos de modo que sua população seja mantida em níveis suficientemente baixos para reduzir a probabilidade de uma fêmea picar uma pessoa doente e disseminar os vírus (BARATA et al., 2001).

A principal forma de controle do mosquito tem sido a redução populacional via aplicação de inseticidas organofosforados e piretroides, visando a eliminar larvas e adultos respectivamente. Entretanto, muitas das populações de mosquitos, no Brasil e no exterior, vêm demonstrando, há tempos, o desenvolvimento de resistência a esses inseticidas, o que reduz sua eficiência no controle (MACORIS et al., 1995, 1999, 2003; RODRIGUEZ et al., 2001; CARVALHO et al., 2004; LIMA et al., 2006; OCAMPO; WESSON, 2004).

A resistência aos inseticidas está relacionada à capacidade do organismo de metabolizá-los. No caso do *Aedes*, essa capacidade está ligada, pelo menos

parcialmente, a um aumento da taxa de síntese de dois tipos de esterases, as carboxilesterases e as acetilcolinesterases, classificadas com base no seu comportamento perante os inibidores malation e sulfato de eserina (OAKESCHOTT et al., 1993)

Temos ainda que considerar o efeito tóxico dos inseticidas, constatado ao longo dos anos, em relação ao ambiente e aos organismos, inclusive o homem (MARZOCHI, 1994; QUEIROZ et al., 1999).

Assim, a toxicidade dos inseticidas somada ao desenvolvimento de resistência, aumenta a preocupação com relação ao uso dessas substâncias, e hoje se busca obter a participação ativa da população na eliminação dos criadouros do *A. aegypti*, a única forma realmente efetiva de combater o mosquito.

Paralelamente, tem havido uma busca intensa de formas alternativas de controle que eliminem o inseto sem causar danos ao ambiente e ao homem. Tentativas de utilizar mosquitos transgênicos têm falhado devido ao seu baixo valor adaptativo comparativamente aos mosquitos normais, ou por outras causas entre as quais se inclui a necessidade de um número extremamente grande de mosquitos alterados para serem soltos na natureza (OLIVEIRA et al., 2011)

Muitos extratos de diferentes plantas e mesmo substâncias de uso doméstico comum têm sido testadas. Uma dessas substâncias, de efeito demonstrado em estudos laboratoriais, tem sido o uso da cafeína. Esta substância intoxica as larvas causando o bloqueio do seu desenvolvimento e levando-as à morte. Assim, não são produzidos adultos, fase em que se dá a transmissão (LARANJA et al., 2003; GUIRADO, 2008; GUIRADO; BICUDO, 2007; LARANJA; BICUDO, 2006).

1.2. Cafeína no controle de *Aedes aegypti*

A literatura mostra que a cafeína (1, 3, 7 – trimetilxantine) (CAF) é um produto consumido pelo homem há vários séculos, especialmente como bebida. Aparentemente, quase todas as civilizações antigas cultivavam plantas contendo cafeína, acreditando-se também que foi o homem do paleolítico que descobriu as principais fontes dessa substância. Há registros datados de 1600 anos atrás e,

talvez de 4700 anos, de uso do chá na China e do café, de 1000 a 1300 anos atrás, na Etiópia (TIMSON, 1977; GRIFFTHIS; WOODSON, 1988).

Hoje, a cafeína é utilizada não só como bebida, mas também na indústria farmacêutica e na produção de cosméticos. É encontrada como componente nas plantas de café, chá, chocolate, guaraná, e muitas outras.

A cafeína atua antagonizando a ação da adenosina, ligando-se ao seu receptor transmembrana. Como a adenosina age como um neurotransmissor no cérebro e transdutor de sinais em muitos outros tecidos, a ligação da CAF bloqueia sua ação (MARANGOS et al., 1984; FREDHOLM et al., 1999). Esse bloqueio causa excitação e, no homem, causa insônia, que acompanha a ingestão de altas doses de bebidas contendo CAF. Seus efeitos têm sido estudados em laboratório, há várias décadas, especialmente em vertebrados (ALTIMARI et al., 2000). Além dos efeitos estimulantes sobre o sistema nervoso, têm sido constatadas alterações nos processos metabólicos, causando aumento da síntese de substâncias tais como glutamina e uréia e redução da síntese de outras substâncias, como glicina, alanina, serina (WAJDA et al., 1989; GLAJCHEN et al., 1988). Em ratos, constatou-se atraso no desenvolvimento fetal e altas taxas de mortalidade (POLLARD et al., 1987). Efeitos genéticos deletérios também foram descritos como sendo devidos ao efeito da cafeína, incluindo mutações gênicas e aberrações cromossômicas (HANSSON et al., 1982).

Vários trabalhos têm mostrado que a CAF, que é hoje um produto disponível no mercado pelo seu uso freqüente, poderia constituir um bom auxiliar no controle alternativo de *A. aegypti* (LARANJA et al., 2003; GUIRADO, 2008; GUIRADO; BICUDO, 2007; LARANJA; BICUDO, 2006). Em estudos anteriores, realizados com *Drosophila*, a administração de CAF durante o desenvolvimento ocasionou danos reprodutivos, atribuídos a possíveis alterações na gametogênese e oviposição, que levariam à redução do número de descendentes e prolongamento do tempo de desenvolvimento (ITOYAMA; BICUDO, 1992, 2000; ITOYAMA et al., 1997, 1998).

Em *A. aegypti*, o tratamento com CAF durante o desenvolvimento larval mostrou que essa substância bloqueia o desenvolvimento do mosquito na fase

larval, impedindo que seja atingida a fase adulta que é a fase em que se dá a transmissão viral. Desta forma poderia ser usada como um bioinseticida. CAF atua de forma dose dependente (isto é, quanto maior a dose, maior e mais precoce é o efeito), sendo que a concentração de 1 mg/mL de água é letal para as larvas (LARANJA et al., 2003). O uso de doses subletais tem permitido a análise de parâmetros biológicos como produtividade, tempo de desenvolvimento, longevidade e outros. Alguns parâmetros, como tempo de desenvolvimento, mostraram índices aumentados, enquanto outros mostraram índices reduzidos, como a produtividade e a longevidade, mas em geral os efeitos foram deletérios (GUIRADO, 2008; GUIRADO; BICUDO, 2007; LARANJA; BICUDO, 2006).

Além do tratamento com a CAF isolada, a borra de café (o pó usado restante após o preparo da bebida) também se mostrou eficiente quanto aos efeitos deletérios sobre o mosquito. Em tratamentos com concentração acima de 75 mg de borra de café por mL de água, há redução na produção de adultos devido à mortalidade das larvas, e na concentração de 300 mg/mL, a mortalidade larval atingiu 100%. Na borra de café não só a CAF remanescente, mas também outros produtos como tanino, ácidos e potássio podem estar contribuindo para seu efeito. Observa-se também que nos tratamentos com CAF ou borra de café o estágio larval pode alongar-se por um tempo maior que o normal até que a larva morra (LARANJA et al., 2003; GUIRADO; BICUDO, 2007).

1.3. Esterases e seu papel

A variação da atividade esterásica, detectada pela eletroforese, em gel, tem sido uma ferramenta importante no estudo da ação gênica durante o desenvolvimento de vários organismos. Especialmente em *Drosophila*, esses estudos mostraram modificações daquelas enzimas, indicando que a expressão diferencial de seus genes codificadores é parte do programa do desenvolvimento (PASTEUR; KASTRITSIS, 1971; HEALY et al., 1991; KAROTAM; OAKESHOTT, 1993; CAMPBELL et al., 2001; NASCIMENTO; BICUDO, 2006).

As esterases são enzimas presentes em todos os organismos desempenhando múltiplos papéis. A literatura mostra que essas proteínas estão envolvidas em vários processos fisiológicos, incluindo a atividade neuronal (HAREL et al., 2000), o metabolismo do hormônio juvenil (GU; ZERA, 1994) e a resistência aos inseticidas (FEYEREISEN, 1995).

Na atividade neuronal, a acetilcolina é liberada na fenda sináptica, liga-se a receptores transmembrana e gera a transmissão de sinal. Posteriormente, a acetilcolinesterase hidrolisa a acetilcolina cessando o estímulo (POHANKA, 2012).

Outro aspecto importante da ativação das esterases diz respeito ao desenvolvimento de resistência a inseticidas, que tem sido reportada em vários insetos (GUILLEMOUD et al., 1997; HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998; CLAUDIANOS et al., 1999; BLACKMAN et al., 1999; BROGDON et al., 1999). A resistência decorre geralmente de superprodução de carboxilesterases, mais frequentemente devida à amplificação gênica (MOUCHÈS et al., 1990; OAKESHOTT et al., 1993), mas também pode ser devida a um aumento da produção por regulação gênica. As carboxilesterases capturam as moléculas de inseticida antes que atinjam o alvo que é a acetilcolinesterase, essencial na transmissão do impulso nervoso (HAWKES; HEMINGWAY, 2002). A ocorrência de mutação na acetilcolinesterase, tornando-a insensível ao efeito do inseticida, também pode ser causa do desenvolvimento de resistência (MUTERO et al., 1994).

O envolvimento de esterases no desenvolvimento de resistência também foi sugerido em estudos realizados com o gênero *Aedes*. Entre eles constam os estudos do padrão de esterases de populações de *A. aegypti* de São José do Rio Preto, Goiânia e Marília (LIMA-CATELANI et al., 2004; POLEZZI; BICUDO, 2005). Essas populações, à época do desenvolvimento dos estudos, haviam sido classificadas por Macoris et al., 2003, respectivamente, como população com suscetibilidade reduzida, população resistente, e população suscetível aos inseticidas utilizados normalmente para seu controle. Os autores acima mencionados pretendiam à época, associar o grau de resistência das populações de

Aedes com alterações de frequência ou graus de expressão de bandas específicas presentes nos géis de eletroforese. Nos seus estudos foram detectadas algumas diferenças entre essas populações quanto ao padrão de carboxilesterases e colinesterases que são as classes de esterases consideradas envolvidas no desenvolvimento de resistência.

Outros estudos têm relacionado a quantidade de carboxilesterases, presentes no *A. aegypti*, ao desenvolvimento de resistência, a maioria deles utilizando como método a quantificação da carboxilesterase no extrato total do mosquito, que se mostra geralmente aumentada nos mosquitos resistentes (FIELD et al., 1999; GAO et al. 2006).

Outro estudo do padrão de esterases de *A. aegypti* realizado em 11 populações resistentes e suscetíveis mostrou que as bandas EST-1 e EST-4 aparecem com alta frequência na maioria das linhagens classificadas como resistentes. Outras bandas classificadas como $\alpha\beta$ colinesterases foram detectadas nas 11 populações analisadas no estudo, com frequências mais elevadas em quatro das seis populações consideradas resistentes (GUIRADO, 2008).

1.4. Esterases e o hormônio juvenil

O hormônio juvenil (JH) é uma classe de sesquiterpenóides produzidos na *Corpora Allata* com posterior distribuição por toda hemolinfa e estão diretamente envolvidos em várias atividades metabólicas dos insetos como metamorfose e ovogênese. O JH atua durante a metamorfose modulando a atividade da ecdisona (20E) evitando que ocorra a muda durante o estágio larval (SANTOS, 2004).

A esterase do hormônio juvenil (JHE) desempenha um papel fundamental durante o desenvolvimento dos insetos, uma vez que controla a titulação do JH. O JH (sesquiterpenoide) e o 20E (ecdisteroide) são hormônios que regulam a metamorfose e o desenvolvimento dos insetos. Na metamorfose de larva para pupa, o JH é removido da hemolinfa e dos tecidos, em momentos precisos, por dois processos: controle da sua síntese e sua degradação. Duas enzimas JHE são basicamente responsáveis pela degradação do JH: JHE, que metaboliza o JH por hidrólise do metil ester insaturado a JH ácido, enquanto o JHEH hidrata o anel

epóxido, resultando em JH diol. (KAMITA; HAMMOCK, 2010). Além disso, a JHE, mesmo em quantidades muito pequenas é capaz de bloquear a produção de JH pela *Corpora Allata* e promover a hidrólise do JH presente nos depósitos lipofílicos do inseto (HAMMOCK; PHILPOTT, 1992). Devido ao papel crítico das esterases JHE, na regulação do JH, a produção de inibidores sintéticos e a análise de substâncias naturais que interfiram nos mecanismos dessa enzima, são objeto de vários estudos que visam à produção de inseticidas (CUSSON et al. 2013).

Como foi mencionado, a JHE desempenha um papel importante na regulação da quantidade de hormônio juvenil presente no organismo, que é necessário para o desenvolvimento dos insetos. O sequenciamento do genoma de *A. aegypti* (NENE et al., 2007) permitiu identificar 10 sequências supostamente correspondentes a genes *jhe*. Análises dessas supostas sequências mostraram que somente três das 10 sequências, EAT43357, EAT43353 e EAT43354 continham a maioria dos motivos catalíticos conservados, especialmente o motivo catalítico central GQSAG, requerido para a atividade esterásica da JHE (BAI et al., 2007). Campbell et al, 2001, reportaram que a JHE de *D. melanogaster* (DmJHE) e a de lepidópteros continham o motivo catalítico GQSAG em lugar do motivo GESAG que está presente na maioria das outras esterases.

A sequência de aminoácidos correspondente a EAT43357 foi a que mostrou o mais alto grau de similaridade (41,9%) com a sequência de aminoácidos de DmJHE. Esses autores mostraram também que a sequência *jhe* EAT43354 expressou uma proteína que não apresenta atividade de JHE e a sequência EAT43353 não se expressou, o que não permitiu saber se este gene codifica uma JHE funcional (BAI et al., 2007).

JH atua sobre vários tecidos, incluindo ovários, corpo gorduroso e intestino, tornando-os capazes de desempenhar suas funções específicas nos adultos. O aumento nos níveis de JH na hemolinfa, no primeiro dia após a emergência dos adultos, sinaliza o término dos processos de ecdise e estimula o início das atividades reprodutivas, com a maturação dos ovócitos. No entanto, este mecanismo hormonal só ocorre quando há disponibilidade de nutrientes (sangue)

para as fêmeas (CAROCI et al., 2004). Além disso, o nível de JH na hemolinfa de fêmeas de *A. aegypti* está diretamente relacionado com a alimentação sanguínea das mesmas. Os níveis de JH caíram de 2,3 ng de JH por grama de extrato de hemolinfa durante as primeiras 3 horas, para 0,4 ng / g 24 horas após o repasto sanguíneo (SHAPIRO et al, 1986).

2. JUSTIFICATIVA

Com base nesse conjunto de observações e dados da literatura, consideramos que inicialmente um estudo comparativo detalhado do padrão de esterases de amostras de *A. aegypti* tratadas e não tratadas com CAF, poderia confirmar se ocorre o envolvimento dessa substância na síntese ou bloqueio da síntese de esterases. Neste caso, essas enzimas poderiam estar relacionadas ao desenvolvimento do inseto. Essa alteração da síntese das esterases poderia então, ser a causa da morte das larvas tratadas com CAF. Testar essa possibilidade foi também objetivo do presente trabalho.

Do ponto de vista prático do controle, seria suficiente saber que a CAF bloqueia o desenvolvimento larval de *A. aegypti* impedindo assim que a fase adulta seja atingida e as fêmeas possam atuar como vetor viral. Esse conhecimento, que está embasado em várias publicações mencionadas neste texto, associado ao fato de que a CAF está disponível no mercado, já seria suficiente para que se recomendasse a utilização da CAF no controle de *A. aegypti*, talvez distribuindo à população pequenas embalagens contendo um grama de CAF. Além disso, essa substância apresenta a vantagem de ser de uso comum, isto é, a sua introdução no ambiente não constitui novidade uma vez que vem sendo utilizada pelo homem em bebidas há vários séculos.

Do ponto de vista científico, porém, é importante saber como é processado o bloqueio do desenvolvimento do mosquito. Os conhecimentos prévios sugerem a possibilidade de que o bloqueio ocorra pelo controle hormonal. Seria ele efetuado através da síntese de esterases?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi ampliar o conhecimento sobre os efeitos da CAF em *A. aegypti*, realizando um estudo detalhado das variações do padrão de esterases nas diferentes fases do desenvolvimento, sob o efeito dessa substância. A seguir poder-se-ia tentar analisar, mais detalhadamente, as bandas que sofressem alteração de síntese, com o tratamento. Diante dos dados existentes, na literatura, poderíamos testar a hipótese de que a CAF bloqueia o desenvolvimento do *A. aegypti* por interferência na síntese das esterases específicas, relacionadas com a produção dos hormônios controladores desse processo.

3.2. Objetivos Específicos

- 1 – Analisar o padrão das bandas de *A. aegypti* sob efeito da CAF, verificando variações de frequência e grau de expressão.
- 2 – Selecionar entre as bandas que apresentassem variação, as mais favoráveis à extração do gel, visando a utilizá-las para sequenciamento e posterior comparação com sequencias de esterases dos hormônios da muda registrados nos bancos de dados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção e manutenção dos mosquitos em laboratório

Aedes aegypti apresenta desenvolvimento holometábolo, passando pelas fases de ovo, larva (subdividida em L1 a L4), pupa e adulto. No presente trabalho, os mosquitos foram coletados, em São José do Rio Preto, pela Gerência de Vigilância Ambiental da Secretaria da Saúde de São José do Rio Preto - SP, sendo trazidos ao Laboratório de Vetores nas fases de larvas, pupas e adultos. No laboratório, os mosquitos adultos foram separados e transferidos para uma gaiola enquanto, as demais fases foram colocadas em outra gaiola para completar o desenvolvimento.

Na alimentação dos insetos adultos foi utilizada uma solução de açúcar a 0,8% e, para alimentação das fêmeas, sangue de camundongo.

Para coleta de ovos, na gaiola dos adultos foi colocado um copo de vidro contendo água até o meio e no seu interior um anel de papel de filtro medindo cerca de cinco cm de largura e 20 cm de comprimento. O anel foi colocado no limite da água, para servir de substrato para a oviposição.

Após a oviposição, o anel de papel com os ovos aderidos era retirado e colocado em local seco e arejado para secagem. Após aproximadamente cinco dias era etiquetado e armazenado.

4.2. Tratamento dos mosquitos com a CAF e preparo das amostras para eletroforese

Com base nos dados anteriormente obtidos (LARANJA et al., 2003, 2006; GUIRADO; BICUDO, 2010), em estudos do efeito da CAF em *A. aegypti*, foram utilizadas as concentrações 0,25, 0,50 e 0,75 mg/ ml de água, para tratamento desses mosquitos desde a fase de ovo. Para manutenção dos mosquitos, a CAF era

dissolvida em água da torneira, que no IBILCE provém de poço próprio e é analisada, periodicamente, quanto à qualidade.

No decorrer do trabalho foram coletados mosquitos dos experimentos controle e tratados, nos estádios L2/L3, L4, pupa e adulto para preparo de amostras a serem submetidas à eletroforese. Cinco larvas L2/L3 foram utilizadas no preparo de cada amostra em função do tamanho, enquanto para as demais fases foram utilizadas amostras individuais. Ao todo, nesta etapa, foram utilizadas 400 larvas L2/L3, 200 larvas L4, 80 pupas e 80 mosquitos adultos.

4.3. Eletroforese

Na eletroforese para análise da variação dos padrões de esterases em mosquitos tratados com CAF foram preparadas amostras por esmagamento em solução específica (Tampão da amostra: Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 + 10% glicerol) e sua corrida foi realizada em géis de poliacrilamida. Foram utilizados géis de separação a 12% e géis de empilhamento a 4%. Os dois tipos de géis utilizados foram preparados de acordo com os seguintes protocolos, adaptados dos trabalhos de Davis (1964) e Laemmli (1970):

A. Gel de separação (12%):

- Solução de acrilamida/bis-acrilamida: 30g de acrilamida e 0,8g de bisacrilamida dissolvidas em 100 mL de água destilada.

- Tampão B: Tris 1,5M ajustado a pH 8,8 com HCl 6M.

B. Gel de empilhamento (4%):

- Solução α (acrilamida/bis-acrilamida modificada): 15g de acrilamida e 0,8g de bisacrilamida dissolvidas em 50 ml de água destilada.

- Tampão C: Tris 0,5M ajustado a pH 6,8 com HCl 6M.

Para acelerar a polimerização dos géis, foram utilizados o persulfato de amônio e o TEMED.

No preparo do gel de separação a 12% de concentração, foram utilizados água destilada (8,70 mL), solução acrilamida/bis (9,75mL), tampão B (6,15 mL), persulfato de amônia (0,4 mL) e TEMED (25,0 μ l). Essa mistura foi colocada rapidamente entre duas placas de vidro de 19 x 19,5 cm e 16 x 19,5 cm, (altura x

largura) unidas por espaçadores plásticos untados com vaselina sólida em ambos os lados e todo o conjunto foi fixado por prendedores metálicos. A aplicação da mistura foi realizada deixando vazios 2 cm da borda superior das placas, onde foi adicionada uma camada de água destilada. Após aproximadamente 40 minutos, tendo ocorrida a polimerização do gel de separação, foi adicionada a mistura do gel de empilhamento, contendo água destilada (6,0 mL), solução α (1,35 mL), tampão C (2,5 mL), persulfato de amônia (0,15 mL) e TEMED (10,0 μ l). O gel de empilhamento foi aplicado sobre o gel de separação e um pente de acrílico com 20 dentes foi colocado na parte superior da placa para a formação dos poços de aplicação das amostras.

