

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES – CPqAM
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

ELISAMA HELVECIO

Caracterização funcional do gene da Glutathione-S-Transferase Epsilon 2 (GSTE2) em
Aedes aegypti

RECIFE
2014

ELISAMA HELVECIO

**Caracterização funcional do gene da Glutathione-S-Transferase Epsilon 2 (GSTE2) em
*Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Maria Alice Varjal de Melo Santos

Co-orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes

RECIFE

2014

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

H485c Helvecio, Elisama.

Caracterização funcional do gene da Glutathione-S-Transferase Epsilon 2 (GSTE2) em *Aedes aegypti*/ Elisama Helvecio. — Recife: [s.n.], 2014.

74 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Maria Alice Varjal de Melo Santos; co-orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes.

1. Aedes- enzimologia. 2. Glutathione S-Transferase pi. 3. Estresse oxidativo. 4. Expressão gênica. 5. Resistência a inseticida. I. Santos, Maria Alice Varjal de Melo. II. Lopes, Constância Flávia Junqueira Ayres. III. Título.

CDU 616.92

ELISAMA HELVECIO

**Caracterização funcional do gene da Glutathione-S-Transferase
Epsilon 2 (GSTE2) em *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Alice Varjal de Melo Santos (Orientadora)
Departamento de Entomologia/CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Membro Externo)
Departamento de Bioquímica e Biofísica/UFPE

Dr. Luís Carlos Alves (Membro Interno)
Departamento de Parasitologia/ CPqAM/FIOCRUZ

**Ao meu Príncipe William,
Meus queridos pais,
E aos meus irmãos**

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas suas promessas em minha vida e por todas as bênçãos derramadas sobre mim.

À Dra. Alice Varjal e Dra Constância Ayres, por me dar oportunidade de realizar esse trabalho, pela orientação e pelos ensinamentos científicos que pude construir ao longo do tempo.

Aos meus pais, por me dar a vida, por me ensinar os caminhos a seguir, pelo apoio, dedicação, carinho e companheirismo.

Ao meu amado esposo William, pelas palavras de auto estima quando achava que tudo estava perdido, pela paciência, compreensão e amizade.

À Dra. Tatiany Romão, Ieda Oliveira, Danilo Carvalho e a Lígia Ferreira pela imensa ajuda no desenvolvimento desse trabalho, vocês foram dez!

À Ana Paula Araújo e Diego Diniz, pela amizade ao longo desses anos, por escutar minhas preocupações e me ajudar nos momentos desesperadores.

A todos do Departamento de Entomologia, pela contribuição direta ou indireta na realização desse trabalho, obrigada!

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela infraestrutura oferecida para realização desta pesquisa.

Ao Programa de Biociências e Biotecnologia em Saúde.

À banca examinadora pelas contribuições!

HELVECIO, E. Caracterização funcional do gene da Glutathiona-S-Transferase Epsilon 2 (GSTE2) em *Aedes aegypti*. 2014 Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

RESUMO

As Glutathiona-S-Transferases (GSTs) em insetos desempenham um papel fundamental na metabolização de inseticidas químicos, e provavelmente estão envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo decorrente da exposição a xenobióticos. O objetivo do trabalho foi a caracterização funcional do gene *GSTE2* em linhagens de *Aedes aegypti* com diferentes perfis de susceptibilidade ao temephos. Foram usadas uma colônia susceptível (RecLab) e outra resistente, (RecR). Larvas de ambas as linhagens foram divididas em dois grupos: exposto ao temephos com concentrações subletais e não exposto. Os indivíduos sobreviventes foram usados em ensaios enzimáticos para medir a atividade das GSTs totais contra os substratos CDNB (padrão) e o 4-HNE, um produto endógeno resultante da peroxidação de lipídeos. Adicionalmente, foi feito o sequenciamento do cDNA deste gene em amostras das duas linhagens e a sua expressão foi investigada. A *GSTE2* das duas linhagens foi expressa em sistema heterólogo e purificada para avaliação da atividade metabólica contra o 4-HNE, através de testes de biocatálise. Os resultados revelaram que a atividade enzimática da GST usando o CDNB foi normal para RecLab, em ambas as condições estudadas, porém, para RecR houve alteração na atividade de GST, para os dois grupos estudados. Usando o 4-HNE como substrato, as duas linhagens apresentaram um perfil enzimático alterado para GST em relação à Rock, com uma resposta aumentada após a exposição ao temephos. Foram identificados polimorfismos que diferenciam as duas linhagens. Os resultados de expressão gênica indicaram que as larvas resistentes apresentam níveis de expressão significativamente maiores do que as susceptíveis, e em RecR a expressão caiu após a exposição, sugerindo o envolvimento dessa enzima nos processos de resistência metabólica na linhagem RecR. Esses dados abrem novas perspectivas de monitoramento da resistência metabólica em *Ae. aegypti*.

Palavras chave: *Aedes*, Enzimologia, Glutathiona-S-Transferase; Estresse oxidativo; Expressão gênica e Resistência a inseticidas.

HELVECIO, E. 2014. Functional characterization of a Glutathione-S-Transferase Epsilon class (GSTE2) from *Aedes aegypti*. Dissertation (Master in Bioscience and Biotechnology in Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

ABSTRACT

The Glutathione S-transferases (GSTs) in insects play a key role in the metabolism of chemical insecticides, and are probably involved in protection against oxidative stress resulting from exposure to xenobiotics. This study aimed to characterize the function of GSTE2 gene in strains of *Aedes aegypti* with different patterns of susceptibility to the organophosphate larvicide temephos. Two colonies were used in this study, a temephos resistant strain (RecR) and a susceptible one (RecLab). Larvae of both strains were divided into two groups: exposed to sub-lethal concentrations of temephos and not exposed. Individuals survivors were used in enzymatic assays to measure the activity of total GSTs against CDNB (standard) and 4-HNE substrates, an endogenous product of lipid peroxidation. Additionally, the *AaGSTE2* cDNA sequencing was performed for samples from both strains and its expression was investigated by qRT-PCR. The GSTE2 protein of the two strains was expressed in a heterologous system and purified to test their metabolic activity against 4-HNE, through biocatalysis tests. The results revealed that the enzymatic activity of total GSTs using CDNB was normal for RecLab in both conditions studied, but for RecR a change was detected for both exposed and non-exposed samples. Using 4-HNE as a substrate, both strains showed an altered profile for total GSTs in relation to the Rockefeller strain, with an increased response after exposure to temephos. Polymorphisms that differentiate the two strains were identified. The results of gene expression analysis indicated that the resistant larvae displayed significantly higher levels of GSTE2 expression than those observed for RecLab and in RecR this level decreased significantly after exposure, suggesting the involvement of this enzyme in the processes of the metabolic resistance in RecR.

Key words: *Aedes*, Enzymology, Glutathione-S-Transferase; Oxidative stress; Gene expression and Insecticide resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação da reação de biotransformação de xenobióticos e a participação das enzimas detoxificadoras	21
Figura 2-	Estrutura cristalográfica da GST de <i>Anopheles cracens</i>	27
Figura 3-	Conjugação da glutathiona reduzida com um substrato eletrofílico (xenobiótico) catalisado pela GST	27
Figura 4-	Atividade de DDTase (dehidrocloração) mediada por GST	28
Figura 5-	Ilustração dos diferentes processos que podem ocorrer nas células devido à exposição à agentes tóxicos	29
Figura 6-	Esquema mostrando as reações ocorridas no processo de peroxidação lipídica	31
Figura 7-	Estrutura química do 4-hydroxynonenal (4-HNE)	32
Figura 8-	Reação do 4-HNE com a glutathiona (GSH)	32
Figura 9-	Representação das microplacas utilizadas nos ensaios bioquímicos para revelar a atividade das GSTs totais	38
Figura 10-	Representação do espectrofotômetro de placas <i>Elx808</i> usado para medir a absorbância da GST totais.	39
Figura 11-	Visualização do vetor de clonagem pGEM-T easy	41
Figura 12-	Vetor pET28a utilizado no processo de expressão da proteína GSTE2	44

Figura 13-	Ilustração da cuba cromatográfica	46
Figura 14-	Esquematização do cromatograma obtido por CCD na reação da GSTE2 com o 4-HNE	47
Figura 15-	Expressão da proteína GSTE2 das linhagens RecLab e RecR	51
Figura 16-	Monitoramento da cromatografia de camada delgada em placas de sílica	52
Figura 17-	Gel de agarose 1% mostrando amplificação do fragmento de 669 pb correspondente a região codificadora do gene <i>GSTE2</i> .	53
Figura 18-	Alinhamento das sequências de aminoácidos da GSTE2 obtidas nas linhagens RecR, Rec Lab, RecRev e Rock com a sequência de GSTE2 disponível no GenBank	57
Figura 19-	Expressão relativa do gene <i>GSTE2</i> nas linhagens de <i>Aedes aegypti</i> RecLab e RecR antes e após exposição ao temephos.	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Classificação das classes de GST citosólicas e sua distribuição em diferentes espécies.	26
Quadro 2-	<i>Primers</i> empregados na amplificação da <i>GSTE2</i> de <i>Ae. aegypti</i> das linhagens estudadas.	40
Quadro 3-	Atividade enzimática de GSTs totais em larvas de linhagens de <i>Aedes aegypti</i> (RecLab e RecR) usando o CDNB e o 4-HNE como substrato sob diferentes condições (exposto e não exposto ao temephos).	50
Quadro 4-	Alterações de aminoácidos detectadas no alinhamento entre as seqüências proteicas de <i>GSTE2</i> de <i>Ae. aegypti</i> disposta no NCBI (AaeL_AAEL007951) e dos clones susceptíveis.	54
Quadro 5-	Alterações de aminoácidos detectadas no alinhamento entre as seqüências proteicas de <i>GSTE2</i> de <i>Ae. aegypti</i> disposta no NCBI (AaeL_AAEL007951) e com as linhagens estudadas.	55
Quadro 6-	Alterações de aminoácidos detectadas no alinhamento entre as seqüências proteicas de <i>GSTE2</i> de <i>Ae. aegypti</i> disposta no NCBI (AaeL_AAEL007951) com a linhagem RecR.	56

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACE – Acetilcolinesterase

Aedes aegypti - *Ae. aegypti*

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

CA – Carbamato

CDNB - 1-chloro-2,4-dinitrobenzeno

DDT- Diclorodifeniltricloroetano

ERO- Espécies reativas de oxigênio

EST – Esterases

GSH - Glutathiona reduzida

GST - Glutathiona-S-Transferase

GSTE2 - Glutathiona-S-Transferase Epsilon 2

KDR - Resistência *Knockdown*

LB - Lúria-Bertani

MFO - Oxidases de função múltipla

OC - Organoclorados

OP - Organofosforados

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PNCD - Programa Nacional de Controle da Dengue

PI – Piretróides

qRT-PCR- RT-PCR quantitativo em tempo real

RR- Razão de resistência

RT-PCR - Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase

SNC – Sistema Nervoso Central

4-HNE – 4-Hydroxynonenal

SÚMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL	18
2.1 Resistência a inseticidas químicos	18
2.2 Mecanismos de resistência	18
2.2.1 Comportamental.....	18
2.2.2 Penetração reduzida.....	19
2.2.3 Modificação do sítio alvo.....	19
2.2.4 Resistência metabólica.....	19
2.3 Diagnóstico da resistência a inseticidas químicos	21
2.3.1 Ensaio biológicos.....	21
2.3.2 Ensaio bioquímicos.....	22
2.3.3 Métodos moleculares	22
2.4 Enzimas de detoxificação	23
2.4.1 Esterases.....	23
2.4.2 Oxidases de Função Múltipla.....	23
2.4.3 Glutathione-S-Transferases	24
2.5 Estresse oxidativo	29
2.6 Caracterização e reatividade química do 4-hydroxynonenal (4-HNE)	31
2.7 Temephos	33
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo Geral	36
4.2 Objetivos Específicos	36
5 METODOLOGIA	37

5.1 Linhagens de <i>Aedes aegypti</i>	37
5.2 Avaliação das GSTs totais.....	37
5.2.1 Análise dos dados.....	38
5.3 Quantificação da atividade enzimática da GSTE2	39
5.3.1 Amostras	39
5.3.2 Extração de mRNA.....	39
5.3.3 RT-PCR (Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase).....	40
5.3.4 Purificação dos produtos de PCR.....	41
5.3.5 Clonagem pGEM- Teasy.....	42
5.3.6 Digestão com enzimas de restrição <i>NdeI</i> e <i>EcoRI</i>	43
5.3.7 Subclonagem do gene <i>GSTE2</i> no Plasmídeo de Expressão pET28.....	44
5.3.8 Expressão e purificação das proteínas recombinantes (GSTE2RecLab e GSTE2 RecR).....	44
5.3.9 Ensaio de Biotatalise.....	46
5.4 Avaliação da expressão gênica do gene <i>GSTE2</i> por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	48
6 RESULTADOS	50
6.1 Análise bioquímica das GSTs totais	50
6.2 Análise da atividade enzimática da GSTE2 contra o 4-HNE	52
6.2.1 Expressão e purificação das GSTE2.....	52
6.2.2 Ensaio de biocatálise.....	53
6.3 Análise da região codificadora do gene <i>GSTE2</i> em linhagens susceptível (RecLab) e resistente (RecR) ao temephos	53
6.4 Perfil de expressão do gene <i>AeGSTE2</i> por qRT-PCR	60
7 DISCUSSÃO	61

8 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

As Glutathione-S-Transferases (GSTs) são enzimas ubíquas, envolvidas em vários processos, tais como: remoção de espécies reativas de oxigênio, regeneração de proteínas com grupo sulfidril reduzido, transporte intracelular, processos digestivos, síntese de prostaglandinas e detoxificação de xenobióticos (HAYES et al., 2005; MCLLAWAIN et al., 2006; TEW, 2007). Elas participam da reação de biotransformação, particularmente na fase II e atuam biotransformando compostos tóxicos através da conjugação com o tri-peptídeo glutathione (GSH) tornando-os mais solúveis em água (WONGTRAKUL et al., 2009). Além da proteção contra compostos exógenos as GSTs conferem proteção a compostos tóxicos de origem endógena, sobretudo aqueles resultantes do estresse oxidativo, a exemplo dos hidroperóxidos de lipídeos gerados a partir da peroxidação de lipídeos (CATALÃ, 2010).

As GSTs em insetos estão também diretamente ligadas ao desenvolvimento de resistência a inseticidas químicos (RANSON; HEMINGWAY, 2005). A resistência a esses compostos pode ocorrer por diversos mecanismos, sendo os mais estudados a alteração no sítio alvo do inseticida e alterações nas enzimas de detoxificação, conhecida como resistência metabólica. Até o momento, não existe registro de populações naturais de *Aedes aegypti* resistentes ao organofosforado temephos (principal larvicida usado para controle desta espécie de mosquito) via alteração do sítio alvo, que neste caso é a enzima acetilcolinesterase. Desta forma, acredita-se que a resistência ao temephos nesta espécie seja mediada por mecanismos metabólicos. Há vários registros que comprovam o envolvimento direto de um membro da classe Epsilon de GST (GSTE2) com a resistência ao DDT e a organofosforados (LUMJUAN et al., 2011; RIVERON et al., 2014; STRODE et al., 2008).

