

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LUANA CRISTINA FARNESI FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NOVALURON, UM INIBIDOR DA SÍNTESE DE QUITINA,
SOBRE A FORMAÇÃO DE LARVAS DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762)**

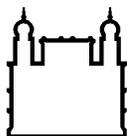
Dissertação submetida ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ), como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração: Biologia Celular e Biologia Molecular.

Orientadores:

Dr^a Denise Valle e Dr Marcelo Pelajo-Machado

Rio de Janeiro

Abril 2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: LUANA CRISTINA FARNESI FERREIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NOVALURON, UM INIBIDOR DA SÍNTESE DE QUITINA
SOBRE A FORMAÇÃO DE LARVAS DE *Aedes Aegypti* (LINNAEUS, 1762)

Orientadores:

Dr^a Denise Valle e Dr Marcelo Pelajo-Machado

Aprovada em: 28/04/2009

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira - Presidente

Prof. Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine

Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso

Prof. Dr^a. Rafaela Vieira Bruno

Prof. Dr^a. Samira Chahad Ehlers

Rio de Janeiro, 28 de abril de 2009.



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE) do Instituto Oswaldo Cruz e no Laboratório de Entomologia do Instituto de Biologia do Exército (IBEx) em colaboração com o Laboratório de Patologia e com o Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, ambos do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Foram utilizados recursos da Fundação Oswaldo Cruz, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS-MS).

Dedico à minha mãe, Hilda Farnesi Ferreira, por me mostrar que com força e coragem todos os sonhos são possíveis!

AGRADECIMENTOS

O budismo é a base de toda minha vida. Aprendi que a Lei de causas e efeitos rege todo o universo, então acredito que para modificar meu destino é preciso somente “arregaçar as mangas” e construir causas positivas!

Ao meu mestre Dr Daisaku Ikeda pela luta abnegada de propagação desta maravilhosa filosofia: O budismo de Nitiren Daishonin!

Aos meus pais Carlos e Hilda e aos meus irmãos Jorge, Patrícia, Marcelo e Carlos Augusto por me ensinarem o significado da palavra família. Nós somos mais do que unidos, somos um só! Aos meus sobrinhos Letícia, Larissa, Marcelle, Hugo, Pedro e Natan por toda a alegria que trazem à minha vida.

Ao meu marido Rodrigo pela compreensão, dedicação, carinho e apoio em todos os momentos que precisei. Com você descobri o que é o verdadeiro amor!

À família Henrique da Silva que esteve presente em todos os momentos de minha formação escolar, me incentivando a continuar, mesmo em meio a todas as adversidades e problemas financeiros. Tia Niva sem você seria impossível!

E também a todos os meus outros familiares que participaram direta ou indiretamente da minha formação.

Ao maior amigo do mundo: Thiago Belinato! Você não sabe o quanto necessito de você! Te amo muito!

À minha amiga-irmã de todas as horas Camila Dutra! Todas as conversas e desabafo foram importantes para a conclusão deste trabalho. Te amo!

Ao meu amigo e “orientador não-oficial” Gustavo Lazzaro. Já são mais de cinco anos de convivência, aprendo, discutindo muitoooooo e conversando demais sobre os mais variados assuntos. Gostaria de te dizer que se cheguei até aqui, você é um dos grandes culpados! Mais uma conquista, mais um trabalho, somos parceiros e seremos para sempre!

A minha AMIGA e orientadora Denise Valle, pela confiança e carinho. Quero que saiba que te admiro muito, e para mim é muito importante ter alguém para me espelhar! Sou muito feliz por pertencer a sua equipe! E continuo a dizer: a Denise é a pessoa mais competente que conheço! OBS: Vale ressaltar as horas de empenho da “chefe” me ajudando a para passar para o papel esta metodologia que arrancou meu couro (risos)!

Ao meu co-orientador Dr Marcelo Pelajo por me aceitar como aluna, em meio aos seus diversos compromissos. E ao seu aluno Pedro Paulo pela receptividade e paciência com essa menina ligada nos 220 V, valeu!

A Jutta Lins que é uma pessoa incrível e incomparável! Sempre disposta a ajudar. Se não fosse você não seria possível defender este trabalho!

A todos os amigos do LAFICAVE, é muito bom trabalhar com essa galera: Ademir, Adriana, Aline, Bento, Denise, Diego (o cara que é um “Bombril”, tem mil e uma utilidades), Diogo (o mal humorado mais fofo do mundo), Edna, Eliane, Gilberto, Gustavo, Isabela, Jutta, Luciana, Luiz, Márcia, Mariana, Nathália, Priscila e Tânia.

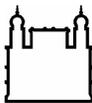
Ao Dr. Alexandre Peixoto e toda sua equipe por todo carinho e atenção que me concederam no período em que realizei experimentos no LBMI. Muito, muito obrigada! Foi bom demais conviver com todos vocês, donos do maior bom humor do mundo! Em especial a galera que me ajudou e muito nos Real-Times: Rafa, Gustavo (Silvio Santos) e Robão, valeu! E a galera que indiretamente me ajudou nos real times, pelo simples fato de me deixarem ser seus amigos: Robson, Lourdinha, Samira, Paulo, Jorge e Carina. Adoro vocês! Obrigada pelas diversas gargalhadas!

A turma de mestrado da Biologia Parasitária que me adotou: Allan, Aline, Carol, Dani Misael, e Mônica. Vocês são nota 10!

Ao Instituto Oswaldo Cruz e à CAPES pelo apoio financeiro e técnico para a realização deste trabalho.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABC (*transporters*) – transportadores ABC (*ATP Binding Casser*)
- AgE – agonista de ecdisona
- AHJ – análogo de hormônio juvenil
- AnE – análogo de ecdisona
- BOD – demanda biológica de oxigênio ("*Biological Oxygen Demand*")
- BPU - benzoil-fenil-uréias
- CDC – Centro de Controle de Doenças (*Centers for Disease Control*)
- cDNA – DNA complementar
- CSI – inibidores da síntese de quitina (*Chitin Synthesis Inhibitors*)
- DDT - dicloro-difenil-tricloroetano
- DENV - dengue vírus
- DEPC - dietil pirocarbonato
- DNA - ácido desoxirribonucléico
- dsRNA - RNA dupla fita (*Double-stranded RNA*)
- FUNASA - Fundação Nacional de Saúde
- GlcNAc - N-acetil glicosamina
- HAE - horas após a eclosão dos ovos
- HE - Hematoxilina Eosina
- HJ - hormônio juvenil
- IE - Inibição da Emergência (dos adultos)
- IGR – reguladores do crescimento de insetos (*Insect Growth Regulators*)
- MP - Membrana Peritrófica
- OC - organoclorado
- OP – organofosforado
- OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde
- qPCR – PCR quantitativo em tempo real (*real time quantitative PCR*)
- RNA – ácido ribonucléico
- RNA_m – RNA mensageiro
- siRNA – pequeno RNA de interferência (*short interfering RNA*)
- SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde
- WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NOVALURON, UM INIBIDOR DA SÍNTESE DE QUITINA SOBRE A FORMAÇÃO DE LARVAS DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762)

(RESUMO) DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AUTORA: LUANA CRISTINA FARNESI FERREIRA

Várias populações de *Aedes aegypti*, vetor da dengue e da febre amarela urbana, apresentam resistência aos inseticidas clássicos utilizados em seu controle. Sendo assim, torna-se imperativo o estabelecimento de estratégias alternativas. Nesse sentido, a biossíntese de quitina é um alvo potencial. Em artrópodes, a quitina é considerada o principal constituinte da cutícula (ou exoesqueleto). A quitina Sintase (do inglês *Chitin Synthase*, CHS) é uma enzima-chave na biossíntese desta molécula, e os compostos benzoil-fenil-uréias (BPUs) possuem atividade inibidora da síntese de quitina, interferindo na formação da cutícula em diversas espécies de insetos. Novaluron é um BPU recentemente recomendado pela WHO para uso em água potável, o que o qualifica como uma alternativa viável para o controle de larvas do vetor da dengue. Neste trabalho investigamos, durante o desenvolvimento larvar de *Ae. aegypti*, a influência de novaluron sobre: 1) o conteúdo de quitina; 2) a expressão do gene *AaCHS1*, evidenciada por seus transcritos alternativos *AaCHS1a* e *AaCHS1b* e, 3) a estrutura do exoesqueleto e da membrana peritrófica. Para tanto, inicialmente foi necessário observar os momentos das ecdises larvais. Os pontos definidos para a coleta das amostras levaram em conta o processo de síntese de cutícula a cada instar larvar. Foram escolhidos pontos tentativamente representativos do início (i), meio (int) e fim (f) do terceiro (L3) e do quarto (L4) instares. Os pontos de L3i, L3int, L3f, L4i, L4int e L4f foram definidos como 53, 59,5, 68, 75, 92,5 e 98 horas após a eclosão (HAE), respectivamente. Novaluron foi então administrado continuamente a larvas L3, a partir de 51 HAE, em concentrações definidas em relação ao seu percentual de inibição de emergência do adulto (IE): IE₂₀, IE₅₀ e IE₉₉. Foi observado um aumento significativo no conteúdo de quitina de larvas controle, desde L3i até L4f. Novaluron afetou significativamente a produção de quitina de forma dose-dependente, ao longo do desenvolvimento larvar. A abundância relativa de mRNA dos transcritos *AaCHS1a* e *AaCHS1b* foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real, de L3i a L4f, em larvas controle e tratadas com a dose de IE₉₉. O perfil de expressão dos transcritos *AaCHS1a* e *AaCHS1b* é similar em larvas controle, ainda que a variação temporal de *AaCHS1b* seja maior. O BPU parece ter um efeito mais proeminente sobre o perfil de expressão de *AaCHS1b*, que se acentua nas primeiras horas após tratamento. Com base nos resultados obtidos, duas hipóteses são discutidas: mecanismo de *feedback* positivo ou atraso fisiológico do desenvolvimento. Ensaios histológicos preliminares validaram a metodologia utilizada para preparo e observação da morfologia de larvas tratadas e controle. Cortes longitudinais evidenciaram a preservação de estruturas internas, inclusive as quitinosas, o que abre a perspectiva de ensaios futuros de marcação específica para quitina.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NOVALURON, UM INIBIDOR DA SÍNTESE DE QUITINA SOBRE A FORMAÇÃO DE LARVAS DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762)

(ABSTRACT) DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AUTORA: LUANA CRISTINA FARNESI FERREIRA

Several populations of *Aedes aegypti*, vector of dengue and urban yellow fever, exhibit resistance to insecticides used on their control. Therefore, the establishment of alternative strategies becomes imperative. In this regard, chitin biosynthesis is a potential target. In arthropods, chitin is considered the main constituent of the cuticle (or exoskeleton). Chitin Synthase (CHS) is a key enzyme in the biosynthesis of this molecule and, Benzoyl-phenyl-urea (BPU) compounds inhibit chitin synthesis, interfering with cuticle formation in several insect species. Novaluron was recently recommended by WHO for use in potable water, which qualifies this BPU as a viable alternative to the control of the dengue vector larvae. In the present work we investigated the influence of novaluron, during larval development of *Ae. aegypti*, on the: 1) chitin content, 2) *AaCHS1* gene expression, through its alternative spliced forms *AaCHS1a* and *AaCHS1b*, and 3) exoskeleton and peritrophic membrane structure. For this purpose, it was first necessary to observe the timing of larval ecdysis. The time points selected for sampling took into account the process of cuticle synthesis at each larval instar. Tentative initial (i), intermediary (int) and final (f) representative time points were chosen for the third (L3) and fourth (L4) larval instars. The points of L3i, L3int, L3f, L4i, L4int and L4f were defined as 53, 59.5, 68, 75, 92.5 and 98 hours after hatching (HAH), respectively. Novaluron was continuously administered to L3 larvae, from 51 HAH on at concentrations defined with respect to the percentage of adult emergence inhibition (EI): EI₂₀, EI₅₀ and EI₉₉. In control larvae, a significant increase of the chitin content, from L3i until L4f, was observed. Novaluron significantly affected chitin production in a dose dependent manner, during larval development. The relative abundance of *AaCHS1a* and *AaCHS1b* transcripts was evaluated by quantitative real time PCR, from L3i to L4f, on both control and novaluron IE₉₉ larvae. The expression of *AaCHS1a* the treated larvae were similar to control. The expression profile of both *AaCHS1a* and *AaCHS1b* transcripts is similar in control larvae, even if variations in *AaCHS1b* are higher. BPU treatment effect seems more pronounced on *AaCHS1b* expression profile, that is activated in the first hours immediately following treatment. Two hypotheses are raised: a positive feedback mechanism or a physiological development delay. Preliminary histological observations validated the methodology employed for preparing and observing control and treated larvae morphology. Longitudinal sections put in evidence the preservation of internal structures, including chitinized ones, opening the perspective of future assays for specific chitin.

ÍNDICE

1) INTRODUÇÃO	1
1.1) INSETOS, MEMBROS DA CLASSE HEXAPODA	1
1.2) ORDEM E FAMÍLIA DOS MOSQUITOS	1
1.3) DESENVOLVIMENTO DOS MOSQUITOS	3
1.4) PRESENÇA E IMPORTÂNCIA DA QUITINA NOS MOSQUITOS	4
1.4.1) <i>A quitina Sintase</i>	7
1.5) A CUTÍCULA DOS INSETOS	9
1.5.1) <i>O processo de muda e a ecdise</i>	10
1.5.2) <i>O controle hormonal do processo de muda</i>	12
1.6) O GÊNERO <i>Aedes</i> E A TRANSMISSÃO DE ARBOVIROSES	13
1.7) O DENGUE	14
1.8) CONTROLE DE VETORES	15
1.8.1) <i>Inseticidas químicos</i>	16
1.8.1.1) Organoclorados	17
1.8.1.2) Organofosforados	17
1.8.1.3) Carbamatos	18
1.8.1.4) Piretróides	18
1.9) RESISTÊNCIA A INSETICIDAS	19
1.10) ALTERNATIVAS DE CONTROLE	20
1.10.1) <i>Reguladores do crescimento de insetos (IGRs)</i>	20
1.10.1.1) Análogos de hormônio juvenil	22
1.10.1.2) Agonistas da ecdisona	22
1.10.1.3) Inibidores da síntese de quitina (CSI)	23
2) OBJETIVO	26
2.1) OBJETIVO GERAL	26
2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3) MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1) MOSQUITOS	27
3.2) VERIFICAÇÃO DO MOMENTO DA ECDISE L2:L3	27
3.3) VERIFICAÇÃO DOS MOMENTOS DAS ECDISES L3:L4 E L4:PUPA	28
3.4) DEFINIÇÃO DOS PONTOS EXPERIMENTAIS	28
3.5) BIOENSAIOS COM LARVAS SINCRONIZADAS	29
3.5.1) <i>Grupo controle</i>	30
3.5.2) <i>Grupo sentinela</i>	30
3.6) QUANTIFICAÇÃO DE QUITINA	30
3.7) ANÁLISES MOLECULARES	31
3.7.1) <i>Extração de RNA total</i>	31
3.7.2) <i>Purificação de RNA por precipitação com cloreto de lítio</i>	32
3.7.3) <i>Síntese de cDNA e PCR quantitativo em tempo real</i>	33
3.7.4) <i>Verificação da eficiência dos primers utilizados</i>	34
3.7.5) <i>Verificação da especificidade dos produtos gerados por qPCR</i>	34

3.8) ANÁLISES MORFOLÓGICAS PRELIMINARES	35
3.8.1) <i>Processamento histoquímico</i>	35
3.8.2) <i>Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)</i>	35
3.9) ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	36
4) RESULTADOS.....	37
4.1) MOMENTO DA ECDISE L2:L3 A 28 °C	37
4.2) MOMENTOS DAS ECDISES L3:L4 E L4:PUPA A 28°C.....	37
4.3) SUBDIVISÃO TEMPORAL DOS INSTARES (PONTOS EXPERIMENTAIS).....	38
4.4) VERIFICAÇÃO DO EFEITO DE NOVALURON SOBRE LARVAS DE <i>AE. AEGYPTI</i>	40
4.5) AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NOVALURON SOBRE O CONTEÚDO DE QUITINA DE IMATUROS	40
4.6) EFEITO DE NOVALURON SOBRE O PERFIL DE EXPRESSÃO DE <i>AACHS1</i>	44
4.6.1) <i>Especificidade dos produtos amplificados</i>	44
4.7) ANÁLISES MORFOLÓGICAS PRELIMINARES	51
5) DISCUSSÃO	55
6) CONCLUSÕES.....	64
7) ANEXO.....	65
8) REFERÊNCIAS	66

1) INTRODUÇÃO

1.1) Insetos, membros da classe Hexapoda

Cinco milhões de anos mais antigos que a espécie humana e seus maiores competidores por alimentos na face da Terra, os insetos ultrapassam de longe, em número, todos os outros animais terrestres (Borror *et al.*, 1989).

Na classe Hexapoda (seis pares de pernas), com cerca de 1.000.000 de espécies conhecidas, são descritas anualmente, desde 1978, cerca de 3.500 novas espécies (Rey, 2001; Brusca e Brusca, 2003). O sucesso evolutivo dos hexápodos, evidenciado pelo enorme número de espécies e por sua grande irradiação adaptativa, pode ser atribuído a vários fatores. Entre eles está a presença de um exoesqueleto quitinoso que serve de barreira entre os tecidos vivos e o ambiente. Além deste, a aquisição da habilidade de vôo, observada muitas ordens, concedeu aos hexápodos vantagem sobre os outros invertebrados (Ruppert e Barnes, 1996).

A classe Hexapoda é dividida em ordens com base na estrutura das asas e das peças bucais, na metamorfose e em vários outros caracteres. Há controvérsias entre os entomólogos sobre os limites de algumas ordens, mas este não é o caso da ordem Diptera (Borror *et al.*, 1989).

1.2) Ordem e família dos mosquitos

Os dípteros distinguem-se prontamente dos outros insetos alados por possuírem apenas um par de asas transparentes e funcionais, equivalente ao par anterior das outras ordens. O par posterior foi modificado para halteres, estruturas de tamanho reduzido que dão equilíbrio ao inseto durante o vôo (figura 1.1) (Forattini, 1996; Rey, 2001). Nesta ordem encontram-se as moscas, os simulídeos e os mosquitos (Brusca e Brusca, 2003).



Figura 1.1: Díptero da família Tipulidae com halteres evidentes (adaptado de <http://en.wikipedia.org/wiki/Haltere>).

A ordem Diptera pode ser dividida em duas subordens: Brachycera e Nematocera. A primeira reúne dípteros que possuem antenas com 3 a 5 segmentos. Já a segunda (antenas longas), engloba os dípteros que possuem antenas com mais de dez segmentos livremente articulados, como as famílias Culicidae (mosquitos), Simuliidae (borrachudos) e Psychodidae (flebotomíneos) (Serra-Freire e Mello, 2006).

Os insetos da família Culicidae são dípteros de pequeno porte, corpo delgado e pernas longas, vulgarmente chamados de mosquitos (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Por muitos séculos pensava-se que os mosquitos representavam apenas incômodo à população, por causa de suas picadas. Somente a partir do século XIX foram levantadas hipóteses sobre o papel dos culicídeos como transmissores de infecções (Forattini, 2002).

A importância epidemiológica destes insetos como vetores teve sua primeira comprovação nas últimas décadas do século XIX, quando se descobriu que a filariose bancroftiana e a malária eram transmitidas por mosquitos (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini, 2002). Sabe-se hoje que muitas espécies de culicídeos estão envolvidas na transmissão de arbovírus, protozoários e helmintos parasitos. Cerca de 3.500 espécies da família Culicidae são conhecidas (Rey, 2001).

Três subfamílias compõem a família Culicidae, são elas: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae. As duas primeiras têm grande importância médico-veterinária, pois as fêmeas desenvolveram o hábito da hematofagia, o que confere a estas subfamílias a propriedade de transmitir diversos tipos de agentes patógenos, encontrados no sangue dos hospedeiros (Clements, 1992; Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Rey, 2001).

1.3) Desenvolvimento dos mosquitos

Os mosquitos, culicídeos holometábolos, possuem um ciclo biológico composto por quatro estágios: ovo, quatro instares larvais, pupa e adulto (figuras 1.2 e 1.3). São fundamentalmente aquáticos e ganham o ambiente terrestre somente na fase adulta, onde fazem sua reprodução e dispersão. Suas larvas alimentam-se de matéria orgânica dissolvida e de microorganismos contidos no criadouro alagado (Borror *et al.*, 1989; Forattini, 1996).

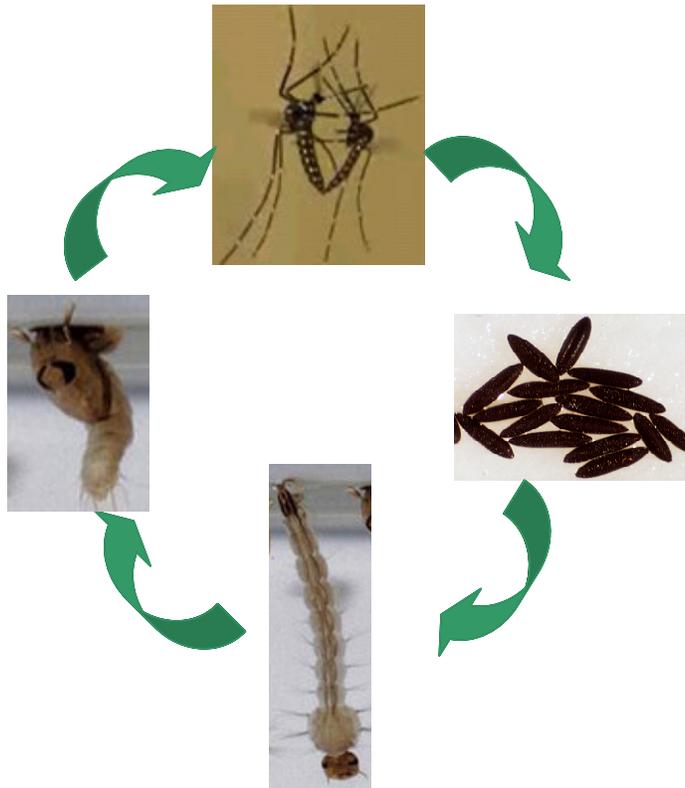


Figura 1.2: Esquema do ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti* (fotos de Genilton Vieira).



Figura 1.3: Larvas de 4º instar e pupas do mosquito *Ae. aegypti* (foto de Genilton Vieira).

As formas adultas são dióicas, aladas, e só estão prontas para realizar a cópula após o endurecimento do tegumento corporal. Em geral, apresentam dimorfismo sexual acentuado: os machos apresentam antenas plumosas e as fêmeas apresentam antenas pilosas e são muito mais corpulentas (Forattini, 1996).

A inseminação é interna, e os espermatozoides ficam armazenados na spermateca da fêmea até o momento da postura, quando ocorre a fecundação. Os mosquitos adultos alimentam-se da seiva elaborada dos vegetais. A postura de ovos depende de alimentação sanguínea (hematofagia), feita em animais vertebrados (Forattini, 2002).

1.4) Presença e importância da quitina nos mosquitos

A quitina é um homo-amino-polissacarídeo formado por monômeros de N-acetil-glicosamina (GlcNAc) ligados entre si através de pontes glicosídicas do tipo β 1-4 (figura 1.4). É considerada o segundo biopolímero mais abundante na natureza, estando presente em fungos, nematódeos e artrópodes. Os polímeros de quitina formam microfibrilas com cerca de 3 nm de diâmetro, estabilizadas por pontes de hidrogênio. Este biopolímero é considerado um dos principais componentes da cutícula dos mosquitos (Merzendorfer e Zimoch, 2003). A quitina não é encontrada em seu estado puro em cutículas, mas sempre em associação com proteínas.

Entretanto, a molécula de quitina pode ser separada de outros componentes da cutícula por digestão alcalina (Candy e Kilby, 1962).

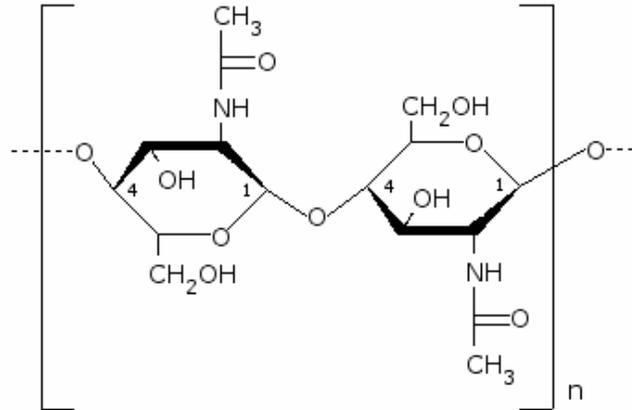


Figura 1.4: Estrutura da molécula de quitina (fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Quitina>).