No dia posterior, com os géis já polimerizados, foi retirado o pente acrílico e o espaçador inferior e o conjunto imerso em tampão de corrida (Tris 0,1M pH 8,3) previamente colocado na cuba de eletroforese vertical a ser utilizada. As placas, já na posição vertical, foram presas à cuba por presilhas metálicas e, posteriormente, colocadas as amostras, já homogeneizadas, juntamente com 1 mL de solução tampão de amostra a 10% (Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 + 10% glicerol), em cada um dos poços.

Por fim, um tampão Tris 0,1M pH 8,3 ajustado com glicina foi usado para preencher o compartimento superior e o inferior da cuba e os géis submetidos à eletroforese por quatro horas, a uma voltagem constante de 200 V, à temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$).

Para identificação das esterases, após a eletroforese os géis foram mergulhados por 45 minutos em 50 mL de uma solução aquosa de fosfato de sódio 0,1 M (pH 6.2), à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Após descarte dessa solução, os géis foram mergulhados por uma hora em uma solução de coloração preparada com 50 mL da solução aquosa de fosfato de sódio 0.1 M, 15 mg de β -naftil acetato e 20 mg de α -naftil acetato (como substrato), 60 mg de Fast Blue RR e 5 mL de N-propanol (JOHNSON et al., 1966; STEINER; JOHNSON, 1973). Devido a que as esterases hidrolisam os substratos diferentemente, as bandas no gel coram-se diferentemente: em preto, quando hidrolisam predominantemente o α -naftil acetato, em vermelho, quando hidrolisam

preferencialmente o β -naftil acetato e em magenta quando hidrolisam da mesma forma o α - e o β -naftil acetatos. Decorrido o tempo, a solução de coloração era substituída por 70 mL de uma solução descolorante, composta por ácido acético glacial, álcool etílico e água destilada (100 mL, 250 mL e 650 mL, respectivamente) e deixada agir por 24 horas, no escuro. Os géis de poliacrilamida foram, então, envolvidos em um banho de gelatina incolor a 5% e, depois, em papel celofane, colocados em um bastidor e secos à temperatura ambiente (CERON et al., 1992).

4.4. Análise das bandas

Nesta etapa do trabalho foram analisadas as características: (1) detecção das bandas presentes nos géis; (2) verificação da frequência de expressão das bandas (número de indivíduos que expressaram cada banda) e (3) análise da intensidade de coloração da banda, como correspondendo ao grau de expressão do DNA responsável pela síntese da proteína que a constitui.

Na análise da intensidade de coloração da banda, foram estabelecidos quatro graus denominados +, ++, +++ e ++++.

Essa classificação inicialmente subjetiva foi respaldada pelo uso do sistema computacional *Global Lab Image* (SP0550, DATA TRANSLATION, Inc., MA, USA, 1995). O procedimento, nessa análise, envolve a transformação das cores em tons de branco e preto, sendo a intensidade de cor dada em tons de cinza (*grays*). O programa foi usado para traçar gráficos de perfil, nos quais a ausência de coloração (branco) corresponde ao valor 255 e a intensidade máxima de cor (preta) corresponde ao valor zero, havendo, entre ambos, valores correspondentes aos diferentes tons de cinza. No presente estudo, o eixo horizontal do gráfico de perfil representa a posição das bandas na largura do gel, analisada em pixels, e o eixo vertical representa a intensidade de coloração de cada banda.

4.5. Extração das esterases para análise e sequenciamento

4.5.1. Isolamento das bandas e extração das esterases

No isolamento das bandas visando à extração para sequenciamento dos ácidos aminados foram utilizadas apenas larvas L4 por apresentarem maior quantidade das enzimas, representadas nos géis por bandas de coloração mais intensa. Na corrida eletroforética, para esta finalidade, foi utilizado um pente de acrílico liso para formação de poço único, permitindo melhor aproveitamento do espaço no gel. As demais condições foram as mesmas já descritas.

Para isolamento das bandas esterásicas, os géis foram retirados da placa e duas fitas verticais de aproximadamente 3 cm foram cortadas nos lados direito e esquerdo do gel. As três partes foram incubadas em tampão fosfato de sódio 0.1M (pH 6,2) para lavagem, por 45 minutos. As duas fitas laterais foram removidas do tampão e, para visualização das bandas, foram mergulhadas por uma hora na solução de coloração com α - e β - naftil acetatos (JOHNSON et al., 1966; STEINER; JOHNSON, 1973).

Cada conjunto de amostras foi macerado juntamente com 1 mL de solução tampão de amostra a 10% (Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 + 10% glicerol) e o homogeneizado resultante foi aplicado

Após a coloração, as duas extremidades laterais do gel, eram colocadas sobre uma placa de vidro nas suas respectivas posições, uma em cada lado da parte não corada do gel para orientar a posição de corte no mesmo para isolar as bandas de interesse. A faixa horizontal correspondente às bandas desejadas, indicadas pela sua posição em relação às tiras laterais, era recortada e removida, após o que, as tiras correspondendo às bandas isoladas eram congeladas até que fosse obtida uma quantidade de material considerada adequada.

Posteriormente esse material foi descongelado e macerado em água ultra pura até que as tiras de géis estivessem dissolvidas. A mistura resultante foi então centrifugada por 5 minutos a 5000 RPM para separar os resíduos de gel da parte líquida contendo a proteína.

A parte líquida, parcialmente purificada e com a esterase de interesse, já extraída, era congelada e enviada para o Laboratório de Tecnologia Enzimática da FCFRP-USP, para ser feita a caracterização das bandas, em colaboração com o Prof. Dr. Hamilton Cabral, professor do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, FCFRP-USP.

4.5.2. Número de amostras utilizadas e período de envio

Foram utilizadas apenas larvas no estágio L4 devido a que essa fase do desenvolvimento foi a que apresentou o maior grau de expressão das bandas modificadas por influência do tratamento com CAF. Foi utilizado um total de 2540 larvas L4, divididas em três lotes: o primeiro lote, composto por 600 larvas, foi dividido em grupos de 100 indivíduos, o segundo lote, composto por 500 larvas, foi dividido em grupos de 50 indivíduos, e o terceiro lote, composto por 1440 larvas, foi dividido em grupos de 60 indivíduos.

O primeiro lote de amostras foi obtido durante o segundo semestre de 2012. No mesmo período foram submetidas à eletroforese e as bandas esterásicas de interesse extraídas e congeladas. Posteriormente, o extrato final foi enviado em novembro do mesmo ano para o laboratório mencionado.

O segundo lote foi obtido no primeiro semestre de 2013 e a eletroforese, extração das proteínas de interesse e congelamento ocorreram durante o mesmo período. Por fim, o material final foi enviado em julho para purificação e sequenciamento.

O terceiro lote foi obtido no segundo semestre de 2013 e, após todo processo de extração das proteínas de interesse, o material foi enviado em janeiro de 2014.

Após a separação das bandas correspondentes à β -esterase EST-21, ao conjunto de bandas α -esterásicas, e ao grupo de bandas $\alpha\beta$ -esterásicas (EST-A a EST-D) cuidadosamente recortadas dos géis, o material resultante foi colocado em Becker, macerado com água ultra pura para extração das proteínas e centrifugado para eliminação parcial dos componentes do gel.

4.6. Purificação das esterases

O sequenciamento de proteínas mostra, de forma direta, a expressão de determinados genes. A análise de peptídeos é dividida em etapas: extração, separação, quantificação e, por último, identificação. Na separação dos fragmentos proteicos são utilizados, geralmente, géis desnaturantes ou cromatografia líquida. A caracterização dos fragmentos proteicos é feita através da espectrometria de massas. As análises podem ser realizadas a partir de íons de peptídeos intactos (espectrometria de massa) ou de peptídeos fragmentados (espectrometria de massa em tandem). Os dados obtidos são então confrontados com bancos de dados para a identificação das proteínas (SALVATO; CARVALHO, 2010).

No entanto, muitas proteínas não têm sido diretamente sequenciadas, mas sua sequência de aminoácidos é conhecida por meio de uma simulação computacional da tradução do mRNA ou do gene conhecido (SEHRA, 2012). Isto tem ocorrido também com as esterases do desenvolvimento.

Outra técnica envolve o estudo dos perfis de mRNA da proteína de interesse, já conhecidos. Podem ser medidos durante o desenvolvimento do organismo utilizando PCR e, o respectivo cDNA, expresso em bactérias recombinantes. Posteriormente essa proteína pode ser caracterizada e avaliada quanto à sua funcionalidade (BAI et al., 2007). Estão disponíveis na internet muitas sequências possíveis de aminoácidos de JHE, mas a maioria foi obtida de forma indireta. Para análise direta das sequências de aminoácidos, do presente trabalho, foi indicada a técnica cromatográfica utilizada no Laboratório de Tecnologia Enzimática da FCFRP-USP.

4.6.1. Cromatografias de troca iônica e exclusão de massa molecular

O comportamento de proteínas em processos cromatográficos não é previsível, assim cada proteína exige um protocolo específico a ser adotado. Processos cromatográficos foram empregados visando a obter as peptidases na sua forma homogênea. Basicamente foram adotados procedimentos alternados ou sequenciais de cromatografia de exclusão de massa molecular e troca iônica, buscando um efetivo isolamento das peptidases.

Os materiais solubilizados foram submetidos à cromatografia de troca iônica para o isolamento das peptidases. Foram utilizadas resinas catiônicas e/ou aniônicas (GE Healthcare), dependendo das características das peptidases. As resinas foram empacotadas em colunas apropriadas para cromatografia de troca iônica (GE Healthcare).

Após a aplicação da amostra pela coluna, a resina foi lavada com tampão de equilíbrio sem NaCl, para remoção do material não ligado. Em seguida foi iniciado um gradiente salino preparado no mesmo tampão, porém com variação de 0 a 1M de NaCl, e para a limpeza da resina foi realizada a lavagem com 2M de NaCl.

As cromatografias de exclusão de massa molecular foram realizadas utilizando as resinas Sephadex G-50 e/ou G-75 média e/ou Sephacril SH-100 e/ou Superdex 75 (GE Healthcare). As resinas foram empacotadas em colunas apropriadas para a realização da cromatografia de exclusão de massa molecular. A eluição das proteínas foi realizada com tampão e pH apropriados, com adição de NaCl variando de 50 a 150mM de NaCl, dependendo do tipo de resina utilizada.

Todo o procedimento de purificação foi realizado em ambiente refrigerado a 4 °C. A manutenção do fluxo de aplicação e eluição das amostras foram mantidas com auxílio de bomba peristáltica e as frações foram coletadas com auxílio de coletor de frações.

4.6.2. Sequenciamento da região N-terminal da peptidase

No período deste trabalho não foi possível completar o sequenciamento da região N-terminal das proteínas em estudo, no entanto, descrevemos a técnica que normalmente é utilizada.

Nesse processo, a sequência da região aminoterminal das peptidases é determinada, pelo uso do sequenciador de proteínas PPSQ-33A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) e a sequência é obtida pelo método de degradação de Edman (EDMAN e BEGG, 1967), que consiste em três etapas: acoplamento, clivagem e conversão. O aminoácido derivado da reação com PITC é convertido a PTH-aminoácido que é então cromatograficamente separado em RP-HPLC. A quantificação e identificação das amostras são realizadas por meio da comparação com padrão analisado no início de cada sequenciamento. O número de resíduos a serem analisados varia de acordo com a quantidade de proteína pura obtida. Se essa quantidade de proteína for adequada (10µg/ml), poderão ser analisados algo em torno de 40 resíduos.

4.7. Análise das sequencias de aminoácidos visando ao reconhecimento das proteínas

Após obtidas as sequências de aminoácidos referentes à região N-terminal das enzimas em estudo, as mesmas deveriam ser comparadas com as sequências já obtidas em outros trabalhos, para o JH, utilizando-se o banco de dados FASTA (<http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta/cgi/searchx.cgi?pgm=fs>).

5. RESULTADOS

5.1. Padrão geral de bandas de *A. aegypti*

O padrão de esterases de *A. aegypti* procedentes de São José do Rio Preto - SP, já era conhecido, uma vez que essa característica vem sendo analisada no Laboratório de Vetores deste Instituto desde 1998. Desses estudos resultaram as publicações de Lima-Catelani et al, 2004, Sousa-Polezzi e Bicudo, 2005, e Guirado, 2008.

Os padrões de esterases, observados nas diferentes análises, ao longo do tempo, estão mostrados no diagrama da Figura 1, no qual esses padrões são representados por linhas de espessura variável, em função do grau de expressão das bandas. As linhas de cor vermelha, preta ou magenta, correspondem às β -, α -, ou $\alpha\beta$ -esterases, respectivamente.

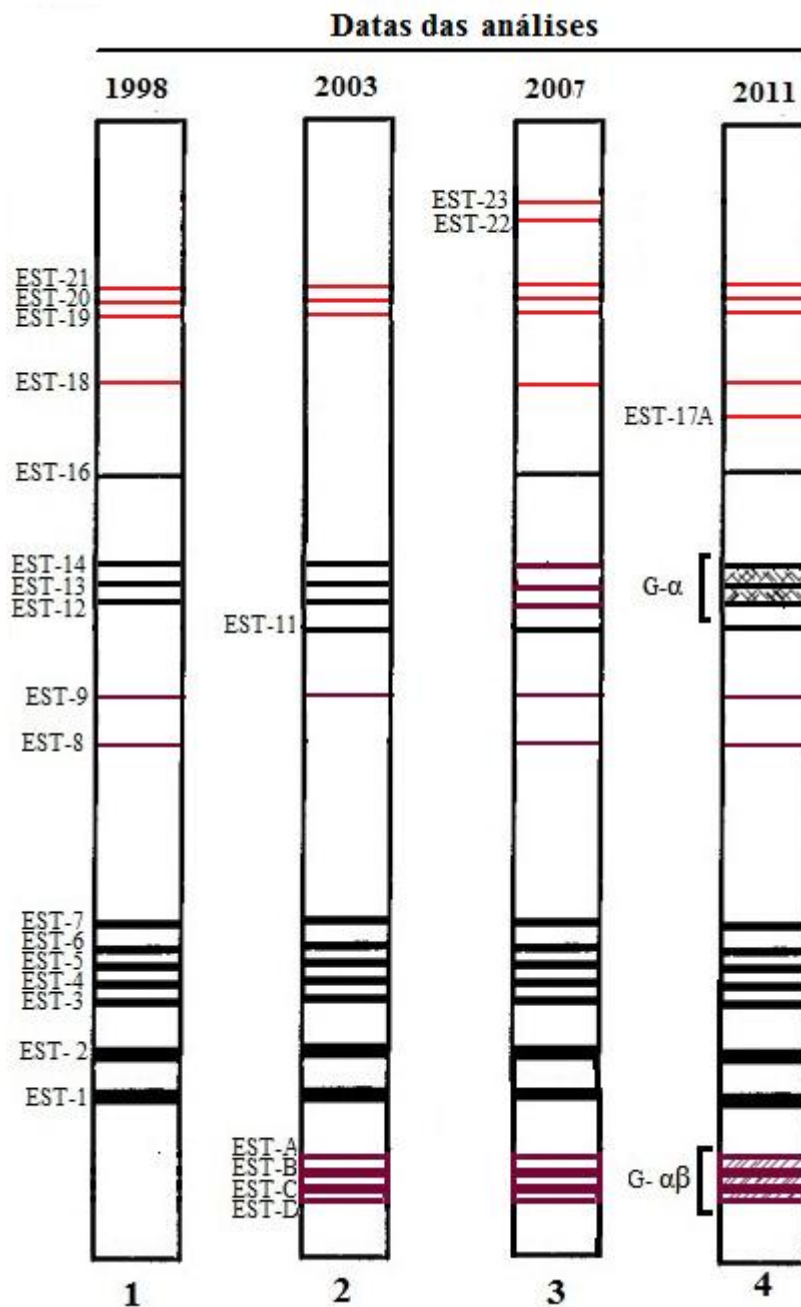


Figura 1. Padrões de bandas esterásicas de *Aedes aegypti* observados em larvas L4 de São José do Rio Preto, em diferentes trabalhos ao longo do tempo. Acima da figura estão as datas das análises cujos autores, na sequência das publicações, foram: **1**-LIMA-CATELANI et al, 2004; **2**-SOUSA-POLEZZI e BICUDO, 2005; **3**-GUIRADO e BICUDO, 2008; **4**- presente trabalho. Bandas pretas = α -esterases; vermelhas = β -esterases e roxas = $\alpha\beta$ -esterases.

5.2. O padrão de bandas esterásicas da população de São José do Rio Preto

Na sequência das datas de análise, o número de bandas encontradas foi 20, 19, 24 e 23, respectivamente. A Figura 1, mostra em gráfico, as presenças e ausências de bandas responsáveis por essa variação numérica.

A diferença numérica é devida à variação na detecção das seguintes bandas, mencionadas na sequência da região menos anódica para a mais anódica do gel.

- conjunto de bandas β -esterases EST-17A, EST-18, EST-22 e EST-23
- banda α - EST-16;
- banda $\alpha\beta$ - EST-8;
- grupo de bandas $\alpha\beta$ - esterases (EST-A a EST-D).

As últimas bandas merecem uma referência especial. Essas bandas foram observadas a partir da segunda análise (SOUSA-POLEZZI; BICUDO, 2005).

Elas não foram encontradas na primeira análise de 162 larvas (LIMA-CATELANI et al, 2004). Na segunda análise, essas bandas foram detectadas com baixa frequência (13,8%). No terceiro estudo (GUIRADO, 2008), a frequência aumentou para 52% e, na presente análise, para 69,5%.

No tempo decorrido desde 1998, a população de *A. aegypti* de São José do Rio Preto foi diferentemente classificada pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) quanto à resistência a inseticidas: primeiramente, como população suscetível (MACORIS et al., 1995) depois como população em desenvolvimento de resistência (MACORIS et al., 1999) e, a partir da terceira análise, como população resistente (MACORIS et al., 2003). Isto ocorreu em paralelo com as alterações da frequência de expressão das bandas $\alpha\beta$. Essas observações levaram os autores precedentes a associar a variação de frequência com o desenvolvimento de resistência. É possível que o aumento da frequência verificado entre a análise realizada em 2007, e a presente, reflita o aumento do grau de resistência decorrido neste tempo.

Outro aspecto que reforça a ideia de considerar este grupo de bandas $\alpha\beta$ como possivelmente relacionado à resistência é que, no segundo estudo (2003), no qual as bandas $\alpha\beta$ estavam presentes com baixa frequência em São José do Rio

Preto, outra população (de Goiânia), simultaneamente analisada e classificada por Macoris et al., 1999, como resistente, apresentou alta frequência dessas bandas (65% a 87%).

No presente estudo não foi possível visualizar separadamente as bandas $\alpha\beta$ -esterásicas por estarem muito próximas nos géis, e assim foram analisadas como um grupo único. Duzentas larvas L4 foram utilizadas nesta análise, sendo desconsiderado o tratamento com cafeína, uma vez que essa substância não interfere na expressão destas enzimas. Na Tabela 1 constam as frequências desse conjunto de bandas, nas diferentes classes de expressão, totalizando 69,5%.

5.3. Avaliação do grau de expressão das esterases

Para ilustrar a avaliação do grau de expressão feita pelo programa *Global Lab Image* é mostrado um gráfico de perfil para as variações das bandas $\alpha\beta$ -esterases (Figura 2). Nele, os “vales” mais profundos correspondem às bandas mais coradas (++++ e +++) e os mais rasos, correspondem às bandas mais claras (++ e +). Nesta figura, que é apenas ilustrativa da técnica, estão representadas bandas de larvas L3, L4 e pupas.

5.4. Variação da expressão das bandas sob o efeito da CAF

Na detecção das bandas presentes nos géis e sua variação sob efeito da CAF foram utilizadas inicialmente as larvas L2/L3, L4, pupas e adultos de *A. aegypti*. Esses mosquitos foram tratados com CAF nas concentrações 0,25, 0,50 e 0,75 mg/mL de água. Porém, devido ao maior número de bandas que podem ser observadas nos géis de poliacrilamida preparados com a fase larval L4, optou-se por utilizar, principalmente, os dados obtidos nessa fase. Por outro lado, utilizou-se predominantemente, nas análises, a maior concentração de CAF (0,75mg/mL) devido ao efeito mais acentuado sobre as bandas, que facilita a observação das diferenças de padrão.

Na Figura 3 são mostrados os padrões de bandas de larvas L4 controle e tratadas nas diferentes concentrações de CAF. No total foram obtidas 23 bandas, das quais apenas EST-11 não está representada. Entre essas bandas incluem-se as que sofreram alteração com o tratamento com CAF.

O efeito da CAF foi analisado em 10 géis, contendo amostras individuais de larvas L4 tratadas e controle, correspondendo a um número total de 200 larvas. A comparação dos dois grupos experimentais não mostrou diferença no que se refere à alteração do número de bandas. A intensidade de coloração, porém, sofreu alteração visível em dois conjuntos de bandas, um deles sendo formado por bandas β -esterásicas e o outro, por bandas α -esterásicas.

Cinco bandas compõem o conjunto β -esterásico, localizado na região proximal do gel em relação à origem das amostras, sendo 4 anteriormente descritas e nomeadas EST-18 a EST-21 por Lima-Catelani et al, 2004, e uma banda aparentemente nova à qual denominamos EST-17A para diferenciá-la da EST-17 detectada pelos mesmos autores em *A. albopictus*.

