



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Curso de Farmácia**



Caracterização Bioquímica e Estrutural da Enzima Triose Fosfato Isomerase em larvas do mosquito *Aedes Aegypti*

**João Henrique da Costa Leme**

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Graduação em Farmácia

Macaé – RJ

2014

**João Henrique da Costa Leme**

**Título:** Caracterização Bioquímica e Estrutural da Enzima Triose Fosfato Isomerase em larvas do mosquito *Aedes Aegypti*

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de farmacêutico;

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes**

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Graduação em Farmácia

Macaé – RJ

2014

**Banca Examinadora:**

---

Dr. José Roberto da Silva - Professor Adjunto da Universidade Federal do Rio de Janeiro Campus Macaé

---

Dra. Helga Fernandes Gomes – Pós-Doutora no Programa de Pós Graduação em Produtos Bioativos e Biociências da Universidade Federal do Rio de Janeiro Campus Macaé

---

Dr. Jorge Luiz da Cunha Moraes – Professor Adjunto da Universidade Federal do Rio de Janeiro Campus Macaé

## Agradecimentos

A Deus por ter me dado saúde e força para superar todas as dificuldades.

À minha Mãe, a qual amo muito, e a quem dedico essa conquista, pelo incentivo, paciência, carinho nos momentos difíceis e por ser meu exemplo de coragem, honestidade e caráter.

A minha vó Ninfa e ao meu Pai, que foram peças fundamentais na minha vida. Não seria quem eu sou hoje se não fosse por vocês.

Ao querido Professor Jorge Moraes pelo constante incentivo, apoio, amizade e por acreditar na minha pessoa.

Ao meu irmão Luiz Guilherme pelo constante apoio e amizade.

A minha tia Cida pela amizade e momentos de descontração.

Aos Profs Rodrigo Fonseca, José Nepomuceno, José Roberto e Helga Gomes pelas sugestões e apoio nos experimentos.

A todos os alunos do LIBHM pela convivência nas bancadas e pelos inúmeros momentos de descontração que tornaram o ambiente de trabalho agradável.

Aos meus amigos de faculdade: Anne, Irma, Hermon, Thiago, Raphael, Victor, Katharina e Bruno, pela amizade, apoio e momentos de descontração.

Às agências de fomento: FAPERJ e FUNEMAC pelo apoio a este trabalho.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01: Área em risco de Dengue em nível Global.....	02
Figura 02: Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> . Brasil, 2006.....	03
Figura 03: Casos de dengue no Rio de Janeiro no período entre 1996 a 2007.....	04
Figura 04: Notificação de agravos no período de 2007 a 2011 na cidade de Macaé .....	05
Figura 05: Ciclo de transmissão da dengue.....	06
Figura 06: Mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	07
Figura 07: Esquema do vírus da dengue.....	08
Figura 08: Ciclo de vida <i>Aedes aegypti</i> .....	09
Figura 09: Fase de ovo.....	10
Figura 10: Fórmula Estrutura do ácido Acetilsalicílico.....	12
Figura 11: Formula Estrutural do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT).....	14
Figura 12: Formula Estrutural temefos.....	14
Figura 13: Mecanismo da reação catalisada pela Triose fosfato isomerase.....	17
Figura 14: Esquema de uma subunidade de triose fosfato isomerase.....	18
Figura 15: Manutenção da colônia de <i>Aedes aegypti</i> .....	22

Figura 16: Sequência de aminoácidos AeTIM retirada do Banco de Dados.....	23
Figura 17: Vetor pGEM.....	24
Figura 18: Amplificação do Gene da AeTim através da técnica de PCR.....	28
Figura 19: Gel de agarose contendo o resultado do miniprep.....	28
Figura 20: Separação do Gene da TIM clonado através de Enzimas de Restrição.....	30
Figura 21: Alinhamento das sequências de aminoácidos das TIMs de <i>Aedes aegypti</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Anopheles</i> , <i>Drosophila</i> , <i>Trypanossoma</i> , <i>B. taurus</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>T. cruzi</i> .....	31
Figura 22: Modelo tridimensional da AeTIM.....	34
Figura 23: Estrutura tridimensional da HsTIM, obtida no PDB.....	35
Figura 24: Sobreposição entre os dímeros de AeTIM e HsTIM, (Verde: Estrutura do Homo sapiens, azul: Estrutura do Aedes.....	36
Figura 25: Análise da posição dos aminoácidos específicos na estrutura tridimensional do AeTIM.....	37
Figura 26: Análise da posição dos aminoácidos na estrutura tridimensional de AeTIM.....	38
Figura 27: Avaliação da diferença de Score-Z entre o Molde e o Modelo gerado. Em vermelho estrutura tridimensional do HsTIM e em preto AeTIM.....	40
Figura 28: Análise da posição dos aminoácidos na sequência de proteínas através do gráfico de energia.....	42

Figura 29: Atividade Enzimática em quase todo o ciclo de desenvolvimento do Mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	44
Figura 30: Porcentagem Atividade Inibida da AeTIM pelo composto DTNB.....	45
Figura 31: Porcentagem Atividade Inibida da AeTIM pelo composto MMTS.....	46
Figura 32: Porcentagem Atividade Inibida da AeTIM pelo composto 3 Bromo Piruvato.....	47
Tabela 01: Porcentual de Identidade entre as sequencias das TIMs de diversos organismos.....	33
Tabela 02: Análise em porcentagem do Gráfico Ramachandran.....	39

**ABREVIATURAS**

<b>TIM</b>	Triose fosfato isomerase
<b>AeTIM</b>	Triose fosfato isomerase do <i>Aedes aegypti</i>
<b>PB</b>	Pares de bases
<b>RT-PCR</b>	Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5'-ditio-bis2-nitrobenzoico
<b>MMTS</b>	Metilmetano tiosulfato
<b>DEN-1</b>	Sorotipo da dengue 1
<b>DEN-2</b>	Sorotipo da dengue 2
<b>DEN-3</b>	Sorotipo da dengue 3
<b>DEN-4</b>	Sorotipo da dengue 4
<b>L-1</b>	Estágio Larval 1
<b>L-2</b>	Estágio Larval 2
<b>L-3</b>	Estágio Larval 3
<b>L-4</b>	Estágio Larval 4

## Sumário

RESUMO.....	xi
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Epidemiologia.....	1
1.2 Dengue no Brasil.....	2
1.3. Ciclo de Transmissão.....	5
1.4. Mosquitos Vetores.....	6
1.5. Vírus da Dengue.....	8
1.6. Ciclo Biológico.....	9
1.7. Formas de Apresentação.....	11
1.8. Tratamento.....	11
1.9. Formas de Prevenção.....	13
1.10. Controle de Vetores.....	13
1.10.1. Controle Químico.....	13
1.10.2. Controle Biológico.....	15
1.10.3. Controle Físico.....	15
1.11. Resistência dos Inseticidas presentes no Mercado.....	16
1.12. A TIM e suas propriedades estruturais e funcionais.....	17
1.12.1 A TIM como alvo de desenho de drogas.....	19
1.13 Inibidores espécie específicos.....	19
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVO.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. Manutenção da Colônia de <i>Aedes aegypti</i> .....	21
4.2. Extração de RNA.....	22
4.3. Síntese da primeira fita de cDNA.....	23
4.4. Amplificação do gene da AeTIM por RT-PCR.....	23
4.5. Clonagem do gene da AeTIM.....	25
4.6. Alinhamento e Comparação de sequências.....	25
4.7. Estrutura tridimensional obtida por modelagem molecular.....	25
4.8. Determinação da atividade de triose fosfato isomerase (TIM).....	26

4.9 Avaliações do poder de Inibição de larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> por três drogas: Ácido 5,5'-ditio-bis2-nitrobenzoico (DTNB), Metilmetano tiosulfanato (MMTS) as quais reagem com cisteínas expostas a solventes, e o composto 3-Bromo-Piruvato (3-BrPA), o qual é uma substância alquilante com alta afinidade por resíduos de cisteínas.....	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Amplificação do gene da AeTIM por RT-PCR.....	27
5.2. Clonagem do gene da AeTIM.....	29
5.3. Alinhamento e Comparação de sequências.....	31
5.4. Modelagem Molecular da TIM do <i>Aedes</i> .....	33
5.5. Determinação da atividade de triose fosfato isomerase (TIM).....	42
5.6. Avaliação do Poder de Inibição de larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> por três drogas: Ácido 5,5'-ditio-bis2-nitrobenzoico (DTNB), Metilmetano tiosulfanato (MMTS) as quais reagem com cisteínas expostas a solventes, e o composto 3-Bromo-Piruvato (3-BrPA), o qual é uma substância alquilante com alta afinidade por resíduos de cisteínas.....	45
6.DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	52

## Resumo

O mosquito *Aedes aegypti* é vetor da dengue e da febre amarela. Nos últimos anos a dengue no Brasil e principalmente no estado do Rio de Janeiro tem atingido índices epidemiológicos alarmantes com milhares de pessoas infectas e muitos óbitos. Neste sentido, novos métodos de controle do vetor são necessários e podem ser atingidos por uma melhor compreensão do ciclo de vida desse inseto. A literatura mostra que a enzima Triose Fosfato Isomerase (TIM) tem sido usada como alvo para desenvolvimento de drogas antiparasitárias, como em: Carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba Histolytica* e *Trypanosoma cruzi*. Neste trabalho realizamos a clonagem dessa enzima, confirmada através do sequenciamento, construção de um modelo tridimensional baseado na modelagem por homologia de sequências, medição da atividade específica da enzima em todo o ciclo de vida do mosquito *A. Aegypti*, onde observamos maior atividade enzimática na fase larval, sendo assim o principal alvo para o controle da população do mosquito. A TIM é uma enzima da via glicolítica que cataliza a interconversão de gliceraldeído-3-fosfato a dihidroxiacetona-fosfato, sendo uma enzima evolutivamente conservada em todos os organismos, como mostrado pelo nosso experimento de alinhamento de sequências de nucleotídeos e aminoácidos. A comparação entre as sequências de aminoácidos da TIM do mosquito *Aedes aegypti* (AeTIM) e TIM de *H. sapiens* mostrou que os resíduos 66, 127 e 217 são comuns às duas enzimas. Entretanto, as cisteínas 7, 25, 43 e 143 são exclusivos da AeTIM. Os nossos resultados de modelagem molecular mostram que a cisteína 143 esta em uma região de fácil acesso estrutural a moléculas de baixo peso molecular. Desta forma, a cisteína 143 torna-se um bom alvo para desenvolvimento de inibidores seletivos da TIM do mosquito transmissor da dengue.

Também realizamos testes com três compostos contra a larva do mosquito e obtivemos relevantes resultados. Os compostos testados foram : 3-Bromo-Piruvato, Metilmetano tiosulfanato (MMTS) e Ácido 5,5'-ditio-bis2-nitrobenzoico (DTNB).

Acreditamos que o conjunto dos dados deste estudo propocionará informações importantes sobre a possibilidade de inibição seletiva de enzimas homólogas em ectoparasitos transmissores de doenças como o mosquito *Aedes aegypti*.

## 1-Introdução

Mosquitos são animais do filo *Arthropoda*, sub-filo *Hexapoda*, classe *Insecta*, ordem *Diptera*, subordem *Nematocera* e família *Culicidae*. A família *Culicidae* possui 3 subfamílias: *Anophelinae*, *Culicinae* e *Toxorhynchitinae*. Espécies das subfamílias *Anophelinae* e *Culicinae* são de grande interesse para o homem, uma vez que suas formas adultas são hematófagas e, em virtude dessa característica, podem transmitir diversas doenças. Mais de um século após a descoberta do papel de mosquitos como vetores de doenças, a humanidade ainda é severamente molestada por doenças transmitidas por eles, como a febre amarela, dengue, malária, dentre outras (Leite, 2011).

Dengue é um dos mais graves problemas de saúde pública da atualidade. Nos últimos anos a situação no Brasil e particularmente no estado do Rio de Janeiro chegou a um ponto alarmante, com milhares de pessoas infectadas com vírus e muitos óbitos. (Clarke, 2002).

O mosquito *Aedes aegypti*, vetor da febre amarela e da dengue, encontrou no Brasil as condições ambientais favoráveis a sua expansão. Um dos maiores problemas que envolvem a transmissão da dengue é a resistência dos ovos do *Aedes aegypti* a dessecação. Eles são capazes de sobreviverem, em dormência, durante meses em locais secos, até que encontrem as condições favoráveis para eclodirem (Tauil, 2010).

### 1.1 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 50 e 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue (MS, abril 2008).

Devido ao crescente número de casos notificados da doença, faz com que aumente a preocupação das autoridades de saúde perante a sociedade, principalmente devido às dificuldades enfrentadas para o controle das epidemias produzidas por esse vírus e pela necessidade de ampliação da capacidade instalada dos serviços de saúde para

atendimento aos indivíduos acometidos com formas graves, em especial a FHD. (Barreto, 2008).



**Figura 01:** Área em risco de Dengue em nível Global. Fonte: [HTTP://gamapserv.who.int/maplibrary/filse/maps/world\\_Denguetransmission\\_Extension\\_2007.png](http://gamapserv.who.int/maplibrary/filse/maps/world_Denguetransmission_Extension_2007.png).

## 1.2 Dengue no Brasil

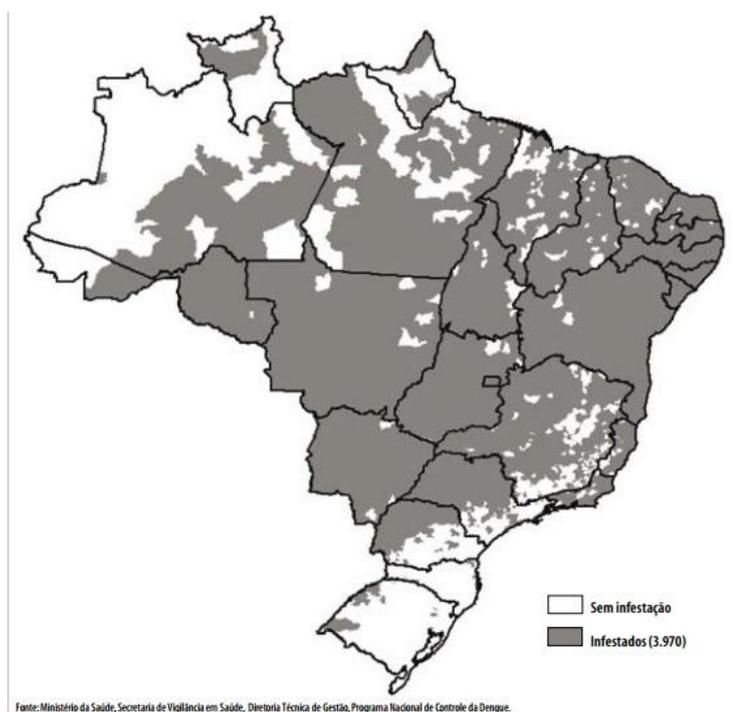
Acredita-se que o principal vetor da dengue, o mosquito *Aedes aegypti* tenha alcançado o território Brasileiro através de navios negreiros no século XIII (MS, 2010).

Mas os primeiros relatos da doença datam o final do século XIX, na cidade de Curitiba, e no início do século XX, na cidade de Niterói. Porém, no início do século XX, a preocupação que se tinha com o mosquito, era devido à transmissão da febre amarela e não da Dengue, pois nesta época os agravos que a dengue poderia causar não eram muito bem conhecidos (site Fiocruz).

Já na metade do século XX, ano de 1950, o Brasil consegue erradicar o mosquito *Aedes aegypti* do seu território, como resultado de medidas para controle da febre amarela. Mas, devido ao não cumprimento das medidas de prevenção, deu-se uma reintrodução do vetor. (MS,2002).

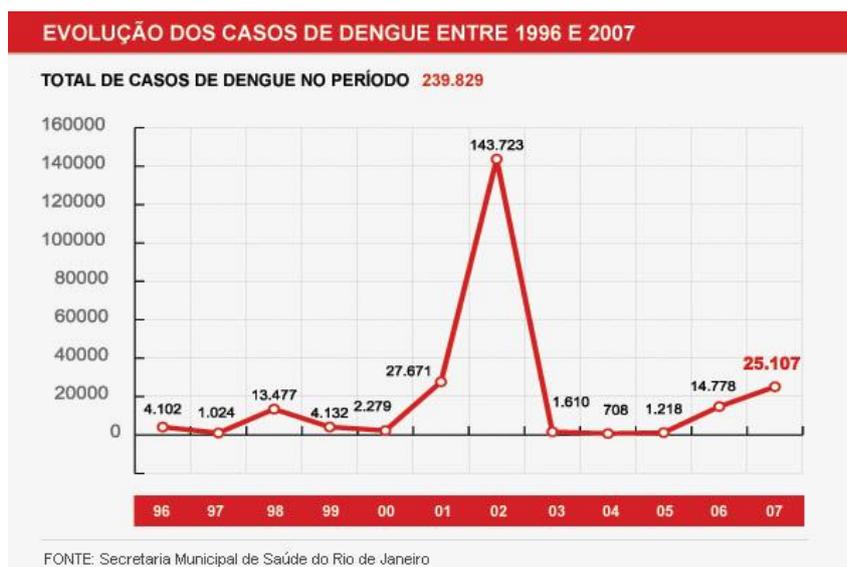
Nos anos de 1981 e 1982, na cidade de Roraima, ocorreram os primeiros casos da doença documentada clínica e laboratorialmente. (MS, 2002). Já a primeira grande epidemia aconteceu em 1986 na cidade do Rio de Janeiro e no ano de 2002, deu-se uma nova incidência da doença, tendo quase 700.000 casos notificados em todo País. (Brasil. Ministério da Saúde. 2010).

O mosquito *Aedes aegypti* pode ser encontrado nos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal, apresentando diferentes taxas de infestação, conforme pode ser observado na imagem abaixo (Braga; 2007).



**Figura 02:** Distribuição do *Aedes aegypti*. Brasil, 2006 Fonte: Ima Aparecida Braga; 2007.

Analisando somente o Estado do Rio de Janeiro no período de 1996 a 2007, nota-se um crescimento no número de casos até o ano de 2002, e a partir desta data há um decaimento, voltando a subir no ano de 2007, conforme representado pela figura 03. (Secretaria Municipal de Saúde do Estado do Rio de Janeiro, 2012).



**Figura 03:** Casos de Dengue no Rio de Janeiro no período entre 1996 a 2007.

Fonte: Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro.

A cidade de Macaé enfrenta atualmente grande problema com a dengue. São milhares de casos notificados anualmente, colocando a doença como um dos principais problemas de saúde pública do município. Entre o ano de 2007 a 2011 foram mais de 10000 casos notificados na cidade, ficando somente atrás de diarreia (Secretaria de Estado de Saúde, 2014).

Acredita-se que o município apresente vários criadouros do principal vetor da doença no Brasil, o mosquito *Aedes aegypti*, como: caixas d'água destampadas e pneus ao relento, contribuindo para o alto índice de infestação da doença a cidade (Secretaria de Estado de Saúde, 2014).