A quitina não está presente apenas na superfície exterior do corpo dos insetos. Outras estruturas, por serem revestidas por cutícula, também possuem quitina em sua constituição. Este é o caso dos intestinos anterior (*estomodeum*) e posterior (*proctodeum*); dos tubos traqueais, de partes do sistema reprodutor (Reynolds e Samuels, 1996) e da cutícula serosa dos ovos dos insetos (Rezende *et al.*, 2008).

O intestino médio dos insetos (*mesodeum* ou *midgut*, do inglês) é a única estrutura que tem contato com o ambiente externo e não é revestida por cutícula. Entretanto, nesta região existe uma estrutura que também possui quitina em sua composição, chamada membrana peritrófica (MP) (figura 1.5). A MP funciona como uma “cápsula” que separa o alimento ingerido do epitélio intestinal, participando do processo digestivo e também da proteção do epitélio contra danos mecânicos, assim como do ataque de toxinas e patógenos ingeridos junto com o alimento (Lehane, 1997). Alguns insetos cessam completamente a produção da MP durante os períodos de jejum ou muda. Desta forma, a MP é expelida ou reabsorvida e outra membrana se forma quando o animal volta a se alimentar (Merzendorfer e Zimoch, 2003).

A MP pode ser de dois tipos, definidos de acordo com a região em que foi produzida (Lehane, 1997). A membrana peritrófica tipo I recobre todo o epitélio do intestino médio do inseto, e em muitos casos só pode ser formada em resposta à alimentação sanguínea. Já a membrana tipo II, produzida em uma região

especializada do intestino anterior chamada cárdia, forma uma camada contínua, que está sempre presente (Lehane, 1997).

Interessantemente, muitas espécies produzem diferentes tipos de MP em diferentes estágios de seu ciclo de vida. Por exemplo, larvas de mosquitos produzem MP tipo II, enquanto fêmeas adultas produzem MP tipo I em resposta à alimentação sanguínea. Essa observação sugere ação de pressões evolutivas que garantam correlação entre o tipo de MP e o hábito alimentar do inseto (Lehane, 1997). A membrana peritrófica tipo I dos mosquitos, é uma bainha extracelular semipermeável composta por um complexo de proteínas, glicoproteínas e proteoglicanas que se associam a microfibrilas de quitina (Clements, 1992; Tellam e Eisemann, 1998; Kato *et al.*, 2006). Entretanto, em alguns insetos, a quitina parece não ser um componente essencial da MP (Tellam e Eisemann, 2000).

Devido ao importante papel da quitina nos insetos esta molécula representa um alvo potencial para o desenvolvimento de inseticidas com novos mecanismos de ação: além de ser essencial para o desenvolvimento, crescimento e muitos aspectos fisiológicos dos insetos, não está presente nos mamíferos.

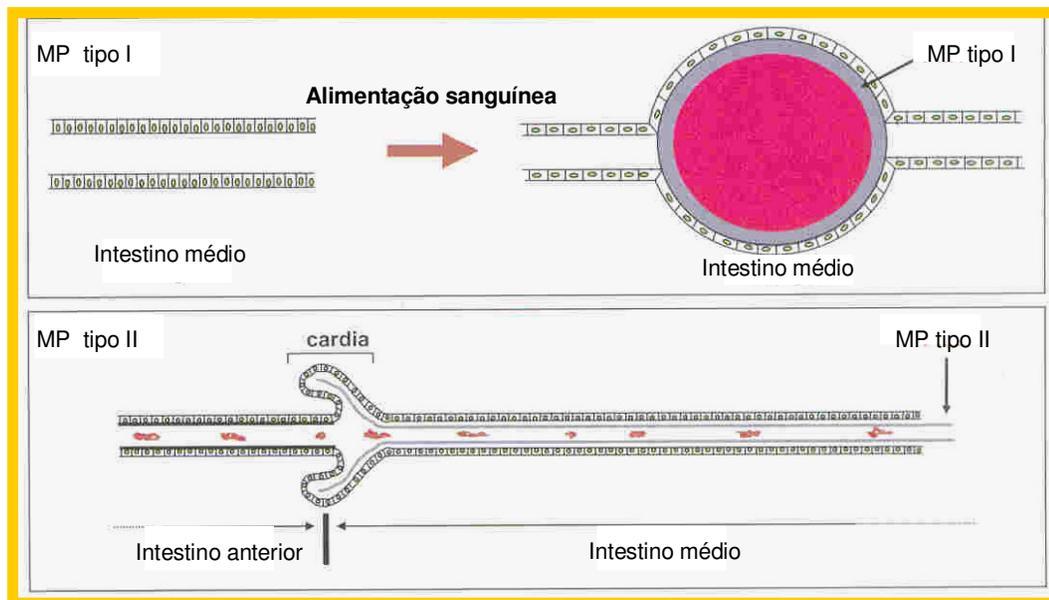


Figura 1.5: Esquema do intestino de insetos mostrando os locais de síntese de MP tipo I e MP tipo II. A MP tipo I envolve o sangue e, MP tipo II partículas de alimento (adaptado de Beaty e Marquardt, 1996).

1.4.1) A quitina Sintase

Candy e Kilby (1962) foram os primeiros a propor uma via biossintética de formação de quitina em insetos. Essa via começaria com glicose e chegaria até moléculas de UDP-GlcNAc que, em uma última reação enzimática, serviriam como doadoras dos monômeros de GlcNAc, usados para formar o polímero de quitina.

Posteriormente as quitina Sintases (CHS do inglês *chitin Synthase*), grandes enzimas da família das glicosiltransferases, foram indicadas como catalisadoras da polimerização dos monômeros de GlcNAc. Essas proteínas integrais de membrana têm domínio catalítico localizado na face citossólica da membrana plasmática (Hogenkamp *et al.*, 2005; Zhang e Zhu, 2006). Assim, os polímeros de quitina destinam-se ao meio extracelular, e chegam a esse meio provavelmente por atravessarem um poro formado pelos domínios transmembranares da quitina Sintase (Ostrowski *et al.*, 2002) (figura 1.6).

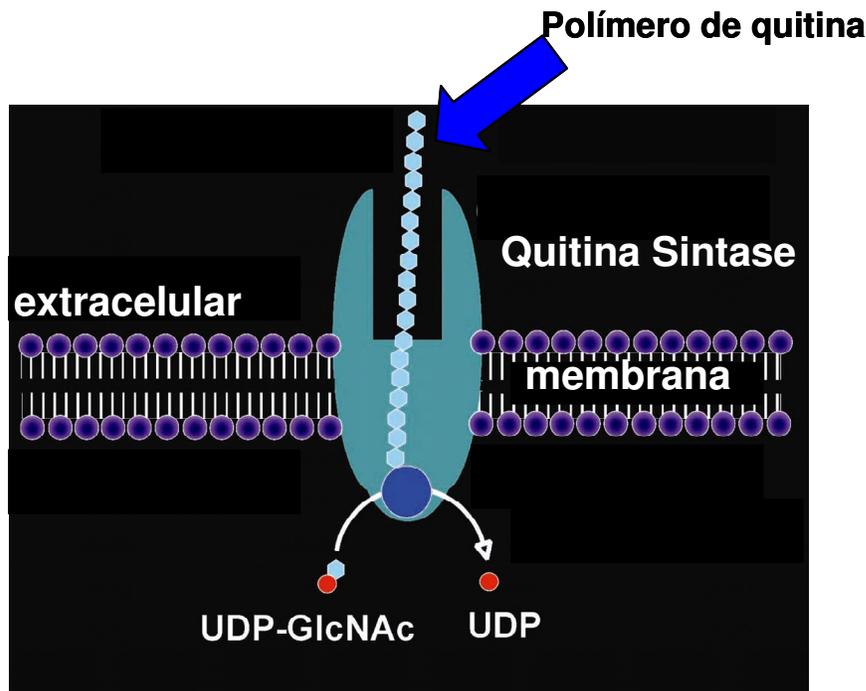


Figura 1.6: Esquema de localização e atuação da quitina Sintase na biossíntese de quitina (adaptado de Merzendorfer e Zimoch, 2003).

Em insetos, existem duas classes de quitina Sintase: enzimas de classe 1 sintetizam quitina para os tecidos epidermais, enquanto as de classe 2 são responsáveis pela síntese de quitina para o epitélio intestinal (Tellam *et al.*, 2000; Moussian *et al.*, 2005).

Estudos indicam que insetos parecem ter diferentes genes para codificar as duas classes de quitina Sintase. Thireos e Kafetzopoulos (1998) identificaram os primeiros genes de CHS em insetos: *DmeCHSA* e *DmeCHSB* no genoma do modelo *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830). Após o sequenciamento completo do genoma desta espécie, foi confirmado que somente duas sequências preditas de proteínas tiveram similaridade com as CHS de fungos, sugerindo que, em insetos, só existem dois genes que codificam esta enzima: *CHS1* (ou *CHSA*) e *CHS2* (ou *CHSB*) (Thireos e Kafetzopoulos, 1998; Adams *et al.*, 2000).

O primeiro cDNA que codifica *CHS* de inseto foi isolado e sequenciado por Tellam (2000) na mosca *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae). Subsequentemente, Ibrahim *et al.* (2000) descreveram um cDNA *CHS* classe 2 (ou classe B) no mosquito *Aedes aegypti*. Desde então, vários cDNAs destes genes têm sido isolados e sequenciados em diferentes espécies de insetos (Zhu *et al.*, 2002; Zhang e Zhu, 2006; Nene *et al.*, 2007; Rezende *et al.*, 2008). Acredita-se que genes *CHS1* e *CHS2* foram provavelmente derivados de um evento de duplicação gênica, ou seja, são genes parálogos (Zhang e Zhu, 2006).

Estudos de expressão gênica no coleóptero *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) e no lepidóptero *Manduca sexta* (Linne, 1763) mostraram que genes *CHS1* foram exclusivamente expressos na epiderme cuticular, enquanto que os genes *CHS2* tiveram sua expressão relacionada à síntese de membrana peritrófica (Tellam *et al.*, 2000; Merzendofer e Zimoch, 2003; Arakane *et al.*, 2004; Hogenkamp *et al.*, 2005; Moussian *et al.*, 2005; Zimoch *et al.*, 2005).

Foi relatado recentemente, para alguns insetos, que em transcritos de *CHS1* ocorre *splicing* alternativo, mutuamente exclusivo, resultando em dois RNAs diferentes, *CHS1a* e *CHS1b*, os quais têm expressão variada durante o desenvolvimento do inseto (Arakane *et al.*, 2004; Hogenkamp *et al.*, 2005; Zimoch *et al.*, 2005; Rezende *et al.*, 2008). Um fragmento do gene quitina Sintase de *Ae. aegypti* (*AaCHS1*) foi recentemente obtido (Rezende *et al.* 2008). Por meio de alinhamento com a sequência de aminoácidos do gene ortólogo de *D. melanogaster*, foi possível obter a composição do gene inteiro dentro do genoma de *Ae. aegypti*. A partir dessas análises foi descrito que *AaCHS1a* é composto por 10 *exons* e nove

introns, e que há edição alternativa dos exons 6a e 6b, resultando em diferentes sequências de aminoácidos para cada transcrito formado (Figura 1.7).



Figura 1.7: Representação esquemática do gene *AaCHS1* e dos dois transcritos resultantes de *splicing* alternativo (*AaCHS1a* e *AaCHS1b*). Retângulos em preto indicam os *exons* constitutivos, retângulos listrados, os *exons* mutuamente exclusivos e retângulos em cinza, os *introns*. Introns com barras brancas dentro estão fora de escala. A edição alternativa do RNAm de *AaCHS1* resulta em dois transcritos diferentes. A e B representam as duas opções para edição alternativa de transcritos *AaCHS1*: em *AaCHS1a*, o exon 5 se liga ao exon 6a que se liga ao exon 7; já em *AaCHS1b* o exon 5 se liga ao exon 6b que se liga ao exon 7 (adaptado de Rezende *et al.*, 2008).

1.5) A cutícula dos insetos

A cutícula dos insetos é secretada por uma camada única de células epiteliais tegumentares, conhecida como epiderme (Chapman, 1998). Esta camada, juntamente com a cutícula forma o tegumento, a cobertura externa dos tecidos vivos de todo artrópode (figura 1.8). Sobre a epiderme há uma procutícula espessa, sobreposta por uma delgada epicutícula externa. A epicutícula é composta de hidrocarbonetos, que perfazem uma cobertura lipídica (Chapman, 1998; Pedrini *et al.*, 2007).

O suporte do corpo dos insetos em si não é propiciado pela epicutícula, mas sim pela procutícula, que é composta de uma exocutícula externa e de uma endocutícula interna (figura 1.8). Ambas as camadas são compostas de interações covalentes, denominadas de ligações cruzadas (*crosslink* no inglês) de quitina e proteínas, sendo que na endocutícula essas duas biomoléculas interagem menos (Chapman, 1998). Isso ocorre porque a exocutícula pode ser esclerotizada, isto é,

ter sua estrutura molecular estabilizada ainda mais pela formação de ligações cruzadas complementares realizadas com a participação de fenóis derivados de tirosina (Clements, 1992).

A cutícula exerce um papel importante na redução da perda de água, fenômeno também relacionado à presença de cera na epicutícula (Pedrini *et al.*, 2007).

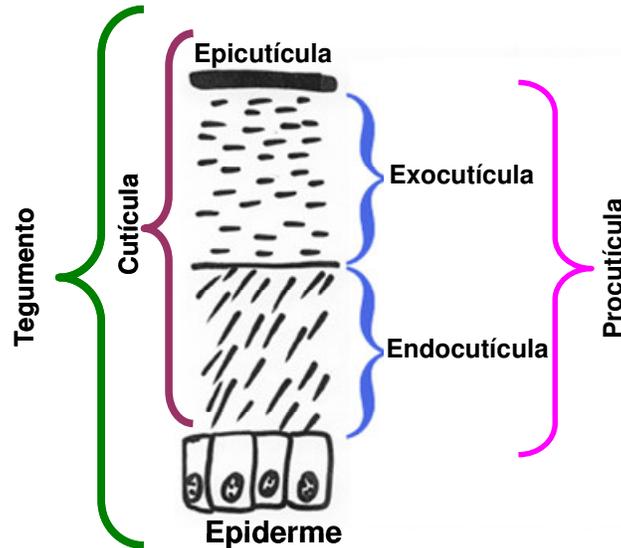


Figura 1.8: Esquema do tegumento dos insetos (adaptado de Chapman, 1998).

1.5.1) O processo de muda e a ecdise

Apesar das vantagens locomotoras e de sustentação de um esqueleto externo, esta estrutura pode representar problema para um indivíduo em crescimento. A solução encontrada pelos insetos para crescerem e se desenvolverem consiste na formação periódica de uma cutícula (ou exoesqueleto) de maior dimensão, e a subsequente eliminação da cutícula antiga, em um processo chamado muda. Os revestimentos cuticulares internos são também substituídos na época da muda (Clements, 1992; Merzendorfer e Zimoch, 2003).

A muda é um processo complexo envolvendo modificações hormonais, comportamentais, fisiológicas e morfológicas, e convém desde já diferenciá-la da ecdise, que é a etapa final do processo da muda. Após a expansão da nova cutícula, os insetos liberam seu antigo exoesqueleto (ou cutícula), agora chamado de exúvia; essa liberação é denominada ecdise (Carlson e Bentley, 1977).

O processo de muda propriamente dito começa com a retração das células epidérmicas em relação à superfície interna da cutícula antiga; este evento é

chamado apólise. Essa separação não é total porque os músculos e nervos mantêm sua conexão com a cutícula velha, permitindo que o inseto se movimente (Merzendorfer e Zimoch, 2003). A própria epiderme secreta um fluido que contém enzimas hidrolíticas inativas (como as Quitinases e Proteases), chamado de fluido de muda. Essas enzimas não promovem a digestão da endocutícula antiga até a nova procutícula indiferenciada ter sido formada (Chapman, 1998). Antes da ativação das enzimas hidrolíticas do fluido ocorre a formação da membrana ecdisal que separa a nova procutícula indiferenciada do fluido de muda e da endocutícula antiga (figura 1.9). O fluido de muda, após ser ativado, promove a degradação da endocutícula (Jungreis, 1973; Reynolds e Samuels, 1996). A maior parte dos produtos desta degradação vai para a cavidade oral e é subsequentemente acumulada no intestino. Entretanto, também pode ocorrer reabsorção direta de alguns produtos pela epiderme (Reynolds e Samuels, 1996; Yarema *et al.*, 2000).

Enquanto ocorre a degradação da endocutícula velha, a epiderme secreta uma nova procutícula por baixo da anterior. Esta procutícula futuramente irá se diferenciar em endocutícula e exocutícula (figura 1.9). Em paralelo a este processo, glândulas da epiderme formam ductos que conduzem as secreções que originarão a epicutícula (figura 1.9). Antes da eliminação da exúvia, o inseto está alojado dentro de dois “esqueletos”, o velho e o novo. As fibras que ancoram os músculos ao exoesqueleto não são digeridas durante o processo de muda; mantêm conexão entre os “esqueletos” novo e velho e só se rompem durante a ecdise, em função de alterações de pressão hidrostática do corpo (Merzendorfer e Zimoch, 2003).

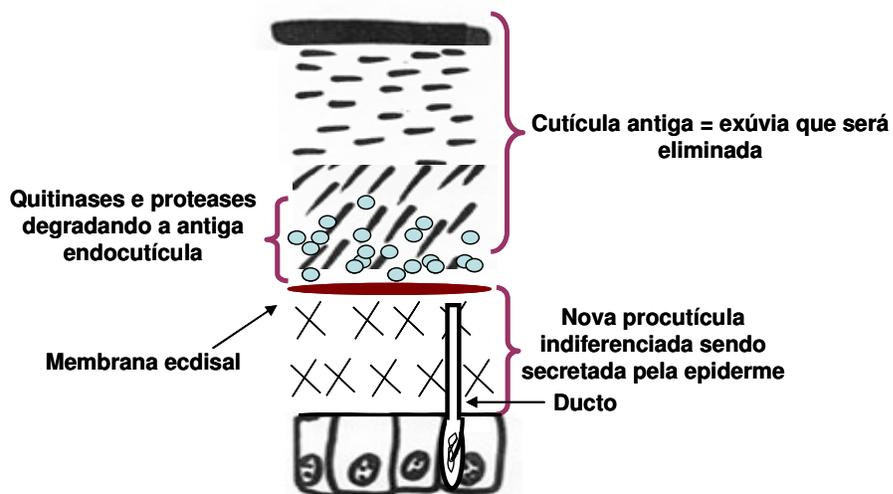


Figura 1.9: Esquema do processo de síntese de nova cutícula durante a muda (adaptado de Chapman, 1998).

O novo exoesqueleto do inseto após a ecdise é mole, enrugado e maleável, e estica-se para acomodar o tamanho aumentado do animal. Essa expansão é provocada pela pressão causada pelo aumento de tamanho dos órgãos internos, e é favorecida pela absorção de água. O consumo de água após a ecdise aumenta o volume do corpo do inseto e estica a nova cutícula ainda não enrijecida. O enrijecimento da nova cutícula resulta da esclerotização de proteínas (Clements, 1992). Os períodos entre ecdises são chamados instares e a duração de cada instar aumenta à medida que o inseto amadurece (Christophers, 1960).

1.5.2) O controle hormonal do processo de muda

A muda encontra-se sob controle hormonal (figura 1.10) (Wigglesworth, 1933; Merzendorfer e Zimoch, 2003). Três hormônios principais estão envolvidos no crescimento, desenvolvimento e muda dos insetos: hormônio protoracicotrópico (PTTH), hormônio juvenil e ecdisona (Tunaz e Uygun, 2004).

O hormônio juvenil, produzido no *corpus allatum* (órgão situado na base do cérebro), mantém os insetos na fase larvar, ou seja, com as características juvenis. A ausência deste hormônio é fator determinante para que o inseto chegue à fase adulta (Chapman, 1998).

A ecdisona, secretada pelas glândulas protorácicas, circula pela hemolinfa e atua diretamente sobre as células epidérmicas, induzindo a muda entre instares. A ecdisona orchestra a morfogênese durante os intervalos entre a apólise e a formação da nova cutícula, controlando não somente a produção das substâncias formadoras da nova cutícula, mas também as alterações de comportamento necessárias ao processo de muda (Tunaz e Uygun, 2004; Lourenço-de-Oliveira, 2005). A produção de ecdisona, por sua vez, é regulada pelo hormônio PTTH, produzido nas células neurosecretoras medianas do cérebro (*pars intercerebralis*) e armazenado no *corpus cardiacum*, ainda na região cefálica do inseto (Rybczynski e Gilbert, 1995).

A regulação hormonal tem um grande potencial no controle de insetos. Por essa razão, existem hoje, disponíveis no mercado, análogos e antagonistas de uma série de hormônios de insetos.

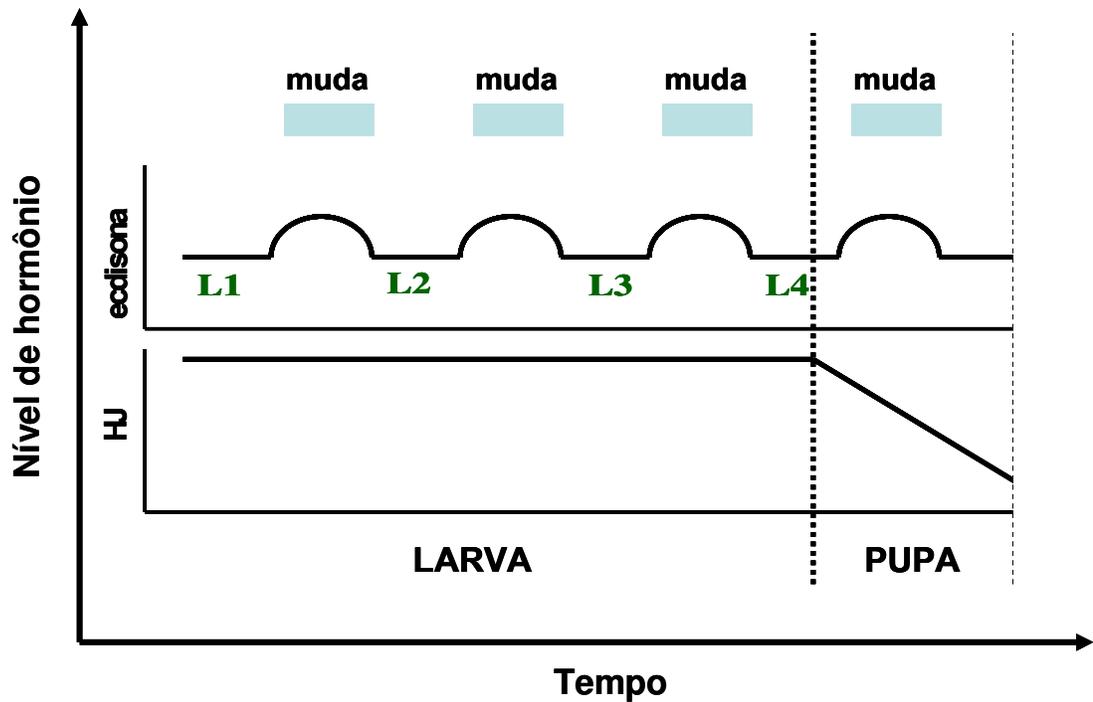


Figura 1.10: Esquema básico de controle hormonal das mudas ao longo do desenvolvimento de mosquitos.

1.6) O gênero *Aedes* e a transmissão de arboviroses

Os mosquitos do subgênero *Stegomyia* (Theobald, 1901), pertencentes ao gênero *Aedes*, são culicídeos da tribo Aedini. A espécie *Ae. aegypti* (figura 1.11) hoje faz parte da fauna culicídea das Américas; porém, sua chegada deu-se passivamente na época das grandes navegações, a partir do século XVI (Forattini, 2002).

Os principais vetores dos arbovírus mais epidêmicos são mosquitos que pertencem à tribo Aedini, incluindo três gêneros que ocorrem no Brasil: *Aedes*, *Psorophora* (Robineau-Desvoidy, 1827) e *Haemagogus* (Williston, 1876) (Forattini, 2002).