O conjunto α -esterásico, que se localiza próximo à região mediana do gel, é formado por um número de bandas cuja individualização não foi possível devido à sua grande proximidade. Possivelmente compõe-se de três bandas que foram também denominadas, pela mesma autora, como EST-12 a EST-14 (Figura 3). Nesta figura é mostrada também a variação de expressão das bandas causada pelas três concentrações de CAF.

Tabela 1. Número (N) e percentual de larvas L4 de *Aedes aegypti* que expressaram o grupo de bandas $\alpha\beta$ -esterásicas nas quatro classes estabelecidas para a intensidade de coloração (+ a ++++), média (X) e desvio padrão (D.P) do valor em “tons de cinza” para cada classe.

Banda	Classes	N / %	X	D.P.
Grupo $\alpha\beta$	+	43 / 21,5%	193,4	8,7
	++	42 / 21%	167,9	7,6
	+++	27 / 13,5%	124,2	14
	++++	27 / 13,5%	72,3	25,9
Ausência	.	61 / 30,5%	.	.
Total	.	200/100%	.	.

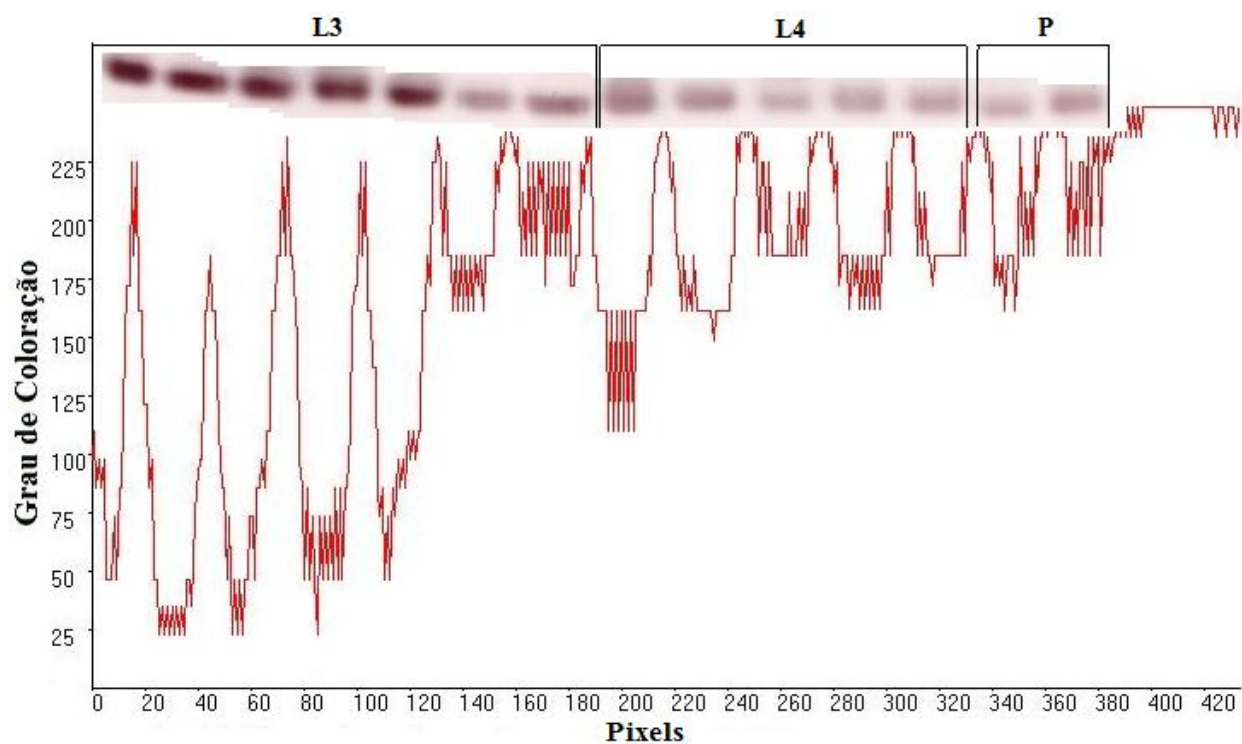


Figura 2. Gráfico de perfil obtido com o programa *Global Lab Image* para cada amostra presente na faixa horizontal, contendo o grupo de bandas $\alpha\beta$ -esterásicas mostrando as variações dos tons de cinza, ao longo do desenvolvimento de L3 a pupa (P) de *Aedes aegypti*. As bandas 1 a 5 representam a classe de maior expressão.

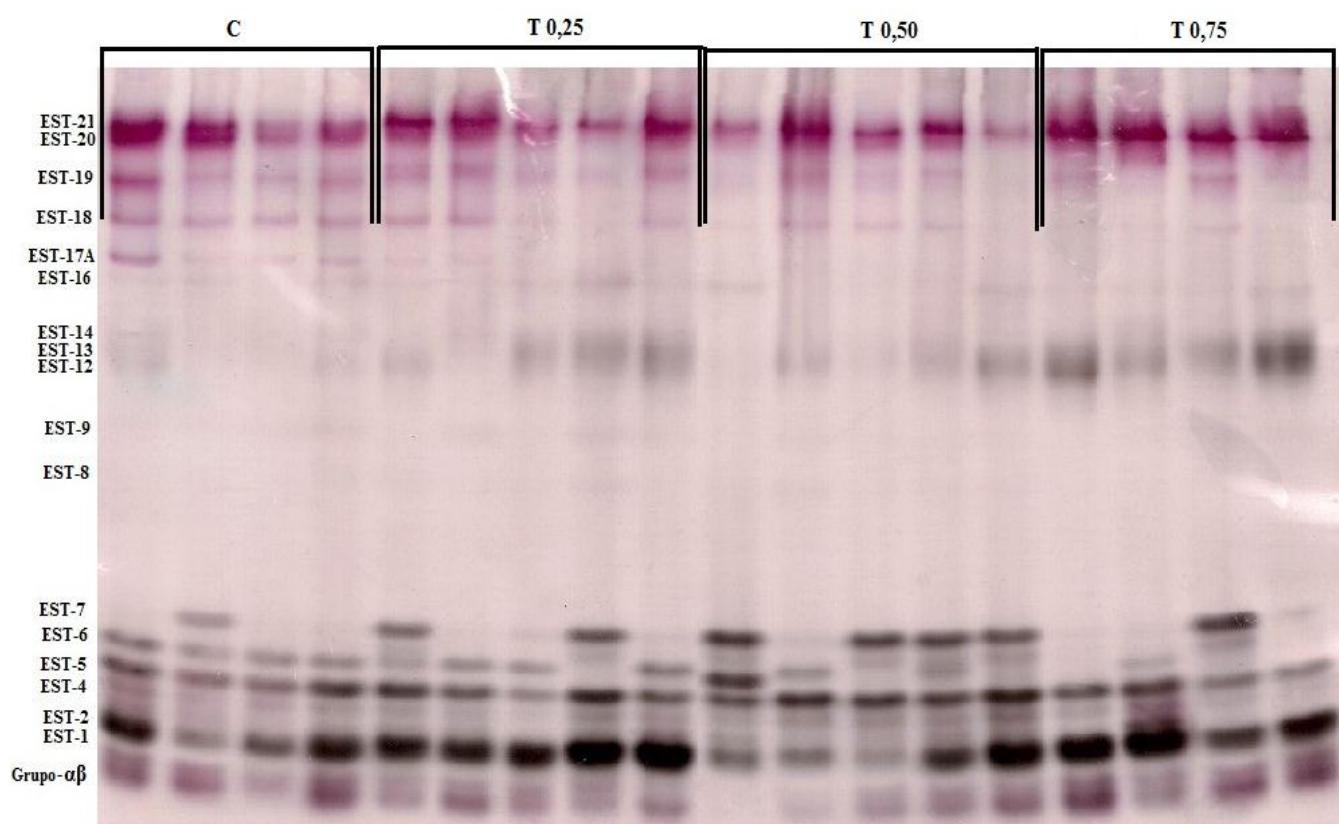


Figura 3. Padrão de esterases de larvas L4 de *Aedes aegypti* obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida, nos experimentos controle (C) e tratados (T) com 0,25, 0,50 e 0,75 mg de cafeína por mL.

5.5. Análise da intensidade de coloração das bandas β – esterásicas

Os dados referentes a estas bandas foram obtidos pela análise de 38 larvas L4 do experimento controle e 40 do tratado. (Tabela 2 e Figuras 4 e 5).

Na tabela 2 constam o número e a porcentagem de mosquitos incluídos nas diferentes classes ou graus de expressão para cada banda, nos grupos experimentais controle e tratado. As figuras 4 e 5 mostram a distribuição da variação das porcentagens conforme descrito nesta tabela.

Observou-se a seguinte variação:

Classe (+): No controle predominam, nesta classe, as bandas EST-17A, EST-18 e EST-19, enquanto no tratado, predomina a banda EST-19. Os mosquitos obtidos no experimento controle não expressaram a banda EST-20.

Classe (++) : Todas as bandas das larvas controle apresentaram este nível de expressão, enquanto as do tratado não mostraram, neste nível, a banda EST-17A. As bandas EST-18, EST-19 e EST-21 do controle expressaram-se mais fortemente do que as do tratado. Observa-se ainda a maior frequência da banda EST-20 no experimento tratado.

Classe (+++) : A partir desta classe há uma mudança na frequência das bandas, com representação maior de EST-19 e EST-20 no controle e ausência de EST-17A no tratado e ausência de EST-18 em ambos os experimentos. A banda EST-21 expressa-se com frequências muito próximas nos dois experimentos.

Classe (++++): Nesta classe ocorreram, nos mosquitos tratados, apenas as bandas EST-20 e EST-21, com aumento considerável da EST-21 em relação ao controle. Os mosquitos controle apresentaram ainda representantes para a banda EST-19.

A Figura 5 apresenta o gráfico de distribuição da soma das frequências de presença de cada banda β -esterásica independente do grau de expressão, nos experimentos controle e tratado. A distribuição mostra, para o grupo tratado em relação ao controle, redução do grau de expressão das bandas EST-17A, EST-18, EST-19 e EST-20 e leve aumento na frequência da banda EST-21.

As Figuras 6 e 7 mostram o gráfico de perfil correspondente à variação de intensidade de coloração para as bandas EST-18 e EST-19, respectivamente, conforme foram apresentadas no gel da Figura 3.

5.6. Análise da intensidade de coloração do conjunto de bandas α -esterásicas

Na análise do conjunto de bandas α -esterásicas foram utilizadas 49 larvas L4, tanto no experimento controle como no tratado (Tabela 2, Figura 8).

Os dados mostraram que a frequência do conjunto de bandas α -esterásicas no controle, é maior na classe de menor expressão (+) e decresce em direção às classes de maior expressão (++++). No experimento tratado ocorre o inverso. Quando se observam os indivíduos que não expressaram o conjunto de bandas, o controle mostrou uma porcentagem aproximadamente quatro vezes maior em relação ao tratado.

O gráfico de perfil da Figura 9 refere-se à avaliação da intensidade de coloração das bandas α -esterásicas, apresentadas na Figura 3.

Tabela 2. Número (N) e percentual de larvas L4 de *Aedes aegypti* que expressaram as bandas α - e β - esterásicas nos quatro graus estabelecidos para a intensidade de coloração (+ a ++++). **C** = controle, **T** = tratado com cafeína a 0,75 mg/mL.

Experimento	Grau de coloração	Bandas β -esterásicas					Conjunto
		EST-17A	EST-18	EST-19	EST-20	EST-21	α -esterásico
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	EST-12 a 14 N (%)
C	+	8(21,0)	11(28,9)	12(31,7)	-	4(10,6)	17(34,7)
	++	5(13,2)	7(18,4)	12(31,7)	5(13,2)	10(26,3)	9(18,4)
	+++	4(10,5)	-	5(13,3)	7(18,4)	8(21,0)	9(18,4)
	++++	-	-	3(7,9)	13(34,2)	14(36,8)	1(2,0)
	Total	17(44,7)	18(47,3)	32(84,2)	25(65,8)	36(94,7)	36(73,5)
	Ausentes	21(55,3)	20(52,7)	6(15,8)	13(34,2)	2(5,3)	13(26,5)
T	+	1(2,5)	6(15,0)	13(32,5)	2(5,0)	3(7,5)	3(6,1)
	++	-	3(7,5)	8(20,0)	7(17,5)	5(12,5)	5(10,2)
	+++	-	-	1(2,5)	6(15,0)	8(20,0)	21(45,9)
	++++	-	-	-	8(20,0)	24(60,0)	17(34,7)
	Total	1(2,5)	9(24,5)	22(55,0)	23(57,5)	40(100,0)	46(93,9)
	Ausentes	39(97,5)	31(75,5)	18(45,0)	17(42,5)	-	3(6,1)

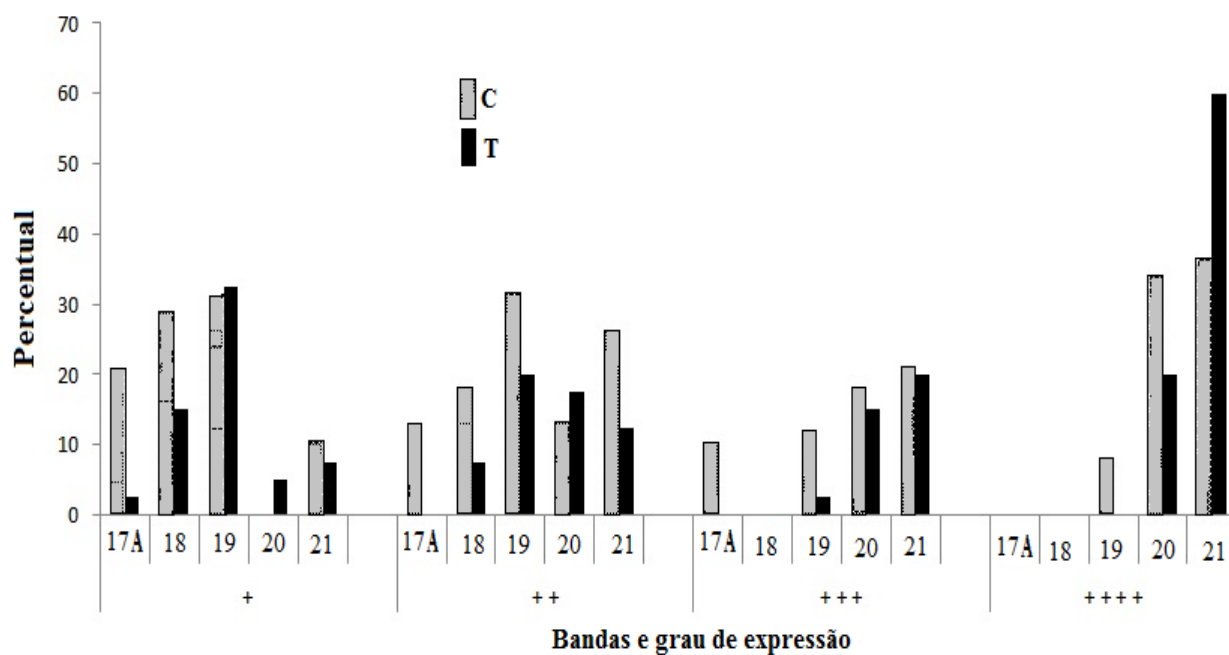


Figura 4. Gráfico de distribuição das porcentagens de larvas L4 de *Aedes aegypti* que expressaram as bandas β-esterásicas (EST-17A a EST-21) nas quatro classes de intensidade de coloração estabelecidas (+ a ++++). C = experimentos controle; T= experimentos tratados com 0,75 mg/ml de cafeína.

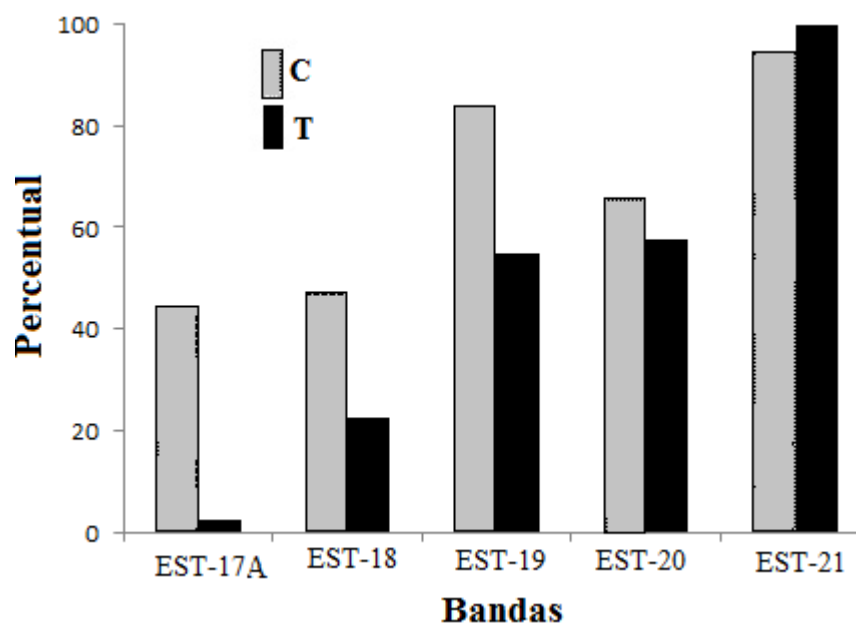


Figura 5. Gráfico de distribuição das porcentagens de larvas L4 de *Aedes aegypti* que expressaram cada banda do conjunto de β-esterases (EST-17A a EST-21) independente do grau de expressão. **C** = experimentos controle; **T** = experimentos tratados com cafeína a 0,75 mg/mL.

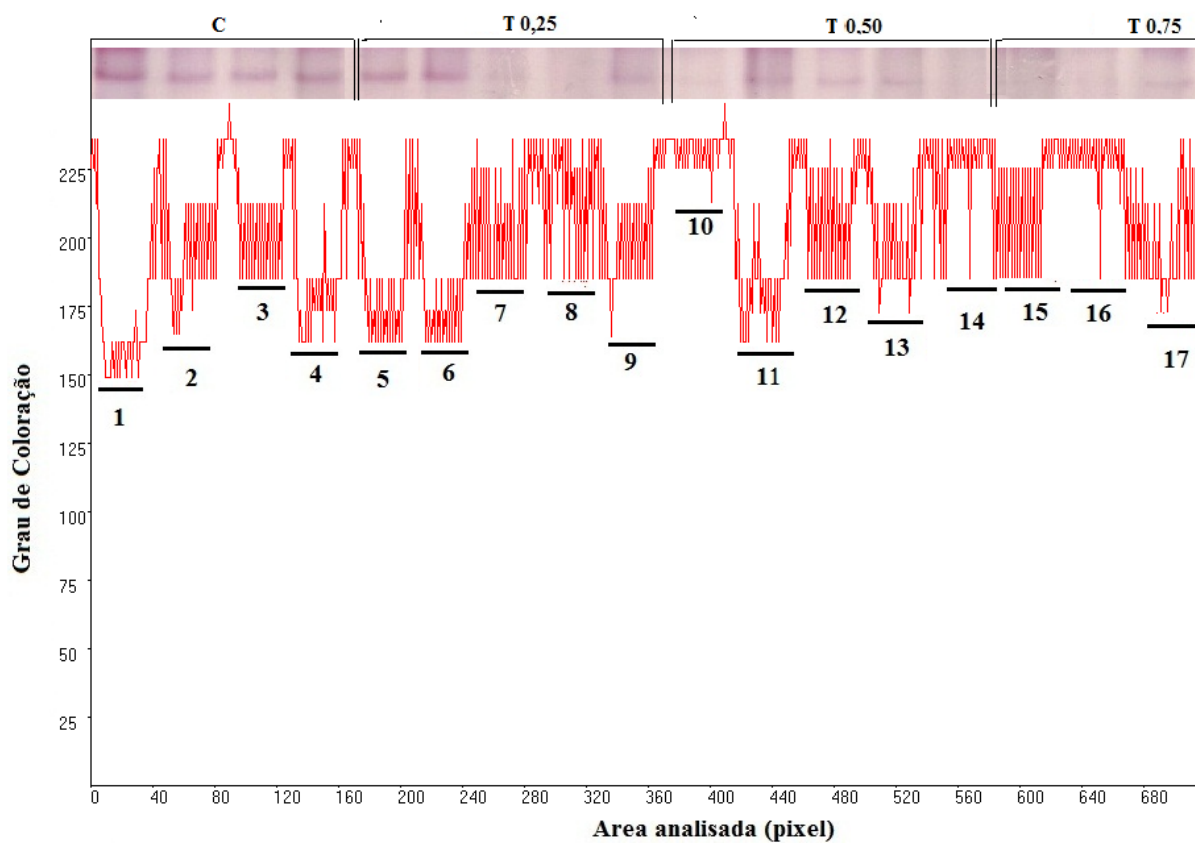


Figura 6. Gráfico de perfil obtido com o programa *Global Lab Image* a partir da faixa horizontal do gel correspondente à banda β -esterásica EST-18 de *Aedes aegypti* conforme variou com o tratamento com cafeína. Colunas 1 a 4 = experimento controle; 5 a 17 = tratamentos com concentrações crescentes de cafeína (0,25, 0,50 e 0,75 mg/mL).