Tabela 40 - Notificação de agravos no período de 2007 a 2011

Agravos notificados	2007	2008	2009	2010	2011
Total	5 622	4 996	6 140	6 363	3 078
Diarréia (não é de notificação, desde 2011)	2 519	2 897	3 808	2 255	0
Dengue	1 840	748	804	2 075	953
Violência doméstica, sexual e outras	0	75	282	488	561
Varicela	120	290	123	433	186
Atendimento anti-rábico	165	100	284	244	154
Condiloma acuminado	196	166	112	110	113
Acidente de trabalho simples	0	0	20	148	322
Tuberculose	102	123	133	113	99
Síndrome do corrimento cervical	243	63	43	92	43
Hepatites virais	64	126	63	33	65
AIDS	42	108	65	90	80
Síndrome do corrimento uretral	71	63	49	43	61
Acidente trabalho com exposição material biológico	25	52	40	32	40
Influenza humana por novo subtipo pandêmico	0	0	164	3	1
Sífilis adquirida	36	11	9	15	91
Intoxicação exógena	0	5	24	4	129
Hanseníase	18	15	19	21	21
Herpes genital	34	16	9	15	27
Meningite	23	22	14	22	8
Síndrome da úlcera genital	26	19	7	14	10
Sífilis em gestante	22	15	8	7	22
Esquistossomose	5	5	23	12	14
Gestante HIV+	14	12	5	13	11
Doenças exantemáticas	23	12	5	1	4
Malária	6	5	2	21	10
Criança exposta ao HIV	0	3	1	22	17
Sífilis congênita	12	10	3	5	7
Acidente de trabalho grave	4	9	6	4	11
Anemia falciforme	0	0	0	21	4
Parotidite epidêmica	4	6	5	3	4
Leptospirose	3	4	4	2	0
Coqueluche	0	4	0	0	3
Acidente por animais peçonhentos	0	4	3	0	0
Leishmaniose tegumentar americana	1	0	1	2	3
Febre maculosa	1	3	0	0	1
Doença de Chagas aguda	1	3	0	0	0
Eventos adversos pós vacinais	1	2	0	0	0
Doença de Creutzfeldt-Jacob	0	0	1	0	0
LER DORT	1	0	0	0	0
Rotavírus	0	0	0	0	1
Tétano acidental	0	0	1	0	0
Rotavírus	0	0	0	0	1
Toxoplasmose	0	0	0	0	1

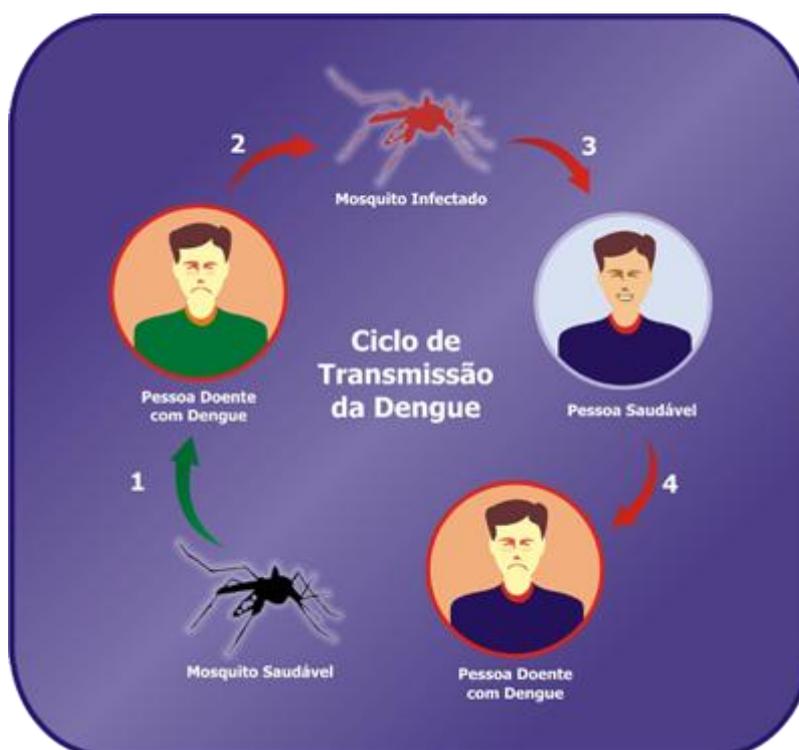
Fonte: Relatório de Gestão 2009/11 - Secretaria Municipal de Saúde.

**Figura 04:** Notificação de Agravos no período de 2007 a 2011 na cidade de Macaé. Fonte: Secretaria Municipal de Saúde.

A situação parece ter chegado a este ponto por diversas razões, dentre as quais o fato do vetor, o mosquito *A. aegypti*, ser um inseto de hábitos domiciliares, cujas fêmeas se alimentam preferencialmente de sangue humano; a presença de grandes aglomerações populacionais nos centros urbanos; o aumento do movimento de pessoas entre diversos locais do planeta, através de meios modernos de transporte (Clarke, 2002) e também devido aos métodos de controle utilizados não serem eficazes.

### 1.3 - Ciclo de Transmissão

Primeiramente, o mosquito *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* adulto, sem apresentar o vírus da dengue, pica uma pessoa infectada pelo vírus. Logo após o primeiro contato do mosquito sadio com o vírus, o mesmo multiplica-se no intestino médio do mosquito e posteriormente infecta outros tecidos chegando as glândulas salivares. Quando uma pessoa sadia, sem apresentar o vírus da dengue é picada por um mosquito infectado com o vírus, inicia-se o ciclo de replicação viral nas células estriadas lisas, fibroblastos e linfonodos locais, e posteriormente o vírus é disseminado para todo o organismo do indivíduo (McBride, 2000). Porém, os sintomas, como: febre, dor de cabeça e mal-estar surgem depois de um período de incubação, o qual pode variar de 2 a 10 dias. Não existe o perigo de uma pessoa infectada pelo vírus da dengue transmitir para outra pessoa diretamente (Ministério da Saúde, 2010).



**Figura 05:** Ciclo de Transmissão da Dengue. Fonte:

<http://www.laboratoriobiolider.com.br/dengue.html>

#### 1.4 Mosquitos Vetores

A Dengue pode ser transmitida por dois mosquitos: *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

O mosquito *Aedes aegypti* é originário da África subsaariana, onde se domesticou e se adaptou ao ambiente criado pelo homem, tornando-se antropofílico (artrópode que prefere alimentar-se em humano). (Rodhain & Rosen, 1997). Acredita-se que ele tenha sido introduzido na América na época da colonização, por meio das embarcações provenientes daquele continente, sendo considerado hoje o principal vetor da doença no Brasil. (BARRETO, TEIXEIRA, 2008; RIGAU-PÉREZ et al, 1999). É um mosquito diurno, de coloração preta, com listras e manchas brancas, adaptado ao ambiente urbano (TAVEIRA et al., 2001).



**Figura 06:** Mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: Ministério da Saúde

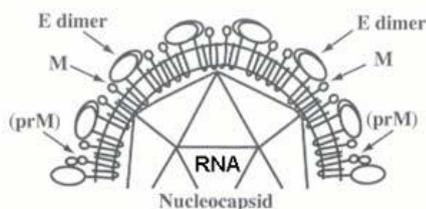
Já o *Aedes albopictus* é uma espécie oriunda das selvas asiáticas e até recentemente era restrito aquele continente. (IBÁÑEZ-BERNAL, S. et AL,1997) Pouco menos de quinze anos atrás, dissemina-se para as Américas. (Rodhain F, Rosen, 1997).

## 1.5 – Vírus da Dengue

O vírus da Dengue pertence ao grupo das arboviroses, gênero *Flavivírus* e a família *Flaviviridae*. É um vírus RNA, de filamento único, envelopado e que possui quatro sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (Westaway EG, Blok J. 1997), conforme representado na figura abaixo.

### O VÍRUS DA DENGUE

#### Modelo esquemático



Fields et al., 1996

**Figura 07:** Esquema do Vírus da Dengue. Fonte: Fields et AL,1996.

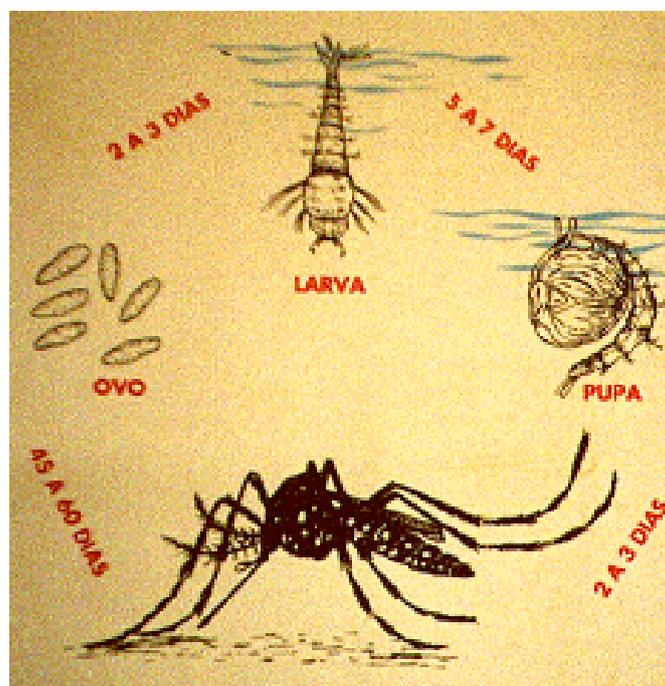
Após o término da Doença, o indivíduo infectado fica resistente aos outros sorotipos do vírus da Dengue durante uma semana, porém, ao término deste período a pessoa volta a ficar vulnerável aos outros sorotipos. Assim, diz-se que a proteção cruzada entre as quatro formas do vírus é transitória (site Fiocruz).

Ao longo dos anos, podemos perceber que o sorotipo predominante do vírus da dengue sofreu diversas alterações no território Brasileiro devido ao movimento de pessoas em diferentes regiões do planeta. Nos anos de 2002 a 2006, o sorotipo que predominou na grande maioria dos estados era o Sorotipo 3. (Ministério da Saúde, 2010. Já nos anos entre 2007 e 2009, notou-se uma modificação, do Sorotipo 3 para o 2. No final do ano de 2009, o predominante era o 1 e no ano 2010, o sorotipo 4 aparece em nosso território. (Ministério do Brasil, 2010).

Devido a estas diversas mudanças de sorotipo do vírus da dengue, fez com que diversas epidemias ocorressem no Brasil. (Silva, M, 2011).

### 1.6 – Ciclo Biológico

O Ciclo de Vida do Mosquito é dividido em duas fases, as quais são: Fase aquática e terrestre. A Fase aquática compreende: ovo, larva (L1, L2, L3 e L4) e pupa. Já a Fase terrestre é o mosquito adulto, o qual transmite a doença. Em condições adequadas de temperatura e umidade, o tempo previsto para o desenvolvimento do mosquito adulto, é em torno de 10 dias (Ministério da Saúde, 2001).

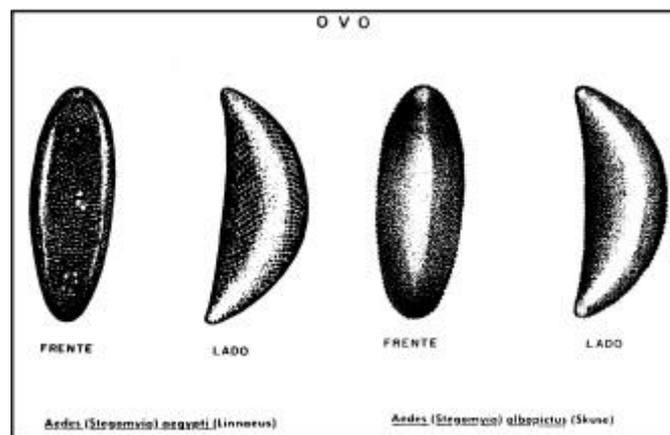


**Figura 08:** Ciclo de vida *Aedes aegypti* Fonte: IOC.fiocruz

Os ovos são depositados pelas fêmeas, fora da água, mais próximos da superfície, ficando aderidos a superfícies dos recipientes. (GILLET, 1961). O período para o desenvolvimento embrionário dura, em condições favoráveis de umidade e temperatura, de dois a três dias. (Forattini, 1962). No momento da postura os ovos são brancos, mas, rapidamente, adquire a cor negra brilhante, em consequência do contato com o oxigênio (Secretaria do Estado de Goiás, 2010).

Após completo desenvolvimento embrionário, os ovos são capazes de resistir a um longo período (máximo de um ano), sem contato com água (GOMES, 2006), conhecido como período de dormência ou diapausa. De acordo com (Marquardt et al, 2005; Tauber et al, 1986; Danks, 1987) esta característica é uma adaptação fisiológica de diversos insetos onde certos processos reprodutivos e comportamentais são alterados com o intuito de permitir a sobrevivência do organismo sob condições adversas.

A quantidade de ovos postos por fêmea/ciclo gonadotrófico, em média vão de 32 até 90 ovos (ALMEIDA, 2003; BRIEGEL, 1990; CANYON et al., 1999).



**Figura 09:** Fase de Ovo. Fonte: pbh

Já a fase larval é um período de alimentação e crescimento. (ARAGÃO et al., 2005), e é subdividida em quatro estágios de desenvolvimento (L1, L2, L3 e L4) e sua duração gira em torno de 5 a 7 dias dependendo da temperatura, alimentos e quantidade de larvas no criadouro. (TINKER, 1976). As larvas alimentam-se de detritos orgânicos, bactérias, fungos, ração presente na água e são providas de grande mobilidade. (Funasa, 2011).

A fase de pupa normalmente tem duração de dois dias e é a fase onde não ocorre alimentação. É a fase de transição do estágio larval para o adulto. (Funasa, 2001).

E a fase adulta é a fase reprodutora do inseto e a responsável pela transmissão da doença. O tempo de vida desta fase gira em torno de 30 dias. (GADELHA, 1985).

### 1.7 – Formas de Apresentação

Ao contrair o vírus da dengue, o indivíduo pode vir a manifestar dois tipos de quadros clínicos: dengue clássica e hemorrágica (Secretaria de Saúde, Paraná).

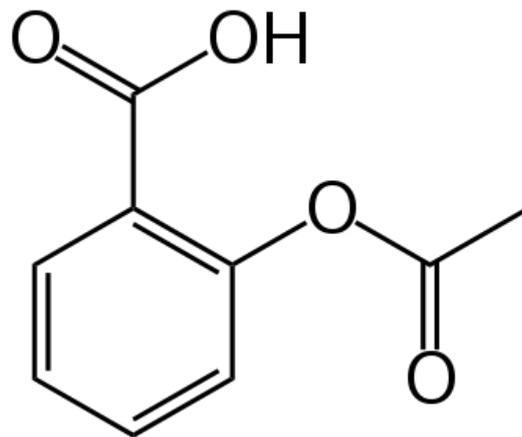
Os principais sintomas manifestados pelos indivíduos com dengue clássica são: febre alta (39° a 40°C), cefaleia, mialgia, dor retroorbital, vômitos (Secretaria de Vigilância em Saúde /MS).

Já a dengue hemorrágica, é uma forma mais grave da doença. Inicialmente, apresenta os mesmos sintomas da dengue clássica, porém no terceiro ou quarto dia de evolução da doença, dá-se o aparecimento de manifestações hemorrágicas e colapso circulatório em virtude do sangramento de pequenos vasos na pele. (Funasa,2002).

A infecção aguda por dengue pode gerar duas respostas imunológicas: primária e secundária. A resposta primária acontece em pessoas que nunca tiveram contato com o flavivírus e a quantidade de anticorpos eleva-se lentamente. Já a resposta secundária, dá-se em pessoas que já tiveram contato anterior com o vírus da Dengue, e título de anticorpos se eleva rapidamente em níveis bastante altos. (Couto, 2004, UFRRJ).

### 1.8 – Tratamento

Nos dias de hoje ainda não é possível encontrar um tratamento específico para dengue no Mercado, apenas medicamentos que aliviam os sintomas. A Organização Mundial da Saúde recomenda que pessoas com suspeitadas de Dengue, procurem imediatamente um posto de saúde, realizando a ingestão de muito líquido, como: água, sucos, soros, chás, soros caseiros, e não façam o uso de medicamentos à base de ácido acetil salicílico e antiinflamatórios, como aspirina e AAS, pois podem aumentar o risco de hemorragias. (Ministério da Saúde, 2010). Os sintomas podem ser tratados com dipirona ou paracetamol.



**Figura 10:** Formula Estrutura Acetilsalicílico. Fonte: Oswaldo Cruz

### 1.9 – Forma de Prevenção

Atualmente, não existe uma forma 100 % eficaz para a prevenção ao vírus da Dengue. Os métodos utilizados têm como foco agir sobre o vetor da doença (*Aedes aegypti* e *albopictus*), seja com inseticidas ou com a eliminação dos criadouros – água parada. Porém, diversas vacinas estão em fase de estudo no país e no mundo (Combate a dengue, 2010), com o intuito de diminuir os números de casos da doença, por serem mais eficazes.

Um dos principais estudos sobre esta técnica de prevenção é o realizado no Instituto Butantan, em São Paulo. A Vacina hoje em desenvolvimento pelo Instituto utiliza a técnica de Engenharia Genética, colocando o material genético do vírus da dengue em outro organismo, como o vírus da febre amarela. (Instituto Butantan), buscando a sua atenuação.

Como sabemos, a dengue tem quatro sorotipos diferentes que provocam os mesmos sintomas. Para que uma vacina para a doença seja considerada eficaz, é necessário que a mesma consiga combater os quatros diferentes sorotipos do vírus. Assim, nesta pesquisa, os pesquisadores trabalham com este objetivo, que a vacina seja capaz de combater todos os sorotipos existentes. Porém, cada sorotipo é trabalhado separadamente, e no final do processo, após inibidos, serão colocados em uma única vacina (Instituto Butantan).

A vacina em teste será composta por três doses, as quais devem ser aplicadas em intervalos de seis meses uma da outra (site Fiocruz). Espera-se que após a imunização, o sistema imune do indivíduo seja capaz de produzir células de defesa, logo impedindo a infecção.

### 1.10 – Controle de Vetores

A tentativa de combate a diversos insetos e artrópodes é uma prática antiga, tendo os primeiros registros há mais de 2000 anos na China. Porém foi no final do século XIX que esta prática ganhou força. (Femusa, 2011).

Nos dias de hoje, muitas doenças já contam com vacinas eficazes, caso da febre amarela ou com medicamentos, caso da malária. Porém, a busca de novos compostos para inibir diversas doenças é imprescindível (Rodhain F, Rosen, 1997).