Para as GSTs também tem sido atribuído um papel fundamental na detoxificação de compostos endógenos tóxicos encontrados em grandes quantidades no interior das células, entre eles está o grupo 4-Hydroxy-2,3-trans-alk-2-enals com destaque para o 4-Hydroxy nonenal (4-HNE). O 4-HNE é produzido através da peroxidação de lipídeos (ALIN et al., 1985), sob condições de estresse oxidativo e tem efeitos na sinalização, proliferação e diferenciação celular (ZARKOVIC et al., 1999). Esse estresse pode ser induzido pela exposição do inseto aos inseticidas, pois o principal efeito das moléculas de DDT ou organofosforados nas células é a peroxidação de lipídeos e conseqüente liberação de radicais de grupos peróxil lipídicos que atuarão sobre os lipídeos das membranas celulares (ESTERBAUER, 1991). Diferentes estudos sugerem que tais compostos podem ser substratos

naturais das GSTs, e de acordo com Sawicki et al. (2003), em pesquisas realizadas com *Drosophila melanogaster*, as classes Delta e Epsilon metabolizam o 4-HNE, porém mais estudos necessitam ser realizados em outras espécies de insetos.

Esse trabalho se propôs a caracterizar o gene da GSTE2 em linhagens de *Aedes aegypti* com diferentes perfis de susceptibilidade ao inseticida temephos, uma vez que pouco se sabe sobre a diversificação funcional dessa enzima.

2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 Resistência a inseticidas químicos

A resistência pode ser definida como a capacidade que uma linhagem tem de resistir a altas quantidades de compostos tóxicos que seria letal para as populações susceptíveis (BEATY; MARQUARDT, 1996). Ela surge em decorrência da seleção de mutações que favorecem a sobrevivência dos indivíduos expostos geração após geração (FERRARI, 1996).

Inseticidas químicos são aplicados para o controle de insetos vetores desde 1940. O uso indiscriminado desses compostos pelos programas de controle, seja pelo aumento na quantidade do produto aplicado ou pelo aumento na frequência de aplicação, além da ausência de rotatividade entre compostos com modos de ação diferentes, leva a falhas recorrentes de controle populacional e ao aparecimento de populações de insetos resistentes (MONTELLA, 2007).

No Brasil, diversas populações de *Aedes aegypti* dos municípios sentinelas do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) estão resistente a inseticidas químicos (BRAGA; VALLE, 2007), situação similar tem sido reportada em várias partes do mundo (POLSON et al., 2011; NKYA et al., 2014; MONTELLA et al., 2008; DHANG et al., 2008; MARCOMBE et al., 2009; OCAMPO et al., 2010; DJOUKA et al., 2011).

2.2 Mecanismos de resistência

2.2.1 Comportamental

Esse tipo de resistência é descrito como uma modificação no comportamento do inseto que passa a evitar o contato com lugares tratados com inseticidas. Estas mudanças podem fazer com que os insetos reconheçam superfícies ou áreas tratadas com inseticidas, diminuindo a invasão de domicílios ou modificando horário de repasto sanguíneo (MATHEGE et al., 2001)

O trabalho de Roberts e Alecrim (1991) com fêmeas de *Anopheles darlingi* na Amazônia, mostrou como o comportamento desse vetor é influenciado após a aplicação do DDT nas casas, ou seja, nesses locais as fêmeas não permaneceram após o uso do produto o que não foi observado nas casas não tratadas. Além disso, dois meses após a aplicação do

produto se observou que as fêmeas que entravam nas habitações selecionadas pelo estudo, permaneciam no interior das casas apenas o tempo necessário para a alimentação. É importante destacar que neste caso, a aplicação do inseticida impõe uma seleção de indivíduos que carregam os genes responsáveis por comportamentos específicos que evitam o contato com o inseticida.

2.2.2 Penetração reduzida

Esse mecanismo está relacionado com a baixa absorção do inseticida pelo inseto e pode ocorrer devido às alterações no tegumento do artrópode, sobretudo no espessamento da cutícula. Um estudo com uma colônia de *Anopheles funestus* de Moçambique revelou que fêmeas resistentes a inseticidas da classe dos Piretróides (PI) possuíam um maior espessamento na cutícula do que as susceptíveis (WOOD et al., 2010).

2.2.3 Modificação do sítio-alvo

Os inseticidas têm como alvo moléculas do Sistema Nervoso Central (SNC) nos insetos e alterações nos resíduos de aminoácidos do sítio alvo leva ao comprometimento da ligação inseticida sítio alvo, diminuindo, ou até mesmo anulando seus efeitos (BROGDON;MCALLISTER, 1998). Os alvos no SNC dos insetos para os inseticidas são: a enzima acetilcolinesterase (AChE), alvo dos Organofosforados e Carbamatos, o canal de sódio, alvo dos organoclorados (OC) e piretróides (PI). Insetos resistentes aos PI podem apresentar um fenótipo chamado de *kdr* (*knockdown resistance*), paralisia por um determinado período de tempo, acompanhada de uma recuperação locomotora após o contato com o inseticida. Diversos estudos mostram a presença da mutação *kdr* em *A. aegypti* resistentes aos piretróides (LIMA et., 2011; MARTINS et al., 2009; HASTINGS, 2011).

2.2.4 Resistência metabólica

A resistência metabólica ocorre devido ao aumento na atividade das enzimas responsáveis pela metabolização de xenobióticos, garantindo a eliminação ou inativação do inseticida circulante, impedindo que este alcance o alvo no SNC, seu sítio final de ação (BROGDON; MCALLISTER, 1998; HEMINGWAY; RANSON, 2000). São três principais

grupos de enzimas envolvidas na resistência metabólica: Esterases (ESTs), Oxidases de função múltipla (MFO) e GSTs.

No mecanismo metabólico, um grande número de genes está envolvido nesse processo, alterações na constituição gênica dos indivíduos podem ocorrer e levar à resistência. Este aumento na capacidade de detoxificação pode ocorrer devido ao aumento do número de cópias do gene em questão, neste caso, se o inseto apresenta múltiplas cópias do gene, ele possivelmente detoxificará mais rapidamente o xenobiótico em relação àquele que só apresenta uma cópia do gene (MONTELLA, 2007). Isto já foi relatado, por exemplo, em *Culex quinquefasciatus*, em uma linhagem resistente a OP devido ao aumento de 250x na amplificação do gene da esterase $\beta 1$ (MOUCHES et al., 1990).

Um outro mecanismo pode ser a alteração da regulação da expressão do gene, levando o inseto a produzir mais ou menos produto com relação ao susceptível. Também já foi detectado em *Ae. aegypti* resistente ao DDT, um aumento na expressão do gene que codifica a GSTE2 (LUNJUAM et al., 2011).

Ao contrário da resistência do tipo sítio-alvo, cujos genes envolvidos são poucos e bastante conservados, o que facilita o desenvolvimento de métodos de diagnóstico da resistência, no mecanismo metabólico, vários genes podem estar envolvidos, e as famílias gênicas destas enzimas de detoxificação evoluem por duplicação gênica (AYRES et al., 2011), o que dificulta a obtenção de métodos de diagnóstico, pois diferentes genes podem ser responsáveis por vários mecanismos nas diferentes linhagens resistentes.

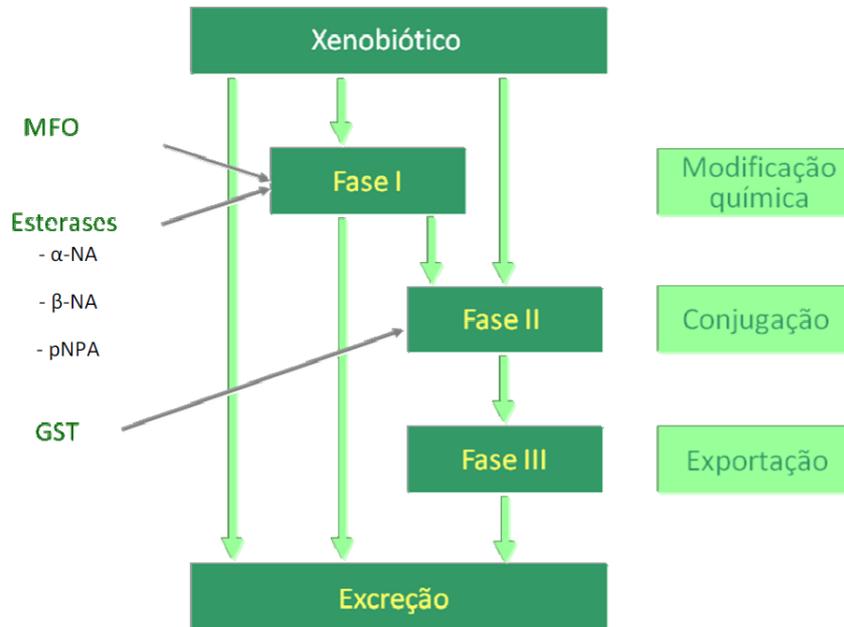
O processo de detoxificação dos inseticidas ocorre através da reação de biotransformação, que é a transformação do xenobiótico em outra substância por meio de alterações químicas. Os produtos gerados dessas transformações possuem propriedades diferentes das originais e apresentam características mais hidrofílicas que irão favorecer a excreção pelo organismo (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Essa reação pode envolver até três fases, na fase I, ocorre a modificação química da molécula, com o envolvimento das MFOs e as ESTs, sendo a enzima responsável pela reação de oxidação, a adição de oxigênio na molécula, e a segunda, pela reação de hidrólise, ou seja, ela quebra a molécula onde houver grupos de ésteres (Figura 1).

Os produtos resultantes dessas reações podem ser excretados diretamente na fase III ou então sofrer reação de conjugação na fase II, realizada principalmente pelas GSTs, que irá ligar a glutatona ao composto que foi ativado na fase I para que ele se torne mais solúvel,

permitindo a sua exportação (fase III) e conseqüentemente sua eliminação por bombas de efluxo para fora da célula (GOODMANE;GILMAN, 2006).

Figura 1: Representação da reação de biotransformação de xenobióticos e a participação das enzimas detoxificadoras.



Fonte: Brasil (2006).

2.3 Diagnóstico da resistência a inseticidas químicos

O diagnóstico da resistência é uma etapa fundamental para os programas de controle, pois permite a escolha do inseticida adequado, uma vez que determina a susceptibilidade da espécie alvo ao composto a ser empregado, determinando assim a melhor opção. Permite também realizar a rotatividade com outros compostos com modo de ação diferenciado, evitando o estabelecimento da resistência em campo. É importante destacar que a realização do monitoramento da resistência em espécies sob ação dos programas de controle evita que os inseticidas já desenvolvidos caiam em desuso, o que é fundamental devido ao número reduzido de classes disponíveis hoje no mercado e ao alto custo para o desenvolvimento de novos inseticidas.

A resistência a inseticidas em populações de mosquito é diagnosticada, quantificada e caracterizada através de diferentes testes *in vivo* e *in vitro*. A seguir estão descritos os mais utilizados.

2.3.1 Ensaios biológicos

Estes testes vão revelar alterações na susceptibilidade das populações de mosquitos aos inseticidas usados para o controle da espécie, esses testes são importantes para o monitoramento e manejo da resistência. É uma metodologia padronizada pela Organização Mundial de Saúde (1960).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (1981) a resistência pode ser detectada segundo duas metodologias: bioensaios dose-diagnóstica (DD), um ensaio qualitativo onde o inseto é submetido a uma única concentração do composto capaz de discriminar os indivíduos resistentes e susceptíveis. Essa concentração é dobro da concentração letal ou dose letal que elimine 99% da população susceptível. A OMS Propõe uma DD para cada vetor e para cada produto a fim de permitir a comparação dos resultados das colônias de mosquito nas distintas regiões do mundo.

A outra metodologia é o bioensaio dose-resposta, que é um ensaio quantitativo, nele são usadas concentrações mortalidade-dose-crescentes do inseticida, para estimar o nível de resistência de uma população.

2.3.2 Ensaios bioquímicos

Os testes bioquímicos vão identificar e quantificar as enzimas envolvidas no mecanismo de resistência metabólica em uma determinada população. São analisadas as enzimas: esterases (α , β e PNPA), glutathione S-transferases (GSTs) e oxidases de função múltipla (MFO). São testes importantes, pois irão caracterizar o mecanismo metabólico na resistência, uma vez que ainda não foram identificadas em populações naturais de *Ae. aegypti*, mutação na ACE, alvo do temephos isso demonstra que o mecanismo do tipo sítio alvo não está envolvido na resistência a organofosforados.

A grande problemática deste teste são os substratos usados, muitos deles são genéricos, e podem sub ou superestimar a atividade das enzimas. Um novo método colorimétrico foi desenvolvido para a detecção específica da atividade de uma classe de GSTs, a Epsilon, associada à resistência ao DDT em *Ae. aegypti* (MOROU et al., 2010), foi mostrado que esse novo método de detecção da atividade enzimática de GST é mais sensível do que o método bioquímico comum.

2.3.3 Métodos moleculares

São importantes para a identificação de novos genes relacionados a resistência, detecção de alelos mutantes nos genes alvos dos inseticidas, para estudar a expressão de inúmeros genes envolvidos com a resistência. Strode et al. (2008) desenvolveram o *Detox-chip*, o qual, através da técnica de microarranjos, é capaz de analisar o perfil de transcrição de 204 genes das três superfamílias relacionadas com a resistência metabólica.

2.4 Enzimas de detoxificação

2.4.1 Esterases

As esterases pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos carboxílicos, podendo atuar também sobre outros substratos que contenham ligações amidas (OAKESHOTT et al., 1993). Em geral, os inseticidas químicos apresentam em sua estrutura química uma ligação éster, o que os torna susceptíveis à ação das Hidrolases.

A superfamília das Hidrolases é formada pelos grupos das Esterases (Colinesterases), Lipases, Fosforotriesterases, Proteases entre outras e apresentam em comum uma conformação secundária com dobramento α/β (MONTELLA, 2007).

Em diferentes espécies de mosquitos, a atividade elevada das esterases tem sido reportada como o principal mecanismo de resistência aos inseticidas organofosforados e secundariamente aos carbamatos (HEMINGWAY, 2000), mostrados nos trabalhos de (AMORIM, 2013; HELVECIO, 2012; MONTELLA et al., 2008; POLSON et al., 2011;) como também grandes quantidades de enzima podem ser encontradas em mosquitos resistentes, quando comparados com os susceptíveis (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998).

Elas atuam sequestrando o inseticida e liberando lentamente os metabólitos formados, o que exige a presença de quantidades crescentes dessas enzimas, devido à ligação do inseticida com o centro ativo da enzima, o que ocorre através de uma relação estequiométrica 1:1 e a regeneração da enzima ser lenta (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998).

2.4.2 Oxidases de Função Múltipla

O termo P450 é usado para descrever enzimas codificadas pelos genes citocromo P450. Na literatura, essa enzima é conhecida por vários nomes, Monoxigenases, Oxidases de função mista (MFOs), Monoxigenase polisubstrato (PMSO), proteína heme tiolato entre outros (MONTELLA, 2007).

As oxidases são conhecidas por metabolizar uma gama de composto endógenos (hormônios juvenil e ecdisona, ácidos graxos, esteroides) e exógenos que contribui em várias funções: crescimento, desenvolvimento, nutrição e detoxificação de xenobióticos (FEYEREISEN,2005; SCOTT, 1998).