Figura 1.11: Mosquito *Ae. aegypti*, representante da tribo Aedini. (Fonte: www.faunabrasil.com.br)

Aedes aegypti é a espécie responsável pela transmissão da Febre Amarela Urbana, sendo também considerado o principal vetor do dengue. Este vetor é um "*container-breeding mosquito*", isto é, um mosquito que se cria preferencialmente em água depositada em recipientes. Não existe acordo sobre quais teriam sido os seus criadouros originais. Uns acreditam que tenham sido buracos de árvores e outros, buracos de rochas situados à sombra, sendo a adaptação florestal, secundária (Mattingly, 1957 *apud* Lima *et al.*, 1988). Seja esse habitat florestal primitivo ou secundário, o fato é que, na África, a espécie tem sido encontrada em tocos de árvores situados na periferia da floresta, o que sugere uma pré-adaptação a ambientes abertos, dos quais a cidade é o caso extremo (Lima *et al.*, 1988). Atualmente *Ae. aegypti* é encontrado principalmente no meio urbano, sendo colonizado em depósitos de armazenamento e coleções temporárias de água, como potes, barris, pneus, latas, garrafas e vasos de plantas (Nelson, 1986).

O mosquito *Ae. aegypti* pode se manter em dormência embrionária. Este fenômeno, vantajoso para proliferação da espécie, garante que o embrião permaneça viável dentro do ovo por meses, até que o ambiente torne-se favorável ao desenvolvimento da larva de primeiro instar (Forattini, 2002).

Aedes albopictus (Skuse, 1894) é considerado um vetor importante do dengue na Ásia e está mais associado à transmissão em meio rural ou semi-urbano. É o caso da epidemia de dengue registrada no Havaí, onde o único vetor encontrado foi *Ae. albopictus* (Hayes *et al.*, 2006). Estudos demonstram a capacidade deste vetor de se refugiar em florestas urbanas, podendo vir a transmitir ao homem arboviroses que eram restritas ao ambiente silvestre (Lourenço-de-Oliveira *et al.*, 2004).

Atualmente, *Ae. aegypti* é encontrado em ampla faixa do continente americano, desde o Uruguai até o sul dos Estados Unidos. No Brasil, está presente nos seus 26 estados e no Distrito Federal e continua sendo o único vetor confirmado na transmissão do dengue no país (SVS, 2006).

1.7) O dengue

O dengue tem se destacado entre as doenças re-emergentes e é considerada a mais importante das doenças virais que afeta o homem, dentre aquelas transmitidas por artrópodes (WHO, 1997; Rigau-Pérez *et al.*, 1998). O dengue ocorre em mais de 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa.

Ainda hoje dengue constitui-se em sério problema de saúde pública no Brasil, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do principal mosquito vetor desta doença, desde sua embriogênese até a fase adulta (OPAS, 2006; Lourenço-de-Oliveira, 2008; Farnesi *et al.*, 2009). No ano de 2008, somente no Estado do Rio de Janeiro, foram notificados 255.818 casos de dengue, com 172 mortes confirmadas e 141 sob investigação (SESDEC-RJ, 2008).

O dengue provoca uma doença febril aguda, de evolução benigna na forma clássica e grave na forma hemorrágica (Febre Hemorrágica do Dengue/FHD). Seu agente etiológico é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família Flaviviridae. Podem-se distinguir quatro sorotipos antígenicamente relacionados, que se designam como DENV-I, DENV-II, DENV-III e DENV-IV. Infecção por um determinado sorotipo produz imunidade por toda a vida contra re-infecção por este mesmo sorotipo, mas confere apenas proteção temporária e parcial contra os outros sorotipos (MS, 1994; WHO, 1997, 2002; OPAS, 2006).

Os esforços para desenvolvimento de uma vacina contra dengue começaram durante a Segunda Guerra Mundial, inspirados no êxito da vacina contra Febre Amarela, mas a falta de modelos adequados e a informação incompleta acerca dos mecanismos patogênicos têm dificultado os avanços deste tipo de pesquisa. Além disso, até o momento não existem drogas anti-virais efetivas para flavivírus como o dengue (Valero e Levy, 2008). Neste sentido, a maioria das medidas para controle da dengue são direcionadas à redução populacional de seu vetor *Ae. aegypti*.

1.8) Controle de vetores

A utilização de compostos químicos no controle de insetos tem registros milenares, como é o caso do enxofre inorgânico. Outras substâncias inorgânicas também foram utilizadas para este fim, como o arsenato, criolato e o ácido bórico. Alguns prejuízos são associados ao uso destes compostos, entre eles a grande persistência no ambiente, a acumulação nos tecidos orgânicos e a alta toxicidade (WHO 1997; Casida e Quistad, 1998). Apesar disto, antes da Segunda Guerra Mundial estas substâncias químicas eram utilizadas no combate aos insetos. Apenas algumas substâncias orgânicas de origem vegetal eram usadas para o

controle de pragas naquele período, como a nicotina, piretrina e rotenona (Graf, 1993; WHO, 1997).

A chamada “revolução dos pesticidas” se deu na década de 1940 e representou o início da era moderna dos pesticidas orgânicos. Neste momento as propriedades inseticidas do DDT (diclorodifeniltricloroetano) foram descobertas por Paul Müller em 1939, o que lhe rendeu o prêmio Nobel de medicina em 1948 (WHO, 1997; D’Amato *et al.*, 2002). A partir de então, o DDT passou a ser o principal inseticida utilizado, até a década de 1970, quando seu uso foi proibido em diversos países, devido aos seus efeitos tóxicos a mamíferos e ao meio ambiente (Beaty e Marquardt, 1996; D’Amato *et al.*, 2002).

O intuito das investidas contra vetores é diminuir a transmissão das doenças através da eliminação de parte da população de insetos infectados (Lima, 2003). Mosquitos vetores podem ser eliminados em diferentes etapas de seu ciclo. O controle das larvas pode ser feito pela eliminação de criadouros (controle físico), com a utilização de organismos naturalmente predadores dos mosquitos (controle biológico) ou com produtos capazes de matar os mosquitos (controle químico). O controle químico de vetores consiste na utilização de compostos que, aplicados direta ou indiretamente nos insetos, em condições adequadas, tem o objetivo de levá-los à morte (Neves *et al.*, 2001; Donalísio e Glasser, 2002).

Existe ainda o controle integrado de vetores, que inclui a vigilância entomológica, redução dos criadouros, controles químico e biológico, manejo da resistência a inseticidas, bem como as importantes campanhas de educação voltadas para a população (WHO, 2006; Braga e Valle, 2007).

1.8.1) Inseticidas químicos

A classificação dos inseticidas químicos é baseada tanto nos efeitos fisiológicos produzidos pela substância quanto pelo grau de similaridade química (WHO, 1984). Aqueles utilizados nos programas de controle de vetores estão agrupados em quatro grandes classes: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Todos estes compostos atuam no sistema nervoso central do inseto (Beaty e Marquardt, 1996).

1.8.1.1) Organoclorados

Inseticidas que contêm carbono, hidrogênio e cloro em sua estrutura química são chamados de hidrocarbonetos clorados, compostos orgânicos clorados, compostos clorados sintéticos, ou simplesmente organoclorados (OCs) (Ware e Whitacre, 2004). Estes compostos interferem com o balanço de íons sódio e potássio nos axônios dos neurônios, impedindo a transmissão normal do impulso nervoso.

Biologicamente, a ação dos OCs nos insetos resulta em alterações de comportamento, distúrbios sensoriais e do equilíbrio, depressão dos centros vitais, particularmente da respiração (D'Amato *et al.*, 2002).

O dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) é o mais conhecido dentre os inseticidas do grupo dos organoclorados. Embora compostos deste grupo tenham contribuído por muito tempo para o controle de vetores, particularmente o DDT, empregado eficientemente em campanhas antimaláricas e contra o tifo no período de 1940-1950, sua aplicação começou a ser banida (inicialmente no uso agrícola) em muitos países, inclusive no Brasil, a partir da década de 1970, em virtude de sua alta toxicidade (D'Amato *et al.*, 2002; Montella, 2008).

1.8.1.2) Organofosforados

Compostos organofosforados (OPs) são aqueles derivados do ácido fosfórico. Também são conhecidos como fosfatos orgânicos ou inseticidas fosforados. Estes compostos entraram no mercado em meados dos anos 1960 (Casida e Quistad, 1998). Este grupo de inseticidas foi usado com o propósito de combater pragas agrícolas, em consequência da resistência aos organoclorados. Os OPs foram posteriormente usados em Saúde Pública no controle de vetores (WHO, 1997). Muitos OPs são, atualmente, utilizados em programas de controle de mosquitos, como o fenthion, temephos e fenitrothion (WHO, 1997).

Os OPs agem através da inibição da ação da Acetilcolinesterase, uma importante enzima do sistema nervoso, responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina. A inibição da função desta enzima resulta no acúmulo de acetilcolina nas sinapses neuronais e neuro-musculares, impedindo a interrupção da propagação do impulso elétrico, provocando rápidas contrações nos músculos voluntários, que levam à paralisia seguida de morte (WHO, 1984; Ware e Whitacre, 2004).

No Brasil, desde 1967 OPs vêm sendo usados no combate ao *Ae. aegypti* (Braga *et al.*, 2004). Somente entre os anos 1996 e 2000 gastou-se no país, em média, cinco mil toneladas de temefos por ano (Zaim e Guillet, 2002). Seu uso intensivo, durante décadas, culminou com a perda da efetividade desta classe de inseticidas em várias regiões do país, devido ao desenvolvimento de resistência em populações do vetor (Lima *et al.*, 2003; Braga *et al.*, 2004).

1.8.1.3) Carbamatos

Os carbamatos são inseticidas derivados do ácido carbâmico, desenvolvidos em 1947 na Suíça; começaram a ser comercializados a partir da década de 1960 (WHO, 1997; Casida e Quistad, 1998). O primeiro produto desta classe utilizado com sucesso foi o carbaril que, por possuir baixa toxicidade aos mamíferos e um amplo espectro de ação sobre os insetos, tornou-se o mais popular dos carbamatos (Ware e Whitacre, 2004).

Assim como os organofosforados, os carbamatos são inibidores diretos da Acetilcolinesterase. Entretanto, a inibição da enzima pelos carbamatos é reversível e bastante rápida, raramente excedendo mais de uma hora. Desse modo, embora os sintomas da ação dos carbamatos sejam rápidos e severos, são curtos em relação aos efeitos dos organofosforados (WHO, 1984).

1.8.1.4) Piretróides

Os piretróides são análogos sintéticos do *piretrum*; compreendem uma mistura de vários ésteres chamados piretrinas, substâncias extraídas de flores pertencentes ao gênero *Chrysanthemum*, particularmente *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Ware e Whitacre, 2004).

A maioria dos piretróides apresenta mecanismo de ação similar ao do DDT, agindo também nos canais de sódio nas membranas neuronais, aparentemente, mantendo-os abertos. Isso faz com que as células nervosas produzam descargas elétricas repetitivas, causando eventualmente paralisia e morte (Ware e Whitacre, 2004; Ke Dong, 2007). Quando comparados com os organoclorados e organofosforados, apresentam baixo grau de toxicidade ao homem e a outros animais (Beaty e Marquardt, 1996).

O primeiro produto comercial, *allethrin*, foi bastante utilizado no mercado de saúde pública, especialmente no combate aos mosquitos. A primeira geração dos piretróides sintéticos (*phenothrin* e *tetramethrin*) era relativamente instável à luz, assim como as piretrinas naturais. A produção de piretróides estáveis à luz solar, como a *permetrina* e a *cipermetrina*, ocorreu durante a década de 1970 (WHO, 1997). Estes compostos, bastante eficazes, podem ser usados em pequenas concentrações, causando pouca contaminação do meio ambiente.

1.9) Resistência a inseticidas

Devido ao intenso uso de inseticidas no controle de artrópodes, muitas populações de vetores têm apresentado resistência a esses compostos (Ke Dong, 2007).

Resistência é a habilidade, em uma linhagem de um organismo, de tolerar doses de tóxicos que seriam letais para a maioria da população normal (susceptível) da mesma espécie (Beaty e Marquardt, 1996; Lima, 2003). Como a resistência é uma característica hereditária, é pertinente citar a definição de resistência de Crow (1957), no âmbito de contexto genético: "o marco na mudança da composição genética de uma determinada população em resposta à pressão de seleção" (IRAC-BR, 2008).

A resistência de um determinado organismo pode ser manifestada para dois ou mais compostos químicos distintos através da resistência cruzada e resistência múltipla. A primeira ocorre quando um único mecanismo confere resistência a dois ou mais compostos. Por outro lado, a resistência múltipla ocorre quando pelo menos dois diferentes mecanismos coexistentes conferem resistência a dois ou mais compostos químicos (IRAC-BR, 2008; Montella *et al.*, 2007). Atualmente, já foi detectada resistência a praticamente todos os grupos de inseticidas, incluindo os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides.

A resistência a inseticidas pode se dar através de diferentes mecanismos. Os tipos de resistência podem ser divididos, de maneira geral, em quatro categorias:

i) comportamental: é a habilidade do inseto de evitar o contato com o inseticida após a detecção do mesmo; pode ou não estar ligada a fatores genéticos (Sparks *et al.*, 1989), mas em geral é estímulo-dependente. Por ser relacionada à detecção do inseticida, esta forma de resistência geralmente ocorre com inseticidas

que são aplicados em iscas ou em superfícies, tais como o DDT (Lockwood *et al.*, 1984).

ii) penetração reduzida: alterações na cutícula do inseto podem reduzir a taxa de penetração do inseticida ao qual o indivíduo é exposto. Isso faz com que os mecanismos de detoxificação ativos no inseto metabolizem mais facilmente o inseticida, devido à pequena quantidade no organismo (IRAC-BR, 2008). É sabido que este mecanismo aparece geralmente em conjunto com outros mecanismos de resistência (Raymond *et al.*, 1989).

iii) resistência metabólica: é o aumento da eficiência dos mecanismos enzimáticos de detoxificação naturais do inseto. Este aumento promove a inativação e eliminação do inseticida, dificultando ou mesmo impedindo que o mesmo alcance seu sítio-alvo, ou seja, na maioria dos casos o sistema nervoso central do inseto (Brogdon e McAllister, 1998; Hemingway e Ranson, 2000).

iv) modificação do sítio-alvo do inseticida: pequenas modificações na molécula-alvo dos inseticidas podem diminuir ou anular a afinidade entre o inseticida e seu receptor no organismo do inseto (Beaty e Marquardt, 1996). Este é o caso da mutação do tipo *kdr*, que modifica o canal de sódio regulado por voltagem, reduzindo a sensibilidade neuronal a piretróides e DDT (Ke Dong, 2007).

Os insetos podem apresentar todos os mecanismos de resistência em um mesmo indivíduo, mas a resistência metabólica e/ou por alteração do sítio alvo responde pela maior parte dos casos de resistência relatados em artrópodes vetores (Montella, 2008).

1.10) Alternativas de controle

Devido ao grave problema da resistência a inseticidas, propostas alternativas para o controle de insetos vetores são urgentes e têm sido estudadas. Exemplos promissores de controle alternativo são os reguladores do desenvolvimento de insetos (IGR, do inglês *Insect Growth Regulators*), que compreendem, entre outros, os hormônios juvenis (HJ) e seus análogos sintéticos e os inibidores da síntese de quitina (CSI, do inglês *chitin synthesis inhibitor*).

1.10.1) Reguladores do crescimento de insetos (IGRs)

Substâncias são classificadas como reguladores do crescimento de insetos por terem efeitos em certos processos essenciais para a fisiologia desses invertebrados. O termo “IGR” foi criado por Staal (1975) com o intuito de descrever uma nova classe de compostos denominados biorracionais (substâncias capazes de acelerar ou inibir processos fisiológicos chave, essenciais ao desenvolvimento normal do inseto ou de sua progênie), definição que exclui os inseticidas tradicionais devido ao seu diferenciado mecanismo de ação (Siddal, 1976).

A ação prejudicial dos IGRs no desenvolvimento de insetos foi descoberta acidentalmente em culturas do percevejo *Pyrrhocoris apterus* (Linnaeus, 1758) (Slama e Williams, 1965). Uma substância presente no papel utilizado nos recipientes onde colônias destes insetos eram mantidas foi associada à baixa oviposição e à ocorrência de ninfas supranumerárias. Esta substância foi classificada como um análogo de hormônio juvenil (AHJ) derivado da planta *Abies balsamea* (Linnaeus, 1758), árvore utilizada nos EUA para produção de papel (Tunaz e Uygun, 2004).

Os IGRs não são necessariamente letais aos insetos-alvo, pois não têm como efeito primário a morte; atuam principalmente durante o desenvolvimento do inseto, interferindo com a muda e metamorfose (Beaty e Marquardt, 1996). Nesse sentido, os IGRs levam mais tempo para reduzir populações de insetos do que os inseticidas convencionais (Graf, 1993). Em contrapartida, esses compostos são seletivos em seu modo de ação e potencialmente atuam em alvos específicos de insetos, inexistentes em vertebrados (Tunaz e Uygun, 2004). Por serem endereçados a alvos distintos dos inseticidas convencionais, que atuam sobre o sistema nervoso, essas substâncias surgem como uma nova e promissora abordagem de controle (Graf, 1993; WHO, 2006).

Além de afetarem os estágios imaturos dos insetos, os IGRs também podem causar uma série de alterações em adultos resultantes de tratamento com doses subletais deste tipo de produto, resultando em grande redução da viabilidade dos insetos sobreviventes (Vasuki, 1992; Martins *et al.*, 2008; Belinato *et al.*, 2009).

Os IGRs podem ser agrupados em três categorias principais, com base em seus modos de ação: (1) hormônios juvenis e seus análogos, ditos juvenóides, (2) agonistas da ecdisona e (3) inibidores da síntese de quitina (CSIs) (Staal, 1975; Graf, 1993; Tunaz e Uygun, 2004).

1.10.1.1) Análogos de hormônio juvenil

Hormônios juvenis de insetos (HJ) foram primeiramente observados por Wigglesworth na década de 1930 (Graf, 1993). Existem vários tipos de HJ conhecidos, de modo que, qualquer distúrbio no balanço normal de um desses hormônios pode resultar em uma desordem crucial no desenvolvimento e/ou reprodução do inseto.

Os HJ são responsáveis pela regulação de processos-chave no inseto, como a embriogênese, muda, metamorfose, reprodução e diapausa (Chapman, 1998). Com base nestas informações, Williams (1956) postulou que os hormônios de insetos poderiam ser uma ferramenta excelente de controle, já que seria muito improvável que os insetos desenvolvessem resistência a substâncias endógenas (Williams, 1956).

Alguns problemas dos HJ são a instabilidade e a dificuldade de síntese, que poderiam interferir com sua utilização efetiva e em larga escala (Tunaz e Uygun, 2004). Uma série de análogos de HJ, compostos que exibem potencial para o controle mais seletivo de insetos, foram sintetizados de forma relativamente simples e se tornaram grandes atrativos. O primeiro análogo de hormônio juvenil (AHJ) introduzido no mercado foi o methoprene (Tunaz e Uygun, 2004); hoje outros AHJ, como piriproxifen e fenoxicarb, estão disponíveis (Mulla *et al.*, 1985; Vythilingam, 2005; Seng, 2006).

Methoprene é um dos AHJ mais representativos; é recomendado pela Organização Mundial de Saúde para uso em água potável, no controle de *Ae. aegypti* (Chavasse e Yap, 1997). Braga *et al.* (2005) comprovaram que o IGR methoprene é efetivo contra populações de *Ae. aegypti* do Brasil resistentes ao OP temephos, causando mortalidade principalmente no estágio de pupa. Entretanto, avaliação por simulado de campo de formulações deste AHJ disponíveis no mercado apresentaram baixo efeito residual nas condições climáticas do Brasil (Lima *et al.*, 2005).

1.10.1.2) Agonistas da ecdisona

Devido à gama de funções desempenhadas por hormônios envolvidos na ecdise, agonistas destes compostos administrados a insetos acarretam certamente uma série de problemas fisiológicos. Os agonistas da ecdisona (AgE) já foram

relacionados à síntese prematura de cutícula, podendo acarretar problemas nas peças bucais e conseqüente má alimentação na fase larvar (Boudjelida *et al.*, 2005).

Os AgE se ligam ao receptor, do mesmo modo que a ecdisona natural, ativando assim a transcrição gênica e o início da muda quando presentes, em momento fisiológico não necessariamente adequado ao inseto (Boudjelida *et al.*, 2005).

Assim como ocorre com outros IGR, adultos resultantes de doses subletais de AgE apresentam longevidade reduzida, diminuição do peso corporal e problemas reprodutivos (Darvas *et al.*, 1992; Heller *et al.*, 1992).

Esta classe relativamente nova de inseticidas também é considerada segura ao meio ambiente e para a maioria dos organismos não-alvo (Kreutzweiser *et al.*, 1994; Addison, 1996).

1.10.1.3) Inibidores da síntese de quitina (CSI)

Muitas substâncias são capazes de inibir a síntese de quitina *in vitro* e *in vivo*. São exemplos alguns fungicidas, herbicidas, hidrocarbonetos clorados, fenilcarbamatos e as benzo-fenil-uréias (BPU) (Hajjar, 1985). As polioxinas e nicomicinas são os mais bem estudados CSI, e são reconhecidos como inibidores da quitina Sintase (CHS), provavelmente ligando-se ao sítio catalítico da enzima (Ruiz-Herreira e San-Blas, 2003). O mais bem descrito CSI é a nicomicina Z, composto análogo ao substrato da quitina Sintase (UDP-N-acetil-glicosamina), que inibe irreversivelmente sua atividade (Gangishetti *et al.*, 2008).

Em relação ao controle de insetos, os BPU merecem destaque dentre os outros CSI. Seu potencial de interferência na síntese de quitina e conseqüente formação de cutícula foi descoberto acidentalmente pelo cientista Philips-Duphar no início da década de 1970, durante suas pesquisas com herbicidas (Graf, 1993). Benzoil-fenil-uréias foram utilizadas pela primeira vez na América Central em 1985, para controlar um grave surto de uma praga do algodoeiro (*Spodoptera* spp) que era resistente a quase todas as classes inseticidas convencionais (Ware e Whitacre, 2004).

O primeiro BPU averiguado tinha baixo potencial herbicida, mas, curiosamente, larvas de insetos que se alimentavam de plantas tratadas realizavam a muda com dificuldade, alguns dias depois da alimentação. Este resultado inesperado culminou com o desenvolvimento do diflubenzuron, o primeiro BPU

usado comercialmente (Graf, 1993). Inicialmente aplicado no controle de pragas agrícolas, foi depois utilizado em Medicina Veterinária, no controle de moscas. É considerado que diflubenzuron inibe a síntese de quitina *in vivo* (Marks *et al.*, 1982, *apud* Gamal *et al.*, 2004). O sucesso de diflubenzuron estimulou o desenvolvimento de outros BPU por várias empresas. Alguns exemplos são o flufenoxuron, triflumuron, e mais recentemente o novaluron.

A maioria dos BPU age principalmente sobre as larvas, que geralmente tornam-se incapazes de sobreviver à próxima muda, em razão de deficiências em sua nova cutícula (Tunaz e Uygun, 2004). Além do exoesqueleto, outras estruturas com constituição quitinosa, como a membrana peritrófica e os ovos (Clements, 1992; Rezende *et al.*, 2008) poderiam ser afetadas.

Existem vários relatos na literatura sobre a eficiência de BPU, como o diflubenzuron (Mian e Mulla, 1982; Graf, 1993), o lufenuron (Wilson e Cryan, 1997), o triflumuron (Sulaiman *et al.*, 1994; Smith e Wall, 1998; Rehini e Soltani, 1999; Martins *et al.*, 2008; Belinato *et al.*, 2009) e o novaluron (Su *et al.*, 2003; Giglio, 2008).

O preciso mecanismo molecular de ação dos BPU ainda não é conhecido (Cohen, 2001), o que gera muita discussão na literatura. Alguns autores sugerem que esses compostos atuam principalmente interferindo com a expressão ou bloqueando a ação da quitina Sintase (Cohen, 1987; Zhang e Zhu, 2006). Outros propõem que estes compostos interferem com a regulação hormonal da síntese de quitina, influenciando a produção de ecdisteróides (Fournet *et al.*, 1995). Outras hipóteses sugerem ainda que BPU possam atuar impedindo a translocação das microfibrilas de quitina na membrana plasmática (Nakagawa e Matsumura, 1994).