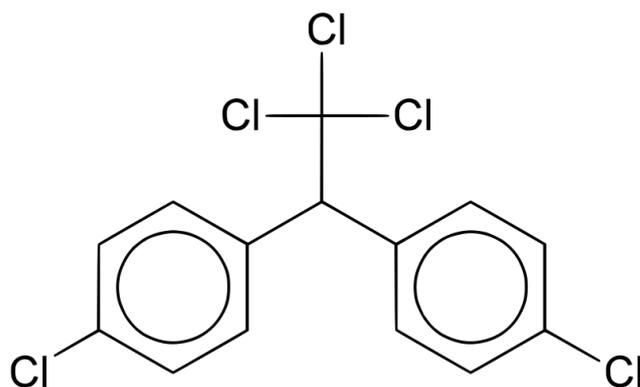
Basicamente, existem três formas de controle de vetores de doenças, os quais são: físico, químico e biológico.

#### 1.10.1 - Controle Químico

O Controle Químico é uma das práticas mais utilizadas para o controle de vetores de diversas doenças, seja com a utilização de inseticidas orgânicos ou inorgânicos. (Rose, 2001).

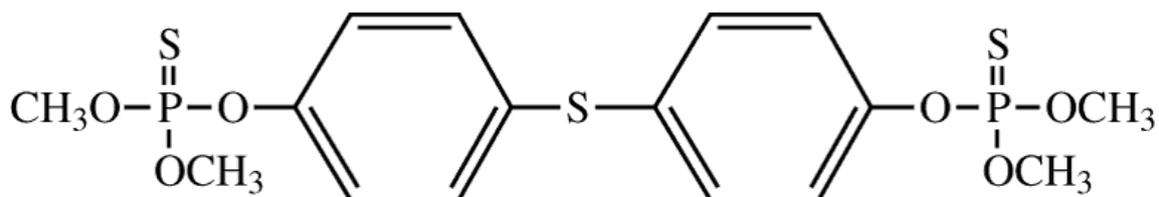
Um dos primeiros inseticidas utilizados é o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), um organoclorado inventado nos anos 40, durante a Segunda Guerra Mundial (Rozendaal, 1997). A partir do desenvolvimento deste produto, vários outros compostos orgânicos foram lançados no mercado, como os derivados dos grupos organofosforados, carbamatos ou piretroides. (Rose, 2001). Todos estes compostos atuam no mesmo local, interferindo no Sistema Nervoso Central dos insetos (Mellon, 1984).

A principal vantagem deste produto é a sua ação ser rápida, porém apresenta algumas desvantagens, como toxicidade aos mamíferos e ao meio ambiente e desenvolve a resistência a determinados vetores de doenças (Barreto, 2005).



**Figura11:** Forma Estrutural do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT).

O Organofosforado temefos foi o larvicida mais utilizado no Brasil para controle do Mosquito *Aedes aegypti* por mais de 30 anos. (BARRETO, 2005). Devido ao seu uso indiscriminado, diversos casos de resistência começaram a surgir e seu uso foi suspenso, pois não tinha mais efeito contra o mosquito vetor. (Andrade & Modolo 1991; Campos & Andrade 2001; Polanczyk et al. 2003; Braga et al. 2004; Carvalho et al. 2004; Luna et al., 2004).



**Figura 12:** Formula Estrutural temefos.

### 1.10.2 - Controle Biológico

Com o intuito de diminuir a resistência e toxicidade aos mamíferos devido ao uso indiscriminado de substâncias químicas, como DDT, temefos, novos métodos de controle estão sendo estudados.

Uma das alternativas propostas é a utilização de fungos entomopatogênicos para o controle dos vetores da dengue. O grande foco do estudo destes fungos para o controle de diversos vetores de doenças, é que os mesmos além de causarem diminuição da população de vetores, os mosquitos infectados com os fungos não transmitem a doença na mesma taxa que os mosquitos não infectados (Thomas e Read, 2007).

O Fungo *Metarhizium anisopliae* consegue penetrar nos insetos através da cutícula. No interior do inseto, produz algumas hifas que proliferam e consomem os tecidos dos órgãos internos do inseto. (Cole, 2003).

E diversos estudos mostram que incubando larvas do mosquito *Aedes aegypti* na presença de diferentes cepas de fungos *Metarhizium anisopliae*, a taxa de mortalidade variou de 6 a 90% (GOMES, 2009), mostrando que podem agir tanto no mosquito adulto quanto na larva.

Outra maneira de combater o vetor da dengue que esta sendo difundido nos dias de hoje, é a utilização de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*, as quais possuem grande propriedade larvicidas e são capazes de produzirem endotoxinas proteicas, as quais quando ingeridas pelas larvas do Mosquito, destroem o epitélio do intestino médio, levando-as à morte (Neto & Oliveira, 1985).

### 1.10.3 - Controle Físico

Já o Controle Físico consiste no aumento da temperatura da água de reservatórios, assim matando ovos e larvas em poucos minutos. (Donalísio, Maria, 2002).

### 1.11 – Resistência dos Inseticidas presentes no Mercado

Os Inseticidas são substâncias utilizadas em diversas áreas, como: agricultura, agropecuária e Saúde Pública, visando à inibição de vetores de doenças ou pragas. Devido ao uso errôneo e contínuo destes produtos, faz com que ocorra o surgimento de populações resistentes e gerando problemas para o controle de vetores. (Rose, 2001). Esta resistência é gerada por todas as classes de inseticidas, afetando a re-emergência

das doenças transmitidas por vetores, pois apesar do grande avanço no desenvolvimento de métodos de controle alternativos, os inseticidas químicos são ainda as principais formas de prevenção utilizada nos dias de hoje (Brogdon, 1988).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a resistência é definida como a habilidade de uma população de insetos em tolerar doses de inseticidas químicos que, em condições normais, causaria a morte (Braga & Valle, 2007).

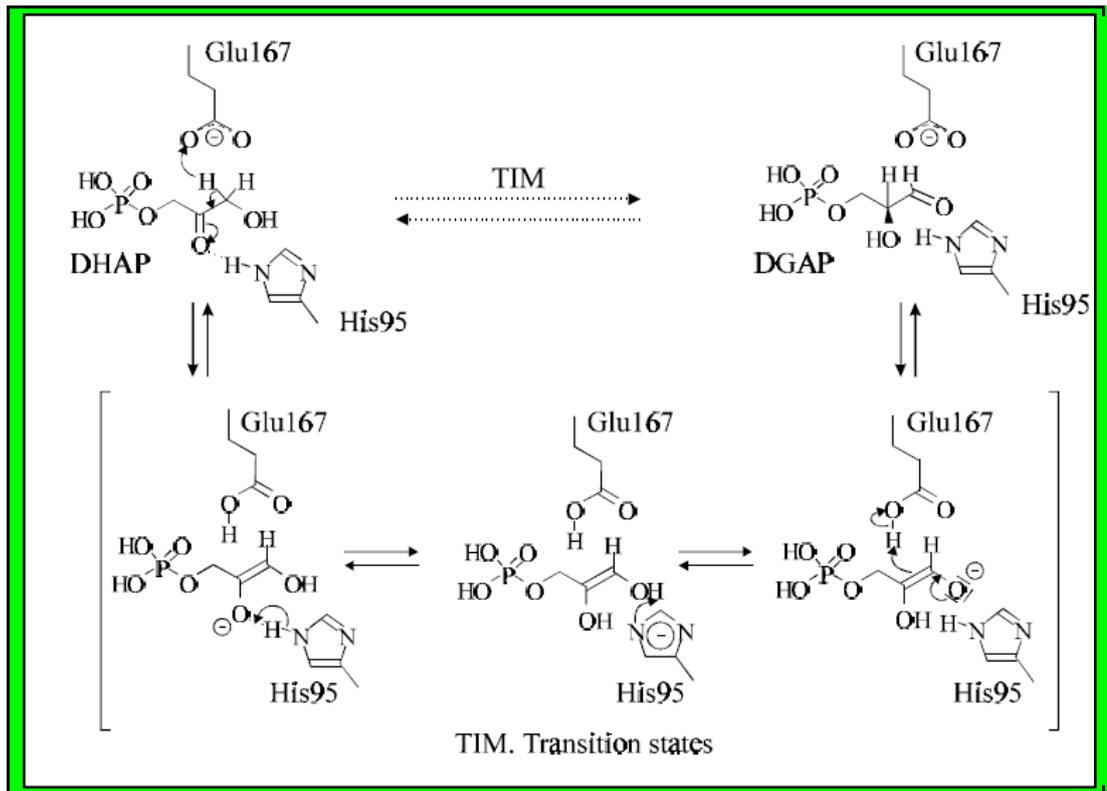
A Resistência, dita fisiológica é uma característica genética presente em diversos organismos. Assim, principalmente populações de Insetos podem, naturalmente, apresentar uma proporção de indivíduos que tenham alelos que lhes conferem resistência a um determinado produto químico. Também, cepas resistentes podem surgir como resultado do uso consistente e errôneo de certos produtos químicos (Ferrari, 1996).

Porém, apesar do grande número de estudos referente ao desenvolvimento de resistência, o número de mecanismos envolvidos ainda é bastante pequeno e necessita de uma maior atenção pelos cientistas do mundo (Ferrari, 1996).

No Desenvolvimento da resistência, pode ocorrer um fenômeno titulado de “resistência cruzada”, onde toda a classe torna-se comprometida (Cruz, 2002).

### 1.12 – A TIM e suas propriedades estruturais e funcionais

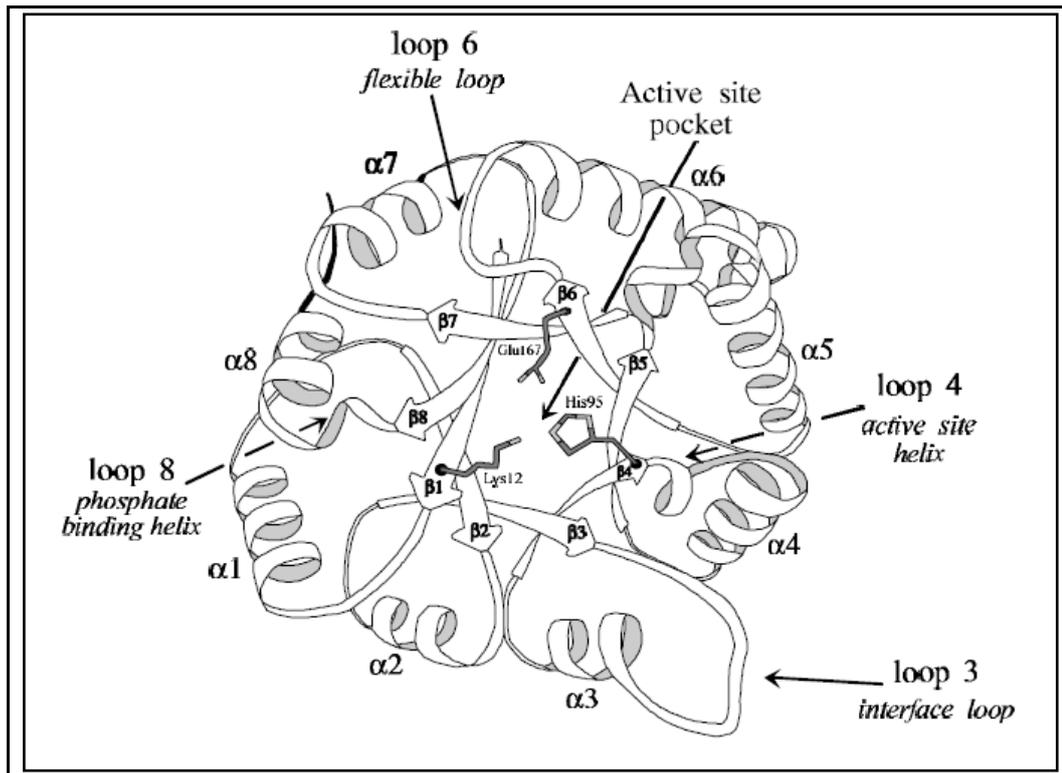
A triose fosfato isomerase (TIM) é uma importante enzima da via glicolítica e da gliconeogênese, que catalisa a conversão reversível de gliceraldeído 3-fosfato (G3-P) em dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Em insetos da família díptera a TIM tem função adicional de abastecimento do ciclo do  $\alpha$ -glicerofosfato, onde inicialmente a DHAP é reduzida a glicerol-fosfato que junto ao NADH formam um sistema de lançadeiras promovendo um transporte rápido de elétrons para mitocôndria e conseqüentemente reciclagem de  $\text{NAD}^+$  para glicólise (Whyard *et al.*, 1994b).



**Figura 13:** Mecanismo da reação catalisada pela Triose fosfato isomerase. (Wierenga, R.K. et al, 1991).

Todas as TIMs são da família das proteínas barril  $\alpha/\beta$ , onde cada monômero tem como característica principal ser formado por 8 folhas- $\beta$  unidas a 8  $\alpha$ -hélices por alças (figura 21).

A maior parte das TIMs descritas são homodímeros com peso molecular de aproximadamente 27 kDa por subunidade (Bell, et al., 1998 e Walden, 2001).



**Figura 14:** Esquema de uma subunidade de triose fosfato isomerase.

### 1-12.1 A TIM como alvo de desenho de drogas

Ao desenvolver uma droga, é necessário que a mesma seja a mais específica possível, evitando assim ser tóxica aos hospedeiros. Para isso, uma das principais ferramentas utilizadas para que se tenha uma inibição específica é a comparação entre as sequências de aminoácidos de diferentes espécies, á procura de resíduos não conservados. Esta abordagem está baseada na reação de drogas com aminoácidos específicos que não se conservaram durante a evolução, possibilitando inibição espécie-específica da enzima. (Gomez-Puyou et al., 1995). Um dos alvos para o desenvolvimento de drogas muito utilizado e descrito na literatura é o aminoácido cisteína, devido ao seu grupamento sulfidril exposto.

O desenvolvimento de drogas espécie – específica para inibição da TIM em diferentes vetores de doença, tem seguido este caminho e apresentados bons resultados, como no caso do composto p-toluenotiosulfonato que reage com cisteínas estruturalmente expostas. Esta droga não inibe as TIMs de *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*, mas inibe as TIMs de galinha e de *Schizosaccharomyces pombe* por

terem uma cisteína na posição 217 que as tornam mais susceptíveis a ação da droga devido a maior exposição estrutural deste resíduo nestas espécies. (Gomez-Puyou et al., 1995).e (Garza-Ramos et al., 1997; Garza-Ramos et al., 1998).

### 1.13 Inibidores espécie-específicos

Uma das técnicas muito utilizadas atualmente para o desenvolvimento de fármacos é a Modelagem Molecular. Como o nome sugere, é uma ferramenta computacional, a qual necessita de um conhecimento prévio de outras áreas, como: bioquímica, fisiologia, farmacologia e química orgânica.

Antes da descoberta desta técnica, o desenvolvimento de moléculas era muito mais complicado, levando um período de tempo maior e o custo também era elevado. Os efeitos adversos advindos das substâncias em testes eram descobertos somente na etapa clínica da pesquisa.

Ao desenvolver um composto, é de grande importância que o mesmo seja o mais específico possível, diminuindo assim os efeitos tóxicos em outros organismos. E através da técnica de modelagem isso se torna possível. A estratégia consiste na busca de aminoácidos não-conservados que sejam importantes para a função ou estabilidade da enzima de uma espécie em particular (Gomez-Puyou *et al.*, 1995). Um agente que modifique tal resíduo poderia inibir a função desta espécie, tendo pouco ou nenhum efeito na atividade da enzima homóloga de outras espécies (hospedeiros) que possuam um resíduo diferente nesta posição (Perez-Montfort *et al.* 1999).

Neste sentido, a enzima triose fosfato isomerase (TIM) tem sido muito estudada para promover a inibição da TIM de endoparasitas sem promover inibição da TIM dos hospedeiros vertebrados (Garza-Ramos et al., 1996; Perez-Montfort et al., 1999; Enríquez-Flores et al., 2011; Romo-Fonsillas et al., 2011).

## 2-Justificativa

Devido ao grande número de casos de dengue em todo o mundo, faz com que pesquisadores direcionem seus estudos a procura de novas formas de prevenção desta doença. A principal forma existente de prevenção desta doença é a utilização de produtos químicos, como os inseticidas, porém, gerando enorme resistência para o

mosquito vetor e toxicidade ao homem. Assim, novas formas de combate ao vetor necessitam ser estudadas.

A proposta principal deste trabalho é descobrir uma forma de prevenção para a dengue a qual seja a mais específica possível, evitando assim agir em outros organismos, principalmente os Seres humanos.

Já foi visto que o Metabolismo energético tem grande importância para o mosquito *Aedes aegypti*, principalmente para o voo. Assim, caso algum enzima chave do Metabolismo vier a ser alterada, a sobrevivência do mosquito será afetada, podendo levar a morte.

E a Enzima Triose fosfato isomerase (TIM) é uma das enzimas mais estudadas em todo mundo, desde suas características cinéticas e físico-químicas à elucidação de sua estrutura em diversos organismos. No entanto, não há trabalhos na literatura que descrevam estas características em mosquitos, como *Aedes Aegypti*, *Anopheles gambiae* e o carrapato bovino *Boophilus microplus*. Estas espécies estão envolvidas na transmissão de doenças como dengue, no caso do *Aedes*, doenças como babesios, no caso do carrapato. Isto os torna importantes alvos para o estudo da TIM e possivelmente o desenho de drogas inibidoras destes artrópodes vetores.

### **3-Objetivo**

Este trabalho teve como objetivo realizar tanto a caracterização Bioquímica e Molecular da enzima Triose fosfato Isomerase do Mosquito *Aedes aegypti*, visando à busca de inibidores específicos.

- 3.1 Estabelecer uma colônia do mosquito *Aedes aegypti* em nosso laboratório.
- 3.2 Síntese de cDNA da larva de mosquito.
- 3.3 Realizar a amplificação do gene da TIM do mosquito através do PCR.
- 3.4 Clonar o gene da TIM de *Aedes* através do vetor Pgem.
- 3.5 Monitorar a Atividade Enzimática em todo o ciclo de desenvolvimento do mosquito.
- 3.6 Analisar o poder de Inibição de três compostos frente ao homogenato de larvas do mosquito *Aedes aegypti*, os quais foram: DTNB, MMTS e 3-Bromo piruvato.

### **4- Materiais e Métodos**

#### **4-1 Manutenção da Colônia de *Aedes aegypti***

No Laboratório Integrado de Bioquímica Hatisaburo Masuda, Campus Macaé, UFRJ, possuímos um Insetário onde mantemos a Colônia de *Aedes aegypti* não infectados pelo vírus da dengue, de acordo com normas legais de manejo.

Os mosquitos são colocados em gaiolas dentro da B.O.D, com temperatura controlada, juntamente com sacarose 10%. A alimentação dos mesmos é feita utilizando camundongos saudáveis, da própria UFRJ, Campus Macaé.

Três dias após a alimentação, as fêmeas são colocadas para realizarem a postura, em papel de pão, devidamente umedecido.

Após a postura, o papel filtro contendo os ovos é colocado em uma bandeja com água, para que o ovo possa desenvolver e tornar-se larva. A fase de ovo dura normalmente três dias. Já o período larval, como apresentado na introdução é a fase onde ocorrem alimentação e crescimento, possuindo quatro estágios: Larva 1, Larva 2, Larva 3 e Larva 4 e tem duração de 5 a 7 dias.