Elas constituem uma superfamília identificada pelo prefixo *CYP*. Essa nomenclatura foi introduzida por Nebert (1993) e é aceita universalmente. Essas enzimas catalisam diferentes reações oxidativas, revelando a falta de especificidade, ou seja, uma mesma MFO pode metabolizar mais de 20 substratos e um único composto pode ser metabolizado por diferentes MFOs. Essa diversidade faz com que essas enzimas possam estar envolvidas com a metabolização de todas as classes de inseticidas, mas nem todas as famílias de P450 são capazes de se ligar e, conseqüentemente degradar o inseticida (COLLINS et al., 2002).

Vários trabalhos ressaltam níveis elevados de P450s das famílias *CYP4*, *CYP6* e *CYP12* em amostras de insetos resistentes, mas apenas em poucos é estabelecida uma relação entre uma P450 específica e alto metabolismo de inseticida (COLLINS et al., 2002). Níveis elevados de atividade da monoxidase P450, em mosquitos resistentes, são freqüentemente encontrados em associação com atividade alterada de outras enzimas (HEMINGWAY et al., 2004).

2.4.3 Glutathione-S-Transferases

As glutathione-S-Transferases são membros de uma grande família de enzimas multifuncionais, envolvidas na metabolização de compostos hidrofóbicos que são tóxicos para a célula, tais como drogas, inseticidas e substratos endógenos. Especial atenção será dada a este grupo de enzimas por tratar-se de nosso objeto de estudo.

As GSTs são divididas em três grupos: microsossomais, citosólicas e mitocondriais. As enzimas pertencentes a este último grupo são encontradas nas mitocôndrias e peroxissomos de mamíferos apenas (LANDER et al., 2004;MOREL et al., 2004;). As microsossomais são

enzimas triméricas e estão associadas à membrana e estão envolvidas no metabolismo de eicosanoides. Existem poucos estudos sobre esse grupo de GST em mosquitos, sabe-se que são diferentes das GST citosólicas, em relação ao seu tamanho e estrutura, mas apresentam atividade enzimática similar. Já foi descrito em *Anopheles gambiae* três genes diferentes dessa enzima e apenas um em *Drosophila melanogaster* (HEMINGWAY et al., 2002; TOBA; AIGAKI, 2000). Apesar de terem estruturas diferentes e também origens diferentes, as citosólicas e as GSTs microssomais catalizam reações similares (GAKUTA; TOSHIRO, 2000; PRABHU et al., 2001).

As GSTs citosólicas são enzimas solúveis encontradas no citoplasma da célula (CHEMENDONZA et al., 2009). Elas compreendem uma extensa família de enzimas que foi subdividida em classes, esta subdivisão foi baseada em vários critérios, tais como: identidade nas seqüências de aminoácidos, relação filogenéticas, propriedades imunológicas, estrutura terciária, habilidade em formar heterodímeros e também a sua localização nos cromossomos (DING et al., 2003; HEMINGWAY et al., 2004).

Em insetos, apenas as GSTs citosólicas estão implicadas na resistência aos inseticidas. Segundo Enayati et al. (2003), essas enzimas foram inicialmente enumeradas conforme a sua ordem de eluição através de processos de purificação. Posteriormente ensaios imunológicos em *Musca domestica* identificaram duas classes de GST, I e II, a primeira codificada por uma família multigênica e a segunda codificada por apenas um gene. Conforme os estudos em insetos foram aumentando, novas GSTs foram identificadas e elas não se enquadravam dentro dessa classificação mencionada acima, então foi adotado o sistema de classificação de mamíferos.

Através de comparações filogenéticas descobriu-se que as enzimas da classe II são ortólogas a classe Sigma encontradas nas espécies desde nemátodas até mamíferos e a classe I é exclusiva de artrópodes, denominada Delta. Com essa nova classificação, mais classes de GSTs foram identificadas, como a Epsilon, a Tabela 1 mostra as classes de GSTs reagrupadas conforme as similaridades de seqüências em diferentes espécies.

Quadro 1: Classificação das classes de GST citosólicas e sua distribuição em diferentes espécies.

Classes de GST	Distribuição
Delta	Artrópodes
Épsilon	Artrópodes
Omega	Nematódeos, insetos e mamíferos
Theta	Insetos, mamíferos e plantas
Sigma	Helmintos, nematódeos, insetos e mamíferos
Zeta	Plantas, nematódeos, insetos e mamíferos

Fonte: Adaptado de Enayati et al. (2005).

Atualmente a nomenclatura dessas enzimas em insetos está formada por três partes: nome da espécie da qual a GST foi isolada, a classe da GST e a ordem de descoberta ou organização do genoma, exemplificando: *AgGSTd12* é o décimo segundo membro da subunidade de GST da classe Delta a ser identificado em *An. gambiae*.

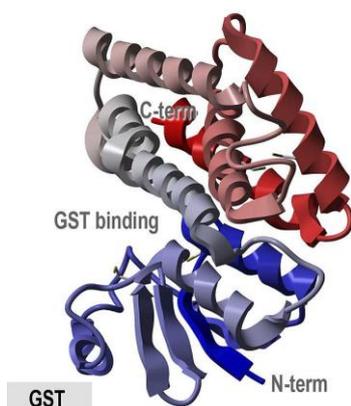
Os genes das famílias das GSTs em *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, foram bem descritos nos estudos de Ding et al. (2003) e Lumjuan et al. (2007) respectivamente, através de análise filogenética, clonagem, expressão e purificação de GSTs. Foram encontrados em *An. gambiae* 28 genes que codificam GSTs citosólicas, 12 da classe Delta e 8 Epsilon, 2 genes pertencentes a classe Theta e somente um para Omega e a Zeta.

Em *Ae. aegypti*, existem 26 genes que codificam GSTs, dois sofrem *splicing* alternativo totalizando 29 transcritos. As classes Delta e Epsilon são formadas por oito membros cada, também foram identificados nessa espécie 1 membro da classe Zeta e Omega e 4 da classe Theta, representado uma expansão dessa classe em relação ao *An. gambiae* que apresenta apenas dois genes.

Para *Culex quinquefasciatus*, foram descritos 40 possíveis genes que codificam GSTs (35 citosólicas e 5 microsossomais), desse total 14 corresponde a classe Delta, 9 Epsilon, 1 Sigma, 1 Omega, 6 Theta e 4 não classificadas ainda, com relação a Zeta, até o presente momento não foi identificada no genoma de *Culex* (REDDY et al., 2011).

As GSTs citosólicas são constituídas por duas subunidades formando homodímeros ou heterodímeros com aproximadamente 25 kDa. Cada subunidade da enzima tem dois sítios de ligação, o sítio G, localizado na porção N-terminal da enzima que se liga a Glutathione e o sítio H (hidrofóbico) na porção C-terminal que se liga a substratos lipofílicos (Figura 2). A alta diversidade dessa região contribui para as GSTs se ligarem a diferentes substratos (MANNERVIK; DANIELSON, 1988). A glutathione é um tripeptídeo formado de três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina.

Figura 2- Estrutura cristalográfica da GST de *Anopheles cracens*.

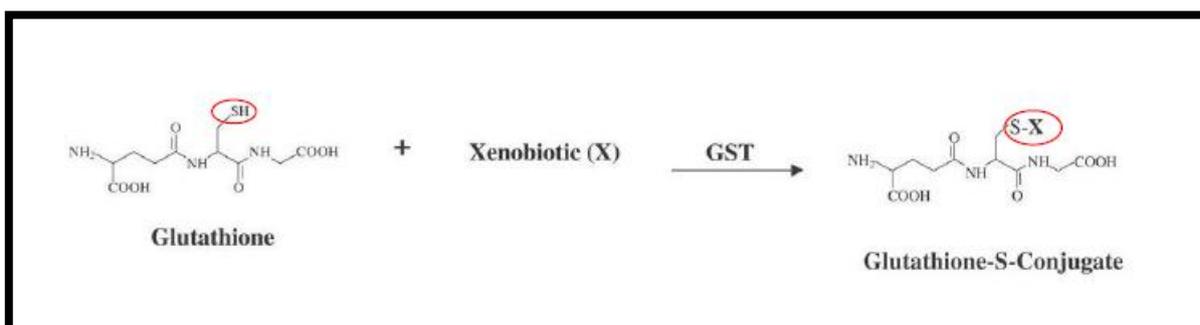


Fonte: Wikipedia (GLUTATIONA, 2014)

A metabolização ocorre através de duas formas, a conjugação da glutathiona no centro hidrofílico das substâncias tóxicas, levando a um aumento da solubilidade dos compostos e facilitando a sua excreção, ou ligando-se em compostos que não são seus substratos. Essa última modalidade de ligação está associada com o seqüestro, armazenamento e transporte de substâncias como inseticidas, hormônios, ácido graxos, entre outros (LUNJUAM et al., 2007).

Como explicado anteriormente, elas participam da reação de biotransformação, especificamente na conjugação da glutathiona com um substrato possivelmente tóxico para a célula, tornando-o mais solúvel e não tóxico para a célula. O sítio H se liga aos substratos lipofílicos enquanto o resíduo catalítico do sítio G interage e ativa o grupo sulfidril da glutathiona, reduzindo-o e gerando um anion tiolato (Figura 3). Esse anion é então capaz de atacar substratos, ligando-os ao sítio H.

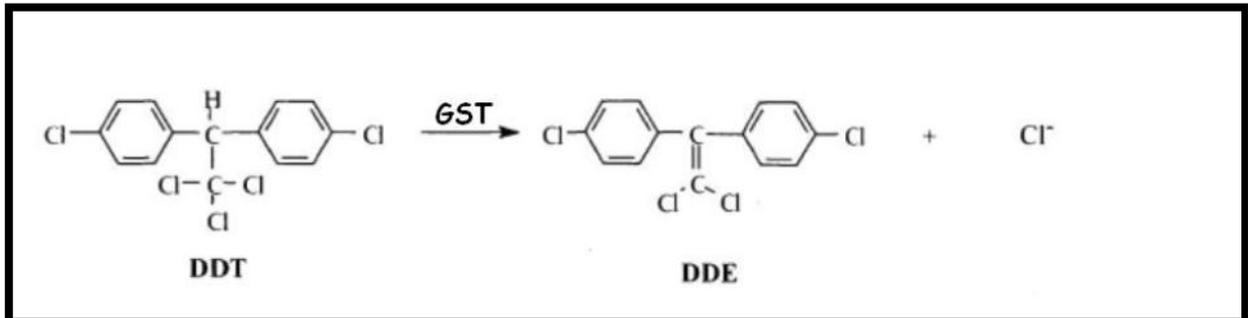
Figura 3- Conjugação da glutathiona reduzida com um substrato eletrofílico (xenobiótico) catalisado pela GST.



Fonte: Townsend e Tewe (2003)

Essa enzima também possui a atividade de DDTase (Figura 4), reação que elimina o DDT, através da retirada de um hidrogênio da molécula inseticida e liberação de uma molécula de cloro, o que gera o DDE, metabólico não tóxico (HEMINGWAY et al., 2004).

Figura 4- Atividade de DDTase (dehidrocloração) mediada por GST.



Fonte: Enayati et al. (2005), com modificações

As GSTs identificadas em mosquitos são expressas em machos e fêmeas e em todos os estágios de desenvolvimento (DING et al., 2003). Mas o padrão de expressão da enzima pode ser diferente em cada estágio do desenvolvimento do mosquito. Em geral, há um aumento na atividade da enzima no estágio larval e de pupa e essa expressão atinge um nível máximo quando o mosquito passa para a fase adulta, contudo há um declínio na expressão com a idade (HAZELTON; LAGN, 1983).

Variação no nível de atividade da enzima em diferentes tecidos tem sido descrito em algumas espécies. A GST Sigma de *Drosophila melanogaster* foi encontrada predominantemente nos músculos de vôo, sugerindo que o papel dessa classe de GST seja estrutural (SINGH et al., 2001). Também alto nível de atividade enzimática foi reportado no corpo gorduroso e no intestino médio de insetos, locais extremamente importantes para a detoxificação de xenobióticos (ENAYATI et al., 2005). Ayres et al. (2011) caracterizaram o cluster de GSTs da classe Epsilon em quatro espécies do gênero *Anopheles*: *An. funestus*, *An. plumbeus*, *An. stephensi* e *An. darlingi*. Eles mostraram que os genes são diferencialmente expressos, e que o gene *GSTE2* é o mais conservado entre as espécies, apresentando o mesmo número de códons na sequência codificadora do gene em todas as espécies, enquanto que os outros genes possuíam *indell*. Além disso, eles também mostraram que o gene *GSTE5* está evoluindo sob seleção positiva, ou seja, importante para a adaptação das espécies. Este padrão de expressão diferenciado sugere que há uma diversificação funcional entre os membros que surgem por duplicação gênica (AYRES et al., 2011). Entretanto, esta diversificação funcional tem sido pouco estudada.

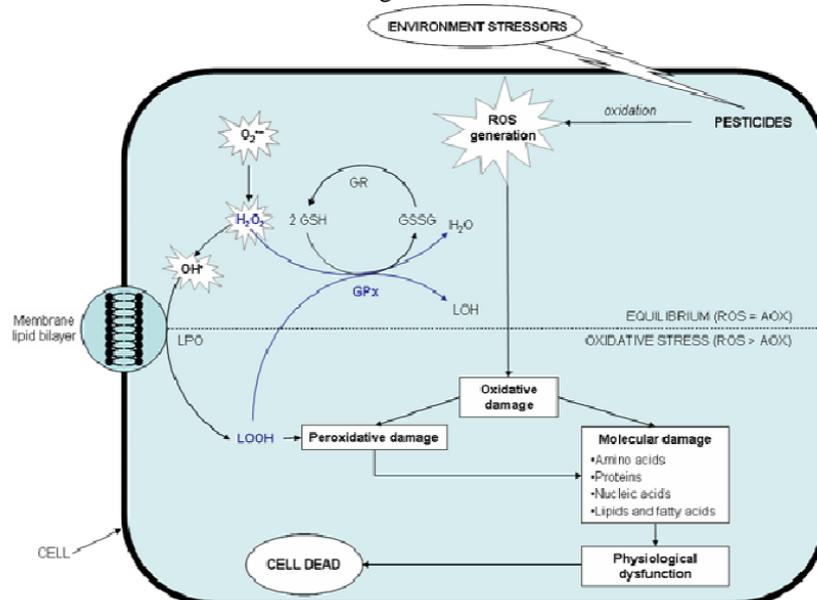
A elevada atividade das GSTs em insetos está, sobretudo relacionada com a resistência às quatro classes de inseticidas químicos, devido ao aumento na quantidade de uma ou mais enzimas seja por amplificação gênica ou aumento na taxa de transcrição da proteína (HEMINGWAY et al., 2004).

Essa classe de enzima tem um papel importante na inativação de produtos tóxicos resultante do metabolismo de oxigênio, as espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, e radicais hidroxil. Os ROS são danosos para a célula e afetam algumas de suas funções, tais como: proliferação, apoptose e diferenciação celular (SAWICKI et al., 2003).

2.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo nas células acontece devido à exposição do organismo a diversos agentes tóxicos, como drogas, inseticidas, radiação ionizantes, entre outros. Esse fenômeno vai ocorrer na célula quando houver um desequilíbrio entre a produção de produtos oxidantes e antioxidantes o que acarretará em danos nos ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Figura 5). Esse processo leva à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio chamados de radicais livres e como consequência à peroxidação de lipídeos, considerada bastante nociva para a célula (YANG et al., 2003).

