

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RODRIGO FAITTA CHITOLINA

**PROTEÔMICA DA GLÂNDULA SALIVAR DE *Aedes (Stegomyia) aegypti*
INFECTADO COM DENV-2 e 3**

CURITIBA

2015

RODRIGO FAITTA CHITOLINA

**PROTEÔMICA DA GLÂNDULA SALIVAR DE *Aedes (Stegomyia) aegypti*
INFECTADO COM DENV-2 e 3**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Magda Clara Vieira Costa-
Ribeiro

Co-orientadora: Dra. Márcia Gonçalves de Castro

CURITIBA

2015



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“PROTEÔMICA DA GLÂNDULA SALIVAR DE *Aedes (Stegomyia)*
aegypti
INFECTADO COM DENV-2 e 3”**

por

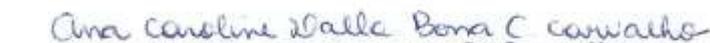
RODRIGO FAITTA CHITOLINA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Prof^ª. Dr^ª. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro – Presidente

Dr^ª. Claudia Nunes dos Santos


Dr. Luiz Eduardo Rizzo de Souza


Dr^ª. Ana Caroline Dalla Bona C. Carvalho,
membro suplente

Curitiba, 30 de março de 2015.

Dedico esse trabalho a meus pais Adair e Vera, meus irmãos Henrique e Arthur e ao meu companheiro Syllas. Obrigado pelo apoio, carinho, amor, compreensão e dedicação. <3

AGRADECIMENTOS

Uma jornada só é possível quando os quatro pilares que regem nossa vida estão em harmonia e fortes para superar qualquer vendaval, sendo assim devo agradecer a esses quatro pilares: Fé, Amor, Amizade e Ensinamentos.

Agradeço a Deus por me ensinar a ter **Fé** e pelas alegrias, conquistas e bons momentos que experimentei ao longo da minha vida, mas também pelos momentos de dificuldade que tanto me ajudaram a crescer.

Agradeço a minha família, a forma mais pura do **Amor**, por nunca me deixarem só. Aos meus pais, Adair André Chitolina e Vera Inês Faitta, que estiveram sempre presentes e me apoiando nos mais diferentes aspectos da minha vida, e que mesmo após estes 6 anos em que não nos vemos diariamente, o amor e o carinho estão sempre representados nos mais singelos atos. Aos meus irmãos Henrique e Arthur, que mesmo com brigas e discussões fraternais são parte importantíssima da minha vida. Ao meu companheiro Syllas, por me ajudar nas batalhas diárias antes e todas as demais que enfrentaremos juntos daqui para frente. À Ana, Marcelo, Silvio, Dilma, Livia, Isis e Gabriel minha segunda família que me acolheram. E a todas as outras pessoas da minha família que de uma maneira ou outra me ajudam e me apoiam. **Amo vocês!**

Agradeço a **Amizade** dos amigos, cuja vitalidade e alegria de viver me encorajaram sempre a persistir e rir, não importando a situação. Agradeço aqueles que estavam perto de corpo, aos que estavam perto de alma, aos que me auxiliaram em diversos aspectos nessa caminhada do mestrado. Obrigado Suelin, Germano, Carla, Ana Caroline, César (papis), Vinicius Richard, Débora, Maiara, Oscar, Filipe, Thais, Isabela (Japinha), Andressa, Letícia, Jason, Fábio (Padre), Graci, Luciana, Julio, Juan, Carlos, Jeff, Anielly, Rosilainy, Mauro, Keli, Inês, Cristiane, Taissa, Estér, Ademir, Bruno, Rodrigo Chaves, Rodrigo Demeterco, Kiko, Everson, Rodrigo Barth, Wellington, Vinicius Chagas, Gonzalo, Marceli, Francielli, Aline, Bruno, Mariana Santos, Mariana Toledo, Emerson, Marise, Rodrigo Neves, Tatiane, Leonardo, Neto, Mano, Sil. Obrigado a todos seja pela conversa, por compartilhar sua casa nas viagens, pelas alegrias e também broncas. Por último, um obrigado mais do que especial a essa nova amizade que iniciou no mestrado e só tende a perdurar, obrigado a

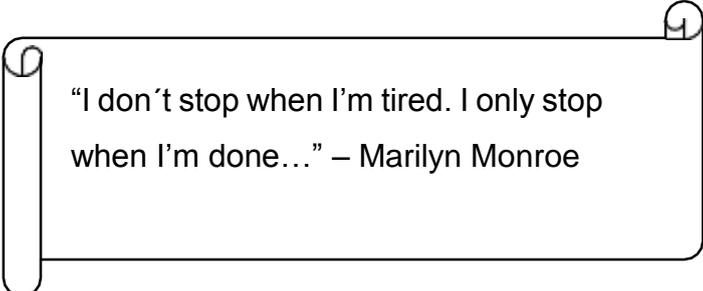
você Izanara, pelos inúmeros momentos que passamos ao longo desses dois anos. A amizade de todos vocês tornou isso possível!

Agradeço aos **Ensinamentos** dos mestres e colegas que permitiram que não apenas esse trabalho fosse possível como também o meu crescimento profissional. Obrigado a família Lathema, por me acolherem e passarem seus ensinamentos, Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira, Dra. Teresa Fernandes, Dra. Nildimar Honório, Dra. Maria Goreti Rosa Freitas, Msc. Dinair Couto, Dr. Rafael Maciel de Freitas, Dra. Monique Albuquerque e em especial a minha co-orientadora Dra. Márcia Gonçalves de Castro pelo auxílio e disponibilidade em tornar esse trabalho possível. Obrigado aqueles que auxiliaram na tarefa de desvendar o mundo das proteínas a Msc. Alessandra Becker, Dr. Luiz Rizzo, Msc. Graciele, Dr. Michel Batista, Dr. Fabricio Marchini, Dra. Juliana Moura, Dra. Larissa Alvarenga e ao professor Dr. Ciro Alberto de Oliveira. Cabe ainda um agradecimento a professora Dra. Débora do Rocio Klisiowicz por ter sido a pessoa que não apenas permitiu o início dessa jornada, como também me “resgatou” em um momento tão difícil.

Por fim, mas não menos importante e sim com muito apreço e estima a minha orientadora professora Dr^a Magda Clara Vieira da Costa-Ribeiro. Agradeço não só os momentos de ensinamentos, mas também por ter me ajudando a abrir portas e pelos momentos de debate e discussão, mesmo que isso tenha feito essa jornada do mestrado uma verdadeira montanha-russa de ensinamentos, discussões e aprendizados. Muito obrigado principalmente por me permitir crescer e ascender profissionalmente.

Muito obrigado a cada um de vocês mencionados aqui ou não, devido a falha humana de esquecimento, por terem sido parte fundamental nessa caminhada.

Ainda, meu muito obrigado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, à FIOCRUZ-RJ e ao Instituto Carlos Chagas FIOCRUZ-PR pelas colaborações e à CAPES pela concessão da bolsa.



“I don’t stop when I’m tired. I only stop
when I’m done...” – Marilyn Monroe

RESUMO

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* é o principal vetor de importantes arboviroses, dentre elas a dengue, que acomete aproximadamente 390 milhões de pessoas por ano. Dentro da dinâmica da doença envolvendo a tríade mosquito- vírus-humano, estudos têm procurado explicar a relação existente entre o vírus e o vetor a fim de esclarecer os fatores associados à disseminação dos sorotipos virais, e as suas implicações na epidemiologia da doença. Ainda, no que concerne a transmissão do vírus, as glândulas salivares de *Ae. aegypti* é um órgão chave na disseminação viral, revestindo-se de grande interesse nos estudos de proteômica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de proteínas da glândula salivar de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com DENV-2 e 3 por meio da proteômica. Fêmeas de *Ae. aegypti* da cepa *Paea* foram submetidas ao repasto sanguíneo segundo três grupos de infecção: i) DENV-2, ii) DENV-3, iii) controle. Após 15 dias do repasto sanguíneo procedeu-se a extração da glândula salivar para realização das análises de proteômica, e a separação do corpo das fêmeas para detecção viral por meio da técnica de RT-PCR seguida da *nested*-PCR. Para as análises de proteômica, *pools* das glândulas salivares foram analisados por espectrometria de massa, associada à cromatografia líquida, com posterior análises nos programas MaxQuant e Perseus. O percentual de infecção das glândulas salivares utilizadas foi verificado a partir dos dados advindos da RT-PCR seguida da *nested*-PCR. Os grupos de infecção foram comparados dois a dois usando um *Two samples test*, através do teste-t. O percentual de infecção encontrado foi de 35% para os grupos de infecção (i) e de 45% para o grupo (ii). Após análise de todos os grupos glândulas salivares (i, ii e iii), obteve-se um total de 1588 proteínas identificadas. Pelo teste-t segundo p-valor ($p < 0,01$) verificou-se a expressão de 233 proteínas, ao passo que após teste de Benjamini-Hochberg este número reduziu para 85 proteínas diferencialmente expressas. Após as comparações, 85 proteínas apresentaram nível de expressão diferenciada sendo que dessas, 20 já foram descritas em estudos prévios. Foram identificadas proteínas do metabolismo celular, de funções digestivas, de repasto sanguíneo e da resposta imune do vetor. As proteínas foram classificadas segundo cinco categorias funcionais, sendo que aproximadamente 51% foram classificadas como proteínas do metabolismo básico. Ainda, 35% das proteínas encontradas não foram correlacionadas a nenhuma função. A análise de proteômica da glândula salivar permitiu a identificação de proteínas já descritas na literatura, bem como o encontro de novas proteínas que servirão de base para futuros estudos quanto a sua funcionalidade.

Palavras-chave: *Aedes (Stegomyia) aegypti*. DENV. Biologia molecular. Proteômica. Glândula salivar

ABSTRACT

The *Aedes (Stegomyia) aegypti* mosquito is the main vector of important arboviruses, among them dengue fever, which affects approximately 390 million people per year. Within the dynamics of disease involving the mosquito-virus-human triad studies have tried to explain the relationship between the virus and the vector in order to clarify the factors associated with the spread of the serotypes, and their implications for the epidemiology of the disease. Also, regarding the transmission of the virus, the salivary gland of *Ae. aegypti* is a key organ in the viral spread becoming of great interest in proteomics studies. The objective of this study was to evaluate the expression of proteins of the salivary gland of *Ae. aegypti* infected with DENV-2 and 3 by means of proteomics. *Ae. aegypti* females, *Paea* strain, were blood feed according to three groups: i) DENV-2, ii) DENV-3, iii) control. After 15 days p.i. the salivary glands were extracted to proteomic analysis, and the body of the females were separated to perform virus detection by RT-PCR followed by a nested PCR. For proteomics analysis, pools of salivary glands were analyzed by mass spectrometry associated with liquid chromatography with subsequent analysis in MaxQuant and Perseus programs. The percentage of infection of the salivary glands used was found from the data arising from RT-PCR followed by nested-PCR. The infected groups were compared using a *Two samples test*. The percentage of infection was found to be 35% for the group of infection (i) and 45% for the group (ii). Following analysis of all salivary glands groups (i, ii and iii), there was obtained a total of 1588 identified proteins. According to the t-test using a p-value ($p < 0.01$) as default it was possible to detect the expression of 233 proteins, whereas after Benjamini-Hochberg test this number dropped to 85 differentially expressed proteins. After comparisons annotation of the 85 proteins that showed differential expression level was carried out. Twenty of these proteins that were identified here had already been described in previous studies of infected salivary glands. It was possible to identify proteins related to the cell metabolism, digestive functions, from blood meal and vector immune response. Proteins were sorted by five functional categories, of which approximately 51% were classified as the basic metabolism proteins. Furthermore, 35% of the proteins that were detected had not being correlated with any function (unknown function). The proteomic analysis of salivary gland allowed the identification of proteins described in the literature, as well as the discovery of new proteins that form the basis for future studies regarding to its functionality.