A etapa de transição entre a fase larval e o mosquito adulto é a fase de pupa, a qual dura aproximadamente três dias.

E a última fase do ciclo de vida do *Aedes aegypti* é a de mosquito adulto, o qual é responsável pela transmissão da doença e seu período de vida é em torno de 1 mês.

Todo este ciclo de vida do Mosquito *Aedes aegypti* é realizado em nosso laboratório, tendo a colaboração de várias pessoas, como alunos de Iniciação, Mestrados e Docentes.



**Figura 15:** Manutenção da colônia de *Aedes aegypti*.

A figura acima representa os principais estágios do Ciclo de Vida do mosquito *Aedes aegypti*. A primeira Bandeja da imagem representa a fase larval. A segunda refere-se à fase de pupa e última e maior bandeja representa a fase adulta (mosquito). Todo o Ciclo de Vida do Mosquito é feito em nosso Insetário, de acordo com as Normas.

#### **4-2 Extração de RNA:**

Inicialmente, 200 mg de larvas do Mosquito em diferente estágio de desenvolvimento foram macerados em um eppendorf com a ajuda de um pistilo com 500  $\mu\text{L}$  de Trizol. A amostra foi centrifugada a 12000 X g por 10 minutos, o material insolúvel foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. Em seguida, o material foi homogeneizado por agitação via inversão, incubado a temperatura ambiente por 3 minutos, submetido à centrifugação 12000 X g por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e adicionado 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Posteriormente, a amostra foi homogeneizada por inversão e incubada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 40 minutos. Em seguida, a mostra foi centrifugada a 12000 X g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, a amostra foi lavada com 100  $\mu\text{L}$  de etanol 75 % e após a evaporação do etanol residual o RNA foi utilizado para amplificação da fita de cDNA.

#### 4-3 Síntese da primeira fita de cDNA:

O pellet de RNA foi resuspendido em 20 µL de água ultra pura esteril. Em outro tubo próprio para PCR, foi adicionado 2 µL de oligo(dT)12-18 e em seguida 10 µL da solução de RNA. A amostra foi aquecida a 70 °C por 10 minutos e imediatamente incubada em gelo por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado 4 µL do tampão (first strand buffer) fornecido pelo fabricante para a enzima transcriptase reversa SUPERSCRIPT II (GibcoBRL cat nº 18064-014), 2 µL de DTT 0,1 M e 2 µL de DNTP 10 mM ( 10 mM de ATP, 10 mM de CTP, 10 mM de GTP e 10 mM de TTP). A amostra foi homogeneizada por agitação via inversão e incubada em banho-maria a 42 °C por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 µL da enzima SUPERSCRIPT II (200 unidades) e o material foi incubada a 42 °C por 1 hora. A enzima foi inativada por aquecimento a 70 °C por 15 minutos.

#### 4-4 Amplificação do gene da AeTIM por RT-PCR:

Realizamos a busca da sequência de aminoácidos da TIM de *Aedes aegypti* no NCBI e ao encontrarmos, fizemos o desenho dos primers no programa Primer 3.

A sequência do gene da TIM *Aedes* contém 744 pb, não sendo considerado um gene grande, conforme representado figura 17.

```
>Triosephosphate isomerase cDNA 744pb (vectorbase: AEEL002542-RA)
ATGGGCCGCAAATTCCTGCGTCGGAGGAAACTGGAAGATGAATGGTGATAAGGCCAGCATC
ACCGATCTGTGCAAGACCTTGACCACTGGACCGCTGAGTGCCGACACCAGGTCATCGTC
GGATGCCAGCCCCCTATCTGACCTTGGCTCGCTCCAGCTGCCGGACAGCGTTGGAGTC
GCCGCCAGAACTGCTACAAGGTGGCCAAGGGTGCCTTACCAGGTAATTTCCGCCGGCC
ATGCTGAAGGACTTGAACATTTGGCTGGGTGATCCTGGGACATTCGGAGCGTCGTGCCATT
TTCGGTGAATCGGACGAACTGGTGGCCGATAAGGTGCGGCACGCTTTGGCCGAAGGTCG
AAGGTCATCGCTTGTATCGGCGAAACGCTGCAGGAACGTGAAGCCGGTCAAACCGAGGCC
GTGTGCTTCCGCCAGACCAAGGCCATCGCCGATAAGGTCAAGGACTGGAGCAACGTTGTG
ATTGCTTACGAACCGGTCGGGCTATTGGTACCGGTAAGACTGCCACCCCGAACAGGCC
CAGGAAGTGCACGCTGCCCTGAGGAAGTGGTTCACCGAGAATGTGTCCGCCGATGTTTCT
GGAGCAATCCGAATCCAGTACGGAGGATCGGTGCTGCTGCCAACTGTGTTGATTTGGCC
GCCAAGCCCGACATCGATGGTTTCTGTTGGTGGTGTCTTCTGTTGAAGCCGGAGTTTCAAT
CAGATCGTTAATGCTAGGCAGTAA
```

(Sequencia da TIM)

```
>Triosephosphate isomerase protein 247aa (vectorbase: AEEL002542-PA)
MGRKFCVGGNWKMGDKASITDLCKTLTTGPLSADTEVIVGCPAPYLTIARSQLPDSVGV
AAQNCYKVAKGAFTEI SPAMLKDLNIGWVILGHSERRAIFGESDELVADKVAHALAEGE
KVIACIGETLQEREAGQTEAVCFRQTKAIADKVKDWSNVV IAYEPVWAIGTKTATPEQA
QEVHAALRKWFTENVSADVSGAIRIQYGGSVTAANCRELAAKPDIDGFLVGGASLKPEFI
QIVNARQ
```

**Figura 16:** Sequência de aminoácidos AeTIM retirada do Banco de Dados.

Já o par de Primer desenhado foi:

Sequência R: CTG CCT AGC ATT AAC GAT CTG ATG AAC TCC

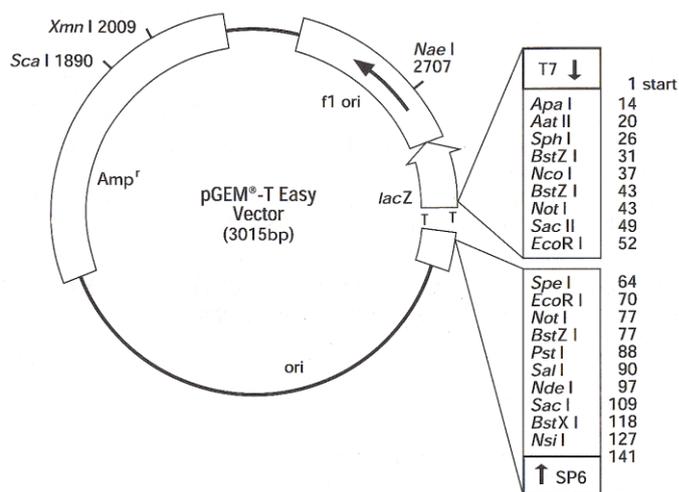
Sequência F: ATGGGCCGCAAATTCTGCGTC

A reação de PCR foi realizada utilizando para tal a Enzima High Fidelity, onde todo o protocolo foi seguindo conforme descrito no manual da Enzima, e o cDNA projetado.

Após o termino da reação, um gel de agarose foi feito e assim, conferido o resultado.

#### 4-5 Clonagem do gene da AeTIM

O fragmento amplificado no RT-PCR foi purificado e clonado utilizando o Vetor pGem. Para isso, foi seguido todo o protocolo determinado pelo fabricante. A ligação do plasmídeo com o gene da AeTIM foi transformado em bactéria competente TOP10.



**Figura 17:** Vetor pGEM. Fonte: promega.com

Primeiramente, foi realizada a ligação do produto da Amplificação do RT-PCR com Vetor, seguindo devidamente o protocolo. Posteriormente, foi feita a transformação da

ligação com a Bactéria competente TOP10, através de um choque térmico. As placas foram semeadas e colocadas para crescer durante 12 horas.

Uma pequena parcela da colônia foi colocada em um meio de cultura e levada para crescimento. Um miniprep foi realizado, onde todos os resíduos e impurezas foram retirados, deixando somente o DNA plasmidial contendo o gene da AeTIM. Um gel de Agarose foi feito e analisado o resultado.

Posteriormente, foi realizada uma Digestão do Miniprep, utilizando para isso algumas enzimas de restrição, como Ecor 1 e Spa 1 , e o resultado foi observado também através de um Gel de Agarose.

#### **4-6 Alinhamento e Comparação de sequências**

Para o alinhamento foi utilizada a seqüência de aminoácidos da AeTIM e outras depositadas no NCBI. As seqüências foram obtidas no formato Fasta conforme maior grau de confiabilidade. Com o emprego do softwear Bioedit foi realizado o alinhamento, comparação de sequências e seleção dos resíduos de cisteína exclusivos da AeTIM.

#### **4-7 Estrutura tridimensional obtida por modelagem molecular:**

Para a obtenção da estrutura Tridimensional foi realizada a comparação entre a seqüência de aminoácidos da AeTIM com algumas das seqüências de TIM depositadas no PDB (Protein Data Base). A TIM de humano foi utilizada como base para modelagem por sofrer os principais danos do vírus da Dengue, também por ter sua estrutura Tridimensional elucidada no PDB e sua sequencia de aminoácidos ser parecida com a do Aedes. Com o emprego do programa Deep View Swing PDB viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>) e do servidor Swiss Model para proteínas oligoméricas (<http://swissmodel.expasy.org/>) foi gerado um modelo por homologia.

Após a construção do Modelo, foi analisada a posição dos aminoácidos na estrutura, através do programa Deep View Swing PDB viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>). A ultima etapa foi a validação do Modelo Tridimensional da AeTIM construído, com o intuito de verificar a qualidade do mesmo, utilizando para isto três programas, os quais foram: Prosa, Verify 3D e Procheck.

#### **4-8 Determinação da atividade de triose fosfato isomerase (TIM):**

A atividade de triose fosfato isomerase foi medida na direção da formação de dihidroxiacetona fosfato. O ensaio foi realizado em meio reacional contendo trietanolamina pH 7.4 (100 mM), EDTA (10mM), NADH (0,2 mM), gliceraldeído-3-fosfato (1 mM) e 0,9 unidades de  $\alpha$ -glicerol fosfato desidrogenase. A reação foi iniciada com 2.4 ng da enzima e a oxidação do NADH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm.

Ao todo, foram realizadas medições em sete pontos durante o desenvolvimento do Mosquito, os quais foram: Ovo de 5 e 62 horas após a eclosão, L1, L2, L3, L4 e estágio de pupa.

#### **4-9 Avaliação do poder de Inibição de larvas do mosquito *Aedes aegypti* por três drogas: Ácido 5,5'-ditio-bis2-nitrobenzoico (DTNB), Metilmetano tiosulfanato (MMTS) as quais reagem com cisteínas expostas a solventes, e o composto 3-Bromo-Piruvato (3-BrPA), o qual é uma substância alquilante com alta afinidade por resíduos de cisteínas:**

Neste ensaio, homogenatos de larvas de *Aedes aegypti* em diferentes estágios de desenvolvimento foram incubadas na presença de diversas concentrações de três drogas, com o intuito de avaliar o poder de inibição da enzima Triose fosfato Isomerase na larva do mosquito. Utilizamos as larvas do mosquito para realizarmos este experimento, devido ao resultado obtido no item anterior, onde monitoramos a atividade enzimática em quase todo o ciclo de desenvolvimento do mosquito, e constatamos que a atividade da enzima Triose fosfato Isomerase apresenta-se maior no estágio larval.

Primeiramente, 200 mg de larva do Mosquito *Aedes aegypti* em diferente estágio de Desenvolvimento foram macerados em eppendorf no gelo, com pistilo, na presença de coquetel de Inibidor de Protease e tampão ph 7,4. Foi realizada a centrifugação 10000 X g por 10 minutos, sendo o sobrenadante coletado em outro eppendorf e o precipitado descartado.

Posteriormente, o Homogenato de Larvas inicial foi distribuído em 12 eppendorf. No Primeiro tubo foram colocados 100 Microlitros do Homogenato de larva sem a presença de drogas. Este tudo serviu como padrão do experimento. Nos outros 11 tubos

foram colocados 90 microlitros do homogenato de larvas e 10 Microlitros de drogas em diferentes concentrações (5, 10, 20, 25, 50, 100, 200, 250, 500 1000 e 2000  $\mu\text{M}$ ). Isto foi realizado para todas as drogas (DTNB, MMTS e 3-Bromo Piruvato).

Todos os tubos foram levados para aquecimento durante duas horas, até mesmo o padrão. Após as duas horas foram realizadas a leitura das amostras no espectrofotômetro. O ensaio foi realizado em meio reacional contendo trietanolamina pH 7.4 (100 mM), EDTA (10mM), NADH (0,2 mM), gliceraldeído-3-fosfato (1 mM) e 0,9 unidades de  $\alpha$ -glicerol fosfato desidrogenase. A reação foi iniciada com 2.4 ng da enzima e a oxidação do NADH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm. (Téllez-Valencia et al., 2004).

Posteriormente, foi feita a Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

Na literatura já é possível encontrar diversos estudos referente ao poder de inibição dos compostos DTNB e MMTS frente à enzima Triose fosfato Isomerase em diversos organismos. (Enríquez-Flores et al., 2011); (Gomez-Puyou et al., 1995), (Gomez-Puyou et al., 1995; Garza-Ramos et al., 1996; Olivares-Illana et al., 2006; Velanker et al., 1997; Rodríguez-Romero et al., 2002).

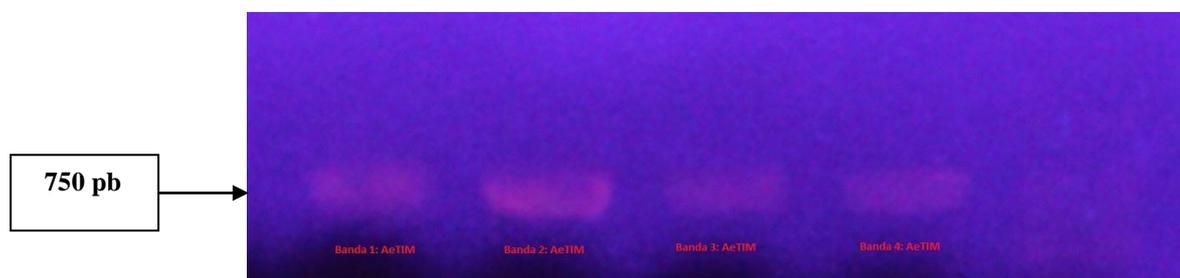
Já o composto 3 Bromo- piruvato, nenhum estudo foi encontrado referente ao poder de inibição deste composto frente a enzima Triose fosfato Isomerase. Porém, já foi descrito a capacidade desta substância em causar a depressão do fluxo glicolítico e da fosforilação oxidativa conseguindo inibir a produção de ATP (Fonda, 1976). Assim, através deste nosso experimento inovador, pretendemos avaliar o poder de inibição do composto 3-Bromo piruvato frente à enzima Triose fosfato Isomerase em larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

## **5- Resultados**

### **5-1 Amplificação do gene da AeTIM por RT-PCR**

A Amplificação do Gene da AeTIM foi confirmada através do Gel de Agarose, o qual correspondeu as nossas expectativas contendo o tamanho esperado, conforme pode ser visto na figura abaixo. Foram realizadas quatro reações contendo o mesmo gene da AeTIM.

## Amplificação do gene da AeTIM



**Figura 18:** Amplificação do Gene da AeTim através da técnica de PCR.

A figura acima apresenta quatro bandas, sendo todas referente ao mesmo gene da AeTIM. O tamanho aproximado das bandas é em torno de 744 pb.

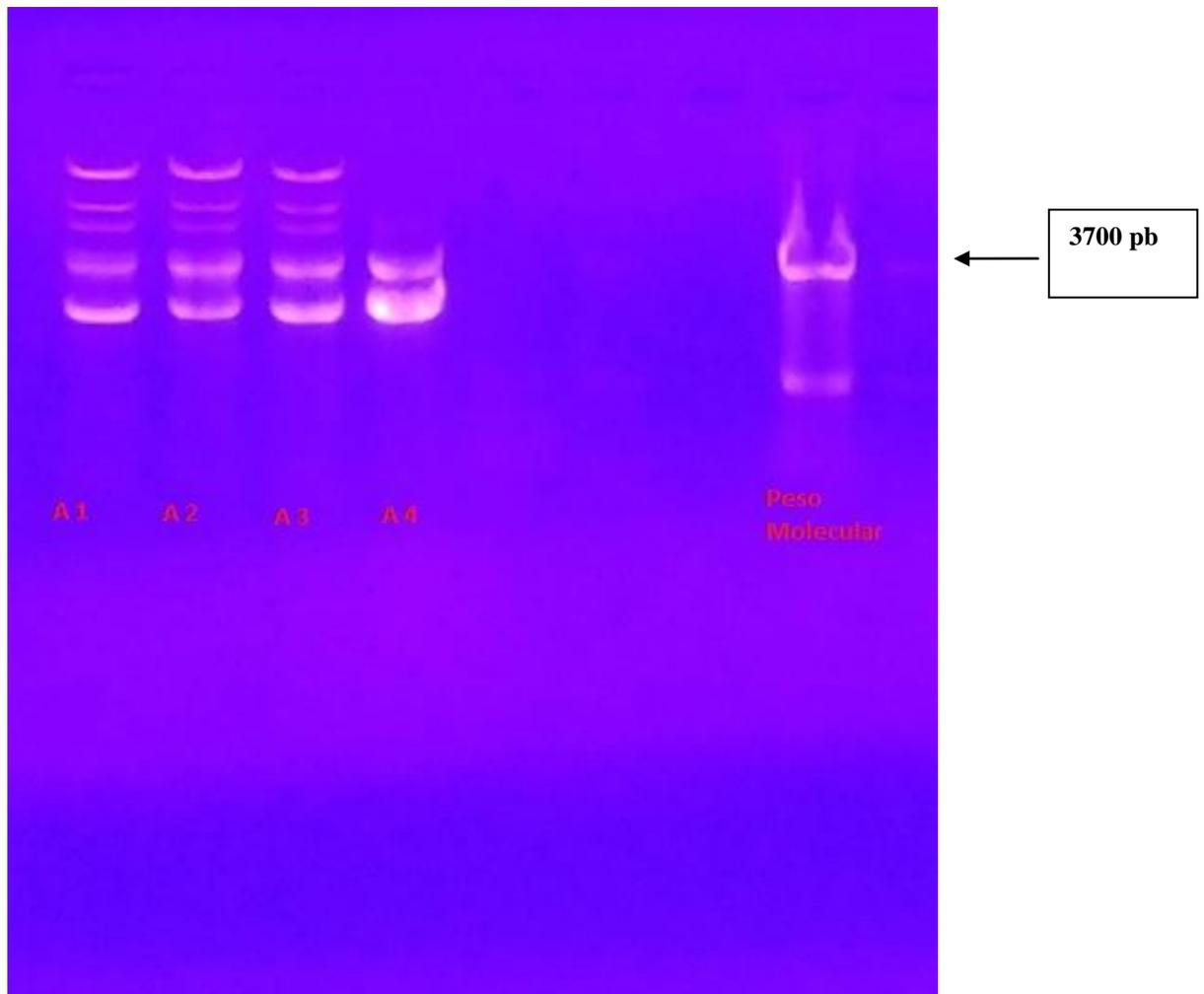
### 5-2 Clonagem do gene da AeTIM:

Conforme descrito no Item 4-5, a Clonagem do Gene AeTIM deu-se através do vetor pGEM, utilizando o produto da Amplificação do RT-PCR.