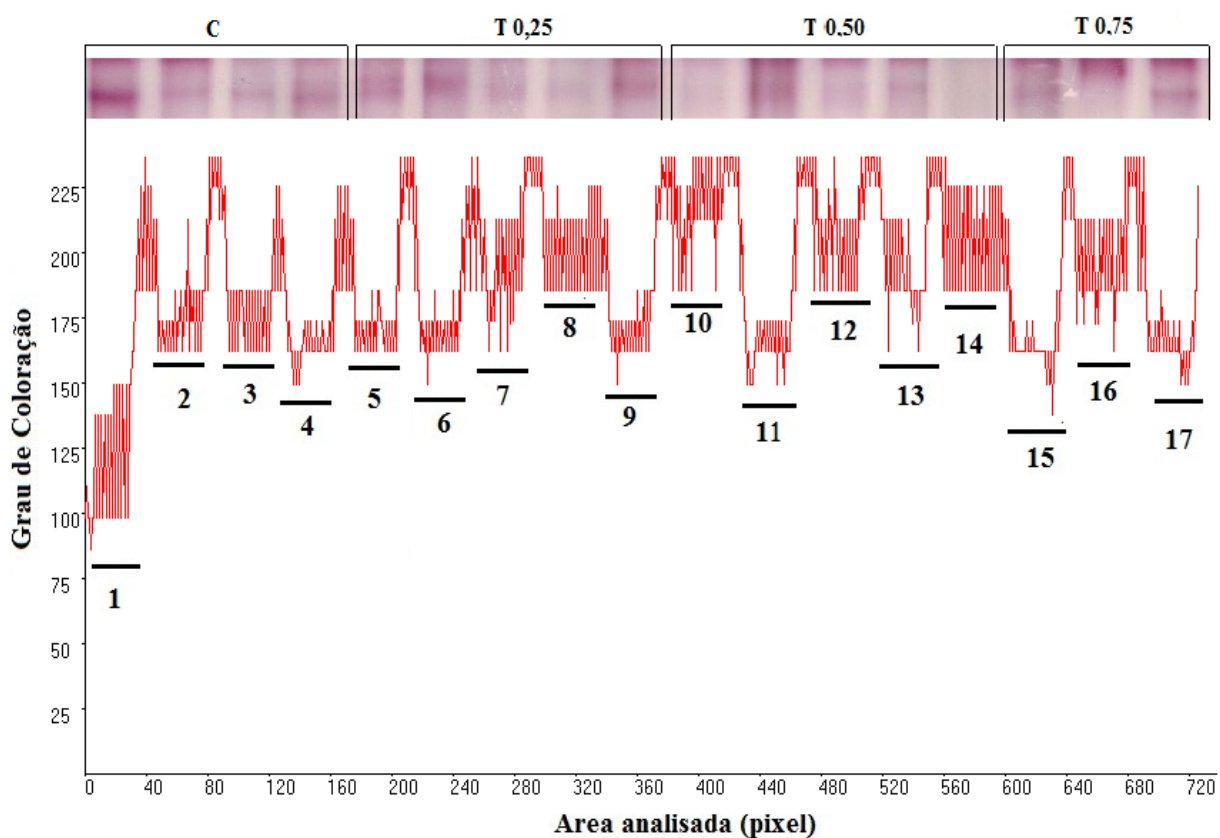


Figura 7. Gráfico de perfil obtido com o programa *Global Lab Image* a partir da faixa horizontal do gel correspondente à banda β -esterásica EST-19 de *Aedes aegypti* conforme variou com o tratamento com cafeína. Colunas 1 a 4 = experimento controle; 5 a 17 = tratamentos com concentrações crescentes de cafeína (0,25, 0,50 e 0,75 mg/mL).

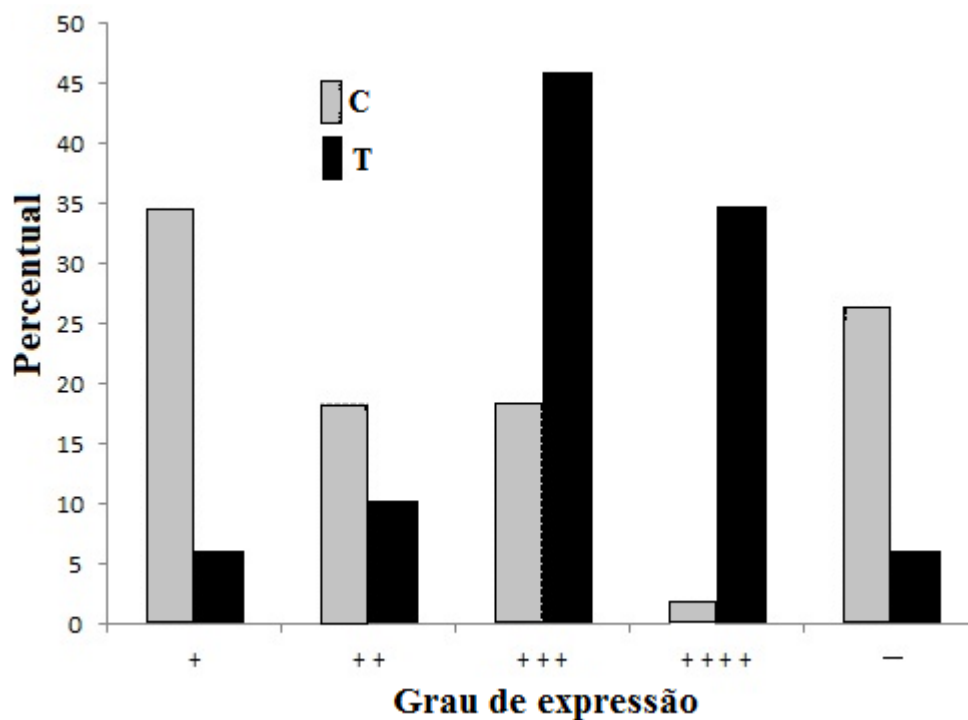


Figura 8. Gráfico de distribuição das porcentagens de larvas L4 de *Aedes aegypti* que expressaram o conjunto de bandas α -esterásicas (EST-12 a EST-14) não individualizadas, nos quatro graus estabelecidos (+ a ++++) C = experimentos controle; T = experimentos tratados com cafeína a 0,75 mg/mL; - = ausência de expressão.

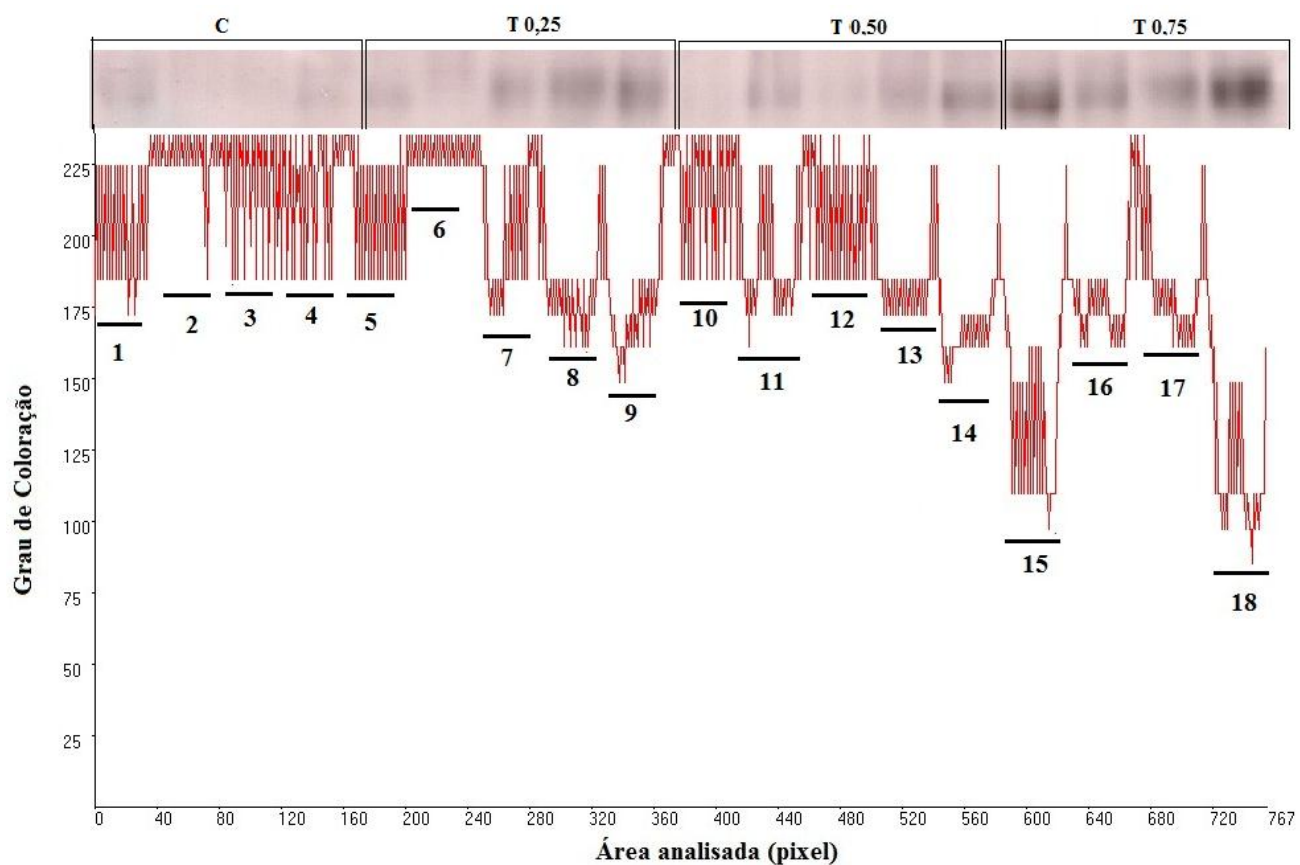


Figura 9. Gráfico de perfil obtido com o programa *Global Lab Image* a partir da faixa horizontal do gel correspondente ao grupo de bandas α -esterásicas de *Aedes aegypti* conforme variou com o tratamento com cafeína. Colunas 1 a 4 = experimento controle; 5 a 17 = tratamentos com concentrações crescentes de cafeína (0,25, 0,50 e 0,75 mg/mL).

5.7. Resultados parciais da purificação e extração de esterases de interesse

As bandas esterásicas de interesse, após serem separadas do gel e parcialmente purificadas, foram enviadas ao Laboratório de Tecnologia Enzimática para continuidade do processo, em três lotes totalizando 2540 amostras.

A purificação fina das amostras do primeiro lote foi finalizada em janeiro de 2013, tendo-se considerado a quantidade de proteínas insuficiente para o sequenciamento. Nosso colaborador armazenou as proteínas já purificadas e nos instruiu a mandar mais amostras.

As amostras do segundo lote foram purificadas em setembro de 2013 e a quantidade de proteínas mostrou-se novamente insuficiente para o sequenciamento, mesmo somada às amostras já armazenadas. Os extratos proteicos foram novamente armazenados.

O processamento do terceiro lote foi finalizado em abril de 2014 e, novamente, a quantidade de proteínas não foi suficiente para análise e sequenciamento.

As Figuras 10, 11 e 12 mostram, em gráficos, exemplos dos cromatogramas referentes respectivamente, à banda β -esterásica EST-21, ao conjunto α -esterásico e ao conjunto de bandas $\alpha\beta$ -esterásicas (EST-A a EST-D), correspondentes às amostras enviadas. Nesses cromatogramas aparece o pico representativo da proteína dominante que é seria utilizada para sequenciamento.

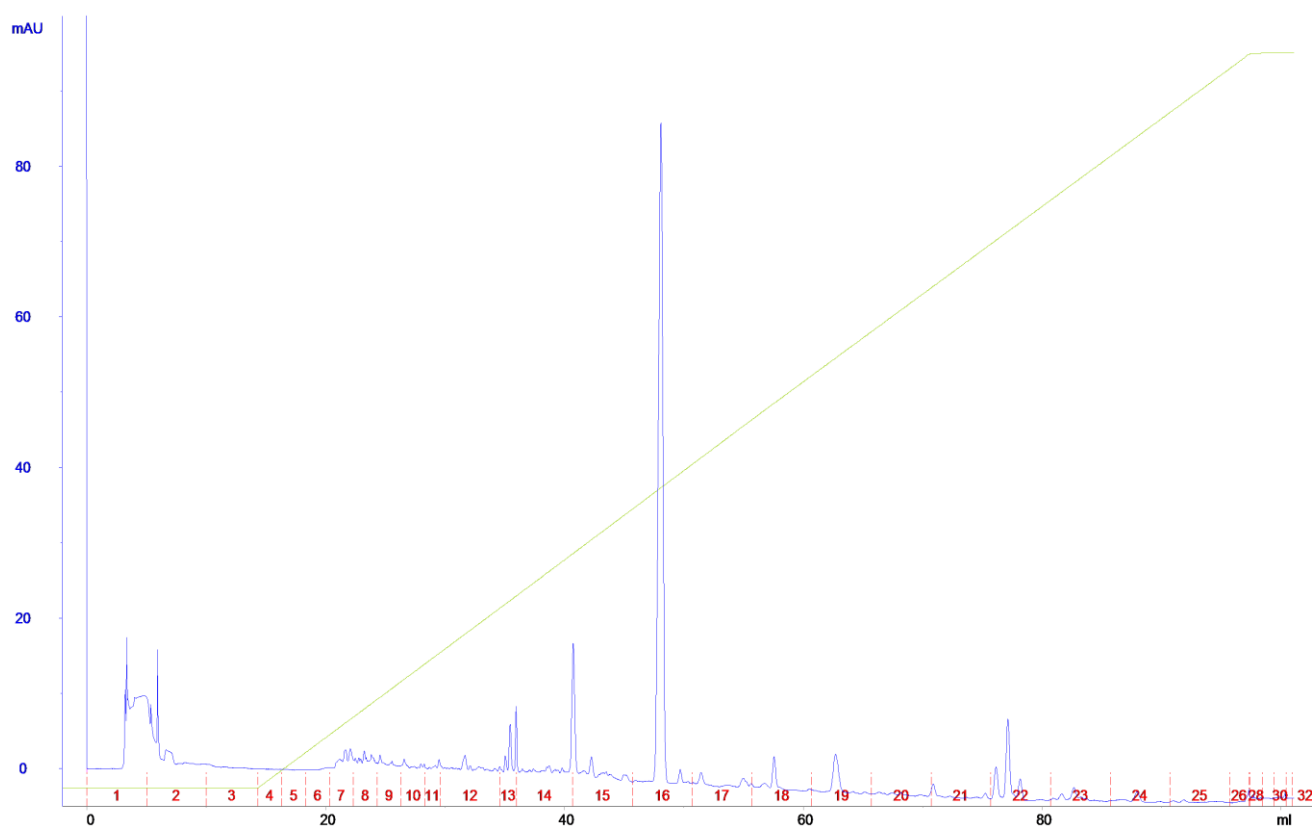


Figura 10. Análise cromatográfica do extrato proteico da banda β -esterásica EST-21. O maior pico corresponde à proteína predominante na banda.

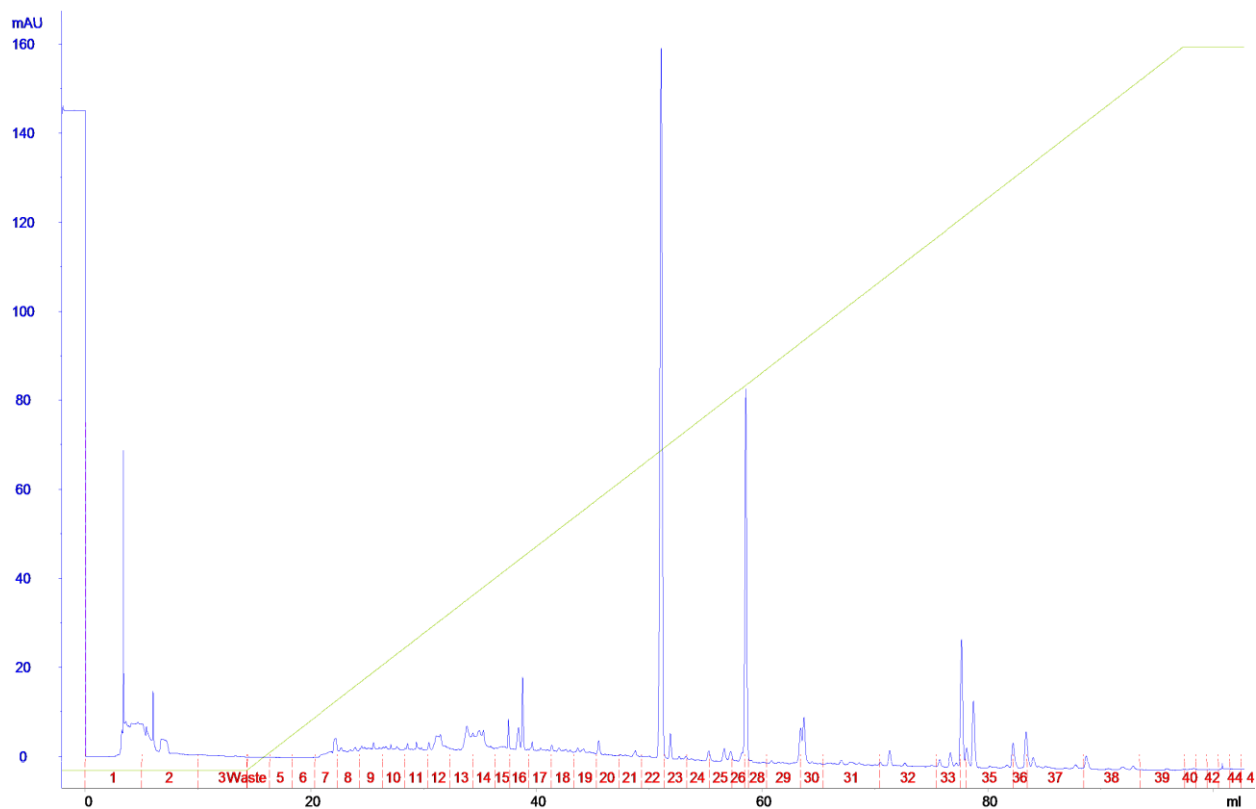


Figura 11. Análise cromatográfica do extrato proteico do conjunto de bandas α -esterásicas. O maior pico corresponde à proteica predominante na banda.

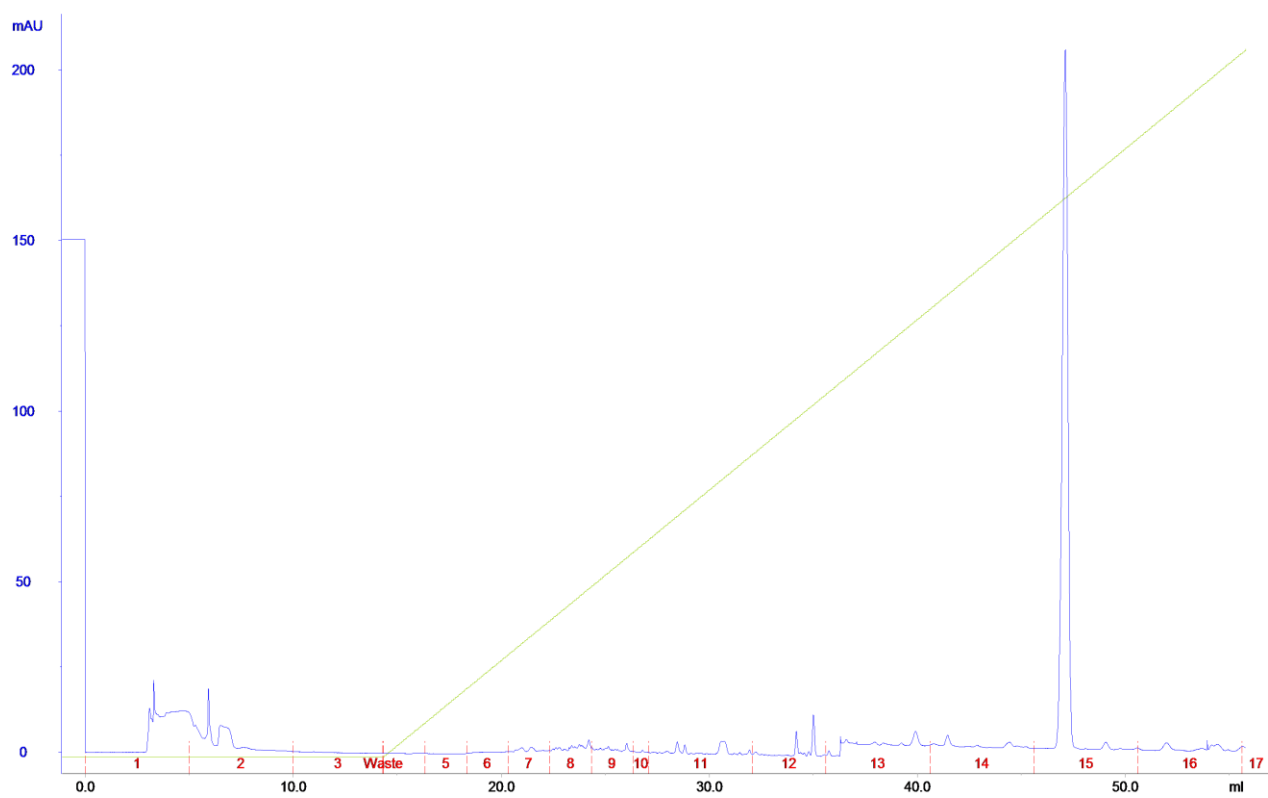


Figura 12. Análise cromatográfica do extrato proteico do grupo de bandas $\alpha\beta$ -esterásicas (EST-A a EST-D). O maior pico corresponde à proteica predominante na banda.