Figura 5- Ilustração dos diferentes processos que podem ocorrer nas células devido à exposição à agentes tóxicos.



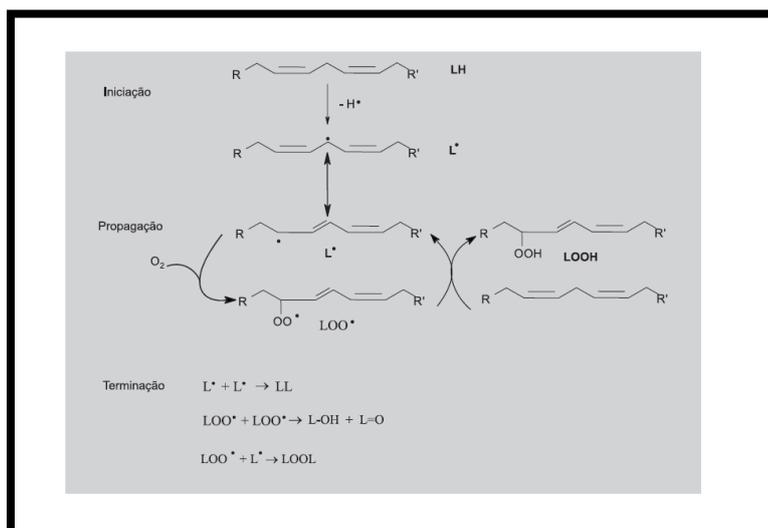
Fonte: Che-Mendonza (2009).

Organismos aeróbicos desenvolveram importantes mecanismos de proteção contra ERO. São mecanismos enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) e não enzimáticos (Glutathione), eles vão atuar inibindo ou diminuindo a oxidação da célula (VALAVANIDES et al., 2006). Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (MELO FILHO et al., 1983). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989).

A peroxidação de lipídeos é iniciada pela reação de radicais livres como ácidos graxos poliinsaturados encontrados na membrana plasmática e nas lipoproteínas. O processo ocorre em cascata e se desenvolve em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 6). Na fase de iniciação, os ácidos graxos poliinsaturados sofrem ataque de uma espécie reativa, seja de oxigênio ou de hidrogênio e ocorre a abstração de um átomo de hidrogênio, formando um radical de carbono, que é estabilizado por um rearranjo molecular formando uma estrutura com duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples.

O radical assim formado se combina com o oxigênio, formando o radical peroxila, que pode retirar um hidrogênio de outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono e assim promovendo a etapa de propagação. A terceira etapa dá-se pela aniquilação dos radicais gerados, originando produtos não radicalares ou então, os radicais peroxila e alcoxila sofrem clivagem formando aldeídos. O aldeído encontrado em maior quantidade nas células é o 4-HNE (LIMA; ABDALLA, 2001).

Figura 6- Esquema mostrando as reações ocorridas no processo de peroxidação lipídica.



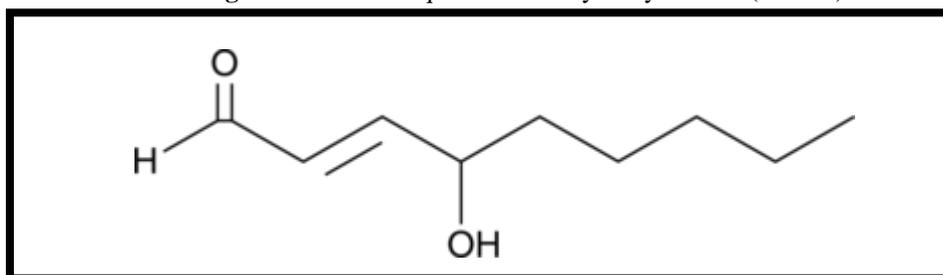
Fonte: Lima; Abdalla (2001).

Alguns trabalhos têm mostrado o envolvimento de GSTs na defesa contra estresse oxidativo. Um estudo publicado por MaB e colaboradores (2007) com baratas germânicas, mostra que nesse organismo, uma enzima GST tem a capacidade de metabolizar compostos provenientes da peroxidação lipídica. Em *Apis cerana cerana* a glutationa-s-transferase sigma 1 (AccGSTS1) submetida a diferentes condições de estresses como frio, calor, peróxido de hidrogênio e cloreto de mercúrio e inseticidas, revelou um aumento na expressão desse gene, o que pode apresentar um mecanismo de defesa contra o aumento dos níveis de estresse oxidativo causado por diferentes agentes (YAN et al., 2007).

2.6 Caracterização e reatividade química do 4-hydroxynonenal (4-HNE)

O 4-HNE foi descoberto em 1960 em estudos de caracterização de substâncias citotóxicas encontradas em linoleato de metila autoxidado. Esse composto é formado de ácido linoleico, ácido aracdônico e ácido aracdônico hidroperoxidado (ESTERBAUER, 1991).

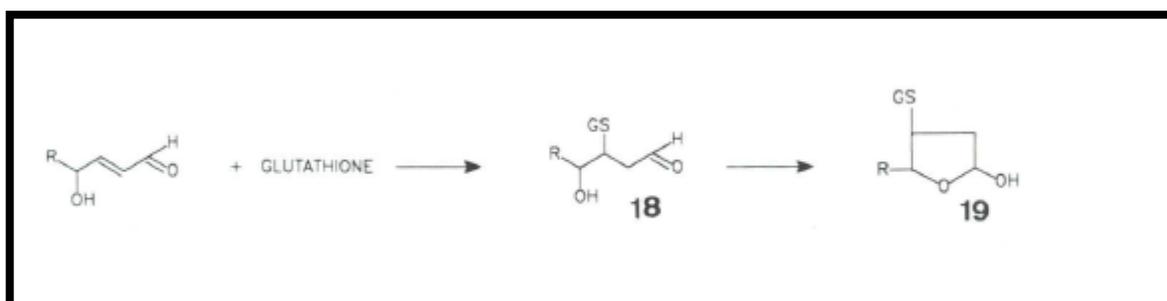
É um aldeído $\alpha\beta$ insaturado formado durante a peroxidação de lipídeos devido à degradação do $\omega 6$ ácido graxo poli-insaturado, que está presente nas membranas celulares. Possui três principais grupos funcionais, o grupo aldeído, a ligação dupla C-C e o grupo hidroxila, eles podem atuar independentemente ou em reações químicas sequenciais com outras moléculas (Figura 7). Cada um desses grupos reagirá conforme o tipo de reagente e condições da reação (ESTERBAUER, 1991).

Figura 7- Estrutura química do 4-hydroxynonenal (4-HNE).

Fonte: Cayman Chemical (2014)

Como citado anteriormente, esse composto apresenta um carbonil $\alpha\beta$ e pode reagir com nucleófilos via Adição de Michael 1,2 e 1,4. A primeira envolve a reação da amina primária (ex. lisina) com o carbono que possui a insaturação, essa reação resulta no intermediário da reação chamado carbonilamina que sofre rearranjos e perde água para formação da base de Schiff. A adição 1,4 ocorre com o C3 do aldeído (β carbono) e um nucleófilo, o resultado é a adição de nucleófilos e prótons através da dupla ligação carbono-carbono. O produto é um enolato que se rearranja para a forma ceto e depois ocorre a protonação do carbono 2. Alguns resíduos de proteínas cisteína, histidina e lisina reagem com o 4-HNE via essa reação de Michael como descrito acima (ULLERY, 2012).

Estudos mostraram que o 4-HNE presente nas diferentes partes das células causa uma rápida perda de grupo sulfidril (SH), o que torna a glutatona uma molécula capaz de reagir com o 4-HNE (DOI et al., 2004; LESGARDS et al., 2011; YANG et al., 2003). A figura 8 mostra o produto inicial dessa reação, o aldeído saturado com o resíduo de glutatona através de uma ligação tio-éter no átomo de carbono 3. Este produto em seguida, é submetido a um rearranjo intramolecular para os cinco membros hemiacetal cíclico 19, que é 95% do produto final em solução aquosa (ESTERBAUER, 1991).

Figura 8- Reação do 4-HNE com a glutatona

Fonte: Esterbauer (1991).

Uma das formas da célula eliminar o 4-HNE é por meio do mecanismo envolvendo a conjugação com a glutatona, explicitado acima. A reação com a glutatona ocorre via adição de Michael, o tripeptídeo glutatona é adicionado ao carbono que possui a ligação dupla com outro carbono, isso pode ocorrer espontaneamente ou pode ser catalisado na presença da Glutathione-S-Transferase, na qual a velocidade da reação vai aumentar gradativamente (SCHAUR, 2003; PETERSEN; DOORN, 2004).

2.7 Temephos

O temephos é um inseticida pertencente à classe dos organofosforados, usado para o controle de larvas de mosquitos. Este inseticida químico é o único recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para uso em água potável (CHAVASSE; YAP, 1997), por apresentar algumas vantagens em relação a outros inseticidas (organoclorados), como por exemplo, serem mais estáveis, não se acumularem nos tecidos de plantas e animais, ter baixa toxicidade e ser produzido em formulações de lenta liberação, o que favorece seu efeito residual prolongado (> 3 meses) nos criadouros (CHAVASSE; YAP, 1997).

A molécula inseticida possui como alvo a enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima, em situação normal (sem a ação do inseticida) é responsável pela metabolização do neurotransmissor acetilcolina (ACE), que atua na propagação do impulso nervoso elétrico. Com a ação do inseticida, a AChE é fosforilada, ficando irreversivelmente inativada. Conseqüentemente, o neurotransmissor ACE se acumula nas sinapses nervosas, levando a propagação contínua do impulso elétrico, culminando com a morte do inseto (WARE; WHITACRE, 2004).

No Brasil, o uso do temephos para o controle de *Ae. aegypti* se iniciou esporadicamente em 1967, com o surto de casos de dengue em 1986, o uso deste produto foi intensificado, o que ocasionou o aparecimento de populações do vetor resistente a este composto. Em 1999, foi estruturada a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência do *Aedes aegypti* a Inseticidas (Rede MoReNAa), coordenada pelo Ministério da Saúde, a responsável pelo monitoramento da susceptibilidade de populações de *Ae. aegypti* aos inseticidas químicos empregados em seu controle.

Os primeiros casos de alteração na susceptibilidade em populações de *Ae. aegypti* ao temephos no país foram detectados em 1999 (BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLOGICO, 1999; MACORIS et al., 1999; MONTELLA et al., 2007). Atualmente a

resistência a esse composto está disseminada pelo país (BESERRA et al., 2007; BRAGA et al., 2004; FONTOURA et al., 2012; LIMA, E. et al., 2006, 2011; LIMA, J. et al., 2003; MONTELLA et al., 2007).

Estudo realizado por Diniz (2011) e Helvecio (2012) com populações do mosquito proveniente de vários municípios do Estado Pernambuco revelou uma alta razão de resistência ao inseticida temephos com valores acima de 100 x e elevado número de indivíduos com atividade de GST alterada, representando quase 90% dos mosquitos analisados em algumas populações. Um estudo realizado por Montella e colaboradores (2008) com populações brasileiras de *A. aegypti* de vários estados, num período de tempo de três anos mostrou que na primeira avaliação em 2001 dos mecanismos de resistência presentes nessas populações, somente as da região nordeste apresentavam atividade alterada para as GSTs, porém em 2004 foi realizada outra avaliação e se observou uma disseminação de populações com atividade das GSTs alteradas, provavelmente em função do aumento no uso de piretróides para controle de mosquitos adultos.

Populações de *Ae. aegypti* resistentes ao temephos também têm sido descritas em outras partes do mundo, como na Costa Rica (BISSET et al., 2013), Cuba (BISSET et al., 2004), Bolívia (BIBER et al., 2006), Colômbia (GRISALES et al., 2013; OCAMPO et al., 2011; SANTACOLOMA; CHAVES; BROCHERO, 2012), Argentina (LLINAS et al., 2010), El Salvador (LAZCANO et al., 2009), Índia (SHETTY; SANIL; SHETTY, 2013; TIKAR et al., 2009), Malásia (LOKE et al., 2010), Trinidad e Tobago (POLSON et al., 2011) e Tailândia (KOMALAMISRA et al., 2011).

Devido ao manejo tardio da resistência a este composto no Brasil, ele se tornou ineficiente no controle de *Ae. aegypti* e foi substituído por outros inseticidas, poucos trabalhos mostram que após a substituição do temephos, o processo de reversão da resistência se dá de forma lenta (BRAGA et al., 2004; LIMA et al., 2011). Alguns municípios adotaram o uso do biolarvicida Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*) e atualmente o Ministério da Saúde recomenda o uso do novaluron (Inibidor da síntese de quitina) para o tratamento de criadouros do mosquito.

3 JUSTIFICATIVA

O aparecimento da resistência a inseticidas químicos é um grave problema no controle de insetos de importância médica e pragas na agricultura. Conhecer a base genética da resistência é importante para detectar e monitorar a resistência em campo e também para implementar medidas de controle eficientes, assim como para desenvolver novos inseticidas. Já foi demonstrado que as GSTs estão envolvidas no processo de metabolização de inseticidas e os genes que codificam estas enzimas estão em grande número no genoma de culicídeos vetores.

O larvicida temephos é um inseticida largamente usado nos programas de controle do *Aedes aegypti*, principal vetor da dengue e febre amarela urbana. Entretanto, populações de *Ae. aegypti* resistentes a este composto já foram relatadas em diversas partes do Brasil e em outros países, apontando para a necessidade de mais estudos sobre os mecanismos envolvidos nesse processo.

Apesar de vários trabalhos terem sido publicados sobre os mecanismos metabólicos de resistência, pouco se sabe sobre a sua base molecular. Atualmente existem poucos métodos de diagnóstico para a resistência metabólica e muitas vezes são falhos, por utilizarem substratos genéricos, assim, mais pesquisas necessitam ser realizadas para a descoberta de substratos que sejam mais específicos para as enzimas.

Além disso, ainda não está claro se o papel das GSTs nos mecanismos de resistência aos inseticidas químicos é devido à sua interação direta com o xenobiótico (via conjugação da GSH) ou se ocorre via metabolismo dos compostos secundários tóxicos gerados pela exposição aos inseticidas. Desta forma, pretendemos com este estudo, investigar a atividade protetora de um membro de GST da classe epsilon (GSTE2) contra produtos derivados da peroxidação de lipídios (4-HNE) provocada pela ação do larvicida temephos, o que ainda não foi confirmada e nem relacionada com o desenvolvimento do fenótipo da resistência.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Este estudo tem como objetivo a caracterização funcional do gene da *GSTE2* em linhagens de *Aedes aegypti* com diferentes perfis de susceptibilidade ao organofosforado temephos.

4.2 Específicos

- a) Comparar a atividade de GSTs totais de linhagens resistente e susceptíveis de *Aedes aegypti* usando os substratos CDNB e 4-HNE através de ensaios bioquímicos;
- b) Identificar polimorfismos genéticos na sequência do gene *GSTE2* entre linhagens susceptíveis e resistente de *Aedes aegypti*;
- c) Verificar a atividade da *GSTE2* recombinantes das linhagens RecR (resistente) e RecLab (susceptível) na metabolização do 4-HNE;
- d) Comparar os níveis de expressão do gene *GSTE2* por qRT-PCR em linhagens de *Ae. aegypti* com diferentes perfis de susceptibilidade ao temephos;
- e) Avaliar o efeito da exposição ao temephos no padrão de expressão de *GSTE2* em linhagens de *Aedes aegypti* com diferentes perfis de susceptibilidade a este composto.