Após deixarmos a bactéria crescer em meio de cultura, realizamos um Miniprep (Purificação do DNA Plasmidial), onde o objetivo era separar o DNA plasmidial do restante da bactéria, ficando somente o Vetor circulado com o nosso gene.

Para visualizarmos o resultado do Miniprep, fizemos um gel de agarose e aplicamos as nossas amostras, conforme figura 20.

### Miniprep do produto amplificado da AeTIM



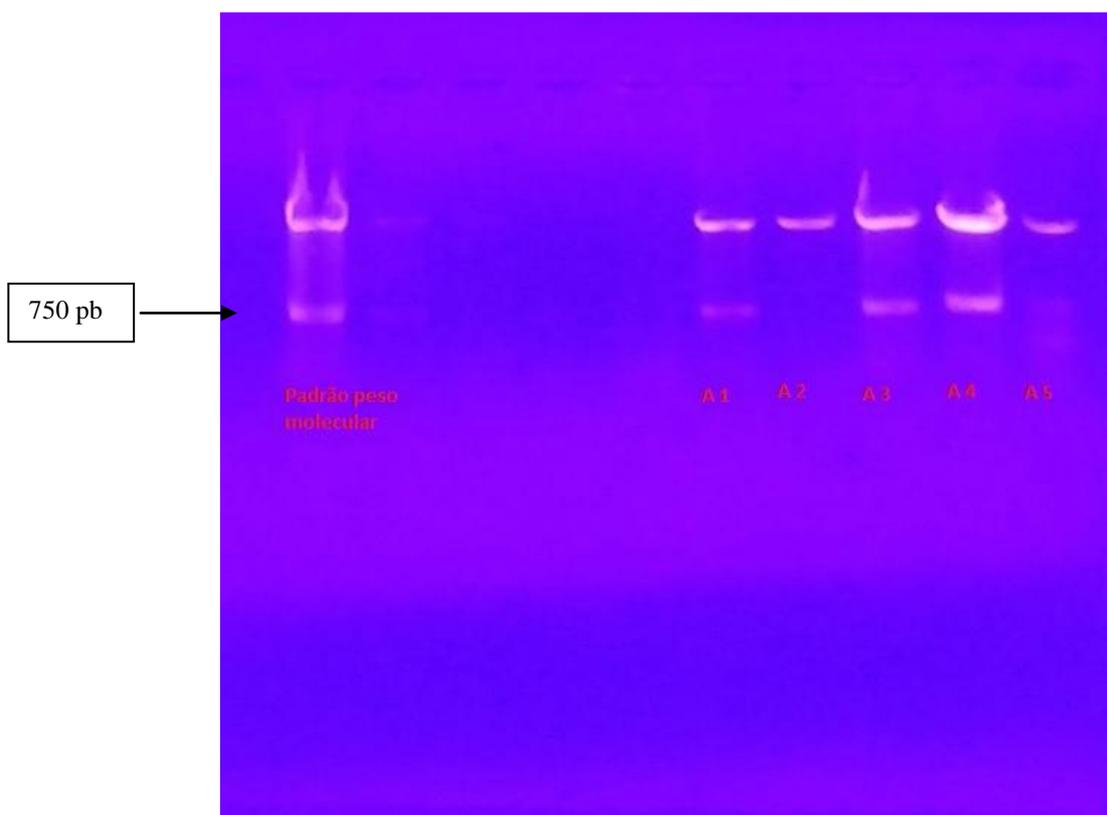
**Figura 19:** Gel de agarose contendo o resultado do miniprep (Purificação de DNA plasmidial).

Ao realizar um Miniprep e colocar as amostras em um gel de agarose para analisar o resultado, espera-se que apareçam duas bandas, uma referente ao plasmídeo superhelicoidizado, que migra mais rápido, e outra, com o plasmídeo relaxado, de migração mais lenta. Porém, muitas das vezes o gel não apresenta somente duas bandas, apresentando também restos de DNA genômico ou de DNA plasmidial em fita simples. Ao analisarmos o Gel de agarose contendo o resultado do nosso Miniprep na figura 20, podemos perceber que a reação ocorreu de forma eficaz, tendo uma banda com o tamanho esperado, torno de 3700 pb.

Obtendo um resultado adequado da reação de Miniprep, realizamos uma digestão do produto gerado na Purificação do DNA Plasmidial. Neste momento o que interessa é somente o gene da AeTIM clonado e não vetor. Assim, com a utilização de enzimas de restrição a digestão, ocorre à separação do gene clonado do vetor, tornando-o linearizado.

No manual do vetor, é possível encontrar quais enzimas podem ser usadas para realizar tal separação. As enzimas utilizadas em nossos experimentos foram Ecor 1 e Spe 1, e o resultado da digestão foi visualizado através do gel de agarose. Tendo a banda o tamanho desejado, uma alíquota da amostra foi levada para sequenciamento e o resultado analisado.

### Digestão do fragmento clonado de AeTIM



**Figura 20:** Separação do Gene da TIM clonado através de Enzimas de Restrição

Ao analisarmos o resultado da Digestão presente no gel de agarose na figura 21, podemos concluir que a reação ocorreu de forma eficaz, apresentando duas bandas conforme o esperado. A Banda maior referente ao vetor Pgem e a menor referente ao gene da AeTIM clonado.

### **5-3 Alinhamento e Comparação de sequências:**

A sequência da AeTIM apresenta alta homologia com TIM de diversos organismos ( Figura 22). O alinhamento das sequências de aminoácidos de *Aedes aegypti*, *Homo sapiens*, *Anopheles*, *Trypanossoma B. taurus*, *D. melanogaster*, *T. cruzi* mostrou que esta enzima é bem conservada, apresentando regiões conservadas e alta identidade com outras TIMs. Este fato foi esperado, visto que, esta enzima faz parte da fisiologia básica da obtenção de energia de todos os organismos. A AeTIM possui 7 Cisteínas por monômero. Estes resíduos são 7, 25, 43, 66, 127, 143 e 217.

Em particular foi realizada uma comparação entre os resíduos de cisteína da TIM de *Aedes* e do *Homo sapiens* a fim de verificar quais deles poderiam servir para possíveis alvos de inibição específica. O resultado indica que os resíduos de cisteína 66, 127 e 217 são conservados e que os resíduos 7, 25, 43 e 143 são exclusivamente não-conservados na AeTIM (Figura 22).

### **Alinhamento das Sequências das TIMs de diversos Organismos**

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5      15      25      35
Aedes aegy MG--RKFCVG GNWKMNGDKA SITDLCKTLT TGPLSADTEV
Homo sapie MAPSRKFFVG GNWKMNGRKQ SLGELIGTLN AAKVPADTEV
Bos Taurus MAPSRKFFVG GNWKMNGRKN NLGELINTLN AAKVPADTEV
Anopheles -----MNGDKA SITELCKTLS AGPLDPNTEV
Culex tars MG--RKFCVG GNWKMNGDKA SIADLCKVLT TGPLNADTEV
Drosophila -----FCVG GNWKMNGDQK SIAEICKTLS GAALDPNTEV
Bombyx mor MG--RKFFVG GNWKMNGDKN QINEIVNNLK KGPLDPNVEV
Drosophila MS--RKFCVG GNWKMNGDQK SIAEIAKTLS SAALDPNTEV
Trypanosom MS-KPQPIAA ANWKCNGSQQ SLSELIDLFN STSINHVDVQC

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      45      55      65      75
Aedes aegy  IVGCPAPYLT LARSQLP-DS VGVAAQNCYK VAKGAFTGEI
Homo sapie  VCAPPTAYID FARQKLD-PK IAVAAQNCYK VTNGAFTGEI
Bos Taurus  VCAPPTAYID FARQKLD-PK IAVAAQNCYK VANGAFTGEI
Anopheles  VVGCPAPYLS LARSLLP-ET IGVAAQNCYK VAKGAFTGEI
Culex tars  VVGCPAPYLT LARSQLP-DS VGVAAQNCYK VPKGAFTEI
Drosophila  VIGCPAIYLM YARNLLP-CT VGVAGQNAK VAKGAFTGEI
Bombyx mor  IVGVPAIYLS YVKTIIP-DN VEVAQNCWK SPKGAFTGEI
Drosophila  VIGCPAIYLM YARNLLP-CE LGLAGQNAK VAKGAFTGEI
Trypanosom  VVASTFVHLA MTKERLSHPK FVIAAQNAIA KS-GAFTGEV

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      85      95      105     115
Aedes aegy  SPAMKLDLNI GWVILGHSE RAI FGESEDEL VADKVAHALA
Homo sapie  SPGMIKDLGA TWVVLGHSE RHV FGESEDEL IGQKVAHALA
Bos Taurus  SPGMIKDLGA TWVVLGHSE RHV FGESEDEL IGQKVAHALA
Anopheles  SPAMKLDLGL GWVILGHSE RAI FGETDEL IAEKVAHALA
Culex tars  SPAMKLDLNI GWVILGHSE RAI FGESEDEL IADKVAHALA
Drosophila  SPSMLKDIGA DWVILGHSE RAI FNESEDEL IAEKAEHALA
Bombyx mor  SPAMIKDVGW NWVILGHSE RTI FGEKDEL VAEKVAHALE
Drosophila  SPAMKLDIGA DWVILGHSE RAI FGESEDEL IAEKAEHALA
Trypanosom  SLPILKDFGV NWIVLGHSE RAY YGETNEI VADKVAALVA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      125     135     145     155
Aedes aegy  EGLKVIACIG ETLQEREAGQ TEAVCFRQTK AIADKVKD--
Homo sapie  EGLGVIACIG EKLDEREAGI TEKVVFEQTK VIADNVKD--
Bos Taurus  EGLGVIACIG EKLDEREAGI TEKVVFEQTK VIADNVKD--
Anopheles  EGLKVIACIG ETLQEREAGQ TEAVCFRQTK AIAAQVKD--
Culex tars  EGLKVIACIG ETLQEREAGQ TEAVCFRQTK AIADKVKD--
Drosophila  EGLKVIACIG ETLDEREAGK TNEVVARQMC AYAKKVRD--
Bombyx mor  SGLKVIACIG ETLEERESGK TEEVVFRLK ALVSAIGDK-
Drosophila  EGLKVIACIG ETLEEREAGK TNEVVARQMC AYAQKIKD--
Trypanosom  AGFMVIACIG ETLQERESGR TAVVVLVTQIA AIAKKLLKAD

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      165     175     185     195
Aedes aegy  WSNVVIAYEP VWAI GTGKTA TPEQAQEVHA ALRKWFTENV
Homo sapie  WSKVVLAYEP VWAI GTGKTA TPQQAQEVHE KLRGWLKS NV
Bos Taurus  WSKVVLAYEP VWAI GTGKTA TPQQAQEVHE KLRGWLKS NV

Anopheles  WSNVVIAYEP VWAI GTGKTA TPEQAQEVHA ALRKWFTENV
Culex tars  WSNVVIAYEP VWAI GTGKTA SPEQAQEVHA ALRKWFTENV
Drosophila  WTNVVVAYEP VWAI GTGKTA TPEQAQEVHA FLRQWLTDNI
Bombyx mor  WENIVLAYEP VWAI GTGKTA TPQQAQDVHH ALRNWLSANV
Drosophila  WKNVVVAYEP VWAI GTGKTA TPDQAQEVHA SLRQWLS DNI
Trypanosom  WAKVVIAYEP VWAI GTGKVA TPQQAQEAHA LIRSWVSSKI