6. DISCUSSÃO

Devido ao fato de *A. aegypti* ser transmissor de doenças humanas graves, como é o caso da dengue, da dengue hemorrágica e da febre amarela, é importante que se estude, em detalhes, a biologia desse organismo e as respostas de seu metabolismo às mudanças do meio ambiente. Conhecimentos mais profundos podem propiciar a descoberta de novas formas de controle que venham a diminuir ou mesmo eliminar o uso intensivo de inseticidas. O problema torna-se ainda mais grave considerando-se que hoje nós encontramos sob a possibilidade de transmissão, na América do Sul, pelo mesmo vetor, do vírus CHIKV que causa febre do Chikungunya, também ainda sem vacina (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2010).

No presente trabalho, pretendeu-se analisar mais profundamente as variações do padrão de esterases sob efeito do tratamento com CAF e, eventualmente, relacionar essas variações com o bloqueio do desenvolvimento. As bases para esse objetivo foram o conhecimento de que esterases estão envolvidas no controle da mudança de estágio em insetos holometábolos, sendo denominadas esterases do hormônio juvenil (TRUMAN; RIDDIFORD, 2007) e o fato de que a CAF bloqueia o desenvolvimento na fase larval do *A. aegypti*. Assim, a pergunta que se coloca pretende saber se as esterases alteradas sob efeito da CAF seriam esterases do desenvolvimento ou estariam, de alguma forma, relacionadas a elas.

Estudamos as variações do padrão de esterases (1) quanto à presença ou ausência da esterase (frequência de indivíduos portadores) e, (2) nos indivíduos em que a enzima é produzida, quanto à existência de variações na intensidade de expressão. Esta última baseou-se no grau de coloração das bandas tratadas com α - e β - naftil acetatos. Estudos considerando a relação entre grau de coloração e intensidade de expressão gênica foram anteriormente realizados em outras espécies, incluindo a *Drosophila* (NASCIMENTO; BICUDO, 2006; BERNARDO; BICUDO, 2009).

O tratamento com CAF revelou que essa substância atua no grau de expressão de bandas do conjunto de β -esterases (EST-17A a EST-20) e do conjunto de bandas α -esterásicas (EST-12 a EST-14).

A avaliação visual da presença e da intensidade de coloração dessas bandas, respaldada pela quantificação dada pelo programa computacional *Global Lab Image*, mostrou que o efeito exercido pela CAF na expressão dos dois grupos de bandas esterásicas diferiu entre si.

De modo geral, observou-se, no experimento tratado, tendência de redução da frequência e do grau de expressão das bandas EST-17A a EST-20 e, opostamente, um leve aumento da frequência e do grau de expressão da banda EST-21.

O grupo de bandas α -esterásicas apresentou, no experimento tratado, aumento da frequência de larvas que o expressaram e, paralelamente, aumento da representação nas classes de maior grau de expressão. Portanto o efeito foi de ativação nos dois aspectos.

A comparação destes resultados com os de Laranja et al., 2003, mostra diferenças. Estas podem ser devidas ao uso de menores concentrações de CAF por aqueles autores (0,1 e 0,2 mg/mL) ou mesmo devidas a variações do metabolismo dos mosquitos no tempo decorrido, talvez em função do uso intenso de inseticidas para combatê-los. Aqueles autores reportaram variações nas bandas EST-1, EST-3, EST-7 EST-19 e EST-20. Todos os casos foram caracterizados por redução na frequência e ou grau de expressão. Do grupo de β -esterases, apenas as duas últimas bandas foram detectadas por aqueles autores.

Assim, em comum com os resultados do presente trabalho, encontramos as bandas EST-19 e EST-20, as quais apresentaram o mesmo comportamento nos dois estudos, isto é, redução do grau de expressão. Aqueles autores admitiram que as variações observadas poderiam estar envolvidas com os problemas causados pela CAF, nos parâmetros biológicos analisados no trabalho (mortalidade e tempo de desenvolvimento).

As variações encontradas para aumento ou redução da expressão de algumas bandas permitiram assim, que continuássemos no objetivo de tentar

relacioná-las com o bloqueio do desenvolvimento. Dados da literatura suportam essa hipótese. Sabe-se que, nos insetos, JH é um hormônio de importância básica no desenvolvimento e reprodução, afetando múltiplos processos fisiológicos pela regulação da expressão gênica (NIJHOUT, 1994). Sabe-se também que a esterase do hormônio juvenil (JHE) é fundamental para o desenvolvimento dos insetos devido à sua ação sobre o hormônio juvenil (JH). A JHE hidrolisa o JH produzindo o ácido JH, desta forma controlando a titulação de hormônio presente na hemolinfa de insetos (SHANMUGAVELU et al., 2000; MACKERT et al., 2006).

Assim, teoricamente, a redução da expressão das esterases do hormônio juvenil seria mais esperada como causa do bloqueio do desenvolvimento do que o aumento, porque a redução de seu grau de expressão poderia levar à incapacidade de realizar o desdobramento do hormônio juvenil, nos níveis necessários para ocorrer a muda. As bandas EST-19 e EST-20 encontram reforço nessa posição, pelo fato de seu comportamento ter permanecido o mesmo em estudos realizados com 11 anos de intervalo.

Quanto ao aumento do grau de expressão das α -esterases só a continuidade dos estudos poderá revelar o seu papel.

Foi importante verificar no presente trabalho que a JHE é uma carboxilesterase (LEE et al., 2011) e as esterases EST-18 a EST-21 foram também classificadas como carboxilesterases, com base na ação de inibidores e localização das bandas (LIMA- CATELANI et al., 2004; SOUSA-POLEZZI; BICUDO, 2005). De uma certa forma, essa informação dá mais um reforço para a hipótese da ação das β -esterases no desenvolvimento.

Há ainda mais uma informação a considerar. Uma substância extraída de um vegetal, o nim (*Azadirachta indica*) tem sido relacionada com o controle de alguns insetos. Foi demonstrado que o óleo emulsionável (1,25 ml/L) e os extratos aquosos de folhas (20%) e de sementes (1,5%) dessa planta interferem no sistema neuroendócrino dos insetos. Essa interferência é manifestada por uma desordem hormonal em diferentes etapas do processo de crescimento do inseto, afetando os hormônios da ecdise (ECD e 2-hydroxyecdisona) e o JH. Assim, os insetos não

são capazes de desenvolver-se de maneira normal e resultam deformações do tegumento, asas, pernas e outras partes do corpo. A maioria desses efeitos pode ser notada nos estádios larval ou ninfal, quando o nim é efetivamente mais ativo (MARTINEZ, 2002).

Assim, dados da literatura e deste trabalho dão suporte à hipótese de envolvimento da CAF no controle da expressão hormonal em larvas de *A. aegypti*: CAF afeta o sistema nervoso que controla a síntese hormonal e bloqueia o desenvolvimento, matando o mosquito no estágio larval; esterases estão envolvidas no processo que controla a metamorfose de *A. aegypti* e a CAF afeta o grau de expressão de algumas esterases específicas; A enzima JHE é uma carboxilesterase e as bandas β -esterásicas, que são afetadas pela CAF, reduzindo o nível de expressão, têm a mesma classificação.

O passo seguinte será analisar as proteínas correspondentes às bandas esterásicas modificadas e comparar sua sequência de aminoácidos com as sequências de esterases do desenvolvimento disponíveis na web. Como também foi mencionado, a esterase considerada praticamente comprovada na literatura como sendo JHE, dispõe de uma sequência de aminoácidos específica (motivo catalítico) que a diferencia das demais esterases (BAI et al., 2007). Este motivo pode ser um importante auxiliar na identificação da JHE. Outras análises são necessárias para confirmar ou não a hipótese apresentada.

7. CONCLUSÕES

1 – No presente trabalho foram confirmados e ampliados os dados que mostram que a CAF altera o padrão de expressão gênica das esterases.

2 – Sob ação dessa substância, foram alterados a frequência e o grau de expressão de dois grupos de bandas: cinco bandas β -esterásicas (EST-17A a EST-21) e um grupo de bandas α – esterásicas (provavelmente EST-12 a EST-14).

3 – No grupo de bandas β -esterásicas EST-17A a EST- 20 mostraram redução de ambas as características, enquanto EST-21 mostrou leve aumento.

4 – Com relação ao grupo de bandas α -esterásicas ocorreu aumento da frequência e do grau de expressão.

Saber se essas alterações estão relacionadas com a metamorfose, que é também afetada pela CAF, depende da continuidade dos experimentos, incluindo o sequenciamento dessas bandas que se alteram e comparar os resultados com as possíveis sequências encontradas nos bancos de dados.

8. REFERÊNCIAS

ALTIMARI, L. R. et al. Efeitos ergogênicos da cafeína sobre o desempenho físico. **Revista Paulista de Educação Física**, São Paulo; v. 14, p. 141-158, dez. 2000.

BAI, H.; RAMASESHADRI, P.; PALLI, S. R. Identification and characterization of juvenile hormone esterase gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology Journal**, Lexington; v. 37, p. 829-837, may. 2007.

BARATA, E. A. M. F. et al. População de *Aedes aegypti* em área endêmica de dengue, Sudeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo; v. 35, p. 237-242, jun. 2001.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, São Paulo; v. 22, p. 53-60, dez. 2008.

BERNARDO A. A.; BICUDO, H. E. M. C. Variability of esterase patterns in adult flies of the saltans species group of *Drosophila* (subgenus *Sophophora*). **Genetica**, Dordrecht; v. 137, p. 111-124, mar. 2009.

BICUDO, H. E. M. C. 2008. Projeto: ação comunitária para o controle do *Aedes aegypti*. Disponível em: < <http://www.ibilce.unesp.br/#!/utilidade-publica/aedes-portugues/>> Acesso em: 2 mar. 2012.

BLACKMAN, R. L. et al. Variation in the chromosomal distribution of amplified esterase in *Aedes aegypti* (FE4) genes in Greek field populations of *Myzus persicae* (Sulzer). **Heredity**, London; v. 82, p. 180-186, ago. 1999.

BROGDON, W. G. et al. Independent selection of multiple mechanisms for pyrethroid resistance in guatemalan *Anopheles albimanus* (Diptera, Culicinae). **Insect Resistance Management**, New York, v. 92, p. 289-302, abr. 1999.

CAMPBELL, P. M. et al. Identification of a juvenile hormone esterase gene by matching its peptide mass fingerprint with a sequence from the *Drosophila* genome project. **Insect Biochemistry and Molecular Biology Journal**, Oxford; v. 31, p. 513-520, abr. 2001.

CAROCCI, A. S.; LI, Y.; NORIEGA, F.G. Reduced juvenile hormone synthesis in mosquitoes with low teneral reserves reduces ovarian previtellogenic development in *Aedes aegypti*. **The Journal of Experimental Biology**, London; v. 207, p. 2685-2690, jul. 2004.

CARVALHO, M. S. L. et al. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo; v. 38, p. 1-10, out. 2004.

CERON, C. R.; SANTOS, J. R.; BICUDO, H. E. M. C. The use of gelatin to dry celophane wound slab gels in an embroidering hoop. **Brazilian Journal of Genetics**, São Paulo; v. 15, p. 201-203, mar. 1992.

CLAUDIANOS, C.; RUSSEL, R. J.; OAKESHOT, J. G. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. **Insect Biochemistry and Molecular Biology Journal**, Oxford; v. 29, p. 675-686, ago. 1999.

CUSSON, M.; SEN, S.E.; SHINODA, T. Juvenile hormone biosynthetic enzymes as targets for insecticide discovery. [Advanced Technologies for Managing Insect Pests](#), London; p. 31-55, jan. 2013.

DAVIS, J. B. Disc electrophoresis, method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**. New York; v. 2, p. 404-427, dez. 1964.

EDMAN P.; BEGG, G. A. protein sequenator. **European Journal of Biochemistry**, Berlin; v. 1, p.80-91, mar. 1967.

FEYEREISEN, R. Molecular biology of insecticide resistance. **Toxicology Letters**, Amsterdam; v. 82/83, p. 83-90, dez. 1995.

FIELD, L. M. et al. Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer). **Biochemical Journal**, London; v. 9, p.737-742, maio 1999.

FIGUEIREDO, R et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta; v. 14, p.667-669, abr. 2008.

FREDHOLM, B. B.; BÄTTIG, K. H.; ZVARTAU, A. N. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological Reviews**, Baltimore; v. 51, p.83-133, mar. 1999.

GAO, J. R. et al. Esterase-mediated malathion resistance in the human head louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam; v. 85, p.28-37, may. 2006.

GLAJCHEN, N. et al. The effect of chronic caffeine administration on serum markers of bone mineral metabolism and bone histomorphometry in the rat. **Calcified Tissue International**, Berlin; v. 43, p. 277-280, nov. 1988.

GU, X.; ZERA, A. J. Developmental profiles and characteristics of hemolymph juvenile hormone esterase, general esterase and juvenile hormone binding in the cricket, *Gryllus assimilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, London; v. 107, p. 553-560, abr. 1994.

GUILLEMAUD, T. et al. Esterase gene amplification in *Culex pipiens*. **Insect Molecular Biology**, Oxford; v. 6, p. 319-327, nov. 1997.

GUIRADO, M. M. **Padrões de esterases em populações resistentes e suscetíveis de *Aedes aegypti***. São José do Rio Preto: IBILCE-UNESP, 2008, 148 p. Tese (Doutorado em Genética) — Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, 2008.

GUIRADO, M. M.; BICUDO, H. E. M. C. Effect of used coffee grounds on larval mortality of *Aedes aegypti* (Díptera: culicidae): suspension concentration and age versus efficacy. **BioAssay**, v. 2, p. 1-7, maio 2007.

GUIRADO, M. M.; BICUDO, H. E. M. C. Effect of caffeine on larval mortality of *Aedes aegypti*: efficiency related to solution concentration and age. **Journal of Entomological Research**, Cambridge; v. 43, p. 11-21, jan. 2010.

GRIFFITHS, R. R.; WOODSON, P. P. Caffeine physical dependence: a review of human and laboratory animal studies. **Psychopharmacology**, Berlin; v. 94, p. 437-451, abr. 1988.

HAMMOCK, B. D.; PHILPOTT, M. L. **Juvenile hormone esterase for insect control**. US5098706 A, 1 nov. 1988, 24 mar. 1992.

HAREL, M. et al. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes. **Protein Science**, New York; v. 9, p. 1063-1072, jun. 2000.

HAWKES, N. J.; HEMINGWAY, J. Analysis of the promoters for the beta-esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam; v. 1574, p. 51-62, fev. 2002.

HEALY, M. J.; DUMANCIC, M. M.; OAKESHOT, J. G. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Genetics**, New York; v. 29, p. 365-388, ago. 1991.

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

ITOYAMA, M. M.; BICUDO, H. E. M. C. Effects of caffeine on fecundity, egg laying capacity, development time and longevity in *Drosophila prosaltans*. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto; v. 15, p.303-321, jun. 1992.

ITOYAMA, M. M.; BICUDO, H. E. M. C.; MANZATO, A. J., Effects of caffeine on mating frequency and pre-copulation and copulation durations in *Drosophila prosaltans*. **Cytobios**, Cambridge; v. 83, p. 245-248, mar. 1995.

ITOYAMA, M. M.; BICUDO, H. E. M. C., CORDEIRO, J. A., Effects of caffeine on mitotic index in *Drosophila prosaltans* (Diptera). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto; v. 20, p.655-658, dec. 1997.

ITOYAMA, M. M., BICUDO, H. E. M. C., MANZATO, A. J., The development of resistance to caffeine in *Drosophila prosaltans*: productivity and longevity after ten generations of treatment. **Cytobios** , Cambridge; v. 96, p.81-93, jan. 1998.

ITOYAMA, M. M.; BICUDO, H. E. M. C. Effect of stannous chloride combined with caffeine on productivity of *Drosophila prosaltans*. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo; v. 23, p.105-107, mar. 2000.

JOHNSON, F. M. et al. An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparison. **University of Texas Publications**, Texas; v. 6615, p. 517-532, jan. 1966.

KAMITA, S. G.; HAMMOCK, B. D. Juvenile hormone esterase: biochemistry and structure. **Journal of Pesticide Science**, Tokyo; v. 35, p. 265-274, jun. 2010.

KAROTAM, J.; OAKESHOTT, J. G. Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. **Heredity**, v. 71, p. 41-50, jul. 1993.

KIHLMAN, B. A.; HANSSON, K. H.; ANDERSSON, C. The effects of post-treatments with caffeine during S and G2 on the frequencies of chromosomal aberrations induced by thiotepa in root tips of *Vicia faba* and in human lymphocytes in vitro. **Mutation Research Letters**, London; v. 104, p. 323-330, 1982.

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

LARANJA, A. T.; MANZATO, A. J.; BICUDO, H. E. M. C. Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and their possible use in alternative control. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo; v. 26, p.419-429, jul. 2003.

LARANJA, A. T.; MANZATO, A. J.; BICUDO, H. E. M. C. Caffeine effect on mortality and oviposition in successive generations of *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública = Journal of public health**, São Paulo; v. 40, p.1112-1117, dez. 2006.

- LEE, S. O. et al. Two juvenile hormone esterase-like carboxylesterase cDNAs from a *Pandalus* shrimp (*Pandalopsis japonica*): cloning, tissue expression, and effects of eyestalk ablation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, London; v. 159, p. 148-156, jul. 2011.
- LEMOS, C. J. et al. Environmental education in *Aedes aegypti* control - vector of dengue virus in the Amanhece district of the city of Araguari – MG. **Em Extensão**, Uberlândia; v. 9, n. 2, p. 156-166, dez. 2010.
- LIMA, E. P. et al. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em Municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília; v. 39, p.1-8, jun. 2006.
- LIMA-CATELANI, A. R.; CERON, C. R.; BICUDO, H. E. M. C. Variation of genetic expression during development, revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Biochemical Genetics**, New York; v. 42, p. 68-84, abr. 2004.
- MACKERT, A. et al. Identification of a juvenile hormone esterase gene in the honey bee, *Apis mellifera*: Expression analysis and functional validation. In: ESA annual meeting, 2006, Indianapolis. **Entomological Society of America (ESA)** Indianapolis: Entomological Society of America, 2006. p. 10-13.
- MACORIS, M. L. G. et al. Modificação da susceptibilidade de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* ao temefós. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia; v. 24, p. 31-40, mar. 1995.
- MACORIS, M. L. G. et al. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo; v. 33, p. 521-22, out. 1999.
- MACORIS, M. L. G. et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro; v. 98, p. 703-708, jul. 2003.
- MARANGOS, P. J.; BOULENGER, J. P.; PATEL, J. Effects of chronic caffeine on brain adenosine receptors: regional and ontogenetic studies. **Life Science**, Oxford; v. 34, p. 899-907, fev. 1984.
- MARTINEZ, S. S. **O Nim - *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos**. IAPAR, Londrina, 2002. Disponível em: <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=410>. Acesso em: 12 jul. 2012.
- MARZOCHI, K. B. F. Dengue in Brazil – situation, transmission and control: a proposal for ecological control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro; v. 89, p. 235-245, jun. 1994.

MOUCHÈS, C. et al. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticides resistance in *Culex*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC; v. 87, p. 2574-2578, abr. 1990.

MUTERO, A. et al. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, New York; v. 91, p. 5922-5926, jun. 1994.

NASCIMENTO, A. P.; BICUDO, H. E. M. C. Further study on the esterase patterns of sibling species in the *Drosophila saltans* subgroup (saltans group): intraspecific and interspecific variations in the development. **Genetica**, Dordrecht; v. 126, p. 265-276, mar. 2006.

NENE, V. et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector (research article) (clinical report). **Science**, Washington, DC; v. 316, p. 1718-1723, jun. 2007.

NIJHOUT, H. F. Symmetry systems and compartments in Lepidopteran wings: the evolution of a patterning mechanism. **Development**, Durham; v. 126, p. 225-233, out. 1994.

OAKESHOTT, J. G. et al. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica**, Dordrecht; v. 90, p. 239-268, out. 1993.

OCAMPO, C. B ; WESSON, D. M. Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colômbia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore; v. 71, p. 506-513, out. 2004.

PAIVA M. H. S. **Monitoramento do gene, que codifica a esterase, envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil**. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008, 72 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

PASTEUR, N.; KASTRITSIS, C.D. Developmental studies in *Drosophila*. I. Acid phosphatases, esterases and other proteins in organs and whole-fly homogenates during development of *D. pseudoobscura*. **Developmental Biology**, New York; v. 26, p.525-536, dez. 1971.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

POHANKA, M. Alpha-7-nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel; v. 12, p. 2219-2238, fev. 2012.

POLEZZI, R. C. S.; BICUDO, H. E. M. C. Effect of phenobarbital on inducing insecticide tolerance and esterase changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 275-283, nov. 2005.

POLLARD, I.; JABBOUR, H.; MEHRABANI, P. A. Effects of caffeine administered during pregnancy on fetal development and subsequent function in the adult rat: prolonged effects on a second generation. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Washington; v. 22, p. 1-15, jun. 1987.