5 METODOLOGIA

5.1 Linhagens de *Aedes aegypti*

Foram usadas no presente estudo quatro linhagens de *Aedes aegypti* que apresentam diferentes perfis de susceptibilidade ao inseticida Temephos, a Rockefeller, linhagem referencia de susceptibilidade a inseticidas químicos, a RecLab, linhagem susceptível originária do município de Recife/PE, a RecR (MELO-SANTOS et al., 2010), linhagem selecionada em laboratório, com elevada resistência ao temephos e RecRev, sub-linhagem estabelecida a partir da 14^a geração da RecR, quando a RR era de 125 vezes, submetida ao processo de reversão da resistência ao temephos. A maioria destas linhagens é mantida há mais de 10 anos, no insetário do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa entre 65-85% e fotoperíodo 12:12 h (dia/noite). Os adultos foram alimentados em solução de sacarose a 10% e as fêmeas fizeram repasto sanguíneo em *Gallus* sp. As larvas foram mantidas em cubas com água deionizada e alimentadas com ração para gatos.

Em função dos objetivos foram utilizadas diferentes linhagens. Amostras da RecLab e RecR foram divididas em dois grupos: exposto e não exposto. As amostras do primeiro grupo foram submetidas à exposição com o inseticida temephos a uma concentração letal específica capaz de eliminar 50% dos indivíduos (CL_{50}). As exposições foram realizadas no estágio larval (L4) e a leitura feita 24 horas após o experimento. As larvas sobreviventes e as não expostas foram contadas e armazenadas a -80°C até a sua utilização em ensaios bioquímicos e qRT-PCR.

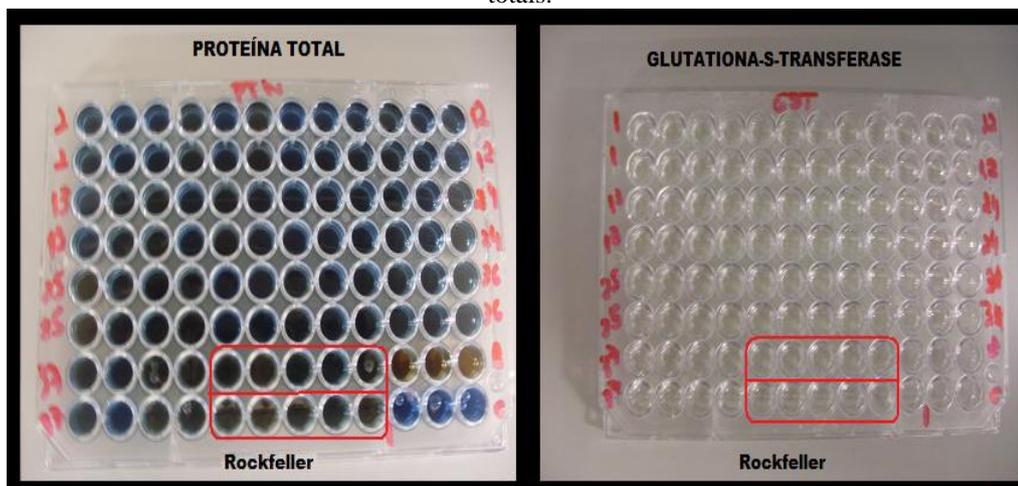
5.2 Avaliação da atividade de GSTs totais

Para avaliar o perfil de atividade das GSTs totais aproximadamente 90 larvas dos grupos exposto e não exposto, de cada linhagem, foram submetidas a testes enzimáticos, usando dois substratos diferentes, o convencional, CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzeno) descrito na Metodologia para Quantificação de Atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em *Aedes aegypti* (BRASIL, 2006), e o 4-HNE. Os testes foram realizados em uma série de três repetições, por população, com larvas no estágio L4, de acordo com o protocolo descrito por Brogdon (1989), com modificações.

As larvas foram homogeneizadas individualmente com 1 ml de tampão fosfato de potássio pH 7.2 em microtubos de 1,5 ml, os homogenatos eram distribuídos em duplicatas nas microplacas de 96 poços *Nunc* (Figura 9), com 0,01 M da glutathiona reduzida (GSH) e 99×10^{-5} M de CDNB ou 4-HNE. É importante destacar que a mesma amostra para cada larva foi empregada para os dois testes.

Para o CDNB, a placa foi lida em cinética com duração de 20 minutos e com intervalo de um minuto para cada leitura no comprimento de onda a 340 nm. Para o 4-HNE, a leitura foi realizada em *end point*, ou seja, leitura imediata após a reação na placa com comprimento de onda de 224 nm. Todas as leituras foram feitas em espectrofotômetro de placas *Elx808* (Figura 10).

Figura 9- Representação das microplacas utilizadas nos ensaios bioquímicos para revelar a atividade das GSTs totais.



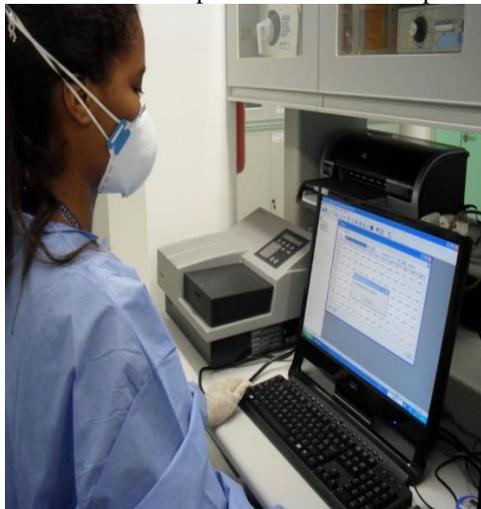
Fonte: Do autor

5.2.1 Análise dos dados

Ao final de cada ensaio, obteve-se como resultado o valor da absorbância das réplicas de cada larva. Os resultados de absorbância foram analisados no software específico *GEN 5*, o qual transformava os dados originais (obtidos em valores de absorbância) em atividade enzimática, através do cálculo do desvio padrão das réplicas. A atividade enzimática obtida para cada indivíduo foi corrigida de acordo com a concentração de proteínas totais. Os perfis enzimáticos das linhagens testadas foram classificados por comparação com a linhagem Rockefeller (percentil 99). As populações foram consideradas normais se <15% dos indivíduos apresentassem atividade enzimática compatível com o percentil 99 de Rockefeller, que expressa a atividade enzimática para 99% dos indivíduos desta linhagem. Valores entre

15% e 50% classificam as populações como alteradas e acima de 50%, muito alterada, de acordo com os critérios definidos pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006).

Figura 10- Representação do espectrofotômetro de placas *Elx808* usado para medir a absorbância da GST totais.



Fonte: Do autor

5.3 Quantificação da atividade enzimática da GSTE2

5.3.1 Amostras

Nesta etapa do estudo foram usadas as quatro linhagens de *Aedes aegypti*, três delas susceptíveis ao inseticida temephos: Rockefeller, RecLab e RecRev e uma resistente, RecR. Os indivíduos foram coletados na fase larval e mantidos a -80°C até a realização dos experimentos. Para avaliar a atividade enzimática das GSTE2 de cada linhagem, foi feita RT-PCR para amplificação do cDNA

5.3.2 Extração de mRNA

O RNA total de uma larva para cada uma das linhagens foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), e clorofórmio hidratado com água DEPC, seguido de precipitação com isopropanol, lavagem com etanol a 70%, centrifugação e ressuspensão com H_2O DEPC, e posteriormente tratado com TURBODNAase (Ambion), com o objetivo de eliminar contaminantes de DNA genômico. A concentração e qualidade do RNA total foram determinadas por espectrofotometria usando o espectrofotômetro NanoDrop® 2000. As amostras de RNA foram quantificadas através de espectrofotometria ($\lambda = 260 \text{ nm}$) e análise

em gel de agarose 1% em comparação com o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen).

5.3.3 RT-PCR (Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase)

As reações de transcrição reversa foram realizadas usando o Kit AMVCloned (Invitrogen®), conforme as recomendações do fabricante. Para cada 300 ng de RNA total foi usado 2 µM de oligo (dt), 2 µM do mix dNTPs, e 5 µl de água ultra pura. As amostras foram incubadas a 65°C por 5 minutos em banho maria e depois foram postas no gelo. Posteriormente foram adicionados 4 µl de tampão de síntese de cDNA 5x, 1 µl de DTT 0,1 mM, 0,2 U de RNase *out* e 0,2 U da Transcriptase Reversa. A última etapa do processo foi realizada no termociclador BIOMETRA® T3000 utilizando esse programa, 45°C por 60 minutos e depois 85°C durante 5 minutos.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 0,2 mM de cada dNTP, 1,6 µM de cada primer que amplificaram *GSTE2* de *Ae. aegypti* das linhagens susceptíveis e resistentes (Quadro 2). 2,5 U de Platinum *Taq* DNA Polimerase® (Invitrogen), tampão contendo 20 mM Tris-HCl pH 8.4 / 50 mM de KCl, 1,4 µM de MgCl₂ e 100 ng do DNA molde. Foi utilizado um controle negativo, com todos os reagentes citados acima, porém sem cDNA, com o objetivo de verificar uma possível contaminação dos reagentes. Cada amostra foi amplificada em um termociclador BIOMETRA® programado para uma etapa de desnaturação a 94°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min, e uma etapa final de 72°C por 10 min.

Quadro 2- *Primers* empregados na amplificação da *GSTE2* de *Ae. aegypti* das linhagens estudadas.

PRIMER	SEQUÊNCIA
<i>AaGSTE2Fw</i>	5'CAACTGCATATGACGAAGCTCAT3'
<i>AaGSTE2Rv</i>	5'TACCTGGAATTCTTATGCCTTTTGAGC3'

Fonte: Do autor

Os fragmentos de PCR foram separados por eletroforese em tampão TBE, a 120V, durante 60 minutos, em gel de agarose 1%, corado com solução de brometo de etídio (5

mg/ml). As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e os géis fotografados com câmera digital. Os tamanhos das bandas foram estimados pela comparação com padrões conhecidos do marcador de peso molecular DNA Ladder® 1Kb (Invitrogen).

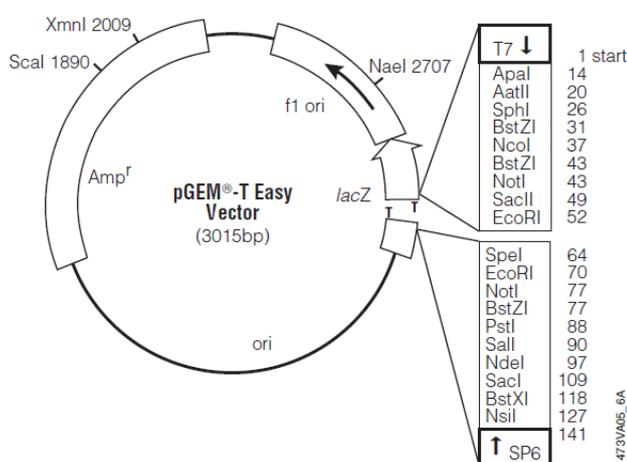
5.3.4 Purificação dos produtos de PCR

As bandas correspondentes aos produtos de PCR para o cDNA do gene da GSTE2 de *Ae. aegypti* foram separadas por eletroforese em gel de agarose, excisadas do gel e purificadas utilizando-se o Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification® (Invitrogen), conforme indicação do fabricante. A qualidade das amostras purificadas foi avaliada em espectrofotômetro NanoDrop® 2000 a partir da leitura da absorbância nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

5.3.5 Clonagem pGEM- Teasy

Os fragmentos amplificados foram inseridos no vetor pGEM-T easy (Promega) (Figura 11). Cada reação de ligação foi preparada em um volume final de 10 µl, empregando-se 5 µl de Tampão de ligação, 10 U T4 DNA ligase, 1 µl pGEM-T Easy (50 ng), 100 ng do produto purificado da PCR, e água ultra pura, as ligações foram incubada *overnight* a 4°C. As ligações foram utilizadas na transformação por choque térmico de células competentes de *Escherichia coli* DH5α.

Figura 11- Vetor pGEM-T easy utilizado na clonagem do gene *GSTE2*.



Fonte: Addgene (2014)

A transformação foi realizada usando 100 µl da célula DH5α quimicamente competente e 5 µl de cada ligação, em seguida as amostras foram homogeneizadas e mantidas no gelo por 30 minutos. Após esse período, as células competentes foram submetidas ao choque térmico, após uma etapa em banho-maria a 42°C por 1 min seguida de resfriamento em gelo por 2 min. 150 µl do meio enriquecido SOC foi adicionado a cada um dos tubos contendo as células transformadas.

As células transformadas foram mantidas a 37°C por 60 minutos sob agitação de 200 rpm em shaker. Cerca de 100 µl dessas amostras foram plaqueadas em meio seletivo Luria-Bertani (LB) sólido acrescido do antibiótico ampicilina a 100 µg/ml, X-Gal 80 µg/ml e IPTG 0,5 mM e incubadas na estufa a 37°C *overnight*. Depois do período de incubação as colônias brancas (possíveis clones positivos) foram selecionadas e repicadas individualmente em tubos de falcon de 15 ml estéreis, contendo 5 ml de meio LB líquido seletivo com ampicilina. Os constructos plasmidiais recombinantes foram isolados pelo método de lise alcalina de acordo com as recomendações do kit QIAprep Spin Miniprep 250 (Qiagen) e quantificados em NanoDrop® 2000.

As construções plasmidiais foram submetidas ao sequenciamento automático ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems) na plataforma tecnológica, usando os primers universais M13F e M13R, compatíveis com o vetor pGEM T-Easy. A identidade e a qualidade das seqüências de nucleotídeos obtidas foram analisadas por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e pelo programa DNASTar, e foram escolhidas apenas duas construções: uma da linhagem susceptível (RecLab) e outra da resistente (RecR) para as próximas etapas de subclonagem em vetor de expressão para obtenção das proteínas recombinantes de fusão em sistema procarioto.

5.3.6 Digestão com enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI*

As construções plasmidiais das linhagens susceptíveis e resistentes foram submetidas a duas digestões com as enzimas de restrição *NdeI* e *EcoRI* para a liberação do fragmento gênico *GSTE2* inserido em cada vetor de clonagem. A primeira digestão foi realizada com a enzima *NdeI* (New England Biolabs), empregando-se um volume final de 30 µl constituídos de 3 µl do Tampão 4, 10 U da enzima, 80 ng de DNA e 15 µl de água ultra pura, esta reação foi mantida em termociclador por 15 horas a 37°C e 15 minutos a 65°C. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1% e visualizado sob luz UV, em seguida a banda do gel

correspondente ao produto da 1ª digestão foi excisada e purificada usando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification® (Invitrogen).

O DNA purificado foi submetido a uma segunda digestão com a enzima *EcoRI*, com um volume total de 40 µl de reação formados por 2,5 U da enzima, 4µl do tampão *EcoRI*, 70 ng de DNA e 6 µl de água. As amostras foram mantidas no termociclador por 24 horas a 37°C. Novamente os produtos finais da digestão foram analisados em gel de agarose a 1% e visualizado sob luz UV, as bandas no gel correspondentes aos fragmentos gênicos *GSTE2* sensível e resistente excisados pelas endonucleases foram cortadas e purificadas com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification® (Invitrogen).