Keywords: *Aedes (Stegomyia) aegypti*. DENV. Molecular biology. Proteomics. Salivary gland

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 Distribuição das classes funcionais de proteínas identificadas no conjunto total avaliado e nos três diferentes grupos de comparação.....	39
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação do vírus dengue e seus respectivos sorotipos, segundo Lanciotti et al. (1992).....	30
Tabela II	Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> (Cepa Paea) submetidas à infecção artificial pelos sorotipos virais DENV-2 ou DENV-3.....	33
Tabela III	Número de glândulas salivares dissecadas e número de indivíduos selecionados para RT-PCR, conforme grupo de infecção.....	34
Tabela IV	Número de fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> (Cepa Paea) positivas para infecção artificial, por meio da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase.....	34
Tabela V	Fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> (Cepa Paea) infectadas por DENV nos pools de glândulas salivares utilizados para as análises de proteômica.....	35
Tabela VI	Determinação do número de proteínas exclusivas em cada grupo de infecção conforme análise pelo Diagrama de Venn.....	36
Tabela VII	Número de proteínas com expressão diferenciada entre os grupos de infecção, após teste-t com p-valor.....	36
Tabela VIII	Número de proteínas com expressão diferenciada entre os grupos de infecção, após teste de Benjamini-Hochberg.....	37
Tabela IX	Proteínas repetidas entre os agrupamentos de comparação estatística segundo as análises do teste-t de Benjamini-Hochberg.....	38

LISTA DE ANEXOS

Anexo I	Proteínas com expressão diferenciada no Grupo A (Controle DENV-2) após análise estatística segundo teste-t de Hochberg.....	57
Anexo II	Proteínas com expressão diferenciada no Grupo B (DENV-3) após análise estatística segundo teste-t de Hochberg.....	62
Anexo III	Proteínas com expressão diferenciada entre no Grupo C (DENV-3) após análise estatística segundo teste-t de Hochberg.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
Ae	<i>Aedes</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BOD	Câmara de Germinação do tipo B.O.D.
CID:	<i>Collisionally induced dissociation</i>
DDA	<i>Data Dependent Analysis</i>
DENV	Dengue vírus
DENV-1	Dengue vírus sorotipo 1
DENV-2	Dengue vírus sorotipo 2
DENV-3	Dengue vírus sorotipo 3
DENV-4	Dengue vírus sorotipo 4
DENV-5	Dengue vírus sorotipo 5
DES	Funções Desconhecidas
DIV	Funções Diversas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ECP	Efeito Citopático
FDR	<i>False Detection Rate</i>
FHD	Febre Hemorrágica do Dengue
FITC	isotiocianato de fluoresceína
MET	Metabolismo Básico
mL	mililitro
mM	mili Molar
MS2	Fracionamento de peptídeos em aminoácidos
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcriptase Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase
RTT	Replicação Transcrição e Tradução
SFB	Soro Fetal Bovino
TRANS	Transporte
TCID50	Dose infectiva para 50% do tecido em cultura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. O vetor.....	16
2.2. O vírus.....	17
2.3. A dengue e o vetor.....	18
2.4. O vírus e o vetor.....	19
2.5. Proteômica da glândula salivar.....	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Criação e separação das fêmeas.....	25
4.2. Amplificação Viral.....	25
4.3. Infecção artificial dos mosquitos.....	27
4.4. Dissecção da glândula salivar e separação para Biologia Molecular.....	28
4.5 Extração do RNA viral e transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	29
4.6 Proteômica da glândula salivar.....	30
4.7 Análise dos dados de Proteômica.....	31
5. RESULTADOS.....	33
5.1. Infecção artificial dos mosquitos.....	33
5.2. Dissecção das glândulas salivares e triagem para Biologia Molecular.....	33
5.3 Confirmação da infecção artificial segundo a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	34
5. 4. Análise Proteômica.....	35
5. 4.1 Confirmações da infecção pelos sorotipos DENV-2 ou DENV-3 nos <i>pools</i> de glândulas salivares.....	35
5.4.2 Determinação do conjunto total de proteínas e análise do Diagrama de Venn.....	35
5.4.3 Proteínas com expressão diferenciada	36
5.4.3.1 Comparação dos grupos de infecção (teste-t segundo p-valor).....	36

5.4.3.2 Comparação dos grupos de infecção (Benjamini-Hochberg/FDR).....	37
5.4.4 Identificação das principais proteínas e suas possíveis funções biológicas	37
5. 4. 5 Identificação e comparação dos resultados com proteínas descritas na literatura sobre a glândula salivar de <i>Ae. aegypti</i> infectada ou não infectada.....	39
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÃO.....	46
8. PERSPECTIVAS.....	47
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
10. ANEXOS.....	57

1. INTRODUÇÃO

A dengue figura no cenário mundial como uma importante endemia afetando milhares de pessoas anualmente. Por não existir vacina contra a doença, se faz necessário um entendimento aprofundado das relações biológicas e evolutivas existentes entre o vetor, o vírus e o hospedeiro vertebrado.

Muitos estudos têm procurado explicar a relação entre o arbovírus e o vetor buscando esclarecer os fatores associados à disseminação dos sorotipos virais, e as suas implicações na epidemiologia da doença.

Dentro dessa temática, procura-se entender quais são as consequências que a infecção pelo vírus dengue causa não apenas no hospedeiro vertebrado, que apresenta manifestações clínicas da doença, mas também no hospedeiro invertebrado, o mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762). Nessa perspectiva, é de suma importância, entender quais são as implicações comportamentais, fisiológicas e biológicas que a infecção pelo DENV causam no vetor responsável pela sua multiplicação e circulação.

No que concerne à transmissão do vírus, a glândula salivar de *Ae. aegypti* torna-se importante nos estudos da proteômica. As análises proteômicas do conteúdo salivar constituem um ponto de partida para os estudos de interação entre vetor e o parasito, propiciando conhecimento sobre os mecanismos de sua transmissão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O vetor

Ae. aegypti são mosquitos pertencentes a ordem Diptera, família Culicida, subfamília Culicinae, cujo espécimes do gênero *Aedes* apresentam hábito diurno, e, somente as fêmeas exercem a hematofagia (Forattini, 2002). Originário da África, o *Ae. aegypti*, atualmente, tem distribuição mundial. Acredita-se que essa dispersão tenha ocorrido de forma passiva, principalmente por meio das atividades humanas, de tal forma que desenvolveram durante sua trajetória evolutiva um comportamento estritamente sinantrópico e antropofílico (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994). Postula-se que o comércio de pneus usados tenha dado grande impulso a sua dispersão (Natal, 2002). No Brasil, o vetor foi erradicado na década de 50, sofrendo sucessivas re-infestações nos anos seguintes que foram controladas. Contudo, em 1976 ocorreu uma nova reintrodução e, não havendo êxito no seu controle, o mosquito *Ae. aegypti* se espalhou para todo o território brasileiro (Tauil, 2002).

O *Ae. aegypti* é o principal vetor de três importantes arbovírus: febre amarela, chikungunya, dengue e, de outras arboviroses (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Morales Vargas *et al.*, 2010). A espécie apresenta seu ciclo de vida associado aos regimes pluviais, de maneira que a incidência de casos de dengue está relacionada a fatores ambientais (aumento de temperatura, pluviosidade, umidade) que favorecem a disseminação do vetor devido ao aumento de criadouros para a espécie (Ribeiro *et al.*, 2006).

Alguns aspectos do comportamento de oviposição deste culicídeo permitem entender o sucesso da dispersão e distribuição da espécie: o primeiro refere-se ao fato dos ovos serem depositados acima da linha da água nos criadouros, que no caso de criadouros temporários, acabam sendo transportados passivamente pelas migrações humanas (Takahashi *et al.*, 2005); o segundo, está relacionado à resistência do ovo à dessecação o que permite que os mesmos permaneçam alguns meses no ambiente (Natal, 2002) e o terceiro, ao comportamento de oviposição aos saltos onde a fêmea deposita seus ovos ao longo de vários criadouros (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Costa-Ribeiro, 2006).

2.2. O vírus

Os vírus dengue (DENV) são arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae* que, além do DENV, engloba o vírus da febre amarela (YFV) o complexo do vírus da encefalite japonesa (JE), a encefalite de São Luís (SLEV), e o vírus do oeste do Nilo (WNV) (Figueiredo, 2007; Carroll *et al.*, 2007).

Composto por uma fita simples de RNA com cerca de onze mil pares de base (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010), o DENV apresenta alta variabilidade genética sendo caracterizado por apresentar cinco sorotipos diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5), sendo que cada sorotipo pode ter vários genótipos (Pontes & Ruffino-Netto, 1994). Em 2013 o DENV-5 foi descoberto e caracterizado a partir do estudo de amostras de pacientes de um surto da doença que ocorreu na Malásia em 2007 (Health/Sciencemag, 2013, Normile, 2013).

Acredita-se que o desenvolvimento de formas graves da doença está associado a vários aspectos, além da resposta imune do hospedeiro, fatores associados aos sorotipos e aos genótipos virais também influenciam (Clyde *et al.*, 2006). Por exemplo, verificou-se que pacientes infectados com DENV-2 tiveram casos mais graves da doença quando comparados à infecção com outros sorotipos (Vaughn *et al.*, 2000; Fried *et al.*, 2010). Ainda, vírus do dengue do sorotipo 2, genótipo do Sudeste-Asiático, são relatados como mais virulentos do que outros genótipos do DENV-2, sendo capazes de sobrepor a replicação do sorotipo DENV-3 em eventos de co-infecção no mosquito (Anderson & Rico-Hesse, 2006; Quintero- Gil *et al.*, 2014).

No que concerne à distribuição dos sorotipos virais do dengue, verificou-se uma ampla dispersão dos quatro principais sorotipos ao longo de 70 anos de investigação, de 1943 a 2013, considerando áreas endêmicas e/ou epidêmicas para a doença. Até a década de 80, a maioria das áreas endêmicas para a doença circulava apenas um ou dois sorotipos virais. Contudo, após esse período observou-se a co-circulação dos quatro sorotipos virais em várias regiões, particularmente na América Latina e na Ásia, implicando em importantes padrões de agravamento da doença (Messina *et al.*, 2014).

2.3 A dengue e o vetor

Acredita-se que dentre as doenças virais de transmissão vetorial, a dengue é a que causa maior impacto na população em termos de morbimortalidade (Gubler, 2002; Taail, 2002).

Estimativas indicam que 2,5 bilhões de pessoas (dois terços da população mundial) encontram-se em áreas endêmicas e com risco para contrair a infecção. Há aproximadamente 390 milhões de infecções por dengue/ano, e 96 milhões apresentam sintomatologia com alguma gravidade. Estima-se que 500 mil pessoas são internadas anualmente com sintomas graves da doença, com uma taxa de óbito de cerca de 2,5%, sendo grande parte desses óbitos ocorrendo em crianças (WHO, 2015)

No Brasil existem relatos de dengue desde o século XIX. Em 1916 há relatos em São Paulo e 1923 em Niterói/RJ, sendo que a primeira epidemia ocorreu entre 1981-1982 em Roraima pelos sorotipos 1 e 2 (Cartilha Dengue, 2011). Após quatro anos, em 1986, deflagrou-se uma epidemia no Rio de Janeiro e em algumas capitais do Nordeste. Desde então, três outras grandes epidemias ocorreram (2002, 2008 e 2010) causadas pela mudança de sorotipo viral predominante (Nogueira & Eppinghaus, 2011).

Não obstante, no século XXI o Brasil se tornou o país com a maior taxa de casos de dengue, ocupando o primeiro lugar no *ranking* internacional, com mais de três milhões de registros entre 2000 e 2005 (Teixeira *et al.*, 2009). Nos anos de 2001 e 2002, o aumento de casos na região sudeste foi observado principalmente no estado do Rio de Janeiro (aproximadamente 145 mil casos reportados), sendo que este número corresponde a 45,8% do registrado em todo o país (Barbosa *et al.*, 2002). Ainda, no período de 1990 a 2008 foram incluídos no Sistema de Vigilância Epidemiológica 8.885 casos de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) (Barreto & Teixeira, 2008).

No Brasil, diversos fatores têm contribuído para o aumento do número de casos de dengue, dentre os quais podemos destacar: ampla dispersão de *Ae. aegypti* no território brasileiro, a intensificação do crescimento urbano desordenado levando ao acúmulo de descartáveis que podem servir como criadouros à espécie, medidas ineficientes de controle e elevado fluxo migratório humano (migração, imigração e emigração) (Costa-Ribeiro, 2006) e a co-circulação de quatro sorotipos

do vírus dengue no país (Ministério da Saúde, 2014). Além disso, registra-se não apenas a circulação bem como a co-circulação dos sorotipos virais em pacientes desde 1985 (Gubler *et al.*, 1985; Araújo *et al.*, 2006).

2.4. O vírus e o vetor

A circulação do DENV pode se iniciar quando um vetor não infectado realiza repasto sanguíneo em um hospedeiro virêmico, e os vírus ingeridos durante a atividade de repasto infectam as suas células do epitélio do intestino médio, replicam, atravessam esta barreira física em direção a hemocele, e, finalmente atingem as glândulas salivares (Castro *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2007).

A replicação e disseminação ocorrem célula a célula, e após o período de incubação extrínseca, variando de 8 a 12 dias, o vetor já apresenta as glândulas salivares infectadas, o que o torna apto a transmitir o vírus aos hospedeiros vertebrados (Castro *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2007). Além do ciclo mosquito-humano-mosquito há também a transmissão vertical do vírus, aonde fêmeas infectadas pelo DENV transmitem à sua progênie (Joshi *et al.* 2002; Cecílio *et al.*, 2007; Le Goff *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012) além da transmissão venérea onde machos infectam as fêmeas durante a cópula (Kow *et al.*, 2001).

Apesar de conhecido o tempo de replicação do vírus no vetor, diversos estudos têm demonstrado que existem diferenças biológicas e fisiológicas nesse processo, advindas tanto do sorotipo e cepa viral utilizada, quanto da procedência geográfica das populações de *Ae. aegypti*. Esses fatores quando avaliados juntos permitem entender melhor a dinâmica da infecção no vetor que pode ter um impacto significativo sobre a distribuição e disseminação dos sorotipos do DENV (Hanley *et al.*, 2008) e conseqüentemente na dinâmica e dispersão da doença.

Pepin e colaboradores (2008) discutem que a diferença que existe entre uma infecção no vetor e uma infecção no ser humano é a de que no artrópode a infecção é por toda a vida, enquanto que no vertebrado ela é transitória, visto da resposta imune adquirida do hospedeiro vertebrado.

Cologna *et al.*, (2005) sugerem que a seleção de linhagens mais virulentas do dengue ocorre tanto nos humanos quanto no mosquito. Para estes autores, o mecanismo pelo qual uma linhagem de vírus se sobressai a outras, é através de maior produção de fitas de RNA em estágios precoces da infecção no vetor,

culminando assim, em uma maior produção de partículas virais alcançando as glândulas salivares e tornando o mosquito capaz de transmitir o vírus. Ainda, uma possível interação específica entre o genótipo do patógeno com o genótipo do hospedeiro invertebrado pode facilitar ou dificultar a infecção pelo vírus (Lambrechts *et al.*, 2009; Fansiri *et al.*, 2013).

Quanto às modificações fisiológicas, verificou-se que a competição larval inter ou intraespecífica resulta em mosquitos menores e conseqüentemente mais suscetíveis à infecção pelo vírus dengue (Alto *et al.*, 2008a, 2008b). Ainda, comparando mosquitos infectados e não infectados, observou-se que fêmeas infectadas apresentam um aumento de aproximadamente 50% na sua atividade locomotora (Lima-Camara *et al.*, 2011). Contudo, há redução na sobrevivência, fecundidade e oviposição (Maciel de Freitas *et al.*, 2011; Sylvestre *et al.*, 2013), bem como na motivação para repasto sanguíneo e, aumento na avidez por este (Maciel de Freitas *et al.*, 2013).

Gubler e colaboradores (1979) verificaram o perfil de susceptibilidade de 13 populações diferentes de *Ae. aegypti* frente a infecção com os quatro sorotipos do dengue, e constataram uma variação significativa na susceptibilidade aos quatro sorotipos em relação à população analisada. Já Lourenço de Oliveira *et al.*, (2004) observaram que a taxa de infecção por DENV-2 é extremamente heterogênea no Brasil, com populações altamente suscetíveis em muitas partes do país, demonstrando que os padrões de disseminação e frequência de epidemias diferem conforme a região e estação do ano. Salazar *et al.*, (2007) observaram que diferentes linhagens de mosquitos de laboratório apresentam níveis variáveis de susceptibilidade ao DENV-2, e que em populações mexicanas, o DENV-2 dissemina em até quatro dias pós infecção para as glândulas salivares.

Outra possível explicação para as diferentes taxas de infecção entre os sorotipos virais é a atuação da microbiota intestinal do vetor que poderia afetar, tanto a infectividade do vírus da dengue (Charan *et al.*, 2013), quanto estimular a resposta imune antiviral no mosquito (Xi *et al.*, 2008). Outra hipótese foi defendida por Sim & Dimopoulos (2010) que verificaram em uma linhagem celular de *Ae. aegypti* (Aag2), que o DENV é capaz de inibir a ativação do sistema imune, sobressaindo-se ou não nas infecções.

2.5. Proteômica da glândula salivar

Dentre os culicídeos, muitas espécies apresentam importância à saúde pública devido ao hábito hematofágico das fêmeas, que durante a realização do repasto sanguíneo podem transmitir inúmeros patógenos como arbovírus, que podem causar moléstias a saúde humana e animal (Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994, Vasconcelos, 2003).

Segundo Silva (2009) o conteúdo bioquímico das glândulas salivares está envolvido direta ou indiretamente no êxito de uma infecção mediante suas propriedades imunomoduladoras ou quimiotáticas. Nessa perspectiva, a saliva de insetos hematofagos representa um ponto chave na disseminação e transmissão de patógenos e arbovírus (Almeras *et al.*, 2010). Além disso, a glândula salivar de insetos hematofagos apresenta uma variada classe de moléculas envolvidas na resposta ao sistema imune do mosquito, além de facilitarem a realização do repasto sanguíneo (Kalume *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2007; Almeras *et al.*, 2009; Fontaine *et al.*, 2011).

Devido as variadas atividades bioquímicas e diferentes componentes na glândula salivar de insetos hematofagos, vários estudos sobre a glândula salivar já foram realizados a fim de se entender a relação entre os vetores e patógenos nas várias famílias de insetos da ordem Diptera que apresentam importância médico-veterinária, a citar os vetores da malária: *Anopheles (Cellia) stephensi* (Liston, 1901) (Valenzuela *et al.*, 2003; Dixit, *et al.*, 2009), *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* (Root, 1926) (Moreira *et al.*, 2001), *Anopheles (Cellia) gambiae* (Giles, 1902) (Kalume *et al.*, 2005), *Anopheles dirus* (Peyton & Harrison, 1979) (Jariyapan *et al.*, 2007); do vetor secundário da dengue nas Américas: *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Arca *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013); dos vetores da leishmaniose visceral no velho mundo: *Phlebotomus (Euphlebotomus) argentipes* (Annandale & Brunette, 1908) e *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* (Newstead, 191) (Anderson *et al.*, 2006); e do vetor da leishmaniose visceral no novo mundo: *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Prates *et al.*, 2008); e o mosquito transmissor da elefantíase: *Culex pipiens quinquefasciatus* (Say, 1823) (Ribeiro *et al.*, 2004).

Dentre as diversas espécies de culicídeos, o mosquito *Ae. aegypti* tem especial interesse visto ser vetor de inúmeros arbovírus, principalmente a dengue,

febre amarela urbana e mais recentemente do vírus Chikungunya (Simon *et al.*, 2008; Vazeille *et al.*, 2013; Vasconcelos, 2014). Com a disponibilização do genoma completo de *Ae. aegypti* (Nene *et al.*, 2007) novas descobertas e estudos com as glândulas salivares e a interação patógeno-hospedeiro foram realizados.

Siriyasatien *et al.* (2005), estudando um complexo de oito proteínas na saliva de *Ae. aegypti*, verificaram que após a realização do repasto sanguíneo há decréscimo no número de proteínas das glândulas salivares. Almeras *et al.* (2009 & 2010) identificaram 120 proteínas na saliva de diferentes colônias de laboratório dessa mesma espécie, sugerindo algumas delas como marcadores antigênicos para estimar a exposição do humano ao mosquito. Ribeiro *et al.* (2007) descreveram 614 transcritos a partir da análise da glândula salivar de *Ae. aegypti*, e revelaram a expressão de 24 proteínas por espectrometria de massa. Ainda, 55 proteínas codificadas por transcritos da glândula salivar não têm função definida, mas são candidatas para a expressão e análise funcional como agentes antimicrobianos ou anti-hemostáticos.

Já Tchankou-Nguetcheu e colaboradores (2010) avaliando o padrão de expressão de proteínas do trato digestivo, rota importante da multiplicação e disseminação do vírus até a glândula salivar, verificaram que mosquitos acometidos pelo DENV apresentam modulação diferenciada no padrão de expressão de proteínas, quando comparados a mosquitos não infectados.

No que tange aos estudos envolvendo a saliva e/ou a glândula salivar, é possível notar que há um efeito na modulação de proteínas do vetor que podem auxiliar a infecção do DENV. Verificou-se que algumas classes de proteínas presentes na saliva do vetor são capazes de aumentar a taxa de replicação do DENV em queratinócitos humanos (Surasombatpattana *et al.*, 2014). Em contrapartida, há relatos de que proteínas advindas da saliva do mosquito podem sensibilizar células dendríticas do hospedeiro de tal forma que novas exposições ao vetor limitam a infecção pelo vírus nessas células (Ader *et al.*, 2004).

Ainda, verificou-se que mosquitos infectados com DENV-2 apresentam pelo menos três grandes grupos de proteínas diferenciadas que podem facilitar o repasto sanguíneo e a infecção pelo vírus (Wasinpiyamongkol *et al.*, 2012), além de alterar o nível de expressão de proteínas estruturais secretadas, metabólicas e com função anti-hemostática e analgésica (Chisenhall *et al.*, 2014a).

Além disso, não apenas proteínas com ação sob o hospedeiro são moduladas, mas também, proteínas envolvidas na resposta imune do vetor contra a infecção (Luplertlop *et al.*, 2014), proteínas envolvidas no comportamento de busca pelo hospedeiro vertebrado (Sim *et al.*, 2012) e de repasto sanguíneo (Platt *et al.*, 1997; Sim *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a expressão de proteínas da glândula salivar de fêmeas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Paea), infectados com DENV-2 e 3 através de análise de proteômica.

3.2 Objetivos Específicos

Confirmar as taxas de infecção pelo sorotipo DENV-2 e 3, independentemente, em *Ae. aegypti* por meio da técnica de RT-PCR e nested-PCR;

Determinar quais proteínas são expressas nas glândulas salivares de *Ae. aegypti* infectados pelo sorotipo DENV-2, por meio de espectrometria de massa;

Determinar quais proteínas são expressas nas glândulas salivares de *Ae. aegypti* infectados pelo sorotipo DENV-3, por meio de espectrometria de massa;

Identificar proteínas com nível de expressão diferenciada nas glândulas salivares de *Ae. aegypti* infectados pelos sorotipos DENV-2 e DENV-3.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1. Criação e separação das fêmeas

Ovos de *Ae. aegypti* cepa Paea, colonizados em laboratório foram postos para eclosão, as larvas obtidas foram criadas em água ambientada e alimentadas conforme descrito por Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994). As pupas obtidas foram separadas para a eclosão dos mosquitos adultos. Após cinco dias da eclosão dos adultos realizou-se a triagem das fêmeas em gaiolas plásticas, cilíndricas (10cm x 5cm x 5cm). A triagem foi realizada anestesiando as fêmeas em uma câmara de gelo, as fêmeas eram separadas dos machos com auxílio de pinças. Foram acondicionadas 60 fêmeas por gaiola para a infecção oral, ficando estas privadas de solução açucarada por um período de 24 horas antes da realização da infecção com sangue virêmico (infecção artificial).

4.2. Amplificação viral

Foram utilizadas cepas de DENV isoladas, molecularmente caracterizadas e colecionadas no Laboratório de Flavivírus/LABFLA/IOC/FIOCRUZ (CEP 274/05). Estoques de DENV-2 e 3 foram obtidos após amplificação por passagens em cultura de células C6/36 de *Ae. albopictus*. A titulação viral foi realizada através de inoculação de diluições sucessivas dos estoques virais em cultura de C6/36. As culturas de C6/36 foram feitas em garrafas (Cell Culture Flask-Tissue Culture treated- Costar USA, 25cm²) até a formação de uma monocamada confluenta ($2,5 \times 10^6$) de células, contendo 10 mL de meio L-15 Leibovitz (Sigma – USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco-Brl, USA). Após a formação da monocamada, o sobrenadante foi substituído por igual volume de meio L-15 contendo 2% de SFB (manutenção). Após 10 dias de incubação, realizou-se a desassociação da monocamada celular por meio mecânico.

Para a titulação do DENV-2 células C6/36 foram preparadas em tubos de cultivo celular, na concentração de $4,5 \times 10^5$ cel/mL e adicionado 1,5 mL da suspensão celular por tubo, após a confluência da monocamada, em aproximadamente 24h. A titulação foi realizada por meio do ensaio de diluição do método de Reed Muench, onde as amostras virais foram diluídas em série e

inoculadas em monocamadas confluentes. Utilizaram-se diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-11} , o meio foi retirado dos tubos e inoculou-se 100uL da suspensão viral, sendo quatro tubos inoculados para cada diluição seriada. O inóculo foi espalhado pela superfície da cultura, rodando os tubos suavemente a cada 15 min e, incubando durante uma hora em câmara de incubação tipo B.O.D. a 28°C, sem que o inóculo secasse. Após a absorção viral, adicionou-se 1,5 mL do meio L-15 suplementado com 5 ou 2% de SFB e incubou-se em estufa a 28°C. Os tubos foram observados diariamente em microscópio invertido até o aparecimento do ECP.

Após o décimo dia da inoculação (DPI), com auxílio de uma pipeta Pasteur, as células foram raspadas dos tubos, para que as mesmas desprendessem do substrato, deixou-se precipitar e se coletou 25 uL da suspensão celular. O material foi transferido para lâminas devidamente preparadas para imunofluorescência indireta (IFI) (Biolab Merieux, 26 x 76 mm). Através do ensaio de IFI foi avaliada a presença de partículas virais infectantes, empregando-se anticorpo monoclonal específico para o vírus testado (BioManguinhos-Fiocruz, Rio de Janeiro) e Anti-IGg de camundongo conjugado com FITC (Isotiocianato de fluoresceína), produzido em cabras (SIGMA-ALDRICH). Os títulos virais (TCID₅₀) foram calculados de acordo com Reed e Munch (1938).

A titulação do DENV-3 foi realizada por meio da técnica de RT-PCR quantitativo, sistema *TaqMan* (qRT-PCR). Realizou-se a transcrição do RNA viral em cDNA, com posterior amplificação deste, utilizando-se os iniciadores e sondas marcadas com os corantes 3' TR e 5'BHQ-2, específicos para DENV-3, e o kit SuperScript III Platinum OneStepQuantitative RT-PCR (Invitrogen, EUA), conforme descrito por Johnson *et al.* (2005). A quantidade de vírus em cada amostra foi calculada comparando-se os valores de Ct (*Cycle Threshold*) da amostra com o Ct da curva padrão. A determinação da curva padrão foi feita através de uma série de diluições de amostras-padrão de RNA de DENV-3 já tituladas, sendo duas amostras de cada uma das seguintes diluições: 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 .

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas no Line Gene 9600 (Bioer), seguindo-se os seguintes parâmetros de ciclagem: 1 ciclo de 15 min a 50°C, 1 ciclo de 2 min a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C.

4.3. Infecção artificial dos mosquitos com DENV

A infecção artificial foi realizada no Laboratório de Transmissores de Hematozoários da FIOCRUZ-RJ. Utilizaram-se fêmeas de *Ae. aegypti* da cepa *Paea*, segundo metodologia descrita por Rutledge *et al.* (1964).

O processo consistiu no uso de alimentadores de vidro, conectados por mangueira de silicone a um sistema de circulação de água e temperatura constante de 37°C. Acoplado ao alimentador, utilizou-se membrana natural dessalgada de intestino de porco, disponível comercialmente, a fim de simular a superfície pela qual as fêmeas realizam o repasto sanguíneo no vertebrado.

Utilizou-se para o repasto, sangue de carneiro desfibrinado (Laborclin®, cat # 520246) misturado ao sorotipo DENV-2 e DENV-3, independentemente e, solução estimulante de repasto ATP (adenosina trifosfato). O sangue passou previamente por um processo de concentração das hemácias que consistiu em uma lavagem desse material. A lavagem foi realizada da seguinte forma: 12 mL do sangue acondicionado em um tubo (15 mL) foi centrifugado por 15 min a 13.700xg, temperatura ambiente. O sobrenadante resultante (soro) foi então descartado e o tubo foi então preenchido com PBS (pH=7,2) até o volume de 12 mL e, novamente centrifugado por 5 min a 860xg. O processo de lavagem foi repetido cinco vezes, sendo que ao final, o concentrado de hemácias obtidos foi então misturado com PBS até completar o volume de 12 mL.

O repasto sanguíneo foi realizado de acordo com três grupos pré-estabelecidos: i) sangue + ATP + DENV-2, ii) sangue + ATP + DENV-3, iii) sangue + ATP (controle). Para cada grupo i, ii e iii, foram usadas 240 fêmeas no repasto sanguíneo.

Para a infecção com DENV-2 utilizou-se o vírus isolado de mosquito provenientes da quarta passagem em cultura com título viral de $10^{7,66}$ (cepa 935/1274, ano 2012, Genótipo Asiático/Americano) misturados com sangue e ATP nas seguintes proporções: 2 mL sangue de carneiro desfibrinado (Laborclin®, cat # 520246) + 0,5 mL de DENV-2 + 150uL ATP (2,5ug/ μ L).

Para infecção com DENV-3 utilizou-se o vírus de isolado humano provenientes da terceira passagem em cultura com título viral de 10^5 (cepa BR77515/03, ano 2003, Genótipo III) misturados com sangue e ATP nas seguintes

proporções: 2 mL sangue de carneiro desfibrinado (Laborclin ®, cat # 520246) + 1 mL DENV-3 + 150 µL ATP (2,5ug/uL).

Para o controle utilizou-se apenas sangue misturado com ATP nas seguintes proporções: 3 mL sangue de carneiro desfibrinado (Laborclin ®, cat # 520246) + 150uL ATP (2,5ug/µL).

Cada gaiola de infecção, contendo 60 fêmeas de *Ae. aegypti* subdivididas em cada grupo descrito anteriormente (i, ii, iii), foi submetida ao repasto sanguíneo por um período de 20 min. Após esse período, a gaiola era retirada e colocada em gelo para que as fêmeas fossem anestesiadas pelo frio. Posteriormente, as gaiolas de infecção com as fêmeas anestesiadas foram colocadas dentro de uma cabine de segurança biológica fechada, apenas com abertura para as mãos para a triagem e separação das fêmeas totalmente ingurgitadas, ou seja, que atingiram a repleção. Após a triagem, as fêmeas foram mantidas em B.O.D sob condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo (26°C ± 2°C; 70-80%, 12h:12h). Essas fêmeas foram mantidas por um período de 15 dias a base de solução açucarada a 10%.

4.4. Dissecção das glândulas salivares e separação para Biologia Molecular

Após o 15º dia de infecção (DPI) as fêmeas de *Ae. aegypti* pertencentes aos grupos de infecção i (DENV-2), ii (DENV-3) e iii (Controle), foram submetidas a dissecção da glândula salivar para análise de proteína e separação do corpo (tórax e abdômen) para detecção viral pela técnica de Biologia Molecular (RT-PCR). Para cada grupo foram obtidas 30 glândulas, exceto para o grupo controle, para o qual foram extraídas 25 glândulas.

O corpo das fêmeas que tiveram as glândulas salivares individualizadas foi separado individualmente em microtubos previamente esterilizados, identificados e posteriormente acondicionados a -70°C.

A extração das glândulas foi realizada sob microscópio estereoscópico (Zeiss Stemi DV4 32x Binocular) com auxílio de microestiletos entomológicos e lâminas de vidro previamente esterilizadas.

Durante a extração das glândulas salivares, os microestiletos entomológicos foram limpos com etanol absoluto, seguido de etanol 80%, entre cada espécime dissecado. Ainda, cada dissecção foi realizada em lâminas de vidro individualizadas e não reutilizadas, a fim de se evitar contaminação entre as amostras. Ao final da

extração os microestiletos entomológicos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio 10%, seguido de banho em etanol absoluto e etanol 80%.

No momento da dissecação foi utilizada água ultra pura livre de nuclease (Sigma Aldrich, cat # W4502). Após a remoção das glândulas, essas foram acondicionadas dentro de microtubos 1,5 mL estéreis (Kasvi, cat # K6-0150) contendo 50 uL de solução 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma- Aldrich, cat # P7626) inibidora de proteases e armazenadas a -70°C até o seu processamento.

4.5 Extração do RNA viral e transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Para extração do RNA viral, cada mosquito foi macerado individualmente (utilizando homogeneizador) em 300 µL de meio de cultura L-15 Leibovitz's (Gibco, BRL), centrifugado por 15 min a 2.400xg a 4°C. O sobrenadante foi retirado, adicionado em 90 µL de soro fetal bovino e armazenado em freezer -80°C para posterior extração. Todo o processo de maceração foi realizado em gelo.

A extração do RNA viral foi realizada por meio do kit QIAamp® Viral Mini Kit (QIAGEN Inc.,Valencia, CA, cat # 52906), segundo protocolo do fabricante. Os RNAs eluídos foram mantidos em freezer -80°C até serem utilizados.

Os iniciadores (Eurofins Genomics) utilizados seguiram Lanciotti *et al.*, (1992) (Tabela I). Como controle negativo foi utilizado água. Para obtenção do cDNA foi utilizado 25uL de PCR Master Mix 2x (Promega, cat # M7505), 10 µM do Primer D1, 10 µM do Primer D2, 100 mM de DTT (DL-Dithiothreitol) (Sigma-Aldrich, cat # 43815) e 2,5Uµ/L da AMV Reverse Transcriptase (Promega, cat # M5108), totalizando 40uL de mix. Para reação final utilizou-se 10 µL do RNA previamente extraído, totalizando um volume final de reação de 50 µL. A reação de transcriptase reversa foi realizada segundo os seguintes parâmetros: 1 ciclo de 42°C por 60 min, 30 ciclos de 94°C por 35 segundos, 56°C por 1 min, 72°C por 2 min, e 1 ciclo de 72°C por 10 min.

Para a reação do *nested* PCR foi utilizado 10 µL do cDNA, 25 µL de PCR Master Mix 2x (Promega, cat # M7505), 10 µM do Primer D1 e 20 µM dos iniciadores TS1, TS2, TS3 e TS4. A reação de *nested* PCR seguiu os seguintes parâmetros: 18 ciclos de 94°C por 35 segundos, 56°C por 1 min, 72°C por 2 min, e 1 ciclo de 72°C por 10 min.

Para confirmação da amplificação todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, com visualização em corante Gel Red (Biotium, Uniscience cat # 41003).

Tabela I. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de amplificação do DENV e seus respectivos sorotipos, segundo Lanciotti *et al.* (1992).

Iniciadores	Sequência	Tamanho do amplificado (pb)
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'	511
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'	511
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	482
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	119
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	290
TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	392

4.6 Proteômica da glândula salivar

Os experimentos da proteômica foram realizados no Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ-PR, plataforma RPT02H, Espectrometria de Massa - PR.

Os *pools* das 30 glândulas salivares acondicionados em 50 µL de solução 1 mM de PMSF foram submetidos a lise em tampão de amostra MES de acordo com o fabricante (Bio-Rad) por fervura a 100°C, durante cinco min. A amostra foi centrifugada a 20.000xg por 15 min e o sobrenadante coletado e submetido ao processo de fracionamento em gel Bis-Tris 10% (Bio-Rad). A eletroforese foi realizada a 30 mA (miliampères) por um período de duas horas permitindo-se apenas a entrada das proteínas no gel. Na sequência, o gel foi corado por Coomassie R-250 (Bio-rad) e procedeu-se a excisão da região do gel contendo as proteínas que foi descorado com solução de ácido acético (10% ácido acético, 30% metanol). Para a digestão das proteínas presentes no pedaço de gel excisado

utilizou-se tampão de digestão: bi-carbonato de amônio 50 mM (NH₄HCO₃, ABC) associado a solução de tripsina (tripsina 12,5 ng/μL em ABC 50 mM).

Uma vez obtido o conjunto de peptídeos totais procedeu-se a determinação e análise por espectrometria de massas associada à cromatografia líquida com a utilização dos equipamentos LTQ ORBITRAP XL – ETD e UPLC NanoLC-Ultra 1D plus segundo descrito por Batista (2013).

Foram injetados 10 μL (5 μg) de amostra no cromatógrafo Easy-nLC 1000 da Thermo Scientific. A separação dos peptídeos ocorreu com um fluxo de 250 nl/min em fase móvel contendo de 5 a 40% de acetonitrila (ACN), 0,1% de ácido fórmico, 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Utilizou-se um gradiente linear de 5 a 40% de ACN em 120 min. A cromatografia ocorreu em coluna analítica de sílica de 30 cm, com diâmetro interno de 75 μm e partículas de C18 com diâmetro de 1,9 μm aquecida a 60°C. Os peptídeos foram ionizados por *eletrospray* (voltagem de 2,3 kV) e injetados no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific). A análise foi realizada por meio do *Data Dependent Analysis* (DDA) como segue: *scan* inicial no Orbitrap com resolução de 15.000, seguido de seleção dos 10 íons mais intensos, os quais foram fragmentados por dissociação induzida por colisão com gases inertes – *collisionally induced dissociation* (CID) e analisados no equipamento *íon trap*. Paralelamente ao fracionamento dos peptídeos em aminoácidos (MS2), foi realizado um *full scan* no Orbitrap com uma resolução de 60.000. Na seleção dos íons para MS2 foi usada uma lista de exclusão dinâmica de 90 segundos (Batista, 2013).

4.7 Análise dos dados de Proteômica

Os dados brutos (.RAW) originados pelo espectrômetro de massa foram analisados no algoritmo MaxQuant versão 1.5.2.8 a fim de se obter o grupo de proteínas das amostras avaliadas. Para obtenção do grupo de proteínas os dados foram confrontados com sequências de proteínas do DENV-2 (Genbank: JX567951.1), do DENV-3 (Genbank: AY679147) e do mosquito *Ae. aegypti* (UniProt: UP000008820). As tabelas geradas pelo MaxQuant foram analisadas pelo algoritmo Perseus versão 1.5.1.6 utilizando o *LFQ intensity* de cada uma das proteínas identificadas.

Para análise das proteínas removeram-se os contaminantes, reversos e os eventos *only identified by site*. Procedeu-se a logaritmização dos dados e as réplicas biológicas foram então agrupadas sobre uma mesma denominação para realização dos testes estatísticos.

A matriz gerada foi utilizada para análise conforme Diagrama de Venn, que determina e identifica as proteínas exclusivas de cada grupo. Para comparação dos grupos de proteínas entre os grupos de infecção, os dados faltantes (*missing data*) foram substituídos por uma distribuição normal, sobrepondo-se assim a menor sensibilidade do equipamento em detectar as proteínas de menor expressão.

Para análise os grupos de infecção foram comparados dois a dois (Grupo A: controle com DENV-2; Grupo B: Controle com DENV-3; Grupo C: DENV-2 com DENV-3) usando o *Two samples test*, por meio de um teste T com p-valor de 1% de significância ($p < 0,01$). Ainda, com intuito de pormenorizar os dados, a matriz passou por um segundo processo de seleção dos dados por meio do teste de Benjamini-Hochberg com FDR (*false detection rate*) de 0.2 e 0.05.

A anotação das proteínas foi feita realizando uma análise no Blast-p contra as sequências referência, com posterior anotação manual no programa *SwissProt* para obtenção da função molecular, identificação e ontologia da proteína.

5. RESULTADOS

5.1. Infecção artificial dos mosquitos

O percentual de repasto sanguíneo variou de 35% a aproximadamente 52% de fêmeas ingurgitadas. Do total de fêmeas submetidas à infecção artificial (N=720 fêmeas), 315 fêmeas (43,75%) realizaram o repasto sanguíneo e estavam visivelmente ingurgitadas. O percentual de fêmeas completamente ingurgitadas para o grupo i (DENV-2) foi de 44,58% (N=107), para o grupo ii (DENV-3) 51,66% (N=124), e no grupo iii (controle) 35% (N=84) (Tabela II).

Tabela II: Número de fêmeas de *Ae. aegypti* (cepa *Paea*) submetidas à infecção artificial pelos sorotipos virais DENV-2 ou DENV-3.

Grupos	Nº fêmeas submetidas ao repasto sanguíneo	Nº fêmeas ingurgitadas (%)
DENV – 2	240	107 (44,58%)
DENV – 3	240	124 (51,66%)
Controle	240	84 (35%)
Total	720	315 (43,75%)

Legenda: Nº= Número; %= percentual

Fonte: O Autor, 2015.

5.2. Dissecção das glândulas salivares e triagem para Biologia Molecular

Após o período de 15 dias de incubação das fêmeas submetidas à infecção pelos sorotipos 2 e 3 de DENV, procedeu-se a retirada das glândulas salivares. Foram obtidos três *pools* contendo 30 pares de glândula salivar, para cada grupo pré-estabelecido anteriormente (i e ii). Para o grupo controle foram separados três *pools* contendo 25 pares de glândula salivar cada. Dentre as 90 fêmeas utilizadas para remoção da glândula salivar, 60 foram utilizadas para confirmação, ou seja, 20 fêmeas de cada *pool* para validação da infecção por meio de RT-PCR seguida da nested-PCR (Tabela III).

Tabela III: Número de glândulas salivares dissecadas e de indivíduos selecionados para RT-PCR, conforme grupo de infecção.

	Nº glândulas salivares extraídas (nº <i>pools</i> / quantidade glândulas por <i>pool</i>)	Nº indivíduos/ Biologia Molecular
DENV-2	90 (3/30)	60
DENV-3	90 (3/30)	60
Controle	75 (3/25)	60
Total	255	180

Legenda: Nº= Número

Fonte: O Autor, 2015.

5.3 Confirmação da infecção artificial por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Para os mosquitos submetidos ao repasto sanguíneo, o percentual de fêmeas infectadas no grupo i (DENV-2) foi de 35% (N= 21), no grupo ii (DENV-3) 45% (N=27). Os indivíduos do grupo iii (Controle) não positivaram para nenhum sorotipo viral do DENV (Tabela IV).

Tabela IV: Número de fêmeas de *Ae. aegypti* (Cepa *Paea*) positivas para infecção artificial, por meio da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase.

	Nº de indivíduos infectados (%)
DENV 2	21 (35%)
DENV 3	27 (45%)
Controle	0 (0%)

Legenda: Nº= Número; %= percentual

Fonte: O Autor, 2015.

5. 4 Análise Proteômica

5.4.1 Confirmações da infecção pelos sorotipos DENV-2 ou DENV-3 nos *pools* de glândulas salivares

Para confirmar a infecção pelo DENV das glândulas salivares, foi realizado RT-PCR no tórax e abdômen de 20 das 30 fêmeas utilizadas para a proteômica, considerando que as glândulas salivares foram agrupadas em *pool*. Todos os *pools* avaliados positivaram para a presença de DENV. Nos *pools* do DENV-2 esse percentual variou de 13,3% a 36,7% de positividade. Para o DENV-3 a positividade variou entre 3,33% até 53,33%. (Tabela V)

Tabela V: Fêmeas de *Ae. aegypti* (Cepa *Paea*) infectadas por DENV 2 e 3, nos *pools* de glândulas salivares utilizados para as análises de proteômica.

	DENV-2 (N/%)	DENV-3 (N/%)
<i>Pool 1</i>	11 (36,7%)	16 (53,33%)
<i>Pool 2</i>	6 (20%)	10 (33,33%)
<i>Pool 3</i>	4 (13,3%)	1 (3,33%)

Legenda: N^o= Número; %= percentual de fêmeas positivas para infecção por DENV

Fonte: O Autor, 2015.

5.4.2 Determinação do conjunto total de proteínas e análise do Diagrama de Venn

Após a obtenção do arquivo (RAW) advindo do espectrômetro de massa e comparação das proteínas reais e hipotéticas com os proteomas de *Ae. aegypti*, do DENV-2 e DENV-3 no software MaxQuant (versão 1.5.2.8.) obteve-se um grupo de proteínas contendo 1588 proteínas nas amostras avaliadas.

Após a remoção dos contaminantes e reversos, dos eventos *only identified by site* e logaritmização dos dados procedeu-se a primeira análise do grupo de proteínas baseado no Diagrama de Venn calculado com base na presença e ausência de valores em colunas de expressão.

Segundo esta análise, das 1588 proteínas totais existentes, o número de proteínas exclusivas no grupo i (DENV-2) foi de 45 proteínas, no grupo ii (DENV-3) 315 proteínas, e no grupo iii (Controle) 12 proteínas (Tabela VI).

Tabela VI: Determinação do número de proteínas exclusivas em cada grupo de infecção conforme análise pelo Diagrama de Venn.

Grupo	Nº de proteínas exclusivas
DENV-2	45
DENV-3	315
Controle	12

Fonte: O Autor, 2015.

5. 4.3 Proteínas com expressão diferenciada

5.4.3.1 Comparação dos grupos de infecção (teste-t segundo p-valor)

Após análise das amostras com o teste-t segundo p-valor ($p=0.01$), o número de proteínas com expressão diferenciada comparando os grupos foi de 67 proteínas para o grupo A (controle com DENV-2); 131 proteínas para o grupo B (controle com DENV-3); 35 proteínas para o grupo C (DENV-2 com DENV-3) (Tabela VII).

Tabela VII: Número de proteínas com expressão diferenciada entre os grupos de infecção, após teste-t com p-valor.

	Controle	DENV-2	DENV-3
Controle	-		
DENV-2	67	-	
DENV-3	131	35	-

Fonte: O Autor, 2015.

5.4.3.2 Comparação dos grupos de infecção (Benjamini-Hochberg/FDR)

Para refinar a identificação das proteínas com modulação diferenciada entre os grupos (A, B e C) realizou-se o teste-t de Benjamini-Hochberg com FDR de 0,2 para todas as comparações dois a dois, exceto na comparação entre o grupo controle e o DENV-3, onde o FDR foi de 0,05.

Baseado nessa análise o número de proteínas com expressão diferenciada obtido comparando-se os grupos foi de 56 proteínas para o grupo A (controle com DENV-2); 24 proteínas para o grupo B (controle com DENV-3); 5 proteínas para o grupo C (DENV-2 com DENV-3) (Tabela VIII).

As proteínas com modulação diferenciada entre os grupos, após teste de Benjamini-Hochberg estão listadas nos Anexos I a III.

Tabela VIII: Número de proteínas com expressão diferenciada entre os grupos de infecção, após teste de Benjamini-Hochberg.

	Controle	DENV-2	DENV-3
Controle	-		
DENV-2	56	-	
DENV-3	24	5	-

Fonte: O Autor, 2015.

5. 4. 4 Identificação das principais proteínas e suas possíveis funções biológicas

No que concerne à identificação e caracterização de possíveis funções das proteínas optou-se por trabalhar com o grupo de proteínas com expressão diferenciada advindas do teste-t segundo Benjamini-Hochberg com FDR de 0,2 e 0.05. A anotação das proteínas está descrita nos Anexos de I a III.

Foram anotadas e classificadas 85 proteínas nas amostras avaliadas, sendo que dessas, quatro proteínas foram encontradas em mais de um dos grupos de comparação. Três proteínas se repetiram no grupo de comparação A (Controle x DENV-2) com o Grupo B (Controle x DENV-3) e, uma proteína se repetiu entre o Grupo B (Controle x DENV-3) e o Grupo C (DENV-2 x DENV-3) (Tabela IX).

Após a identificação das proteínas de cada um dos grupos de comparação (Grupo A ao Grupo C) foi possível o agrupamento das proteínas em cinco categorias funcionais: Metabolismo Básico (MET), Transporte (TRANS), Replicação, Transcrição e Tradução (RTT), Funções diversas (DIV) e Função desconhecida (DES). Dentre a classificação das proteínas, as relacionadas ao MET foram as mais abundantes tanto no conjunto total analisado, quanto nos três grupos de comparação, com o mesmo padrão se repetindo para proteínas de função desconhecida (DES). O grupo de comparação C foi o que apresentou a menor quantidade de classes funcionais (Fig. 01)

Tabela IX: Proteínas repetidas entre os agrupamentos de comparação estatística segundo as análises do teste-t de Benjamini-Hochberg.

	Grupo A (Cont x DENV-2)	Grupo B (Cont x DENV-3)	Grupo C (DENV-2 x DENV-3)
Grupo A (Cont x DENV-2)	-		
Grupo B (Cont x DENV-3)	J9HS73 / Q17BZ3 / Q1HR88*	-	
Grupo C (DENV-2 x DENV-3)	Q16R13		-

Legenda: (*)=proteínas já caracterizadas e identificadas da glândula salivar de *Ae. aegypti*,
Cont=controle. Proteínas identificadas segundo UniProt ID.

Fonte: O Autor, 2015.

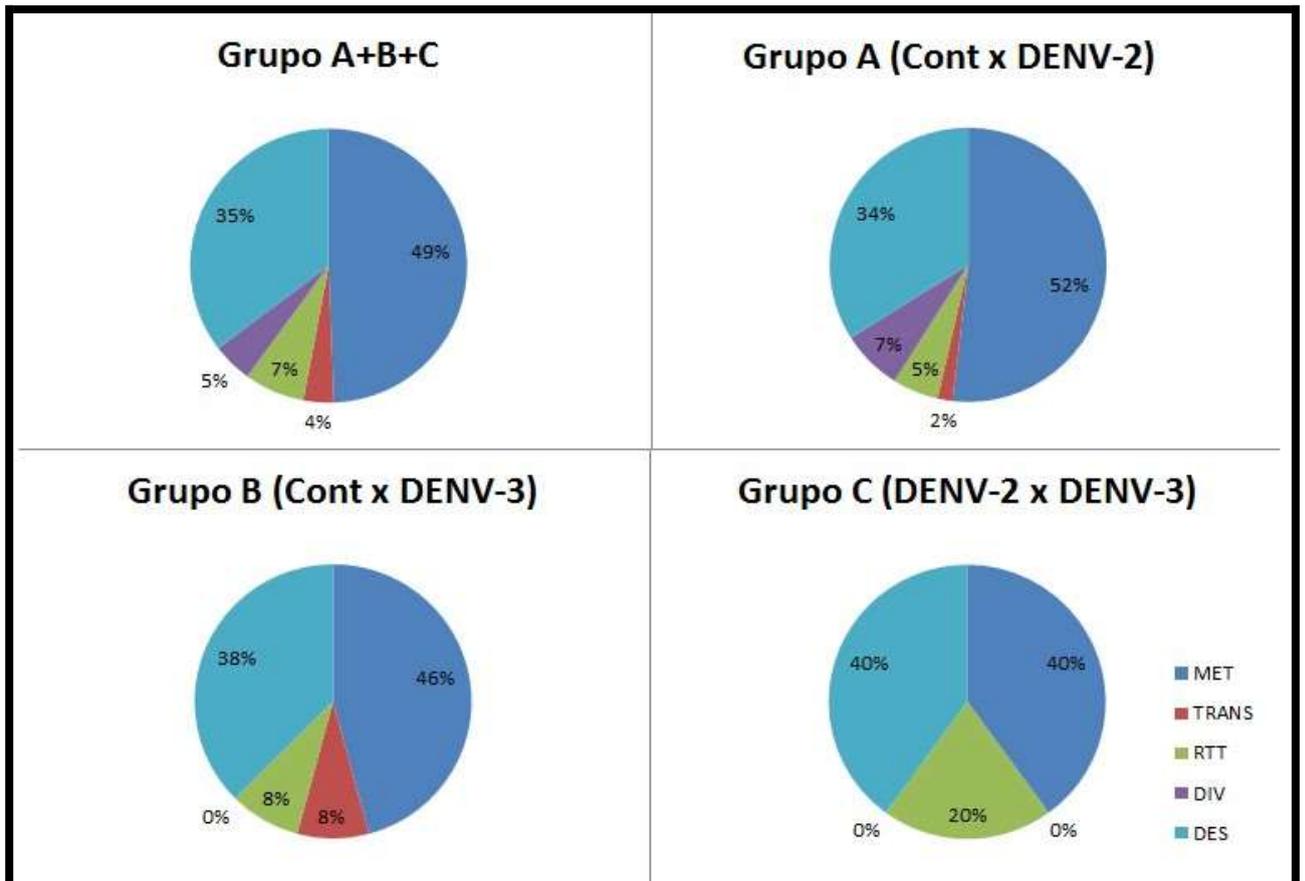


Figura 01: Distribuição das classes funcionais de proteínas identificadas no conjunto total avaliado e nos três diferentes grupos de comparação. Cont= Controle; MET= Metabolismo Básico; TRANS= Transporte; RTT= Replicação, Transcrição e Tradução; DIV= Funções Diversas; DES= Função Desconhecida.

Fonte: O Autor, 2015.

5. 4. 5 Identificação e comparação dos resultados com proteínas descritas na literatura sobre a glândula salivar de *Ae. aegypti* infectada e não infectada

Após comparação com os dados referentes aos estudos de proteínas da glândula salivar de *Ae. aegypti* infectados artificialmente, ou não, com sorotipos do DENV, verificou-se que dentre as 85 proteínas identificadas e anotadas no presente estudo, 15 delas marcadas com (*) nos Anexos de I a III, já haviam sido descritas e relatadas em pesquisas envolvendo a glândula salivar provenientes de fêmeas não infectadas (James et al, 1991; Champagne, et al., 1995; Ribeiro, et al., 2007; Almeras et al, 2010). No que se refere aos estudos envolvendo infecção pelo DENV, das 85 proteínas identificadas neste trabalho, 20 (UniProt IDs: P49128, P50635,

Q16V48, Q16VL4, Q177P7, P18153, Q16RS6, Q17G63, Q17HE1, B0FWC7, Q16Q68, Q16TI5, Q171D1, Q175A4, Q1HQV6, Q179J9, Q0IEU1, Q16VZ4, Q173P6, Q1HRJ5) marcadas em negrito nos Anexos I a III, já haviam sido descritas previamente em estudos de infecção artificial utilizando o DENV-2 (Tchankouo-Nguetcheu, *et al.*, 2010; Wasinpiyamongkol, *et al.*, 2012; Sim, *et al.*, 2012; Chisenhall, *et al.*, 2014 a, b) (Anexos I a III).

O maior número dessas proteínas diferencialmente expressas, já descritas previamente em estudos de infecção com DENV-2, foi encontrado nos grupos A (controle x DENV-2) e B (controle x DENV-3).

Ainda, a grande maioria das proteínas identificadas pertence ao metabolismo celular: oxidases, sintetases, desidrogenases e oxidorredutases, sendo as duas últimas principalmente relacionadas ao NADH.

Além das proteínas do metabolismo celular, foram identificadas proteínas com acentuada participação nas funções digestivas e de repasto sanguíneo: uma apirase (Uniprot ID: P50635), uma alpha-amilase (Uniprot ID: Q16VL4), uma chimotripsina (Uniprot ID: Q16V48) e duas Serpina (Uniprot ID: Q17G63 e Q17HE1); e proteínas estruturais envolvidas na função de resposta imune: actina (Uniprot ID: P49128) e fibrinogênio e fibronectina (Uniprot ID: Q17NB9).

6. DISCUSSÃO

Após a realização da infecção artificial das fêmeas de *Ae. aegypti*, obteve-se um percentual de positividade para repasto sanguíneo de aproximadamente 44% no conjunto total. No que se refere aos grupos de infecção, o maior percentual de repasto sanguíneo foi alcançado no grupo submetido à infecção com DENV-3, seguido do DENV-2.

No que tange aos dados de infecção, pode-se perceber que as taxas de infecção pelo DENV não atingiram 50% dos mosquitos avaliados, apesar de ambos os genótipos do DENV utilizados nesse trabalho, DENV-3 genótipo III e DENV-2 genótipo Americano/Ásiático, já terem sido incriminados como causadores de epidemias severas.

Outro estudo, utilizando a mesma população de laboratório (Cepa *Paea*) alcançaram taxas superiores a 80% em experimentos de infecção artificial em infecções realizadas com o sorotipo DENV-2 (Lourenço de Oliveira *et al.*, 2004). Contudo, apesar da baixa taxa de infecção encontrada no presente trabalho para esta linhagem de mosquitos, as taxas de infecção foram próximas entre os grupos de infecção testados, totalizando 35% para grupo i (DENV-2) e 45% para o grupo ii (DENV-3).

Uma possível explicação para esta baixa taxa de infecção pode ser atribuída a manutenção da colônia de laboratório de *Ae. aegypti* (Cepa *Paea*) ao longo de muitas gerações, afetando a competência vetorial devido a eventos de deriva genética aleatória e seleção (Armstrong & Rico-Hesse, 2001). A fim de se reverter tal situação, se faz necessário a obtenção de amostras da mesma linhagem de mosquitos provenientes de outro laboratório, uma vez que a deriva genética e a seleção natural ocorrem de maneira diferenciada em colônias de outros laboratórios. Para as análises de proteômica da glândula salivar, até o momento, todos os estudos têm focado no uso de *pool* de glândulas salivares, uma vez que a concentração de proteínas totais aproximada para cada par de glândulas é de 1µg (Fontaine *et al.*, 2011). Dessa, forma optou-se pelo uso de *pool* de glândulas para aumentar a concentração de proteínas e, assim, permitir a sua identificação.

No que concerne à taxa de infecção das glândulas salivares, esse percentual de positividade variou de 13% a 36% nos *pools* contendo glândulas infectadas com DENV-2 e, de 3% a 53% nos *pools* contendo glândulas infectadas com DENV-3.

Apesar da alta variação existente entre as amostras avaliadas, todas apresentavam partículas do DENV. Vale ressaltar, que das 30 glândulas separadas em cada um dos *pools*, apenas o corpo de 20 fêmeas foram analisados para confirmação da infectividade pelo DENV, de tal forma que a positividade para partículas virais, pode ser maior que o encontrado nestas amostras.

Como mencionado previamente, mosquitos infectados por arbovírus apresentam modulação nas proteínas da glândula salivar e modificação nas classes de proteínas (Wasinpiyamongkol *et al.*, 2012; Chisenhall *et al.*, 2014a b). Sendo assim, a identificação de proteínas com modulação diferenciada e específica em relação ao sorotipo responsável pela infecção, tem especial interesse na disseminação do vírus e epidemiologia da dengue. Uma das maneiras de avaliação e determinação do grupo de proteínas específicas em cada grupo de infecção é dada pela análise do Diagrama de Venn. Nessa análise verificou-se que o grupo com o maior número de proteínas exclusivas foi o grupo ii (DENV-3), seguido do grupo i (DENV-2) e, grupo iii (Controle). Essa diferença no número de proteínas exclusivas pode advir do fato da eficiência da infecção observada pelos sorotipos virais uma vez que a maior ou menor presença das partículas virais, ou mesmo a sua ausência no grupo controle, pode refletir na alteração da expressão de proteínas estruturais, secretadas e/ou metabólicas.

Apesar do Diagrama de Venn representar uma ideia geral do conjunto de proteínas em questão, tal análise é superficial e serve apenas como ilustração, uma vez que os dados não foram submetidos a uma análise estatística específica para se determinar as proteínas, e nem leva em consideração as limitações técnicas do equipamento no que concerne a identificação de proteínas com menor expressão no conjunto analisado.

Sendo assim, a fim de avaliar e comparar a intensidade e a presença de proteínas estatisticamente, a tabela foi filtrada para substituição dos *missing data*, por uma distribuição normal, sobrepondo-se assim a limitação do equipamento em detectar proteínas de baixa expressão. Após essa correção foi possível realizar o teste-t usando como padrão estatístico o p-valor ($p=0,01$), obtendo a partir dessa análise um total de 233 proteínas diferencialmente expressas no conjunto total das 1588 proteínas identificadas. Pode-se verificar que o número de proteínas com expressão diferenciada entre os grupos variou de 35 a 131 proteínas, sendo que o maior número de proteínas identificadas foi detectado no grupo de comparação B

(Controle x DENV-3), e o menor número de proteínas identificadas no grupo C (DENV-2 x DENV-3). Curiosamente, o grupo C é o que apresentaria o maior número de partículas virais, de tal forma a se esperar que tivesse maior número de proteínas diferencialmente expressas. Ainda, quando se comparam os grupos contendo o controle, o grupo A (Controle x DENV-2) apresentou menos proteínas que o grupo B, apesar de apresentar um título viral 100 vezes maior.

Em virtude da variação existente entre as réplicas biológicas usadas (*pools* das glândulas salivares), na análise de proteômica optou-se pela realização de um teste-t segundo o procedimento de Benjamini-Hochberg para se controlar as taxas de falsa detecção (FDR) nas amostras analisadas. O FDR representa a proporção esperada de hipóteses que são rejeitadas por engano, ele consiste em um método mais preciso para correção dos dados, quando comparado a correção de Bonferroni (Benjamini & Hochberg, 1995).

Avaliando-se os dados após o teste t de Benjamini-Hochberg verificou-se novamente um menor número de proteínas no agrupamento C e, um maior número de proteínas no grupo A, ao invés do grupo B. Tal fato decorre do FDR utilizado para filtrar a tabela no grupo B ser igual a 0.05, ao passo que para o grupo A o FDR foi igual a 0,2. Sendo assim, a análise mais restritiva utilizada acabou por diminuir o número de proteínas diferencialmente expressas no grupo B.

Ainda, sabe-se que mosquitos alimentados em sangue não infectado expressam diferentes conjuntos de proteínas quando comparados aos mosquitos alimentados com sangue infectado (Wasinpiyamongkol *et al.*, 2012). Choumet e colaboradores (2007) sugerem que a diferença no nível de expressão das proteínas pode ser devido a um processo extensivo de modificações pós-traducionais nas proteínas dos grupos de mosquitos infectados.

Outro fator que deve ser avaliado quando se verificam o número de proteínas em estudos da glândula salivar, são os métodos usados para quantificação e identificação dessas proteínas. Muitos dos artigos publicados envolvendo a quantificação e identificação de proteínas da glândula salivar utilizam metodologias *high-throughput* baseadas em avaliação de transcriptoma com posterior inferência sobre o proteoma, de tal forma a se identificar e inferir um grande número de proteínas (Valenzuela *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2006; Arca *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Dixit *et al.*, 2009; Juhn *et al.*, 2011; Sim *et al.*, 2012). Em contrapartida, quando se utilizam outras técnicas clássicas de proteômica da

glândula salivar, onde o órgão em si é usado para a quantificação direta das proteínas e, o número de proteínas identificadas e, classificadas é menor (Moreira *et al.*, 2001; Kalume *et al.*, 2005; Almeras *et al.*, 2009; Wasinpiyamongkol *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Chisenhall *et al.*, 2014 a, 2014b). Sendo assim, às modificações pós-traducionais e a metodologia utilizada podem ser responsáveis pela variação no número de proteínas observadas entre os diferentes grupos de infecção.

No que se refere à identificação de proteínas realizou-se a anotação de 85 proteínas, com quatro delas se repetindo em diferentes grupos de comparação. Ainda, do conjunto total de proteínas identificadas e anotadas, 35 destas, aproximadamente 42%, já foram descritas em outros artigos (James *et al.*, 1991; Champagne *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 2007; Almeras *et al.*, 2010; Tchankouo- Nguetcheu *et al.*, 2010; Wasinpiyamongkol *et al.*, 2012; Sim *et al.*, 2012; Chisenhall *et al.*, 2014 a,b). Dentre essas 35 proteínas identificadas, muitas apresentam função bem caracterizada sobre seu papel na fisiologia do repasto sanguíneo e/ou infecção pelos vírus do dengue.

Dentre as proteínas identificadas, a apirase, as serpinas, a chimotripsina e a alpha-amilase são apontadas como participantes nos processos de digestão e facilitação do repasto sanguíneo (Champagne *et al.*, 1995; Sim *et al.*, 2012; Wasinpiyamongkol *et al.*, 2012; Chisenhall *et al.*, 2014b).

Quanto à identificação de proteínas relacionadas à infecção pelos sorotipos do dengue, foi possível a identificação tanto de proteínas não descritas até o momento na literatura, quanto de proteínas já relacionadas a eventos de infecção pelo DENV. Dentre as proteínas já descritas e que confirmam a modulação diferenciada na glândula salivar infectada destacam-se as proteínas envolvidas no metabolismo celular, em especial as NADH desidrogenases, NADH oxidoredutase, citocromo-c oxidase e ATP sintase. Essas classes de proteínas são apontadas como ocorrendo principalmente na membrana celular, membrana essa que acaba por ser rompida durante a replicação viral, havendo assim diminuição na expressão dessas classes de proteínas. Ainda, além das proteínas de membrana, as proteínas estruturais aqui identificadas, troponina-T e actina, também são descritas como apresentando regulação diferenciada frente a uma infecção pelo DENV, devido a esse mesmo rompimento celular durante a replicação viral (Chisenhall *et al.*, 2014a).

Conjuntamente às proteínas de membrana e estruturais, proteínas relacionadas à função de imunidade inata no vetor foram também caracterizadas e identificadas

dentre elas, uma AMP ligase dependente e fibrinogênio e fibronectina (Sim *et al.*, 2012).

Apesar de aproximadamente 42% das proteínas já terem sido descritas e relacionadas às funções específicas na fisiologia do repasto sanguíneo e/ou infecção pelos vírus do dengue, há ainda um percentual de aproximadamente 58% de proteínas ainda não correlacionadas a nenhuma função específica e definida. Em virtude disso, essas proteínas se revestem de especial interesse para futuros estudos de caracterização biológica uma vez que podem elucidar novos aspectos relacionados à replicação viral no vetor e possivelmente na epidemiologia da dengue.

7. CONCLUSÃO

- Verificou-se uma taxa de infecção de 45% para o DENV-3 e de 35% para o DENV-2.
- A análise proteômica das glândulas salivares de fêmeas de *Ae.aegypti* infectadas revelou proteínas já descritas na literatura.
- Foram observadas novas proteínas na análise da proteômica das glândulas salivares infectadas com DENV, cuja funções e caracterizações biológicas e fisiológicas podem estar envolvidas em vários processos, dentre os quais o de replicação e disseminação viral.
- O estudo conjunto da infecção por meio da biologia molecular e proteômica da glândula salivar podem figurar como técnicas importantes no estudo da replicação e disseminação do DENV, com implicação direta na epidemiologia da doença.

8. PERSPECTIVAS

O presente trabalho permitiu a identificação de proteínas já conhecidas e outras novas que podem ser alvo de futuros estudos para melhor entendimento das funções biológicas dessas moléculas. Ainda, o estudo mais aprofundado dessas proteínas podem elucidar aspectos relacionados à replicação viral do DENV nos insetos vetores, com implicação direta sobre a epidemiologia da doença.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADER, Daniel B. et al. Modulation of dengue virus infection of dendritic cells by *Aedes aegypti* saliva. **Viral immunology**, v. 17, n. 2, p. 252-265, 2004.
- ALMERAS, L. et al. Sialome individuality between *Aedes aegypti* colonies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 5, p. 531-541, 2009.
- ALMERAS, Lionel et al. Salivary gland protein repertoire from *Aedes aegypti* mosquitoes. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 4, p. 391-402, 2010.
- ALTO, Barry W. et al. Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, n. 1633, p. 463-471, 2008a.
- ALTO, Barry W.; REISKIND, Michael H.; LOUNIBOS, L. Philip. Size alters susceptibility of vectors to dengue virus infection and dissemination. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, n. 5, p. 688-695, 2008b.
- ANDERSON, Jennifer M. et al. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. **BMC genomics**, v. 7, n. 1, p. 52, 2006.
- ANDERSON, Justin R.; RICO-HESSE, Rebeca. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 5, p. 886-892, 2006.
- ARAÚJO, Fernanda Montenegro de Carvalho et al. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 925-928, 2006.
- ARCA, Bruno et al. An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 2, p. 107-127, 2007.
- ARMSTRONG, Philip M.; RICO-HESSE, Rebeca. Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 1, n. 2, p. 159-168, 2001.
- BARBOSA JR, da Silva J. et al. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. **Epidemiological bulletin**, v. 23, n. 1, p. 3-6, 2002.

- BARRETO, Maurício L.; TEIXEIRA, Maria Glória. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.
- BATISTA, Michel. **Efeito da depleção de MAP-Kinases em Trypanosoma brucei**. Tese (Doutorado), Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, 2013.
- BENJAMINI, Yoav; HOCHBERG, Yosef. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, p. 289-300, 1995.
- CARROLL, I. Dale; TOOVEY, Stephen; VAN GOMPEL, Alfons. Dengue fever and pregnancy—A review and comment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n. 3, p. 183-188, 2007.
- Cartilha dengue 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/flash/cartilha_dengue.html. Acesso em 11/10/2012. Acessado em: 12/10/2012.
- CASTRO, Márcia Gonçalves de et al. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 809-814, 2004.
- CECÍLIO, A. B. et al. Natural vertical transmission by *Stegomyia albopicta* as dengue vector in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 1, p. 123-127, 2009.
- CHAMPAGNE, Donald E. et al. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 3, p. 694-698, 1995.
- CHARAN, Shakti S. et al. Comparative analysis of midgut bacterial communities of *Aedes aegypti* mosquito strains varying in vector competence to dengue virus. **Parasitology research**, v. 112, n. 7, p. 2627-2637, 2013.
- CHISENHALL, Daniel M. et al. Effect of dengue-2 virus infection on protein expression in the salivary glands of *Aedes aegypti* mosquitoes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 3, p. 431-437, 2014a.
- CHISENHALL, Daniel M. et al. Infection with dengue-2 virus alters proteins in naturally expectorated saliva of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 252, 2014b.

- CHOUMET, Valérie et al. The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the Plasmodium life cycle: a global proteomic study. **Proteomics**, v. 7, n. 18, p. 3384-3394, 2007.
- CLYDE, Karen; KYLE, Jennifer L.; HARRIS, Eva. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of virology**, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.
- COLOGNA, Raymond; ARMSTRONG, Philip M.; RICO-HESSE, Rebeca. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. **Journal of virology**, v. 79, n. 2, p. 853-859, 2005.
- CONSOLI, Rotraut AGB; DE OLIVEIRA, Ricardo Lourenço. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 1994.
- COSTA-RIBEIRO, Magda Clara Vieira. **Variabilidade genética de *Aedes (Stegomyia) aegypti* no Brasil**. 2006. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz.
- DIXIT, Rajnikant et al. Salivary gland transcriptome analysis during *Plasmodium* infection in malaria vector *Anopheles stephensi*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 636-646, 2009.
- FANSIRI, Thanyalak et al. Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses. **PLoS genetics**, v. 9, n. 8, p. e1003621, 2013.
- FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.
- FONTAINE, A. et al. Mosquito salivary gland protein preservation in the field for immunological and biochemical analysis. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 33, 2011.
- FORATTINI, Oswaldo Paulo. Culicidologia Médica. Vol. 2: Identificação. **Biologia, Epidemiologia. ISBN**, v. 85, n. 314, p. 0699, 2002.
- FRIED, Jessica R. et al. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. 2010.
- GUBLER, D. J. et al. A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 34, n. 1, p.1 170-173, 1985.

- GUBLER, Duane J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002
- GUBLER, Duane J. et al. Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 28, n. 6, p. 1045-1052, 1979.
- HANLEY, Kathryn A. et al. Superior infectivity for mosquito vectors contributes to competitive displacement among strains of dengue virus. **BMC ecology**, v. 8, n. 1, p. 1, 2008.
- HEALTH/SCIENCEMAG, 2013. First New Dengue Virus Type in 50 Years. Disponível em: <http://news.sciencemag.org/health/2013/10/first-new-dengue-virus-type-50-years>. Acessado em: 27/10/2013.
- JAMES, Anthony A. et al. Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, *Aedes aegypti*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 44, n. 2, p. 245-253, 1991.
- JARIYAPAN, Narissara et al. Salivary gland proteins of the human malaria vector, *Anopheles dirus* B (Diptera: Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 1, p. 5-10, 2007.
- JOHNSON, Barbara W.; RUSSELL, Brandy J.; LANCIOTTI, Robert S. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 10, p. 4977-4983, 2005.
- JOSHI, Vinod; MOURYA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 67, n. 2, p. 158-161, 2002.
- JUHN, Jennifer et al. Spatial mapping of gene expression in salivary glands of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Parasit Vectors**, v. 4, n. 1, 2011.
- KALUME, Dário E. et al. A proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles gambiae* mosquito. **Proteomics**, v. 5, n. 14, p. 3765-3777, 2005.
- KOW, Chung Youne; KOON, Lim Loo; YIN, Pang Fung. Detection of dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 4, p. 475-479, 2001.

- LAMBRECHTS, Louis et al. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. **BMC evolutionary biology**, v. 9, n. 1, p. 160, 2009.
- LANCIOTTI, Robert S. et al. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 1, p. 65-76, 1994.
- LE GOFF, Gilbert et al. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia. **Parasite: journal de la Société Française de Parasitologie**, v. 18, n. 3, p. 277, 2011.
- LIMA-CAMARA, Tamara N. et al. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17690, 2011.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 43-54, 2004.
- LUPLERTLOP, Natthanej et al. Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following infection with dengue virus. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 1, p. e1001252, 2011.
- MACIEL-DE-FREITAS, Rafael et al. The influence of dengue virus serotype-2 infection on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) motivation and avidity to blood feed. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e65252, 2013.
- MACIEL-DE-FREITAS, Rafael; KOELLA, J. C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo. Lower survival rate, longevity and fecundity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) females orally challenged with dengue virus serotype 2. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 452- 458, 2011.
- MARTINS, Victor Emanuel Pessoa et al. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41386, 2012.
- MESSINA, Jane P. et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 3, p. 138-146, 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - Boletim Epidemiológico, vol 45, nº26/2014 - Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/outubro/27/BE-2014-45--26----Dengue-SE41-e-CHIKV-SE42.pdf>. Acessado em: 25/11/2014.

- MOREIRA, Cristina K. et al. Analysis of salivary gland proteins of the mosquito *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 5, p. 763-767, 2001.
- NATAL, Delsio. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 205-207, 2002.
- NENE, Vishvanath et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007.
- NOGUEIRA, Rita MR; EPPINGHAUS, Ana LF. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 255-256, 2011.
- NORMILE, Dennis. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 415-415, 2013.
- PEPIN, Kim M.; LAMBETH, Kalli; HANLEY, Kathryn A. Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus. **BMC microbiology**, v. 8, n. 1, p. 28, 2008.
- PLATT, Kenneth B. et al. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 57, n. 2, p. 119-125, 1997.
- PONTES, Ricardo JS; RUFFINO-NETTO, Antonio. Dengue in urban locality of Southeastern, Brazil: epidemiological aspects. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 218-227, 1994.
- PRATES, Deboraci Brito et al. Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. **Journal of Medical entomology**, v. 45, n. 3, p. 409-413, 2008.
- QUINTERO-GIL, Diana C et al. Differential replication of dengue virus serotypes 2 and 3 in coinfections of C6/36 cells and *Aedes aegypti* mosquitoes. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, p. 876-884, 2014.
- REED, I. J.; MUNCH, H. Toxicity studies on experimental animals. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 27, p. 493-8, 1938.
- RIBEIRO, A. F. et al.. Associação entre incidência de dengue e variáveis climáticas. **Revista de Saúde Pública** v.40, n.4, p. 671-676, 2006.
- RIBEIRO, José MC et al. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti**. **BMC genomics**, v. 8, n. 1, p.6, 2007.

- RIBEIRO, José MC et al. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 6, p. 543-563, 2004.
- RODENHUIS-ZYBERT, Izabela A.; WILSCHUT, Jan; SMIT, Jolanda M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and molecular life sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773-2786, 2010.
- RUTLEDGE, L. C.; WARD, R. A.; GOULD, D. J. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. **Mosquito News**, v. 24, n. 4, p. 407-419, 1964.
- SALAZAR, Ma Isabel et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC microbiology**, v. 7, n. 1, p. 9, 2007.
- SILVA, Francinaldo S. A importância hematofágica e parasitológica da saliva dos insetos hematófagos. **Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 3, n. 3, p. 4, 2009.
- SIM, Shuzhen; DIMOPOULOS, George. Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. **PLoS one**, v. 5, n. 5, p. e10678, 2010.
- SIM, Shuzhen; RAMIREZ, José L.; DIMOPOULOS, George. Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 3, p. e1002631, 2012.
- SIMON, Fabrice; SAVINI, Hélène; PAROLA, Philippe. Chikungunya: a paradigm of emergence and globalization of vector-borne diseases. **Medical Clinics of North America**, v. 92, n. 6, p. 1323-1343, 2008.
- SIRIYASATIEN, M. D.; KRAIVICHIAN, Kanyarat; SURANG NUCHPRAYOON, M. D. Decrease of mosquito salivary gland proteins after a blood meal: an implication for pathogenesis of mosquito bite allergy. **J Med Assoc Thai**, v. 88, n. 4, p. S255-9, 2005.
- SURASOMBATPATTANA, Pornapat et al. *Aedes aegypti* saliva contains a prominent 34-kDa protein that strongly enhances dengue virus replication in human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 1, p. 281-284, 2014.
- SYLVESTRE, Gabriel; GANDINI, Mariana; MACIEL-DE-FREITAS, Rafael. Age-dependent effects of oral infection with dengue virus on *Aedes aegypti* (Diptera:

- Culicidae) feeding behavior, survival, oviposition success and fecundity. **PLoS one**, v. 8, n. 3, p. e59933, 2013.
- TAKAHASHI, Lucy Tiemi et al. Mathematical models for the *Aedes aegypti* dispersal dynamics: travelling waves by wing and wind. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 67, n. 3, p. 509-528, 2005.
- TAUIL, Pedro Luiz. Critical aspects of dengue control in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.
- TCHANKOUO-NGUETCHEU, Stéphane et al. Differential protein modulation in midguts of *Aedes aegypti* infected with chikungunya and dengue 2 viruses. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13149, 2010.
- TEIXEIRA, Maria Glória et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p. S7-S18, 2009.
- VALENZUELA, Jesus G. et al. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 7, p. 717-732, 2003.
- VARGAS, Ronald Enrique Morales et al. Climate associated size and shape changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Thailand. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 4, p. 580-585, 2010.
- VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Emergência do vírus Chikungunya: risco de introdução no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 9-10, 2014.
- VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.
- VAUGHN, David W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 2-9, 2000.
- VAZEILLE, Marie et al. Oral receptivity of *Aedes aegypti* from Cape Verde for yellow fever, dengue, and chikungunya viruses. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 1, p. 37-40, 2013.
- WASINPIYAMONGKOL, Ladawan et al. Protein expression in the salivary glands of dengue-infected *Aedes aegypti* mosquitoes and blood-feeding success. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 43, n. 6, p. 1346, 2012.

WHO – World Health Organization. 2012. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acessado em: 22/02/2015.

XI, Zhiyong; RAMIREZ, Jose L.; DIMOPOULOS, George. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 7, p. e1000098, 2008.

ZHANG, Meichun et al. Differential proteomics of *Aedes albopictus* salivary gland, midgut and C6/36 cell induced by dengue virus infection. **Virology**, v. 444, n. 1, p. 109-118, 2013.

10. Anexos

Anexo I: Proteínas com expressão diferenciada no Grupo A (Controle x DENV-2) segundo teste-t de Benjamini-Hochberg.

Classe Funcional	Protein ID Uniprot	Nome	Gene	Gene Ontology ID	Função Molecular	p-valor	Score
Metabolismo Básico (MET)	P49128	actina	ACT-1	GO:0005524	Ligante de ATP	0.00014190	2
	P50635*	apirase, putativo	APY	GO:0005524 / GO:0016788 / GO:0046872	Ligante de ATP / atividade de hidrolase, agindo em ligações do tipo éster/ ligante de ion metálico	0.00485266	5
	Q16HW7	Glucosamina-6-fosfato isomerase	Gnpda1	GO:0004342 / GO:0016787	atividade deaminase da glucosamina-6-fosfato / atividade de hidrolase	0.00013208	3
	Q17DT0	E1 enzima ativadora de ubiquitina	AAEL004076	GO:0005524 / GO:0003824 / GO:0046872	ligante de ATP / atividade catalítica / ligante de ion metálico	0.00494575	2
	Q0IFN2	fator de alongamento da tradução eucariótica	AAEL004500	GO:0003924 /GO:0005525	Atividade de GTPase / ligante de GTP	0.00166327	1
	Q16F58	citocromo P450	CYP6BB2	GO:0020037 / GO:0004497 / GO:0005506 / GO:0016705	ligante de grupamento Heme / atividade de monooxygenase / ligante de ion ferro / atividade de oxidoreductase, sob doadores emparelhados, com incorporação ou redução do oxigênio molecular	0.00369635	1
	Q16GJ0	proteína hipotética	AAEL014367	GO:0005044 / GO:0004252	atividade do receptor scavenger / atividade de endopeptidase do tipo serina	0.00191114	1
	Q16H01	6-fosfogluconolactonase	AAEL014204	GO:0017057	Atividade de 6 fosfogluconolactonase	0.00532862	1

Q16V48	quimotripsina 1	AAEL009680	GO:0004252	atividade de endopeptidase do tipo serina	0.00230081	1
Q16VL4	alfa-amilase	AAEL009524	GO:0003824 / GO:0043169	atividade catalítica / ligante de cátions	0.00171024	1
Q16XK7	proteína de ligação ao cálcio, putativo	AAEL008844	GO:0005509	ligante de ion cálcio	0.00360279	1
Q173T1	redutase pirrolina-5-carboxilato	AAEL007033	GO:0004735	atividade redutase da pirrolina-5-carboxilato	0.00205199	2
Q173V3	citocromo P450	CYP6AG3	GO:0020037 / GO:0004497 / GO:0005506 / GO:0016705	ligante de grupamento Heme / atividade de monooxygenase / ligante de ion ferro / atividade de oxidoreductase, sob doadores emparelhados, com incorporação ou redução do oxigênio molecular	0.00530315	1
Q177P7	methylenetetrahydrofolate desidrogenase	AAEL006085	GO:0005524 / GO:0004488 / GO:0004329	ligante de ATP / atividade de methylenetetrahydrofolate desidrogenase (NADP +) / atividade ligase do formato-tetrahydrofolate	0.00320873	1
Q17BZ3	Isomerase 3,2-trans-enoil-CoA, mitocondrial	AAEL004755	GO:0003824	atividade catalítica	0.00040971	1
Q17DM8	aldo-ceto redutase	AAEL004102	GO:0016491	atividade de oxidoreductase	0.00085038	1
Q17GK8	sarcalumenin	AAEL002971	GO:0003924 / GO:0005525	Atividade de GTPase / ligante de GTP	0.00267055	1
Q17LW8	treonil-tRNA sintetase	AAEL001206	GO:0005524 / GO:0004829	Ligação de ATP / ligante de treonina-tRNA	0.00509216	1
Q17M83	AMP-ligase coa dependente	AAEL001128	GO:0003824	atividade catalítica	0.00286525	1

	Q1HQR4*	proteína ras-relacionados Rab-11A-like X1 isoform	AAEL009317	GO:0005525	ligante de GTP	0.00287702	1
	Q1HQU9*	Precursor proteína dissulfeto isomerase-A6	AAEL010065	GO:0016853	atividade de isomerase	0.00021129	1
	Q1Hqw1*	proteína hipotética	AAEL007236	GO:0008168	atividade de metiltransferase	0.00146044	1
	Q1HRP6*	peptidil-prolil cis-trans isomerase (ciclofilina)	AAEL013279	GO:0003755	atividade de isomerase de peptidil-prolil cis-trans	0.00447983	2
	Q1HRQ4*	microsomal peptidase sinal 23 kd subunidade (spc22 / 23)	AAEL000947	GO:0008233	atividade de peptidase	0.00123583	1
	Q0IFL5	Argininosuccinate synthase	AAEL004701	GO:0004055 / GO:0005524	atividade de sintase de argininosuccinato / Ligante de ATP	0.00275196	3
	Q16FX1	proteína hipotética	AAEL014607	GO:0020037 / GO:0004497 / GO:0005506 / GO:0016705	ligante de grupamento Heme / atividade de monooxygenase / ligante de ion ferro / atividade de oxidoreductase, sob doadores emparelhados, com incorporação ou redução do oxigênio molecular	0.00157990	1
	Q16TC2	proteína hipotética	AAEL010288	GO:0005524/ GO:0004075/ GO:0046872	Ligante de ATP / atividade de carboxilase da biotina / Ligante de ion metálico	0.00029811	1
	Q175J7	proteína hipotética	AAEL006634	GO:0016747	Atividade de transferase	0.00613853	1
	Q17F22	proteína hipotética	AAEL003606	GO:0005524 / GO:0004639	ligante de ATP / atividade de síntese da carboxamida succínico phosphoribosylaminoimidazole	0.00048700	1
Transporte (TRANS)	Q178J2	proteína hipotética	AAEL005849	GO:0022857	atividade de transporte transmembrana	0.00041719	1

Replicação, Transcrição e Tradução (RTT)	Q16K15	Fator de iniciação da tradução de eucariotos 3 subunidade	AAEL013144	GO:0003743	atividade de iniciação do fator de tradução	0.00365311	2
	Q17LA3	lipoproteína de alta densidade de ligação às proteínas / vigilin	AAEL001421	GO:0003723	ligante de RNA	0.00025445	1
	Q1HR88*	fator de alongamento 1-alfa	AaeL_AAEL017096	GO:0003746 / GO:0005525 / GO:0003924	atividade de alongamento do fator de tradução / ligante de GTP / atividade de GTPase	0.00107183	2
Funções diversas (DIV)	Q16Z73	Proteína 78E da cutícula de pupa	AAEL008289	GO:0042302	componente estrutural da cutícula	0.00340455	1
	Q58HB9*	proteína hipotética	SG16.2sp	GO:0005549	ligante de molécula de odor	0.00179323	1
	P18153*	37 kDa salivary gland allergen Aed a 2	D7	GO:0005549	ligante de molécula de odor	0.00597836	3
	Q0IF93	proteína hipotética	AAEL006417	GO:0005549	ligante de molécula de odor	0.00633406	1
Função desconhecida (DES)	J9EAN1	proteína nucleolar Nop56	AaeL_AAEL017421			0.00366866	1
	J9HHN1	proteína hipotética	AaeL_AAEL017563			2.77E-05	1
	Q16K31	proteína hipotética	AAEL013138			0.00552424	1
	Q16RS6	troponina i	AAEL010850			0.00627049	1
	Q177K9	precursor de Gelsolina	AAEL006096			0.00019485	1
	Q17G63	Precursor da proteína SERPIN1, putativa	SRPN26			0.00536809	1
	Q17LF6	proteína hipotética	AAEL001390			0.00149770	1
	Q17LN8	proteína hipotética	AAEL001319			0.00142551	1
	Q17ME9	proteína de gordura corporal anterior	AAEL001022			0.00054559	1

Q17NB9	fibrinogênio e fibronectina	AAEL000749	0.00021769	1
Q1HRF7*	proteína hipotética	AAEL003600	0.00068458	1
J9HS73	proteína hipotética	AaeL_AAEL017395	0.00061715	1
Q16R13	proteína hipotética	AAEL011094	0.00082627	1
Q16UF4	proteína hipotética	AAEL009932	0.00703889	1
Q17HE1	Precursor da proteína SERPIN	SRPN23	0.00651522	1
Q17IL4	proteína hipotética	AAEL002295	0.00466945	1
Q17J80	proteína hipotética	AAEL002130	0.00064354	1
Q17NC2	proteína hipotética	AAEL000732	0.00691647	1
Q17PM3	proteína hipotética	AAEL000293	0.0067542	1

Legenda: Negrito= proteínas identificadas em outras publicações envolvendo infecção por sorotipos virais do DENV; (*)= proteínas já caracterizadas e identificadas em outras publicações sobre proteômica da glândula salivar de *Ae. aegypti*. Score: classificação do nível de identificação das proteínas segundo uma medida heurística do conteúdo da anotação disponível para a proteína.

Fonte: O Autor, 2015.

Anexo II: Proteínas com expressão diferenciada no Grupo B (Controle x DENV-3) segundo teste-t de Benjamini-Hochberg.

Classe Funcional	Protein ID Uniprot	Nome	Gene	Gene Ontology ID	Função Molecular	p-valor	Score
Metabolismo Básico (MET)	B0FWC7*	citocromo c oxidase subunidade I	mt:Col	GO:0004129 / GO:0020037 / GO:0005506	atividade de citocromo-c oxidase / ligação heme / ion de ligação do ferro	0.000234088	3
	Q1HRL5*	proteína ribossômica 60S L29	AAEL004151	GO:0003735	componente estrutural do ribossomo	0.000197479	1
	Q16J67	prolina desidrogenase 1, X2 isoforma mitocondrial	AAEL013431	GO:0004657	atividade de prolina desidrogenase	0.000630237	1
	Q16JZ2	aminotransferase	AAEL013166	GO:0003824	atividade catalítica	0.000753952	1
	Q16Q68	Proteína NADH oxidoreductase ubiquinona-fe-s 2 (ndufs2)	AAEL011381	GO:0051287 / GO:0048038 / GO:0016651	ligante de NAD / ligante de quinone / atividade de oxidoreductase, agindo em NAD (P) H	0.000143906	1
	Q16TI5	NADH desidrogenase [ubiquinona] 1 beta subcomplexo subunidade 9	AAEL010230	GO:0003824	atividade catalítica	0.000512027	1
	Q171D1	NADH-ubiquinona oxidoreductase flavoprotein 1 (ndufv1)	AAEL007681	GO:0051539 / GO:0010181 / GO:0051287 / GO:0008137	ligante de ferro 4 e cluster de enxofre 4 / oligante de FMN / ligante de NAD / atividade de NADH desidrogenase (ubiquinona)	0.000142058	1
	Q175A4	2-oxoglutarato desidrogenase	AAEL006721	GO:0004591 / GO:0030976	atividade de oxoglutarato desidrogenase (transferência de succinil) / ligante de tiamina	0.000194992	1

					pirofosfato		
	Q17BZ3	Isomerase 3,2-trans-enoil-CoA, mitocondrial	AAEL004755	GO:0003824	atividade catalítica	0.000550382	1
	Q17KS3	glicerol-3-fosfato desidrogenase	AAEL001593	GO:0004367 / GO:0051287	atividade de desidrogenase glicerol-3-fosfato [NAD +] / ligante de NAD	9.71E-05	2
	Q1HQV6*	NADH oxidoreductase ubiquinona-42 kda subunidade	AAEL012950	GO:0005524 / GO:0019206	Ligação de ATP / atividade de quinase de nucleósido	7.48E-05	1
Transporte (TRANS)	Q16RN6	proteína transportadora de ADP, ATP	AAEL010884	GO:0005215	atividade de transportador	0.000301569	1
	Q179J9	ATP sintase mitocondrial cadeia b	AAEL005610	GO:0015078	atividade de transporte transmembrana do íon hidrogênio	0.000248472	1
Replicação, Transcrição e Tradução (RTT)	Q179T1	ribonucleoproteína heterogênea nuclear	AAEL005515	GO:0003676 / GO:0000166	ligante de ácido nucleico / ligante de nucleotídeos	0.000219171	1
	Q1HR88*	fator de alongamento 1-alfa	AaeL_AAEL017096	GO:0003924 / GO:0005525 / GO:0003746	Atividade GTPase / ligante de GTP / atividade de alongamento do fator da tradução	3.35E-05	2
Função desconhecida (DES)	Q0IEU1	NADH mitocondrial: oxidoreductase ubiquinona ESSS subunidade, putativo	AAEL008002			0.000295133	1
	Q16QS3	proteína mitocondrial	AAEL011184			0.000358488	1

transportadora de fosfato					
Q16VZ4	NADH oxidoreductase ubiquinona-39 kda subunidade	AAEL009414		0.000351574	1
Q16WX6	letal 35Di	AAEL009066		0.000210496	1
Q173P6	NADH desidrogenase, putativo	AAEL007054		5.64E-05	1
Q1HRJ5*	NADH desidrogenase [ubiquinona] 1 alfa subcomplexo subunidade 4-like X1 isoform	AAEL002881		0.000430702	1
Q5MM88*	ubiquinol-citocromo c redutase complexo de proteínas 14 kd	AAEL007868		0.000274748	1
J9HS73	proteina hipotetica	AaeL_AAEL017395		0.000172084	1
Q174P7	proteina hipotetica	AAEL006822		0.000268746	1

Legenda: Negrito= proteínas identificadas em outras publicações envolvendo infecção por sorotipos virais do DENV; (*)= proteínas já caracterizadas e identificadas em outras publicações sobre proteômica da glândula salivar de *Ae. aegypti*. Score: classificação do nível de identificação das proteínas segundo uma medida heurística do conteúdo da anotação disponível para a proteína.

Fonte: O Autor. 2015.

Anexo III: Proteínas com expressão diferenciada no Grupo C (DENV-2 x DENV-3) segundo teste-t de Benjamini-Hochberg.

Classe Funcional	Protein ID Uniprot	Nome	Gene	Gene Ontology ID	Função Molecular	p-valor	Score
Metabolismo Básico (MET)	Q173B8	proteína hipotética	AAEL007218	GO:0080019	atividade (formação de álcool)-fatty-acil CoA redutase	0.000341	1
	Q178Z5	proteína hipotética	AAEL005688	GO:0005524 / GO:0000049 / GO:0004818	ligante de ATP / ligante de tRNA / atividade de ligante do glutamato tRNA	0.000223	1
Replicação, Transcrição e Tradução (RTT)	Q1HRL5*	proteína ribossômica 60S L29	AAEL004151	GO:0003735	componente estrutural de ribossoma / Ribonucleoproteína proteína ribossomal	0.000251	1
Função desconhecida (DES)	Q16XT8	proteína hipotética	AAEL008766			0.000246	1
	Q16R13	proteína hipotética	AAEL011094			0.000359	1

Legenda: (*)= proteínas já caracterizadas e identificadas em outras publicações sobre proteômica da glândula salivar de *Ae. aegypti*. Score: classificação do nível de identificação das proteínas segundo uma medida heurística do conteúdo da anotação disponível para a proteína.

Fonte: O Autor, 2015.