QUEIROZ, M. L.; FERNANDES S. M. D.; VALADARES, M. C. Neutrophil function in workers exposed to organophosphate and carbamate insecticides. **International Journal of Immunopharmacology**, Oxford; v. 21, p. 263-270, abr. 1999.

REBÊLO, J. M. M. et al. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão – Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 477-486, 1999.

REYES-VILLANUEVA, F. El dengue – binomia del vector, transmisión y opciones para suspensión control em México. **Ciencia**, v. 41, p. 45-55, 1990

RODHAIN, F. La situación de la dengue dans le monde: la situation de la dengue et de la dengue hémorragique dans le monde, dans les Amériques et en Guyane Française. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris; v. 89, p. 87-90, 1996.

RODRIGUEZ, M. M. et al. Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti*. (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu; v. 3, p. 623-628, set. 2001.

SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. C. G. Methods and strategies in proteomics and their applications in plants. **Ciência Rural**, Santa Maria; v. 40, p.727-734, mar. 2010.

SANTOS, A. M. **Estrutura do gene da esterase do hormônio juvenil de *Apis Mellifera* e seu papel durante o desenvolvimento pós-embrionário e a diferenciação de castas**. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP, 2004, 125 p. Dissertação (Mestre em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP, Ribeirão Preto, 2004.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Casos importados da febre do Chikungunya no Brasil. Disponível em: <http://www.hc.ufpr.br/files/febre_do_chikungunya_no_brasil.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2014.

SEHRA, S. S.; SEHRA, S. K. Conceptual translation as a part of gene expression, **International Journal of Computers & Technology**, Washington; v. 3, p. 503-505, dez. 2012.

SEVERSON LAB HOME. The Severson *Aedes aegypti* genome project: VectorBase. Disponível em: <<http://www.nd.edu/~dsevervo/genome.html>>. Acesso em 13 fev. 2012.

SHANMUGAVELU, M. et al. A novel protein that binds juvenile hormone esterase in fat body tissue and pericardial cells of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore; v. 275, p.1802-1806, jan. 2000.

SHAPIRO, A. B. et al. Juvenile hormone and juvenile hormone esterase in adult females of the mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, Austin; v. 32, p. 867-877, 1986.

SLOSEK, J. *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: a review of their interactions with the human population. **Social Science and Medicine**, Oxford; v. 23, p. 249-257, 1986.

SOUZA-POLEZZI, R. C.; BICUDO, H. E. M. C. Genetic variation along time in a Brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), detected by changes in esterase pattern. **Genetica**, Dordrecht; v. 125, p. 43-53, set. 2005.

STEINER, W. W. M.; JOHNSON, W. C. Techniques for electrophoresis of Hawaiian *Drosophila*. **US-IBP Island Ecosystems Technical Report**. Michigan; v. 3, p. 1-21, nov. 1973.

TIMSON, J. Caffeine. **Mutation Research = Reviews in Genetic Toxicology**, Amsterdam; v. 47, p. 1-52, 1977.

TRUMAN, J. W.; RIDDIFORD, L. M. The morphostatic actions of juvenile hormone. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford; v. 37, p. 761-770, ago. 2007.

WAJDA, I. J.; BANAY-SCHWARTZ; M.; LAJTHA, A. The effect of caffeine on some mouse brain free amino acid levels. **Neurochemical Research**, New York; v. 14, p. 317-320, abr. 1989.

WIGGLESWORTH, V. B. The formation of the peritrophic membrane in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. **Journal of Microscopical Science**, London; v. 2, p. 593-616, 1930.

9. APÊNDICE: ARTIGO.

Changes in the Esterase Pattern and Development Block at the larval stage of *Aedes aegypti* under the Action of Caffeine: are they Cause and Effect Mechanisms?

André Martins Pólo¹ and Hermione Elly Melara de Campos Bicudo¹

Universidade Estadual Paulista-UNESP, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, SP, Brazil

Short Title: Esterase pattern and development block in *Aedes aegypti*.

Keywords: juvenile hormone, esterase of the juvenile hormone, ecdysone, expression degree of esterases, electrophoresis.

Abstract

The mosquito *Aedes aegypti* is a vector of human disease-causing virus, including dengue, dengue hemorrhagic fever and yellow fever. The transmission of these diseases is made by the bite of adult females, which require blood repast for completing their eggs maturation. Several studies have shown that treatment with caffeine (CAF) blocks the development and kills *A. aegypti* in larval stage. Preliminary work also indicated that CAF treatment of *A. aegypti* changes the pattern of synthesis of esterase enzymes. The esterases play important roles in various physiological processes of the organisms, including among them the control of the insect metamorphosis. In the present work, we analyzed them in polyacrylamide gels stained with α and β naphthyl acetates and Fast Blue RR. CAF at 0.75 mg/mL water was used in the treatments. The samples were prepared with larval stages, pupae and adults, but mainly with L4 phase. Comparison of the treated and control mosquitoes allowed to study the presence and frequency of the esterase bands in the gels and their degree of expression evaluated on the basis of staining degree by the Global Lab Image computer program. The analysis showed that under CAF effect five β -esterase bands and three α -esterase bands changed frequency and expression degree, causing reduction in four, a small increase in one of the β -esterases and increase in the group of α -esterases. In view of these changes parallel to the larval development block we thought in the hypothesis that these esterases may be involved in the regulation of the hormones that control development. For example, the β -esterases could be juvenile hormone esterases that when expressed at lower levels couldn't be sufficient to metabolize the juvenile hormone, a process that is necessary to the occurrence of metamorphosis. A better analysis of these esterases, including sequencing, for evaluation of this hypothesis will be the primary goal in the continuation of this work.

1. Introduction

Aedes aegypti is a vector of arboviruses that cause severe human diseases, such as dengue, dengue hemorrhagic fever and yellow fever. The distribution of these mosquitoes reaches the tropical and subtropical regions where temperature and humidity are favorable to their development and reproduction (Rebelo et al., 1999; Barreto; Teixeira, 2008). *Aedes aegypti* has holometabolous development that includes the stages of egg, larva (subdivided into L1 to L4), pupa and adult. The transmission of the viral diseases occurs through the bite of the adult females that need a blood meal to complete the maturation of their eggs.

The main way to combat the diseases caused by this vector is reducing the insect population size. The application of organophosphates and pyrethroid insecticides has been the main method used to achieve this goal. However, many populations of *A. aegypti*, from different places of the world, have developed resistance to these insecticides, reducing their efficiency in the control programs (Macoris et al., 1995, 1999, 2003; Rodriguez et al., 2001; Carvalho et al., 2004; Lima et al., 2006; Ocampo; Wesson, 2004). Furthermore, it is known for a long time that pesticides are toxic, affecting the environment and organisms, including humans. (Marzochi, 1994; Queiroz et al., 1999).

Due to the high incidence of *A.aegypti*, in many regions of the world, there has been an intensive search for alternative forms of control that eliminate the insect without harming the environment and human health. Several studies have shown that one of the possibilities is the use of caffeine (CAF). This substance blocks the development of the larvae that die in about 24 hours, depending on the concentration used in the treatment (Laranja et al., 2003; Guirado; Bicudo, 2007; Guirado, 2008; Laranja et al, 2006). At the concentration 1 mg / ml of water, generally the mortality occurs in the L1 instar. A study in which CAF treatment was performed during generations showed consecutive reduction in egg production till that at the eighth generation descendants were no longer produced (Laranja et al., 2006).

Using sub lethal doses of CAF, several biological parameters could be analyzed, including number of progeny, development time and longevity (Laranja et al., 2003; Laranja; et al. 2006; Guirado; Bicudo, 2007; Guirado, 2008).

Caffeine (1, 3, 7 - trimethylxantine) belongs to the group of methylxanthine and has been consumed by man for centuries, especially as a drink. CAF antagonizes the action of adenosine, binding to its transmembrane receptor thereby blocking the action of this neurotransmitter in the brain (Marangos et al. 1884; Fredholm et al., 1999). In humans, this blockage is responsible for excitation and, in many cases, for insomnia (Altimari, et al., 2000). In *Drosophila* studies, that primarily inspired the tests with *A. aegypti*, CAF affected reproduction and prolonged development (Itoyama; Bicudo, 1992, 2000; Itoyama et al., 1995, 1997, 1998).

Used coffee grounds (UCG), which is the coffee powder that remains after preparing the beverage, also showed to be efficient in the control of *A. aegypti*. 100% mortality was detected at 300mg/ml concentration (about four table spoons for a normal size glass of water) (Laranja et al., 2003).

One of the previous studies suggested that the esterase synthesis of *A. aegypti* could be affected by CAF (Laranja et al., 2006). Esterases are enzymes involved in several physiological processes, including neuronal activity (Harel et al., 2000), juvenile hormone (JH) metabolism (Gu; Zera, 1994) and insecticide resistance (Feyereisen, 1995). The juvenile hormone esterases (JHEs) play a critical role in the regulation of insect development. They control the titration of the hormones JH (sesquiterpenoids), which regulates the metamorphosis and development of insects. The JH hormones modulate the action of the hormones 20E (ecdysteroids) to prevent metamorphosis. In the metamorphosis of larvae to pupae, JH is removed from the hemolymph and tissues at precise moments, by controlling the synthesis and/or degradation. Two JHE enzymes are primarily responsible for JH degradation: (1) JHE, which metabolizes JH by hydrolysis of the JH methyl ester unsaturated acid and (2) JHEH, which hydrates the JH epoxide ring, resulting in JH diol. Because of their critical role in the regulation of

JH, the JHE esterases have been used as insecticides in several studies (Bai et al. 2007).

In view of the evidence that CAF blocks development of the mosquitoes *A. aegypti* at larval stages, and that there is involvement of the esterases in the control of the insects molting, the objective of this study was to find knowledge reinforcing the hypothesis that these two processes are related. This was done through detecting esterase bands that show changes in expression under the effect of CAF treatment and to observe if their characteristics conform to those known to the juvenile hormone esterases.

2. Materials and Methods

2.1. Collection and maintaining of the mosquitoes in the laboratory.

In this study, larvae, pupae and adults of *A. aegypti* were collected in natural breeding sites, in São José do Rio Preto, SP, by SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias). They were brought to the Vectors Laboratory, where the adults were transferred to a cage while the other stages were placed into another cage for completing the development.

In the laboratory, the adult mosquitoes were fed with 8% sugar aqueous solution. Once a week, the females were fed with blood. Their eggs were collected twice a week for further use. The substrate for oviposition was a strip of filter paper put inside a glass half filled with water, circling internally the glass in the limit water/air.

2.2. Treatment of the mosquitoes and preparation of the samples for electrophoresis.

The mosquitoes were treated with CAF since the egg phase. CAF was used in the concentrations 0.25, 0.50 and 0.75 mg/ml water, chosen on the basis of previous data (Laranja *et al.*, 2003, 2006; Guirado, 2008). CAF aqueous solutions were prepared with water coming from the well belonging to the school (IBILCE).. The water is examined periodically for quality.

The samples for electrophoresis were prepared with control and treated mosquitoes, in the larval stages L2, L3 and L4, in pupae and adults. Due to the small size, five L2 or L3 were used to prepare each sample. The samples for analysis of the other stages were prepared with a single mosquito. The study involved the use of 600 larvae (400 L3 and 200 L4), 80 pupae and 80 adults.

2.3. Electrophoresis.

The samples for electrophoresis were prepared by crushing control and treated mosquitoes in a buffer solution (Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 + 10% glicerol) and then were put to run in polyacrilamde gels. Two kinds of gels were used: separation gels (12%) and staking gels (4%) (adapted from. Davis, 1964) and Laemmli, 1970). The staking gel was polymerized in the upper part of the plates, in continuation to the separating gel already polymerized inside them. After the application of the samples in the staking gel the electrophoresis was done for four hours at a constant voltage (200V) and controlled temperature ($25^{\circ} \text{C} \pm 1$).

2.4. Identification of the esterases in the gels.

After electrophoreses, the identification of the esterases was done by dipping the gels in an aqueous solution of 0.1M sodium phosphate (pH 6.2), at room temperature ($\pm 25^{\circ}$), followed by staining in a solution prepared with 50 mL of the same sodium phosphate solution, 15 mg of β -naphtyl acetate and 20 mg of α -naphtyl acetate, 60 mg of Fast Blue RR and 5 mL of N-propanol (Johnson et al., 1966; Steiner; Johnson, 1973).

Because the esterases hydrolyze the substrates differently, the bands in the gel stain with different colors: black if they hydrolyze preferentially: the α -naphtyl acetate, red, if they hydrolyze preferentially the β -naphtyl acetate and magenta when they hydrolyze both α - and β -naphtyl acetates. After staining throughout the night, the gels are distained during 24 h, in the dark, in a solution prepared with acetic acid, alcohol and distilled water (100 mL, 250 mL and 650 mL, respectively). The gels were dried in accordance with Ceron et al., 1992.

2.5. Analysis of the bands.

In the comparison between treated and control gels, the bands were analyzed as to the frequency of expression (number of mosquitoes that expressed each band) and expression degree.

The expression degree was evaluated on the basis of the intensity of staining, according with values obtained with the Global Lab Image computer program (Data Translation, Marlboro, M.A., U.S.A.). Four degrees were established and named +, ++, +++ and +++++. The program produced profile graphs in which the absence of color corresponds to the value 255 and the maximum intensity of color (black) corresponds to the value zero. Nuances of gray are between the extremes. In the graphs, the horizontal axis represents the position of the bands in the gels and the vertical axis represents the intensity of staining of each band.

Results

5.1. General pattern of the esterase bands of *A. aegypti* from São José do Rio Preto.

The pattern of esterases of *A. aegypti* from São José do Rio Preto was previously known, since this characteristic has been analyzed in the Laboratory of Vectors of this Institute since 1988 (Lima-Catelani et al. 2004, Sousa-Polezzi & Bicudo, 2005 and Guirado, 2008). The esterase bands observed in the different analysis over time are shown in the diagram of Figure1, in which they are represented by lines of varying thickness (depending on the degree of their expression), and different colors: black, red and magenta, corresponding to α -, β - and $\alpha\beta$ -esterases, respectively (classified according with the pattern of hydrolysis they perform relatively to α - and β - naphthyl acetates).

5.2. Data on the bands detected in the present study.

The esterase patterns of *A. aegypti* from São José do Rio Preto, detected in the present analysis, included 23 bands. In relation to the previous studies, the

difference was the finding of an apparently new band we named EST-17A aiming to differentiate it from a band named EST-17 that was previously described in *A. albopictus*. Another aspect was that, in this study, we couldn't observe the bands EST-A to EST-D isolate from each other because they are very closed in the gel. Because of this they were analyzed as a single band.

5.3. Evaluation of the expression degree of the esterases.

As mentioned in Material and Methods, the esterase bands were evaluated regarding the frequency and the degree of expression. The assessment to the degree of expression was made by the Global Lab Image computer program that generated profile graphs. In Figure 2 we show one of these graphs relative to the group of esterases EST-A to EST-D for illustrating the expression variations. In this figure, the deeper valleys correspond to bands with higher degree of staining (++++ and +++) and the shallower correspond to the less stained bands (++ and +).

5.4. Expression variation of the bands under the effect of CAF.

The analysis of the CAF effect was restricted to mosquitoes in the larval stage L4 due to their greater number of bands, and to treatment with CAF at 0.75mg/mL due to its more pronounced effect on the bands. For illustration, the Figure 3 shows a gel with the esterase banding pattern of L4 treated with the three concentrations of CAF, used preliminarily, and controls. From the total of 23 bands only EST-11 is not present in this gel.

The comparison of treated and control mosquitoes didn't show differences with regard to the number of bands. However, the intensity of staining showed visible changes under treatment in two sets of bands. One of them was formed by five β -esterases, located in the proximal region of the gel relatively to the origin of the samples. They include the bands EST-18 to EST 21, previously described by Lima Catelani et al. (2004) and the apparently new band EST-17A. The other affected set of bands was formed by the α -esterases EST-12 to EST-14, that were analyzed as a single band since they could not be observed separately.

5.4.1 Analysis of the β -esterase bands.

The data on these bands were obtained in the study of 38 and 40 L4 larvae from control and treated experiments, respectively (Table 2 and Figures 4 and 5).

The numbers and percentages of mosquitoes included in the four expression classes, for each band from experiment and control groups are in Table 2. Figures 4 and 5 show the distribution of these percentages.

The distribution graph of the sum of frequencies of expression of each β -esterase band regardless of the level of expression, obtained for control and treated mosquitoes are in Figure 5. For the treated group compared with the control, the distribution showed reduction in the expression of the bands EST-17A, EST-18, EST-19 and EST-20 and increase for band EST-21. Profile graphs corresponding to variation of the staining intensity for bands EST-18 and EST-19 are in Figures 6 and 7, respectively.

5.4.2. Analysis of the α -esterase bands.

Forty nine L4 larvae were analyzed in the control and also in CAF treatment of the α -esterase bands (Table 2, Figure 8). In the control, the frequency of expression was higher in the class of lowest degree (+) and decreased towards the highest expression class (++++). The reverse occurred in the treated mosquitoes. The profile graph in Figure 9 refers to the evaluation of the staining intensity of the α -esterases bands, as shown in Figure 3.

Discussion

Because *A. aegypti* is a vector of serious human diseases, such as dengue, dengue hemorrhagic fever and yellow fever, it is important to study, in detail, the biology of this organism and its metabolic responses to environmental changes. Deeper knowledge can lead to the discovery of new forms of control that could decrease or even eliminate the intensive use of insecticides.

In the present study, we were looking for knowledge that could reinforce the idea that CAF impairs esterases of development. Since it has been known for a

long time that the so called juvenile hormone esterases (JHE) are involved in the control of instar change in holometabolous insects (Truman, Riddiford, 2007), the esterases affected by CAF could be eventually JHEs.

Changes in the pattern of esterases were analyzed as to the frequency of individuals expressing each band and as to intensity of expression of each band based on the degree of staining with α - and β -naphthyl acetates, evaluated by the Glogal Lab Image program. Studies considering the relationship between the degree of staining and intensity of gene expression were performed previously in *Drosophila* (Nascimento; Bicudo, 2006 and Bernardo; Bicudo, 2009).

The expression degree of two sets of bands was changed due to the effect of CAF: the β -esterases (EST-17A to EST-20) and the α - esterase (EST-12 to EST-14). The effect on the two groups of bands differed from each other. Differences were also found among the β -esterases.

The frequency and degree of larval expression of the β -esterase bands EST-17A to EST-20, were reduced relatively to the control.

As to the group of α - esterases, the treated larvae showed increased frequency and degree of expression. So the CAF effect was activation of the expression of α - esterases, in both characteristics.

A comparison of these results with the obtained by Laranja et al. (2003) shows differences. Those authors reported variations under CAF treatment in the bands EST-1, EST-3, EST-7 EST-19 and EST-20. In all these bands the effects were characterized by a reduction in the frequency and or degree of expression. Thus the two studies on CAF effect shared the same results only for EST-19 and EST-20 bands. These differences might be due to the use of lower concentrations of CAF by those authors (0.1 and 0.2 mg / mL). or even due to changes in the metabolism of the mosquitoes in the time between the studies, perhaps due to the extensive use of insecticides to combat them.

The band variations observed in treatments with CAF allowed continuing in the attempt to relate them to the larval development block. Literature data support this hypothesis. In insects, juvenile hormone (JH) is of basic importance in the development and reproduction, affecting multiple physiological processes by

regulating gene expression (Nijhout, 1994). It is also known that the juvenile hormone esterase (JHE) is fundamental for the development of insects due to their action on JH. JHE hydrolyzes JH, thereby controlling the titration of this hormone present in the hemolymph (Shanmugavelu et al, 2000; Mackert et al, 2006.).

Thus, theoretically the reduction of the JHE expression would be more expected to cause blockage of the development than its increase because the lower degree of expression could lead to inability to perform the metabolism of JH in the levels required to the occurrence of molting. The EST-19 and EST-20 bands are then candidates to develop that role. It is important that their behavior in front of CAF remained the same in analyzes performed 11 years apart. Regarding the increase in the degree of expression of EST-21, it might be involved in regulating the synthesis of JHE or other characteristics affected by CAF. However these are only hypothesis to be analyzed.

A result that may reinforce the hypothesis of involvement of the esterases modified by CAF with JE is that JHE is a carboxylesterase (Lee et al, 2011) and the esterases EST-18 to EST-21 were also classified as carboxylesterases, based on the action of inhibitors by Lima-Catelani et al, (2004) and Sousa –Polezzi & Bicudo (2005). The esterases EST-12 to EST-14 were classified as cholinesterases by the same authors.

Another interesting information was obtained with a substance extracted from a vegetable, nim (*Azadirachta indica*), which has been related to the control of some insects. It was shown that the oil emulsion (1.25 ml / L) and the aqueous extracts of leaves (20%) and seeds (1.5%) of the plant interfere with the neuroendocrine system of insects. This interference is manifested by a hormonal disorder at different stages of the insect development, affecting the molting hormones (ECD and 2-hydroxyecdisona) and JH. Thus, the insects are not able to develop normally, resulting deformations of integument, wings, legs and other body parts. Most of these effects can be seen in the larval or nymphal stages, when nim is actually more active (Martinez, 2002).