5.3.7 Subclonagem do gene *GSTE2* no Plasmídeo de Expressão pET28

As seqüências codificantes de interesse foram inseridas de forma direcional no vetor pET28a a fim de se obter as proteínas *GSTE2* recombinantes RecLab e RecR com uma seqüência de Poli-His (Histidinas) na sua porção N-terminal. Cada mistura de ligação foi preparada empregando-se um volume final de 10 µl constituídos de 10 U de T4 ligase, 1 µl de tampão 4, 5µl (50ng) do pET28, 2 µl de DNA e 1 µl de água, essa reação foi mantida a 16°C por 16 horas.

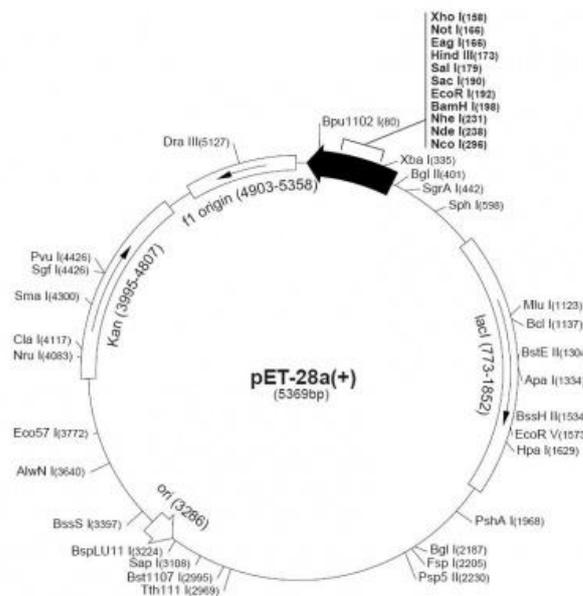
O procedimento empregado na transformação das células competentes foi similar ao descrito no item 5.3.5. As células transformadas foram semeadas em meio LB sólido com o antibiótico Kanamicina e então mantidas na estufa a 37°C overnight.

Após o período de incubação, alguns clones foram selecionados para etapas de isolamento plasmidial e individualmente foram inoculados em 5 ml de meio LB Kanamicina e incubados a 37°C overnight sob agitação de 200 rpm. As células tiveram seus plasmídeos extraídos pelo kit QIAprep Spin Miniprep 250 (Qiagen) segundo as instruções do fabricante. Com a finalidade de verificar quais as amostras plasmidiais de pET28 que continham a integração do inserto, foi realizada uma digestão em pequena escala dos clones selecionados com as duas enzimas citadas anteriormente e os fragmentos correspondentes ao gene *GSTE2* excisados foram visualizados em gel de agarose 1% sob luz UV. A identidade das seqüências codificadoras para *GSTE2* também foram mais uma vez confirmadas por sequenciamento automático ABI PRISM ® 3100 (Applied Biosystems).

5.3.8 Expressão e purificação das proteínas recombinantes (GSTE2RecLab e GSTE2RecR)

Para expressar as proteínas recombinantes de $\cong 24$ kDa (GSTE2RecLab e GSTE2RecR), codificadas pelos fragmentos RecLab e RecR de $\cong 660$ pb da sequência codificadora do gene *GSTE2* de *Ae. aegypti* clonados no vetor de expressão pET28a (Figura 12), células competentes do tipo BL21star de *E. coli* foram transformadas com os constructos pET28-RecLab e pET28-RecR e plaqueadas em meio LB suplementado com Kanamicina (10 $\mu\text{g/ml}$). Uma colônia da placa foi selecionada, inoculada em 10 ml de meio LB com o mesmo antibiótico acima citado e incubada a 37°C, sob agitação por 12 horas. A cultura crescida foi inoculada em 500 ml de meio de cultura (LB) suplementado com Kanamicina (100 $\mu\text{g/ml}$) e submetida às mesmas condições de incubação citadas anteriormente.

Figura 12- Vetor pET28a utilizado no processo de expressão da proteína GSTE2



Fonte: Addgene (2014).

O crescimento bacteriano foi monitorado através da densidade ótica ($\lambda=600$ nm) de alíquotas do meio de cultura no espectrofotômetro. Ao atingir densidade ótica de 0,5, as bactérias foram induzidas a 30°C com IPTG na concentração final de 0,1 mM durante 4 horas. Uma alíquota de 200 μl de meio de cultura foi centrifugada a 5.000 g por 3 min. Ao sedimento foram acrescentados 80 μl de tampão de amostra Laemmli 2X e 15 μl da amostra foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE 10%, o gel foi corado com azul de comassie R-250 e analisado. O volume restante foi centrifugado a 5.000 g por 10 min a 4°C. O sedimento

obtido foi ressuspenso em 20 ml de tampão PBS para posterior lise através de um sonificador Sonics Vibra-Cell VC 505. Foi adicionado Triton-X 1% final ao lisado para posterior centrifugação a 5.000 g por 10 min a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado imidazol 5 mM e 200 µl de resina de agarose Ni-NTA® (Qiagen) previamente equilibrada com PBS após três lavagens consecutivas. A mistura foi incubada por 1 hora a 4°C sob leve agitação. Após incubação a amostra foi centrifugada a 5.000 g por 2 min, o sobrenadante foi descartado e a resina foi lavada três vezes com 1 ml de tampão PBS.

As proteínas recombinantes ligadas a resina foram eluídas através de sucessivas lavagens com tampão de lavagem (50 mM de Na₂PO₄/300 mM de NaCl/ 10% de glicerol pH 6) e 20 mM de imidazol (1^a lavagem); tampão de lavagem e 0.5 M de imidazol (2^a e 3^a lavagens). A resina final foi ressuspenso com 200 µl de PBS/glicerol 10% e armazenada a -70°C. Um volume de 10 µl de cada eluato da resina restante foi acrescido de igual volume de tampão Laemmli 2X e 10 µl foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE 15%, visualizado após coloração com azul de Coomassie R-250, para avaliar a purificação.

5.3.9 Ensaio de Biocatálise

Com o objetivo de avaliar a atividade metabólica da GSTE2 contra o substrato 4-HNE experimentos de biocatálise foram realizados e os resultados avaliados por cromatografia de camada delgada (CCD). Esta técnica está baseada na separação dos componentes de uma mistura, identificação e quantificação das espécies químicas, é realizada através da distribuição de componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo.

Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela, durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes, ou seja, os componentes da amostra têm diferentes velocidades ao passarem pela fase estacionária (DEGANI et al., 1998).

Em um erlenmeyer com capacidade para 10 ml, 6 mg das proteínas purificadas foram incubadas com 1,2 mM de 4-HNE, 1mM de glutatona (GSH) e 1 ml de tampão fosfato de potássio pH 7,2 em uma incubadora TECNAL a 30°C e rotação de 120rpm. Foi feito também outra reação denominada padrão, onde todos os reagentes citados acima estavam presentes,

com exceção da enzima GSTE2. Ambas as reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD) até o consumo total do substrato.

As amostras das reações foram aplicadas em placa de sílica com dimensões de 2,5x5,0 cm, onde uma gota de cada amostra reacional e de uma amostra padrão de 4-HNE foi aplicada, com ajuda de um capilar, próxima à base da placa (cerca de 1 cm acima da base), com cuidado para que o diâmetro da mancha não ultrapassasse 0,25 cm. A cuba cromatográfica foi preparada com um recipiente de vidro com tampa e conteúdo papel de filtro nas paredes embebidos com a fase móvel, deixando a atmosfera interna do recipiente saturada com vapores da fase móvel para facilitar a “corrida” cromatográfica (Figura 13).

Figura 13- Cuba cromatográfica

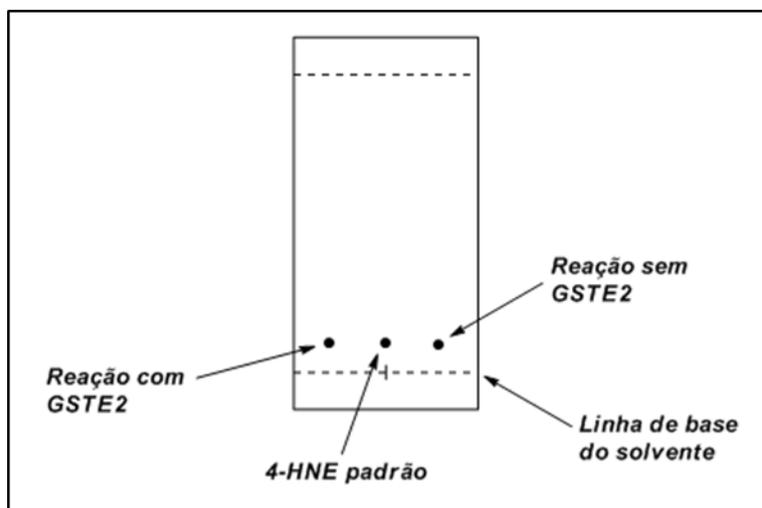


Fonte: Do autor

Em seguida, a placa foi posicionada na cuba cromatográfica de modo que o nível da fase móvel ficasse abaixo do ponto onde as amostras haviam sido aplicadas, onde foi eluída com uma mistura dos solventes *n*-hexano/acetato de etila na proporção 1:1. A cromatoplaça

foi revelada em vanilina sulfúrica sob aquecimento, a figura 14 mostra o esquema de aplicação das amostras.

Figura 14- Esquemática do cromatograma obtido por CCD na reação da GSTE2 com o 4-HNE.



Fonte: Do autor

5.4 Avaliação da expressão gênica do gene *GSTE2* por RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O RNA total de amostras das linhagens RecR e RecLab foi obtido a partir de pools de 5 larvas, usando o protocolo de extração de RNA por Trizol (Ambion). A qRT-PCR foi realizada com o kit Quantitect SYBR Green RT-PCR (QIAGEN, cat No 204245) onde foram usados os primers 5' AAGATCTACGGCTGGCTGGA 3' e 5'TCTGCGACAGGACAAACTGC 3' que são específicos para o gene *GSTE2*. Os primers foram desenhados usando o primer select, uma das ferramentas do DNA Star. Todas as reações de RT-PCR quantitativa foram realizadas em duplicata com cinco repetições no sistema de PCR em tempo real da Applied Biosystems (ABI 7500). Para cada reação foram usados: SYBR Green Master mix 1X, 0,2 µM de cada primer (Forward e Reverse), 0,2 U da enzima Transcriptase Reversa, 5 µl de cada amostra normalizada para 100 ng e H₂O para completar 25 µl de reação. O gene *rpl8* foi usado como controle endógeno. A reação de RT-PCR quantitativa foi realizada medindo-se a intensidade de fluorescência do Sybr-Green I, na qual todas as amostras puderam ser comparadas. A fluorescência emitida foi captada pelo sistema óptico do termociclador e transmitida para um computador onde o *software* fez a

análise final dos dados. Os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo software ABI (versão 2.0.4) da Applied Biosystems.

O programa de qRT-PCR se deu nas seguintes etapas: uma etapa inicial a 50°C por 30 minutos que permitiu a transcrição reversa; outra etapa de 15 minutos a 95°C para ativar a Taq polimerase seguida por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Controles negativos foram incluídos para detectar contaminação dos reagentes (mix sem molde de RNA) e presença de DNA genômico não removido pelo tratamento com DNase (mix sem transcriptase reversa). A expressão relativa do RNAm foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

6 RESULTADOS

6.1 Análise bioquímica das GSTs totais

Os resultados dos ensaios enzimáticos utilizando o CDNB como substrato revelou que a linhagem susceptível RecLab não apresentou indivíduos com atividade alterada para as GSTs totais, mesmo na condição de exposição ao temephos. Em relação à linhagem resistente RecR, 33% das larvas não expostas apresentaram atividade alterada para essa enzima e 35% das larvas expostas também mostraram alteração (Tabela 3).

Por outro lado, empregando-se o 4-HNE como substrato, foi observado que as duas linhagens mostraram alteração para as GSTs totais em relação à Rockefeller, com aumento na atividade destas enzimas após a exposição ao temephos para as duas linhagens. Os resultados destes testes estão mostrados na Tabela 3.

Quadro 3- Atividade enzimática de GSTs totais em larvas de linhagens de *Aedes aegypti* (RecLab e RecR) usando o CDNB e o 4-HNE como substrato sob diferentes condições (exposto e não exposto ao temephos).

CDNB	Linhagens	Número de Larvas	p99 ¹	% >p99 ²	Classificação ³
	Rockefeller	83	1,3	-	-
	Rec Lab Não exposto	95	1,7	1	N
	Rec Lab exposto	78	1,8	1	N
	RecR Não exposto	91	4,3	33	A
	RecR Exposto	86	4,9	35	A
4-HNE	Linhagens	Número de Larvas	p99 ¹	% >p99 ²	Classificação ³
	Rockefeller	80	2,0	-	-
	Rec Lab Não exposto	91	4,1	20	A
	Rec Lab exposto	98	5,2	30	A
	RecR Não exposto	89	7,3	45	A
	RecR Exposto	87	8,5	55	MA

Fonte: Do autor

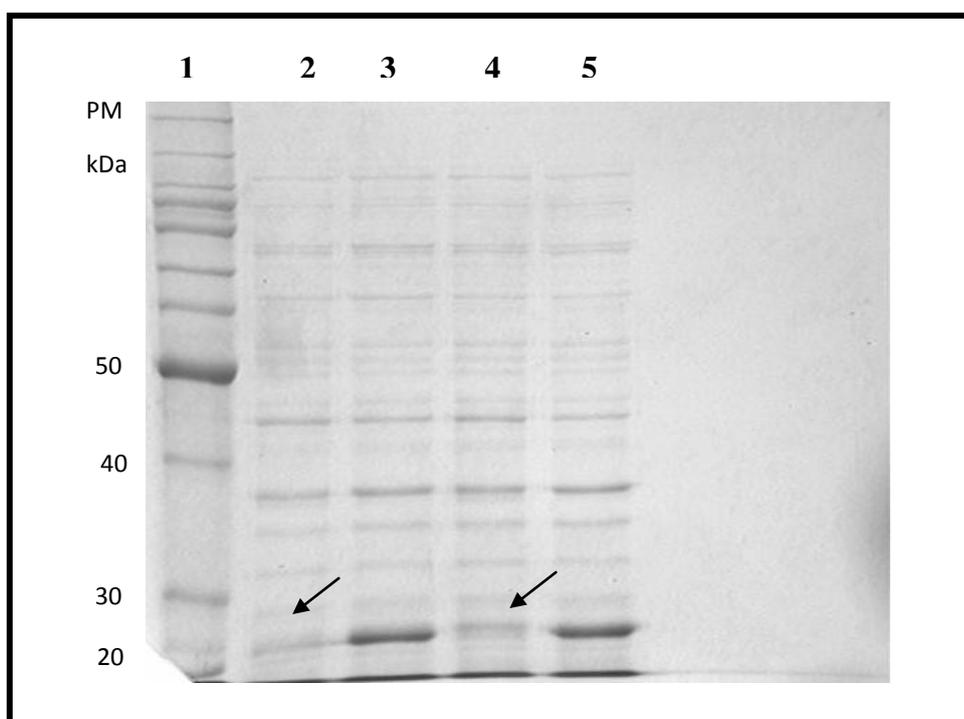
Legenda: ¹ Percentil 99, ² Porcentagem de indivíduos com atividade enzimática acima do percentil 99 de Rockefeller, ³ Classificação da atividade enzimática comparada com Rockefeller: N (normal), A (alterado) e MA (Muito alterado)

6.2 Análise da atividade enzimática da GSTE2 contra o 4-HNE

6.2.1 Expressão e purificação das GSTE2

A produção da proteína recombinante foi realizada por meio da indução por IPTG. A Figura 15 mostra um gel de SDS-PAGE a 10% após as amostras serem submetidas a condições desnaturantes. A presença da banda diferenciada nas frações 2 e 4 mostra o tamanho esperado da proteína GSTE2, de aproximadamente 24 kDa, revelando o sucesso na metodologia de expressão adotada.