Hipóteses recentes apontam para uma interferência indireta dos BPU com a síntese de quitina. Seu alvo não seria a quitina Sintase propriamente dita, mas sim um transportador ABC (do inglês *ATP Binding Casset*)¹. Esse transportador, relacionado com fluxo de cálcio intracelular, interferiria com o transporte dos monômeros de GlcNac, atrapalhando de alguma forma a síntese de quitina (Abo-Eighar *et al.*, 2004; Gangishetti *et al.*, 2008). Até o momento, apesar dos esforços dos pesquisadores, o endereçamento molecular dos BPU ainda não está claro. Entretanto, frente à eficácia destes compostos e sua iminente utilização no controle

¹ Transportadores ABC: São proteínas integrais de membrana que tipicamente utilizam a energia celular (ATP) para translocar solutos através de membranas celulares. Essas proteínas podem transportar íons, açúcares, aminoácidos, polissacarídeos, hormônios, lipídeos e xenobióticos (Jones and George, 2003).

de *Ae. aegypti*, cada vez mais se faz necessário o entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de inibição da síntese de quitina causada por esses compostos.

Novaluron

Nas últimas décadas, este novo CSI da classe dos BPU tem se mostrado muito eficaz no controle de larvas das ordens de Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera e Diptera (Mulla *et al.*, 2003; WHO, 2003; Giglio, 2008).

Novaluron é pouco tóxico aos mamíferos e atóxico para aves, vermes do solo e microflora (WHO, 2003). Apesar de novaluron ter sido, por vezes, considerado tóxico aos invertebrados aquáticos, a baixa persistência do produto em sistemas aquáticos indica que não há exposição crônica significativa e que os riscos aos crustáceos, em longo prazo, são considerados aceitáveis (WHO, 2003).

A eficácia de novaluron contra mosquitos foi comprovada em espécimes de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) por Su *et al.* (2003), quando este BPU se mostrou igual ou superior a outro BPU utilizado nos EUA (diflubenzuron) (Mulla *et al.*, 2003). Neste mesmo trabalho foi confirmada a eficácia de novaluron sobre *Ae. aegypti*, sendo esta espécie mais susceptível ao composto do que *C. quinquefasciatus*. Trabalhos prévios de nossa equipe identificaram grande eficácia de novaluron sobre larvas de *Ae. aegypti* em condições de laboratório: a emergência de adultos foi completamente inibida com baixa concentração (4µg/L) deste BPU; novaluron também se mostrou eficaz sobre as populações de campo que apresentavam resistência a outros inseticidas químicos, como o larvicida temephos (Giglio, 2008).

De acordo com o Programa Nacional de Controle da Dengue / Ministério da Saúde (PNCD/MS) o larvicida temephos é a primeira escolha para o combate ao *Ae. aegypti*. Entretanto, em caso de resistência, o MS recomenda o uso de larvicidas alternativos que já foram avaliados pelo PNCD e aprovados para uso em água potável, entre eles o BPU novaluron (WHO, 2007; SVS, 2009). Vale ressaltar que diversas populações de *Ae. aegypti* do Brasil são resistentes ao larvicida temephos (Montella *et al.*, 2007). O Ministério da Saúde acaba de adquirir um BPU (diflubenzuron) para substituir temephos em populações resistentes (SVS, 2009).

A importância dos BPU para o controle de *Ae. aegypti* no Brasil, e a falta de conhecimento sobre seu mecanismo de ação, nos estimularam a investigar o efeito de um destes compostos (novaluron) em parâmetros importantes do

desenvolvimento larvar do vetor. O presente trabalho verificou os efeitos do BPU novaluron sobre a síntese de quitina e a expressão de um gene quitina Sintase (*CHS1*) em alguns momentos do desenvolvimento larvar, na tentativa de prover conhecimento sobre essa questão.

2) OBJETIVO

2.1) Objetivo geral

Investigar o efeito do inibidor de síntese de quitina novaluron na formação do exoesqueleto de larvas de *Ae. aegypti*.

2.2) Objetivos específicos

a) Acompanhar a cinética de desenvolvimento larvar, observando os momentos de ecdise a 28 °C.

b) Avaliar o efeito de novaluron, nas doses IE₂₀, IE₅₀ e IE₉₉, durante o intervalo de desenvolvimento dos 3° e 4° instares larvares, sobre:

b1) o conteúdo de quitina;

b2) o perfil de expressão de *AaCHS1a* e *AaCHS1b*;

b3) a estrutura do exoesqueleto e da membrana peritrófica.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Mosquitos

Foram utilizadas larvas de mosquitos *Ae. aegypti* da cepa Rockefeller, mantida continuamente no laboratório (LAFICAVE). Esta linhagem foi estabelecida em 1959 no Rockefeller Institute (Nova York, NY) e desde então é utilizada por laboratórios de todo o mundo como cepa de referência para susceptibilidade a inseticidas (Hartberg e Craig, 1970).

Para a manutenção da colônia do laboratório, ovos são estimulados a eclodir em água por uma hora. Grupos de aproximadamente 1.000 larvas são transferidos para bacias retangulares (33 X 24 X 8 cm) contendo um litro de água desclorada e alimentados, a cada três dias, com 1 g de ração para gatos (Friskies[®], Purina, Camaquã/RS). As pupas são recolhidas diariamente e transferidas para gaiolas cilíndricas de papelão, de 16,5 cm de diâmetro por 17,5 cm de altura. Os adultos são mantidos nestas gaiolas dentro do insetário, a 26 ± 1 °C e umidade relativa de 70-75%. A eles é fornecida continuamente solução de sacarose a 10%. Para a produção de ovos, fêmeas são alimentadas em cobaios, de acordo com procedimento aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA - Fiocruz). As fêmeas colocam seus ovos em recipientes com papel-filtro úmido. Assim, os ovos presos ao papel-filtro são expostos ao ar até que o papel seque e são estocados dentro do insetário.

3.2) Verificação do momento da ecdise L2:L3

Com os objetivos de sincronizar larvas para realização dos bioensaios com novaluron e de definir o momento adequado para o início de sua realização, acompanhamos o desenvolvimento das larvas de *Ae. aegypti* do 1° ao 3° instar.

Ovos dos estoques da colônia Rockefeller foram estimulados a eclodir, em grupos de aproximadamente 2.000, em copos plásticos com capacidade para 200 mL, contendo cerca de 100 mL de água de criação (água retirada das bacias com larvas) por 30 minutos a $28 \pm 0,5$ °C.

Para cada experimento, 500 larvas recém-eclodidas (L1) foram transferidas para bacias de criação e alimentadas como descrito no item 3.1. As bacias com as larvas foram mantidas em estufas do tipo BOD a $28 \pm 0,5$ °C e fotoperíodo controlado (12 horas de claro / 12 horas de escuro). A ecdise L2:L3 foi acompanhada, a cada hora, a partir de 40 horas de desenvolvimento. Para efeito da

experimentação, considerou-se como início da ecdise L2:L3 o momento da muda das primeiras larvas. Nessas condições, a ecdise ocorreu 48 horas após a eclosão dos ovos (48 HAE). Em função da grande sincronia no desenvolvimento, este também pode ser considerado o ponto em que cerca de 50% dos espécimes atingem o 3º instar, como ilustrado na figura 4.1 da seção Resultados. Este foi o ponto do início da preparação dos bioensaios (ver item 3.5).

O acompanhamento da ecdise foi feito por contagem de exúvias, e este foi o parâmetro utilizado para definição dos instares larvais (Wigglesworth,1973).

3.3) Verificação dos momentos das ecdises L3:L4 e L4:pupa

Assim que as larvas atingiram o 3º instar (L3, 48 HAE, ver item 3.2), foram transferidas para copos plásticos transparentes com capacidade para 300 mL (10 larvas/copo) contendo 150 mL de água filtrada e pequena quantidade de comida (aproximadamente 0,15 g por copo). Essa quantidade de comida, suficiente para todo o período do ensaio, foi aplicada apenas no início, no momento da montagem dos copos.

Uma vez que acetona é utilizada como solvente do novaluron, como controle interno, acrescentou-se até 120 µL deste solvente em cada copo com 150 ml de água, proporção superior ao máximo utilizado nos bioensaios. Não foi verificada, nestas condições, alteração no tempo de desenvolvimento larvar. Foram realizados cinco experimentos para cada condição (150 ml água desclorada + 120 µL acetona pura ou apenas água desclorada); aproximadamente 50 larvas foram utilizadas em cada experimento.

Nas duas condições (copos com água ou copos com água e acetona), o desenvolvimento larvar foi acompanhado até a pupação de todos os indivíduos. A exemplo da ecdise L2:L3, considerou-se como início da ecdise L3:L4 o momento em que os primeiros espécimes atingiam o 4º instar. Nessas condições, a ecdise L3:L4 ocorreu 70 horas após a eclosão dos ovos (ver figuras 4.2 e 4.3). O mesmo racional foi utilizado para definir o momento da ecdise L4: pupa, que foi observado 100 HAE (ver figuras 4.2 e 4.3).

3.4) Definição dos pontos experimentais

Uma vez que os objetivos deste trabalho estão diretamente relacionados com o processo de muda (evento fisiológico que se inicia em torno da metade do tempo de duração de cada instar/estágio), julgamos necessário subdividir

temporalmente cada instar larvar avaliado. Esta subdivisão temporal teve como objetivo definir pontos experimentais que representassem o começo, o meio e o fim de cada instar. Para tanto, utilizamos os dados de acompanhamento das ecdises, obtidos previamente (figuras 4.1 e 4.2).

Neste trabalho consideramos como tempo total de duração de cada instar o intervalo entre duas ecdises (ver itens 3.2 e 3.3). Tomando como base esses intervalos, definimos arbitrariamente os pontos experimentais. As larvas consideradas “iniciais” (L3i ou L4i) foram coletadas cinco horas² após a ecdise. A coleta de larvas “finais” (L3f ou L4f) foi realizada duas horas antes da ecdise para o instar (ou estágio) subsequente. O ponto de coleta “intermediário” (L3int ou L4int) foi estipulado como a metade do tempo de duração de cada instar. Entretanto, para o 4° instar (L4int), por conveniência técnica, a coleta foi realizada com atraso de 7,5 horas (ver item 4.3 e figura 4.3).

3.5) Bioensaios com larvas sincronizadas

Larvas L3 recém-eclodidas foram expostas continuamente ao novaluron 100CE (Rimon® - AGRICUR). Foram utilizadas três concentrações, definidas por meio de análise Probit: 0,10 µg/L, 0,14 µg/L e 0,30 µg/L. De acordo com trabalho anterior do LAFICAVE, estas concentrações equivalem, respectivamente, às IE₂₀, IE₅₀ e IE₉₉ para *Ae. aegypti* (Giglio, 2008).

Em cada bioensaio e para cada concentração foram utilizados 24 copos com 150 mL de solução de novaluron, preparados como descrito no item 3.3.

Quinze minutos depois da preparação, as larvas L3, previamente separadas em grupos de 10 em copinhos de 50 mL, eram transferidas para os copos com novaluron, com auxílio de uma peneira de nylon (Falcon n° de catálogo 2350). A preparação deste teste tinha, em média, a duração de três horas. Com isto, as larvas L3 entravam em contato com o inseticida 51 horas após a eclosão dos ovos (51 HAE). Estes bioensaios foram realizados segundo protocolo já estabelecido no laboratório (Martins *et al.*, 2008), com pequenas modificações, das quais a principal foi manutenção dos copos em estufas BOD a 28 ± 0,5 °C e fotoperíodo controlado (12 horas de claro / 12 horas de escuro).

Após exposição a novaluron, larvas dos grupos experimentais e controle foram coletadas nos momentos definidos previamente (L3i, L3int, L3f, L4i, L4int e

² Cinco horas depois da ecdise foi o tempo médio gasto com a preparação dos bioensaios (ver item 3.5)

L4f, ver item 4.3 e figura 4.3) e então estocadas em freezer a -70 °C ou fixadas em formalina Millonig (Carson *et al.*, 1973) para análises posteriores. Todos os testes foram repetidos no mínimo três vezes.

3.5.1) Grupo controle

Larvas expostas às mesmas condições, mas sem novaluron, foram utilizadas como grupo controle. Na preparação destes copos, no lugar do BPU, adicionava-se 90 µL de acetona, equivalente ao maior volume de solução de novaluron adicionado aos copos experimentais dos bioensaios.

3.5.2) Grupo sentinela

Com o objetivo de monitorar a inibição de emergência (IE) esperada para cada concentração testada, em paralelo a cada ensaio, foram preparados dois copos nas mesmas condições do grupo experimental, utilizados como grupo sentinela. Neste grupo, os testes foram acompanhados até que não se observasse larvas e/ou pupas vivas para contabilizar o percentual de IE.

3.6) Quantificação de quitina

Para estudar o efeito de novaluron sobre o conteúdo de quitina das larvas, foram utilizadas 15 larvas expostas a cada condição. Estas larvas foram coletadas em momentos específicos do desenvolvimento, como definido anteriormente.

O conteúdo de quitina das larvas foi avaliado por meio de quantificação de derivados de glicosamina, subproduto de quitina obtido pela desacetilação de monômeros de N-acetil-glicosamina (GlcNac). A quantificação de glicosamina foi feita de acordo com Lehmann e White (1975) e Zhang e Zhu (2006). A técnica, resumidamente, consiste de digestão alcalina da quitina que é convertida em quitosana (por desacetilação) pela ação conjunta de temperatura elevada (130 °C) e alta concentração alcalina (KOH a 14 M). Aldeídos derivados da quitosana (glicosamina desacetilada) são então gerados em reação com o ácido nitroso (HNO₂) e, ao final do processo, os grupamentos derivados de glicosamina reagem com Fe⁺³ e são dosados colorimetricamente (figura 3.1).

O conteúdo de quitina foi expresso em equivalentes de glicosamina, de acordo com curva padrão construída usando concentrações conhecidas de glicosamina sintética (Sigma-Aldrich). Antes da quantificação de quitina, o peso

corporal das larvas foi determinado, para normalização do resultado (expresso em μg de glicosamina por mg de larva).

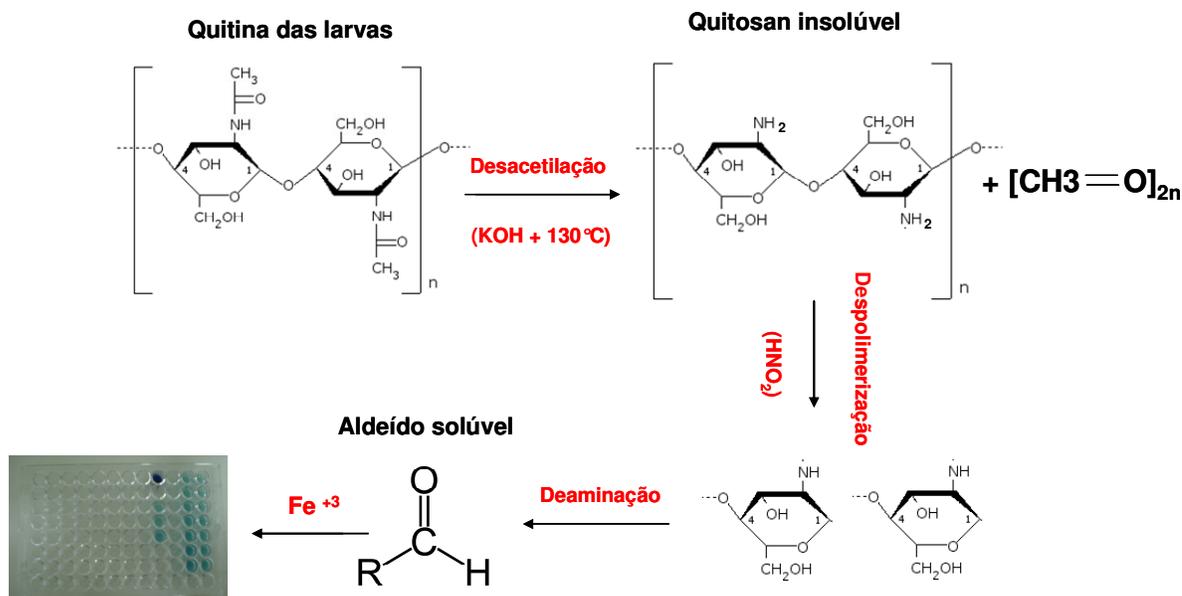


Figura 3.1: Esquema do ensaio de dosagem de quitina em larvas de *Ae. aegypti*. As etapas de deaminação e de despolimerização foram separadas didaticamente (adaptado de Lehmann e White, 1975).

3.7) Análises moleculares

A variação do nível de expressão de RNAm de *AaCHS1a*, *AaCHS1b* e do gene constitutivo *rp49*, em resposta ao tratamento com novaluron, foi avaliada por PCR quantitativo em tempo-real (qPCR).

3.7.1) Extração de RNA total

RNA total das larvas foi obtido utilizando o método de extração com tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio proposto por Chomczynski e Sacchi (1987), com o reagente comercial Trizol® (Invitrogen) (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina) que mantém a integridade de RNAs enquanto destrói as células e os componentes celulares.

O processo de extração iniciou-se com a maceração manual das larvas (cinco larvas por condição testada) em 50 µL de Trizol, com auxílio de pistilo plástico previamente tratado com dietil-piromcarbonato (DEPC) a 0,1% (v/v) para inativação de Ribonucleases (RNAses). Em seguida foram adicionados 950 µL de Trizol e o homogenato foi mantido por cinco minutos à temperatura ambiente. Depois da adição de 200 µL de clorofórmio, os tubos foram agitados vigorosamente e deixados à temperatura ambiente por mais quatro minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15' em centrífuga refrigerada a 4 °C, separando duas fases. A fase superior (aquosa) de cada amostra foi transferida para novos tubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 500 µL de isopropanol (Merck). Os tubos foram agitados vigorosamente e mantidos à temperatura ambiente por mais dez minutos, seguidos por nova etapa de centrifugação a 12.000 g por 10' a 4 °C. Neste momento pôde-se observar, ao fundo de cada tubo, um precipitado (RNA total), e os sobrenadantes foram descartados.

Os precipitados foram lavados com 1mL de etanol a 70%, seguido de vigorosa agitação e centrifugação a 10.000 g por 10' a 4 °C. Após descarte dos sobrenadantes, os tubos foram mantidos abertos em termobloco a 60 °C por cerca de 5' para a secagem do precipitado.

3.7.2) Purificação de RNA por precipitação com cloreto de lítio

A etapa de purificação da solução de RNA total foi incluída com o intuito de retirar contaminantes das amostras, que poderiam inibir a atividade da enzima Transcriptase Reversa nas etapas seguintes, de síntese de cDNA (Gentile, 2007).

Para tanto, foram adicionados ao precipitado seco de cada amostra 100 µL de água Milli-Q, previamente tratada com DEPC a 0,1% (v/v). Os tubos foram incubados a 60 °C por 10'. A cada amostra foram adicionados 50 µL de LiCl a 7,5 M, os tubos foram agitados vigorosamente, deixados por 30' a -20 °C, para acelerar a precipitação do RNA e submetidos à centrifugação por 20' a 15.700 g a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados, e os precipitados lavados com 500 µL de etanol 70% gelado, seguido de agitação vigorosa e centrifugação por 20' a 15.700 g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o RNA purificado, seco a 60 °C em termobloco por cerca de 5'.

O RNA purificado foi ressuspenso em 320 µL de água Milli-Q (32 vezes diluído, vide item 3.7.4), previamente tratada com DEPC a 0,1% (v/v). O volume de água utilizado foi estabelecido por testes prévios.

3.7.3) Síntese de cDNA e PCR quantitativo em tempo real

DNA complementar (cDNA) das amostras foi utilizado como modelo para a análise por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). A primeira fita do cDNA foi sintetizada com o kit para transcrição reversa *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems), que contém o iniciador oligo-d(T)18, utilizando 3,8 µL do RNA total de cada amostra em uma reação de 10 µL de volume final, de acordo com as especificações do fabricante.

O perfil de expressão dos transcritos de *AaCHS1* foi obtido por qPCR. As reações de qPCR foram conduzidas no equipamento Applied Biosystems Step One™ Real Time PCR System com o fluoróforo *Power SYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems). Em todas as reações foram utilizados os seguintes *primers* específicos para *AaCHS1*:

- *AaCHS1a*: **Forward** = 5' CAAGGACAATATCCACGTCAAG3'

Reverse = 5' AGGCCAAGATATGCGACAG 3' (Rezende *et al.*, 2008)

- *AaCHS1b*: **Forward** = 5' GCCGTTGGGCGTCAA 3'

Reverse = 5' GATCGGTTCCAACCTGGAGGTACT 3'

Os *primers* 5aeexpRP (**Forward** = 5'GCTATGACAAGCTTGCCCCCA 3') e 3aeaquaRP1b (**Reverse** = 5' TCATCAGCACCTCCAGCTC 3') (Gentile *et al.*, 2005) foram utilizados para amplificar o gene da proteína ribossomal 49 (*rp49*), de expressão constitutiva, usado como um controle endógeno, ou seja, normalizador interno. Após a normalização, os níveis de expressão dos transcritos *AaCHS1a* e *AaCHS1b* de larvas L3 iniciais não tratadas foram utilizados arbitrariamente como calibradores da expressão dos demais transcritos de quitina Sintase avaliados. Isto porque larvas L3 iniciais apresentaram o menor nível de expressão dos transcritos de *AaCHS1*. A curva final de expressão dos transcritos de *AaCHS1* foi estabelecida pela média das curvas normalizadas de cada experimento.

Todas as reações de qPCR foram feitas em volume final de 20 µL a 95 °C por 10', seguidos por 40 ciclos de 15" a 95 °C e 30" a 60 °C. Os dados foram coletados na etapa de 60 °C. Foi feito um protocolo de dissociação das duplas fitas formadas a partir de 60 °C, depois de 40 ciclos, utilizando-se a temperatura de fusão (T_m), para verificação da especificidade dos produtos formados.

A expressão de *AaCHS1a* e *AaCHS1b* foi obtida de larvas coletadas de três experimentos, em dias diferentes (triplicatas biológicas), tanto para os controles

quanto para o tratamento com novaluron. Em cada experimento foram feitas três réplicas técnicas para cada condição (L3i, L3int, L3f, L4i, L4int e L4f) e para cada gene avaliado (*rp49*, *AaCHS1a* e *AaCHS1b*).

3.7.4) Verificação da eficiência dos *primers* utilizados

Devido às diferenças fisiológicas e de tamanho entre os instares L3 e L4, julgamos necessário estabelecer, para cada instar, uma curva padrão. Para cada par de oligonucleotídeos (*primers*) utilizados nas reações de qPCR foram utilizadas seis diluições seqüenciais de RNA (1, 2, 4, 8, 16 e 32 vezes), a partir de uma mesma amostra, ressuspendida em 10 µL de água Milli Q. Com cada diluição de RNA procedeu-se à síntese de cDNA e às reações de qPCR essencialmente como descrito no item 3.7.3. Com estas curvas padrão foi possível estabelecer o volume ideal para ressuspendar o RNA de cada instar sem que houvesse inibição da síntese de cDNA por excesso de RNA. Estas curvas também foram utilizadas nos cálculos de eficiência absoluta e relativa dos jogos de *primers* de acordo com o *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR - Applied Biosystems (2004)*: como critério arbitrário, a eficiência absoluta dos *primers* é considerada satisfatória quando acima de 90%; já os valores de inclinação da curva de eficiência dos *primers* experimentais (em nosso caso, *AaCHS1a* e *AaCHS1b*) em relação aos *primers* do gene normalizador (utilizamos *rp49*) têm que estar entre 0,1 e -0,1.

Para o cDNA de larvas L3 a eficiência absoluta dos jogos de *primers* utilizados para amplificar os genes *AaCHS1a*, *AaCHS1b* e *rp49* foi um pouco menor que o mínimo recomendado, de 85,4, 82,2 e 89,5% respectivamente. Com estes valores, obteve-se inclinação das curvas de eficiência relativa entre 0,1 e -0,1. Já para o cDNA de larvas L4 a eficiência absoluta dos *primers* *AaCHS1a*, *AaCHS1b* e *rp49* foi respectivamente 87,8, 77,5 e 99,4%, o que resultou em valores não satisfatórios de inclinação das curvas

3.7.5) Verificação da especificidade dos produtos gerados por qPCR

Após as reações de qPCR, os produtos gerados foram submetidos a curvas de dissociação, por meio das quais foi possível identificar a temperatura de dissociação (T_m) de cada produto e a eventual formação de produtos inespecíficos. Este controle foi incluído porque o *SYBR® Green* poderia emitir fluorescência ao se

ligar inespecificamente a qualquer dupla fita de DNA, interferindo na interpretação do sinal.