Thus, data from the literature and from this work reinforce the hypothesis of involvement of CAF in controlling hormone expression in the larvae of *A.*

aegypti: CAF affects the nervous system that controls the hormone synthesis and CAF blocks the development, killing the mosquito at the larval stage; esterases are involved in the process that controls the metamorphosis in *A. aegypti* and affects the expression degree of some specific esterases; the enzyme JHE is a carboxylesterase and the β -esterase bands that are affected by CAF, reducing the level of expression are classified in the same way.

In the continuation of this study, it would be interesting to analyze the protein bands corresponding to the modified esterases and comparing its amino acid sequence with the sequences of the development esterases available in the web. As already mentioned, the esterase considered practically proven in the literature to be a JHE has a specific amino acid sequence (catalytic motif) that differentiates it from the other esterases (BAI et al., 2007). This motif can be an important aid in the JHE identification.

References

- ALTIMARI, L. R.; CYRINO, E. S.; ZUCAS, S. M.; BURINI, R. C. Efeitos ergogênicos da cafeína sobre o desempenho físico. **Revista Paulista de Educação Física**, v. 14, p. 141-158, 2000.
- BAI, H.; RAMASESHADRI, P.; PALLI, S.R.. Identification and characterization of juvenile hormone esterase gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology Journal**, v.37, p. 829-837, 2007.
- BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa, **Estudos Avançados**, v. 22, p. 53-60, 2008.
- BERNARDO A. A.; BICUDO, H.E.M.C. Variability of esterase patterns in adult flies of the saltans species group of *Drosophila* (subgenus *Sophophora*), **Genetica**, v. 137, p. 111-124, 2009.
- CARVALHO, M.S.L., CALDAS, E.D., DEGALLIER, N. VILARINHOS, P.T.R.SOUZA, L.C.K.R., YOSHIZAWA, M.A.C., KNOX, M.B., OLIVEIRA, C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temefós no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, v.38, p. 1-10, 2004.

CERON, C.R., J.R. SANTOS; H.E.M.C. BICUDO. The use of gelatin to dry celophane wound slab gels in an embroidering hoop. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 15, p. 201-203, 1992.

DAVIS, J. B. Disc electrophoresis, method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 2, p. 404-427, 1964.

FEYEREISEN, R. Molecular biology of insecticide resistance. **Toxicology Letters**, v. 82/83, p. 83-90, 1995.

FREDHOLM, B.B.; BÄTTIG, K. H.; ZVARTAU, A.N. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacological Reviews**, v.51, p.83-133, 1999.

GU, X.; ZERA, A.J. Developmental profiles and characteristics of hemolymph juvenile hormone esterase, general esterase and juvenile hormone binding in the cricket, *Gryllus assimilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 107, p. 553-560, 1994.

GUIRADO, M.M. **Padrões de esterases em populações resistentes e suscetíveis de *Aedes aegypti***. Tese apresentada ao IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, para obtenção do título de Doutor em Genética, 148 p., 2008.

GUIRADO, M.M.; BICUDO, H.E.M.C. Effect of used coffee grounds on larval mortality of *Aedes aegypti* (Díptera: culicidae): Suspension concentration and age versus efficacy. **BioAssay**, v.2, p. 1-7, 2007.

GUIRADO, M.M.; BICUDO, H.E.M.C. Effect of caffeine on larval mortality of *Aedes aegypti*: Efficiency related to solution concentration and age. **Journal of Entomological Research**, v. 43, p. 11-21, 2010.

HAREL, M.; KRYGER, G.; ROSENBERRY, T.L.; MALLENDER, W.D.; LEWIS, T.; FLETCHER, R.J.; GUSS, J.M.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L.; Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes. **Protein Science**, v.9, p. 1063-1072, 2000.

ITOYAMA, M. M., BICUDO, H. E. M. C., CORDEIRO, J.A. Effects of caffeine on mitotic index in *Drosophila prosaltans* (Diptera). **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.655 - 658, 1997.

ITOYAMA, M.M.; BICUDO, H.E.M.C.; MANZATO, J.A. Effects of caffeine on mating frequency and pre-copulation and copulation durations in *Drosophila prosaltans*. **Cytobios**, v. 83, p. 245-248, 1995.

ITOYAMA, M. M., BICUDO, H. E. M. C., MANZATO, A. J., The development of resistance to caffeine in *Drosophila prosaltans*: productivity and longevity after ten generations of treatment. **Cytobios** , v.96, p.81 - 93, 1998.

ITOYAMA, M. M., BICUDO, H. E. M. C. Effect of stannous chloride combined with caffeine on productivity of *Drosophila prosaltans*. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.105 – 107., 2000.

ITOYAMA, M. M.; BICUDO, H.E.M.C. Effects of caffeine on fecundity, egg laying capacity, development time and longevity in *Drosophila prosaltans*. **Brazilian Journal of Genetics**, v.15, p.303-21., 1992.

JOHNSON, F.M.; KANAPI, C.G.; RICHARDSON, R.H.; WHEELER, M.R.; STONE, W.S., An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparison. **University of Texas Publications XVIII**, v. 6615, p. 517-532, 1966.

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

LARANJA, A. T.; A. J. MANZATO; BICUDO, H.E.M.C., Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and their possible use in alternative control. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p.419-429., 2003.

LARANJA, A.T., MANZATO, A.J., BICUDO, H.E.M.C. Caffeine effect on mortality and oviposition in successive generations of *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública / Journal of Public Health** , v.40, p.1112 – 1117, 2006.

LEE, S.O.; JEON J.M.; OH, C.W.; KIM, Y.M.; KANG, C.K.; LEE, D.S.; MYKLES, D.L.; KIM, H.W. Two juvenile hormone esterase-like carboxylesterase cDNAs from a *Pandalus* shrimp (*Pandalopsis japonica*): cloning, tissue expression, and effects of eyestalk ablation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, p. 148 – 156, 2011.

LIMA, E.P., OLIVEIRA-FILHO, A.M., LIMA, J.W.O., RAMOS-JR, A.N., CAVALCANTI, L.P.G; PONTES, R.J.S. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em Municípios do Estado do Ceará, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p.1-8, 2006.

LIMA-CATELANI, A.R.; CERON, C.R.; BICUDO, H.E.M.C. Genetic variation during development, revealed by esterase patterns of *Aedes aegypti*. **Biochemical Genetics**, v. 42, p. 68-84, 2004.

MACKERT, A.; HARTFELDER, K.; SIMÕES, Z. L. P.; BITONDI, M. M. G. **Identification of a juvenile hormone esterase gene in the honey bee, *Apis mellifera* - Expression analysis and functional validation**. In: THE 2006 ESA ANNUAL MEETING, 2006, p.10-13.

MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M. ; TAKAKU. L.; GLASSER, C.M.; GARBELOTO, V.C.; CIRINO, V.C.B.L. Alteração de resposta de

susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.33, p.521-22, 1999.

MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C.M.; GARBELOTO, V.C.; BRACCO, J.E. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p. 703-708, 2003.

MACORIS, M.L.G.; CAMARGO, M.F.; SILVA, I.G.; TAKAKU, L.; ANDRIGHETTI, M.T. Modificação da susceptibilidade de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* ao temefós. **Revista de Patologia Tropical**, v.24, p.31-40, 1995.

MARANGOS, P.J.; BOULENGER, J.P.; PATEL, J. Effects of chronic caffeine on brain adenosine receptors: regional and ontogenetic studies. **Life Science**, v.34, p. 899-907, 1984.

MARTINEZ, S.S. O Nim - *Azadirachta indica*: Natureza, usos múltiplos, **IAPAR**, Londrina, 2002.

MARZOCHI, K.B.F.; ARZOCHI, K.B.F. Dengue in Brazil – situation, transmission and control: a proposal for ecological control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, p. 235-45. 1994.

NASCIMENTO, A.P.; BICUDO, H.E.M.C. Further study on the esterase patterns of sibling species in the *Drosophila saltans* subgroup (*saltans* group): intraspecific and interspecific variations in the development. **Genética**, v. 126, p. 265-276. 2006.

NIJHOUT, H. F. Symmetry systems and compartments in Lepidopteran wings: the evolution of a patterning mechanism. **Development**, p. 225-233, 1994.

OCAMPO, C.B ; WESSON, D.M. Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colômbia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, p. 506-513. 2004.

QUEIROZ, M. L.; FERNANDES S. M. D.; VALADARES, M. C. Neutrophil function in workers exposed to organophosphate and carbamate insecticides. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 21, p. 263-270. 1999.

REBÊLO, J.M.M.; COSTA, J.M.L.; SILVA, F.S.; PEREIRA, Y.N.O.; SILVA, J.M. Distribuição de *Aedes aegypti* e do dengue no Estado do Maranhão – Brasil, **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.15, p. 477-486, 1999.

RODRIGUEZ, M.M.; BISSET, J.; FERNANDEZ, D.M.; LAUZAN, L.; SOCA, A. Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti*. (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela., **J. Med. Entomol.**, v. 3, p.623-628. 2001.

SHANMUGAVELU, M.; BAYTAN, A. R.; CHESNUT, J. D.; BONNING, B. C. A novel protein that binds Juvenile Hormone Esterase in fat body tissue and pericardial cells of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p.1802-1806, 2000.

SOUZA-POLEZZI, R.C.; BICUDO, H.E.M.C. Genetic variation along time in a Brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), detected by changes in esterase pattern. **Genetica (The Hague)**, v. 125, p. 43-53. 2005.

STEINER, W.W.M.; JOHNSON, W.C. Techniques for electrophoresis of Hawaiian *Drosophila*. **US – IBP Island Ecosyst. Tech. Rep.**, v. 3, p. 1-21. 1973.

TRUMAN, J. W.; RIDDIFORD, L. M. The morphostatic actions of juvenile hormone. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 761 -770. 2007.