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      205     215     225     235
Aedes aegy  SADVSGAIRI QYGGSVTAAN CRELAAKPDI DGFLVGGASL
Homo sapie  SDAVAQSTRI IYGGSVTGAT CKELASQPDV DGFLVGGASL
Bos Taurus  SDAVAQSARI IYGGSVTGAT CKELASQPDV DGFLVGGASL
Anopheles  SADVSNARI  QYGGSVTAAN CRELAAKPD- -----
Culex tars  SADVSAARI  QYGGSVTAAN CRELAAKPDI DGFLVGGASL
Drosophila  SKEVSAALRI QYGGSVTAAN AKELAKK PDI DGFLVGGASL
Bombyx mor  SGSVSDAVRI QYGGSVTAAN AKELASCKDI DGFLVGGASL
Drosophila  SKEVSASLRI QYGGSVTAAN AKELAKK PDI DGFLVGGASL
Trypanosom  GADVAGELRI LYGGSVNGKN ARTLYQQRDV NGFLVGGASL

```

**Figura 21:** Alinhamento das seqüências de aminoácidos das TIMs de *Aedes aegypti*, *Homo sapiens*, *Anopheles*, *Drosophila*, *Trypanosoma*, *B. taurus*, *D. melanogaster*, *T. cruzi*.

O alinhamento foi realizado como descrito em materiais e métodos.

Transformando a figura acima em tabela, conseguimos perceber o quão conservado é a enzima Triose fosfato Isomerase (TIM).

Porcentual de Identidade entre as sequencias de diversos organismos

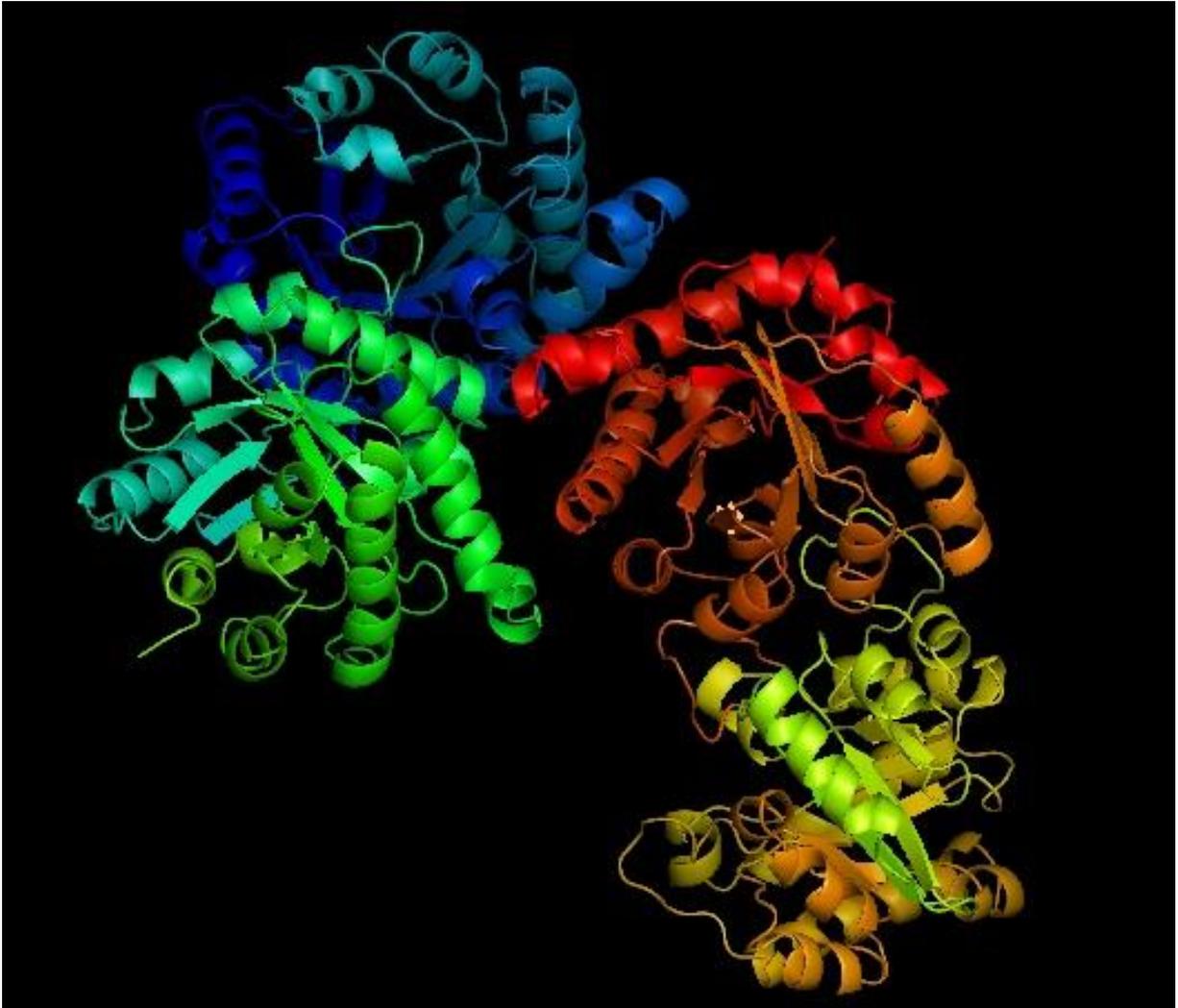
	Modelo	molde	Anopheles gambiae	Culex Tarsalis	Drosophila pseudoobscura
Modelo	-	67%	91%	96%	75%
Molde	67%	-	68%	67%	64%
Anopheles gambiae	91%	68%	-	90%	78%
Culex Tarsalis	96%	67%	90%	-	75%
Drosophila pseudoobscura	75%	64%	78%	75%	-

**Tabela 1:** Porcentual de Identidade entre as sequencias das TIMs de diversos organismos.

#### **5-4 Modelagem Molecular da TIM do Aedes:**

Um modelo da TIM do *Aedes* foi obtido através do programa Swiss Model, modo automático, com a técnica de modelagem comparativa utilizando como molde a estrutura da TIM do *Homo Sapiens*, obtendo um modelo com 67% de identidade, possuindo o formato característico das TIMs (forma de Barril, Homodimérica), conforme pode ser observado na figura 23.

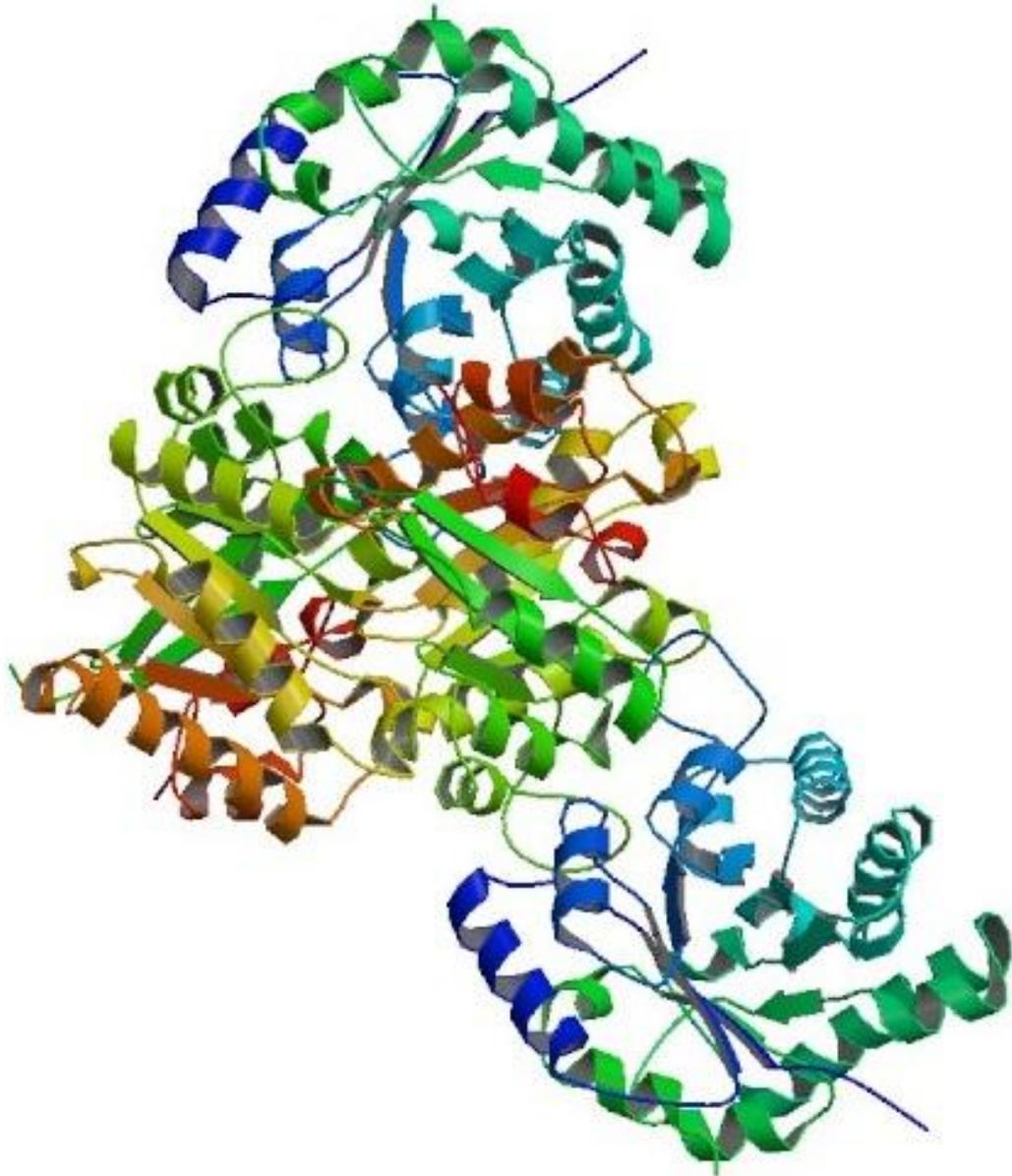
### Estrutura Tridimensional AeTIM.



**Figura 22:** Modelo tridimensional da AeTIM.

Ao analisar a estrutura da TIM de *Homo sapiens* utilizada como molde para a construção da AeTIM, podemos perceber que ela também apresenta as características fundamentais de uma enzima Triose fosfato Isomerase, como: formato de barril, homodimérica.

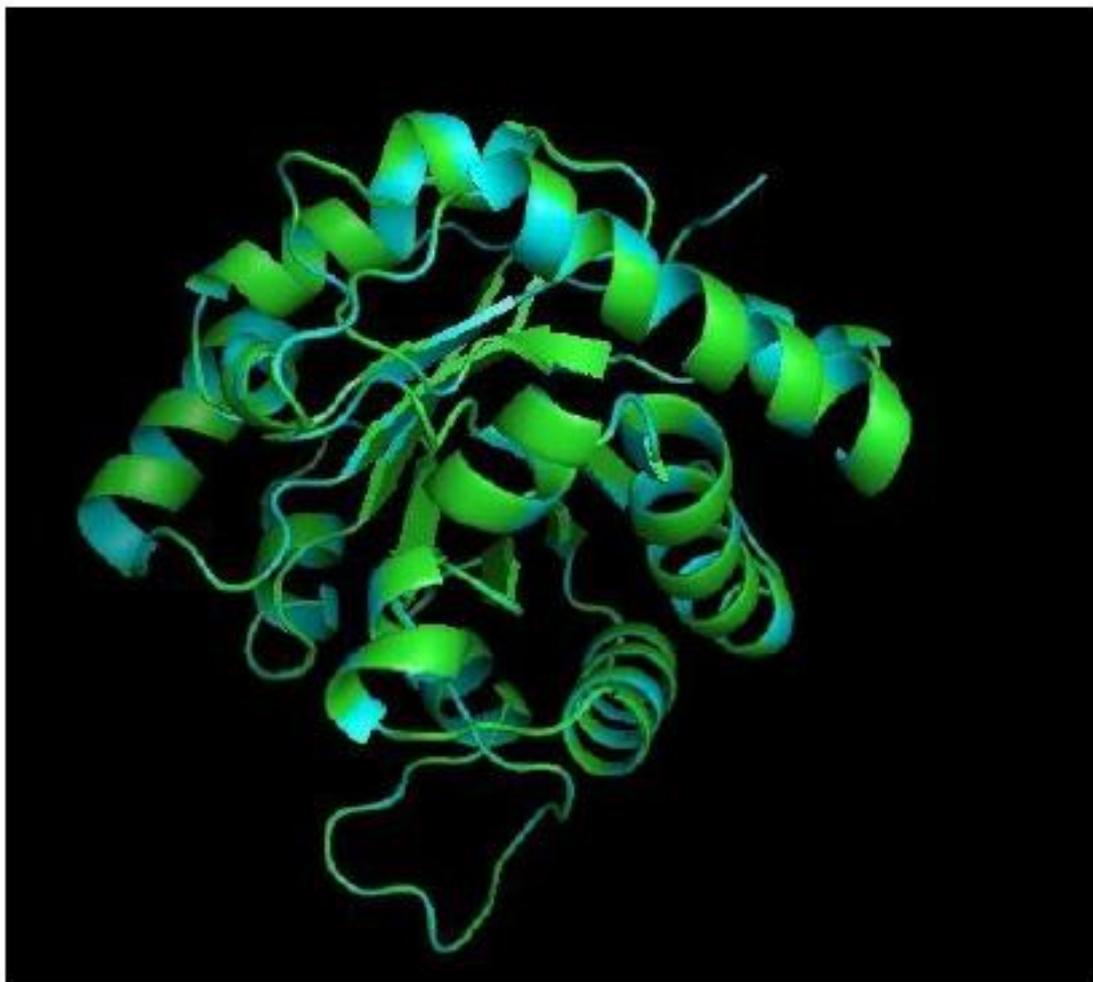
### Estrutura Tridimensional Homo sapiens TIM.



**Figura 23:** Estrutura tridimensional da HsTIM, obtida no PDB.

Em nível de comparação, sobrepondo um monômero da estrutura da TIM de *Aedes aegypti* e *Homo sapiens*, observamos que as estruturas são bem parecidas, conforme pode ser observado na figura 25.

## Sobreposição das Estruturas de AeTIM e HsTIM



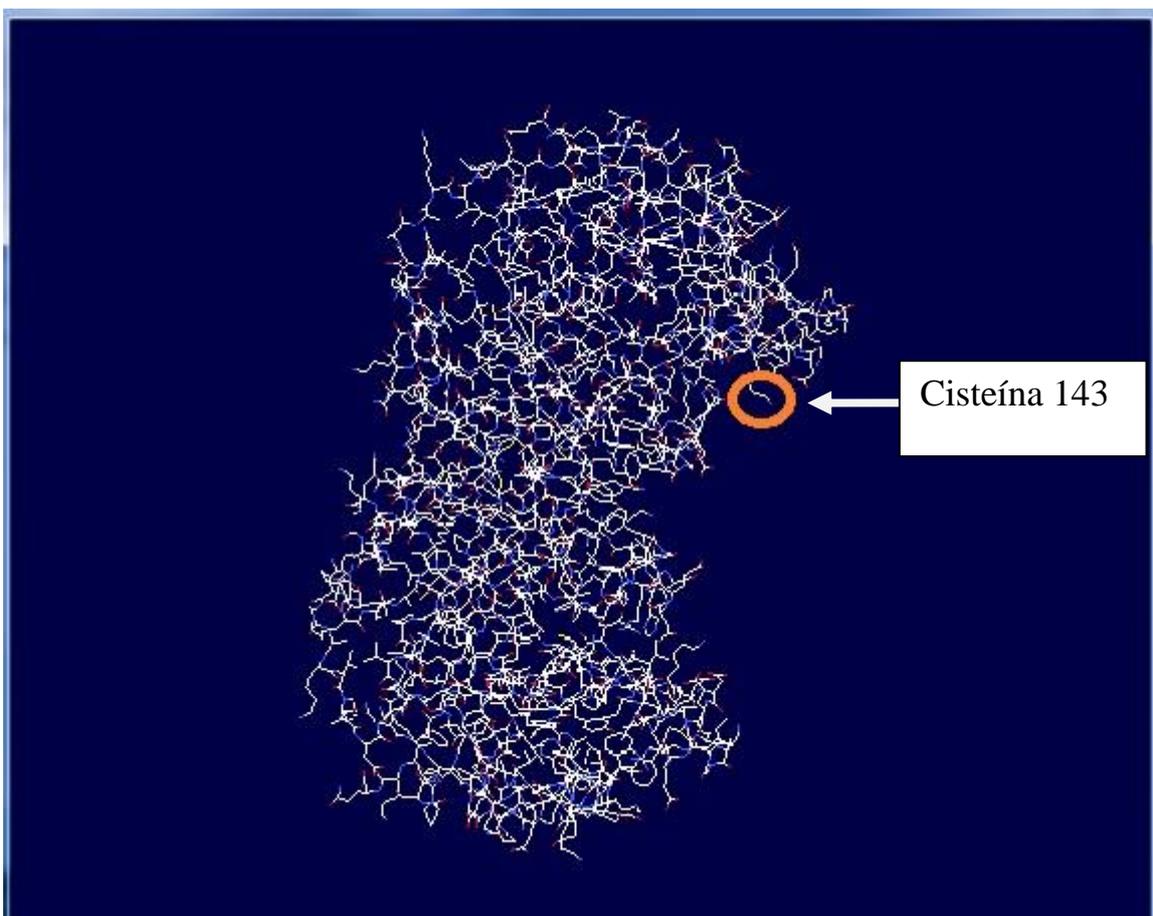
**Figura 24:** Sobreposição entre os dímeros de AeTIM e HsTIM, (Verde: Estrutura do Homo sapiens, azul: Estrutura do Aedes).

Utilizando o programa Swiss – PDB Viewer, foi possível analisar as ligações entre os carbonos presentes na estrutura tridimensional do AeTIM, e observar a posição das cisteínas, as quais apresentaram ser específicas para a sequência de aminoácidos do mosquito *Aedes aegypti*.

Ao verificarmos a posição dos aminoácidos na estrutura Tridimensional da AeTIM criada, podemos perceber que a Cisteína 143, a qual é específica da TIM de *Aedes*, encontra-se exposta, em uma região de fácil acesso. Logo, este aminoácido poderá ser

explorado futuramente, com o intuito de gerar um inibidor específico para o vetor da dengue, conforme pode ser visto na figura 26.

### Estrutura Tridimensional da AeTIM mostrando a localização da Cisteína 143.

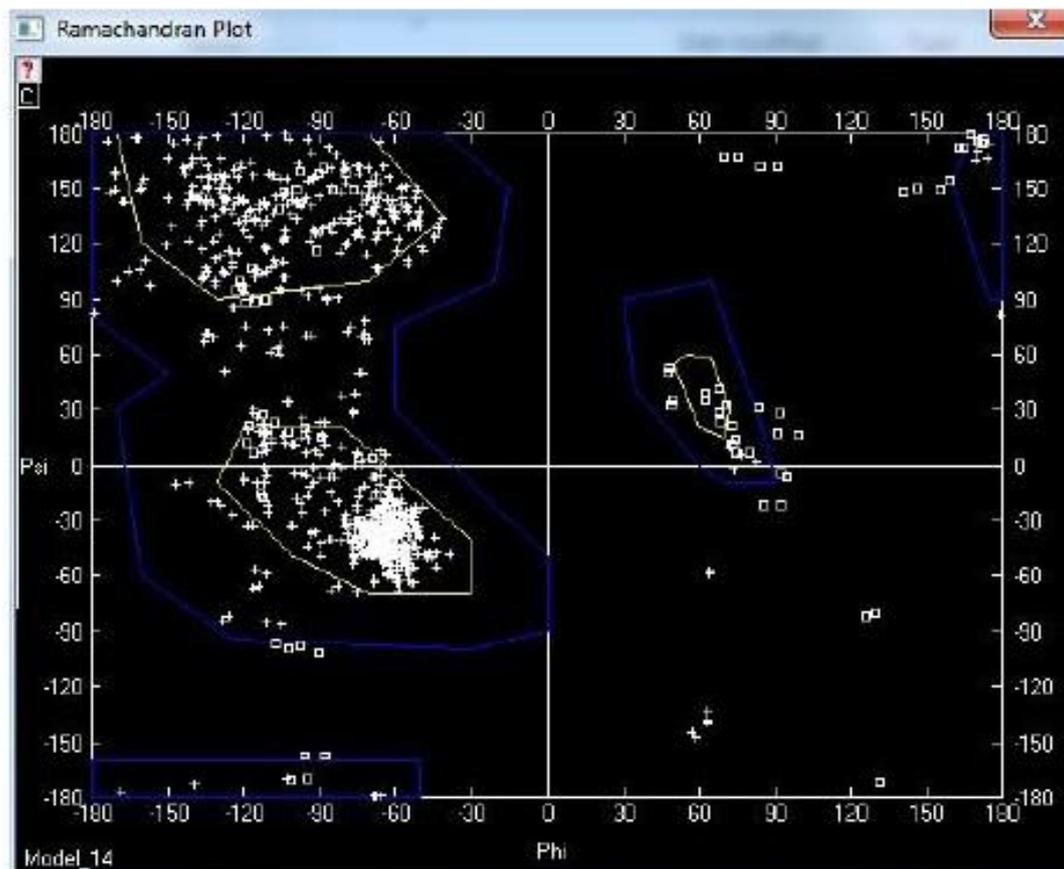


**Figura 25:** Análise da posição dos aminoácidos específicos na estrutura tridimensional do AeTIM.

Após termos obtido a estrutura tridimensional da AeTIM, fizemos a análise da qualidade do modelo. Para isso, foram utilizados 3 programas: Procheck, Verify 3D e Prosa (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>).

No Procheck, obtivemos o gráfico de Ramachandran, conforme na figura 27.

## Gráfico de Ramachandran



**Gráfico 26:** Análise da posição dos aminoácidos na estrutura Tridimensional de AeTIM.

O Gráfico de Ramachandran é uma forma utilizada para verificar a qualidade do modelo gerado, analisando a posição dos aminoácidos na estrutura da enzima. Cada ponto branco no gráfico representa um aminoácido. O ideal é que eles fiquem dentro da marcação branca, sendo uma posição favorável, ou azul, regiões permitidas.

Assim, analisando o gráfico, percebemos que a qualidade do modelo é bem alta, tendo somente alguns aminoácidos em regiões desfavoráveis (não permitidas).

Transformando o gráfico de Ramachandran em tabela, conseguimos perceber com mais facilidade a qualidade do modelo gerado.

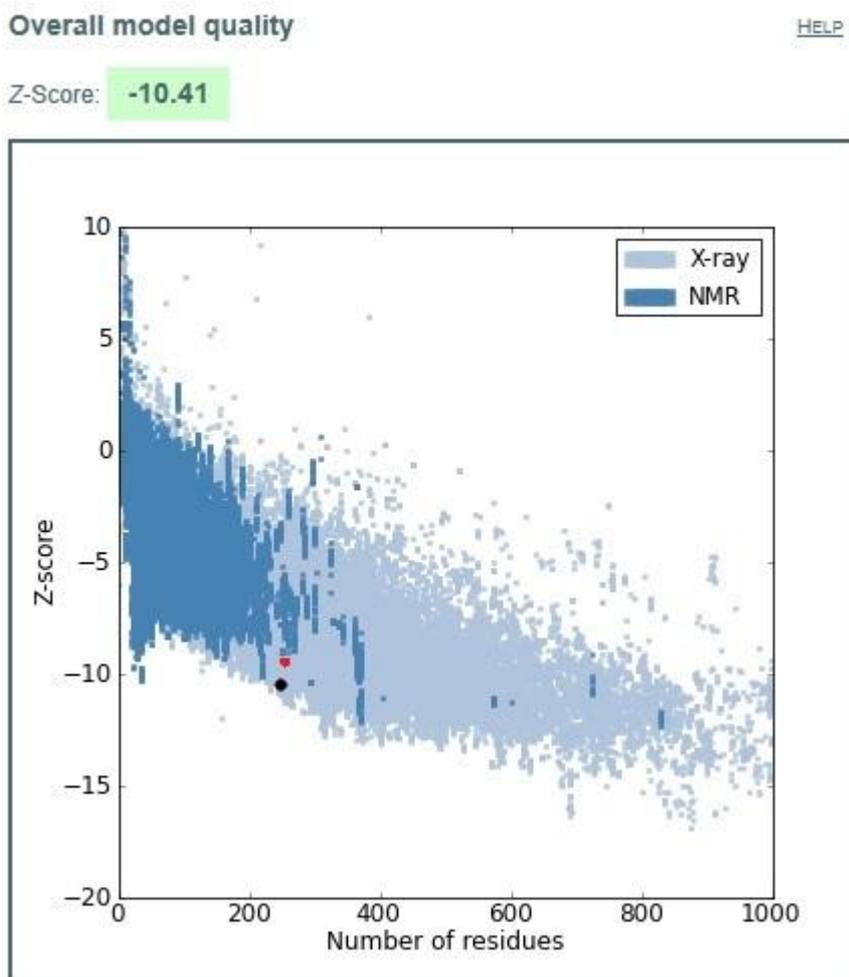
### Gráfico de Remachandran em números

Modelo	% de resíduos na região		
	Favoráveis	Permitidas	Não favoráveis
<i>Aedes aegypti</i>	83%	16,2%	0,8%

**Tabela 02:** Análise em porcentagem do Gráfico Remachandran.

Já o programa Protein structure Analysis (Prosa) foi utilizado para avaliar o score Z (a média dos dados) entre o molde e o modelo. As estruturas das proteínas depositadas no PDB são criptografadas pela técnica de RMN ou Raio X. Assim, é necessário que a estrutura gerada através da modelagem por Homologia, siga os parâmetros do molde tendo uma média parecida. Observando o gráfico 28, percebemos que o valor de score Z do molde e modelo é parecido, logo, mostrando que a qualidade do Modelo é alta.

## Avaliação da Qualidade do Modelo tomando como base o Score Z.



**Figura 27:** Avaliação da diferença de Score-Z entre o Molde e o Modelo gerado. Em vermelho estrutura tridimensional do HsTIM e em preto AeTIM.

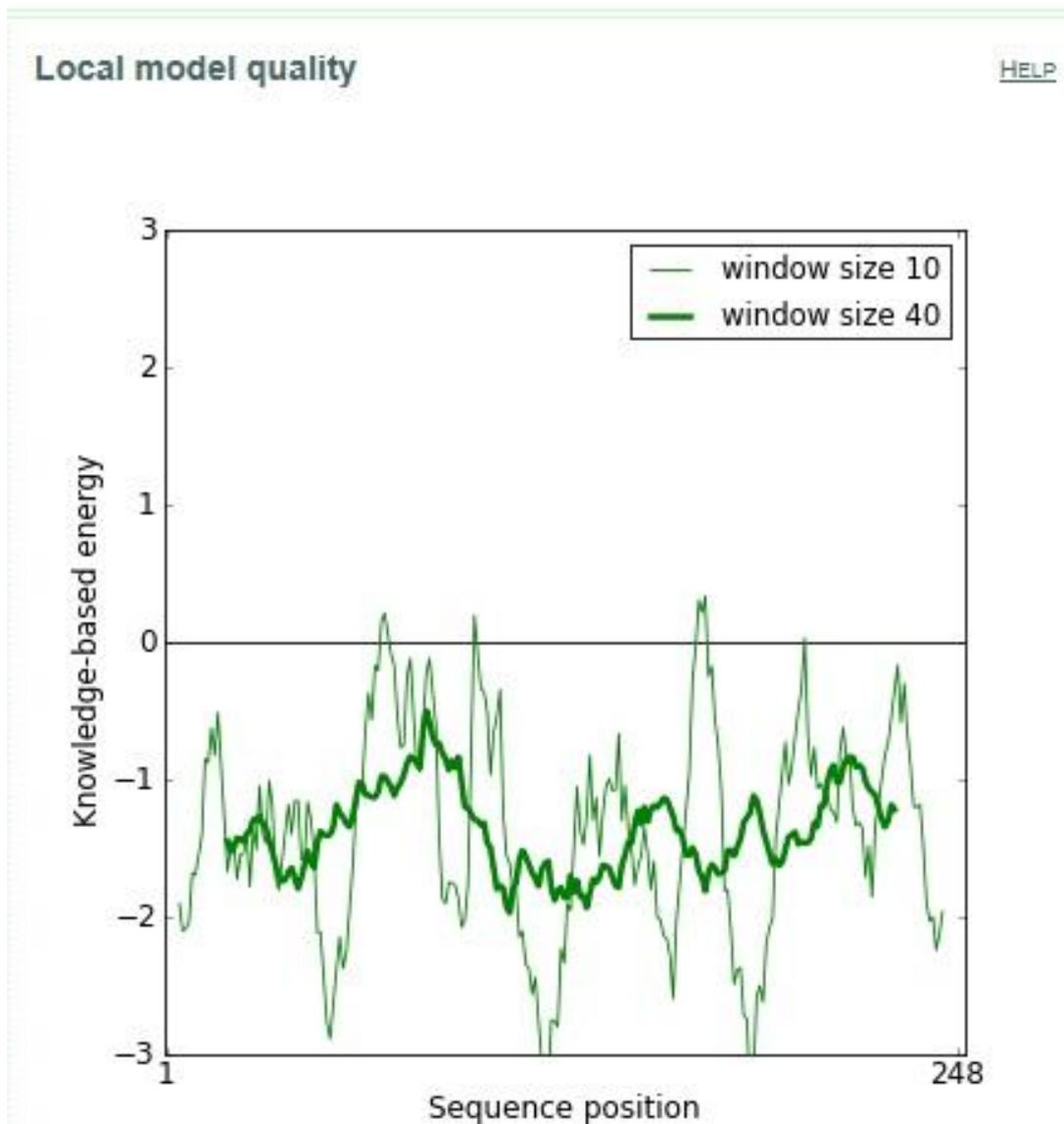
O valor de Score representa a qualidade geral da estrutura e também o desvio da energia total da proteína com respeito à distribuição derivada de conformações randômicas. É necessário que o valor de score de determinada estrutura esteja na marcação correta. Estruturas de proteínas globulares cujos scores-Z desviam muito da média da base de dados não são usuais e tendem a estar erradas.

Outra forma de verificarmos a qualidade do modelo gerado da-se pela utilização do programa Verify 3D. Este programa tem a capacidade de realizar a avaliação da

qualidade do modelo em relação à posição dos resíduos de aminoácidos na sequência proteína, com fornecimento de um gráfico. Valores positivos de energia podem representar problemas na estrutura do modelo gerado e já valores negativos atestam que o modelo gerado tem uma boa qualidade, tendo os aminoácidos na posição adequada.

Assim, analisando a figura 29, podemos perceber a grande quantidade dos resíduos de aminoácidos na sequência proteica possuem valores de energia negativos, assim estando em uma posição correta na sequência de aminoácidos.

## Gráfico de energia



**Figura 28:** Análise da posição dos aminoácidos na sequência de proteínas através do gráfico de energia.

### **5-5 Determinação da atividade da enzima triose fosfato isomerase (TIM) em quase todo o ciclo de desenvolvimento do mosquito:**

Conforme descrito no Item 4-8, a medição da atividade específica da AeTIM foi realizada em quase todo o ciclo de vida do *Aedes aegypti*, contemplando desde o estágio de ovo ao de pupa, e teve como objetivo analisar em qual estágio de desenvolvimento

do mosquito a atividade metabólica da enzima encontra-se maior, para que futuros estudo pudessem ser direcionados.

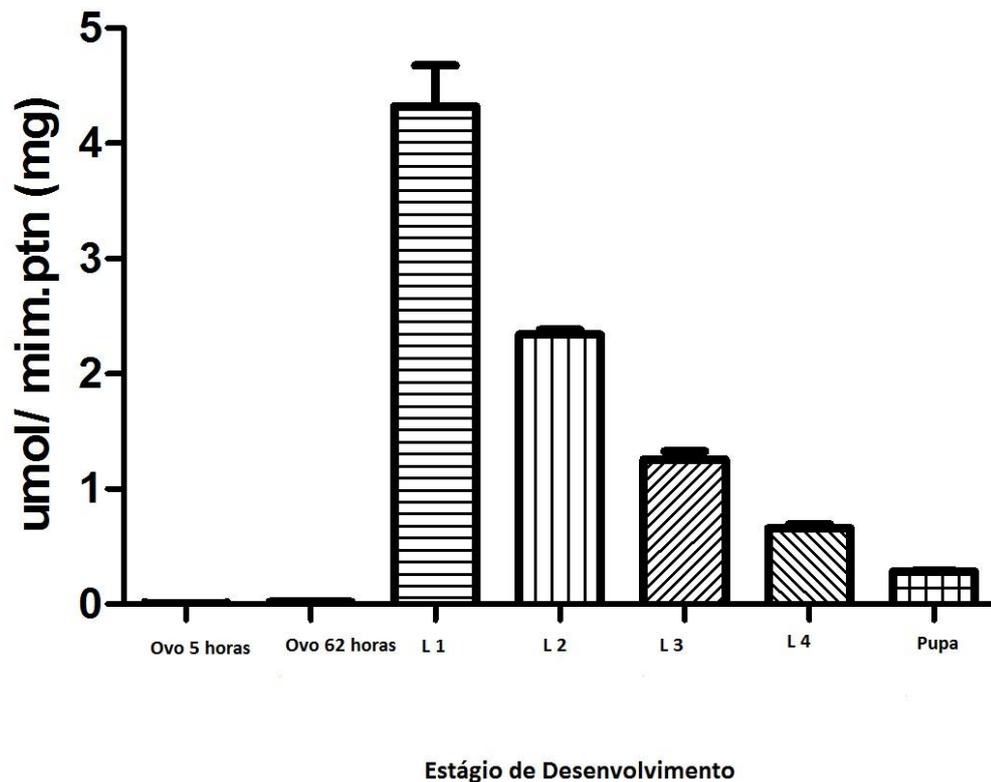
Após a medição, observamos que há uma grande variação de atividade metabólica durante o ciclo de vida do Mosquito *Aedes aegypti*, conforme pode ser observado na figura (30).

Tanto os ovos com 5 e 62 horas após a ovoposição apresentaram ter atividades enzimáticas baixas quando comparados aos outros estágios de desenvolvimento. Nesta fase, dá-se uma economia de gasto energético, com o intuito de que os outros estágios contenham a energia suficiente para continuar o desenvolvimento, chegando ao mosquito adulto. Salientando que os nutrientes utilizados para a sobrevivência desta fase, são provenientes/adquiridos do mosquito adulto.

Já no estágio de larva, pode-se observar um pico de atividade enzimática, sendo maior em L1 e decaindo com o avançar do desenvolvimento. Nesta etapa, a quantidade de energia necessária para o desenvolvimento do mosquito aumenta consideravelmente, principalmente pela necessidade de locomoção em função da busca de alimentos para a sua sobrevivência e também, pelo fato de adaptação ao ambiente, necessitando de grande quantidade de energia. Porém, com o avançar do desenvolvimento larval a atividade metabólica decai notoriamente, devido ao fato de a larva já encontrar-se adaptada ao meio em que vive, necessitando assim de um gasto energético menor.

E no estágio de pupa, podemos perceber que o nível de atividade apresenta-se bem baixo, acreditando que nesta fase também ocorra uma economia de energia, com o objetivo de que o mosquito adulto consiga suprir suas necessidades metabólicas, principalmente à de voo.

**Atividade Enzimática durante o Ciclo de Vida do Mosquito *Aedes aegypti***



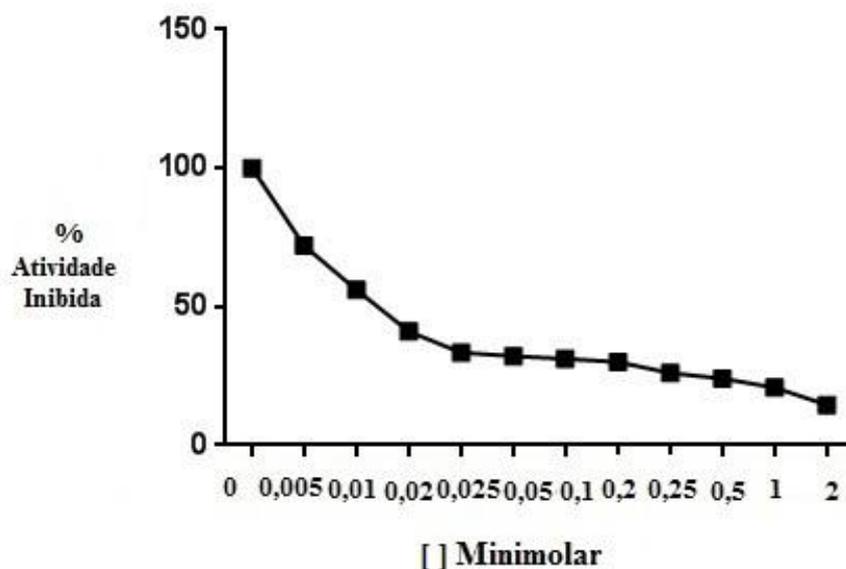
**Figura 29:** Análise da Atividade enzimática em quase todo o ciclo de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*.

**5-6 Avaliação do Poder de Inibição de larvas do mosquito *Aedes aegypti* por três drogas: Ácido 5,5'-ditio-bis2-nitrobenzoico (DTNB), Metilmetano tiosulfanato**

**(MMTS) as quais reagem com cisteínas expostas a solventes, e o composto 3-Bromo-Piruvato (3-BrPA), o qual é uma substância alquilante com alta afinidade por resíduos de cisteínas:**

O composto ácido 5,5'-ditio-bis2-nitrobenzóico (DTNB) e metilmetano tiosulfanato (MMTS) são derivatizantes que reagem equimolarmente com o grupamento sulfidril (SH) de resíduos de cisteína expostos. Foi visto que a AeTIM apresenta uma alta sensibilidade para MMTS e DTNB (Figuras 31 e 32) e que é possível inibir esta enzima baseada nas interações de drogas com resíduos de cisteínas não-conservados. A concentração em que a atividade é inibida em 50% (IC 50) é de 5 $\mu$ M para o MMTS e 10  $\mu$ M para o DTNB (figuras 31 e 32).

### **Efeito do DTNB em Larvas do Mosquito *Aedes aegypti***

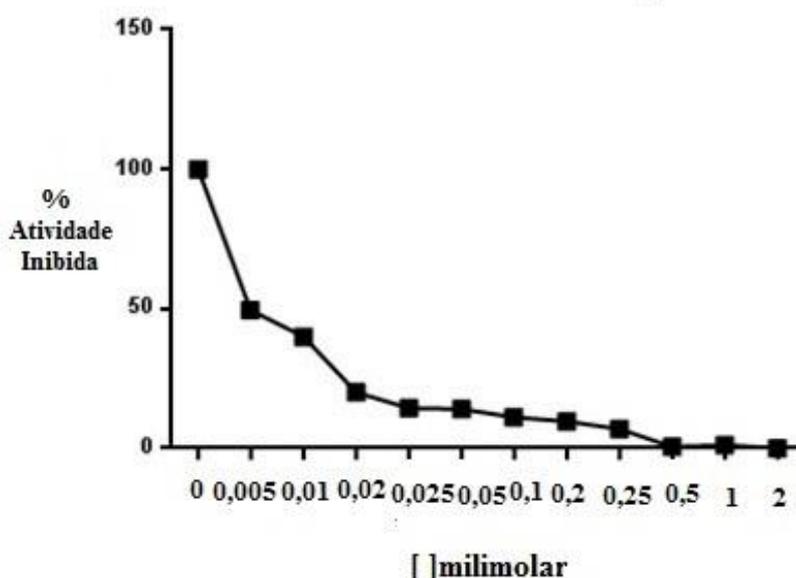


**Figura 30:** % Atividade Inibida da AeTIM pelo composto DTNB.

Analisando a figura 31 percebemos que o Composto Ácido 5,5'-ditio-bis2-nitrobenzóico (DTNB) possui grande poder de Inibição da Atividade enzimática da

AeTIM. 0,01 mM são capazes de Inibir 50 % da Atividade da Enzima e 0,025 mM inibe 75%. Também percebemos que na concentração de 0,025 a 0,2 milimolar a taxa de inibição permanece constante, e isto é devido à falta de cisteínas expostas para que o composto possa agir. Aumentando a concentração da substância, a taxa de inibição volta a crescer novamente, conseguindo acessar as cisteínas menos expostas.

### Efeito do MMTS em Larvas do Mosquito *Aedes aegypti*



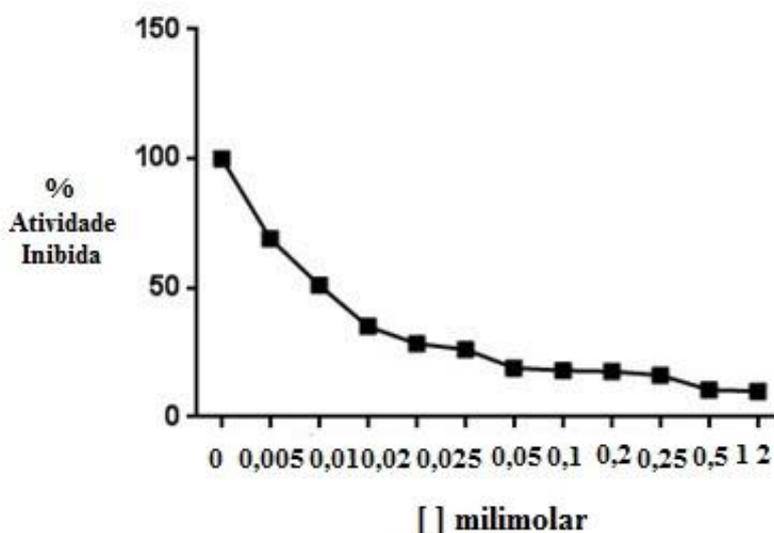
**Figura 31:** % Atividade Inibida da AeTIM pelo MMTS.

Através da figura 32 acima, percebemos que o composto MMTS foi capaz de inibir a enzima Triose Fosfato Isomerase de Larvas do Mosquito *Aedes aegypti* com o uso de pequenas concentrações. 0,005 mM foram capazes de Inibir 50 % da Atividade enzimática e 0,02 mM inibiu 80%. Como ocorreu no experimento com a substância DTNB, na concentração de 0,025 a 0,1 milimolar da droga MMTS, a taxa de inibição permanece constante, devido à falta de cisteínas expostas para que o MMTS pudesse agir e causar inibição. Já com o aumento da concentração da substância, a taxa de inibição volta a crescer. Assim, percebemos que o composto MMTS é bem eficaz para inibição enzimática em larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

O Composto 3 Bromo Piruvato também apresentou-se bem eficaz na Inibição da Enzima Triose fosfato Isomerase nas Larvas do Mosquito *Aedes aegypti*, conforme

pode ser visto na figura 33. 0,01 mM do composto são capazes de inibir 50% da atividade enzimática e 0,025 mM 75%. Sabendo que este composto reage com grupamentos tios (SH) e Hidroxilas(OH), a possível causa para que a inibição da atividade enzimática seja a mesma com as concentrações de 0,05 a 0,25 milimolar, é devido a falta de grupamentos SH livres para que a droga possa agir, e assim levar a inibição da enzima.

### Efeito do 3 Bromo Piruvato em Larvas do Mosquito *Aedes aegypti*



**Figura 32:** % Atividade Inibida da AeTIM pelo Composto 3 Bromo Piruvato.

## 6-Discussão

O Metabolismo Energético é um conjunto de transformações que todos os organismos possuem, tendo como principal objetivo à produção de Energia ou ATP, indo desde a fotossíntese a respiração e sendo de grande importância para a sobrevivência. Caso ocorra alguma modificação desta via, como inibição de enzimas chaves para a continuação do processo, pode acarretar problemas sérios para os organismos, como a morte.

A TIM é uma das principais enzimas encontradas no metabolismo energético, estando presente em todas as células e tecidos dos diversos organismos e tendo participação tanto na via glicolítica quanto da gliconeogênese (Jimenez et al., 2000).

Neste sentido, a TIM pode ser um interessante candidato a desenvolvimento de drogas, já que uma resposta imune contra a TIM pode interferir em diferentes processos fisiológicos como observado em *T. solium* (Jimenez et al., 2000) e *S. mansoni* (Zhu et al., 2006).

No mosquito *Aedes aegypti*, conforme descrito por diversos autores, o metabolismo energético tem grande importância na atividade de voo do mosquito. O aminoácido prolina, tem a capacidade de transferir unidades de acetil-coenzima-A (acetil-CoA) do corpo gorduroso para o músculo de voo. Já no corpo gorduroso, através do ciclo do ácido cítrico, dar-se a conversão de moléculas de acetil-CoA em alfa-cetoglutarato e posteriormente em glutamato e prolina que pode ser transportada para o músculo de voo através da hemolinfa. Já no músculo de voo, ocorrer a conversão inversa, de prolina a alfa-cetoglutarato, o qual entra no ciclo do ácido cítrico para ser oxidado e produzir ATP (Scaraffia & Wells, 2002).

Quando um inseticida é inventado, faz necessário que o mesmo seja seletivo para determinado organismo, não afetando outros, principalmente os Seres Humanos. Esta especificidade pode ser adquirida ao compararmos a sequência de aminoácidos de diferentes organismos, através do alinhamento, buscando aminoácidos, como por exemplo, as cisteínas, que não são conservados em diversos organismos. Ao encontrarmos os aminoácidos não conservados, outra ferramenta que pode ser utilizada é a modelagem molecular, a qual permite visualizarmos a posição dos aminoácidos na estrutura e escolher um aminoácido que esteja em uma região de fácil acesso para a inibição.

Ao realizarmos o alinhamento das sequências das TIMs de diversos organismos notamos que os aminoácidos apresentaram conservados, independente da espécie analisada. Porém, algumas diferenças são percebidas, como é o caso das cisteínas 7, 25, 43 e 143, sendo específicas da AeTIM em comparação a HsTIM, podendo ser exploradas futuramente para a produção de um inibidor específico para esta enzima.

E ao analisarmos a Estrutura Tridimensional do AeTIM gerada através da técnica de modelagem por Homologia, notamos que a cisteína 143, o qual é um aminoácido específico para a TIM do mosquito *Aedes aegypti*, encontra-se em um local exposto na

estrutura, sendo de fácil acesso. Logo, este aminoácido poderá ser explorado futuramente, com o intuito de gerar um inibidor específico para o vetor da dengue.

Qualquer alteração nesta região pode ocasionar perda da atividade catalítica. Entretanto, para que o resíduo cisteína 143 seja caracterizado como um bom alvo, estudos posteriores precisam ser realizados.

Conforme descrito acima, a modelagem por homologia é uma importante ferramenta para a predição da estrutura tridimensional de uma proteína que não possui cristal, seja por raio-X ou RMN. Esta técnica tem como base a evolução molecular, ou seja, estruturas semelhantes de aminoácidos terão estruturas Tridimensionais parecidas. (Venter, J;2001).

Tendo a estrutura tridimensional da AeTIM obtida através de modelagem por homologia, faz com que o estudo de possíveis inibidores específicos para a enzima torne-se mais rápido e fácil. Através desta técnica podemos analisar quais as regiões são de fácil acesso, a fim de permitir uma inibição e conseqüentemente levar a perda da função da enzima e também podemos testar diversos inibidores, através de docking molecular, sendo uma importante ferramenta nas áreas de biologia estrutural, bioquímica e biofísica. (Osvaldo Filho, 2003).

A sua aplicação nos dias de hoje tem sido muito útil tanto na indústria farmacêutica como na pesquisa fundamental, sendo uma grandiosa alternativa para superar os problemas encontrados na elucidação de estruturas proteicas por técnicas experimentais. (Mariana Souza, 2008).

Já o objetivo de monitorar a atividade Metabólica em todo o estágio de desenvolvimento do Mosquito *Aedes aegypti*, foi visualizar em qual estágio a mesma encontra-se maior, assim, podendo direcionar o estudo na busca de inibidores específicos para enzima Triose fosfato Isomerase no mosquito.

Através da análise constatamos que a fase a qual apresentou maior atividade metabólica foi a de larva, principalmente a L1, devido a sua grande necessidade metabólica para locomoção em busca de alimentos e adaptação ao meio em que vive. Porém decaindo com o avançar do estágio de larva.

Conforme descrito nos resultados, item 4-8, o ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) e metilmetano tiosulfanato (MMTS) são derivatizantes que reagem equimolarmente com o grupamento sulfidril (SH) de resíduos de cisteína expostos.

Ao colocarmos no homogenato das larvas de *Aedes aegypti* concentrações diferentes de DTNB e MMTS, notamos que a inibição é grande, mostrando que é possível inibir esta enzima baseada nas interações de drogas com resíduos de cisteínas conservados.

A atividade foi inibida em 50% com 10  $\mu$ M de DTNB e 5  $\mu$ M MMTS. Estes resultados apresentaram muito semelhantes aos mostrados na Inibição de *T. brucei*, *t. cruzi* (Téllez-Valencia et al., 2002) e *G. lamblia* (Enríquez-Flores et al., 2011) pelos compostos DTNB e MMTS.

Em muitos outros trabalhos é possível notar a sensibilidade das cisteínas da TIM a estes compostos, como é o caso do *T. cruzi*, *T. brucei* (Gomez-Puyou et al., 1995), *L. mexicana*, *L. donovani*, *G. lamblia*, *P. falciparum* e *E. coli*. Esta sensibilidade é muito importante para a caracterização dos resíduos de cisteína como bom alvo para o desenvolvimento de inibidores antiparasitários específicos (Gomez-Puyou et al., 1995; Garza-Ramos et al., 1996; Olivares-Illana et al., 2006; Velanker et al., 1997; Rodríguez-Romero et al., 2002).

Já o composto 3-BromoPiruvato (3-BrPA) é uma substância que tem como característica principal a capacidade de alquilar grupos (-OH) e tióis (-SH) de proteínas e peptídeos em diversos organismos e em várias enzimas. Trata-se de um composto pequeno, e devido a sua ação depressora do fluxo glicolítico e da fosforilação oxidativa consegue inibir a produção de ATP. (Fonda, 1976).

Assim, devido as propriedades apresentadas pela molécula 3-BromoPiruvato, vários pesquisadores do Mundo começaram a testá-lo com diferentes alvos, como descrito por (Pry e Hsu, 1978) em fígado de pombos e de pato por e de pato por (Satterlee e Hsu, 1991). Porém, nenhum estudo que evidencie o poder de inibição da enzima Triose fosfato Isomerase por esta substância foi identificado na literatura, assim este nosso estudo apresenta dados importantes para a sociedade científica.

E após a realização do nosso experimento, onde foi feita a incubação de diversas concentrações do composto 3-BromoPiruvato com homogenatos de larvas, concluímos que a molécula possui grande poder de inibição do homogenato de larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

## **7-Conclusões**

A AeTIM apresentou 7 cisteínas por monômero. Estes resíduos são 7, 25, 43, 66, 127, 143 e 217.

Apesar de ser uma proteína conservada, a comparação entre a sequência de aminoácidos da AeTIM e da TIM de *Homo sapiens* indica que os resíduos de cisteína 7, 25, 43 e 143 são exclusivamente não conservados na AeTIM;

Com a análise da posição dos aminoácidos que apresentaram ser específicos para a sequência de aminoácidos do mosquito *Aedes aegypti* através da estrutura tridimensional, podemos perceber que a cisteína 143 encontra-se em uma região de fácil acesso, podendo ser estudada futuramente como forma de inibição para a enzima Triose fosfato Isomerase no mosquito *Aedes aegypti*.

A Estrutura tridimensional construída da AeTIM conteve as características fundamentais da enzima Triose fosfato Isomerase, como formato de barril, homodímeros, 8 alfa hélice e 8 folhas betas por dímeros.

Percebemos que a fase de desenvolvimento do mosquito a qual apresenta maior atividade enzimática é a fase de larva, principalmente a L1, podendo ser explorada futuramente como alvo para inibição da enzima Triose fosfato Isomerase.

As substâncias DTNB e MMTS, as quais reagem com grupamento sulfídrico de cisteínas expostas apresentaram possuir grande poder de inibição da enzima Triose fosfato Isomerase em larvas do mosquito *Aedes aegypti*, onde a mesma foi inibida com pequenas concentrações das drogas.

Já o composto 3 Bromopiruvato, o qual é descrito na literatura como agente alquilante de hidroxila (OH) e tióis (SH), apresentou grande poder de inibição frente a enzima Triose fosfato Isomerase em larvas do mosquito *Aedes aegypti*, contribuindo grandemente para o desenvolvimento de inibidores para este vetor, pois até o momento, nenhum estudo havia sido realizado com esta droga com o intuito de inibição da enzima Triose fosfato Isomerase do mosquito transmissor da dengue.

## **8 – Referências Bibliográficas**

Abreu, A.P.(2011). Estudo de alvos terapêuticos e ligantes em doenças neurodegenerativas e neuroinfecções por modelagem molecular. Tese submetida á Universidade Federal Fluminense visando a obtenção do grau de Doutor em Neurociências.

ALMEIDA, E. A. P. Padrão de oviposição e ciclos gonotróficos de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) em Laboratório. 2003. 37 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

Andrade CFS, Modolo M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. Rev. Saúde. Publ. 25: 184-187, 1991.

André, F.E. (2001). The future of vaccines, immunization concepts and practice. Vaccine 19, 2206–2209.

ARAGÃO, V. O.; SILVA, E. A.; FARIAS, D. F.; FERREIRA, P. M. P.; GADELHA, N. C.; CARVALHO, A. F. F. U. Avaliação do potencial de diferentes dietas para o desenvolvimento de larvas de *Aedes aegypti*. V Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação do Centro Federal Tecnológico do Estado do Ceará – CEFET, 2005.

Azevedo, S.A.(2011). Desenvolvimento de vacinas de DNA contra o vírus da dengue baseadas na proteína do envelope viral. Instituto Oswaldo Cruz Pós Graduação em Biologia e Molecular.

Barreto, F.C. (2005). *Aedes aegypti* - RESISTÊNCIA AOS INSETICIDAS QUÍMICOS E AS NOVAS ALTERNATIVAS DE CONTROLE. Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos, Goiás, ISSN 1808-8597, v.1, n.2, p. 62-73.

BARRETO, L. L. C.; COELHO, H. B. T.; GARCIA, M. L. R. Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. *Cad. Saúde Pública.*, v.20, n.6, p.1447-1457, 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Rev. Saúde.*, v.16, n.3, p. 279-293, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt\\_aval\\_vul\\_epid\\_dengue](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_aval_vul_epid_dengue). Acesso em 03 de Maio 2014.

Brogdon WG, McAllister JC. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases* 1998;4(4):605-613.

Bell,G.S., Russell,R.J.M., Kohlhoff,M., Hensel,R., Danson,M.J., Hough,D.W., & Taylor,G.L. (1998) Preliminary crystallographic studies of triosephosphate isomerase (TIM) from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus woesei*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **54**, 1419-1421.

Carvalho MSL, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos PTR, Souza LCKR, Yoshizawa MAC, Knox MB, Oliveira C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal. *Rev. Saúde Pública*, 38: 623-629, 2004

Cole, L. (2003) Programas de Pesticidas, Divisão de Prevenção, Agência de Proteção Ambiental, Washington, United States of American.

Cruz I. Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith). Embrapa Milho e Sorgo. Documentos 21, 15p. 2002.

Dias, A.B.Larissa., Almeida,L.C., Haes,M.Tissiane., Mota,M.L., Filho,R.S.J. (2010). Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. Condutas em enfermaria de clínica médica de hospital de média complexidade - Parte 1 Capítulo VI.

Ferrari JA. Insecticide resistance In: The Biology of Disease Vectors. Colorado: University Press of Colorado; 1996.

Filho, Oswaldo. Modelagem de proteínas por homologia. Quím. Nova vol.26 no.2 São Paulo Mar./ Apr. 2003

Fiocruz. Vetor da dengue na Ásia, *A. albopictus* é alvo de estudos. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=576&sid=32>. Acesso em 22 de maio 2014.

Fiocruz. <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue>. Acessado dia 19/02/2014.

Flores, E.S.,Romero,R.A.(2008). Species-specific inhibition of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. *Molecular & Biochemical Parasitology* 157 179–186.

FONDA, M. Bromopyruvate inactivation of glutamate apodecarboxylase. Kinetics and specificity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 251, n. 1, p. 229-235, 1976.

FUNASA (2001). Dengue- Instruções para pessoal de combate ao vetor; Manual de Normas técnicas. Brasília: Ministério da Saúde

FUNASA, (2002). Ministério da Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico. Brasília: Ministério da Saúde.

GADELHA, D. P.;TODA, A.T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. Doença. Trop.*, v.37, n.5, p.29-36, 1985.

Garza-Ramos,G., Cabrera,N., Saavedra-Lira,E., de Gomez-Puyou,M.T., Ostoa-Saloma,P., Perez-Montfort,R., & Gomez-Puyou,A. (1998) Sulfhydryl reagent susceptibility in proteins with high sequence similarity triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *European Journal of Biochemistry* 253, 684-691.

GILLETT, J. D.; COBERT, P.S.; HADDOW, A. J. Observations on the oviposition cycle of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology.*, v.55, n.3, p. 427- 431, 1961..

GOMES, A. S.; SÁ, S .J. S.; EIRAS, E. A. Periodicidade de oviposição de fêmeas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) em laboratório e campo. *Rev Soc. Bras. Med. Trop.*, v.39, n.4, p.327- 332, 2006.

Gomez-Puyou,A., Saavedra-Lira,E., Becker,I., Zubillaga,R.A., Rojo-Dominguez,A., & Perez-Montfort,R. (1995) Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action--studies with triosephosphate isomerase. *Chem.Biol.* 2, 847-855.

Gomes, C. Estratégias de Controle Biológico de Larvas de mosquito *Aedes aegypti* com Fungos Entomopatogênicos. (2009). Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Guy,B. Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra dengue. *Rev Pan-Amaz Saude* 2011; 2(2):51-64

Instituto Butantan. Disponível:

[http://www.butantan.gov.br/home/releases/Butantan\\_produz\\_vacina\\_contra\\_dengue.pdf](http://www.butantan.gov.br/home/releases/Butantan_produz_vacina_contra_dengue.pdf)  
. Acessado dia 03/03/2014.

Hutten,C.G. (2008). RECOMENDAÇÕES TÉCNICAS PARA O CONTROLE DA DENGUE PELO SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Leite, Germano. Entomologia Básica. Universidade Federal de Minas Gerais.2011.

Maciel, M.V., Marais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Amóra, S.S.A. (2010). Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. Rev. bras. plantas med. vol.12 no.1 Botucatu.

McBride WJH, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes and infection*. 2000;2(9):1041-50

Mellon RB, Georghiou GP. Rotational use of insecticides in mosquito control programs. Proceedings and papers of the fifty-second annual Conference of the California and Vector Control Association 1984;65-67.

Ministério da Saúde. (2011). Fundação Nacional de Saúde. Dengue – Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor – Manual de Normas Técnicas.

MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE ; Secretaria de Vigilância em Saúde; Informe Epidemiológico da Dengue Análise de situação e tendências – 2010.

Ministério da Saúde do Brasil. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=27630](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=27630)

Moraes, J., Galina, A., Alvarenga, P. H., Rezende, G. L., Masuda, A., Vaz Jr, I. S., & Logullo, C. (2007) Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *B. microplus*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A*. 146, 528-533.

Moraes, J. (2011). Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*

Neto, A.L.R. & Oliveira, C.M. (1985) Controle Biológico de Culicídeos e Simulídeos. Rev. Bras. Doen. Trop. São Paulo.

Nunes, S.J. (2011). Dengue: Etiologia, patogênese e suas implicações a nível global. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em: Medicina.

Nunes, P.M.R. (2013). O CONHECIMENTO DA POPULAÇÃO DO MUNICÍPIO DE PICOS SOBRE AS FORMAS DE CONTROLE DO MOSQUITO VETOR DA

DENGUE. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, modalidade Licenciatura.

Oliveira, M.R.(1998). A dengue no Rio de Janeiro: repensando a participação popular em saúde. Cad. Saúde Pública, vol.14.

Pontes, S.J.R., Netto, R.A.(1994). Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. Revista Saúde Publica, 28(3): 218-27.

PRY, T.; HSU, R. Mechanism of pigeon liver malic enzyme. Reactivity of class II sulfhydryl groups as conformational probe for the " half-of-the-sites" reactivity of the enzyme with bromopyruvate. Biochemistry, v. 17, n. 19, p. 4024-4029, 1978.

RODHAIN, F.; ROSEN, L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.) *Dengue and dengue haemorrhagic fever*. New York: CAB International, 1997. p.45-60.

Romero,R.A., Santoyo,H.A., Yauner,P.L.,Velasco,F.A.(2002). Structure and Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica*. J. Mol. Biol. 322, 669–675.

Rose, R.I. (2001) Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerg. Infec. Dis.*, 7(1):17-23.

SATTERLEE, J.; HSU, R. Duck liver malic enzyme: sequence of a tryptic peptide containing the cysteine residue labeled by the substrate analog bromopyruvate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1079, n. 3, p. 247-252, 1991.

Scaraffia, P. Y., Wells, M. A. (2002), Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. *Journal of Insect Physiology*, 49: 591-601.

Secretaria do Estado de Goias. Disponível em: <http://www.saude.go.gov.br/index.php?idEditoria=4208>. Acessado dia 10/05/2014

Tauil, Pedro. Aspectos críticos do controle da febre amarela no Brasil. *Rev Saúde Pública* 2010;44(3):555-8.

Teixeira, G.A., Barreto, L.M., Guerra, Z. (1999). Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. *Informe Epidemiológico do SUS*, 8(4):5-33.

Télliez-Valencia, A., Ávila-Rios, S., Pérez-Montorf, R., Rodríguez-Romero, A., Gomez-Puyou, M. T., López-Calahorra, F., & Gómez-Puyou, A. (2002) Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 958-963.

TINKER, M.E. Los hábitats larvarios de *Aedes aegypti* em Surinam. *Bol Of Sanit Panam.*, v.80, n.5, p.412-23, 1976.

Valencia, T.A., Rios, A.S. (2002). Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295 958–963.

Valencia, T.A. (2004). Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an Agent that Perturbs its Dimer Interface. *J. Mol. Biol.* 341, 1355–1365.

Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; *et al.*; *Science* 2001, 291, 1304.

Vital, Wagner. (2006). *Metabolismo de Glicose Durante a Embriogênese do Mosquito Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Walden, H., Bell, S.G., Russell, R.J.M., Siebers, B., Hensel, R., & Taylor, G.L., (2001) Tiny TIM: a small tetrameric hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 306, 745–757.

Westaway EG, Blok J. Taxonomy and evolutionary relationships of flaviviruses. In: Gubler DJ, Kuno C, eds. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Cambridge: CAB International; 1997, p. 147-73.

Wierenga, K.R., Borcheti, V.T., Noble, M.E.M. (1992). Crystallographic binding studies with triosephosphate isomerases: conformational changes induced by substrate and substrate-analogues. Federation of European Biochemical Societies.

Whyard, S., Russell, R.J., & Walker, V.K. (1994a) Insecticide Resistance and Malathion Carboxylesterase in the Sheep Blowfly, *Lucilia-Cuprina*. *Biochemical Genetics* **32**, 9-24.