Os produtos (*amplicons*) gerados foram também submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Foram utilizados 200 ng do marcador de peso molecular Ultra Low Range (Fermentas®). O gel foi corado com brometo de etídio a 1 µg/mL.

3.8) Análises morfológicas preliminares

Larvas coletadas em momentos específicos do desenvolvimento foram fixadas em formalina 10% tamponada (Millonig), pH 7,3, modificado por Carson *et al.* (1973) e estocadas a 4 °C.

3.8.1) Processamento histoquímico

As larvas foram processadas seguindo-se as técnicas histológicas de rotina do Laboratório de Patologia do IOC para inclusão em parafina, com algumas modificações. Resumidamente, o material foi submetido a lavagens seriadas (30' cada) em solução de etanol a 30, 50 e 70%, seguidas de imersão em etanol a 96% por 5 horas. As amostras foram então colocadas em processador histotécnico Shandon Citadel 2000, onde passaram por seis banhos de uma hora em etanol absoluto, dois banhos de uma hora em xilol e finalmente dois banhos de uma hora em parafina a 56 °C. Cortes de 5 µm foram obtidos em micrótomo rotativo, tendo sido coletados em lâminas previamente tratadas com adesivo silano e posteriormente submetidas à coloração.

3.8.2) Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)

Para remoção da parafina, os cortes foram submetidos a três banhos de xilol, hidratados em uma série de concentrações decrescentes de álcool etílico (dois banhos a 100%, um a 95% e um a 70%) e lavados em água destilada. Procedeu-se à coloração pela hemalúmem de Mayer, por 25 minutos, que foi seguida de lavagem em água corrente por 20 minutos. Posteriormente, os cortes foram desidratados em álcool a 70% e submetidos à coloração por eosina-floxina, durante 1 minuto. Após rápida lavagem em álcool a 95%, os cortes foram desidratados em três banhos de álcool etílico a 100%, clarificados em três banhos de xilol e montados com lamínulas, usando-se Goma de Damar. Microscopia de campo claro e captura de imagens, em cortes corados com HE, foram empregadas para avaliação geral da

preservação morfológica das larvas. Foram utilizados microscópio Zeiss Axioplan e câmera de vídeo Zeiss mRC5.

3.9) Análise estatística dos resultados

Para todos os experimentos calculou-se média e desvio padrão, indicados nos gráficos apresentados. Foram utilizados o teste t de *Student* ($P < 0,05$) e análises de variância (ANOVA; $P < 0,05$) na quantificação bioquímica de quitina e nas comparações de nível de expressão gênica de *AaCHS1*.

4) RESULTADOS

4.1) Momento da ecdise L2:L3 a 28 °C

Para a concretização deste trabalho foi preciso sincronizar ao máximo as larvas antes da realização dos bioensaios (vide metodologia). Em nossas condições, o início da ecdise L2:L3 ocorreu 48 horas após a eclosão dos ovos (48 HAE). Devido à sincronia no desenvolvimento de larvas L3, também neste momento aproximadamente 50% dos espécimes atingiam o 3º instar (figura 4.1).

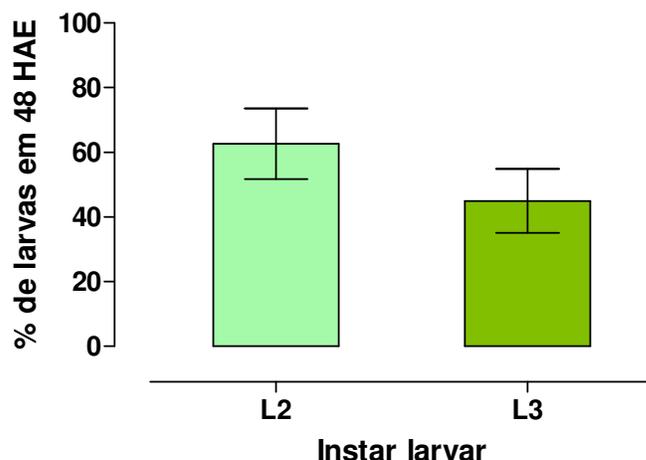


Figura 4.1: Proporção de larvas *Aedes aegypti* L2 e L3, 48 horas após a eclosão (HAE) a 28 °C. As barras do gráfico representam as médias e os desvios padrão de quatro experimentos. A contagem de exúvias foi utilizada como parâmetro de definição de instares.

4.2) Momentos das ecdises L3:L4 e L4:pupa a 28 °C

O desenvolvimento larvar foi acompanhado até a pupação de todos os indivíduos. Em nossas condições, o início da ecdise L3:L4 ocorreu 70 horas após a eclosão dos ovos (figura 4.2). O mesmo racional foi utilizado para definir o momento da ecdise L4: pupa, que foi observado 100 HAE (figura 4.2). Foi percebida grande sincronia na ecdise L3:L4: cinco horas após a ecdise das primeiras larvas L4 (75 HAE), 100% dos espécimes já haviam atingido o 4º instar (figura 4.2). Diferentemente, não foi observada sincronia na ecdise L4:pupa; enquanto as primeiras pupas se formaram a partir de 100 HAE (figura 4.2), este evento só se completou 44 horas depois, com 144 HAE (dados não mostrados, representados graficamente na figura 4.3). Com isto, o tempo de duração do 4º instar variou entre 30 e 74 horas.

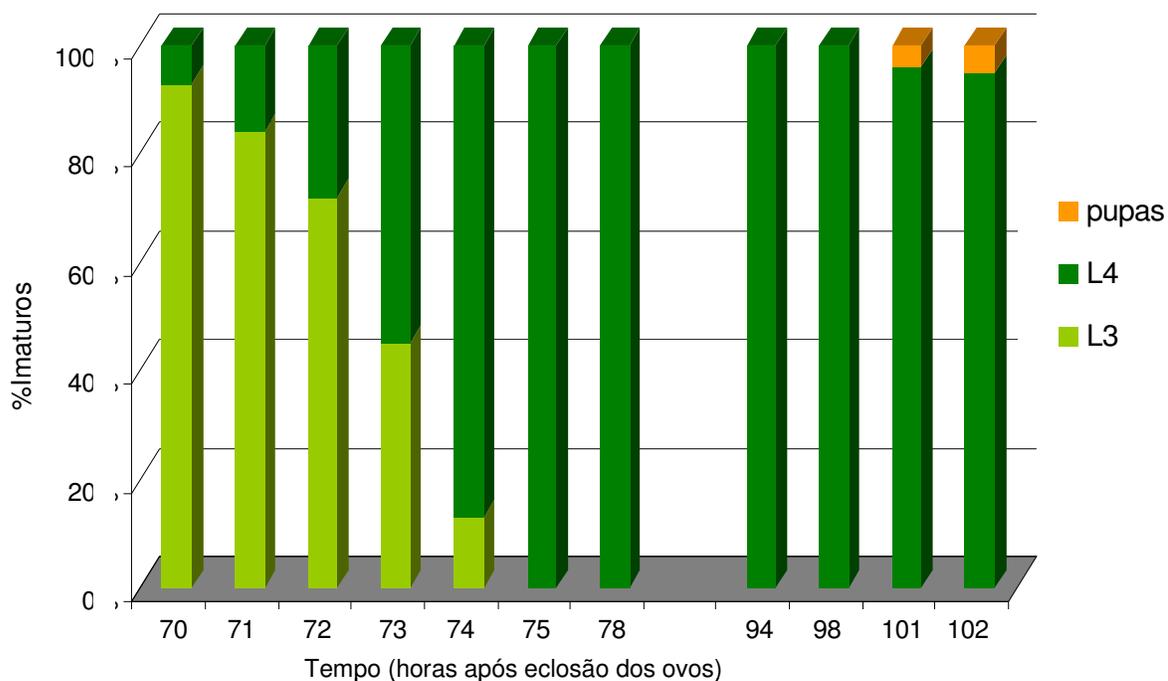


Figura 4.2: Desenvolvimento larvar de *Aedes aegypti* a 28 °C: proporção de larvas L3, L4 e de pupas ao longo do tempo, expresso em horas após a eclosão dos ovos (HAE). Os dados mostrados correspondem à média de cinco experimentos em duas condições (com ou sem acetona).

4.3) Subdivisão temporal dos instares (pontos experimentais)

Como mencionado na metodologia, cada instar larvar avaliado foi subdividido temporalmente, para efeito da experimentação. Foram definidos pontos experimentais com base no tempo de duração de cada instar.

O tempo de duração do 3º instar foi de 22 horas, considerando o intervalo entre o surgimento das primeiras larvas L3 (48 HAE) e das primeiras L4 (70 HAE) (figura 4.3). As coletas de larvas L3 “iniciais” foram realizadas 53 HAE, ou seja, cinco horas após a ecdise ($48 + 5 = 53$ HAE), e a coleta de larvas L3 “finais” (L3f) duas horas antes da ecdise do instar subsequente (68 HAE). Larvas L3 “intermediárias” foram coletadas no momento que representava aproximadamente metade do tempo de duração deste instar ($22 / 2 = 11$ horas; $48 + 11 = 59$ HAE). Uma vez que há grande sincronia no terceiro instar, estes pontos, escolhidos arbitrariamente, corresponderam a aproximadamente 20% (L3i, 53 HAE), 50% (L3int 59,5 HAE) e 90% (L3f, 68 HAE) do tempo de duração de L3, respectivamente.

O tempo de duração do 4° instar foi de 30 horas, considerando o intervalo entre o surgimento das primeiras larvas L4 (70 HAE) e das primeiras pupas (100 HAE). Utilizando o mesmo critério definido para coletas do 3° instar, larvas L4 “iniciais” foram coletadas 75 HAE, ou seja, cinco horas após a ecdise, e larvas L4 “finais” (L4f), com 98 HAE, duas horas antes do início da ecdise para o estágio de pupa. De acordo com o critério utilizado, larvas L4 “intermediárias” deveriam ter sido coletadas com 85 HAE, que corresponde à metade do tempo entre as duas ecdises ($30 / 2 = 15$ horas; $70 + 15 = 85$ HAE). Contudo, por conveniência técnica, para acomodação de horário de experimentação, este ponto foi definido com atraso de 7,5 horas ou seja, 92,5 HAE (figura 4.3).

Não consideramos, contudo, que esta variação tenha sido importante em termos relativos. Devido à falta de sincronia na ecdise L4:pupa, os pontos escolhidos podem corresponder a percentuais muito variáveis do tempo de duração deste instar, para os quais esta diferença de 7,5 horas pouco contribui. Se considerarmos 30 horas como o tempo total de duração deste instar, os pontos L4i (75 HAE), L4int (92,5) e L4f (98 HAE) correspondem respectivamente a 17, 75 e 93% deste período. No outro extremo, se considerarmos que este instar dura 74 horas (ecdise L3:L4 = 70 HAE; ecdise L4:pupa dos últimos espécies = 144 HAE), os mesmos pontos corresponderiam a aproximadamente 7, 30 e 38% do total de duração. Ou seja, a perda de sincronia não nos permitiu definir pontos de coleta que correspondessem fielmente ao início, meio e fim do 4° instar.

Os pontos experimentais aqui estabelecidos (figura 4.3) foram utilizados para todas as análises posteriores.

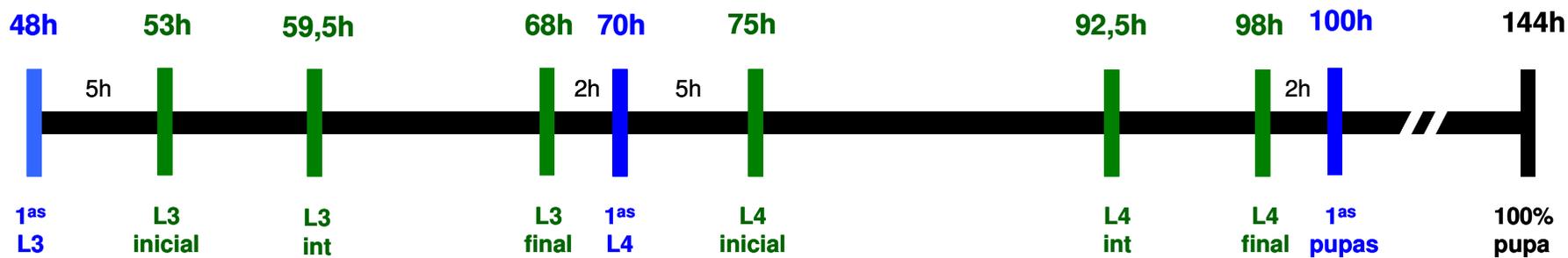


Figura 4.3: Definição dos pontos experimentais. As barras verticais em verde indicam os momentos definidos para coleta de amostras para as análises bioquímicas, histológicas e moleculares. Todos os pontos estão definidos em horas após a eclosão dos ovos.

4.4) Verificação do efeito de novaluron sobre larvas de *Ae. aegypti*

Novaluron 100CE (Rimon®) foi administrado a larvas L3, expostas continuamente ao produto e revelou inibição dose-dependente da emergência dos adultos (figura 4.4).

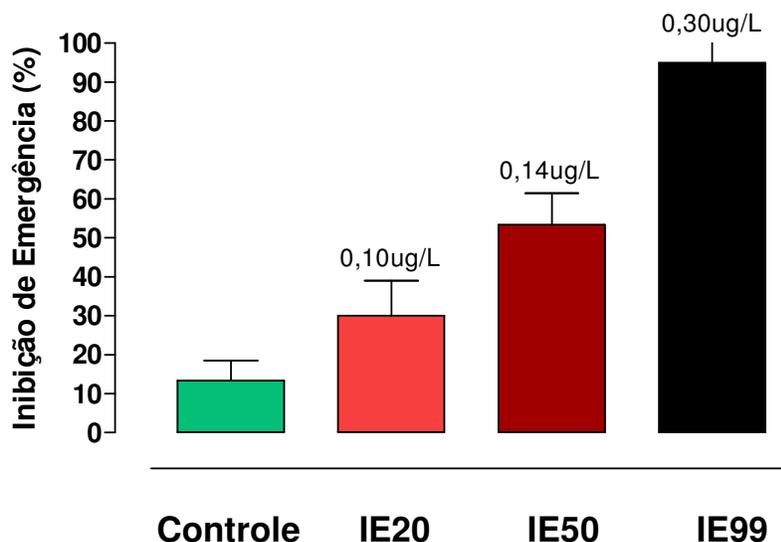


Figura 4.4: Efeito de novaluron sobre a inibição de emergência de *Aedes aegypti* adultos expostos continuamente, desde L3. As barras indicam as médias e desvios padrão de três experimentos de cada condição. As concentrações utilizadas em cada IE estão indicadas acima de cada barra.

4.5) Avaliação do efeito de novaluron sobre o conteúdo de quitina de imaturos

Amostras de larvas expostas ou não ao novaluron, coletadas como definido previamente, foram submetidas à quantificação indireta de quitina. Análises de variância compararam os dados de cada condição com os resultados obtidos para L3i. No grupo controle, não exposto ao BPU, percebe-se tendência de aumento do conteúdo de quitina ao longo de cada instar. Entretanto, quando comparado com L3i, este aumento só foi significativo a partir de L4int (figura 4.5-A).

Na dose IE₂₀ foi encontrado perfil semelhante ao controle (figura 4.5-B). Entretanto foram observadas diferenças significativas em L3int e L3f em relação à produção de quitina de L3i (figura 4.5-B). A essas diferenças, que provavelmente ocorreram devido ao pequeno desvio padrão observado em L3i, não foi atribuída relevância fisiológica particular.

As doses IE₅₀ e IE₉₉ alteraram o perfil normal de produção de quitina, principalmente no 4º instar (figura 4.5-C e D). Em ambas as doses, diferentemente

do controle, o conteúdo de quitina de L4f não é significativamente maior do que o de L3i (figura 4.5-C e D). Essas alterações no perfil de produção de quitina, evidenciadas no 4º instar, podem estar relacionadas com o tempo de exposição das larvas às altas doses de novaluron (IE_{50} e IE_{99}).

Interessantemente, em todos os casos, o conteúdo de quitina ao final do 3º instar foi superior àquele do início de L4 (figura 4.5). Vale ressaltar que a produção da nova cutícula antecede a eliminação da cutícula antiga (ecdise). O resultado encontrado parece refletir o período em que a larva possui dois exoesqueletos.

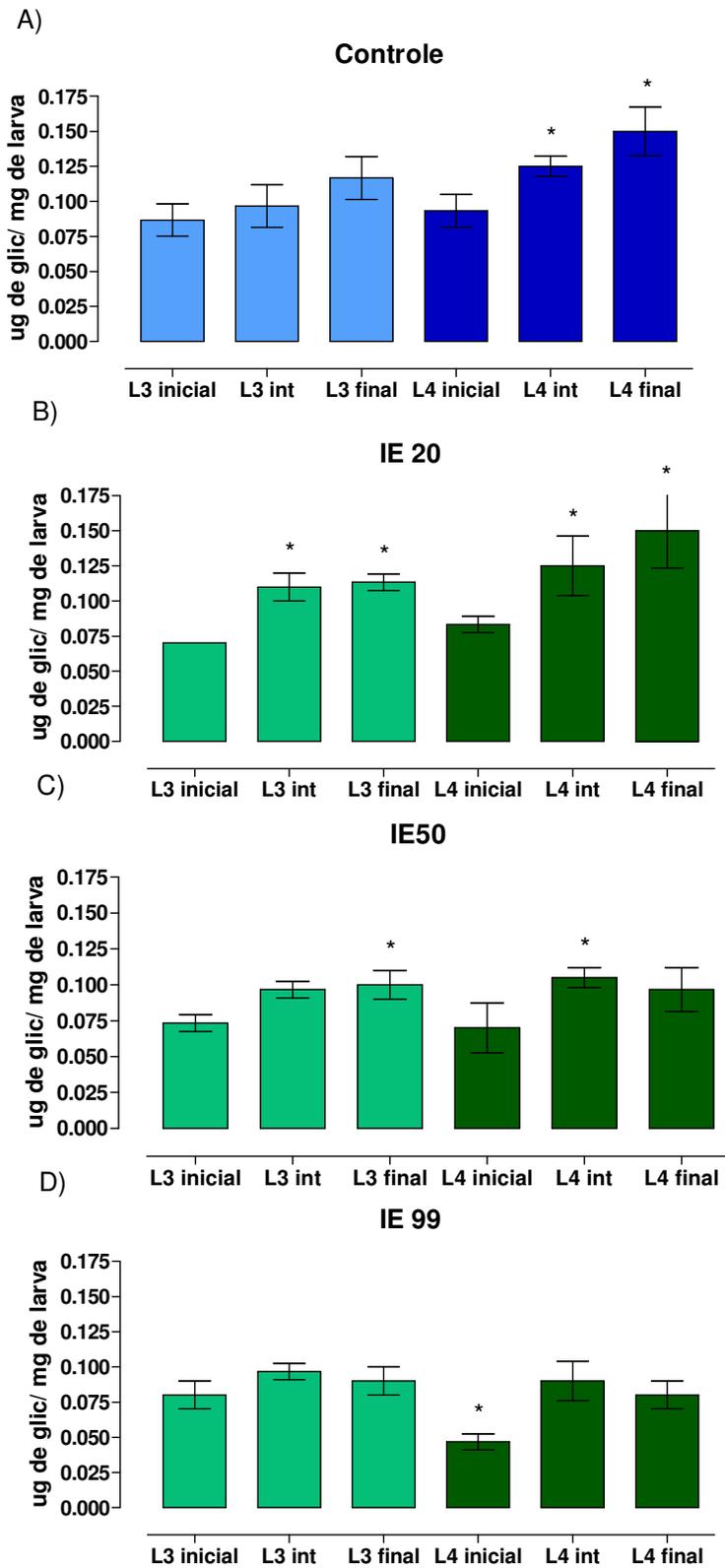


Figura 4.5: Efeito de diferentes concentrações de novaluron sobre o perfil de produção de quitina ao longo dos instares L3 e L4 de *Aedes aegypti*. Cada barra tem valores referentes às médias com os desvios padrões de três experimentos. Os asteriscos indicam diferenças significativas no conteúdo de quitina, em comparação com os valores obtidos para o grupo L3i de cada dose (ANOVA, $P < 0,05$).

Outras análises de variância (ANOVA; $P < 0,05$) foram realizadas a fim de verificar o efeito dose-dependente do produto sobre o conteúdo de quitina, em cada ponto experimental. Essas análises mostraram que a produção de quitina no 3º instar foi pouco afetada pelo produto. Neste instar, quando o conteúdo de quitina de cada IE foi comparado com a condição controle, só foi detectada diferença significativa em L3f em larvas que foram expostas à maior concentração (IE₉₉). Maior comprometimento na produção de quitina de larvas expostas ao novaluron foi evidenciado a partir do 4º instar, quando diferenças significativas foram observadas já em L4i, no grupo exposto à IE₉₉. Ao final deste instar (L4f) houve diferença significativa nos grupos expostos também à IE₅₀. Esses testes corroboram nossa hipótese de relação direta não apenas da concentração como também do tempo de exposição ao produto e o comprometimento do conteúdo de quitina.

Para melhor visualização, os dados do efeito de todas as concentrações de novaluron sobre o conteúdo de quitina estão apresentados de forma consolidada na figura 4.6.

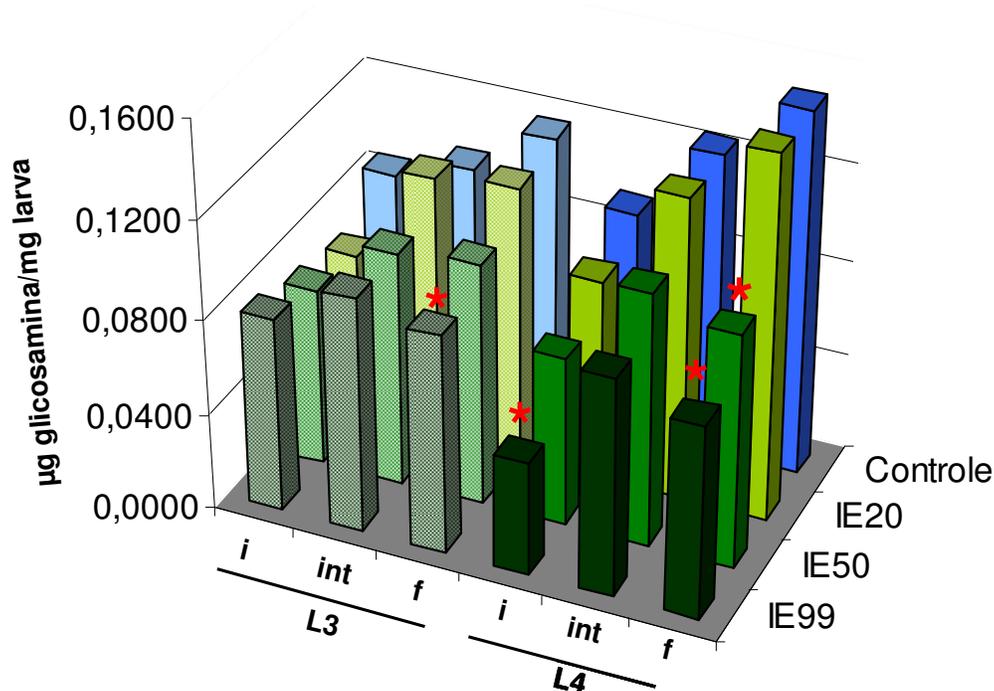


Figura 4.6: Perfil de produção de quitina em todas as condições de tratamento, ao longo dos instares L3 e L4 de *Aedes aegypti*. Cada barra tem valores referentes à média de três experimentos. Asteriscos apontam diferenças significativas entre o conteúdo de quitina em cada dose em relação à condição controle (ANOVA; $P < 0,05$).

4.6) Efeito de novaluron sobre o perfil de expressão de *AaCHS1*

A abundância dos transcritos de *AaCHS1* ao longo do desenvolvimento larvar foi avaliada por qPCR, com *primers* específicos para os exons alternativos *AaCHS1a* e *AaCHS1b*, em larvas controle e tratadas com a maior dose de novaluron (IE₉₉).

4.6.1) Especificidade dos produtos amplificados

As curvas de dissociação revelaram que os pares de oligonucleotídeos adotados nas reações de qPCR não formavam produtos inespecíficos, confirmando a amplificação somente dos produtos de interesse (figura 4.7).