Figure 1

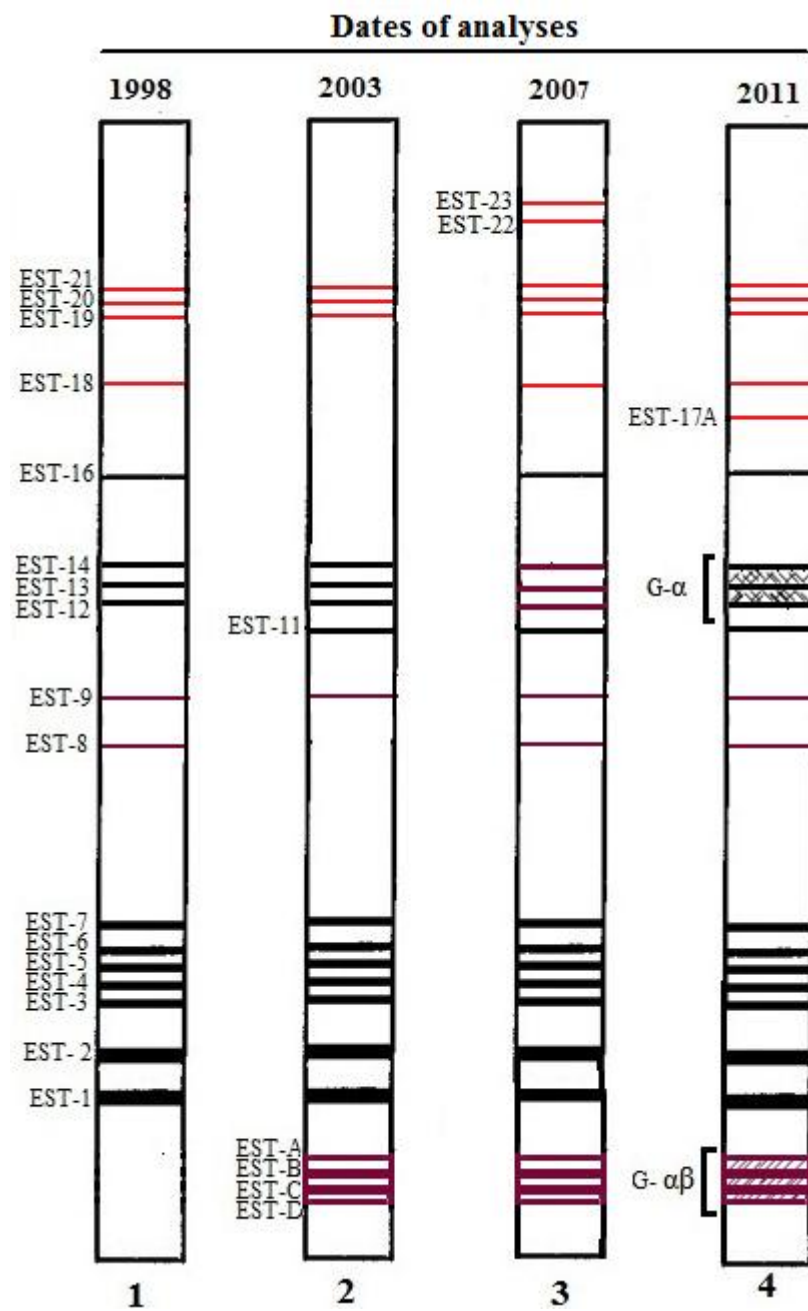


Figure 2

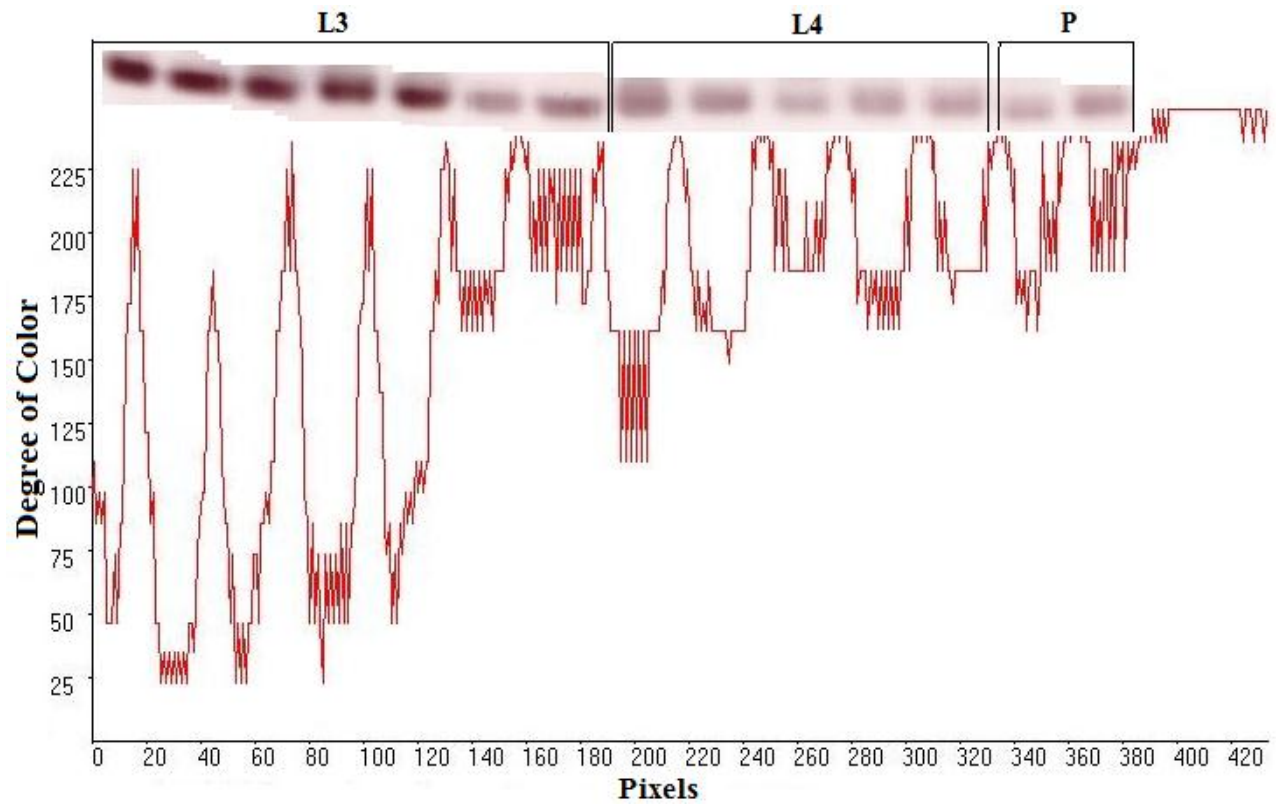


Figure 3

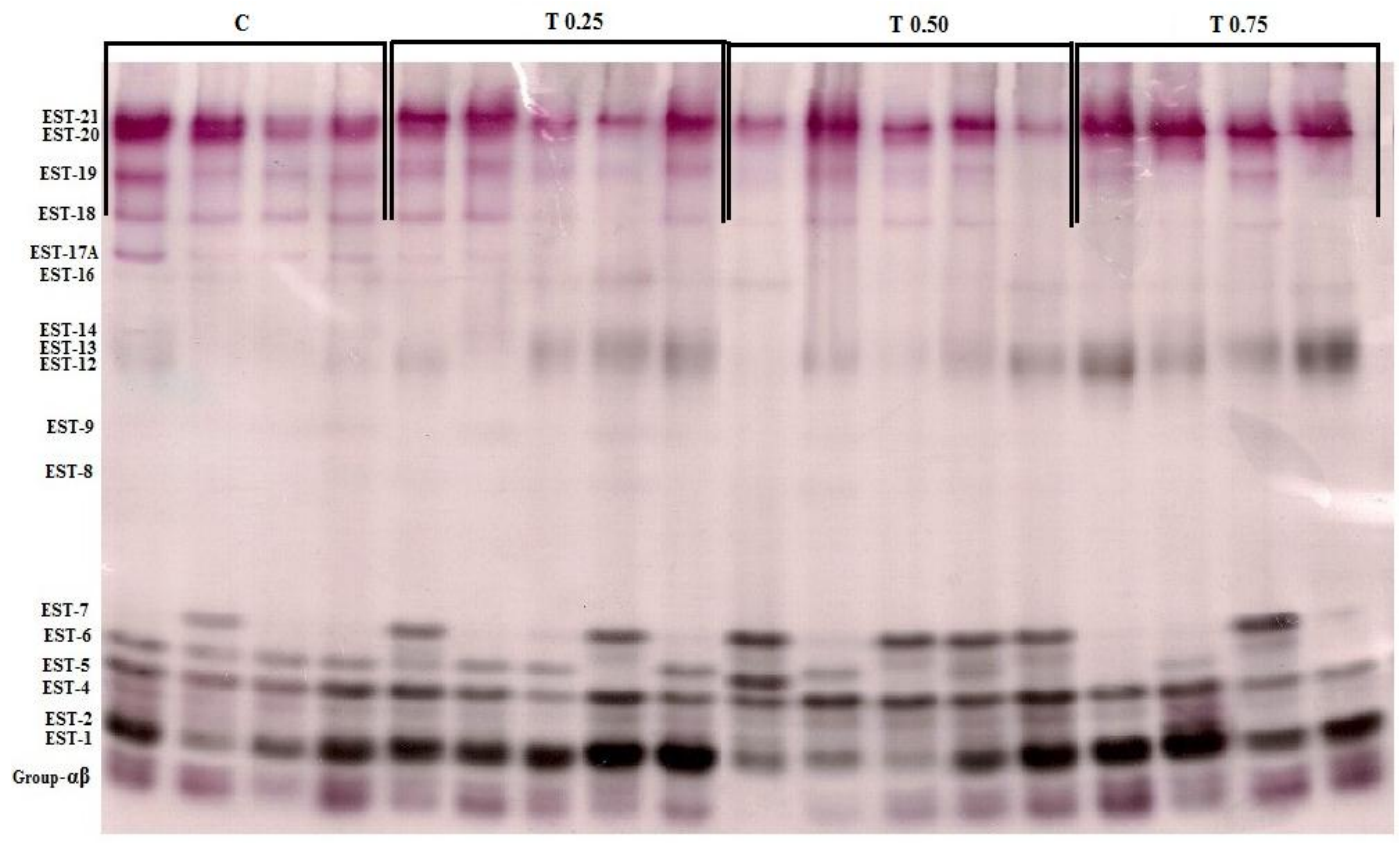


Figure 4

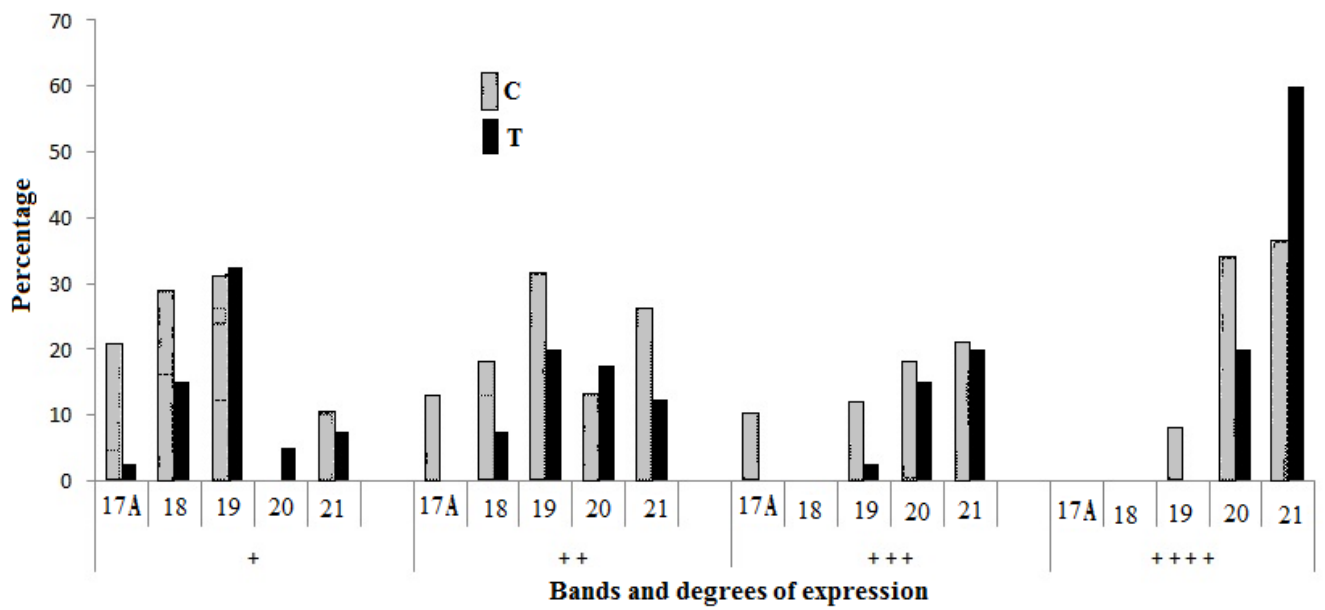


Figure 5

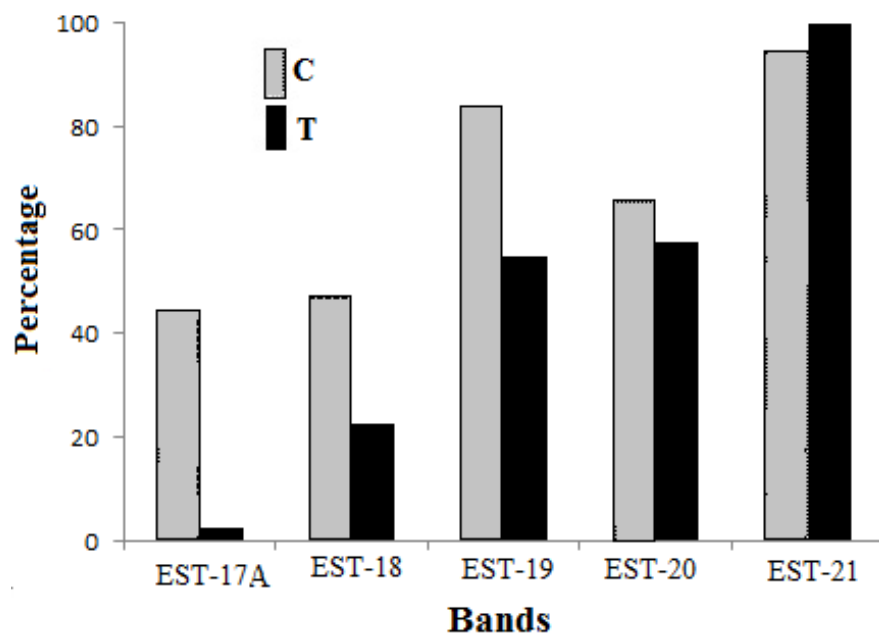


Figure 6

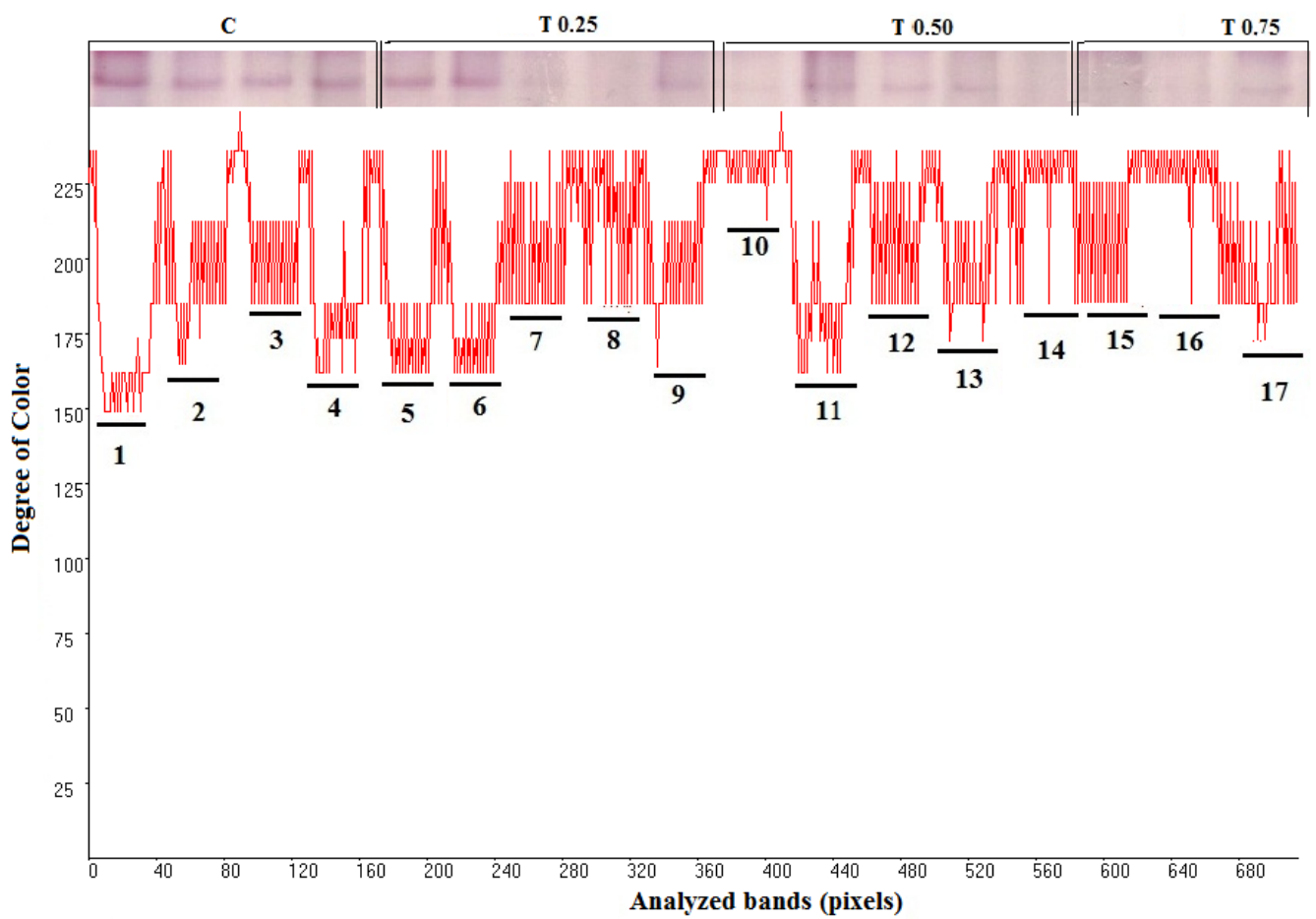


Figure 7

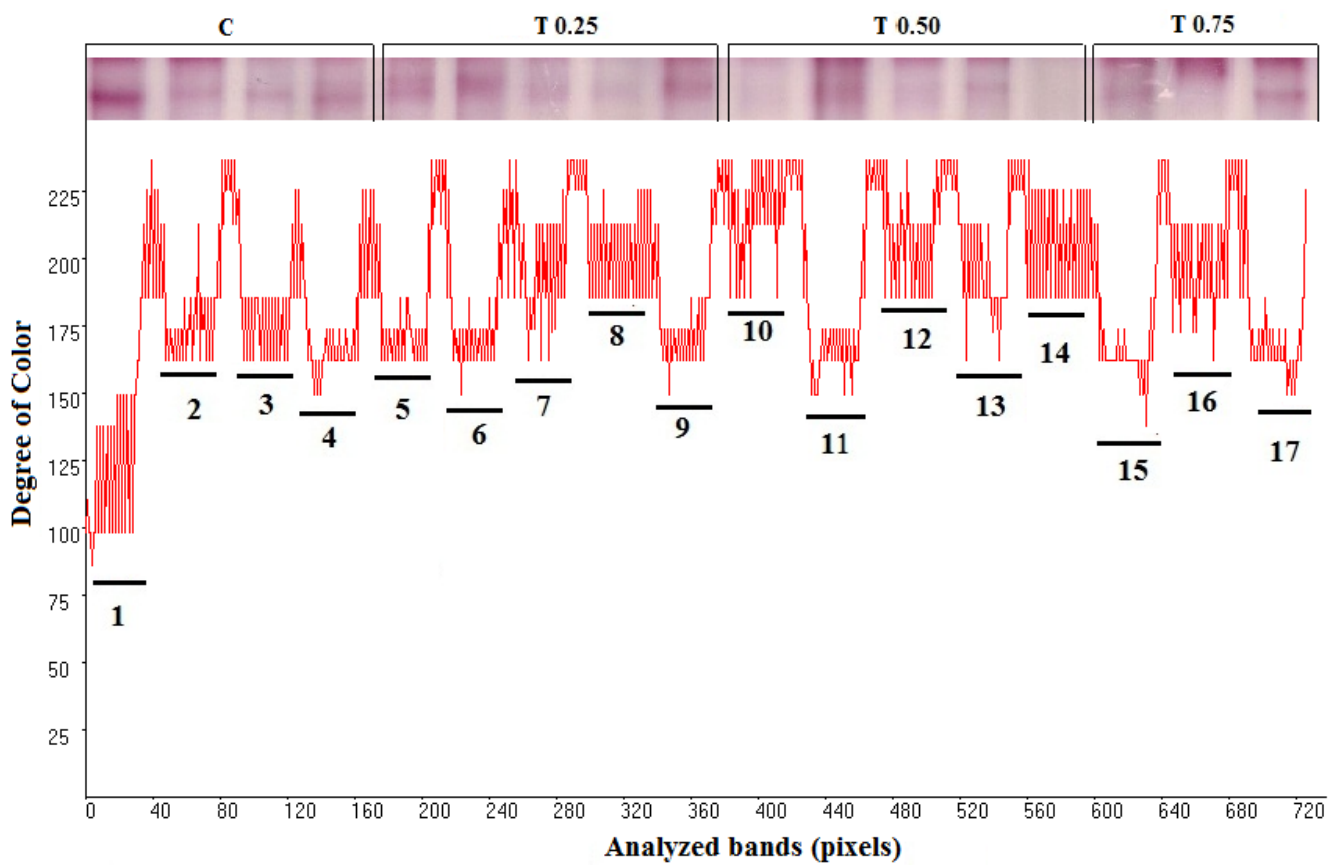


Figure 8

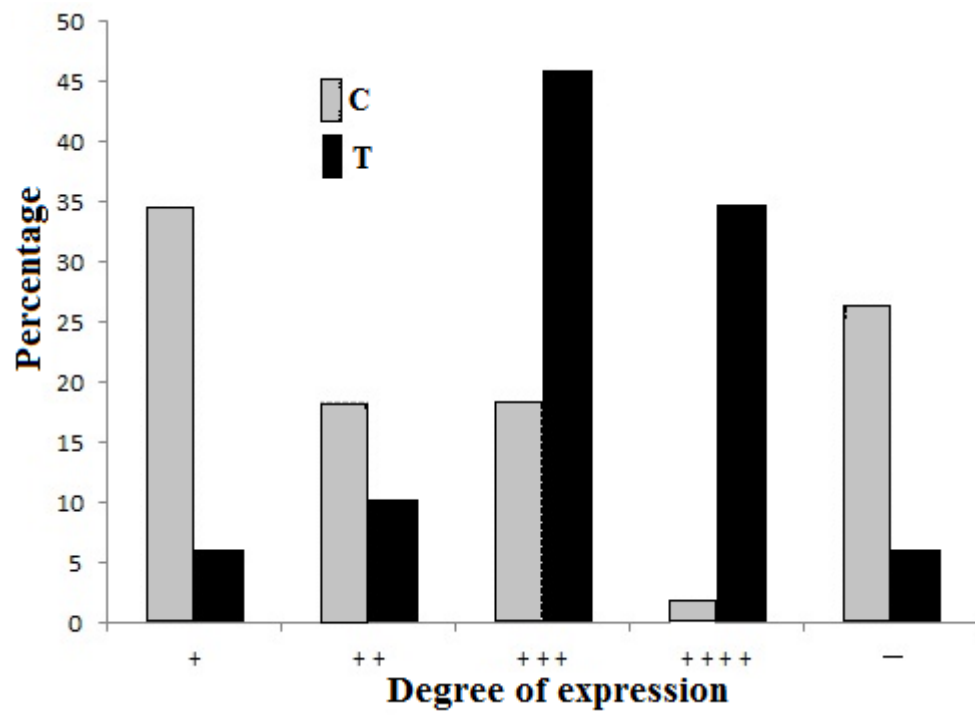


Figure 9

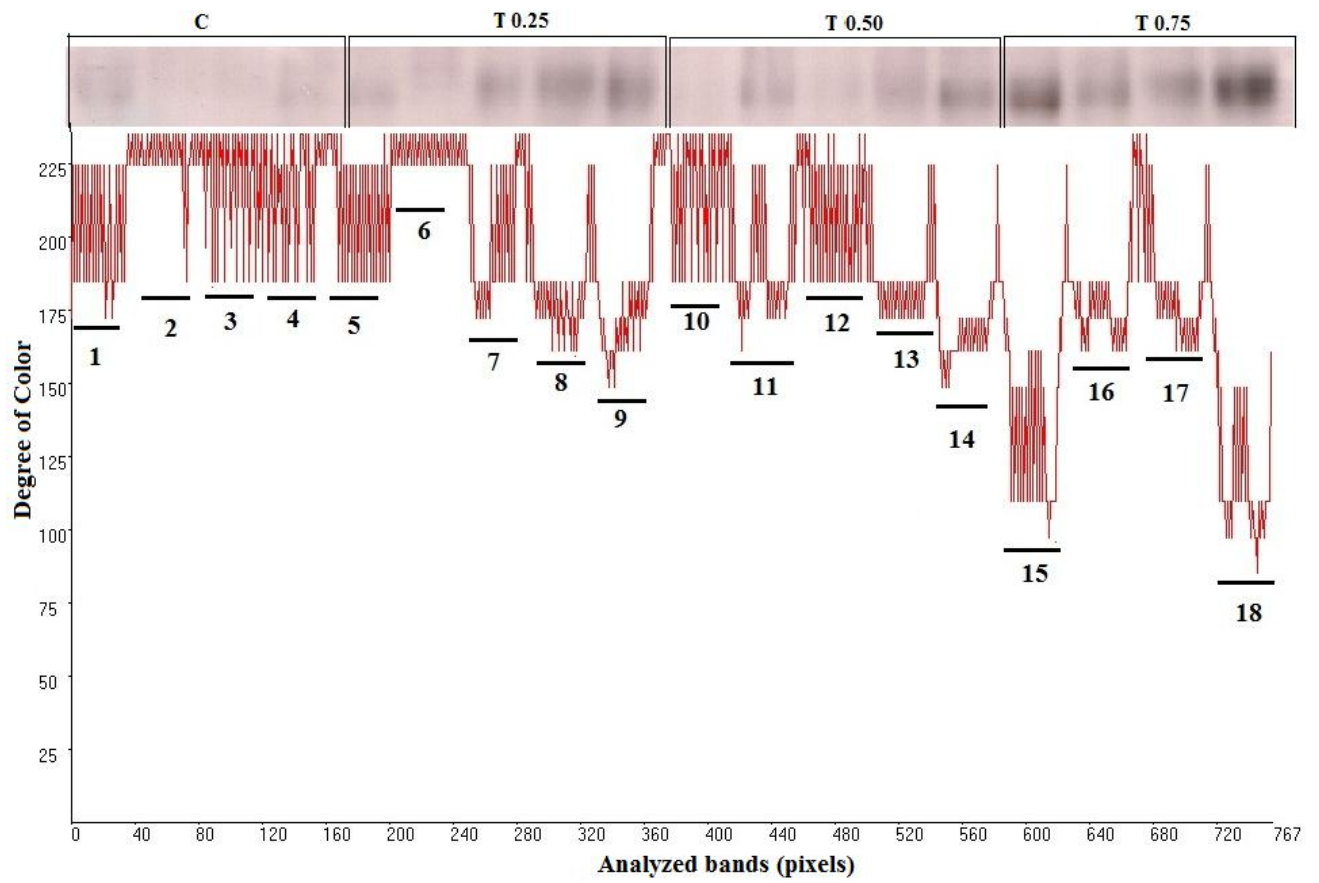


Table 1

Band	Classes	N / %	X	D.P.
Group $\alpha\beta$	+	43 / 21.5%	193.4	8.7
	++	42 / 21%	167.9	7.6
	+++	27 / 13.5%	124.2	14
	++++	27 / 13.5%	72.3	25.9
Absent	.	61 / 30.5%	.	.
Total	.	200/100%	.	.

Table 2

Experiment	staining degree	β -esterase bands					α -esterase group
		EST-17A	EST-18	EST-19	EST-20	EST-21	EST-12 a 14
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
C	+	8(21.0)	11(28.9)	12(31.7)	-	4(10.6)	17(34.7)
	++	5(13.2)	7(18.4)	12(31.7)	5(13.2)	10(26.3)	9(18.4)
	+++	4(10.5)	-	5(13.3)	7(18.4)	8(21.0)	9(18.4)
	++++	-	-	3(7.9)	13(34.2)	14(36.8)	1(2.0)
	total	17(44.7)	18(47.3)	32(84.2)	25(65.8)	36(94.7)	36(73.5)
	absent	21(55.3)	20(52.7)	6(15.8)	13(34.2)	2(5.3)	13(26.5)
T	+	1(2.5)	6(15.0)	13(32.5)	2(5.0)	3(7.5)	3(6.1)
	++	-	3(7.5)	8(20.0)	7(17.5)	5(12.5)	5(10.2)
	+++	-	-	1(2.5)	6(15.0)	8(20.0)	21(45.9)
	++++	-	-	-	8(20.0)	24(60.0)	17(34.7)
	total	1(2.5)	9(24.5)	22(55.0)	23(57.5)	40(100.0)	46(93.9)
	absent	39(97.5)	31(75.5)	18(45.0)	17(42.5)	-	3(6.1)

Legends for Figures

Figure 1. Esterase band patterns of *Aedes aegypti* observed in L4 larvae from São José do Rio Preto, in studies over time. Above are the analysis dates whose authors, in the sequence of the publications were: **1**-LIMA-CATELANI et al, 2004; **2**-SOUSA-POLEZZI e BICUDO, 2005; **3**-GUIRADO e BICUDO, 2008; **4**-this study. Black bands = α -esterases; red = β -esterases and magenta = $\alpha\beta$ -esterases.

Figure 2. Profile graph obtained by the *Global Lab Image* program for each sample in the gel (horizontal axis) showing variations of the staining intensity of the $\alpha\beta$ -esterase bands in the development from L3 larva to pupa (P) of *Aedes aegypti*.

Figure 3. Esterase pattern of L4 larvae of *Aedes aegypti* obtained by electrophoresis in an polyacrylamide gel, in the experiments control (C) and treated (T) with caffeine at 0.25, 0.50 and 0.75 mg/mL.

Figure 4. Distribution graph of the percentages of L4 larvae of *Aedes aegypti* that expressed the bands β -esterases (EST-17A to EST-21), included in the four classes of staining intensity (+ a ++++). C = control; T= treated with caffeine at 0.75 mg/ml..

Figure 5. Distribution graph of the percentages of L4 larvae of *Aedes aegypti* that expressed the bands β -esterases (EST-17A a EST-21), irrespective of the degree of expression. C = control; T = treated with caffeine at 0.75 mg/mL.

Figure 6. Profile graph obtained in an electrophoresis gel by the *Global Lab Image* program showing the expression variations of the β -esterase EST-18 of *Aedes aegypti* treated with caffeine Columns 1 to 4 = control; 5 to 17 = larvae treated with increasing concentrations of caffeine (0.25, 0.50 and 0.75 mg/mL).

Figure 7. Profile graph obtained in the electrophoresis gel by the *Global Lab Image* program showing the expression variations of the β -esterase EST-19 of *Aedes aegypti* r treated with caffeine. Columns 1 to 4 = control; 5 to 17 = larvae treated with increasing concentrations of caffeine (0.25, 0.50 and 0.75 mg/mL).

Figure 8. Distribution graph of the percentages of L4 larvae of *Aedes aegypti* that expressed the α -esterase bands included in the four degrees of staining (+ to ++++). C = control; T = larvae treated with caffeine at 0.75 mg/mL. = no expression

Figure 9. Profile graph obtained in an electrophoresis gel by the *Global Lab Image* program showing the expression variations of the α -esterase bands (EST-12 a EST-14), of *Aedes aegypti* under treatment with caffeine. Columns 1 to 4 = control; 5 to 17 = treated with increasing concentrations of caffeine (0.25, 0.50 and 0.75 mg/mL).

Legends for Tables

Table 1. Number (N) and percentage of L4 larvae of *Aedes aegypti* that expressed the bands $\alpha\beta$ -esterases, included in the four classes of staining intensity (+ a ++++), mean (X) and standard deviation (D.P) with the value of gray shades obtained by the Global Lab Image program.

Table 2. Number (N) and percentage of L4 larvae of *Aedes aegypti* that expressed the α - and β - esterase bands, included in the four classes of staining intensity (+ a ++++). C = control, T = larvae trated with caffeine at 0.75 mg/mL.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura