

RONNIE VON DOS SANTOS VELOSO

Proteoma diferencial da resposta à hormese induzida por deltametrina em populações de caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V443p
2012

Veloso, Ronnie Von dos Santos, 1978-
Proteoma diferencial da resposta à hormese induzida por
deltametrina em populações de caruncho-do-milho
(*Sitophilus zeamais*) / Ronnie Von dos Santos Veloso. –
Viçosa, MG, 2012.
ix, 66 f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Sitophilus zeamais* - Fisiologia. 2. Piretróides.
3. Resistência aos inseticidas. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-
Graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.768

RONNIE VON DOS SANTOS VELOSO

Proteoma diferencial da resposta à hormese induzida por deltametrina em populações do caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de maio de 2012.

Raul Narciso Carvalho Guedes
(Coorientador)

Camila Rocha da Silva

Wellington Garcia Campos

Juliana Lopes Rangel Fietto

Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Entomologia, pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo.

À Professora, Maria Goreti de Almeida Oliveira pela orientação e confiança ao longo do curso.

Aos professores Raul Narciso Carvalho Guedes e o Professor Marcelo Ehlers Loureiro pela co-orientação, sugestões e críticas.

Ao Núcleo de Análises de Biomoléculas (Nubiomol) pela oportunidade de aprendizado e pela colaboração em infraestrutura e equipamentos, especialmente agradeço ao técnico responsável pelo núcleo MSc. Edvaldo Barros.

Aos amigos da pós-graduação do Laboratório de Enzimologia, Ecotoxicologia e do Nubiomol pela grande amizade, convívio e companheirismo ao longo de minha vida acadêmica em Viçosa.

Aos Drs. Wellington Garcia Campos, Juliana Lopes Rangel Fietto e Camila Rocha da Silva pela composição da banca de defesa, sugestões e críticas.

Aos demais professores do curso de Entomologia, importantes na transmissão de suas experiências e responsáveis por parte dos conhecimentos adquiridos durante a minha formação.

Em especial agradeço ao professor Germano Leão Demolin Leite da Universidade Federal de Minas Gerais pela amizade, incentivo e pela grande contribuição em minha formação científica.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Entomologia Sra. Maria Paula da Costa e à Míriam, pela amizade, seriedade e eficiência.

Aos estagiários do Laboratório de Ecotoxicologia e Enzimologia pela amizade e valiosa ajuda durante a execução deste trabalho.

Aos meus pais Tiago Veloso e Jacira Santos Veloso e a todos os meus familiares, que diretamente ou indiretamente ofereceram condições de progredir na minha caminhada.

A todos os colegas dos cursos de Entomologia e Agronomia pelo agradável

convívio durante as disciplinas cursadas e pela relação de amizade, entretenimento e divergência de idéias que fazem da Universidade um ambiente propício à formação profissional e intelectual.

E finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

	Páginas
Introdução Geral	1
Parte 1: Hormese induzida por deltametrina em populações de caruncho-do-milho	3
Introdução	4
Hormese	4
Evidências do fenômeno	4
Hormese e os métodos tradicionais de avaliação toxicológica	5
Limitações da curva dose-resposta padrão	7
Desafios	7
Material e Métodos	8
Insetos	8
Taxa instantânea de crescimento (r_i)	8
Tratamento dos insetos	10
Estatística	10
Resultados	11
Taxa instantânea de crescimento (r_i)	11
Modelos reparameterizados para avaliação estatística de hormese	15
Modelo de Cedergreen	17
Discussão	19
Modelo logarítmico logístico (log logístico ou regressão logística)	20

Modelo de Brain e Cousens	24
Modelo de Cedergreen	25
Conclusão	26
Referências	29
Parte II: Perfil de expressão proteica mediante hormese induzida por deltametrina em populações de caruncho-do-milho <i>Sitophilus zeamais</i> (Coleoptera: Curculionidae)	34
Introdução	35
Revisão proteoma	38
Estratégias para identificação de <i>spots</i> diferencialmente expressos	40
Material e Métodos	45
Insetos	45
Tratamento dos insetos	46
Bioensaio de exposição à concentração hormética de deltametrina	46
Extração de proteínas	47
Eletroforese bidimensional	47
Visualização das proteínas e análise das imagens	48
Resultados	49
Discussão	54
Conclusão	60
Referências	61

RESUMO

VELOSO, Ronnie Von dos Santos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2012. **Proteoma diferencial da resposta à hormese induzida por deltametrina em populações de caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*)**. Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-orientadores: Raul Narciso Carvalho Guedes, Eliseu José Guedes Pereira e Joel Antônio de Oliveira.

Hormese é um termo amplamente utilizado na toxicologia para descrever o comportamento bifásico da curva dose-resposta, onde a exposição ao estresse físico ou químico induz uma resposta estimulatória ou inibitória dose-dependente. O fenômeno é caracteristicamente descrito por um modelo dose-resposta não-linear onde a exposição a baixos níveis de estresse induz um efeito estimulatório enquanto altos níveis de exposição provocam inibição ou toxicidade. Dois modelos logarítmico-logísticos reparameterizados foram utilizados para avaliar bioensaios dose-resposta em *Sitophilus zeamais*, duas populações resistentes e uma susceptível a inseticidas. Além disso, o perfil de expressão de proteínas foi analisado nas três populações. A curva dose-resposta foi bifásica para as três populações. Foi observado várias alterações no perfil de expressão de proteínas. Nas populações resistentes prevaleceu o aumento de expressão (aumento no volume do spot) enquanto na população susceptível foi observado redução de expressão na maioria dos spots diferencialmente expressos. Essa redução pode ser devido a um período refratário mais prologando nessa população e conseqüentemente maior retardo no restabelecimento do estado homeostático. Poucos spots foram identificados como expressão de novas proteínas nas três populações. A população de Jacarezinho foi a que apresentou o maior número de spots com expressão de novas proteínas, foram seis spots para população de jacarezinho, um spot para população de Juiz de Fora e nenhum spot na população susceptível de Sete Lagoas. Essa grande variação reflete a dificuldade de relacionar os eventos moleculares com as respostas obtidas nas curvas dose-resposta. Embora as respostas biológicas possam ser observadas com relativa dificuldade, a miríade de eventos moleculares em resposta as variações do ambiente tornam extremamente difícil identificar os eventos mecanísticos envolvidos com a resposta ao estresse. A variação no perfil de expressão de proteínas entre populações reflete a dificuldade para compreensão dos mecanismos envolvidos com o efeito hormético. A exposição mesmo a doses moderadas de estresse induziu muitas alterações no perfil de expressão de proteínas. Em uma próxima etapa a identificação das proteínas diferencialmente expressas seria de grande importância para

verificarmos se grupos de proteínas comuns entre as populações são afetados. Além de apresentar maior magnitude no incremento populacional, em doses moderadas de deltametrina, as populações resistentes apresentam maior alteração no perfil de expressão de proteínas e esse comportamento parece ser dependente dos parâmetros de história de vida.

ABSTRACT

VELOSO, Ronnie Von dos Santos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2012.

Hormesis induced by deltamethrin in populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*): differential proteome response. Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Raul Narciso Carvalho Guedes, Eliseu José Guedes Pereira and Joel Antônio de Oliveira.

Hormesis is a widely used in toxicology to describe the biphasic dose-response curve, where exposure to chemical or physical stress induces a stimulatory or inhibitory response dose-dependent. This phenomenon is typically described by a nonlinear dose-response where exposure to low levels of stress induces a stimulatory effect while high levels of exposure cause inhibition or toxicity. Two reparameterized logistic-logarithmic models were used to describe deltamethrin dose-response in *Sitophilus zeamais*, two insecticide-resistant strains and one insecticide-susceptible strain. Moreover, the profile of protein expression was examined in three populations. The biphasic dose-response was observed in three tested strains. It was observed several changes in protein profiling expression. In insecticide-resistant strains prevailed up-regulation protein expression (increase in *spot* volume) while in the insecticide-susceptible strain was observed down-regulation expression in most *spots*. This reduction may be due to a more extend refractory period and consequently greater delay in restoring the homeostatic state in the insecticide-susceptible strain. Few spots were identified as the expression of new proteins in the three strains. The Jacarezinho strain showed the largest number of protein *spots*, were six spots in the Jacarezinho strain, one spot in the Juiz de Fora strain and no spot in the Sete Lagoas susceptible strain. This wide variation reflects the difficulty of relating the molecular events with the responses obtained in the dose-response curves. Although the biological responses can be observed with relative difficulty, the myriad of molecular events in response to changes in the environment make it extremely difficult to identify the mechanistic events involved in the stress response. The change in the profile of protein expression between populations reflects the difficulty in understanding the mechanisms involved in the hormesis. The exposure to even moderate doses of stress induces many changes in the profiling protein expression. In a next step the identification of differentially expressed proteins would be of great importance to check whether groups of common proteins among populations are affected. Besides the greater magnitude in population growth, moderate doses of

deltamethrin resistant populations have a higher profile changes in protein expression and this behavior seems to be dependent on life history parameters.

Introdução Geral

O termo hormese tem sido amplamente utilizado no campo da toxicologia para descrever o comportamento bifásico da curva dose-resposta, onde a exposição ao estresse físico ou químico induz uma resposta estimulatória ou inibitória dose-dependente. O fenômeno é caracteristicamente descrito por um modelo dose-resposta não-linear onde a exposição a baixos níveis de estresse induz um efeito estimulatório enquanto altos níveis de exposição provocam inibição ou toxicidade. Esse comportamento é observado quando o organismo é submetido a uma ampla faixa de exposição variando de níveis muito baixos àqueles que desencadeiam efeito adverso. Embora as primeiras evidências de hormese tenham sido observadas há quase 150 anos, somente nos últimos dez anos o fenômeno vem ganhando notoriedade em publicações científicas, sobretudo na área médica. Entretanto, houve pouca evolução no conhecimento do mecanismo fisiológico do fenômeno, o que tem sido determinante para manutenção de métodos tradicionais de ensaios toxicológicos. Uma metodologia universal é a relação dose-resposta com limiar de exposição (modelo dose-resposta linear), muito utilizada em avaliações envolvendo ensaios toxicológicos e que tem como foco principal a resposta induzida pelas altas doses. Recentemente essa metodologia vem sendo questionada principalmente em função das inúmeras evidências de indução de resposta em faixas de concentração muito baixa onde supostamente o agente de estresse não desencadearia nenhum tipo de efeito.

Os métodos tradicionais de bioensaios envolvendo relação dose-resposta são focados nos níveis de exposição ao qual o agente de estresse induz efeito adverso. Nessa metodologia, muitas informações biológicas são perdidas na faixa de exposição onde a concentração da substância é muito baixa, pois tradicionalmente essa região é negligenciada por supostamente não induzir nenhum tipo de resposta no organismo. Entretanto inúmeras evidências apontam para uma mudança de paradigma nas avaliações de toxicidade, principalmente pelo crescente número de publicações relatando a ocorrência de resposta biológica significativa mediante exposição a concentrações muito baixas de substâncias que exibem toxicidade em altas doses. Dessa forma, vem ganhando força a hipótese de que esse modelo de resposta é uma regra nos sistemas biológicos, independentemente do agente de estresse ao qual o organismo é exposto.

Hormese tem recebido maior atenção em áreas da ciência ligadas à saúde humana. Por outro lado pouca ênfase vem sendo dada nas ciências agrárias, sobretudo na toxicologia de pesticidas. Nesse trabalho, verificamos o efeito da exposição de populações do caruncho-do-milho *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) à doses sub-letais de deltametrina. Planejamos a execução desse trabalho em duas etapas, a primeira etapa teve como foco estudos de demografia populacional de caruncho-do-milho *S. zeamais*. Supostamente, exposição a níveis muito baixos de estresse físico ou químico não é capaz de desencadear resposta no organismo. Dessa forma na segunda etapa desse trabalho avaliamos se alterações nos bioensaios de demografia populacional coincidem com alterações na expressão total de proteínas de caruncho do milho exposto a doses horméticas do inseticida piretróide deltametrina. Aqui pretendemos responder a duas perguntas: exposição a concentrações muito baixas do inseticida deltametrina resulta em vantagem para o fitness de *S. zeamais*? Há evidências de alterações fisiológicas sugestivas da existência de rotas fisiológicas alternativas determinantes de parâmetros de história de vida? Esperamos que esse trabalho possa contribuir para a descrição do modelo fisiológico do fenômeno permitindo, não somente confirmá-lo, mas dimensionar sua importância em contexto aplicado a agricultura.

Parte I

Hormese induzida por deltametrina em populações de caruncho
do milho

INTRODUÇÃO

Hormese

Hormese é um conceito caracterizado pelo comportamento bifásico da curva dose-resposta, que implica em dois tipos de resposta biológica quando um organismo é exposto a um agente de estresse, sendo uma estimulatória e outra inibitória (Calabrese & Baldwin, 2001; Calabrese, 2004; Mattson, 2008; Murado & Vásquez, 2010). O fenômeno também é definido como uma resposta super-compensatória ocorrida em função de um desequilíbrio no estado homeostático do organismo (Calabrese, 2008). As primeiras evidências de resposta hormética foram observadas há aproximadamente 150 anos por Virchow (1854) (citado por Henschler, 2006). Em 1888 o fenômeno ganhou visibilidade através de um trabalho de Hugo Schulz (1853-1932) (citado por Calabrese, 2008) que avaliou o efeito de um desinfetante no metabolismo de leveduras. Nesse trabalho, Schulz observou que esse composto inibia a produção de dióxido de carbono quando as leveduras eram expostas a altas doses, e estimulava quando eram expostas em baixas doses (Calabrese, 2008). O termo hormese foi citado pela primeira vez em 1943 pelos pesquisadores Southam e Ehrlich da Universidade de Idaho (Calabrese & Baldwin, 2001). Após várias décadas o fenômeno voltou a ganhar atenção principalmente devido à necessidade de informações mais completas, para fins de regulamentação, acerca dos efeitos provocados pela exposição a poluentes bem como nas avaliações de risco em testes de carcinogenicidade (Calabrese, 2004, 2008; Reynolds, 2010).

Evidências do fenômeno

O efeito hormético tem recebido atenção especial nas áreas de ciências biológicas e biomédicas e também nos estudos envolvendo avaliações de risco ambiental, principalmente por desafiar os modelos tradicionais de avaliação quanto a capacidade de prever todos os efeitos causados pela exposição a poluentes (Stark & Banks, 2003; Kinoshita et al., 2006; Rattan, 2008; Myers et al., 2009; Stanek & Calabrese, 2010; Calabrese et al., 2010). Embora existam muitas evidências da ocorrência de resposta hormética em trabalhos publicados nas diversas áreas da ciência, ainda não existem informações suficientes para responder se o fenômeno é fruto do mero acaso ou uma regra que pode ser generalizada para todos os organismos e conseqüentemente para os modelos de avaliação sobre o efeito de poluentes. Em relação à fisiologia da resposta hormética, as informações disponíveis em publicações, em sua maioria, são meramente especulativas acerca dos mecanismos envolvidos com a

expressão do fenômeno (Calabrese & Baldwin, 2001; Calabrese, 2008; Mushak, 2009). Para que o modelo de resposta bifásica supere o método tradicional de avaliação toxicológica (curva dose-resposta com limiar) é necessário verificar se o fenômeno é amplamente generalizado, ou seja, é regra e não exceção nos ensaios de curva dose-resposta. Além disso, é necessário encontrar rotas fisiológicas determinantes da expressão do fenômeno bem como compreender a dinâmica dos mecanismos envolvidos com a expressão da resposta hormética (Yueshu et al., 2010; Calabrese et al., 2010).

Em 2001 foi realizado o primeiro levantamento no sentido de determinar a frequência da resposta hormética em ensaios dose-resposta. Foi criado um banco de dados que reúne trabalhos de ensaios dose-resposta com evidências de hormese, identificadas através de modelagem estatística (Calabrese & Baldwin, 2001). Nessa estimativa foram estabelecidos critérios para diferenciar os desvios em relação ao controle, separando os desvios devido ao mero acaso daqueles consistentes com a expressão do fenômeno. Foram analisados 20.285 artigos dos quais 195 ou 1% continham 668 curvas dose-resposta que atendiam os critérios de entrada para identificar a ocorrência do efeito hormético. Aplicando os critérios para identificação do fenômeno, foram encontradas 245 (37% de 668) doses-resposta de 86 artigos (0,4% de 20.285) que condizem com a resposta esperada para o fenômeno de acordo com os critérios estatísticos estabelecidos (Calabrese & Baldwin, 2001).

Hormese e os métodos tradicionais de avaliação toxicológica

O método principal para determinação de parâmetros toxicológicos envolvendo o impacto de poluentes ou outros agentes de estresse nos organismos vivos é baseado na relação entre diferentes níveis de exposição e o efeito adverso provocado pelo poluente após determinado tempo (Calabrese, 2004). A representação gráfica dos resultados forma a relação conhecida como curva dose-resposta que, por ser muito utilizada em estudos de toxicologia e desfrutar de plena aceitação nas agências de regulamentação ambiental, ficou conhecida como curva dose-resposta padrão. A curva dose resposta tem um formato sigmoidal e representa a relação entre determinados níveis de exposição a um agente de estresse e a proporção de uma população que responde ao efeito quantitativo decorrente dessa exposição. Existe um limite entre o mais baixo ponto da curva capaz de induzir algum efeito adverso e os demais níveis abaixo desse ponto onde supostamente não há resposta. O limite entre essas duas regiões da curva é conhecido como Nível de Nenhum Efeito Adverso Observado (NNEAO, do inglês NOAEL) (Calabrese, 2004; Kodell, 2009). Embora a curva dose-resposta padrão seja

amplamente aceita e empregada nos estudos de avaliação de risco, evidências da existência de resposta a baixos níveis de exposição têm levantado vários questionamentos sobre a validade desse método de avaliação (Calabrese & Baldwin, 2001; Calabrese, 2003, 2004, 2008; Stark & Banks, 2003; Calabrese et al, 2010). A curva dose-resposta padrão é limitada em termos de tipos de resposta-biológica avaliada (ex.:mortalidade), dessa forma essa metodologia permite conhecer apenas parcialmente o efeito de um poluente sobre o organismo. Além disso, outro questionamento sobre essa metodologia é referente à extrapolação de resultados que são obtidos em altos níveis de exposição aguda para prever o efeito a baixos níveis de exposição crônica. Dessa forma torna-se necessário encontrar um modelo de avaliação de risco toxicológico capaz de solucionar as deficiências da curva dose-resposta padrão que é utilizada pela maioria das agências de avaliação de risco de poluentes. Nesse contexto o modelo hormético da relação dose-resposta surge como uma alternativa promissora capaz de fornecer informações mais completas sobre os efeitos de um poluente (Alexeeff et al., 2002; Calabrese, 2003; Kodell, 2009).

Limitações da curva dose-resposta padrão

A avaliação do efeito de inseticidas em insetos, geralmente, é focada na mortalidade dos indivíduos medida através de curvas dose-resposta mediante exposição aguda. Devido ao limitado número de respostas obtidas e ao curto tempo de avaliação, esse método é incapaz de avaliar o completo efeito dos inseticidas, sobretudo o efeito da exposição crônica nas populações (Calabrese, 2005). Uma alternativa aos métodos tradicionais de avaliação toxicológica, que focam apenas no efeito adverso, são as análises de demografia populacional (ex. tabela de vida) que é um tipo de avaliação mais abrangente que os estudos de exposição aguda focadas apenas a mortalidade como resposta. Esses estudos permitem reunir em um único parâmetro os vários efeitos provocados pela exposição crônica a poluentes. Embora seja uma ferramenta muito útil, a duração do ciclo de vida muito longo de algumas espécies limita sua utilização. Em outros casos o tipo de organismo torna o seu custo relativamente alto e inviabiliza sua utilização. A realização de estudos de demografia populacional, através da construção de tabelas de vida, muitas vezes é limitada pelas características biológicas da espécie, como ciclo de vida longo e baixa taxa de reprodução. Essas limitações tornam o estudo caro e consomem muito tempo. Uma alternativa para minimizar essas limitações é a avaliação da taxa instantânea de crescimento populacional (r_t), que é uma medida direta do crescimento populacional sendo mais vantajosa principalmente devido à integração

de um maior número de respostas em um parâmetro mais realista que incorpora resultados de sobrevivência e fecundidade (Stark & Banks 2003).

Desafios

O delineamento de experimentos para investigar a expressão do efeito hormético é um dos principais desafios para explorar o assunto. Isso porque ainda não existem modelos estatísticos bem definidos para verificar a robustez das respostas obtidas. Além disso, a componente temporal exigida para percepção da resposta biológica, na maioria dos ensaios, torna difícil a avaliação do fenômeno em espécies de ciclo de vida longo como a maioria dos mamíferos. A solução para o fomento de subsídios que rejeitassem a hipótese de que o fenômeno é uma resposta casual foi o estabelecimento de um banco de dados baseado no levantamento de trabalhos envolvendo a utilização de curvas dose-resposta e aplicação de parâmetros que permitissem verificar o efeito hormético nesses trabalhos (Calabrese & Baldwin, 2001; Calabrese & Blain, 2005). Essa alternativa permitiu encurtar o longo caminho que seria necessário para o desenvolvimento de experimentos delineados para confirmar o fenômeno bem como consolidar metodologias. Entretanto, essa estratégia tem o inconveniente de utilizar trabalhos que não foram planejados para avaliar o fenômeno e tem sido questionada a validade dessa metodologia para reconhecer a ocorrência do efeito hormético (Mushak, 2009).

Outro desafio para que o modelo hormético tenha plena aceitação, pela comunidade científica e agências de regulamentação ambiental, é relativo à compreensão dos mecanismos envolvidos com a expressão do fenômeno (Feinendegen, 2005; Calabrese, 2008; Zhang et al., 2009). Na toxicologia moderna existe uma forte tendência de valorizar apenas os trabalhos voltados para explicação mecanicista de problemas (Calabrese, 2008). A explicação dos mecanismos tem a grande vantagem de gerar uma melhor explicação biológica e permitir prever diversas situações envolvidas com a resposta biológica. Embora a expressão do fenômeno hormético tenha sido amplamente reportada em trabalhos de toxicologia, ainda não existem evidências consistentes sobre os mecanismos envolvidos com a expressão do fenômeno. Dessa forma, a explicação mecanística para a resposta hormética é um dos desafios mais urgentes a serem elucidados no campo da toxicologia (Calabrese, 2008; Yueshu et al., 2010; Kending, et al., 2010).

Nessa primeira parte do trabalho avaliamos se exposição à baixas doses de deltametrina afeta o crescimento populacional de caruncho-do-milho *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Além disso, ao utilizar três populações, procuramos

verificar indícios da generalização do fenômeno entre diferentes populações de *S. zeamais*

MATERIAL E MÉTODOS

Insetos

Foram utilizadas três populações de *S. zeamais* sendo uma população padrão de susceptibilidade proveniente do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (EMBRAPA Milho e Sorgo - CNPMS), localizado na cidade de Sete Lagoas – MG. Esta população é considerada como padrão de susceptibilidade a inseticidas piretróides e vem sendo mantida, sem exposição a inseticidas, em condições de laboratório por aproximadamente 20 anos (Guedes *et al.*, 1994; Fragoso *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003). As outras duas populações são altamente resistentes a piretróides. Uma delas, coletada em moinhos de grãos na cidade de Juiz de Fora – MG, Brasil, no início de 1999 e estabelecida a partir de 500 indivíduos, é também resistente ao malation (Fragoso *et al.*, 2003). A segunda população resistente foi coletada originalmente em unidades armazenadoras de semente de milho em Jacarezinho – Paraná, Brasil no final da década de 80 sendo altamente resistentes a DDT e piretróides. Todas as populações vêm sendo criadas em grãos de milho isentos de inseticidas e mantidas em condições controladas de temperatura ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$), umidade ($70 \pm 5\%$) e fotoperíodo (LD 12:12 h).

As populações resistentes utilizadas na execução desse trabalho, aparentemente, apresentam desempenho demográfico diferenciado sendo que uma delas apresenta custo fisiológico associado à resistência (Araújo *et al.*, 2008a; Lopes *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010). Além disso, essas populações apresentam diferenças quanto a acumulação e mobilização de reserva energética. Isto é atribuído a capacidade de mitigar o custo fisiológico envolvido com a resistência, sugerindo uma maior eficiência na utilização dos recursos energéticos na população sem custo (Araújo *et al.*, 2008a; Araújo *et al.*, 2008b).

Taxa de crescimento instantâneo (r_i)

O ensaio para avaliação da taxa de crescimento instantâneo foi inteiramente casualizado com três repetições. Em cada repetição, vinte insetos adultos das populações de Jacarezinho e Juiz de fora e 20 insetos adultos para população de Sete Lagoa foram utilizados. Todos os insetos adultos utilizados no ensaio de incremento populacional (r_i) tinham idade de emergência do grão entre um e quatro dias após emergidos. Os frascos de vidro utilizados nesse ensaio possuíam um volume de 590 mL

e em cada frasco (repetição) foram adicionados 300 g de milho 20 insetos para cada uma das populações. Os insetos foram mantidos nesses frascos em sala com temperatura controlada 27 °C e fotoperíodo LD 12:12 por um período entre 90 e 100 dias dependendo da população. Ao final desse período o número total de insetos vivos foi contabilizado e os valores utilizados na fórmula de Stark & Bank, (2003) para determinação da taxa instantânea de crescimento populacional (r_i).

Fórmula de Stark & Bank, 2003,

$$r_i = \frac{\left[\ln\left(\frac{N_f}{N_i}\right) \right]}{\Delta T} \quad [1]$$

Onde:

r_i = Taxa instantânea de crescimento;

N_f = Número final de insetos vivos;

N_i = Número inicial de insetos vivos;

ΔT = Variação de tempo (número de dias em que o ensaio foi realizado).

A taxa instantânea de crescimento populacional (r_i) foi calculada como parte da estratégia para avaliação do bioensaio dose-resposta em três populações de *Sitophilus zeamais*. Uma das populações utilizadas no bioensaio é padrão de susceptibilidade a inseticidas piretróides (Sete Lagoas), enquanto as outras duas populações são resistentes a inseticidas desse grupo químico (Jacarezinho e Juiz de Fora) (Guedes *et al.*, 1994; Fragoso *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003). As populações utilizadas nesse experimento foram expostas a doses crescentes de deltametrina, para realização dos estudos demografia populacional. As concentrações de deltametrina utilizadas nesse experimento foram cuidadosamente pré-determinadas com o objetivo de identificar um limiar aproximado entre as concentrações do inseticida que afetava negativamente o valor de r_i da população e aquelas concentrações que não induziam efeito adverso na taxa instantânea de crescimento (nesse caso específico o limiar corresponde a uma inferência aproximada do Nível de Nenhum Efeito Adverso Observado- NNEAO). Essa estratégia foi necessária para aumentarmos a chance de incluir a faixa de concentração do inseticida que induz o efeito hormético (Calabrese 2008).

No bioensaio utilizamos um maior número de concentrações que ficavam abaixo do NNEAO aproximado determinado em ensaios preliminares. As concentrações de k-biol (deltametrina) variaram de 0 a 1,4483 gramas de ingrediente por quilograma de

milho (g.i.a./Kg) para as populações resistentes e de 0 a 0,5 g.i.a./Kg por tonelada na população susceptível.

Tratamento dos insetos

Foram utilizados 300g de grãos de milho tratados com a formulação comercial do inseticida K-obiol 25 CE com 25 g de deltametrina por litro da formulação. As doses de deltametrina utilizadas no bioensaio dose resposta foram cuidadosamente determinadas através de bioensaios preliminares. As amostras com 300 g de milho foram tratadas com uma ampla faixa de concentração do inseticida utilizando três repetições para cada tratamento. Utilizamos um volume de calda de 7 mL/Kg de grãos de milho, para aplicação do inseticida através de um pulverizador pneumático com pressão aproximada do jato de 3 bar. Os grãos foram colocados em uma bandeja plástica e o jato direcionado manualmente a uma altura aproximada de 20 cm. Durante a aplicação do inseticida os grãos foram cuidadosamente revolvidos com o objetivo de realizar uma aplicação uniforme do inseticida. Os grãos foram acondicionados em potes de vidro e em cada pote foram colocados 20 insetos, em seguida os potes foram acondicionados em um ambiente controlado com temperatura de aproximadamente 27°C e fotoperíodo de 12/12 h. Entre 90 e 100 dias de acondicionamento foi realizada a contagem dos insetos e avaliado o incremento populacional em cada tratamento de acordo com o modelo de taxa de crescimento populacional instantânea (r_i).

Estatística

A variação do incremento populacional de populações de caruncho do milho (y) foi avaliada em função de doses de deltametrina (x) em dois modelos de regressão não linear (Equação 2 e 3) com o objetivo de confirmar se o incremento observado em regiões próximas a concentração zero na curva dose- resposta é significativo para hormese. Os dois modelos foram modificados a partir do modelo logaritimico-logístico (Equação 1). Os parâmetros iniciais dos limites inferior (c) foram fixados em 0 e para o limite superior (d) em 100. Os demais parâmetros iniciais dos modelos foram livremente estimados com exceção dos valores de α que foram fixados entre 0,007 e 1,75 de acordo com o menor valor da soma dos quadrados do resíduo. As estimativas dos parâmetros das equações 2 e 3 foram obtidas pelo método Marquardt através de um programa estatístico (PROC NLIN SAS Institute 2002)

RESULTADOS

Taxa instantânea de crescimento populacional (r_i)

A relação dose-resposta para o r_i de três populações de *Sitophilus zeamais* expostas a doses crescentes de deltametrina apresentou comportamento bifásico, também definido como resposta hormética (Figura 1). Em relação à população de Jacarezinho, a população de Sete Lagoas e Juiz de Fora têm níveis demográficos semelhantes quando mantidas em condições de ausência de inseticida (Figura 1). Entretanto, à medida que os níveis de exposição à deltametrina aumentaram seguiu-se um aumento nos valores de r_i com posterior tendência de redução em concentrações mais elevadas (Figura 1). As concentrações de deltametrina com valor de r_i maior que o do controle variaram, aproximadamente, entre $2,5^{-8}$ a $2,5^{-3}$ g.i.a/kg de milho (Figura 1). Nas concentrações acima de $2,5^{-3}$ g.i.a/kg de deltametrina houve tendência de decréscimo do r_i em níveis abaixo do controle. Nas concentrações a partir de 0,05 g.i.a/kg a relação entre concentração do inseticida e magnitude do valor de r_i foram muito distintas entre as populações de Jacarezinho e Juiz de Fora. Entretanto, a faixa de concentração do inseticida que induz aumento no valor de r_i , em relação ao controle, foi semelhante nas duas populações (Tabela 2 e 3). Analisando a figura 1 e considerando uma aproximação para determinados parâmetros comumente determinados em curvas dose resposta através de modelos apropriados, é possível observar que, um valor aproximado para DE_x (dose efetiva para manifestar $x\%$ de resposta) seria muito discrepante entre as populações resistentes. Enquanto a concentração necessária para reduzir o valor de r_i à aproximadamente 50% do valor do controle ficou entre 0,025 e 0,05 g.i.a. /Kg na população de jacarezinho, na população de Juiz de Fora a concentração necessária para redução na mesma magnitude ficou acima de 1,4483 g.i.a /Kg.

As concentrações de deltametrina onde o valor de r_i foi semelhante ao nível do controle após o período de 100 dias nas populações de Jacarezinho e Juiz de Fora foram, respectivamente, 0,0125 g.i.a /Kg e 0,025 g.i.a /Kg (Tabela 1 e 2). A população de Juiz de fora e jacarezinho tiveram maior porcentagem de incremento no valor de r_i em relação à população susceptível de Sete Lagoas sendo, respectivamente, 28%, 25% e 7% maior que o controle (Tabela 1, 2 e 3).

Na população susceptível (Sete Lagoas), todas as concentrações testadas induziram aumento no valor de r_i , com exceção da concentração 0,5 g.i.a de

deltametrina/Kg que matou todos os indivíduos (dados não utilizados para o cálculo de r_i). Entretanto, o incremento no r_i foi mais modesto quando comparado com as populações resistentes. Na população de Sete Lagoas, o incremento máximo no valor de r_i foi de 7% em relação ao controle (Tabela 3).

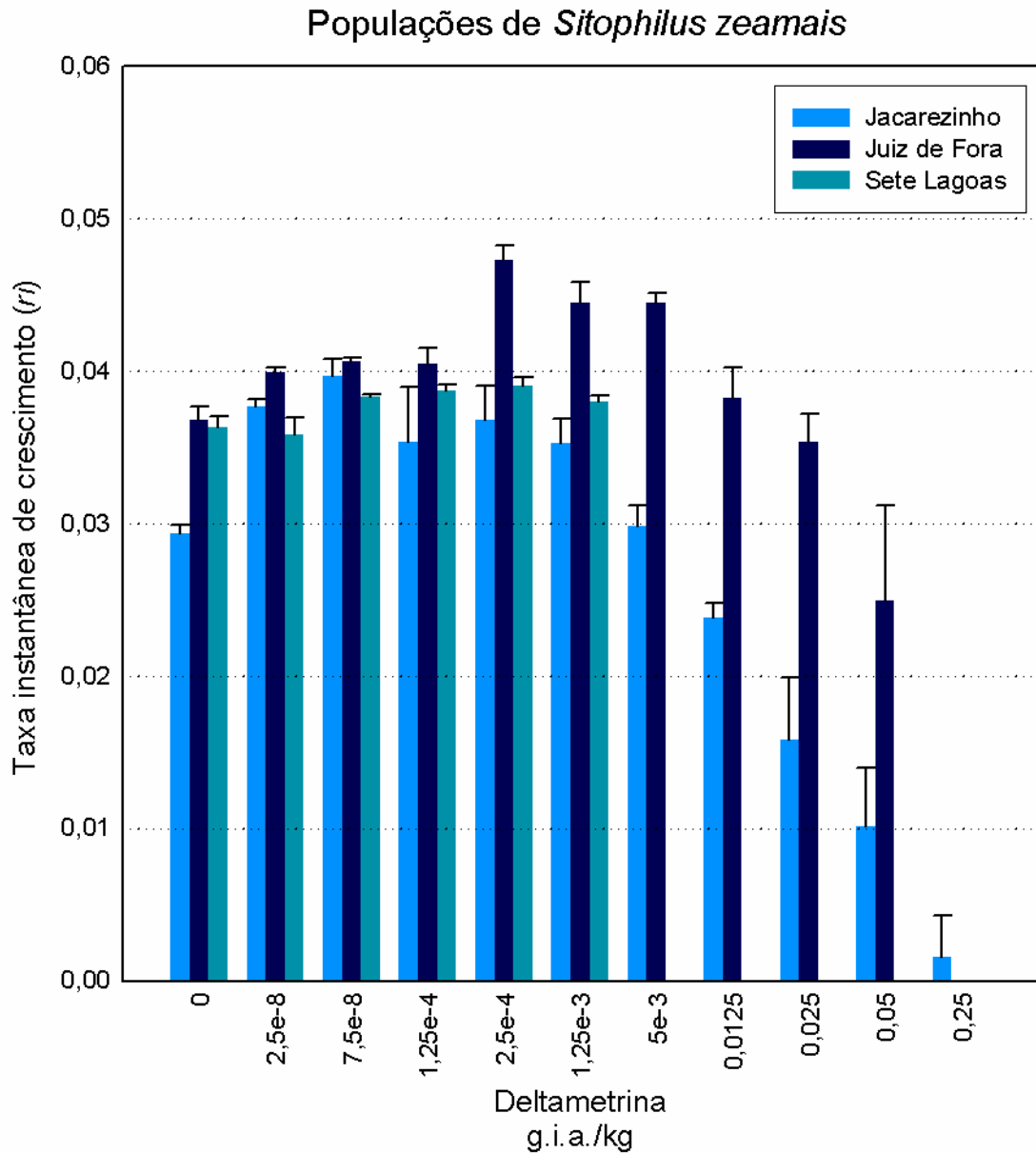


Figura 1: taxa instantânea de crescimento populacional mediante exposição a doses crescentes de deltametrina (formulação comercial k-obiol). Os valores de r_i foram transformados e porcentagem do controle. A magnitude de resposta do controle foi de 100%. A linha transversal cinza representa o nível de 100% de incremento do controle.

Tabela 1: Efeito do inseticida K-obiol na taxa instantânea de crescimento (r_i) na população de

Jacarezinho				
Dose (g.i.a de Deltametrina/Kg de milho)	ri	Desvio	Erro	% (porcentagem de incremento em relação ao controle)
0	0,029308	0,000615	0,000355	100
2,5 ⁻⁸	0,037679	0,000434	0,00025	128,5614
7,5 ⁻⁸	0,039652	0,001123	0,000648	135,2917
1,25 ⁻⁴	0,03538	0,003538	0,002043	120,7157
2,5 ⁻⁴	0,03676	0,002262	0,001306	125,4241
1,25 ⁻³	0,035243	0,001611	0,00093	120,2484
0,005	0,029811	0,001375	0,000794	101,7137
0,0125	0,023857	0,000949	0,000548	81,40153
0,025	0,015824	0,004119	0,002378	53,99208
0,05	0,010155	0,003812	0,002201	34,64837
0,25	0,001567	0,002714	0,001567	5,345521

Tabela 2: Efeito do inseticida K-obiol na taxa instantânea de crescimento (*ri*) na população de Juiz de Fora

Dose (g.i.a de Deltametrina/Kg de milho)	<i>ri</i>	Desvio	Erro	% (porcentagem de incremento em relação ao controle)
0	0,036792	0,000866	0,0005	100
1,25 ⁻⁸	0,039958	0,000253	0,000146	108,6051
2,5 ⁻⁸	0,04061	0,000292	0,000168	110,3766
6,25 ⁻⁸	0,040487	0,001003	0,000579	110,0408
1,25 ⁻⁴	0,047279	0,001007	0,000581	128,5026
2,5 ⁻³	0,044508	0,001357	0,000784	120,9702
0,0125	0,044517	0,000615	0,000355	120,996
0,0875	0,038249	0,002005	0,001157	103,9585
3.5	0,035373	0,001846	0,001066	96,14122
1,4483	0,024916	0,006252	0,00361	67,72125
2,6064	0	-	-	-

Tabela 3: Efeito do inseticida K-obiol na taxa instantânea de crescimento (*ri*) na população de Sete Lagoas.

Dose (g.i.a de Deltametrina/Kg de milho)	Ri	Desvio	Erro	%
0	0,036288	0,000727	0,00042	100
2,5 ⁻⁸	0,035822	0,00112	0,000647	98,71608
7,5 ⁻⁸	0,038282	0,000158	9,11E-05	105,495
2,5 ⁻⁴	0,038749	0,000372	0,000215	106,7821
1,25 ⁻³	0,039006	0,000552	0,000319	107,4908
2,5 ⁻³	0,037961	0,000392	0,000226	104,6106
0,5	-	-	-	-

Modelos reparameterizados para avaliação estatística de hormese

Em nosso trabalho aplicamos dois modelos logarítmico-logísticos reparameterizados para avaliar bioensaios dose-resposta em três populações de *Sitophilus zeamais*. (Brain & Cousens 1989; Cedergreen, 2005)

Modelo de Brain & Cousens

O modelo de Brain & Cousens é representado pela equação 2, nesse modelo os valores das assíntotas da curva sigmoide são representados pelas letras c, assíntota superior ou resposta na dose infinita, e letra d que corresponde à resposta ao nível do controle. A letra f representa a taxa de estímulo próxima à dose 0 ($f > \text{que } 0$ é uma condição necessária para presença de hormese) (Brain & Cousens). Nas três populações, os parâmetros do modelo ajustado foram significativos de acordo com a análise de variância (Tabelas 1 e 2). Para cada parâmetro foi calculado o respectivo desvio padrão e o intervalo de confiança. O erro padrão e intervalo de confiança do parâmetro “b” não foram calculadas, provavelmente, em função da pouca quantidade de pontos nas concentrações mais altas no bioensaio da população susceptível de Sete Lagoas. Além

disso, o valor de “f” estimado para cada modelo foi maior que zero nas três populações e essa é condição necessária para confirmação do efeito hormético de acordo com Brain & Cousens 1999. Embora a presença de hormese tenha sido confirmada através do parâmetro f, o modelo não é um bom estimador para outros parâmetros da curva como os parâmetros d e c, que correspondem às assíntotas superior e inferior. Esses valores foram mais realistas somente para a população de Sete Lagoas. Nas outras duas populações o modelo estimou valores irreais para as magnitudes de respostas observadas no bioensaio (Tabelas 2).

$$y = c + \frac{d - c + fx}{1 + \exp \{b[\ln(x) - \ln(e)]\}} \quad [2]$$

Equação 2: Reparameterização do modelo logarítmico-logístico, Modelo de Brain & Cousens. (x = dose; y = resposta; d = resposta ao nível do controle; c = resposta na dose máxima; e = dose em que o valor de $d - c$ é reduzida a 50% (ED50); b = proporcional a inclinação da reta em ED50; f = mede a taxa de crescimento do estímulo em doses próximas a zero).

Tabela 1

Regressão Não Linear (Modelo Brain & Cousens et al., 1999)						
Fonte	População	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Pr > F
Modelo	Jacarezinho	3	18267,0	6089,0	311,96	< 0,0001
	Juiz de Fora	3	2151,2	717,1	9,11	0,0181
	Sete Lagoas	2	9124,5	4562,3	304,5	0,0003
Erro	Jacarezinho	6	117,1	19,5185	-	
	Juiz de Fora	5	393,4	78,6809	-	
	Sete Lagoas	3	44,9478	14,9826	-	
Corrigido	Jacarezinho	9	18384,1	-	-	
	Juiz de Fora	8	2544,6	-	-	
	Sete Lagoas	5	9169,5	-	-	

Tabela 2

Regressão Não Linear					
Estimativa dos parâmetros do modelo de					
Brain & Cousens et al., 1999 (Equação 2)					
Parâmetros	População	Estimativa	Erro Padrão	Intervalo de confiança 95%	
d	Jacarezinho	-71,8143	9,9391	-96,1345	-47,4941
	Juiz de Fora	116,3	4,4128	104,9	127,6
	Sete Lagoas	103,9	2,2860	96,6129	111,2
c	Jacarezinho	129,4	2,5628	123,1	135,6
	Juiz de Fora	-156,9	1648,3	-4394,0	4080,1
	Sete Lagoas	2,825E-9	3,8707	-12,3186	12,3186
b	Jacarezinho	-0,7933	0,0813	-0,9922	-0,5944
	Juiz de Fora	0,7587	1,1493	-2,1957	3,7132
	Sete Lagoas	109,3	-	-	-
f	Jacarezinho	4,2663	1,4664	0,6781	7,8545
	Juiz de Fora	3,5240	33,0269	-81,3731	88,4211
	Sete Lagoas	22,2822	45,5198	-122,6	167,1

Modelo de Cedergreen

O modelo de Cedergreen foi reparameterizado a partir do modelo logaritmico logístico com o objetivo de minimizar algumas limitações do modelo de Brain & Cousens. Nessa nova reparameterização a taxa de incremento do efeito hormético é definida na equação pela substituição do parâmetro f_x (modelo de Brain & Cousens) por $f(-1/x^a)$ (Equação 2 e 3). O parâmetro $f(-1/x^a)$ passar a ser interpretado como o valor máximo de incremento na resposta próxima à dose zero e como no modelo de Brain & Cousens os parâmetros c e d representam as assíntotas da curva dose resposta sigmoideal. Por outro lado, os parâmetros “ b ” e “ e ” perdem sua interpretação como no modelo log-logístico. Essa reparameterização foi testada por Cedergreen que encontrou

significância em 69% das 51 curvas dose-resposta não significativas com o modelo de Brain & Cousens. Em nossos dados foi possível observar que o modelo de Cedergreen foi um melhor estimador para os parâmetros c e d. O parâmetro f foi positivo para todas as populações confirmando a presença de hormese no bioensaio dose resposta (Tabelas 3 e 4).

$$y = c + \frac{d - c + f \exp(-1/x^\alpha)}{1 + \exp \left\{ b \left[\frac{\ln(x)}{\ln(e)} \right] \right\}} \quad [3]$$

Equação 3: Reparameterização do modelo logarítmico-logístico, Modelo de Cedergreen (2005). (x = dose; y = resposta; d = resposta ao nível do controle; c = resposta na dose máxima; e = dose em que o valor de $d - c$ é reduzida a 50% (ED50); b = proporcional a inclinação da reta em ED50; $f \exp(-1/x^\alpha)$ = mede a taxa de crescimento do estímulo em doses próximas a zero).

Tabela 3

Regressão Não Linear (Cedergreen et al., 2005))						
Fonte	População	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Pr > F
Modelo	Jacarezinho	3	18271,7	6090,0	324,99	< 0,0001
	Juiz de Fora	3	11116,9	3705,6	12,19	<0,0058
	Sete Lagoas	3	9122,0	30,407	128,23	<0,0077
Erro	Jacarezinho	6	112,1	18,7408	-	
	Juiz de Fora	6	18,243	304,0	-	
	Sete Lagoas	2	47,4242	23,7121	-	
Corrigido	Jacarezinho	9	18384,1	-	-	
	Juiz de Fora	8	12941,1	-	-	
	Sete Lagoas	5	9169,5	-	-	

Tabela 4

Regressão Não Linear					
Estimativa dos parâmetros do modelo de					
Cedergreen et al., 2005 (Equação 3)					
Parâmetros	População	Estimativa	Erro Padrão	Intervalo de confiança 95%	
d	Jacarezinho	128,5	2,3192	122,9	134,2
	Juiz de Fora	116,9	9,0295	94,4566	138,6
	Sete Lagoas	104,3	2,6587	92,9065	115,8
c	Jacarezinho	-4,8803	7,1750	-22,4368	12,6762
	Juiz de Fora	-35,7789	84,8542	-243,4	171,9
	Sete Lagoas	-0,0770	67,4721	-290,4	290,2
b	Jacarezinho	1,0352	0,1114	0,7625	1,3079
	Juiz de Fora	0,6460	0,5774	-0,7670	2,0589
	Sete Lagoas	2,3361	258,3	-1108,9	1113,6
f	Jacarezinho	99,064	36,4414	9,8955	188,2
	Juiz de Fora	26,5573	86,5226	-185,2	238,3
	Sete Lagoas	43,6661	10372,1	-44,5845	44,6719

DISCUSSÃO

Um dos desafios para análise de dados envolvendo a manifestação de hormese é a determinação de um procedimento estatístico apropriado para uma análise confiável. A visualização gráfica permite inferir sobre determinados parâmetros do bioensaio dose-resposta, entretanto é muito importante a análise estatística apropriada para melhorar confiabilidade dos parâmetros estimados. O modelo logaritmico-logístico, tradicionalmente utilizado para análise de bioensaios dose-resposta em altas concentrações, não incorpora o efeito hormético. Dessa forma, é crescente o esforço para estabelecer um modelo estatístico adequado para avaliação da presença de hormese em curvas dose-resposta (Belz & Pielpho, 2012). Em todos os trabalhos, a reparameterização do modelo logaritmico-logístico tem sido a principal estratégia para permitir a análise de dados horméticos. Aqui nós testamos alguns dos modelos

reparameterizados a partir do modelo logaritimico-logístico para avaliar os resultados dos bioensaios de dose-resposta das três populações.

Nas três populações, a representação gráfica dos dados dose de deltametrina X % de r_i em relação ao controle mostra o comportamento bifásico da curva dose resposta (figura 1). Nesses gráficos observamos um comportamento crescente da curva (estímulo) em baixas concentrações e decrescente (inibição) em altas concentrações. Esse comportamento é observado em diversos organismos expostos a diversas fontes de estresse. Inclusive, em um trabalho anterior esse comportamento da curva foi observado na população de Jacarezinho com o mesmo inseticida usado nesse experimento utilizando estudo de tabela de fertilidade (Guedes et al 2009).

Em um modelo tradicional de avaliação dose-resposta, como o logaritmico-logístico, os dados nessa região onde ocorreram os incrementos seriam linearizados através da transformação de *probit* ou seria assumido que nenhuma indução de resposta significativa seria observada nessa faixa de concentração e sendo assim a curva seria sigmoideal e assintótica. Dessa forma, os modelos tradicionais de avaliação dose resposta, não são satisfatoriamente aplicáveis a esse tipo de comportamento. O modelo logaritmico-logístico não comporta o efeito bifásico da curva dose-resposta e a linearização da curva através da transformação de *probit* não permite a identificação desse efeito em baixas doses. Alguns modelos para avaliação desse tipo de resposta foram publicados recentemente e aqui testamos dois destes modelos para avaliarmos com algum critério estatístico a presença ou não de hormese nas três populações.

Modelo logaritmico logístico (log-logístico ou regressão logística)

A toxicidade aguda de um agente de estresse é, geralmente, expressa por um modelo de dose-resposta log-logístico. Nesse caso, a relação entre o nível de exposição ao agente de estresse e a magnitude da resposta é estabelecida pela exposição do organismo a vários níveis do agente de estresse. Comumente, bioensaios preliminares estabelecem o critério para determinação dos níveis de exposição que induzem uma magnitude de resposta maior que 0% e inferior a 100%. As respostas para cada nível de exposição são representadas em um gráfico determinando a curva dose-resposta. Em uma curva dose-resposta bem definida, onde a população apresenta distribuição normal em relação à susceptibilidade a um agente de estresse, seu formato é sigmoideal (Figura 2). O gráfico estabelecido por um modelo de dose-resposta log-logístico apresenta segmentos bem definidos ao longo da curva. A interpretação biológica de cada um

desses seguimentos tem aceitação universal dentro da toxicologia e farmacologia. Esses segmentos são descritos ao longo do texto e ilustrados na Figura 2.

O aumento do número de publicações envolvendo efeito hormético despertou o interesse de alguns pesquisadores em estabelecer modelos estatísticos robustos para análise de dados que envolvem resposta hormética (Brain & Cousens., 1989; Schabenberger et al., 1999; Cedergreen et al., 2005). Apesar dos esforços nesse sentido, nenhum dos modelos estabelecidos até o momento é suficientemente robusto para análise de dados horméticos. Os modelos disponíveis para análise de dados horméticos tem como base um modelo de regressão não-linear conhecido como logarítmico-logístico (do inglês log-logistic model) (Equação 5). Esse modelo é amplamente utilizado em bioensaios que envolvem a relação dose-resposta. Graficamente o modelo representa uma curva com formato sigmoidal e simétrico em torno de um ponto de inflexão, onde as respostas são restritas entre duas assíntotas d e c na equação 1, representadas como a região entre o segmento II e IV na figura 2.

A principal limitação desse modelo é que ele força o campo de respostas a ter um comportamento de aumento ou redução unimodal. Essa restrição não permite que um tipo de resposta como a hormética seja detectada ou representada na curva do modelo log-logístico. Além disso, nesse modelo não há parâmetro estatístico que permita avaliar a significância dos desvios que comumente ocorrem na extremidade da curva que corresponde às baixas doses. Essa é uma das razões pelas quais os desvios de resposta observados em baixas doses foram, frequentemente, desconsiderados por muito tempo na toxicologia (Calabrese 2001). Uma breve descrição dos princípios que norteiam o ajuste de um modelo logarítmico-logístico bem como sua interpretação e utilização em ensaios dose-resposta é útil para mostrar a principal razão pela qual o modelo é incapaz de medir a distribuição de respostas induzidas na faixa de exposição conhecida como zona hormética como as encontradas nas curvas dose-resposta das três populações usadas nesse trabalho.

$$y = c + \frac{d-c}{1 + \exp \{b[\ln(x) - \ln(e)]\}} \quad [4]$$

Equação 1 : Modelo monotônico logarítmico-logístico (x = dose; y = resposta; d = resposta ao nível do controle; c = resposta na dose máxima; e = resposta onde o valor de $d - c$ é reduzida a 50% (ED50); b = proporcional a inclinação da reta em ED50).

O modelo log-logístico pressupõe uma condição de normalidade em relação às distribuições de frequências de resposta induzidas pela exposição a determinados níveis de estresse. Analisando o conjunto da frequência de resposta restrito pelo modelo logarítmico-logístico é possível verificar que, extrapolando os dados para as extremidades da curva, as distribuições de resposta em doses muito baixas são lineares e a magnitude da resposta aumenta com o incremento do nível de estresse (Figura 2).

Uma relação dose-resposta, para uma população, é uma relação de tudo ou nada, ou seja, há apenas duas possibilidades para a resposta, ou ela é induzida ou não é induzida. Considerando o modelo para uma população, se um número suficiente de indivíduos dessa população é exposto a uma ampla faixa de doses, espera-se que pouquíssimos indivíduos sejam representados nas extremidades da curva. Isso porque em uma população suficientemente grande, a distribuição da frequência das respostas é normal e fundamentada pelo princípio biológico da variabilidade genética. Nesse caso, espera-se que poucos indivíduos respondam a doses mais baixas (indivíduos susceptíveis), enquanto para outra pequena parcela, representada pelos indivíduos resistentes, somente a exposição a um nível desproporcionalmente alto do agente de estresse irá induzir resposta. Por outro lado a maior frequência de resposta estará representada nas doses intermediárias às doses muito baixas e ou muito altas (Figura 2).

Uma segunda manipulação do modelo assegura que o campo de respostas fique restrito às doses intermediárias. No modelo logarítmico-logístico as extremidades da curva comumente são negligenciadas através da linearização do modelo mediante a transformação de probit (Hodgson, 2004). Nesse caso somente os níveis de resposta na região intermediária da faixa de exposição são incorporados na representação do modelo dose resposta.

A figura 2 ilustra a representação gráfica esperada por um modelo logarítmico-logístico. De acordo com a interpretação do modelo, o segmento I representa aquelas doses que não induzem resposta na população, o segmento II representa a região da abcissa (doses) que induz efeito apenas nos indivíduos mais susceptíveis da população, e o segmento III abrange a faixa de doses que induz resposta na grande maioria dos indivíduos da população. No segmento IV somente os indivíduos tolerantes da população irão responder a essa faixa de dose, enquanto no segmento V quase todos os indivíduos da população irão responder a esse nível de exposição.

A figura 2 refere-se à curva sigmoide da figura 2a linearizada através da transformação de probit. Essa transformação restringe o campo de observações a um intervalo de confiança de 95% e dessa forma exclui qualquer manifestação de resposta nas extremidades da curva. Comumente a região das abcissas são logaritimizadas enquanto a magnitude da resposta é convertida em unidades de probabilidade (probit) e nesse caso os segmentos I e V não são linearizados e dessa forma excluídos do modelo que representa os bioensaios de dose-resposta.

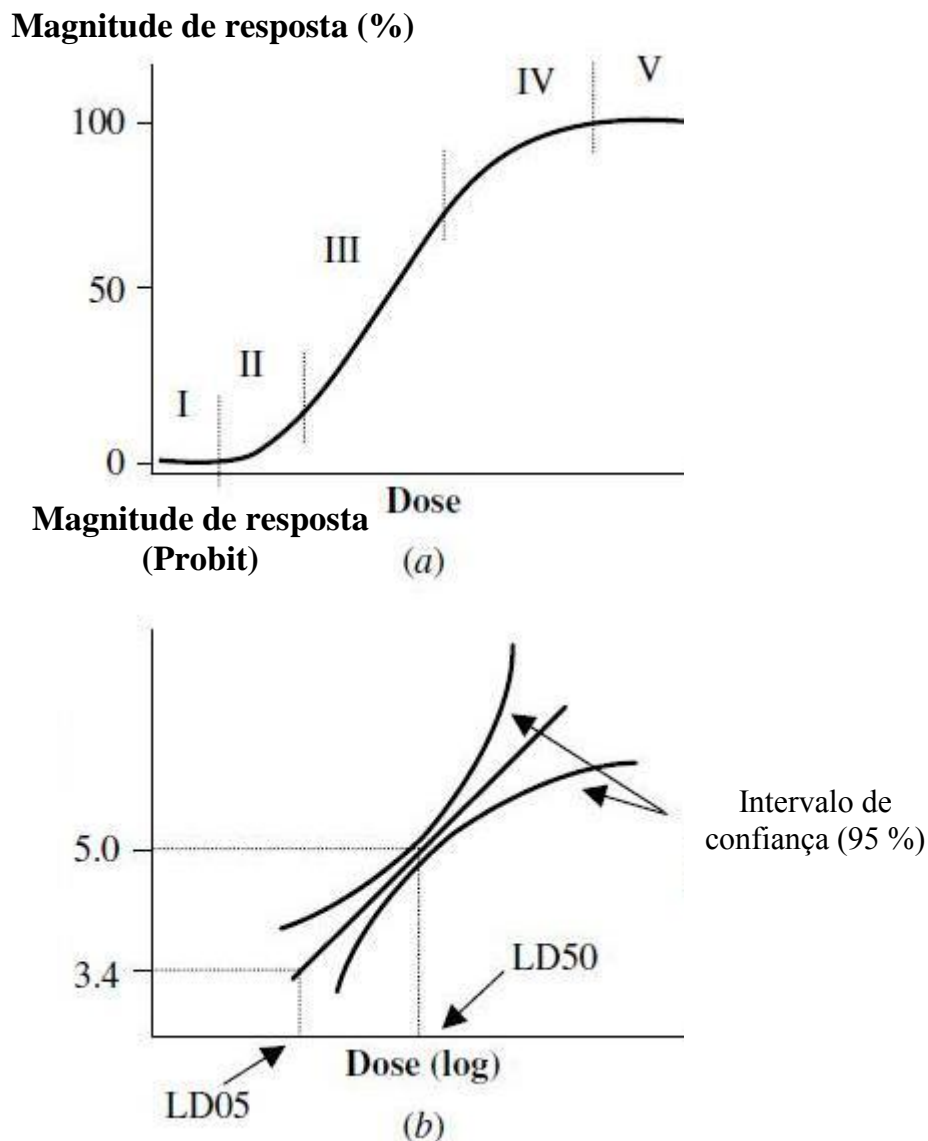


Figura 2: Curva dose resposta sigmoide (a); curva dose resposta linearizada através da transformação de probit (b); LD05= representa a dose que induz 5% de resposta; LD50= representa a dose que induz 50 % de resposta; LD = dose letal (Hodgson, 2004).

Modelo de Brain & Cousens

O modelo de Brain & Cousens foi o primeiro a ser reparameterizado a partir da função monotônica log-logística. Esse modelo foi aplicado para avaliação dos resultados do bioensaio de dose-resposta nas três populações de *Sitophilus zeamais* utilizadas nesse trabalho. A estimativa dos parâmetros do modelo é apresentada nas tabelas 1 e 2. O modelo logarítmico-logístico não é um modelo adequado para avaliar hormese e, em função das limitações expostas, provavelmente não seja um modelo adequado para avaliações dose-resposta. Um modelo adequado para incluir o efeito hormético deve ser um modelo que incorpore um comportamento bifásico na avaliação dos dados de um bioensaio dose resposta. Isso porque o efeito hormético envolve um incremento ou redução da magnitude da resposta em baixas doses e a medida que a dose aumenta o efeito na magnitude da resposta passa a ser oposto ao observado em baixas doses (Figura 1). Pela magnitude das respostas observadas em baixas doses, suas implicações são de importância relevante (Tabela 1, 2 e 3). Para mitigar as limitações do modelo logarítmico-logístico muitos autores vêm sugerindo modificações no sentido de incorporar o efeito hormético (Brain & Cousens 1989, Cedergreen 2005, Shabenberger 1999, Belz & Piepho, 2012). O artifício utilizado nesse caso é a adição de uma componente no modelo logístico (Equação 4), essa componente é responsável por medir o efeito hormético. Isso torna o modelo logístico um modelo não linear e bimodal. Um dos primeiros esforços nesse sentido foi o modelo proposto por Brain & Cousens 1989 (Equação 2).

Uma das limitações do modelo de Brain & Cousens é que o valor de "e" que corresponde a ED50 precisa ser bem estabelecido (Cedergreen et al., 2005). Para melhorar a robustez do modelo de Brain & Cousens uma nova reparameterização foi proposta, e com isso o modelo passou a permitir o estabelecimento de um valor arbitrário para a ED50 (Shabenberger, 1999) (Equação 5).

$$y = c + \frac{d-c+fx}{1 + \omega \exp \left\{ b \left[\frac{\ln(x)}{\ln(e)} \right] \right\}}, \quad \omega = 1 + 2fx \frac{\ln(e)}{d-c} \quad [5]$$

Equação 3: Reparameterização do modelo logarítmico-logístico, Modelo de Shabenberger, 1999. (x = dose; y = resposta; d = resposta ao nível do controle; c = resposta na dose máxima; e = dose em que o valor de $d - c$ é reduzida a 50% (ED50); b =

proporcional à inclinação da reta em ED50; f mede a taxa de crescimento do estímulo em doses próximas a zero).

No modelo de Brain & Cousens o parâmetro “d” corresponde à resposta ao nível do controle, enquanto “c” corresponde à magnitude da resposta na dose infinita. Os valores de entrada para estimativa desses dois parâmetros, no programa estatístico SAS, foram respectivamente 100 (resposta ao nível do controle) e zero (resposta na dose infinita). Os valores de “b” (inclinação da curva na dose x) e f (taxa de incremento na dose próxima a zero) foram arbitrariamente determinados (Cedergreen et al., 2005; Belz & Piepho, 2012).

Em nossos dados, o modelo conseguiu estimar a taxa de incremento do efeito hormético para a todas as populações ($f > 1$) (Tabelas 1 e 2). Embora, um estímulo em regiões de baixas concentrações tenha sido observado em todas as populações (Figura 1) somente para a população de Jacarezinho os parâmetros foram significativos com o modelo de Brain & Cousens (Tabela 1 e 2). De acordo com Shabenberguer essa taxa de incremento (valor de f) só é significativa para hormese se o intervalo de confiança não incluir zero.

Embora o modelo de Brain & Cousens seja um dos principais modelos reparameterizados para incorporação do efeito hormético em curvas dose-resposta. Esse modelo apresenta algumas desvantagens que o tornam pouco robusto. Uma dessas desvantagens é relacionada à restrição de valores para os parâmetros “f” e “b”. O modelo de Brain & Cousens sofre graves distorções para valores de f negativos ou quando os valores de b são menores que um. Essa restrição torna o modelo pouco robusto para aplicação em dados reais de bioensaios de dose resposta (Cedergreen, 2005).

Modelo de Cedergreen

O modelo de Cedergreen foi reparameterizado a partir do modelo de log-logístico com o objetivo de eliminar algumas limitações do modelo de Brain & Cousens. Uma dessas limitações é em relação ao valor de “b” que é restrito a valores superiores a 1 e também o valor para “f” que para um melhor ajuste do modelo precisa ter valor positivo. Uma das primeiras evidências da baixa robustez do modelo de Brain & Cousens foi quando o modelo foi aplicado em 51 curvas dose-resposta com pico em baixas doses de herbicidas, nesse experimento não foram encontradas significância quanto à resposta hormética em nenhum dos ensaios. Foi então que o modelo sofreu uma reparameterização substituindo o $f x$ por $f(-1/x^a)$ (Equação 3) essa substituição

tornou o modelo mais robusto ao minimizar a restrição para os valores de “f” e “b”. Ao testar o novo modelo nas mesmas 51 curvas dose-resposta foi encontrada significância em 69% dessas curvas com o novo modelo (Cedergreen et al., 2005).

Em nossa avaliação o modelo foi significativo nas três populações (tabelas 10, 12 e 14). O valor de f que mede a taxa de incremento do efeito hormético também foi significativo nas três populações, entretanto nas populações de Sete Lagoas e Juiz de Fora o intervalo de confiança incluiu o valor zero e isso leva a rejeição da ocorrência do efeito hormético de acordo com (Shabenderger, 1999).

Em nossos dados podemos observar que o modelo de Cedergreen foi um melhor estimador para os parâmetros “c” e “d”. Embora o parâmetro “f” tenha sido positivo em todas as populações é preciso cautela ao interpretar os dados das populações de Juiz de Fora e Sete Lagoas pelo fato de o intervalo de confiança desse parâmetro incluir o valor zero (Tabelas 11, 13 e 15).

O modelo de Cedergreen foi mais robusto para análise de nossos dados, principalmente, pela proximidade dos parâmetros estimados com aqueles obtidos em nosso bioensaio. Entretanto o modelo ainda deixa a desejar principalmente pelo fato da arbitrariedade da escolha do parâmetro α . Outro questionamento a respeito de ambos os modelos é o fato de não considerar a significância biológica do efeito hormético. Todos os modelos foram apenas numericamente reparameterizados sem considerar qual o impacto real do efeito hormético, que embora modesto pode ter uma significância biológica expressiva. Como os modelos testados foram desenvolvidos para avaliação do efeito de herbicidas em plantas, é possível que alguns parâmetros não tenham o melhor ajuste quando utilizamos o modelo para outros grupos de organismos. Por exemplo, a significância biológica em relação ao tamanho do pico do efeito hormético, bem como sua amplitude pode ser bem diferente entre plantas e insetos ou mesmo na inibição quanto a formação de tumores mediante exposição a substâncias carcinogênicas.

Conclusão

Os modelos testados nesse trabalho para determinação de hormese em curvas dose resposta representam um grande avanço em bioensaios toxicológicos que incluem o efeito hormético. Esses modelos podem descrever curvas que exibem o efeito hormético e testar sua significância. Entretanto, não podem determinar diretamente parâmetros relevantes tais como a máxima resposta do efeito hormético bem como valores de DEx. Dessa forma, esses modelos ainda são pouco robustos para uma boa avaliação de bioensaio dose resposta. Na utilização desses modelos é muito importante

que haja uma interpretação cuidadosa em relação à significância da resposta hormética. Além disso, informações quantitativas relevantes como os valores de ED_x, valores onde o incremento hormético é máximo, bem como os limites da resposta hormética na curva dose resposta não podem ser determinadas através desses modelos.

Uma das principais dificuldades para identificação do efeito hormético é o incremento modesto que geralmente é observado na curva dose resposta. Um bom modelo estatístico para avaliação de curvas dose-resposta que, envolvem o efeito hormético, deve ser capaz de avaliar com robustez estatística e significância biológica os desvios que ocorrem na região de baixas dosagens da curva dose resposta. É preciso salientar que embora os números desse incremento sejam pequenos do ponto de vista estatístico, o impacto biológico pode não ser. Por exemplo, em números absolutos houve um aumento de até 200 insetos na população de Sete Lagoas, embora isso não seja significativo de acordo com os modelos testados aqui esse incremento pode ter impacto significativo para o manejo de pragas.

Então, um modelo que seja capaz de determinar não somente a significância da resposta hormética, mas também alguns parâmetros de relevância da curva dose resposta seria o ideal para avaliação desse tipo de resposta. Isso é importante, principalmente, para que as discussões acerca do fenômeno passem de uma simples discussão entre presença e ausência para um nível onde assunto possa ser discutido em termos quantitativos acerca da magnitude da resposta hormética.

Outro fator que chama atenção com a aplicação do modelo é a não significância da resposta hormética para a população de Juiz de Fora mesmo que os valores máximos de incremento no ri tenham ficado muito próximos dos valores da população de Jacarezinho, na população de Juiz de fora o efeito hormético foi não significativo de acordo com o intervalo de confiança que inclui o valor 0. Embora não tenha sido significativo o impacto desse incremento, ele deve ser muito significativo do ponto de vista do manejo de pragas. Então, esse fator chama a atenção para a necessidade de modelos que possam determinar bem o impacto quantitativo do modelo do ponto de vista da significância biológica do efeito hormético.

Um dos fatores que mais contribui para dificuldade de reconhecer a ocorrência do efeito hormético em curvas dose resposta é o modesto estímulo observado (30 – 60%) (Calabrese). Devido a modesta magnitude da resposta, o fenômeno é muito difícil de ser observado quando os bioensaios utilizam poucas doses. Dessa forma, em futuros estudos para avaliação do efeito hormético é muito importante um cuidadoso

delineamento experimental. Podemos observar nesse trabalho que é muito importante que haja um bom número de doses tanto abaixo quanto acima do limiar conhecido como Nível de Nenhum Efeito Adverso Observado. Isso melhora a determinação dos parâmetros quando utilizamos os modelos testados nesse trabalho. Além disso tem a vantagem de determinar bem o completo efeito de um agente de estresse tanto em baixas quanto em altas doses.

A toxicologia tem sido dominada pela ênfase em altas doses nas avaliações de toxicidade. Por causa disso, muita informação acerca da performance biológica ficou por muito tempo desconhecidas. Muitas rotas alternativas de grande importância para os parâmetros de história de vida dos indivíduos ainda permanecem desconhecidos mesmo a luz de tanto conhecimento científico. Esperamos que esse trabalho assim como outros citados aqui possam contribuir para o reconhecimento do fenômeno e o estímulo para busca de um modelo robusto para determinação da presença bem como das medidas quantitativas do efeito hormético em bioensaios toxicológicos.

Referências

- Arumugam, T.V. Gleichmann, M., Tang, Sung-Chun, Mattson, M.P.** Hormesis preconditioning mechanisms, the nervous system and aging. *Ageing Research Reviews*, v.5, p.165-178, 2006.
- Abete, P., Cacciatore, F., Testa, G., Della-Morte, D., Galizia, G., Santis, D., Calabrese, C., Cioppa, A., Ferrara, N., Rengo, F. Ischemic preconditioning in the aging heart: From bench to bedside. *Ageing Research Reviews*, v.9, p.153–162, 2010.
- Alexeeff, G.F., Broadwin, R., Liaw, J., Dawson, S.V. Characterization of the LOAEL-toNOAEL uncertainty factor for mild adverse effects from acute inhalation exposures. *Regulatory toxicology and pharmacology*, v36, p.96-105, 2002.
- Araújo, R.A. ; Guedes, R. N. C. ; Oliveira, M. G. A. ; Ferreira, G. H. Enhanced Activity of Carbohydrate- and Lipid-Metabolizing Enzymes in Insecticide-Resistant Populations of the Maize Weevil. *Bulletin of Entomological Research*, v.98, p.417-424, 2008 a.
- Araújo, R.A. ; Guedes, R. N. C. ; Oliveira, M. G. A. ; Ferreira, G. H. Enhanced proteolytic and cellulolytic activity in insecticide-resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*.. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.44, p.354-359, 2008b.
- Brain, P., Cousens, R. An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, v.29, p93-96, 1989.
- Calabrese, E.J. (a) Hormesis: From marginalization to mainstream a case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment. *Toxicology and applied pharmacology*, v.197, p.125-136, 2004.
- Calabrese, E.J., (a) Toxicological awakenings: the rebirth of hormesis as a central pillar of toxicology. *Toxicology and applied pharmacology*, v.204, p.1-8, 2005.
- Calabrese, E.J., Blain, R. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. *Toxicology and applied pharmacology*, v.202, p.289-301, 2005.
- Calabrese, E.J. (a) Converging concepts: Adaptive response, preconditioning, and Yerkes-Dodson Law are manifestations of hormesis. *Ageing Research Reviews*, v.7, p. 8-20, 2008.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A. The Frequency of u-shaped dose responses in the toxicological literature. *Toxicological sciences*, v.62, p.330-338, 2001.

- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A. Hormesis: the dose-response revolution. Annual review of pharmacology and toxicology, v.43, p.175-197, 2003.
- Calabrese, E.J. (b) Hormesis: From marginalization to mainstream a case for hormesis as the default dose-response model in risk assessment. Toxicology and applied pharmacology, v.197, p.125-136, 2004.
- Calabrese, E.J., Blain, R. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. Toxicology and applied pharmacology, v.202, p.289-301, 2005.
- Calabrese, E.J. (b) Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. Environmental toxicology and chemistry, v27, p.1451-1474, 2008.
- Calabrese E.J., Hoffmann, G.R., Stanek, E.J., Nascarella, M.A. Hormesis in high-throughput screening of antibacterial compounds in *E coli*. Human & experimental toxicology, v.29, p.667-677, 2010.
- Cedergreen, N., Ritz, C., Streibig, J.C. Improved empirical models describing hormesis. Environmental Toxicology and Chemistry, v.24, p.3166-3172, 2005.
- Feinendegen, L.E. Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. The british journal of Radiology, v.78, p.3-7, 2005.
- Fragoso, D.B.; Guedes, R.N.C.; Rezende, S.T. Glutathione S-transferase detoxification as a potential pyrethroid resistance mechanism in the maize weevil *Sitophilus zeamais*. Entomologia Experimentalis et Applicata, v.109, p.21-29, 2003.
- Guedes, R.N.C.; Lima, J.O.G.; Santos, J.P.; Cruz, C.D. Inheritance of Deltamethrin resistance in a Brazilian strain of maize weevil (*Sitophilus zeamais* Mots.). International Journal of Pest Management, v.40, p.103-106, 1994.
- Henschler, D. The origin of hormesis: historical background and driving forces. Human & Experimental Toxicology, v.25, p. 347-351, 2006.
- Hodges, A.B., Ladenheim, B., McCoy, M.T., Beauvais, G., Cai, N., Krasnova, I.N. Cadet, J.L. Long-Term Protective Effects of Methamphetamine Preconditioning Against Single-Day Methamphetamine Toxic Challenges. Current Neuropharmacology, v.9, p.35-39, 2011.
- Kending, E.L, Le, H.H., Belcher, S.M. Defining Hormesis: Evaluation of a Complex Concentration Response Phenomenon. International Journal of Toxicology, v29, p.235-246, 2010.

- Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Wei, M., Fukuhima, S., Hormesis in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Journal of toxicology pathology*, v.19, p.111-122, 2006.
- Kodell, R.L. Replace the NOAEL and LOAEL with the BMDL₀₁ and BMDL₁₀. *Environmental and Ecological statistics*, v.16, p.3-12, 2009.
- Lanzillotta, A., Sarnico, I., Ingrassia, R., Boroni, F., Branca, C., Benarese, M., Faraco, G., Blasi, F., Chiarugi, A., Spano, P., Pizzi, M. The acetylation of RelA in Lys310 dictates the NF- κ B-dependent response in post-ischemic injury. *Cell Death and Disease* 1, e96, 2010.
- Lopes, K. V. G. ; Silva, L. B. ; Reis, A. P. ; Oliveira, M. G. A. ; Guedes, R. N. C. Modified alpha-amylase activity among insecticide-resistant and susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Insect Physiology*, v.56, p.1050-1057, 2010.
- Mattson, M.P. Hormesis Defined. *Ageing Research Reviews*. v.7, p.1-7, 2008.
- Murado, M.A. and Vásquez, J.A. Biphasic toxicodynamic features of some antimicrobial agents on microbial growth: a dynamic mathematical model and its implications on hormesis. *BMC Microbiology*, v.10: 220, p. 1-14, 2010.
- Mushak, P. Ad hoc and fast forward: the science of hormesis growth and development. *Environmental health perspectives*, v.117, p.1333-1338, 2009.
- Myers, J.P., Zoeller, R.T., Saal, F.S.V. A clash of old and new scientific concepts in toxicity, with important implications for public health. *Environmental health perspectives*, v.117, p.1652-1655, 2009.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* v.9, p.255–262, 1998.
- Ovelgönne, H.H., Wiegant, F.A., Souren, J.E., Van, R.H., Van, W.R. Enhancement of the stress response by low concentrations of arsenite in arsenite-pretreated Reuber H35 hepatoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.132, p.146-155, 1995.
- Prasad, S.S., Russell, M., Nowakowska, M. Neuroprotection induced in vitro by ischemic preconditioning and postconditioning: modulation of apoptosis and PI3K-Akt pathways. *Journal of molecular neuroscience*, v.43, p.428-442, 2011.
- Rattan, S.I.S. Hormesis in aging. *Ageing research reviews*, v.7, p.63-78, 2008.

- Reynolds, A.R. Potential relevance of bell-shaped and u-shaped dose-responses for the therapeutic targeting of angiogenesis in cancer. *Dose-Response*, v.8, p.253–284, 2010.
- Ribeiro, B.M.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Santos, J.P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored. Prod. Res.* 39: 21-31, 2003.
- Schabenberger, O., Tharp, B.E., Kells, J.J., Penner, D. Statistics – Statistical test for hormesis and effective dosages in herbicide dose-response. *Agronomy Journal*, 91, 713–721.
- Shen, S., Matsubae, M., Takao, T., Tanaka, N., Komatsu, S. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. *Journal of biochemical*, v.132, p.613-620, 2002.
- Shevchenko, A. Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometry sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, v.68, p.850-858, 1996.
- Silva, L. B. ; Oliveira, M. G. A. ; Guedes, R. N. C. ; Pereira, E. J. G. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases from insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Biochemistry & Molecular Biology*, v. 155, p. 12-19, 2010.
- Stanek III, E.J., Calabrese, E.J. Predicting low dose effects for chemicals in high through-put studies. *Dose-Response*, v.8, p.301–316, 2010
- Stark, J.D., Banks, J.E. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annual Review of Entomology*, v.48, p.505-519, 2003.
- Van Wijk R, Wiegant FA. Postconditioning hormesis and the homeopathic Similia principle: molecular aspects. *Human & Experimental Toxicology*, v.29, p.561-565, 2010.
- Wiegant, F.A.C., Prins, H.A.B., van Wijk, R. Postconditioning hormesis put in perspective: an overview of experimental and clinical studies. *Dose-response*, v.9, p.209-224, 2011.
- Wiegant, F.A., van Rijn, J., van Wijk, R. Enhancement of the stress response by minute amounts of cadmium in sensitized Reuber H35 hepatoma cells. *Toxicology*, v.116, p.27-37, 1997.
- Yueshu Yu, Guoqing Shen, Honglin Zhu, Yitong Lu. Imidacloprid-induced hormesis on the fecundity and juvenile hormone levels of the green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.98, p.238–242, 2010.

Zhang, Y., Shen, G., Yu, Y., Zhu, H. The hormetic effect of cadmium on the activity of antioxidant enzymes in the earthworm *Eisenia fetida*. Environmental pollution, v.157, p.3064-3068, 2009. the stress response by minute amounts of cadmium in sensitized Reuber H35 hepatoma cells. Toxicology, v.116, p. 27-37, 1997.

Schabenberger, O., Tharp, B. E., Kells, J. J., and Penner, D. (1999), "Statistical Tests for Hormesis and Effective Dosages in Herbicide Dose Response," *Agronomy Journal*, 91, 713–721.

Parte II

Perfil de expressão proteica mediante hormese induzida por
deltametrina em populações de caruncho-do-milho *Sitophilus*
zeamais (Coleoptera: Curculionidae)

Introdução

Um agente de estresse altera o estado homeostático do organismo que responde no sentido de restabelecê-lo. No ambiente, existe uma miríade de fontes de estresse potencialmente letais e a sobrevivência e perpetuação das espécies dependem da capacidade de responder ao estresse de forma adaptativamente vantajosa. Quanto maior o acúmulo de um agente de estresse no organismo maior a severidade de danos fisiológicos que eventualmente ocasiona a morte do indivíduo devido à incapacidade de restabelecer seu estado homeostático. Por outro lado, quando o indivíduo é exposto a concentrações muito baixas de um agente de estresse a interação fisiológica do organismo com esse agente é, aparentemente, vantajosa para o indivíduo e esse estímulo ou vantagem é definido como hormese (Calabrese, 2008). Sem a existência de mecanismos adaptativos de resposta ao estresse, severo ou moderado, o acúmulo de danos fisiológicos comprometeria a sobrevivência das espécies. Hormese é um tipo de resposta virtualmente conservada em todos os organismos e seu mecanismo estaria relacionado à ativação de vias adaptativas de resposta ao estresse, razão pela qual é considerada evolutivamente importante (Parsons, 2001; Calabrese & Blain, 2005). Fugir do perigo é uma das formas de lidar com as condições potencialmente letais do ambiente e, evolutivamente, essa é uma força direcionadora da mobilidade em diversos organismos. Alternativamente, a capacidade de alterar os processos fisiológicos para responder ao estresse deve ter contribuído para que esses organismos permanecessem ou ocupassem os mais variados nichos. A capacidade de responder adaptativamente aos baixos níveis de estresse no ambiente deve ter permitido a dispersão desses organismos para ambientais com condições adversas mais severas (Parsons, 2001). A resposta adaptativa aos baixos níveis de estresse é a principal hipótese que fundamenta a ocorrência de hormese (Snow et al., 2005; Mukherjee et al., 2006; Calabrese et al., 2010). Nessa segunda parte do trabalho procuramos evidências de que a exposição, mesmo em baixas doses de fontes de estresse como os inseticidas, induzem alterações fisiológicas que são, provavelmente, responsáveis pela resposta biológica (efeito hormético: incremento populacional) observado em caruncho do milho.

Uma relação dose-resposta, principal fundamento em bioensaios de toxicidade, é dependente da inequívoca associação entre o agente de estresse e o tipo de resposta biológica observada bem como do nível de exposição com a magnitude de resposta. Para isto é preciso existir um alvo com o qual o químico irá interagir e desencadear a

resposta (Calabrese & Blain, 2005). A magnitude dessa resposta é dependente da concentração do químico no sitio alvo, essa concentração depende, principalmente, da dose administrada. Uma forma confiável de dar respaldo a resposta biológica observada é relacionando os eventos moleculares com a magnitude da resposta biológica no organismo. Proteômica é uma boa estratégia para entendermos as mudanças fisiológicas que ocorrem mediante o estresse moderado. O proteoma é o conjunto completo de proteínas expressas por um genoma em um momento fisiológico específico, incluindo as isoformas e modificações pós-traducionais ocorridas nas proteínas (de-Hoog & Mann, 2004; Newton, et al., 2004).

Uma hipótese para ocorrência do efeito hormético é a indução de vias adaptativas de resposta ao estresse quando uma quantidade do agente de estresse acumula no organismo em quantidade suficiente para provocar um pequeno dano celular. A ativação dessas vias desencadearia uma resposta adaptativa supercompensatória que seria responsável pelo efeito hormético. De acordo com essa hipótese, o químico primeiro causa o dano na célula para em seguida desencadear uma cascata de respostas que irão reparar o dano e restabelecer o estado homeostático celular. Entretanto, essa resposta seria mais que suficiente para reparar o dano e por isso resultaria em uma melhora geral para o organismo (Calabrese, 2010).

Outra hipótese é a de que o efeito hormético é diretamente estimulado por receptores específicos na célula. De acordo com essa hipótese, na célula existiriam dois sub-tipos de receptores celulares envolvidos com a resposta ao estresse. Um desses receptores teria menor afinidade pelo xenobiótico e seria acionado somente quando o ambiente celular atingisse uma concentração relativamente alta do xenobiótico (provavelmente receptores envolvidos com indução de mecanismos detoxificativos envolvendo glutathione transferases, monooxigenases etc.). O outro receptor teria grande afinidade pelo xenobiótico, que mesmo em baixas concentrações desencadearia o efeito hormético observado em curvas dose-resposta (Calabrese, 2008, 2010). Adicionalmente, doses muito baixas de um químico podem estimular a produção de mais receptores resultando em um aumento de resposta, geralmente benéfica para o organismo, enquanto doses muito altas podem inibir a expressão de receptores resultando em uma diminuição da resposta hormética (Welshons et al., 2003). Para ambas as hipóteses a seleção para resistência deve contribuir grandemente para o ganho evolutivo em outros caracteres como maior eficiência na forma de lidar com o estresse moderado. A susceptibilidade à deltametrina, que é diferente entre as populações, pode

ter uma grande contribuição para a magnitude da resposta hormética. Seleção para determinadas características como a resistência a inseticida geralmente vem acompanhada de outras características como custo fisiológico que é um efeito prejudicial dependendo das condições do meio. Esse fenômeno é conhecido como efeito pleiotrópico e comumente acompanha o processo evolutivo. A magnitude da resposta hormética foi maior nas populações resistentes. Esta plasticidade diferente entre as populações pode ter sido alcançada devido aos processos pleiotrópicos que contribuíram para melhorar a resposta não somente em altas doses do inseticida, mas também mediante exposição ao estresse moderado onde o organismo consegue tirar proveito da exposição a doses moderadas do inseticida favorecendo sua performance (Carriere, et al 1994; Berticat et al., 2002, 2004; Shi et al., 2004; Guedes et al., 2006).

Embora a resposta hormética seja um fenômeno observado com relativa frequência na literatura os eventos moleculares, particularmente, aqueles envolvidos com a resposta ao estresse moderado são praticamente desconhecidos. Nesse trabalho observamos que três populações de caruncho-do-milho com desempenhos demográficos diferentes bem como diferentes níveis de resistência à inseticidas apresentam o perfil de resposta hormética quando expostas a deltametrina.

Essa proposta de trabalho tem como objetivo avaliar a ocorrência de hormese em populações de *Sitophilus zeamais* e posteriormente verificar se o perfil de expressão de proteínas também é alterado mediante exposição a doses horméticas de deltametrina. Esse trabalho é particularmente interessado em responder a duas perguntas: exposição a concentrações muito baixas do inseticida deltametrina favorece o crescimento populacional de *S. zeamais*? Há evidências de alterações fisiológicas sugestivas da existência de rotas fisiológicas alternativas determinantes de parâmetros de história de vida? Acreditamos que a descrição do modelo fisiológico do fenômeno permitirá, não somente confirmá-lo, mas dimensionar sua importância em um contexto amplo da ciência, desde as agrárias àquelas ligadas ao meio ambiente e saúde humana.

Revisão

Proteoma

Uma análise proteômica é dependente de quatro plataformas tecnológicas que são fundamentais para execução dos protocolos e correta identificação de proteínas de interesse. A primeira compreende o uso de uma metodologia que envolva um procedimento rápido e simples para separação de proteínas em uma mistura complexa. O segundo demanda que haja um método rápido e sensível para caracterização quantitativa. O terceiro depende da existência de um extenso banco de dados com informações estruturais inerentes às sequências de aminoácidos ou peptídeos que compõem as proteínas. A última plataforma envolve o emprego de programas para relacionar as informações obtidas experimentalmente com aquelas contidas nos bancos de dados (Gevaert & Vadekerckhove, 2000). As quatro plataformas podem ser utilizadas através de duas estratégias a Peptide Mass Fingerprinting (PMF) dependente do sequenciamento genômico do organismo e Seqüenciamento de novo dependente de informações sobre características estruturais de aminoácidos (Cantú et al., 2008 Zhang & Reilly 2010). Em uma análise comparativa, existem vantagens e desvantagens inerentes às duas técnicas. O que determina a escolha da estratégia a seguir para identificar proteínas de interesse é o tipo de informação disponível sobre o organismo em estudo. As estratégias de separação e quantificação relativa foram utilizadas em nosso trabalho na busca por evidências de alterações fisiológicas relacionadas ao efeito hormético observado em estudos de demografia populacional. A parte final de identificação das proteínas diferencialmente expressas não foi realizada, entretanto essas proteínas foram conservadas in gel para futura identificação.

Protein Mass Fingerprinting (PMF) é um dos principais métodos utilizados para identificação de proteínas por espectrometria de massa. A identificação de uma proteína envolve várias etapas que vão desde a correta preparação da amostra até a separação das proteínas que é comumente realizada através do gel de eletroforese ou cromatografia líquida. Gel de eletroforese bi-dimensional é o principal método de separação utilizado na técnica PMF. Essa técnica envolve a clivagem de proteínas em regiões específicas, gerando peptídeos cuja massa é obtida através de espectrômetro de massa, utilizando as tecnologias MALDI-TOF (sigla do inglês: matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight) ou ESI-TOF (sigla do inglês: electrospray ionization – time off light). Para identificação das proteínas, utilizam-se programas que relacionam a massa obtida

experimentalmente com aquelas geradas teoricamente em um banco de dados. A identificação de uma proteína pelo método PMF tem como principal vantagem a praticidade, a rapidez e o baixo custo. Entretanto, um dos fatores limitantes é que o método é dependente de uma base de dados que contenha informações sobre o completo genoma do organismo em estudo para permitir a correlação dos dados obtidos experimentalmente com informações estruturais de proteínas geradas teoricamente a partir das informações do genoma.

Além disso, é necessária uma grande quantidade de peptídeos para obter informação suficiente para identificação da proteína o que nem sempre é possível. A amostra pode conter mistura de proteínas e pode resultar em número insuficiente de peptídeos de cada proteína para correta identificação na correlação com a base de dados. Mudanças pós-transcrição podem resultar em alteração na massa da proteína que não estão previstas na base de dados. Embora o PMF seja um método prático e relativamente eficiente, o sucesso para identificar uma proteína por esse método tem como pré-requisito fundamental a existência de informações sobre a proteína em um banco de dados o que nem sempre é possível. Nesse caso outro método deve ser empregado para identificar a proteína (Gevaert & Vadekerckhove, 2000; Horn et al., 2004; Thiede et al., 2005; Padliya & Wood, 2008).

O processo do seqüenciamento de novo envolve a digestão proteolítica, dissociação do peptídeo, análise em espectrômetro de massa em tandem e interpretação dos fragmentos resultantes. Nesse processo a sequência de aminoácidos de um peptídeo é determinada mediante fragmentação da proteína e ionização dos peptídeos em espectrômetro de massa em tandem. Os peptídeos ionizados são seletivamente fragmentados e a razão massa/carga é medida. Posteriormente a sequência de aminoácidos do peptídeo é obtida manualmente através da relação do seu espectro de massa com um espectro esperado para sua correspondente sequência de aminoácidos. Seqüenciamento de novo é uma das alternativas para identificação de proteínas em organismos cujo genoma não é conhecido, sendo uma de suas principais vantagens. Esse método não depende de informações sobre proteínas previamente contidas em um banco de dados. Entretanto, a execução da metodologia é mais trabalhosa e cara e os resultados são difíceis de serem analisados. A técnica seqüenciamento de novo depende do conhecimento da massa dos aminoácidos contidos em uma sequência peptídica. Alguns aminoácidos têm massa parecida como a leucina e a isoleucina, isso aumenta as chances de erro na interpretação da sequência de aminoácidos nos peptídeos. É uma

técnica importante para expansão do banco de dados de proteínas de organismos cujo genoma ainda não é conhecido, mas muito difícil de ser analisada o que a torna passível de erros (Dančik et al., 1999; Cagney and Emili 2002; Cantú et al., 2008).

Estratégias para identificação de spots diferencialmente expressos

Shotgun proteomics evita a modesta eficiência de separação e pobre sensibilidade do espectro de massa associado com a análise de proteínas intactas. A estratégia shotgun proteomics utiliza fragmentos de peptídeos obtidos da digestão proteolítica para identificar proteínas de uma amostra através da espectrometria de massa. Nessa técnica, os pequenos peptídeos oriundos de uma mistura são utilizados para obter informações qualitativas e quantitativas sobre as proteínas da mistura original. Essa caracterização pode ser obtida mediante fracionamento através da cromatografia líquida, para reduzir a complexidade da amostra, e posterior análise em espectrômetro de massa em tandem (MS/MS). O espectro de massa é comparado com as informações obtidas em um banco de dados de proteínas e os peptídeos da amostra são identificados. Essa técnica permite identificar e quantificar centenas de proteínas em uma única análise utilizando pequenos peptídeos e, comparado com outras técnicas que utilizam a proteína intacta para caracterização, a estratégia shotgun melhora consideravelmente o processo de separação e a resolução do espectro de massa. (Alves et al., 2007; Wienkoop & Weckwerth, 2006; Cox and Phillips, 2007; Fournier et al., 2007; Hu et al., 2007; Liao et al., 2009).

A análise proteômica feita através da estratégia shotgun proteomics identifica proteínas a partir de pequenos peptídeos gerados pela digestão proteolítica de uma mistura de proteínas. Embora seja uma técnica com boa resolução para identificação em análises proteômicas, possui algumas restrições quando a amostra é composta por uma mistura muito grande de proteínas que prejudicam a qualidade dos resultados em função da complexa mistura de peptídeos que ao gerados após a fragmentação. Dessa forma, um pré-fracionamento dos peptídeos contidos na amostra melhora os resultados obtidos pela estratégia shotgun para identificação de proteínas. Esse pré-fracionamento pode ser feito através da focalização isoelétrica (IEF) que permite obter um refinamento adicional no processo de identificação de proteínas através da separação de misturas de peptídeos ou proteínas pelo seu ponto isoelétrico, servindo como um filtro adicional para identificação da proteína de interesse (Ros et al., 2002; Michel et al., 2003; Hörth et al., 2006; Krijgsvelde et al., 2006; Chenau et al., 2008).

A focalização isoelétrica é uma técnica eletroforética de alta resolução que pode ser aplicada em numa análise proteômica ingell ou offgel. Essa técnica é utilizada para separar biomoléculas anfóteras através de seu ponto isoelétrico (PI) mediante aplicação de um campo elétrico em um gradiente de pH (Lam et al., 2007). Essa focalização isoelétrica pode ser realizada mediante emprego da técnica da eletroforese off-gel (OGE). Através dessa técnica peptídeos e proteínas podem ser separados de acordo com seu ponto isoelétrico na própria solução. Um modelo off-gel é composto por uma câmara de fluxo com vários compartimentos separados por um gradiente linear de pH, estrategicamente, constituído por paredes que funcionam como um imobilizador de pH (IPG) que tampona uma fina camada de solução. Quando uma amostra contendo uma mistura de proteínas é colocada nessa câmara e submetida a um campo elétrico as proteínas fluem através da câmara até serem imobilizadas em um compartimento que neutraliza sua carga. Isso permite uma alta resolução no que diz respeito à separação de uma mistura de proteínas ou peptídeos e tem a grande vantagem de permitir o trabalho com amostras em pequena escala (Ros et al., 2002).

Em uma estratégia proteômica shotgun a mistura de proteínas contidas em uma amostra são submetidas à digestão antes de sofrerem alguma forma de fracionamento. Os peptídeos obtidos dessa digestão podem ser submetidos a um método de separação antes da análise em espectrômetro de massa. Dessa forma, a técnica é baseada em uma estratégia proteômica multidimensional onde a separação dos peptídeos em uma primeira dimensão, pode ser realizada através de técnicas como a cromatografia líquida (LC) de troca catiônica forte (SCX), focalização isoelétrica in-gel, eletroforese por capilaridade (CE) ou cromatografia líquida de fase reversa (RP-LC) (Essader et al., 2005; Waller et al., 2008). Algumas dessas técnicas de separação têm o inconveniente de ser muito trabalhosa para análises de rotina e de eficiência resolutive passível de melhora (Ros et al., 2002; Smith, 2005; Lam et al., 2006; Chenau et al., 2008; Lashanda et al., 2008; Pan et al., 2009).

A técnica de separação através da focalização offgel é uma alternativa que substitui, de forma mais eficiente, outras técnicas como as citadas acima na execução da primeira dimensão numa estratégia proteômica bidimensional shotgun (Ros et al., 2002; Lam et al 2006; Waller et al 2008). Nesse caso, a identificação de proteínas em uma amostra poderia ser feita em duas dimensões. Numa primeira dimensão os peptídeos obtidos da digestão seriam submetidos ao equipamento focalizador offgel para separação de acordo com o seu ponto isoelétrico. Em uma segunda dimensão, os

peptídeos são coletados e submetidos a um espectrômetro para separação de acordo com sua massa e posterior cruzamento das informações obtidas experimentalmente com aquelas contidas em um banco de dados para identificação da proteína (Waller et al., 2008).

Em proteômica, a separação de proteínas através do gel de eletroforese bidimensional (gel 2-D) seguida pela espectrometria de massa são metodologias muito utilizadas em quantificação de proteínas (Wu et al., 2006; Fenselau, 2007). Entretanto, a resolução relativamente baixa na separação das proteínas através do gel 2-D interfere na precisão do processo de separação e contribui para elevar o erro experimental nas análises quantitativas (Fournier, 2007; Zhu et al., 2010). Dessa forma, novas metodologias utilizando técnicas de separação de misturas complexas como a shotgun em uma estratégia multidimensional MudPIT (do inglês: multidimensional protein identification) aliada a modernas técnicas de espectrometria de massa têm, alternativamente, sido utilizada como uma ferramenta mais eficiente em relação às técnicas dependentes do gel 2-D (Wolters et al., 2001; Bantscheff et al., 2007; Delahunty & Yates III, 2007; Jones et al., 2007) (Figura 3).

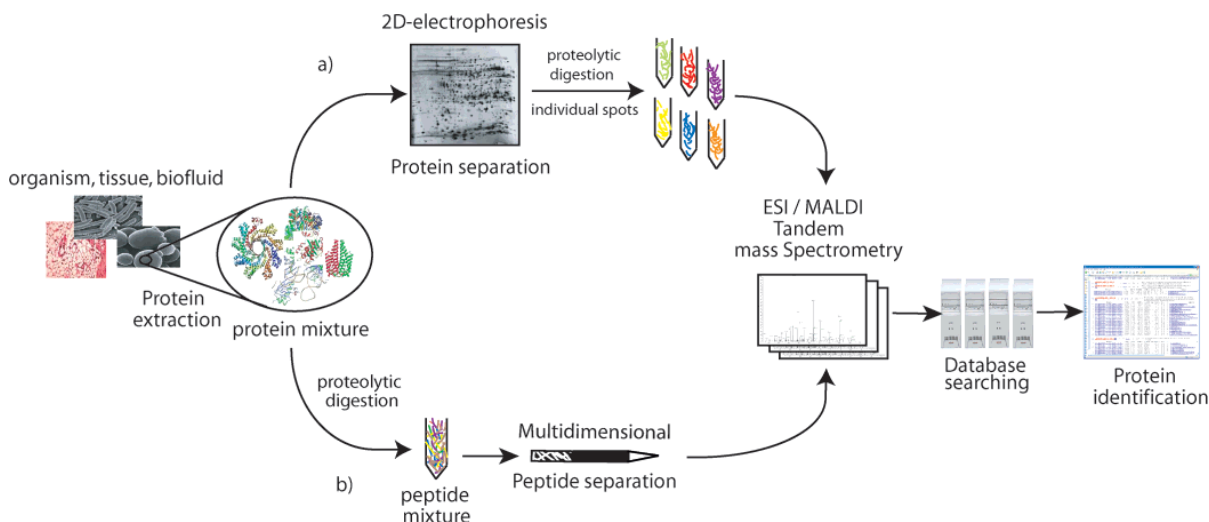


Figura 3: Alternativas para análise proteômica através de técnicas (a) dependente do gel e (b) não dependente de gel (Fournier et al., 2007).

Recentemente têm-se empregado uma técnica de alta resolução baseada na teoria de diluição de isótopos estáveis. Essa teoria preconiza que peptídeos com isótopos marcado são idênticos a sua contraparte nativa e dessa forma os dois peptídeos terão o mesmo comportamento durante a cromatografia ou análise em espectrômetro de massa. O espectrômetro de massa é capaz de reconhecer a diferença entre as duas formas de modo que a quantificação é obtida pela diferença de intensidade dos espectros das

formas marcadas e não marcadas. Nessa técnica o controle é marcado com um isótopo leve enquanto a amostra é marcada com isótopo pesado. Após a marcação as duas amostras são misturadas e passam por um processo de digestão. Em seguida os peptídeos são separados por cromatografia líquida e analisados em espectrômetro de massa (Figura 3). Duas metodologias de quantificação, através da técnica de marcação de isótopos, muito utilizadas são a ICAT (do inglês: isotope-coded affinity tag) e a iTRAQ (sigla derivada do inglês: isobaric tags for relative and absolute quantification) (Wu et al., 2006; Kocher et al., 2009). A metodologia ICAT consiste na marcação isotópica de resíduos de cisteína (Tao & Aebersold, 2003; Fenseslau, 2007; Hekmat et al., 2008). A metodologia iTRAQ é baseada na introdução de marcadores que se ligam a grupos amino livres no N terminal de todos os peptídeos e nas cadeias laterais internas com resíduos de lisina. Posteriormente, os peptídeos marcados em duas amostras são identificados em espectrômetro de massa pela sobreposição dos picos que apresentam relação massa/carga distintas em função do tipo de isótopo ligado, sendo a relação entre a área dos dois picos uma medida quantitativa relativa à expressão da proteína (Wu et al., 2006; Hekmat et al., 2008; Kocher et al., 2009).

Embora a estratégia de marcação de isótopos represente uma melhora nas técnicas de quantificação, ela ainda apresenta algumas limitações relacionadas a dificuldades operacionais e custos dos reagentes utilizados para marcação (Bantscheff et al., 2007; Wang et al., 2008). Assim, outras metodologias para análise quantitativa surgiram como alternativa à utilização das técnicas envolvendo marcação isotópica. Uma dessas alternativas é a LFQP (sigla derivada do inglês: label-free quantitative proteomics). Essa técnica separa e identifica milhares de proteínas de uma amostra biológica complexa onde a abundância relativa de uma proteína pode ser determinada pela intensidade ou pela contagem dos picos espectrais (Wang et al., 2008; Zhu et al., 2010) (Figura 4 e 5). Entre as estratégias para quantificação de proteínas em análises proteômicas a técnica LFQP aparece na literatura como uma técnica emergente e promissora que vem sendo aperfeiçoada para figurar entre as principais estratégias de quantificação em análises proteômicas (Levin et al., 2007; Xun et al., 2009; Zhang et al., 2010; Zhu et al., 2010).

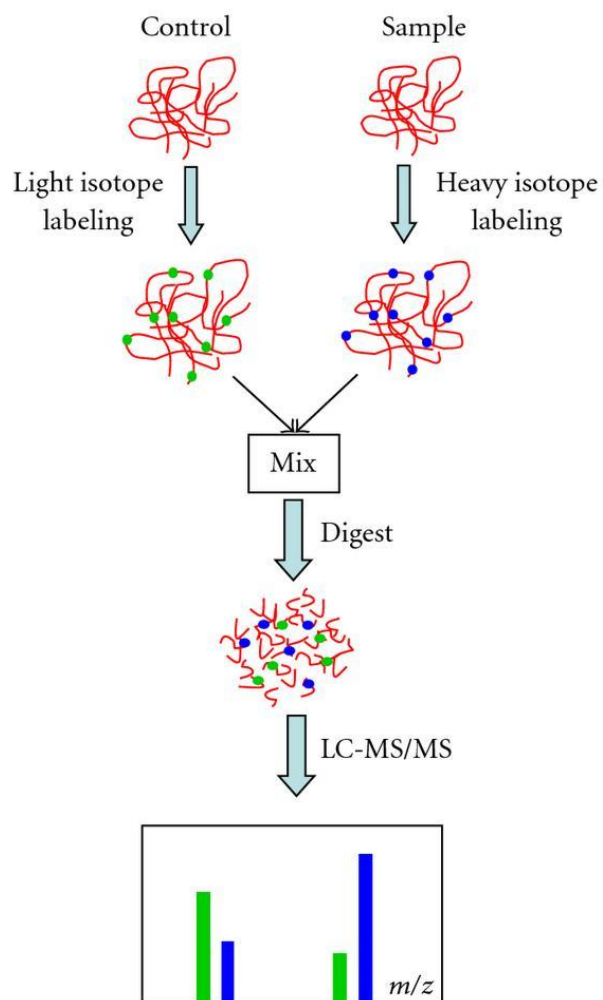


Figura 4. Esquema de uma estratégia de quantificação através da marcação de isótopos. (Zhu et al., 2010)

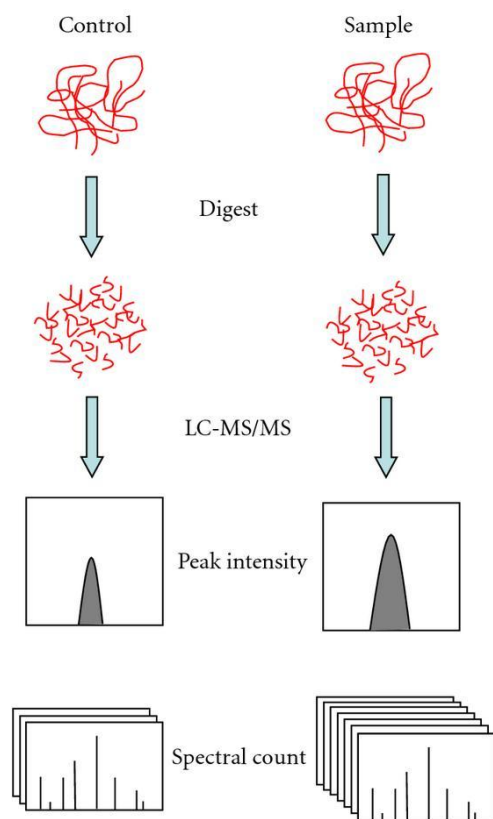


Figura 5. Esquema de estratégia de quantificação de proteínas através da técnica Label-Free Quantitative Proteomic (LQFP) (Zhu et al., 2010).

Material e Métodos

Insetos

Três populações de *Sitophilus zeamais* foram usadas no estudo, sendo uma delas padrão de susceptibilidade e proveniente do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (EMBRAPA Milho e Sorgo - CNPMS), localizado na cidade de Sete Lagoas – MG. Esta população é considerada como padrão de susceptibilidade a inseticidas piretróides e vem sendo mantida, sem exposição a inseticidas, em condições de laboratório por aproximadamente 20 anos (Guedes *et al.*, 1994; Fragoso *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2003). As outras duas populações são altamente resistentes a piretróides. Uma delas, coletada em moinhos de grãos na cidade de Juiz de Fora – MG, Brasil, no início de 1999 e estabelecida a partir de 500 indivíduos, é também resistente ao malation (Fragoso *et al.*, 2003). A segunda população resistente foi coletada

originalmente em unidades armazenadoras de semente de milho em Jacarezinho – Paraná, Brasil no final da década de 80 sendo altamente resistentes a DDT e piretróides. Todas as populações vêm sendo criadas em grãos de milho isentos de inseticidas e mantidas em condições controladas de temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), umidade ($70 \pm 5\%$) e fotoperíodo (LD 12:12 h).

Tratamento dos insetos

As amostras de insetos em quantidade suficiente para realização dos bioensaios de exposição e posterior extração de proteínas foram obtidas mediante replicação das populações em grãos de milho isentos de resíduos de inseticidas. Os insetos das populações de Sete Lagoas, Jacarezinho e Juiz de Fora foram replicados utilizando aproximadamente dois gramas de insetos para cada 1 kg de milho em seis frascos de vidro com volume de 1000 mL por população. Insetos não-sexados das populações de Sete Lagoas, Jacarezinho e Juiz de Fora foram mantidos em grãos de milho acondicionados em potes de vidro por aproximadamente 30 dias em local de temperatura e luminosidade controlada. Os insetos foram mantidos nesses frascos em sala com temperatura controlada $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo LD 12:12 por um período entre 90 e 100 dias dependendo da população.

Bioensaio de exposição à concentração hormética de deltametrina

Foram utilizados 300g de grãos de milho serão tratados com a formulação comercial do inseticida piretróide deltametrina (formulação K-obiol 25 CE com 25 g de deltametrina por litro de formulação). As amostras com 1 kg de milho foram tratadas com a dose que induziu a maior magnitude de estímulo no bioensaio de demografia. Foram utilizadas três repetições para cada tratamento. Os grãos foram acondicionados em potes de vidro e em cada pote foi colocado 1,5g de insetos, em seguida os potes foram acondicionados em um ambiente controlado com temperatura de aproximadamente 27°C e fotoperíodo de 12/12 h. Os insetos foram acondicionados por 4 dias, após o qual foram congelados com nitrogênio líquido e armazenados a -80°C .

O inseticida foi aplicado em um volume de calda de 7 mL/Kg de grãos de milho através de um pulverizador pneumático com pressão aproximada do jato de 3 bar. Os grãos foram colocados em uma bandeja plástica e o jato direcionado manualmente a uma altura aproximada de 20 cm. Durante a aplicação do inseticida os grãos foram cuidadosamente revolvidos com o objetivo de realizar uma aplicação uniforme do inseticida.

Extração de proteínas

Para extração das proteínas do caruncho foi utilizado o protocolo descrito por Shen et al. (2002), com modificações (Mesquita et al., 2009). Amostras contendo 1,5 g de insetos foram pulverizadas em almofariz pré-resfriado com nitrogênio líquido. A amostra de insetos pulverizada foi ressuspensa e solubilizada por 1 hora a 4 °C em 10mL de tampão de extração (Tris HCl pH 7,5 40mM; Sacarose 250 mM; EDTA 10mM; Triton-X-100 1%; DTT 1mM; PMSF 1mM; 2-mercaptoetanol 2%). Essa amostra foi centrifugada a 6000 g durante 15 minutos a uma temperatura de 4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e para que as proteínas foram precipitadas, 15mL de TCA 10% (ácido tri-cloro acético) foram adicionados em cada amostra. Doze horas após a adição do TCA as amostras foram novamente centrifugadas a 6000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado quatro vezes com 5mL de acetona gelada ou até a obtenção de uma amostra bem clara. Entre o intervalo de cada lavagem com acetona, o precipitado foi ressuspensa mediante agitação no vortex e posteriormente centrifugada por 4 minutos a 6000 g. A última lavagem foi realizada com etanol 80% para remoção do excesso de acetona. Após a lavagem, o precipitado foi desidratado em bomba de vácuo e armazenado a -20 °C. Posteriormente, o precipitado foi dissolvido em tampão de amostra para gel bi-dimensional (7M uréia, 2M Tiouréia, 4% CHAPS, 2% IPG-buffer (Amersham Biosciences), 80mM DTT) e sonicado três vezes em gelo com duração de 1 minuto por sonicação. A concentração protéica das amostras foi determinada de acordo como método de Bradford (1976). Todas as amostras foram armazenadas a -20 °C até separação por eletroforese bidimensional.

A análise de degradação de proteínas em gel SDS-PAGE foi realizada de acordo com Laemmli (1970). As amostras foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e aplicadas em gel SDS-PAGE 12% (40 µg de proteínas em cada poço). Os géis foram corados com Coomassie coloidal.

Eletroforese bi-dimensional

A primeira dimensão ou focalização isoelétrica (IEF) foi realizada em fitas de 24 cm com gradientes de anfólinos com pH 3-11 (GE Healthcare Upsala, Suécia). As fitas foram reidratadas por 14-20 h em 450 µl de tampão de reidratação (7M uréia, 2M Tiouréia, 2% CHAPS, 0,002% azul de bromophenol, 2% IPG-buffer, 0,2% DTT) contendo 1mg de proteína das amostras.

A focalização isoeétrica foi realizada em um sistema IPGphor (GE Healthcare Upsala, Suécia) a 20 °C, corrente máxima de 0,05 mA por tira IPG, etapas 200 V por 1 hora; 500 V por 1 hora; 1000V por 1 hora; 8000 V por 3 horas; 8000 V por 3:45 horas. As fitas foram equilibradas em duas etapas, 15 minutos em cada etapa, antes de iniciar a focalização. Para o equilíbrio na primeira etapa foi utilizado 1% de DTT e na segunda etapa 2,5% de iodoacetamida ambos diluídos em solução de equilíbrio (6M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol, 0,01M Tris-HCL pH 8,8).

A separação na segunda etapa foi realizada na cuba PROTEAN DaltSIX (GE Healthcare Upsala, Suécia) com espaçadores de 1,0 mm em gel de poliacrilamida 12,5%. As tiras foram lavadas com o tampão de corrida antes de colocá-la no topo do gel para remover o excesso da solução de equilíbrio. Um pedaço de papel de filtro umedecido com 3µL da solução de marcadores de peso molecular foi adicionado ao lado da extremidade ácida da tira, o topo do gel foi selado com agarose 0,5%.

A corrida foi inicializada com corrente de 15mA por 30 minutos na primeira etapa e 40mA por gel durante 6 horas a 12 °C. Para eletroforese bidimensional foram utilizadas três repetições com o objetivo de confirmar a reprodutibilidade e permitir a análise estatística na avaliação das imagens.

Visualização das proteínas e análise das imagens.

As proteínas presentes nos géis bidimensionais foram evidenciadas através da imersão por 12 horas em solução 1% de azul de Coomassie R-250 e descorado com metanol: ácido acético: água (40:10:50 v/v) em 3 lavagens de 30 minutos. Posteriormente os géis foram imersos em solução de ácido acético 5% e deixados por 12 horas até revelação dos “spots”.

Os géis foram fotodigitalizados no aparelho Image Scanner III (GE-Healthcare, 2004) e as imagens foram calibradas com o software Labscan (GE-Healthcare). A análise de comparação entre as imagens foi realizada automaticamente, com intervenção manual quando necessário, através do software ImageMaster 2D Platinum 7.5 (GE Healthcare). A comparação foi feita entre grupos de uma mesma população expostos e não expostos a concentração hormética de deltametrina, considerando três repetições para cada tratamento. Foram considerados diferencialmente expressos somente os spots com variação de sobreposição de medidas (Ratio) acima de 1,5 e ANOVA com $p < 0,05$. Intensidade, volume e saliência dos spots foram previamente analisados para ajuste dos parâmetros que possibilitasse melhor precisão na identificação e

quantificação dos spots. Após o estabelecimento de pontos de referência, os géis foram comparados automaticamente. As triplicatas foram analisadas automaticamente.

Na análise o programa localiza, quantifica e faz a correspondência entre os spot nos três géis de cada triplicata e entre as triplicatas tratadas e não tratadas. A quantificação relativa de cada spot foi realizada através da normalização do volume que é posteriormente dividido pelo volume total de todos os *spots* no gel e multiplicada por um fator constante de valor 100 produzindo uma porcentagem de volume de cada spot. Os valores de área, volume, volume normalizado, intensidade normalizada bem como a locação dos valores de ponto isoelétrico e massa molecular da 2ª dimensão de todos os *spots* (pI e MW teóricos), foram analisados pelo programa que quantificou e identificou os spots diferencialmente expressos entre os grupos tratados e não tratados.

Resultados

Três populações de caruncho do milho foram expostas durante 120 horas em uma concentração de deltametrina que induziu um máximo pico na taxa instantânea de crescimento populacional (r_i) de acordo com o bioensaio de dose-resposta. As proteínas totais de cada população foram extraídas e submetidas à separação bidimensional em gel de eletroforese (Figura e anexos).

O perfil de expressão de proteínas das populações de Jacarezinho, Juiz de Fora e Sete Lagoas foi analisado através das imagens fotodigitalizadas e revelou *spots* bem resolvidos e reprodutíveis entre os pontos isoelétrico de 3 a 11 e entre as massas moleculares de 15 a 100 kDa (Figuras 6, 7 e 8). Foram identificadas 1204 *spots* de proteínas bem resolvidos e com correspondência (Matches) entre as populações tratadas e não tratadas de Jacarezinho, 1253 na população de Juiz de Fora e 885 na população de Sete Lagoas.

Na população de Jacarezinho foram identificados 37 *spots* de proteínas diferencialmente expressas de acordo com a significância para valores de $p < 0,05$ pela ANOVA. Entre os spots diferencialmente expressos, 31 *spots* sofreram alteração na quantidade relativa após o tratamento com inseticida. Foi detectado aumento na expressão de 23 *spots* e em pelo menos um desses *spots* o aumento foi superior a 1,5 vezes em relação ao controle (Figura 6). Por outro lado houve redução significativa no volume de 8 *spots*. Três *spots* de proteínas foram expressas somente na população tratada enquanto três outros spots foram completamente inibidos após o tratamento com deltametrina (Figura 9) (Tabela 16).

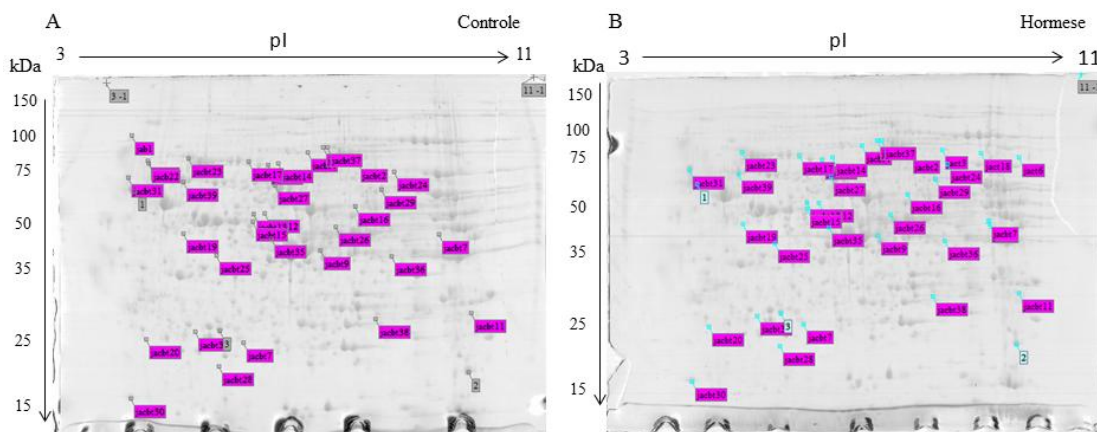


Figura 6: Spots destacados com retângulo indicando perfil de alteração na expressão de proteínas da população de Jacarezinho, A população controle; B população exposta à deltametrina.

Na população de Juiz de Fora foram identificados um total de 16 spots diferencialmente expressos de acordo com a significância para valores de $p < 0,05$ pela ANOVA. Após 120 horas de exposição à deltametrina, foi observado aumento na expressão de 12 *spots* de proteínas e em apenas três *spots* houve redução na expressão. O *spot* JFT13 revelado no gel do tratamento da população de Juiz de Fora foi detectado como expressão de nova proteína induzida pelo inseticida (Figura 7) (Tabela 17).

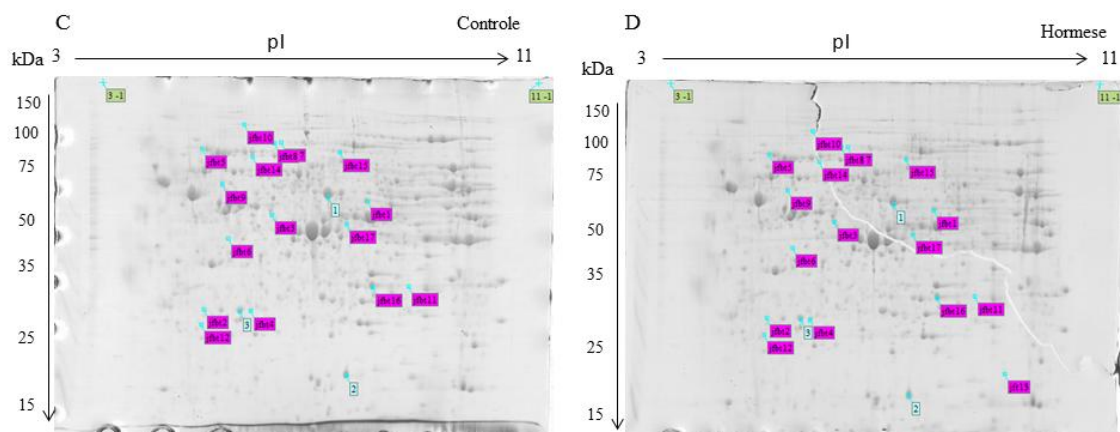


Figura 7: Spots destacados com retângulo indicando perfil de alteração na expressão de proteínas da população de Juiz de Fora, C população controle; D população exposta à deltametrina.

Na população de Sete Lagoas foram identificadas 21 *spots* de proteínas diferencialmente expressas de acordo com a significância para valores de $p < 0,05$ pela ANOVA. Apenas dois desses *spots* tiveram aumento significativo entre a população não tratada e tratada. Após a exposição a deltametrina, houve redução significativa em 11

spots de proteínas. Nas populações tratadas, 20 *spots* de proteínas foram completamente inibidos e somente um novo *spot* foi induzido nessa população (Tabela 15, Figura 8).

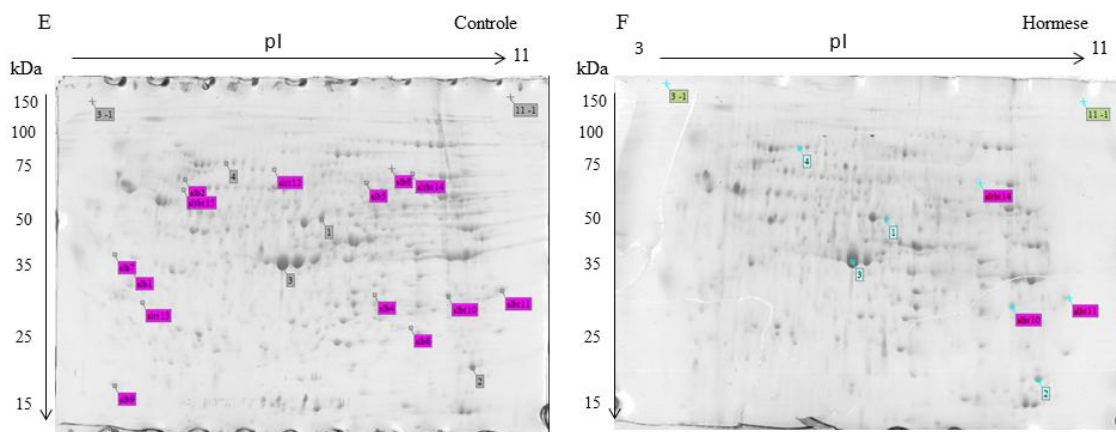


Figura 8. Spots destacados com retângulo indicando perfil de alteração na expressão de proteínas da população de Sete Lagoas, E população controle; F população exposta à deltametrina.

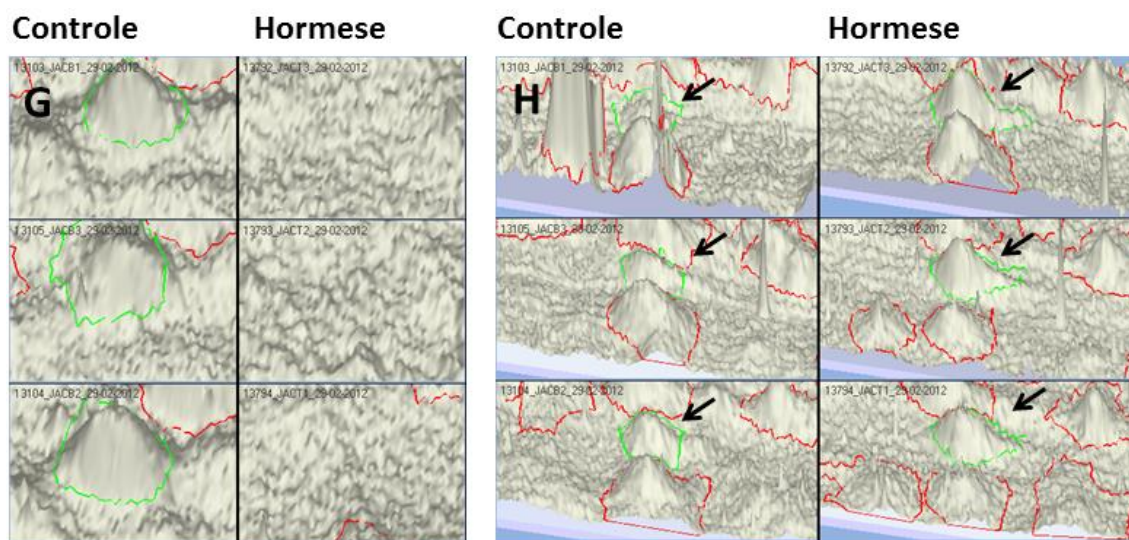


Figura 9: (G) Imagem tridimensional mostrando a inibição de expressão após tratamento com deltametrina no spot com ID jacb22 (H); Imagem tridimensional mostrando o aumento de expressão no *spot* com ID jact2, estatísticas na tabela 16.

Tabela 15: perfil de expressão diferencial de spots de proteínas na população de Sete Lagoas (aumento ou redução). Valores precedidos de sinal negativo indica que houve redução no volume do spot; valores positivos indicam aumento no volume do spot. Valores nas colunas Sete Lagoas (branco e tratado) representam a razão matemática da expressão diferencial. Spot ID representa a identificação do spot no gel.

(slt= presente somente no tratado; slb presente somente no controle).

Correspondência 1 = (spot presente, somente, em um dos géis) Correspondência 2 = (spot presente nos dois géis)

Identificação do spot	Correspondência	Sete Lagoas		Anova
		Branco	Tratado	
slbt33	2	-1,14356	1,14356	0,0492183
slbt19	2	1,54698	-1,54698	0,00732924
slbt23	2	-2,01367	2,01367	0,0332381
slbt10	2	1,11482	-1,11482	7,40E-04
slbt31	2	1,07399	-1,07399	0,0360638
slbt29	2	1,4918	-1,4918	0,0145337
slbt30	2	2,96369	-2,96369	6,41E-05
slbt22	2	1,49313	-1,49313	0,00941729
slbt30	2	1,19597	-1,19597	0,0146882
slbt24	2	1,31072	-1,31072	0,0111432
slbt14	2	1,75209	-1,75209	0,00301561
slbt18	2	1,51433	-1,51433	0,0039079
slb9	1	1,00E+06	1,00E+06	4,26E-04
slb23	1	1,00E+06	1,00E+06	0,003791
slb8	1	1,00E+06	1,00E+06	0,013182
slb25	1	1,00E+06	1,00E+06	0,011872
slb6	1	1,00E+06	1,00E+06	7,98E-06
slb27	1	1,00E+06	1,00E+06	0,012762
slb11	1	1,00E+06	1,00E+06	9,04E-04
slb4	1	1,00E+06	1,00E+06	5,49E-06
slb1	1	1,00E+06	1,00E+06	5,99E-08
slb7	1	1,00E+06	1,00E+06	1,05E-05
slb16	1	1,00E+06	1,00E+06	0,00192
slb20	1	1,00E+06	1,00E+06	0,00736
slb17	1	1,00E+06	1,00E+06	0,06132
slb5	1	1,00E+06	1,00E+06	2,15E-04
slbt15	1	1,00E+06	1,00E+06	0,00381
slb17	1	1,00E+06	1,00E+06	0,002155
slb8	1	1,00E+06	1,00E+06	6,22E-05
slb2	1	1,00E+06	1,00E+06	4,15E-07
slb12	1	1,00E+06	1,00E+06	0,002323
slb13	1	1,00E+06	1,00E+06	0,002916
slb21	1	1,00E+06	1,00E+06	5,53E-07

Tabela 16: perfil de expressão diferencial de spots de proteínas na população de Jacarezinho (aumento ou redução). Valores precedidos de sinal negativo indica que houve redução no volume do spot; valores positivos indicam aumento no volume do spot. Valores nas colunas Jacarezinho (branco e tratado) representam a razão matemática da expressão diferencial. (jact= presente somente no tratado; jacb presente somente no controle.) Correspondência 1 = (spot presente, somente, em um dos géis) Correspondência 2 = (spot presente nos dois géis)

Identificação do Spot	Correspondência	Jacarezinho (branco)	Jacarezinho (Tratado)	Anova
jacbt30	2	-1,09475	1,09475	0,028942
jacbt28	2	-1,09185	1,09185	0,025517
jacbt7	2	-1,12852	1,12852	0,011374
jacbt20	2	-1,2148	1,2148	0,010282
jacbt33	2	-1,05747	1,05747	0,035318
jacbt38	2	-0,87427	0,87427	0,546959
jacbt11	2	-1,03319	1,03319	0,086589
jacbt36	2	-1,19053	1,19053	0,037226
jacbt25	2	-1,22464	1,22464	0,022255
jacbt9	2	-1,36614	1,36614	0,008489
jacbt35	2	-1,13153	1,13153	0,036809
jacbt19	2	1,17119	-1,17119	0,009346
jacbt26	2	-1,14615	1,14615	0,023532
jacbt15	2	-1,22727	1,22727	0,00452
jacbt12	2	-1,19904	1,19904	0,026368
jacbt13	2	-1,44284	1,44284	0,002106
jacbt16	2	1,16793	-1,16793	0,00466
jacbt29	2	-1,03675	1,03675	0,04876
jacbt27	2	1,12375	-1,12375	0,024228
jacbt31	2	-1,27125	1,27125	0,030195
jacbt39	2	1,18633	-1,18633	0,002461
jacbt24	2	-1,24037	1,24037	0,020624
jacbt10	2	-1,18115	1,18115	0,008733
jacbt14	2	-1,16574	1,16574	0,024159
jacbt17	2	-1,24088	1,24088	0,00918
jacbt23	2	1,1075	-1,1075	0,020064
jacbt4	2	-1,18823	1,18823	7,70E-04
jacbt37	2	1,13863	-1,13863	0,062351
jacbt5	2	1,85123	-1,85123	0,001028
jacbt2	2	-1,5202	1,5202	0,0078
jacbt7	2	1,76817	-1,76817	0,003085
jact6	1	1,00E+06	1,00E+06	0,001085
jact18	1	1,00E+06	1,00E+06	0,009338
jact3	1	1,00E+06	1,00E+06	3,29E-04
jacb22	1	1,00E+06	1,00E+06	0,006444
jacb21	1	1,00E+06	1,00E+06	0,00865
jacb1	1	1,00E+06	1,00E+06	2,70E-04

Tabela 17: perfil de expressão diferencial de spots de proteínas na população de Juiz de Fora (aumento ou redução). Valores precedidos de sinal negativo indica que houve redução no volume do *spot*; valores positivos indicam aumento no volume do *spot*. Valores nas colunas Juiz de Fora (branco e tratado) representam a razão matemática da expressão diferencial. *Spot ID* representa a identificação do spot no gel. Match Count = identificação da proteína pelo programa. Spot ID identificação do spot diferencialmente expresso.

(Siglas: jft= presente somente no tratado)

Match Count 1 = (spot presente, somente, em um dos géis)

Match Count 2 = (spot presente nos dois géis)

Identificação do spot	Correspondência	Juiz de Fora		Anova
		Branco	Tratado	
jfbt12	2	-1,38946	1,38946	0,021273
jfbt11	2	-1,14211	1,14211	0,019817
jfbt16	2	1,08846	-1,08846	0,040912
jfbt6	2	-1,30798	1,30798	0,021686
jfbt17	2	-1,2075	1,2075	0,041489
jfbt1	2	1,16021	-1,16021	0,027645
jfbt9	2	1,1334	-1,1334	0,012131
jfbt14	2	-1,23493	1,23493	0,037969
jfbt15	2	-1,18525	1,18525	0,039514
jfbt5	2	-1,18235	1,18235	0,005354
jfbt8	2	-1,17184	1,17184	0,01221
jfbt7	2	-1,22305	1,22305	0,01155
jfbt10	2	-1,23985	1,23985	0,016085
jfbt2	2	-1,00478	1,00478	0,147759
jfbt4	2	-1,08702	1,08702	0,070352
jft13	1	1,00E+06	1,00E+06	0,021558

Discussão

Proteínas são as principais biomoléculas envolvidas com a resposta ao estresse em diversos grupos de organismos e as mais conhecidas são enzimas do metabolismo detoxificativo (Muangmoonchai et al., 2001; Goff et al., 2006; King-Jones et al., 2006; Christen et al., 2009; Martínez-Paz et al., 2012). Organismos expostos a altas concentrações de xenobióticos que são agentes de estresse (ex. pesticidas) por longo período de tempo sofrem alterações fisiológicas severas que eventualmente desencadeiam sua morte. Para mitigar a ação tóxica do agente de estresse, grupos de enzimas detoxificativas como a glutatona S-transferases, enzimas heme-tioladas (P450, EC 1.14.14.1) e algumas esterases sofrem aumento na expressão e consequentemente na intensidade do metabolismo detoxificativo (Eijl et al., 2007;

Perez et al., 2010; Martínez-Paz et al., 2012). Os mecanismos envolvidos com a regulação da expressão dessas proteínas são bem conhecidos, particularmente, em situações de estresse severo causado por xenobióticos (ex.: pesticidas, carcinogênicos) que em altas concentrações induz uma resposta biológica adversa facilmente observada (Denison & Scott, 2003; Okey, 2007). Entretanto, quando os organismos são expostos em quantidades muito baixas de um xenobiótico, a resposta biológica é pouco evidente no curto prazo e dessa forma, frequentemente negligenciada (Calabrese & Blain, 2005). Alterações no estado homeostático provocadas pela exposição a baixas concentrações de agentes de estresse são frequentemente associadas a uma resposta biológica benéfica para o organismo ou célula. Contudo, o fenômeno foi marginalmente explorado na toxicologia ao longo de mais de 100 anos desde a primeira observação desse tipo de resposta (Calabrese & Blain, 2005).

Nesse trabalho observamos que houve alteração no perfil de expressão de proteínas após a exposição à deltametrina nas três populações avaliadas. As populações resistentes de Jacarezinho e Juiz de Fora apresentaram maior número de spots de proteínas com aumento na expressão após o tratamento com deltametrina. Por outro lado na população susceptível de Sete Lagoas houve diminuição na expressão da maioria dos *spots* diferencialmente expressos após o tratamento com o inseticida. Outra observação interessante é a relação entre a magnitude de incremento populacional e o número de *spots* com aumento na expressão (Tabela 15 a 20). A magnitude do incremento populacional nas populações resistentes foi maior do que na população susceptível, em torno de 30% nas populações resistentes e incremento inferior a 10% na população susceptível (Figura). Uma possibilidade para essa marcante diferença na magnitude da resposta induzida pela exposição à baixa dose de estresse pode estar relacionada à plasticidade biológica de cada população, nesse caso a população susceptível apresenta uma menor plasticidade biológica para lidar com o estresse causado pela exposição à deltametrina, tanto em doses altas quanto em doses moderadas (Flood et al., 1983, 1985).

Qualquer tipo de organismo ou célula é virtualmente capaz de emitir uma resposta fisiológica, dose-dependente, mediante interação com um agente de estresse físico ou químico. O resultado dessa interação é a manifestação de uma resposta biológica que pode ser estimulatória ou inibitória dependendo do tipo de resposta avaliada e do nível de exposição do organismo ou célula (Calabrese & Blain, 2005). Normalmente a exposição moderada a um agente de estresse induz um estímulo ou

benefício para o organismo enquanto a exposição mais intensa resulta em inibição ou toxicidade, essa relação de estímulo/inibição dose-dependente é denominada como hormese (Mattson, 2008). A representação gráfica da resposta hormética em um modelo de curva dose-resposta é sempre do tipo bifásica sendo essa a melhor definição para o conceito de hormese (Calabrese & Baldwin, 2002; Mattson, 2008). Além da curva bifásica, outra característica da hormese é a baixa amplitude de resposta induzida no organismo sob estresse moderado, geralmente entre 10 e 60% (Calabrese & Blain 2005). Esse modelo é observado em vários sistemas biológicos independentemente do tipo de agente de estresse (radiação, calor, pesticida, carcinogênicos) e supostamente é resultado da ativação de vias altamente conservadas e evolutivamente relacionadas com a resposta ao estresse moderado (Parsons 2001).

Em nosso trabalho a magnitude de estímulo da resposta avaliada ficou dentro daquelas frequentemente observadas em outros organismos. Além disso, um modelo de curva dose resposta bifásica foi observado nas três populações testadas. A resposta biológica induzida pela exposição ao estresse moderado é intrinsecamente relacionada a um estímulo em algum parâmetro importante para a história de vida do organismo (ex. longevidade, resistência, aumento populacional). Ao avaliarmos a taxa de crescimento populacional verificamos que o inseticida tanto pode inibir quanto estimular o crescimento populacional em uma maneira dose-dependente. O modo como o agente de estresse interage com o organismo determina o tipo de mecanismo de resposta que será desencadeado (). A capacidade de responder a diversos estímulos do ambiente pressupõe o envolvimento de diferentes grupos de enzimas, receptores e fatores de transcrição que são dependentes do tipo de estresse ao qual o organismo é exposto (). O alto grau de conservação do modelo de resposta hormética sugere o envolvimento de mecanismos virtualmente importantes para todos os organismos. Um exemplo disso são as proteínas chaperonas (HSPs), expressas em quase todos os organismos vivos e envolvidas na mitigação do estresse químico ou físico (ex.: calor). Além das proteínas chaperonas, outras biomoléculas importantes para a resposta ao estresse moderado foram recentemente descobertas reforçando a hipótese de que existem vias alternativas de resposta ao estresse, evolutivamente importantes para todos os grupos de organismos.

Embora a fase estimulatória da curva dose-resposta normalmente esteja associada a uma vantagem para o organismo ou célula, em um contexto mais amplo esse estímulo pode resultar em um efeito adverso para outros organismos que interagem

dentro de um sistema biológico. Em um cenário onde a exposição a baixos níveis de radiação, antibióticos ou pesticidas é associada à proliferação de células, microrganismos e pragas agrícolas o benefício é relativo e depende do ponto de vista do observador. Nesse caso a resposta pode ser adversa para o tratamento de patologias no indivíduo e também para o manejo de pragas bem como para o controle de vetores de doenças em ambientes agrícolas ou urbanos (Wang & Cai 2000).

A exposição moderada a alguns agentes de estresse de origem sintética ou biológica resulta na ativação de um tipo de receptor “promíscuo” o aril-hidrocarboneto (RAh) envolvido com a indução da síntese de um grupo de enzimas destoxificativas, especificamente, enzimas heme-tioladas (P450, EC 1.14.14.1) que mitigam a toxicidade de diversos agentes de estresse favorecendo a sobrevivência do organismo em situações de exposição a poluentes (). Por outro lado, há evidências de que a ativação intensa e intermitente do RAh pelo agente de estresse TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) está associada a uma resposta biológica adversa para o organismo (Bohonowych & Denison 2007; Okey, 2007).

Hormese é teoricamente explicada pela existência de duas vias de resposta ao estresse, uma de resposta ao estresse moderado que aparentemente é vantajosa em termos de custo adaptativo e outra envolvida com a resposta ao estresse severo que é energeticamente custosa e eventualmente acompanhada de desvantagem adaptativa (Pietsch et al., 2011). A sensibilidade do organismo em responder a diversos fatores de estresse expressando sempre um mesmo perfil de resposta (curva dose resposta bifásica) sugere a existência de rotas fisiológicas alternativas, associadas às vias adaptativas de resposta ao estresse e que estão virtualmente conservadas em todos os organismos().

e timidamente explicadas resposta hormética na maioria dos casos que envolvem a relação dose-resposta em bioensaios toxicológicos a resposta aguda mediante exposição à altas doses são amplamente predominantes a relação dose-resposta é fundamentalmente uma relação de obtenção de respostas mediante exposição à altas doses de agentes de estresse foi por muito tempo focada nos efeitos adversos provocados pela exposição aguda a altas doses de poluentes. Por causa disso, um grande volume de informação sobre mecanismos envolvidos com a resposta ao efeito adverso de xenobióticos é facilmente encontrado na literatura. Em função da curta duração dos ensaios e por considerar apenas os efeitos adversos como resposta, essa forma de avaliação é muito limitada para obtenção de informações mais completas sobre o efeito

da exposição a substâncias tóxicas nos organismos. Os métodos tradicionais de avaliação sobre o efeito de xenobióticos em organismos vivos avalia, principalmente, a mortalidade que comumente é observada acima de um determinado limiar de exposição na curva dose-resposta (NOAEL - nível onde nenhum efeito adverso é observado). Evidências da ocorrência do efeito estimulatório (hormese) em organismos expostos a doses sub-letais de xenobióticos abre um novo campo de estudo na toxicologia. Isso implica em mudanças na forma como as avaliações toxicológicas são realizadas permitindo a obtenção de respostas mais completas sobre o efeito de xenobióticos nos organismos vivos. Uma das formas de avaliar a ocorrência desse efeito estimulatório é através da exposição crônica utilizando doses sub-letais do agente de estresse (ex.: inseticida) e avaliando o impacto dessa exposição no incremento populacional. A determinação dos mecanismos envolvidos com a expressão do fenômeno pode trazer informações promissoras sobre o balanço entre rotas fisiológicas alternativas determinantes de parâmetros de história dos organismos. Recentemente alguns fatores de transcrição bem como enzimas foram descritas como sendo relacionadas com vias adaptativas de resposta ao estresse.

Em nosso trabalho as populações resistentes aparentemente lidam melhor com o estresse severo ou moderado e provavelmente essa característica é decorrente da seleção provocada pela história de vida dessas populações. As populações resistentes são oriundas de ambientes agrícolas e provavelmente essas populações conviveram com períodos de estresse severo e moderado devido aos intervalos entre aplicações de inseticidas. Embora, oriundas de regiões diferentes e com história de vida distintas ambas as populações apresentam a mesma característica de resposta. Aparentemente, existem muitas rotas que convergem para uma única via cujo resultado de sua ativação resulta em ganho adaptativo para o indivíduo. A resposta biológica induzida pela exposição a baixos níveis de um determinado agente de estresse é quantitativamente modesta em sua magnitude. Entretanto, organismos expostos ao estresse moderado provavelmente tem um ganho adaptativo muito maior do que aqueles que evoluem em ambientes de estresse extremos ou mesmo ausentes de estresse (Parsons, 2001). Embora modesto, a resposta ao estresse moderado supostamente tem um caráter evolutivo muito importante, pois há evidências de que esse modelo de resposta seja generalizado entre os diversos tipos de organismos expostos a diferentes fontes de estresse, sugerindo a existência de um mecanismo altamente conservado entre os diversos grupos de organismos (Pietsch et al., 2011).

Em nosso trabalho foi possível observar várias alterações no perfil de expressão de proteínas. Nas populações resistentes prevaleceu o aumento de expressão (aumento no volume do spot) enquanto na população susceptível foi observado redução de expressão na maioria dos spots diferencialmente expressos (Tabelas 15 a 17). Essa redução pode ser devido a um período refratário mais prologando nessa população e consequentemente maior retardo no restabelecimento do estado homeostático (Zolard & Diamond, 2009; Calabrese, 2010). Em relação ao grande número de spots com aumento ou redução do nível de expressão, poucos *spots* foram identificados como expressão de novas proteínas nas três populações. A população de Jacarezinho foi a que apresentou o maior número de *spots* com expressão de novas proteínas, foram seis spots para população de jacarezinho, um *spot* para população de Juiz de Fora e nenhum spot na população susceptível de Sete Lagoas (Tabelas 16 a 17). Essa grande variação reflete a dificuldade de relacionar os eventos moleculares com as respostas obtidas nas curvas dose-resposta. Embora as respostas biológicas possam ser observadas com relativa dificuldade, a miríade de eventos moleculares em resposta as variações do ambiente tornam extremamente difícil identificar os eventos mecanísticos envolvidos com a resposta ao estresse.

Nesse trabalho as proteínas diferencialmente expressas não foram identificadas, entretanto foram conservadas no gel para futura identificação principalmente daquelas com maior magnitude de expressão bem como aquelas consideradas novas proteínas expressas. Essa grande variação no perfil surpreendeu nossas expectativas principalmente pela modesta magnitude de resposta e o baixo nível de exposição ao qual as populações foram expostas.

Conclusão

A variação no perfil de expressão de proteínas entre populações reflete a dificuldade para compreensão dos mecanismos envolvidos com o efeito hormético. A exposição mesmo a doses moderadas de estresse induziu muitas alterações no perfil de expressão de proteínas. Em uma próxima etapa a identificação das proteínas diferencialmente expressas seria de grande importância para verificarmos se grupos de proteínas comuns entre as populações são afetados. Além de apresentar maior magnitude no incremento populacional, em doses moderadas de deltametrina, as populações resistentes apresentam maior alteração no perfil de expressão de proteínas e esse comportamento parece ser dependente dos parâmetros de história de vida.

Referências

- Alves, P., Arnold, R.J., Novotny, M.V., Radivojac, P., Reilly, J.P., Tang, H. Advancement in protein inference from shotgun proteomics using peptide detectability. *Pacific Symposium on Biocomputing*, v.12, p.409-420, 2007.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v.389, p.1017–1031, 2007.
- Berticat, C.; Boquien, G.; Raymond, M.; Chevillon, C. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetic Research, Camb.*, v.79, p.41–47, 2002.
- Berticat, C.; Duron, O.; Heyse, D.; Raymond, M. Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*. *Genetic Research, Camb.*, v.83, p.189–196, 2004.
- Bohonowych, J.E., Denison, M.S. Persistent binding of ligands to the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicological Sciences*, v.98, p.99-109, 2007.
- Cagney, G. and Emili, A. *De novo* peptide sequencing and quantitative profiling of complex protein mixtures using mass-coded abundance tagging. *Nature Biotechnology*, v.20, p.163 – 170, 2002.
- Calabrese, E. Blain, R. The occurrence of hermetic dose response in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. *Toxicology and applied pharmacology*, v202, p.289-301, 2005.
- Calabrese, E. J. Hormesis: Principles and Applications for Pharmacology and Toxicology. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, v.3, p. 59-71, 2008.
- Calabrese E.J., Hoffmann, G.R., Stanek, E.J., Nascarella, M.A. Hormesis in high-throughput screening of antibacterial compounds in *E coli*. *Human & experimental toxicology*, v.29, p.667-677, 2010.
- Carriere, Y., Deland, J.P., Roff, D.A., Vincent, C. Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. *Proceedings Royal Society. B.* v.258 p. 35-40, 1994.
- Cantú, M.D., Carrilho, E., Wulff, N.A., Palma, M.S. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova*, v.31, p.669-675, 2008.
- Chenau, J., Michelland, S., Sidibe, J., Seve, M. Peptides OFFGEL electrophoresis: a suitable pre-analytical step for complex eukaryotic samples fractionation compatible

- with quantitative iTRAQ labeling. *Proteome Sci.* 2008; 6: 9. Published online. doi: 10.1186/1477-5956-6-9.
- Cox, M.M. and Phillips, Jr, G.N. *Handbook of proteins; structure, function, and methods* (1319 páginas). v.2, p.1159-1162, 2007.
- Carriere, Y., Deland, J.P., Roff, D.A., Vincent, C. Life-History Costs Associated with the Evolution of Insecticide Resistance. *Proc R Soc Lond Ser B-Biol Sci* v.258, p.35–40, 1994.
- Christen, V., Oggier, D.M., Fent, K. (2009). A Microtiter-Plate-Based Cytochrome P450 3A Activity Assay In Fish Cell Lines. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28, 2632–2638.
- Dančík, D., Addona, T.A., Clauser, K.R., Vath, J.E. De Novo peptide sequencing via tandem mass spectrometry: a graph-theoretical approach, *Proceedings of the third annual international conference on Computational molecular biology*, p.135-144, 1999.
- Denison, M.S., Nagy, S.R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.43, p.309-334, 2003.
- Delahunty, C.M., Yates, J.R. MudPIT: multidimensional protein identification technology. *BioTechniques*, v.43, p. 563-569, 2007.
- Eijl, S. van, Zhu, Z., Cupitt, J., Gierula, M., Gotz, C., Fritsche, E., Edwards, R.J. Elucidation of Xenobiotic Metabolism Pathways in Human Skin and Human Skin Models by Proteomic Profiling. *Plos one*, v.7, e41721. doi:10.1371/journal.pone.0041721, 2007
- Essader, A.S., Cargile, B.J., Bundy, J.L., Stephenson Jr, J.L. A comparison of immobilized pH gradient isoelectric focusing and strong-cation-exchange chromatography as a first dimension in shotgun proteomics. *Proteomics*, v.5, p.24–34, 2005.
- Fenselau, C. A review of quantitative methods for proteomic studies. *Journal of Chromatography B*, v.855 p.14–20, 2007.
- Flood, J.F. Smith, G.E. Cherkin, A. Memory enhancement: supra-additive effect of subcutaneous cholinergic drug combinations in mice. *Psychopharmacology*, v. 86, p. 61-67, 1985.

- Flood, J.F., Smith, G.E., Cherkin, A. Memory retention: potentiation of cholinergic drug combinations in mice. *Neurobiology Aging*, v. 4, p. 37-43, 1983.
- Fournier, M.L., Gilmore, J.M., Martin-Brown, S.A., Washburn, M.P. Multidimensional Separations-Based Shotgun Proteomics. *Chemical Reviews*, v.107, p.3654-3686, 2007.
- Gevaert K, Vandekerckhove J. Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis*, v.21, p.1145-1154, 2000.
- Goff, G.L., Hilliou, F., Siegfried, B.D., Boundy, S., Wajnberg, E., Sofer, L., Audant, P., ffrench-Constant, R.H., Feyereisen, R. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*. Sex dependence of P450 and GST induction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.36, p.674-682, 2006.
- Hekmat, O., He, S., Warren, R. A. J. and Withers, S. G. A Mechanism-Based ICAT Strategy for Comparing Relative Expression and Activity Levels of Glycosidases in Biological Systems. *Journal of Proteome Research*, v.7, p.3282–3292, 2008.
- Horn, D.M., Peters, E.C., Klock, H., Meyers, A., Brock, A. Improved protein identification using automated high mass measurement accuracy MALDI FT-ICR MS peptide mass fingerprinting. *International Journal of Mass Spectrometry*, v.238, p.189–196, 2004.
- Hörth, P., Miller, C.A., Preckel, T., Wenz, C. *Efficient fractionation and improved protein* identification by peptide OFFGEL electrophoresis. *Molecular & Cellular Proteomics*. v.5, p.1968-1974, 2006.
- Hu, L., Ye, M., Jiang, X., Feng, S., Zou, H. Advances in hyphenated analytical techniques for shotgun proteome and peptidome analysis—A review. *Analytica Chimica Acta*, v.598, p.193–204, 2007.
- Jones, M.R., Nuhse, T.S., Studholme, D.J., Peck, S.C., Shirasu, K. Multidimensional protein identification technology (MudPIT) analysis of ubiquitinated proteins in plants. *Molecular & cellular proteomics*, v.6, p.601-610, 2007.
- King-Jones, K., Horner, M.A., Lam, G., Thummel, C.S. The DHR96 nuclear receptor regulates xenobiotic response in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, v.4, p. 37-48, 2006
- Köcher, T., Pichler, P., Schutzbier, M., Stingl, C., Kaul, A., Teucher, N., Hasenfuss, G., Penninger, J.M., Mechtler, K. High Precision Quantitative Proteomics Using iTRAQ on an LTQ Orbitrap: A New Mass Spectrometric Method Combining the Benefits of All. *Journal of Proteome Research*, v. 8, p.4743–4752, 2009.

- Krijgsveld, J., Gauci, S., Dormeyer, W., Heck, A.J.R. In-Gel Isoelectric Focusing of Peptides as a Tool for Improved Protein Identification. *Journal of Proteome Research*. v.5, p.1721-1730, 2006.
- Lam, H.T., Josserand, J., Lion, N., Girault, H.H. Modeling the Isoelectric Focusing of Peptides in an OFFGEL Multicompartment Cell. *Journal of Proteome Research*. v.6, p.1666-1676, 2007.
- Levin, Y., Schwarz, E., Wang, L., Leweke, F.M. Bahn, S. Label-free LC-MS/MS quantitative proteomics for large-scale biomarker discovery in complex samples. *Journal of separation science*, v.30, p.2198-2203, 2007.
- Liao, L., McClatchy, D.B., Yates, J.R. Primer: Shotgun Proteomics in Neuroscience. *Neuron*. V.63, p.12–26, 2009.
- Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G. Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposure to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v.155, p. 333-343, 2012.
- Mattson, M.P. Defined hormesis. *Ageing Research Review*, v.7, p.1-7, 2008.
- Michel, P.E., Reymond, F., Arnaud, I.L., Josserand, J., Girault, H.H., Rossier, J.S. Protein fractionation in a multicompartment device using Off-Gel isoelectric focusing. *Electrophoresis*. v.24, p. 3–11, 2003.
- Muangmoonchai, R., Smirlis, D. Wong, S-C., Edwards, M., Phillips, I.R., Shephard, E.A. Xenobiotic induction of cytochrome P450 2B1 (CYP2B1) is mediated by the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (CAR) and requires steroid co-activator 1 (SRC-1) and the transcription factor Sp1. *Biochemical Journal*, 355, 71-78, 2001. (Printed in Great Britain).
- Mukherjee, M., M. K. Sengupta, M. A. Hossain, A. Ahamed, B. Das, B. Nayak, D. Lodh, M. M. Rahman and D. Chakraborti (2006): Arsenic contamination in groundwater: A global perspective with emphasis on the Asian scenario. *J. Health Popul. Nutr.*, **24**(2), 142–163.
- Okey, A.B. An aryl hydrocarbon receptor odyssey to the shores of toxicology: the deichmann lecture, international congress of toxicology –XI. *Toxicological sciences*, v.98, p.5-38, 2007.
- Padliya, N.D., Wood, T.D. Improved peptide mass fingerprinting matches via optimized sample preparation in MALDI mass spectrometry. *analytica chimica acta*, v.6 2 7, p.162–168, 2008.

- Perez, J.L., Jayaprakasha, G.K., Cadena, A., Martinez, E., Ahmad, H., Patil, S.S. In vivo induction of phase II detoxifying enzymes, glutathione transferase and quinone reductase by citrus triterpenoids. *BMC, Complementary and Alternative Medicine*, v.10, p. 2-8, 2010.
- Pietsch, C., Bucheli, T.D., Wettstein, F.E., Burkhaedt-Holm, P. Frequent biphasic cellular response of permanent fish cell cultures to deoxynivalenol (DON). *Toxicology and applied pharmacology*, v.256, p.24-34, 2011.
- Ros, A.; Faupel, M.; Mees, H.; van Oostrum, J.; Ferrigno, R.; Reymond, F.; Michel, P.; Rossier, JS; Girault, HH. Protein purification by Off-Gel electrophoresis. *Proteomics*, v. 2, p.151–156, 2002.
- Shi, M.A.; Lougarre, A.; Alies, C.; Frémaux, I.; Tang, Z.H.; Stojan, J.; Fournier, D. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations 49 conferring insecticide resistance. *BioMed Central Evolutionary Biology*, v.4, p.1471-2148, 2004.
- Snow, Elizabeth T., Sykora, Peter, Durham, Troy R. and Klein, Catherine B. Arsenic, mode of action at biologically plausible low doses : what are the implications for low dose cancer risk?, *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 207, no. 2 Supplement 1, pp. 557-564, 2005.
- Tao, W.A.; Aebersold, E. Advances in quantitative proteomics via stable isotope tagging and mass spectrometry. *Current opinion in biotechnology*, v.14, p.110-118, 2003.
- Thiede B, Hohenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, Jungblut PR. Peptide mass fingerprinting. *Methods*, v.35, p.237–247, 2005.
- Waller, L.N., Shores, K., Knapp, D.R. Shotgun Proteomic Analysis of Cerebrospinal Fluid Using Off-Gel Electrophoresis as the First-Dimension Separation. *Journal of Proteome Research*. v.7,p. 4577–4584, 2008.
- Wang, G.J., Cai, L. Induction of cell-proliferation hormesis and cell-survival adaptive response in mouse hematopoietic cells by whole-body low-dose radiation. *Toxicological Sciences*, v.53, p.369-376, 2000.
- Wang, M., You, J., Bemis, K.G., Tegeler, T.J., Brown, D.P.G. Label-free mass spectrometry based protein quantification technologies in proteomic analysis. *Briefings in functional genomics and proteomics*. v.7. p.329-339, 2008.

- Wienkoop, S., Weckwerth, W. Relative and absolute quantitative shotgun proteomics: targeting low-abundance proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, v.57, p.1529–1535, 2006.
- Wu, W.W., Wang, G., Baek, S.J., Shen, R.F. Comparative Study of Three Proteomic Quantitative Methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, Using 2D Gel- or LC MALDI TOF/TOF. *Journal of Proteome Research*, v.5, p.651-658, 2006.
- Wolters, D.A., Washburn, M.P. Yates III, J.R. An Automated Multidimensional Protein Identification Technology for Shotgun Proteomics. *Analytical Chemistry*, v.73, p.5683-5690, 2001.
- Xun, Z., Kaufman, T.C., Clemmer, D.E. Stable isotope labeling and label-free proteomics of *Drosophila parkin* null mutants. *Journal of proteome research*, v.8, p.4500-4510, 2009.
- Zhang, L. and Reilly, J.P. De Novo Sequencing of Tryptic Peptides Derived from *Deinococcus radiodurans* Ribosomal Proteins Using 157 nm Photodissociation MALDI TOF/TOF Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, v.9, p.3025–3034, 2010.
- Zhang, Y., Wen, Z., Washburn, M.P., Florens, L. Refinements to label free proteome quantitation: how to deal with peptides shared by multiple proteins. *Analytical Chemistry*, v.82, p. 2272-2281, 2010.
- Zhu, W., Smith, J.W., Huang, C.M. Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v.2010, 6 pages, 2010, doi:10.1155/2010/840518.
- Zoladz, P.R., Diamond, D.N., Linear and non-linear dose response functions reveal a hormetic relationship between stress and learning. *Dose Response*, v.7, p.132-148, 2009.