A temperatura de fusão (T_m , do inglês *melting temperature*) do produto do gene constitutivo *rp49* foi de aproximadamente 82,9 °C. As T_m de *AaCHS1a* e de *AaCHS1b* foram 79,6 e 78,6 °C respectivamente.

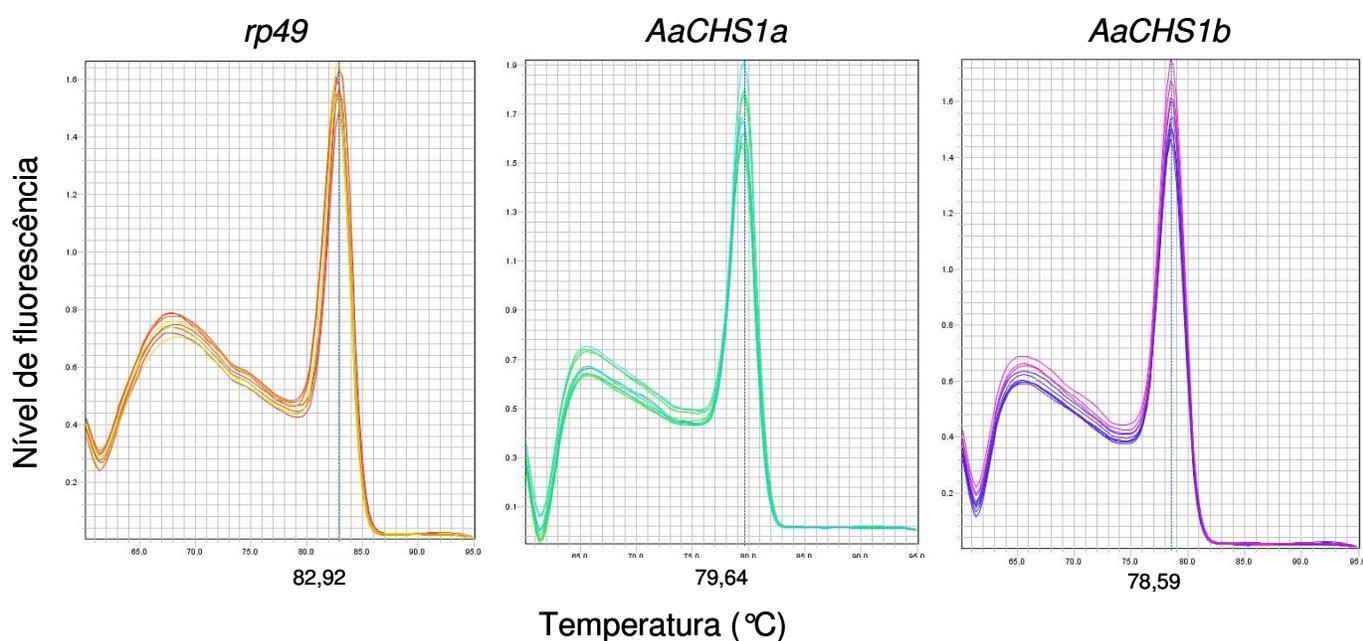


Figura 4.7: Curvas de dissociação dos produtos dos genes *rp49*, *AaCHS1a* e *AaCHS1b* amplificados pela reação de qPCR. A linha pontilhada em azul mostra a T_m de cada produto.

Todos os produtos de amplificação por qPCR obtidos apresentaram os tamanhos esperados: 190 pares de bases (pb) para *rp49* (Gentile *et al.*, 2005), 209 pb para *AaCHS1a* e 87 pb para *AaCHS1b* (Rezende *et al.*, 2008) (Figura 4.8).

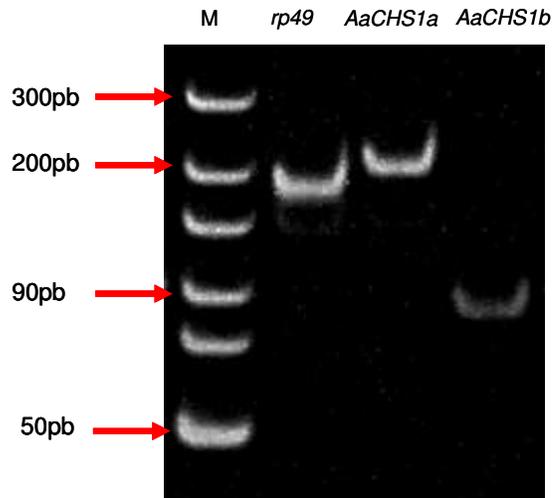


Figura 4.8: Eletroforese em gel de poliacrilamida mostrando os produtos das reações de qPCR com cDNA de larvas L4 “intermediárias”. Não foram detectados *amplicons* secundários. M: marcador de peso molecular.

4.6.2) Quantificação relativa de *AaCHS1a* e *AaCHS1b*

Como indicado na metodologia, os resultados obtidos para cada ponto experimental dos níveis de expressão dos transcritos *AaCHS1a* e *AaCHS1b* foram calibrados com as larvas L3 controle “iniciais”, definidas como o valor de referência.

No grupo controle ocorreu aumento gradual e significativo no nível de expressão de *AaCHS1a* até L4i (teste t de *Student*, $P < 0,05$) (figura 4.9), momento no qual a expressão deste transcrito é cerca de quatro vezes maior do que em L3i. A partir de então o nível de expressão dos transcritos cai pela metade (L4int comparado com L4i). Uma sutil tendência de aumento da expressão é percebida ao final do 4º instar (L4f), apesar de não significativa (teste t de *Student*, $P > 0,05$) (figura 4.9).

O perfil de expressão de *AaCHS1a* correspondeu ao que esperávamos para larvas L3 (maior expressão de *AaCHS1a* em L3int, devido ao requerimento de quitina para a síntese da nova cutícula). Por outro lado, o perfil encontrado para larvas L4 foi inesperado, e pode ter relação com os problemas encontrados na definição dos pontos de coleta deste instar, devido à falta de sincronia desta fase do desenvolvimento, mencionada anteriormente.

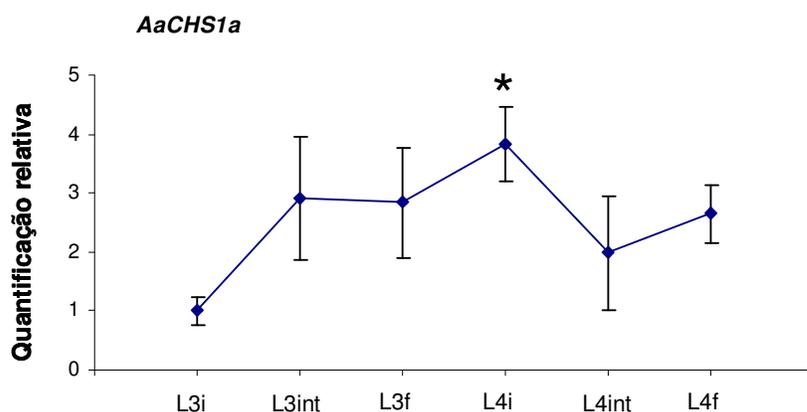


Figura 4.9: Perfil de expressão de *AaCHS1a* durante o desenvolvimento larvar do grupo controle de *Aedes aegypti*. Os pontos representam as médias e o erro padrão de três experimentos. O asterisco aponta diferença significativa (teste t de *Student*, $P < 0,05$).

Observamos, nas larvas controle, perfil de expressão de *AaCHS1b* semelhante àquele de *AaCHS1a*, embora com aumentos e quedas, ao longo do desenvolvimento, mais proeminentes (figura 4.10). Por exemplo, já em L3int houve um aumento de sete vezes no nível de expressão dos transcritos, quando comparado com L3i. A expressão máxima de *AaCHS1b* no controle foi percebida em L4i, com um aumento de 12 vezes comparada à expressão de larvas L3i (teste t de *Student* $P < 0,05$). Uma queda de aproximadamente duas vezes é percebida comparando o nível de expressão de L4i com L4int. Ao final do 4º instar (L4f) ocorre um aumento, mas não significativo, da expressão de *AaCHS1b* comparado com o nível de expressão do momento anterior (L4int) (figura 4.10). Assim como para *AaCHS1a*, o perfil de expressão de *AaCHS1b* correspondeu ao que esperávamos para larvas L3, mas não para L4.

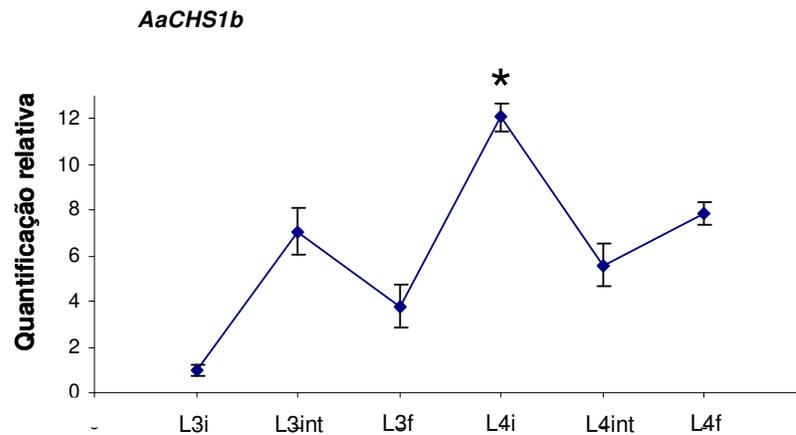


Figura 4.10: Perfil de expressão de *AaCHS1b* durante o desenvolvimento larvar do grupo controle de *Aedes aegypti*. Os pontos representam as médias e o erro padrão de três experimentos. O asterisco aponta diferença significativa (teste t de *Student*, $P < 0,05$).

Larvas tratadas com novaluron (IE₉₉) (figura 4.11) exibem perfil de expressão de *AaCHS1a* semelhante ao de larvas controle. Entretanto, logo no início do tratamento, larvas L3i expostas ao novaluron já têm o dobro da expressão do transcrito de larvas controle. Por outro lado, o aumento do nível de expressão de *AaCHS1a* em larvas tratadas, ao longo dos 3^o e 4^o instares, é de no máximo duas vezes (L4i), a metade da variação observada para larvas controle.

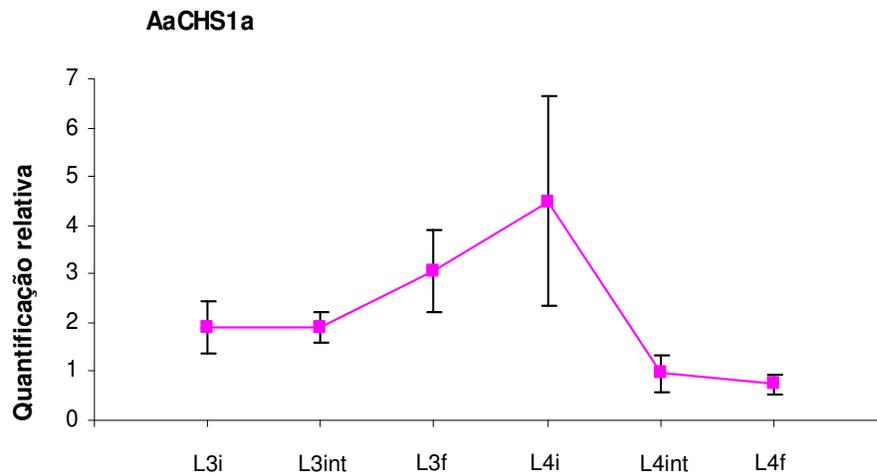


Figura 4.11: Perfil de expressão de *AaCHS1a* durante o desenvolvimento larvar de *Aedes aegypti* expostos à IE₉₉ de novaluron. Os pontos representam as médias e o erro padrão de três experimentos.

O tratamento com o BPU novaluron parece ter efeito mais proeminente na expressão de *AaCHS1b* do que em *AaCHS1a* (figura 4.12). Depois de apenas duas horas de tratamento (51 HAE a 53HAE; vide metodologia) o nível de expressão de *AaCHS1b* é quatro vezes aumentado, em relação ao controle (comparar os pontos L3i nas figuras 4.10 e 4.12). Diferentemente das larvas controle, a expressão deste transcrito continua aumentando até L3f, quando sua expressão é cerca de três vezes mais intensa que no início do tratamento. Subsequentemente, uma queda de duas vezes na expressão é percebida durante a primeira metade do 4º instar (comparar o nível de expressão de L4i e L4int). Queda de expressão equivalente também foi observada em larvas controle (figura 4.10). Ao final do 4º instar (L4f), o nível de expressão de *AaCHS1b* de larvas expostas à IE₉₉ de novaluron diminui ainda mais (figura 4.10), sendo quatro vezes menor do que no controle (L4f) (figura 4.12).

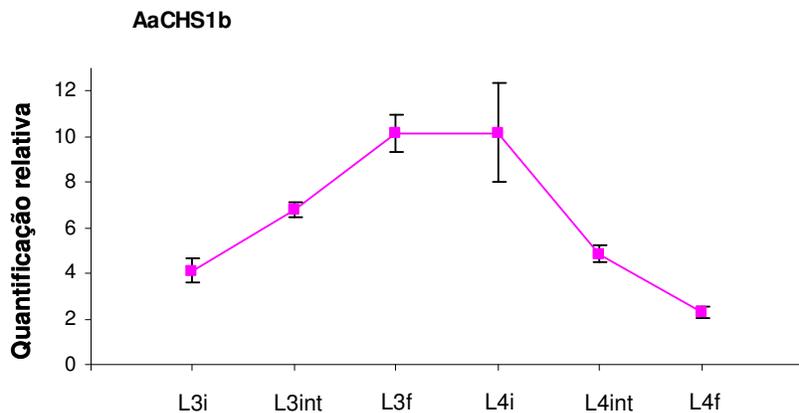


Figura 4.12: Perfil de expressão de *AaCHS1b* durante o desenvolvimento larvar de *Aedes aegypti* expostos à IE₉₉ de novaluron (IE₉₉). Os pontos representam as médias e o erro padrão de três experimentos.

Os resultados obtidos para os dois transcritos nas condições controle e experimental estão representados de forma consolidada, na figura 4.13. Quando a expressão de *AaCHS1a* de larvas tratadas e controle é comparada ponto a ponto, identifica-se diferença significativa (teste t de *Student*, $P < 0,05$) apenas em L4f: Neste momento a expressão em larvas tratadas é aproximadamente quatro vezes menor que em larvas controle. Na comparação ponto a ponto da expressão de *AaCHS1b* em larvas tratadas e controle não foram encontradas diferenças significativas pelo teste t de *Student*, $P < 0,05$.

Entretanto, por inspeção visual (figura 4.13), foram encontradas diferenças da expressão dos transcritos de quitina Sintase que sugerem interferência de novaluron durante o 3º instar. Devido aos problemas encontrados com a variação entre as ra eficiência dos *primers* utilizados, não foram possíveis análises estatísticas mais detalhadas. Pretendemos repetir estes ensaios, otimizando a metodologia de amplificação dos transcritos e aumentando o número de pontos experimentais, de forma a elucidar estes perfis de expressão.

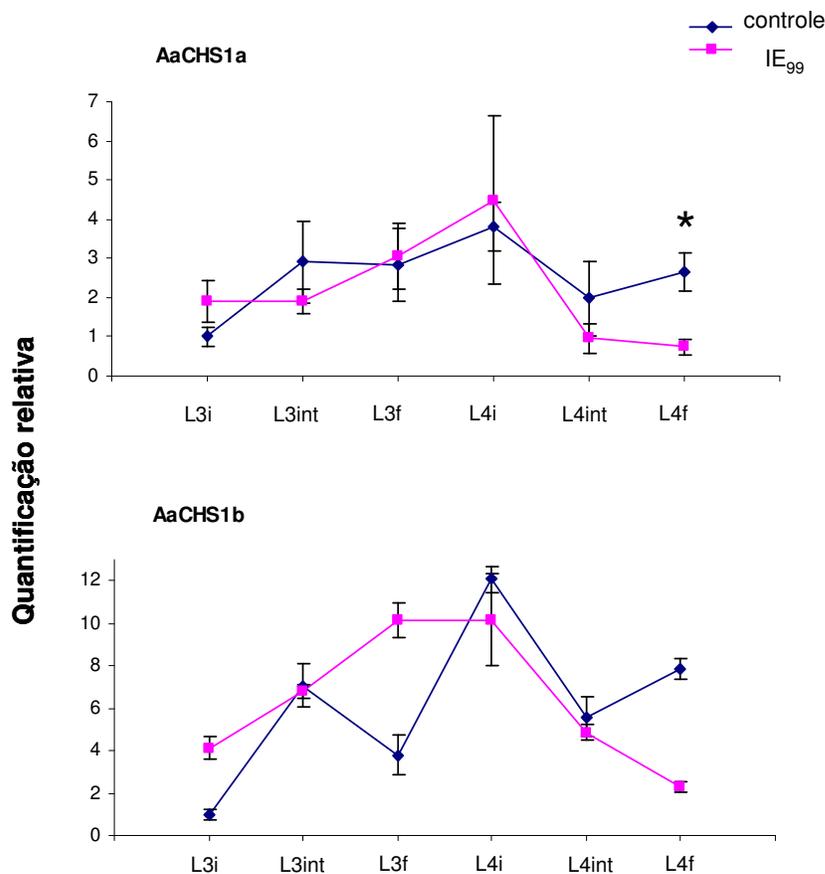


Figura 4.13: Quantificação relativa de *AaCHS1a* e *AaCHS1b* durante o desenvolvimento larvar de *Aedes aegypti* tratados ou não com novaluron. Os pontos representam as médias e o erro padrão de três experimentos. O asterisco aponta diferença significativa (teste t de *Student*, $P < 0,05$).

4.7) Análises morfológicas preliminares

Com o objetivo de verificar o efeito de novaluron sobre estruturas quitinosas de larvas de *Ae. aegypti* foi necessário validar uma metodologia de obtenção de cortes histológicos de larvas inteiras que preservasse a morfologia interna e externa dos espécimes. Até o momento, esses cortes foram realizados em larvas L3i e L4f, controle e tratadas com o BPU na dose IE₉₉.

A figura 4.14, que mostra alguns aspectos da anatomia de uma larva *Ae. aegypti* de forma esquemática, foi inserida com o objetivo de facilitar a observação dos dados morfológicos obtidos neste trabalho.

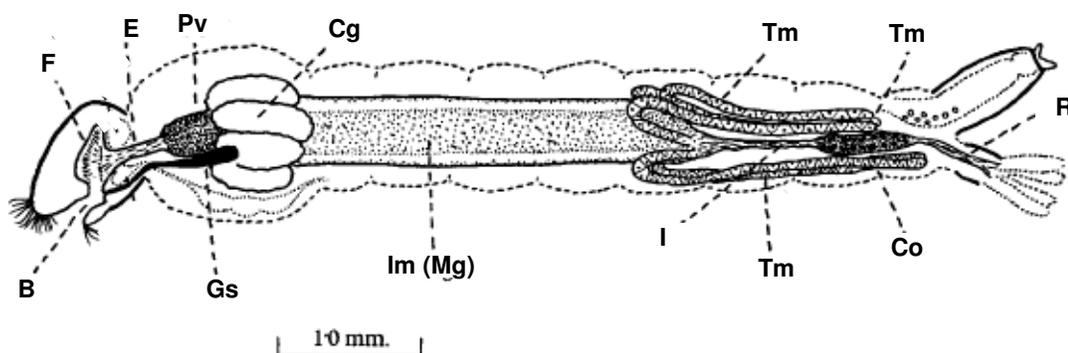


Figura 4.14 Vista lateral de larva *Aedes aegypti* mostrando anatomia geral do canal alimentar. B= boca, Cg= ceco gástrico, Co= ceco, E= esôfago, F= faringe, Gs= glândula salivar, I= íleo, Im (Mg) = intestino médio, Pv= proventrículo, R= reto, Tm = Túbulos de Malpighi. Magnificação do esquema representada por barra de aumento (adaptado de Christopher, 1960).

Em todos os casos, as setas indicam estruturas que, acreditamos, contêm quitina: setas azuis apontam para o exoesqueleto (figuras 4.15-A e B e 4.16-A e B), e setas vermelhas, para um envoltório do conteúdo intestinal (figuras 4.15 e 4.16-C e D). Este envoltório é, possivelmente, a membrana peritrófica. Nas figuras 4.15 (C e D) e 4.16 (C e D) a coloração por HE possibilitou visualização das células do epitélio intestinal das larvas.

Nos cortes de larvas L3i identificamos, na região da cabeça, uma cobertura externa, provavelmente quitinosa, que parece fazer parte do exoesqueleto (figura 4.15-A e B). As estruturas que provavelmente contêm quitina, do intestino, de larvas L3i tratadas com novaluron parecem mais tênues que em larvas controle (figura 4.15- C e D).

Em larvas L4f, na região da cabeça, mostradas nos quadrante A e B da figura 4.16, também foi percebida uma cobertura externa. Embora neste caso, em oposição às larvas L3, tenha sido percebida maior deformação da região da cabeça de larvas expostas ao novaluron. Adicionalmente, em larvas L4f tratadas com novaluron, ao contrário de larvas controle, não foi possível visualizar o envoltório do conteúdo intestinal (figura 4.16-C e D).

Marcações posteriores específicas para quitina são necessárias para que possamos avaliar o efeito do tratamento na estrutura do exoesqueleto das larvas; essas análises já estão previstas.

L3 inicial

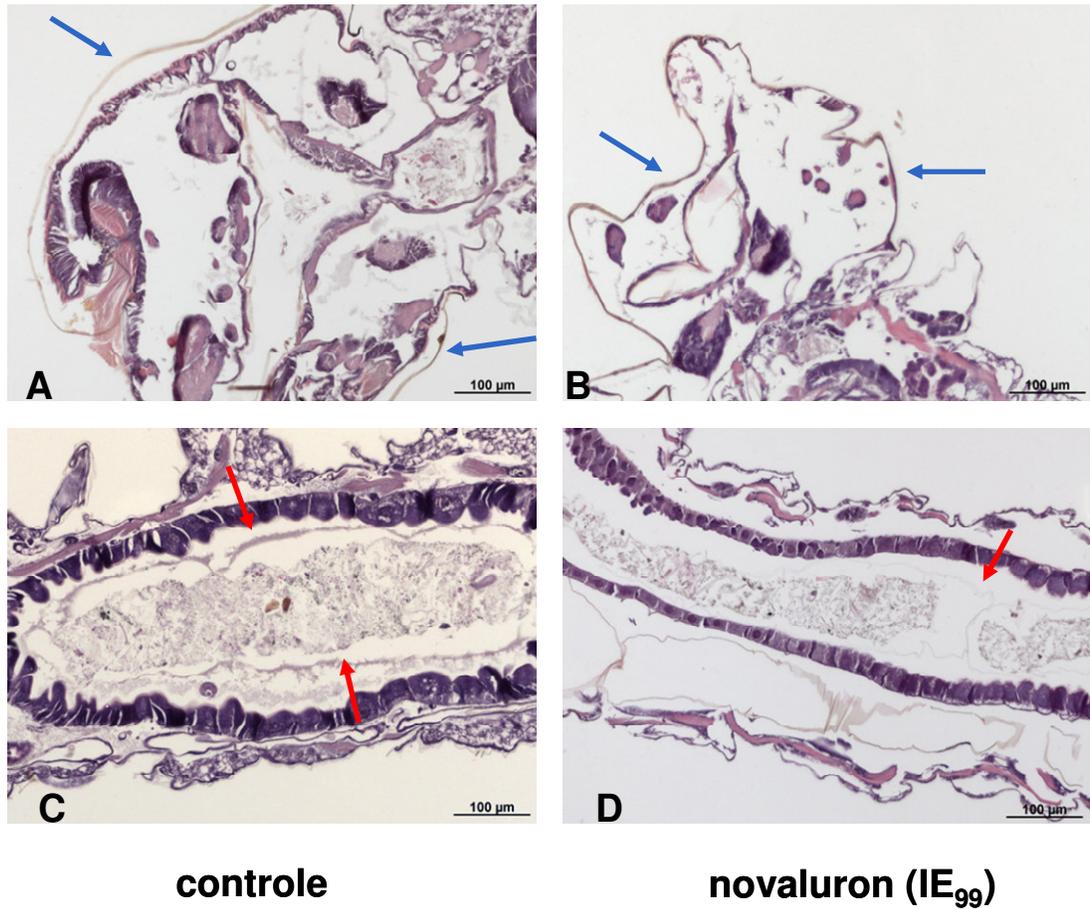


Figura 4.15: Morfologia interna de larvas de 3^o instar de *Aedes aegypti*, controle (A, C) e tratadas com novaluron, IE₉₉ (B, D). A e B cabeça; C e D intestino. Setas em azul e vermelho apontam, respectivamente, para estruturas possivelmente quitinosas externas (exoesqueleto) e internas (membrana peritrófica).

L4 final

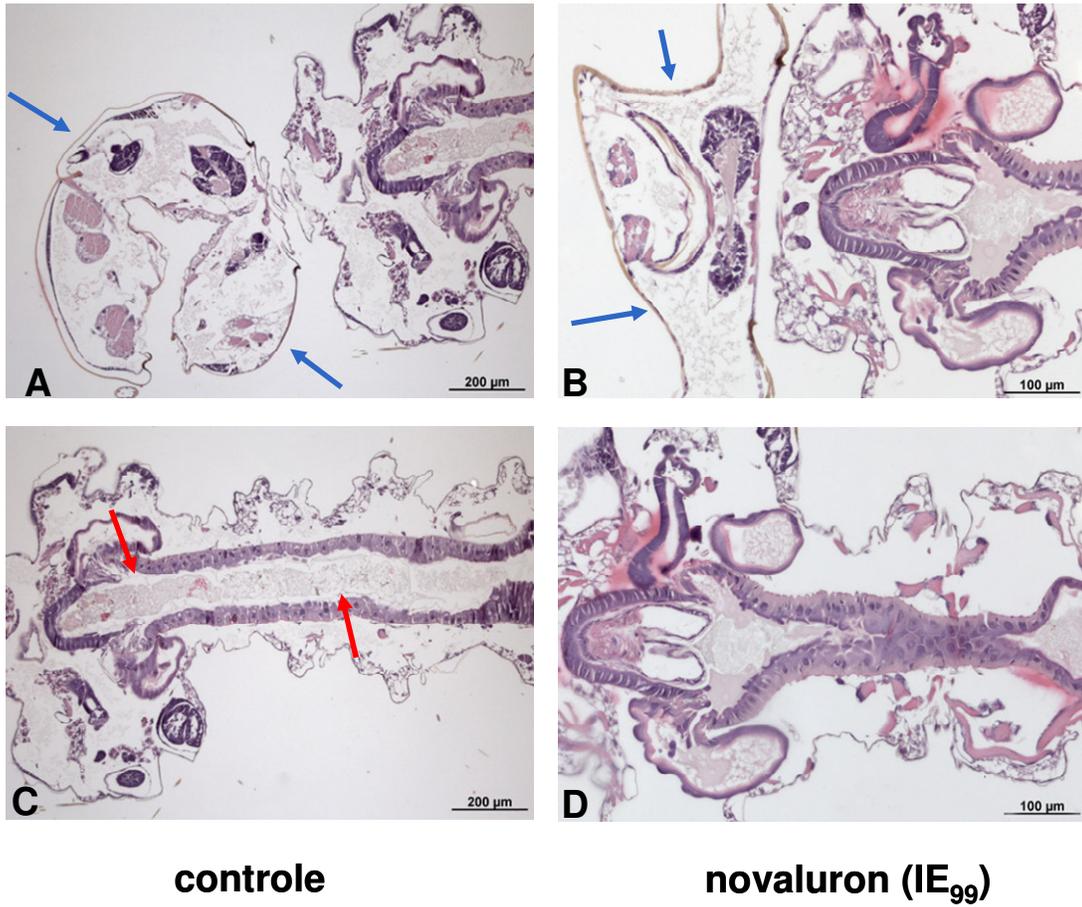


Figura 4.16: Morfologia interna de larvas de 4^o instar de *Aedes aegypti*, controle e tratadas com novaluron (IE₉₉). A e B cabeça; C e D intestino. Setas em azul apontam para estruturas quitinosas externas (exo esqueleto). Setas em vermelho apontam para estruturas quitinosas internas (membrana peritrófica). Magnificação da imagem representada por barra de aumento.

5) DISCUSSÃO

Ainda nos dias atuais, dengue continua sendo um sério problema de saúde pública. Em 2008, o Brasil enfrentou sua segunda maior epidemia de dengue, com 734.000 casos notificados até outubro. Por suas condições climáticas e sócio-ambientais, que permitem ampla disseminação do vetor, *Ae. aegypti*, a cidade do Rio de Janeiro pode ser considerada um importante ponto de introdução e disseminação da dengue no país. Uma vez que uma vacina contra dengue ainda não está disponível, as principais estratégias de controle têm sido centradas na redução da população do mosquito (Lourenço-de-Oliveira, 2008).

Os inseticidas químicos ainda são a ferramenta mais utilizada para combater o mosquito transmissor da dengue. Entretanto, várias populações do vetor apresentam resistência às principais classes de inseticidas utilizados nos programas de controle (Zaim e Guillet, 2002; Montella *et al.*, 2007). No Brasil, a resistência de *Ae. aegypti* está disseminada em quase todo o país (Montella *et al.*, 2007), o que torna imperativo o estudo de estratégias alternativas de controle.

Os inibidores da síntese de quitina destacam-se dentre as alternativas de controle do vetor da dengue, mesmo de populações que apresentam resistência aos inseticidas convencionais (Martins *et al.*, 2008). Diflubenzuron, o primeiro CSI disponibilizado comercialmente, já é utilizado com sucesso no controle de diversas espécies de insetos há décadas, principalmente no combate a pragas agrícolas (Mian e Mulla, 1982).

Análises prévias de nossa equipe comprovam a eficiência de um CSI da classe dos BPUs em culicídeos vetores como *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *C. quinquefasciatus*. Triflumuron, em concentrações da ordem de $\mu\text{g/L}$, provocou inibição dose-dependente da emergência de adultos em linhagens de laboratório de três espécies analisadas. Este composto também se mostrou eficiente contra populações oriundas do campo de *Ae. aegypti*, independente do grau de resistência a organofosforados e piretróides (Belinato, 2007).

Na tentativa de elucidar o impacto do uso deste CSI em campo, estudo recente avaliou os efeitos de doses sub-letais do BPU triflumuron, aplicado a larvas, sobre a viabilidade de adultos sobreviventes de *Ae. aegypti*. Entre os diversos parâmetros afetados destacam-se longevidade, atividade locomotora, capacidade de alimentação sanguínea e de cópula e postura de ovos (Belinato *et al.*, 2009).

Novaluron é uma alternativa promissora para o controle de insetos vetores. Este CSI apresenta maior atividade contra *Ae. aegypti* ($IE_{99} = 0,3 \mu\text{g/L}$; Giglio, 2008) do que outros BPU, como triflumuron ($IE_{99} = 1,8 \mu\text{g/L}$; Martins *et al.*, 2008) ou diflubenzuron ($IE_{99} = 3,5 \mu\text{g/L}$; Fournet *et al.*, 1993). Os resultados obtidos nesta dissertação são compatíveis com os valores descritos: a concentração de $0,3 \mu\text{g/L}$ de novaluron foi responsável pela inibição de 99% da emergência dos adultos.

Dados da literatura apontam os CSI como excelente opção para o manejo de mosquitos vetores em áreas urbanas. No Brasil, alguns BPU já foram validados para substituição ao larvicida temephos em populações resistentes a este OP (SVS, 2009). Apesar destes compostos terem sido descobertos na década de 1970, até o presente momento o mecanismo de ação preciso dos BPUs ainda não é completamente conhecido (Cohen, 2001; Merzendorfer, 2005). Devido a sua iminente utilização para o controle de *Ae. aegypti* no Brasil, maior detalhamento sobre seus efeitos e potenciais mecanismos de ação é de extrema importância (WHO, 2007; SVS, 2009).

Neste contexto, o objetivo desta dissertação foi investigar o efeito do BPU novaluron sobre a formação do exoesqueleto de larvas de *Ae. aegypti*. Para alcançar os objetivos, foi necessário conhecer a cronologia de desenvolvimento larvar desta espécie, até a formação de pupas, em uma temperatura definida, pré-requisito para a realização de todos os ensaios.

Para muitas espécies de insetos, inclusive *Ae. aegypti*, o desenvolvimento ocorre somente em faixa de temperatura específica, definida por limites máximo e mínimo letais (Clements, 1992; Farnesi *et al.*, 2009). Nesta faixa, mesmo pequenas variações podem alterar a cinética de desenvolvimento larvar de *Ae. aegypti* (Ribeiro, 2005). Com base nestas informações, os bioensaios destinados à coleta de larvas para as análises bioquímicas, moleculares e histológicas apresentados nesta dissertação foram realizados à temperatura constante de $28 \text{ }^\circ\text{C}$.

Buscamos trabalhar com amostras representativas de momentos que pudessem refletir com precisão as diferentes etapas do processo de muda, subdividindo temporalmente os instares larvais avaliados. Vale ressaltar que a partir da segunda metade de cada instar ocorre o desprendimento do antigo exoesqueleto quitinoso e a formação de uma nova cutícula (Clements, 1992). Considerando estas questões fisiológicas, foram escolhidos três momentos, correspondentes ao início, meio e final de cada instar avaliado (L3 e L4). Vale ressaltar que testes prévios com

acetona, solvente usado na diluição de novaluron, não evidenciaram qualquer tipo de alteração na cinética do desenvolvimento de larvas de *Ae. aegypti*, validando seu uso em todos os experimentos subsequentes.

Verificamos que larvas L3 realizam ecdise de forma mais sincronizada e que o tempo de duração deste instar é menor quando comparado a L4. Estes resultados confirmam o que foi descrito por Christophers (1960). A diferença na duração dos instares L3 e L4 pode estar relacionada com o processo fisiológico de pupação que ocorre no final de L4. A menor sincronia na ecdise de larvas L4, quando comparadas com L3, também pode ser atribuída à diferença no tempo de desenvolvimento de cada sexo, que pode chegar a um dia (Ribeiro, 2005). Machos são os primeiros a atingir o estágio de pupa, tanto em *Ae. aegypti* como em *Ae. vexans* (Christophers, 1960; Clements, 1992; Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Os resultados inesperados encontrados na quantificação relativa do gene *AaCHS1* no 4º instar podem estar relacionados com a falta de sincronia no desenvolvimento observada para este instar, quando acompanhado sem discriminação de sexo.

No contexto dessa dissertação, foi implementada no LAFICAVE metodologia de quantificação de quitina, que possibilitou a avaliação de larvas de *Ae. aegypti*. Vale mencionar que, em colaboração com outro projeto de pesquisa do laboratório, utilizamos esta técnica para dosar quitina na cutícula serosa, estrutura formada durante a embriogênese de mosquitos (Rezende *et al.*, 2008).

Observamos, em larvas do grupo controle, aumento significativo no conteúdo de quitina durante o período avaliado. No decorrer de cada instar este aumento ocorre de maneira gradual. Foi observada uma redução de cerca de 20% no conteúdo de quitina de larvas de início do 4º instar em comparação com larvas de final do 3º instar. Apesar de não ser significativa, esta diferença já era esperada: ao final do terceiro instar as larvas de culicídeos possuem duas exocutículas (uma nova e uma antiga). A cutícula antiga é perdida em consequência do processo de muda (Clements, 1992).

Candy e Kilby (1962) também analisaram o conteúdo de quitina ao longo do 5º instar do gafanhoto *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775). Os autores observaram aumento do conteúdo de quitina ao longo do período, e decréscimo ao final, que foi relacionado a período de maior ação de Quitinases. No início do estágio subsequente (adulto), o conteúdo de quitina ainda era inferior ao instar anterior. Embora, a exemplo destes autores, tenhamos constatado para larvas controle de *Ae. aegypti* aumento de quitina ao longo de cada instar larvar e queda do conteúdo

logo após a muda, não observamos diminuição do conteúdo de quitina ao final de cada instar. Esta diferença se deve, provavelmente, à metodologia utilizada na dosagem de quitina: quantificamos derivados de glicosamina, que permanecem no inseto mesmo após a ação inicial das Quitinases.

Em relação ao tratamento com novaluron, percebemos que o produto diminuiu efetivamente o conteúdo de quitina das larvas de forma dose-dependente. Resultados semelhantes foram observados em larvas *An. quadrimaculatus* expostas a outro CSI, o diflubenzuron (Zhang e Zhu, 2006). Contudo, a faixa de variação de doses empregada foi distinta nos dois casos: no trabalho aqui apresentado a maior concentração foi aproximadamente o triplo da menor ($IE_{20} = 0,10$ a $IE_{99} = 0,3 \mu\text{g/L}$); Zhang e Zhu utilizaram concentrações ao longo de duas ordens de grandeza (4 a $500 \mu\text{g/L}$), sendo a maior equivalente a aproximadamente IE_{30} . Os autores não apresentaram informação sobre a sincronização das larvas utilizadas, por isso o trabalho não fornece indícios que comprovem que a quantificação de quitina foi efetivamente realizada em larvas L3. Vale ressaltar que foi exatamente em função destas imprecisões na literatura que optamos por definir os momentos de avaliação com base na fisiologia do processo da muda.

Genes *CHS1* são comprovadamente relacionados com a formação de cutícula larvar na mosca *D. melanogaster* (Ostrowski *et al.*, 2002; Moussian *et al.*, 2005) e no besouro *T. castaneum* (Arakane *et al.*, 2005). Moussian *et al.* (2005) estudaram a morfologia detalhada de embriões *D. melanogaster* mutantes para o gene *kkv* (ortólogo de *CHS1*). Os autores demonstraram que este gene quitina Sintase é essencial para a integridade da procutícula, estabilidade da epicutícula e para a manutenção da morfologia da epiderme dos embriões. Genes *CHS2* são relacionados com a síntese de quitina para a membrana peritrófica de insetos (Arakane *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2006).

Arakane *et al.* (2005) realizaram análise funcional dos dois genes quitina Sintase no besouro *T. castaneum* (*TcCHS1* e *TcCHS2*) por RNA de interferência (RNAi), revelando o papel principal de cada um deles. O silenciamento do gene *TcCHS1* interferiu especificamente nas mudas e reduziu o conteúdo de quitina do corpo do inseto, enquanto o silenciamento de *TcCHS2* interferiu na alimentação larvar e reduziu o conteúdo de quitina do intestino médio das larvas.

Adicionalmente, Chen *et al.* (2008) utilizaram o mesmo mecanismo de silenciamento (RNAi) para inibir especificamente a expressão de *CHS1* (*SeCHSA*) em *Spodoptera exigua* (Lepdoptera: Noctuidae). Os autores verificaram que a adição

de dsRNA/siRNA específico de *SeCHSA* em culturas de células provocou uma redução específica da expressão da proteína *SeCHSA in vitro*. Adicionalmente, quando dsRNA ou siRNA deste gene foi injetado em larvas de 4º instar (*in vivo*) houve uma significativa redução no nível de expressão de RNAm associada a defeitos na formação cuticular e redução do acúmulo de quitina na traqueia.

Em recente trabalho, verificamos a expressão de *AaCHS1* durante a embriogênese de *Ae. aegypti*. Há expressão de apenas um dos transcritos alternativos (*AaCHS1a*) nas primeiras 12 horas da embriogênese, que foi relacionada ao surgimento de uma estrutura quitinosa na casca do ovo, importante para a resistência à dessecação dos ovos, a cutícula serosa. Por outro lado, os níveis de expressão do outro transcrito alternativo, *AaCHS1b*, aumentam somente ao final da embriogênese. Este aumento foi associado à formação do exoesqueleto da larva em formação (Rezende *et al.*, 2008). Os resultados com larvas controle apresentados nesta dissertação foram consistentes com este trabalho, revelando maior variação nos níveis de expressão de *AaCHS1b*.

Apesar da comprovada importância dos genes *CHS* na biossíntese de quitina e de sua possível relevância para o mecanismo de ação de BPU, poucos são os trabalhos que investigam o perfil de expressão desses genes ao longo do desenvolvimento de insetos vetores. As análises moleculares aqui apresentadas pretendem elucidar se o BPU novaluron interfere com a expressão de *AaCHS1*.

Gagou *et al.* (2002) verificaram o padrão temporal de expressão de *DmeCHSA* e *DmeCHSB* nos estágios finais do desenvolvimento de *D. melanogaster* no sentido de prover as primeiras informações sobre sua regulação transcricional. Os autores ainda relacionaram a expressão de genes *CHS* com as variações hormonais que ocorrem durante o período de muda, e observaram aumento em sua expressão logo após um pico de ecdisona durante a pupação deste díptero. Vale ressaltar que, em geral, durante o processo de muda dos insetos, genes envolvidos com a morfogênese são expressos nos períodos de títulos altos de ecdisona, enquanto aqueles envolvidos com a formação de cutícula são expressos quando os títulos de ecdisona são baixos (Bete e Arias, 1993).

O presente trabalho procurou investigar o perfil de expressão de *CHS* de *Ae. aegypti* durante tratamento com um BPU, e relacionar as variações desse perfil com o conteúdo de quitina avaliado. Inicialmente seriam avaliados os dois genes de quitina *Sinatse* (*AaCHS1* e *AaCHS2*). Entretanto, apesar de termos desenhado

primers específicos para *AaCHS2*, não obtivemos êxito em sua utilização em reações de qPCR.

Detectamos variações do nível de expressão dos dois transcritos alternativos de *AaCHS* (*1a* e *1b*) ao longo do desenvolvimento larvar de *Ae. aegypti*. As observações aqui discutidas estão restritas a larvas de 3° instar, devido aos problemas com a sincronia das amostras de larvas de 4° instar, relatados anteriormente. A expressão dos dois transcritos alternativos, *AaCHS1a* e *AaCHS1b*, apresentou perfis semelhantes, embora este último tenha exibido maiores flutuações. Em larvas controle a expressão dos transcritos aumenta na metade do instar (L3int), e é seguida por ligeira queda na transcrição, mais acentuada em *AaCHS1b*. Por outro lado, o conteúdo de quitina aumenta gradualmente ao longo do 3° instar. Ou seja, parece que a transcrição que ocorre até a metade do instar acumula transcritos suficientes para suportar a síntese da enzima CHS1, que por sua vez garante a fabricação de quitina em quantidade suficiente para a muda L3:L4, sem que seja necessário um pico de transcrição. (compare as figuras 4.6 e 4.13).

Diferentemente do controle, larvas L3 expostas por até 17 horas ao novaluron (L3i, L3int e L3f), aumentaram a expressão de *AaCHS1b* até o final do instar (L3f). Apesar da maior transcrição, o conteúdo de quitina não aumenta de forma equivalente em L3f tratadas com a maior dose do produto ($IE_{99} = 0,3\mu\text{g/L}$, novamente, compare as figuras 4.6 e 4.13). Esta diferença de perfis sugere provável mecanismo de *feedback* positivo. Em outras palavras, a ativação da transcrição de *AaCHS1b* logo após o tratamento com novaluron seria uma compensação ao efeito inibitório do produto sobre a síntese de quitina. Este resultado sugere que a enzima *AaCHS1b* deve ter um importante papel na síntese de quitina para a muda L3:L4 (ver figura 4.13).

Interessantemente, este mesmo mecanismo de *feedback* positivo na expressão de *AqCHS1* já foi proposto por Zhang e Zhu (2006) em larvas de *An. quadrimaculatus*, em resposta a tratamento com o diflubenzuron: exposição de larvas, por 24h, à concentração de $500\mu\text{g/L}$ deste BPU, dose que inibe aproximadamente 30% da emergência de adultos, resultou em aumento da expressão de *AqCHS1*, detectado por *Northern blot*. Este aumento foi ainda mais acentuado em larvas expostas ao produto por 48h. Vale ressaltar que, na concentração utilizada pelos autores, a maioria das larvas sobrevivia ao tratamento.

A avaliação do perfil de transcrição de *CHS* aqui apresentada foi feita com larvas de *Ae. aegypti* expostas à IE₉₉. Nossos resultados mostraram queda nos níveis de expressão dos transcritos de *AaCHS1* (*a* e *b*) a partir de 41h de exposição a novaluron (correspondente, em larvas controle, a aproximadamente metade do 4º instar, L4int). Essa queda pode ser explicada pelo efeito tempo-dependente do produto sobre a viabilidade das larvas associado à alta dose utilizada em nossos experimentos (IE₉₉). Monitoramento da viabilidade do grupo sentinela, exposto à mesma dose de novaluron, revelou que apenas cerca de 5% das larvas sobreviviam ao tratamento. Isso sugere que as larvas coletadas para as análises de expressão de *AaCHS1*, apesar de vivas, já estão muito debilitadas e têm sua expressão gênica fortemente abalada. Esta possibilidade é confirmada a partir da observação de que a expressão do gene constitutivo *rp49* também foi reduzida no grupo experimental.

Uma hipótese, alternativa ao mecanismo de *feedback* positivo de expressão de *AaCHS1b*, é o atraso fisiológico de expressão deste transcrito no grupo experimental. Larvas expostas ao inibidor novaluron teriam a cronologia de seu desenvolvimento atrasada. Ou seja, larvas tratadas, coletadas no ponto experimental L3f seriam, fisiologicamente, L3int. Na tentativa de elucidar essa questão, ensaios futuros de acompanhamento do processo de muda em larvas tratadas com o produto já estão previstos.

Nossos resultados apontam para interferência de novaluron na expressão de *AaCHS1*. Contudo ainda não é possível saber se este BPU está agindo diretamente sobre a enzima CHS1. Observamos que a redução do conteúdo de quitina nas larvas de *Ae. aegypti* expostas ao produto é concomitante com um aumento da expressão do gene *AaCHS1*, principalmente do transcrito *AaCHS1b*.

Muito ainda resta a esclarecer sobre os mecanismos de ação dos CSI. É provável que estes compostos atuem sobre outros alvos, distintos da quitina Sintase. Alguns estudos com diflubenzuron revelaram que estes compostos conseguem inibir a síntese de quitina em insetos, mas não em fungos, que também possuem a enzima CHS (Post e Vicent, 1973; Ishaaya e Casida, 1974). Por outro lado, sabe-se que CSIs da classe das polioxinas D agem tanto em insetos quanto em fungos.

Alguns estudos apontam para diferentes efeitos dos BPU, como a interrupção do fluxo de Ca⁺² intracelular (Nagakawa e Matsumura, 1994). Abo-Eighar *et al.* (2004) acreditam que o alvo do BPU diflubenzuron é um transportador ABC, mais especificamente um receptor de sulfoniluréia (SUR), que estaria presente em vesículas cuticulares dos insetos. Os autores propuseram esse sítio de ação

baseados em ensaios de competição entre diflubenzuron e a droga glibenclamida, uma sulfoniluréia utilizada em tratamento de diabetes. A glibenclamida atua sobre um receptor SUR, acarretando a entrada do íon Ca^{+2} em células pancreáticas, e promovendo a liberação de insulina. Neste trabalho, os autores demonstraram a presença de um receptor de sulfoniluréia (DSUR) no tegumento de *D. melanogaster*. Verificaram ainda que glibenclamida prejudica a síntese de quitina em tegumentos cuticulares, do mesmo modo que diflubenzuron. Em outras palavras, o BPU citado parece competir com a droga pelo mesmo sítio de ligação. Os autores sugerem relação entre SUR e a translocação dos monômeros de GlcNac. Entretanto, a função de SUR na síntese de quitina ainda não é entendida.

Gangisshetti *et al.* (2008) estudaram o impacto de dois CSI da classe dos BPU (diflubenzuron e lufenuron) sobre diferenciação de cutícula em embriões de *D. melanogaster*. Os autores compararam fenótipos oriundos de mutantes de genes envolvidos na síntese de quitina com fenótipos de moscas tratadas, na tentativa de compreender o modo de ação dos BPU. Além de redução do conteúdo de quitina epidermal e traqueal em embriões tratados, os autores observaram que a correta organização das fibras de quitina na cutícula dos embriões estava relacionada à quantidade da mesma. Este trabalho relata efeito dose-dependente dos BPU sobre a embriogênese e correlaciona efeitos do tratamento na morfologia com fenótipos de mutantes para genes relacionados com a síntese de quitina. Em particular, foi observado que altas concentrações dos BPU geram fenótipos similares a mutantes *kkv* (ortólogo de *CHS*), o que já havia sido relatado por Moussian *et al.* (2005).

Entretanto, Gangisshetti *et al.* (2008) não conseguiram observar efeitos significativos dos BPU testados sobre a expressão do gene *kkv* durante o desenvolvimento embrionário do modelo estudado (expressão de até duas vezes não foi considerada neste trabalho). Este resultado suporta a hipótese de que a ação dos BPU sobre a síntese de quitina não ocorre diretamente na enzima quitina Sintase. Os autores propõem que os BPU atuariam inibindo um transportador ABC, responsável pelo transporte ativo do íon Ca^{+2} para o meio extracelular. A saída de cálcio intracelular garantiria as mudanças de concentração iônica e pH ótimo necessários à ativação da quitina Sintase.

Em relação aos cortes histológicos, as microscopias de campo claro demonstraram que a metodologia testada poderá ser utilizada futuramente, pois tanto o exoesqueleto quanto as estruturas internas em ambas as condições testadas foram preservadas. O tratamento com novaluron pareceu interferir com estruturas

provavelmente quitinosas do intestino das larvas. Pretendemos analisar os prejuízos causados na estrutura quitinosa do exoesqueleto de larvas tratadas verificando, por microscopia fluorescente, a presença de quitina através de marcação com fluoróforos específicos para este polissacarídeo.

A proposta deste estudo foi contribuir com a compreensão dos efeitos e do mecanismo de ação de um BPU em larvas de *Ae. aegypti*, já que esta classe de inseticidas será efetivamente introduzida no controle do vetor da dengue no Brasil (SVS, 2009). Diflubenzuron e novaluron são fortes candidatos para utilização no controle de *Ae. aegypti*, já que estes compostos foram recentemente aprovados para uso em água potável (WHO, 2007).

Nossa equipe visa continuar com as investigações sobre a expressão de genes relacionados com a síntese de quitina e colaborar com informações para o entendimento sobre a síntese de quitina e o endereçamento molecular dos inibidores deste processo.

6) CONCLUSÕES

- Identificamos os momentos de ecdise L3:L4 e L4:pupa do vetor *Ae. aegypti* a 28°C
- A ecdise L3:L4 ocorre em menos tempo e de forma mais sincronizada que L4:pupa
- Tratamento com novaluron diminuiu o conteúdo de quitina das larvas de forma dose-dependente
- Novaluron interfere com a expressão dos dois transcritos do gene *AaCHS1* de forma distinta
- O aumento do nível de expressão de *AaCHS1b*, em larvas L3 tratadas com novaluron, pode refletir um mecanismo de *feedback* positivo ou um atraso fisiológico no desenvolvimento larvar induzido pelo BPU
- A metodologia utilizada para fixação de larvas e obtenção de cortes histológicos preservou as estruturas internas e tem potencial de ser empregada na identificação de estruturas quitinosas

7) ANEXO

Colaboração e trabalhos no período

Paralelamente aos objetivos desta dissertação, no período do Mestrado, foram publicados os seguintes artigos:

- Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL (2009) Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104(1): 124-126.

Neste estudo foi avaliada a influência da temperatura no tempo de desenvolvimento embrionário e na viabilidade dos ovos de *Ae. aegypti*. A diapausa, ao final da embriogênese, pôde ser interrompida com uma solução que estimulou a eclosão dos ovos. Foram testadas temperaturas entre 12-36°C. O limite máximo de temperatura suportado por embriões desta espécie foi de 35°C e o limite mínimo foi inferior a 12°C. As variações de temperatura influenciaram significativamente a viabilidade dos ovos.

- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA, Valle D (2008) Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. BioMed Central Development Biology, 8: 82.

Este trabalho confirmou a presença de quitina na cutícula serosa de embriões de *Ae. aegypti*. Também foi apontado o papel da cutícula serosa quitinizada na resistência à dessecação dos ovos deste vetor. Neste trabalho pude colaborar tanto com os ensaios de viabilidade dos ovos, quanto com os de quantificação bioquímica de quitina.

8) REFERÊNCIAS

- Abo-Elghar GE, Fujiyoshi P, Matsumura F. Significance of the sulfonyleurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004; 34: 743-752.
- Adams MD, Susan EC, Robert AH *et al.* The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 2000; 287: 2185-2195.
- Addison JA. Safety testing of tebufenozide. A new molt-inducing insecticide for effects on non-target forest soil invertebrates. *Ecotoxicolol Environ Saf*. 1996; 28: 14- 24.
- Arakane Y, Hogenkamp DG, Zhu YC, Kramer KJ, Specht CA, Beeman RW, Kanost MR, Muthukrishnan S. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004; 34: 291–304.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Specht CA, Tomoyasu Y, Lorenzen MD, Kanost M, Beeman RW. The *Tribolium chitin synthase* genes *TcCHS1* and *TcCHS2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Mol Biol*. 2005; 14(5): 453 – 463.
- Beaty BJ, Marquadt WC. The biology of disease vectors. Colorado: University Press of Colorado; 1996.
- Belinato TA, Martins AJ, Lima JBP, Lima-Camara TN, Peixoto AA, Valle D. Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(1): 43-47.
- Belinato TA. Efeito do triflumuron - um inibidor da síntese de quitina – sobre o desenvolvimento e a reprodução de culicídeos vetores de doenças. Tese de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro; 2007.
- Borror DJ, Tripleton CA, Jonson NF. An introduction to the study of insect. 6ª Ed. Nevada: Souders College Publishing; 1989.
- Boudjelida H, Bouaziz A, Soin T, Smagghe G, Soltani N. Effects of ecdysone agonist halofenozide against *Culex pipiens*. *Pestic Biochem Physiol*. 2005; 83: 115-123.

- Braga IA, Lima JBP, Cunha SP, Soares SS, Melo RCGM, Valle D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas States, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99:199-203.
- Braga IA, Mello CB, Peixoto AA, Valle D. Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) development in laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100(4): 435- 440.
- Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiol Serv Saúde. 2007; 16 (4): 279-293.
- Brogdon WG, McAllister JC. Insecticide resistance and vector control. Emerg Inf Dis. 1998; 4: 605-613.
- Brusca RC, Brusca GJ. Invertebrates. 2^a Ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc; 2003.
- Candy DJ, Kilby BA. Studies on chitin synthesis in the desert locust. J Exp Biol. 1962; 39: 129-140.
- Carlson JR, Bentley D. Ecdysis: neural orchestration of a complex behavioral performance. Science. 1977; 195(4282): 1006 – 1008.
- Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. Am J Clin Pathol. 1973; 59 (3): 365-73.
- Casida JE, Quistad GB 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? Ann Rev Entomol. 1998; 43: 1-16.
- Chapman RF. The insects. Structure and Function. 4^a Ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1998.
- Chavasse DC, Yap HH. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. WHO/CTD/WHOPES/97.2.. Geneva, WHO; 1997.
- Chen X, Tian H, Zou L, Tang B, Hu J, Zhang W. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A, with RNA interference. Bull Entomol Research. 2008; 98: 613–619.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-9, 1987.
- Clements AN. The biology of mosquitoes. Development, nutrition and reproduction. London: Chapman and Hall; 1992.

- Cohen E. Chitin Biochemistry: synthesis and inhibition. *Annu Rev Entomol.* 1987; 32:71-93.
- Cohen E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag Sci.* 2001; 57: 946-950.
- Consoli R, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994.
- Cristophers SR. *Aedes aegypti*. The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. London: Cambridge University Press; 1960.
- Crow, J. F. Genetics of resistance to chemicals. *Annu. Rev. Entomol.* 1957; 2: 227-246.
- D'Amato C, Torres JPM, Malm O (2002) DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental – Uma revisão. *Quim Nov.* 2002; 25(6): 995-1002.
- Darvas B, Polgar L, Tag El-din MH, Eross K, Wing KD (1992) Developmental disturbances in different insect orders caused by an ecdysteroid agonist, RH 5849. *J Econ Entomol.* 1992; 85(6): 2107-2112.
- Donalísio MR, Glasser CM. 2002. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. *Rev Bras Epidemiol SP.* 2002; 5(3): 259-272.
- Estrutura da molécula de quitina. [online] [Capturado em 20 de setembro 2008]. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Quitina>. Wikipedia; 2008.
- Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(1): 124-126.
- Forattini OP. *Culicidologia Médica*. Vol. 1. São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo – EDUSP; 1996.
- Forattini OP. *Culicidologia Médica*. Vol. 2. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo – EDUSP; 2002.
- Fournet F, Sannier C, Montney N. Effects of the insect growth regulators and diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc.* 1993; 9(4): 426-430.
- Fournet F, Sannier C, Moriniere M, Porcheron P, Monteny N. Effects of two insect growth regulators on ecdysteroid production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1995; 32: 588-593.

- Gagou ME, Kapsetaki M, Turberg A, Kafetzopoulos D. Stage-specific expression of the chitin synthase *DmeChSA* and *DmeChSB* genes during the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Insect Biochem Mol Biol.* 2002; 32: 141–146.
- Gangishetti U, Breitenbach S, Zander M, Saheb SK, Müller U, Schwarz H, Moussian B. Effects of benzoylphenylurea on chitin synthesis and orientation in the cuticle of the *Drosophila* larvae. *European J Cell Biology.* 2008; 1-14.
- Gentile C, Lima JBP, Peixoto AA. Isolation of a fragment homologous to the *rp49* constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100(6): 645-647.
- Gentile, C. Genética molecular dos ritmos circadianos em mosquitos vetores (Díptera:Culicidae). Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro; 2007.
- Giglio NF. Efeito do novaluron - um inibidor da síntese de quitina – sobre *Aedes aegypti* em laboratório e simulado de campo. Tese de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro; 2008.
- Gomes AC, Forattini OP, Kakitani I, Marques GRAM, Marques CCAM, Marucci D, Brito M. Microhabitats de *Aedes albopictus* (Skuse) na região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública.* 1992; 26: 108-118.
- Graf JF. The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasitol today* 1993; 9(12): 471-474.
- Hajjar NP. *Insecticides.* New York: John Wiley & Sons; 1985.
- Hartberg WK, Craig-Jr GB. Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitos. II Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. *Evolution.* 1970; 24: 692-703.
- Hayes JM, Rigau-Péres JG, Reiter P, Effler PV, Pang L, Vorndam V, Hinten SR, Mark KE, Myers MF, Street K, Bergau L, Meyer C, Armador M, Napier M, Clark GG, Biggerstaff BJ, Gubler DJ. Risk factors for infection during a dengue-1 outbreak in Maui, Hawaii, 2001. *Tropical Medicine and Hygiene.* 2006;100: 559-566.
- Heller JJ, Mattioda H, Klein E, Sagenmuller A. Field evaluation of RH 5992 on lepidopterous pests in Europe. *Pest Dis.* 1992; 2: 59-65.
- Hemingway J, Ranson H. Inseticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann Rev Entomol.* 2000; 45: 371-391.

- Hogenkamp DG, Arakane Y, Zimocho L, Merzendorfer H, Kramera KJ, Beemanb RW, Kanosta MR, Spechtd CA, Muthukrishnana S. Chitin synthase genes in *Manduca sexta*: characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development. *Insect Biochem and Mol Biol*. 2005; 35: 529–540.
- Ibrahim GH, Smartt CT, Kiley LM, Christensen BM. Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2000; 30: 1213-1222.
- IRAC-BR. Modo de ação de inseticidas e acaricidas [on-line]. Comitê Brasileiro de ação à resistência a inseticida. [Capturado em março de 2008]. Disponível em: <http://www.irac-br.org.br>.
- Ishaaya I, Casida JE. Dietary TH-6040 alters cuticle composition and enzyme activity of housefly larval cuticle. *Pestic Biochem Physiol*. 1974; 4: 484–490.
- Jungreis, AM. Physiology and Composition of Molting Fluid and Midgut Luminal Contents in the Silkworm *Ityalophora cecropia*. *J. Comp. Physiol*. 1973; 88: 113-127.
- Kato N, Mueller CR, Fuchs JF, Wessely V, Lan Q, Christensen BM. Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006; 36: 1–9.
- Ke Dong. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci*. 2007; 7:17–30.
- Kreutzweiser DP, Capell SS, Wainio-Keiser KL, Eichenberg DC. Toxicity of a new molt-inducing insecticide (RH-5992) to aquatic invertebrates. *Ecotoxicol Environ Saf*. 1994; 28: 14-24.
- Lehane MJ. Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol*. 1997; 42: 525-550.
- Lehmann PF e White LO 1975. Chitin Assay Used to Demonstrate Renal Localization and Cortisone-Enhanced Growth of *Aspergillus fumigatus* Mycelium in Mice. *Infection and Imunity*. 1975; 12: 987-992.
- Lima JBP, Melo NV, Valle D. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop SP*. 2005; 47(3): 125-130.

- Lima JBP, Pereira da Cunha M, Silva JRC, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D. *Aedes aegypti* resistance to organophosphates in several localities in Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68: 329-333.
- Lima JBP. *Aedes aegypti* e *Anopheles* neotropicais, vetores de importância médica no Brasil: Aspectos básicos de biologia e controle. Dissertação de conclusão de Doutorado em Biologia Parasitária. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; 2003.
- Lima MM, Aragão MB, Amaral RS. Criadouros de *Aedes aegypti* encontrados em alguns bairros da cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil em 1984-85. *Cad Saúde Pub.* Rio de Janeiro.1988; 4: 293-300.
- Lockwood JA, Sparks TC, Story RN. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. *Bull Entomol Soc Am.* 1984; 30: 41-50.
- Lourenço-de-Oliveira R, Castro MG, Braks MA, Lounibos LP. The invasion of urban forest by dengue vectors in Rio de Janeiro. *J. Vector Ecol.* 2004; 29: 94-100.
- Lourenço-de-Oliveira R. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. Em: Coura, JR *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 1ª Ed. Vol 2, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2005.
- Lourenço-de-Oliveira. Rio de Janeiro against *Aedes aegypti*: yellow fever in 1908 and dengue in 2008 – Editorial. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(7): 627-628.
- Martins AJ, Belinato TA, Lima JBP, Valle D. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Pest Manag Sci.* 2008; 64 (6): 676-680.
- Merzendorfer H. Insect chitin synthases: a review. *J Comp Physiol B.* 2005; 176: 1-15.
- Merzendorfer H, Zimoch L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol.* 2003; 206: 4393-4412.
- Mian LS, Mulla MS. Biological and environmental dynamics of insect growth regulators (IGRs) as used against Diptera of public health importance. *Res Rev.* 1982; 84: 27-112.

- Ministério da Saúde. Controle de vetores da febre amarela e dengue. Instruções para pessoal de operações (Normas Técnicas). Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Distrito Federal; 1994
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77(3): 467-477.
- Montella IRC. Estudos dos mecanismos bioquímicos de resistência a inseticidas em diferentes populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1972) do Brasil. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro; 2008.
- Mosquito *Ae. aegypti*, representante da tribo Aedini. [online] [Capturado em 20 de setembro 2008]. Disponível em: <http://www.faunabrasil.com.br>. FAUNABRASIL; 2008.
- Moussian B, Schwarz H, Bartoszewski S, Nüsslein-Volhard C. Involvement of chitin in exoesqueleto morfogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Morphology* 2005; 264: 117-130.
- Mulla MS, Darwazeh HA, Ede L, Kennedy B. Laboratory and field evaluation of the IGR fenoxycarb against mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* 1985; 1(4):442-8.
- Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, Chompoosri J, Zaim M, Su T. Laboratory and field evaluation of novaluron, a new acylurea insect growth regulator, against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Vec Ecol.* 2003; 28: 241-254.
- Nelson MJ. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC; 1986.
- Nene, V, Wortman, JR, Lawson, D, Haas, B, Kodira, C, Tu, Z, Loftus, B, Xi, Z, Megy, K, *et al.* Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science.* 2007; 316: 1718-1722.
- Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM. Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu Biblioteca Biomédica; 2001.
- OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. [online] [Capturado em 20 de setembro de 2006]. Disponível em: <http://www.opas.org.br/prevencao>; 2006
- Ostrowski S, Dierick HA, Bejsovec A. Genetic control of cuticle formation during embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Gen.Soc Am* 2002; 161: 171-182.
- Pedrini N, Rosana C, Juárez MP. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp Biochem and Physiol.* 2007; 146: 124-137.

- Post LC, Vincent WR. A new insecticide chitin anythesis. *Naturwissenschaften*. 1973; 60: 431-432.
- Raymond M, Heckel DG, Scott JG. Interactions between pesticide genes: model and experiment. *Genet*. 1989; 123: 543-551.
- Rehimi N, Soltani N. Laboratory evaluation of Alsystin, a chitin synthesis inhibitor, against *Culex pipiens pipiens* L. (Dip., Culicidae): effects on development and cuticle secretion. *J Appl Entomol*. 1999; 123: 437-441.
- Rey L. *Parasitologia*. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
- Reynolds SE, Samuels RI. Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. *Adv. Insect Physiol*. 1996; 26: 157-232.
- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA, Valle D. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. *BMC Dev Biol* 2008; 8:82.
- Ribeiro CDM. Padronização de condições para criação de larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) visando aprimorar o monitoramento da resistência do vetor do dengue a inseticidas. Monografia de conclusão de bacharelado, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006.
- Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vordan AV. Dengue and dengue hemorrhagic fever. 1998 *Lancet*. 1998; 352: 971-977.
- Ruiz-Herrera J, San-Blas G. Chitin synthesis as target for antifungal drugs. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2003; 3(1):77-91.
- Ruppert E, Barnes RD. *Zoologia dos Invertebrados*. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Rocca Ltda; 1996.
- Rybczynski R, Gilbert LI. Prothoracicotropic hormone-regulated expression of a hsp 70 cognate protein in the insect prothoracic gland. *Mol and Cel Endocrinology*. 1995; 115: 73-85.
- Seng CM, Setha T, Chanta N, Socheat D, Guillet P, Nathan MB. Inhibition of adult emergence of *Aedes aegypti* in simulated domestic water-storage containers by using a controlled-release formulation of pyriproxyfen. *J Am Mosq Control Assoc*. 2006; 22(1): 152- 154.
- Serra-Freire NM, Mello RP. *Entomologia & Acarologia na Medicina Veterinária*. 1ª Ed. Rio de Janeiro. Livros de Veterinária Ltda; 2006.

- SESDC. Casos de Dengue. [online] [Capturado em 19 de fevereiro de 2009]. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/Docs/Acoes/dengue/Dengue>. Secretaria de Saúde e Defesa Civil do Rio de Janeiro; 2008.
- Siddal JB. Insect growth regulators and insect control: A critical appraisal. *Env Health Pers.* 1976; 14: 119-126.
- Slama K, Williams CM. 'Paper Factor' as an inhibitor of the embryonic development of the European bug, *Pyrrhocoris apterus*. *Nature.* 1965; 210 (33): 329-330.
- Smith KE, Wall R. Suppression of the blowfly *Lucilia sericata* using odour-baited triflumuron-impregnated targets. *Med Veterinary Entomol.* 1998; 12: 430-437.
- Sparks TC, Lockwood JA, Byford RL, Graves JB, Leonard BR. The role of behaviorin insecticide resistance. *Pest Sci.* 1989; 26: 383-399.
- Staal GB. Insect growth regulators with juvenile hormone activity. *Ann Rev Entomol.* 1975; 20: 417-60.
- Su T, Mulla MS, Zaim M. Laboratory and field evaluations of novaluron, a new insect growth regulator (IGR), against *Culex* mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* 2003; 19(4): 408-418.
- Sulaiman S, Jeffery J, Sohadi RA. Residual efficacy of triflumuron against the dengue vector, *Aedes albopictus* (Skuse). *Bull Soc Vec Ecol.* 1994; 19(2): 111-114.
- SVS. Dengue-Secretaria de Vigilância em Saúde [online] [Capturado em 2 de outubro de 2006]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/svs>.
- SVS. Manejo da resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas. Nota técnica: N° 013/2009. CGPNCD/DIGES/SVS/MS; 2009.
- Tellam RL, Eisemann CH. Inhibition of growth of *Lucilia cuprina* larvae using serum from sheep vaccinated with first-instar larval antigens. *International J Parasitol.* 1998; 28: 439-450.
- Tellam RL, Eisemann CH. Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem and Mol Biol.* 2000; 30:1189-1201.
- Tellam RL, Vuocolo T, Johnson SE, Jarmey J, Pearson RD. Insect Chitin Synthase: cDNA sequence, gene organization and expression. *Euro J Biochem.* 2000; 267: 6025-6042.
- Thireos, G, Kafetzopoulos, D. DNA encoding an arthropod chitin synthase. 1998. Patent WO 9853053-A.

- Tipulidae. [online] [Capturado em 20 de setembro 2008]. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Haltere>. Wikipedia; 2008.
- Tunaz H, Uygun N. Insect growth regulators for insect pest control. *Turk J Agric For*. 2004; 28: 377-387.
- Valero N, Levy A. Future prospects in developing of dengue vaccines. *Invest Clin*. 2008; 49(2):135-8.
- Vasuki V. Adult longevity of certain mosquito species after larval and pupal exposure to sublethal concentration of an insect growth regulator hexaflumuron. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1992; 23: 121-124.
- Vasuki V. Influence of IGR treatment on oviposition of three species of vector mosquitoes at sublethal concentrations. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999; 30: 200-203.
- Vasuki V. The effects of sublethal doses of hexaflumuron on the feeding behavior of mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res*. 1992; 82: 535- 538.
- Vazeille M, Rosen L, Mousson L, Failloux AB. Low oral receptivity for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from Southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 68: 203-208.
- Vythilingam I, Luz BM, Hanni R, Beng TS, Huat TC. Laboratory and field evaluation of the insect growth regulator pyriproxyfen (Sumilarv 0.5G) against dengue vectors. *J Am Mosq Control Assoc*. 2005; 21(3): 296-300.
- Ware GW, Whitacre DM. *The Pesticide Book*. 6^a Ed. Willoughby, Ohio: Meister Media Worldwide; 2004.
- WHO. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Fact sheet n^o 117. World Health Organization. Disponível no site: [<http://www.who.int/emc/diseases/ebola/denguepublication/index.html>]; 2002.
- WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization, Genebra. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13; 2005.
- WHO. Infectious disease: Dengue [online] [Capturado em 12 setembro 2006]. Disponível em: <http://www.who.int/topics/dengue>. World Health Organization; 2006.
- WHO. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae insecticides. World Health Organization, Genebra . WHO/VBC/81.807; 1981.
- WHO. Monitoring of insecticide resistance in malaria vectors. Organização Mundial de Saúde. Eastern Mediterranean Region, Cairo, Egypt; 1997.

- WHO. Novaluron in drinking-water: use for vector control in drinking-water sources and containers. World Health Organization, Geneva. WHO/SDE/WSH/07.01/11; 2007.
- WHO. Prevention, Diagnosis and treatment of insecticide poisoning. WHO Technical report series 889. World Health Organization, Geneva; 1984.
- WHO. Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides: Novaluron. World Health Organization, Geneva; 2003.
- WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, Bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. World Health Organization, Geneva. WHO/CDS/CPC/MAL 98.12; 1998.
- Wigglesworth VB. The Physiology of the Cuticle and of Ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Triatomidae, Hemiptera); with special reference to the function of the oenocytes and of the dermal glands. Quarterly J Microscopical Science. 1933; 2 (76): 269-318.
- Wigglesworth VB. The Role of the Epidermal Cells in Moulding the Surface Pattern of the Cuticle in *Rhodnius* (Hemiptera). J Cell Sci. 1973; 12: 683-705.
- Williams CM. The juvenile hormone of insects. Nature. 1956; 178: 212-213.
- Wilson TG, Cryan JR. Lufenuron, a chitin-synthesis inhibitor, interrupts development of *Drosophila melanogaster*. J Exp Zool. 1997; 278:37-44.
- Yarema C, McLean H, Caveney S. L-Glutamate retrieved with the moulting fluid is processed by a glutamine synthetase in the pupal midgut of *Calpodes ethlius*. J Insect Physiol. 2000; 46: 1497-1507.
- Zaim M, Guillet P. Alternative insecticides: an urgent need. Tr Parasitol. 2002; 18: 161-163.
- Zhang J, Zhu KY. Characterization of a chitin synthase cDNA and its increased mRNA level associated with decrease chitin synthesis in *Anopheles quadrimaculatus* exposed to diflubenzuron. Insect Biochem Mol Biol. 2006; 36: 712-725.
- Zhu YC, Specht CA, Dittmer NT, Muthukrishnan S, Kanost MR, Kramer KJ. Sequence of a cDNA expression of the gene encoding a putative epidermal chitin synthase of *Manduca sexta*. Insect Biochem Mol Biol. 2002; 32: 1497-1506.
- Zimoch L, Hogenkamp DG, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Merzendorfer H. Regulation of chitin synthesis in the larval midgut of *Manduca sexta*. Insect Biochem Mol Biol. 2005; 35: 515-52