Figura 15: Expressão da proteína GSTE2 das linhagens RecLab e RecR



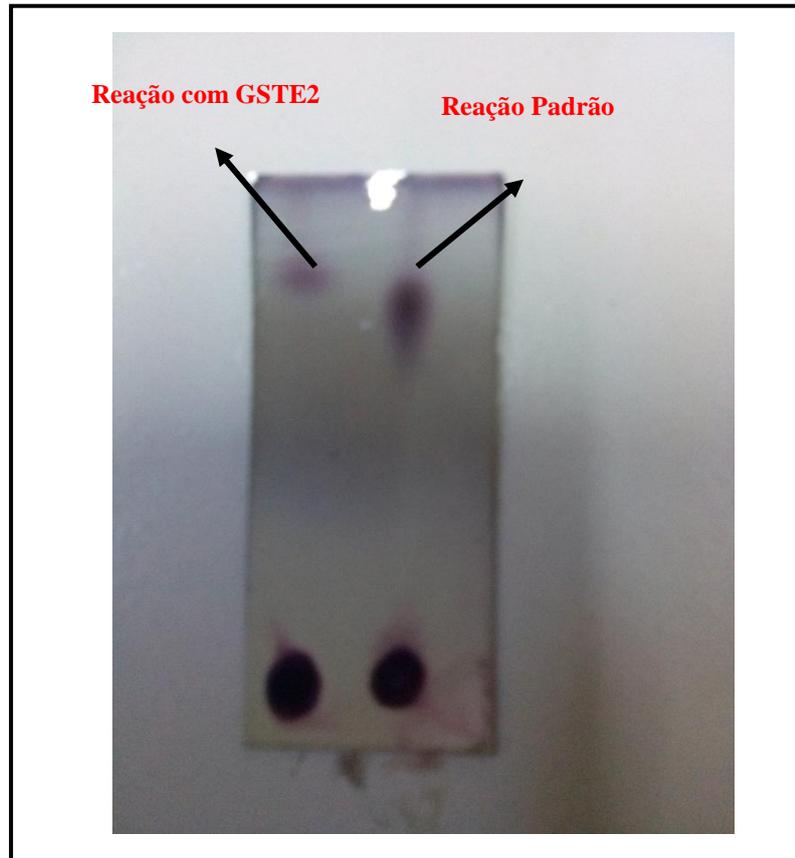
Fonte: Do autor

Nota: A coluna 1 é o peso molecular, os poços 2 e 3 são proteínas da linhagem RecLab e os poços 4 e 5 da linhagem RecR., a 2 e 4 são extratos proteicos não induzidos do sistema de expressão e as colunas 3 e 5 são os extratos proteicos induzidos mostrando a eficiência no processo de expressão protéica (Apontada pelas setas).

6.2.2 Ensaio de biocatálise

Os ensaios de biocatálise realizados com a GSTE2 de RecLab e RecR não foram conclusivos, apesar de ter sido observada uma redução na intensidade da banda e migração diferencial na amostra com a enzima presente na reação na placa de sílica (Figura 16).

Figura 16- Monitoramento da cromatografia de camada delgada com placas de sílica



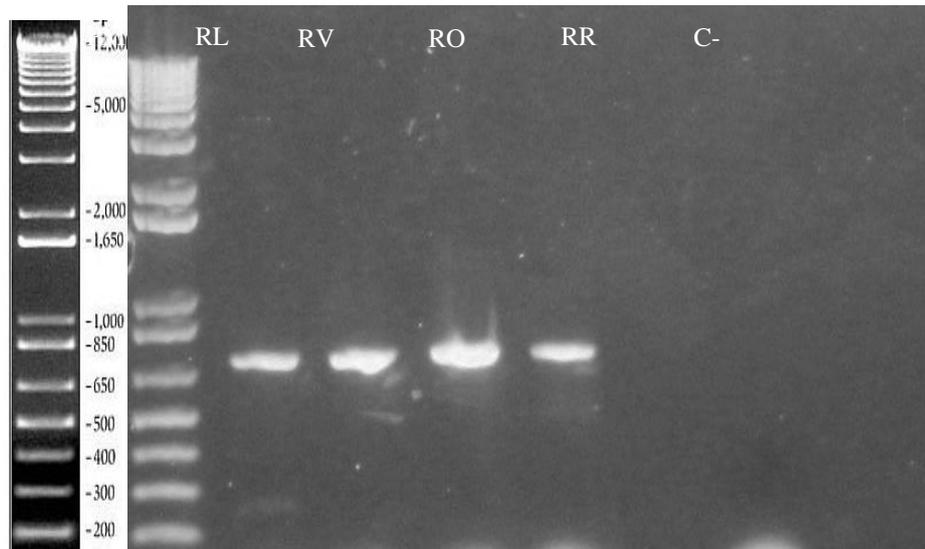
Fonte: Do autor

6.3 Análise da região codificadora do gene *GSTE2* em linhagens susceptível (RecLab) e resistente (RecR) ao temephos

As reações de RT- PCRs realizadas em larvas das linhagens (RecLab, RecRev, Rock e RecR) amplificaram um fragmento de aproximadamente 669 pares de base (Figura 17). Estes fragmentos foram purificados, clonados e sequenciados. As sequencias foram alinhadas com as que estão depositadas no NCBI (AaeL_AAEL007951, VectorBase: AAEL007951).

O resultado do alinhamento evidenciou polimorfismos presentes entre as seqüências obtidas dos clones das linhagens susceptíveis e a seqüência do *GSTE2* de *Ae. aegypti* disponível no NCBI/VectorBase. Apenas quatro mutações do tipo substituição de bases foram observadas. Nenhuma mutação do tipo *indell* (adição ou deleção) foi observada (Tabela 4). Essas mutações levaram a trocas de aminoácidos na cadeia polipeptídica (Tabela 5). Já para os clones resistentes, houve 24 substituições nucleotídicas e cinco trocas de aminoácidos (Tabela 6 e 5, respectivamente). A figura 18 mostra o alinhamento das sequencias de aminoácidos entre todas as linhagens estudadas.

Figura 17- Gel de agarose 1% mostrando amplificação do fragmento de 669 pb correspondente a região codificadora do gene *GSTE2*.



Fonte: Do autor

Nota: PM (Marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Invitrogen), RL (RecLab), RV (RecRev), RO (Rockefeller), RR (RecR), C- (Controle negativo).

Quadro 4- Alterações de aminoácidos detectadas no alinhamento entre as seqüências proteicas de GSTE2 de *Ae. aegypti* disposta no NCBI (AaeL_AAEL007951) e dos clones susceptíveis.

POSIÇÃO DE BASE ALTERADA				
GSTE2 <i>Ae. aegypti</i>	313	344	416	515
RecLab	G	G	A	T
RecRev	A	T	A	A
Rock	G	T	G	A

Fonte: Do autor

Quadro 5- Alterações de aminoácidos detectadas no alinhamento entre as sequências proteicas de GSTE2 de *Ae. aegypti* disposta no NCBI (AaeL_AAEL007951) e com as linhagens estudadas.

LINHAGENS	POSIÇÃO DO AMINOÁCIDO ALTERADO							
	105	111	115	139	150	172	178	198
<i>GSTe2 Ae. aegypti</i>	G	L	C	Q	I	V	E	A
Rec Lab	G	-	F	Q	-	E	-	-
RecRev	S	-	F	Q	-	E	-	-
Rock	G	-	F	R	-	E	-	-
RecR	-	S	F	-	V	-	A	E

Fonte: Do autor

Quadro 6- Alterações de aminoácidos detectadas no alinhamento entre as seqüências proteicas de GSTE2 de *Ae. aegypti* disposta no NCBI (AaeL_AAEL007951) com a linhagem RecR.

POSIÇÃO BASE ALTERADA																								
	57	189	252	273	332	333	344	357	375	411	448	468	471	477	507	516	519	522	533	534	552	576	593	654
GSTE2 <i>Ae. aegypti</i>	A	C	T	T	T	G	G	T	G	T	A	A	C	T	T	A	T	G	A	G	C	G	C	T
RecR	G	G	C	C	C	T	T	C	A	A	G	C	T	C	C	C	C	A	C	C	T	A	A	C

Fonte: Do autor

Figura 18- Alinhamento das sequências de aminoácidos da GSTE2 obtidas nas linhagens RecR, Rec Lab, RecRev e Rock com a sequência de GSTE2 disponível no GenBank..

	10	20	30	40	50	60
GSTE2 <i>A. aegypti</i>	MPKLI	LYTLHV	SPPCRAVEL	CAKALGLELE	QKTVNLLTKEHL	TPEFMKMN
RecR	MPKLI	LYTLHV	SPPCRAVEL	CAKALGLELE	QKTVNLLTKEHL	TPEFMKMN
RecLab	MPKLI	LYTLHV	SPPCRAVEL	CAKALGLELE	QKTVNLLTKEHL	TPEFMKMN
RecRev	MPKLI	LYTLHV	SPPCRAVEL	CAKALGLELE	QKTVNLLTKEHL	TPEFMKMN
Rock	MPKLI	LYTLHV	SPPCRAVEL	CAKALGLELE	QKTVNLLTKEHL	TPEFMKMN
	80	90	100	110	120	130
GSTE2 <i>A. aegypti</i>	IMIYLV	SKYKDD	SLYSKEL	VKQAKL	NAALHFE	SGVLFAR
RecR	IMIYLV	SKYKDD	SLYSKEL	VKQAKL	NAALHFE	SGVLFAR
RecLab	IMIYLV	SKYKDD	SLYSKEL	VKQAKL	NAALHFE	SGVLFAR
RecRev	IMIYLV	SKYKDD	SLYSKEL	VKQAKL	NAALHFE	SGVLFAR
Rock	IMIYLV	SKYKDD	SLYSKEL	VKQAKL	NAALHFE	SGVLFAR
	150	160	170	180	190	200
GSTE2 <i>A. aegypti</i>	LEDTLV	DDYIVG	NSLTIAD	FCVSSV	SSIMGVI	FMDKEKF
RecR	LEDTLV	DDYIVG	NSLTIAD	FCVSSV	SSIMGVI	FMDKEKF
RecLab	LEDTLV	DDYIVG	NSLTIAD	FCVSSV	SSIMGVI	FMDKEKF
RecRev	LEDTLV	DDYIVG	NSLTIAD	FCVSSV	SSIMGVI	FMDKEKF
Rock	LEDTLV	DDYIVG	NSLTIAD	FCVSSV	SSIMGVI	FMDKEKF
	220					
GSTE2 <i>A. aegypti</i>	VLSQ	KEKNA	QKA			
RecR	VLSQ	KEKNA	QKA			
RecLab	VLSQ	KEKNA	QKA			
RecRev	VLSQ	KEKNA	QKA			
Rock	VLSQ	KEKNA	QKA			

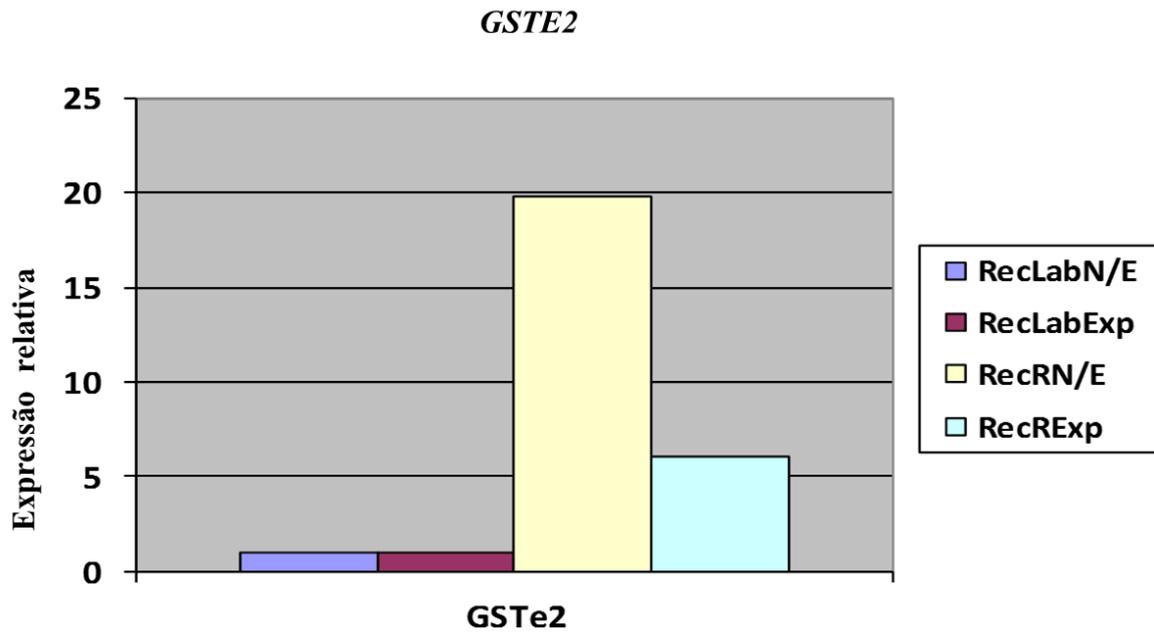
Fonte: Do autor

Nota: Em vermelho estão as modificações de aminoácidos encontradas em todas as linhagens estudadas em relação a sequência de GSTE2 depositada no NCBI e VectorBase. Em amarelos estão as substituições de aminoácidos encontrado apenas em RecR.

6.4 Perfil de expressão do gene *AeGSTE2* por qRT-PCR

A expressão relativa do *GSTE2* na linhagem Resistente foi muito maior do que na linhagem susceptível (Figura 19). Para RecLab, não houve diferença no nível de expressão gênica entre os grupos exposto (1,029) e não exposto (1,0). A exposição ao temephos na linhagem resistente (RecR) diminuiu significativamente o número de cópias de mRNA detectado para o gene *GSTE2*, caindo em torno de 19 vezes após a exposição ao temephos.

Figura 19- Expressão relativa do gene *GSTE2* nas linhagens de *Aedes aegypti* RecLab e RecR antes e após exposição ao temephos.



Fonte: Dados do autor

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram estudadas as atividades de GSTs totais e da *GSTE2* de duas linhagens de *Ae. aegypti* que apresentam diferentes perfis de susceptibilidade ao temephos. Inicialmente foi avaliada a atividade enzimática das larvas de RecLab e RecR utilizando os substratos CDNB, considerado o padrão para os ensaios bioquímicos e o 4-HNE. Além disso, verificou-se a capacidade das GSTs totais em metabolizar esse aldeído oriundo de estresse oxidativo.

Os resultados dos ensaios bioquímicos com o CDNB revelaram que todos os indivíduos da linhagem susceptível (RecL), apresentaram atividade normal para as GST totais, já para a resistente, mais de 30% dos indivíduos apresentaram atividade modificada. Esses dados mostram o envolvimento claro destas enzimas no mecanismo metabólico de resistência ao temephos desenvolvido nesta linhagem. De fato, Melo Santos et al. (2010) quando caracterizaram o processo de seleção da linhagem RecR mostraram que há uma alteração na atividade de GSTs totais em torno de 90% dos indivíduos na fase de larva.

Adicionalmente avaliamos o efeito da exposição ao temephos sobre a atividade destas enzimas. Isto é um grande diferencial deste trabalho, pois na maioria das vezes, os trabalhos comparam apenas linhagens resistentes e susceptíveis ao inseticida, ou exposto e não exposto aos compostos. Neste trabalho verificamos que a exposição ao inseticida não afetou o nível de atividade das GSTs totais quando avaliadas contra o CDNB, nem na susceptível nem na resistente. Estes resultados confirmam que este substrato é genérico e não detecta respostas de estresse oxidativo, provocado pela exposição ao agente oxidante. O estudo de Poupardin et al (2008), em larvas de *Ae. aegypti* submetidas à doses subletais de alguns inseticidas não alteraram a atividade das GSTs. De acordo com esses pesquisadores, os inseticidas nem sempre são o principal indutor de enzimas responsáveis por sua metabolização, muitas vezes outros xenobióticos estão presentes na água onde as larvas de mosquitos se desenvolvem e podem favorecer a tolerância para os inseticidas (RIAZ et al., 2009).

Com relação ao 4-HNE verificamos que houve a metabolização deste composto pelas GSTs totais das duas linhagens estudadas. A família das GSTs é conhecida por catalisar a conjugação do GSH com xenobióticos, incluindo o 4-HNE (HAYES et al., 2005). Os testes enzimáticos com o 4-HNE em RecLab e RecR demonstraram que as duas linhagens apresentaram um perfil enzimático alterado e muito alterado em relação à linhagem Rockefeller, respectivamente. Estes dados sugerem que a linhagem Rockefeller pode ter

sofrido uma grande perda na atividade destas enzimas, provavelmente em decorrência do tempo de colonização em laboratório (mais de 60 anos) em comparação à linhagem susceptível RecL (em torno de 10 anos) e a RecR (cerca de 5 anos). Vale destacar que o número de indivíduos apresentando alteração foi maior na linhagem resistente.

Para a condição de exposição ao temephos foi observado um aumento no número de indivíduos com atividade modificada nas duas linhagens (RecL e RecR). Esses dados reforçam o papel do 4-HNE como um marcador de estresse oxidativo, estudos mostram o envolvimento desse fenômeno como um possível fator na toxicidade dos organofosforados (BANERJEE et al., 2001; BEBE; PANEMANGALORE, 2005; EL-SHARKAWY et al., 1994;).

A maioria das pesquisas com esse aldeído $\alpha\beta$ insaturado é realizada em mamíferos. Nesses animais a GSTa 4 é considerada a principal rota para a conjugação de 4-HNE e GSH (ZHAO et al., 1999; HOU et al., 2007; HUBTSCHE et al., 1998), porém em *Drosophila melanogaster* já foram registrados que seis GSTs da classe Delta apresentam significativa atividade para conjugação do 4-HNE (SAWICKI et al., 2003). Em *Anopheles cracens* a GSTE3-3 exibe uma alta atividade para o 4-HNE, os resíduos Tyr 153 e Thr 190 estão relacionados com interação entre 4-HNE/GST, mecanismo similar ao encontrado em mamíferos, esses resíduos se apresentam conservados na classe Epsilon (WONGRAKUL et al., 2009). Em todos os estudos examinados há uma clara conexão entre as GSTs e os processos de estresse oxidativo.

Uma importante questão levantada é que existem registros do metabolismo do 4-HNE pelas GSTs e que existe aumento da atividade destas enzimas em linhagens resistentes a inseticidas químicos, entretanto não está claro se a resistência ao inseticida ocorre devida à capacidade das GSTs interagirem diretamente com o xenobiótico, através da sua conjugação com a GSH, ou se é em decorrência de sua capacidade de metabolizar os agentes tóxicos que surgem após a exposição ao agente tóxico, como por exemplo o 4-HNE. Recentemente, um trabalho demonstrou que em uma linhagem resistente ao temephos havia a superexpressão de GSTs específicas, principalmente da classe Epsilon. Porém, após a utilização de um composto inibidor de GST a linhagem continuou resistente, sugerindo que talvez as GSTEs não estejam envolvidas na detoxificação primária e sim na conjugação com os metabólitos secundários (SAAVEDRA-RODRIGUES et al., 2014). De fato, nossos resultados corroboram esta hipótese.

No trabalho de Wu et al (2011), com *Oxya chinensis* foi observado à correlação entre a exposição ao malathion e o clorpirifos com o aumento de MDA (Malonadeído), composto oriundo da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares dos seres vivos. Além disso, eles também observaram um aumento na atividade das GSTs em decorrência da exposição ao malathion, corroborando com os nossos resultados.

No presente trabalho detectamos alteração na atividade de GSTs mesmo na linhagem susceptível não exposta. Isso comprova que o 4-HNE está presente em pequenas concentrações em resposta a situações normais de estresse na célula. De fato, existem indícios de que o 4-HNE em baixas concentrações funciona como uma molécula endógena sinalizadora, induzindo mecanismos de proteção através da regulação de outros mecanismos (ZHANG et al., 2007; COHEN et al., 2011). Entretanto, quando em altas concentrações torna-se letal para a célula e precisa ser metabolizado e excretado. Desta forma, estabelecer a quantidade que é normal no meio intracelular e aquela em que torna-se tóxico para a célula é fundamental para que seja possível sua utilização em testes de diagnóstico da resistência. Para tanto, novos estudos devem ser realizados que visem à quantificação desta molécula em diferentes condições.

Os resultados da avaliação da expressão gênica mostraram que há uma superexpressão da GSTE2 na linhagem resistente em relação à linhagem susceptível, em torno de 19X. Mais uma vez confirmando os resultados obtidos por Strode et al. (2012). Porém, após a exposição ao temephos, o número de cópias do RNAm deste gene caiu consideravelmente. Uma possível explicação para isso seria a urgente necessidade da célula em traduzir estes mRNA para que a proteína pudesse atuar no metabolismo do 4-HNE, resultante da exposição. Isto deverá ser comprovado através de experimentos futuros quantificando a concentração desta molécula no meio e quantificando também a proteína GSTE2 e não somente o RNAm, antes e depois da exposição.

A análise das seqüências dos cDNAs de *GSTE2* para as duas linhagens (RecR e RecL) revelou a presença de polimorfismos que diferenciam as duas seqüências. O papel destes polimorfismos na capacidade metabólica da GSTE2 deverá ser investigado com mais detalhes. Recentemente, Riveron et al (2014) observou em populações africanas de *Anopheles funestus* resistente ao DDT que a simples mudança de aminoácido F119L na *GSTE2* confere um alto nível de resistência metabólica ao DDT. Inicialmente eles fizeram microarranjo com os possíveis genes relacionados com a metabolização de DDT e o gene mais expresso foi a *GSTE2*, resultado confirmado pela qRT-PCR. O nível de expressão desse

gene foi 69x maior na população resistente Benin. A expressão transgênica da *GSTE2* em *Drosophila melanogaster* demonstrou que esse gene sozinho confere resistência ao DDT e resistência cruzada com piretróides. Os autores correlacionaram a presença da mutação com a eficiência na metabolização do inseticida. Esse é o primeiro marcador de resistência metabólica à base de DNA em mosquitos, que fornece uma ferramenta essencial para acompanhar a evolução da resistência e para projetar o manejo da resistência adequada em populações de mosquito.

Na linhagem RecR, as cinco substituições de aminoácidos L111S, C115F, I150V, E178A e A198E foram encontradas também na *GSTE2* da linhagem de *Ae. aegypti* resistente ao DDT e aos piretróides, denominada PMD-R oriunda da Tailândia (LUMJUAN et al., 2011). Para confirmar se esses alelos foram adquiridos em laboratório ou proveniente de campo, sequenciamos 10 indivíduos de Araripina, local de origem da linhagem resistente e todos eles apresentaram as mesmas substituições de aminoácidos.

Segundo Lumjuan et al. (2011) as três últimas são semi conservativas e provavelmente não interferem na atividade catalítica da enzima. Porém, os resíduos 111 e 115 fazem parte de um possível local de ligação ao DDT (WUANG et al., 2008). Por motivos operacionais não conseguimos caracterizar bioquimicamente a *GSTE2* de RecLab e RecR para ver se há uma diferença nas propriedades catalíticas entre as duas linhagens, mas sugerimos que a atividade metabólica entre elas seja diferente. Porém outros experimentos precisam ser realizados.

Para sumarizar, as GSTs desempenham um importante papel na metabolização de inseticidas. A atividade enzimática e a expressão de alguns genes são significativamente elevadas em linhagens resistentes a diferentes inseticidas (YU et al., 2008). No nosso estudo observamos que a expressão relativa da *GSTE2* foi muito maior em RecR, esses dados corroboram com Ding et al. (2003), eles demonstram em *Anopheles gambiae* o alto nível de expressão de todos os membros da classe Epsilon e a *GSTE2* se sobressaiu em relação as outras, o mesmo foi visto por Lumjuan et al., (2011) em linhagens de *Ae. aegypti*.

Adicionalmente analisamos a mesma linhagem sobre duas condições e o grupo não exposto de RecR apresentou um maior nível de expressão da *GSTE2*, segundo Wu et al. (2011) altas concentrações de inseticidas podem diminuir a expressão de GSTs. Neste caso acreditamos que houve uma diminuição do número de cópias do mRNA em decorrência da necessidade de produção da proteína. Todos estes resultados somados aos descritos na literatura sugerem que a *GSTE2* é um bom alvo para desenvolver métodos de diagnóstico da resistência e também para o desenvolvimento de novos inseticidas, como por exemplo,

inibidores destas enzimas de detoxificação. Os polimorfismos encontrados entre as linhagens resistente e susceptível fornecem informações valiosas para se compreender melhor o modo de interação entre a enzima, seus substratos específicos e a GSH.

8 CONCLUSÕES

a)As GSTs totais em linhagens de *Aedes aegypti* com diferentes perfis de susceptibilidade ao temephos são capazes de metabolizar o 4-HNE;

b) A exposição ao temephos leva à formação do 4-HNE;

c) Há algum mecanismo de regulação da expressão da GSTE2 na linhagem RecR responsável por superexpressar esta proteína que está implicada no mecanismo de resistência metabólica ao temephos;

d)As sequências nucleotídicas do gene *GSTE2* são diferentes entre as linhagens resistente e susceptível, o que poderá afetar suas capacidades metabólicas;

e) Nossos dados sugerem que há uma ligação entre a capacidade de GSTs em metabolizar o 4-HNE e a resistência ao temephos.

REFERÊNCIAS

- ADDGENE. Plasmid: pGEM-T Easy Vector. Cambridge. 2014. Disponível em : < <http://www.addgene.org/vector-database/2853/>>. Acesso em : 12 mar. 2014.
- ADDGENE. pET-28 a. Cambridge. 2014. Disponível em :< <http://www.addgene.org/vector-database/2565/>>. Acesso em : 12 mar. 2014.
- ALIN, P.; DANIELSON, U. H.; MANNERVIK, B. 4-Hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. Febs Letters, Netherlands, v.179, n.2, p. 267-270, 1985.
- AMORIM, L. B. Populações de *Culex quinquefasciatus* Say, 1983 (Diptera:Culicidae) do Estado de Pernambuco: diversidade genética e perfil de susceptibilidade ao organofosforado temephos. 2013. 115p. Tese (Doutorado em Biologia Animal)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- AYRES, C. F. J. Comparative genomics of the Anopheline glutathione S-transferase epsilon cluster. PLoS One, San Francisco, v. 6, n. 12, p. e29237, 2011.
- BANERJEE, B. D. et al. Pesticides induced oxidative stress: perspectives and trends. Review Environment Society. Montreal, v. 16, p. 1-40, 2001.
- BEATY, B. J.; MARQUARDT, W. C. The biology of disease vectors. Burlington University Press of Colorado,1996.
- BESERRA, E. B. et al. Resistência de Populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) ao Organofosforado Temefós na Paraíba, Brasil. Neotropical Entomology, Londrina, v. 36, n. 2, p. 303-307, 2007.
- BEBE, F. N.; PANEMANGALORE, M. Pesticides and essential minerals modify endogenous antioxidants and cytochrome p450 in tissues of rats. Journal Environmental Society. Oxford, v.40, p. 769-784, 2005.
- BIBER, P. A. et al. Laboratory evaluation of susceptibility of natural subpopulations of *Aedes aegypti* larvae to temephos. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 22, n. 3, p. 408-411, 2006.
- BISSET, J. Status of resistance to insecticides and resistance mechanisms in larvae from Playa municipality collected during the intensive campaign against *Aedes aegypti* in Havana City, 2001-2002. Revista Cubana de Medicina Tropical , Habana, v. 56, n. 1, p. 61-66, 2004.
- _____. Insecticide Resistance in Two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Costa Rica. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 50, n. 2, p. 352-361, 2013.

BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO. Brasília: FUNASA, ano 1, v. 15, n. 10, 1999.

BRAGA, I. A. et al. *Aedes aegypti* resistance to Temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, n. 2, p. 199-203, 2004.

BRAGA I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiologia e Serviços de Saúde, São Paulo, v. 16, p. 279-293, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Metodologia para Quantificação de Atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em *Aedes aegypti*. Brasília, 2006.

BROGDON W. G.; MCALLISTER J. C. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno v.14, n. 2, p. 159-164, 1998.

BROGDON W. G. Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. Parasitology Today, Cambridge, v. 5, p. 56-60, 1989.

CATALÁ A. A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. Biochemical and Biophysical Research Communications, Kansas City, v. 399, n.3, p. 318-323, 2010.

CAYMAN CHEMICAL. 4Hydroxynonenal. Ann Arbor, 2014. Disponível em :<<https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/32100>>. Acesso em: 14 abr. 2014.

CHAVASSE, D. C.; YAP, H. H. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: WHO,1997. (WHO/CTD/WHOPES/97.2.).

CHE-MENDOZA, A.; PENILLA, R. P.; RODRIGUEZ, D. A. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: a review. African Journal of Biotechnology, Nairobi, v. 8, p. 1386–1397, 2009.

COLLINS, F. H. et al. Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. Insect Molecular Biology, Oxyford, v. 11, p. 409-418, 2002.

COHEN, G. et al. Role of lipid peroxidation and PPAR- δ in amplifying glucose-stimulated insulin secretion. Diabetes. New York, v. 60, p. 2830-2842, 2011.

DAVID, J. P. et al. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. Proceeding of the National Academy of Sciences of USA, Washington, v. 102, n. 11, p. 4080-4084, 2005.

DHANG, C. C. et al. Biochemical detection of temephos resistance in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) from dengue-endemic areas of Selangor State, Malaysia. Proceedings ASEAN Congress Tropical Medicine Parasitology, Bangkok, v. 3, p. 6-20, 2008.

DINIZ, D. F. A. Perfil de susceptibilidade de populações de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, do estado de Pernambuco ao inseticida químico temephos. 2011. 53p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

DING, Y. et al. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. BMC Genomics, London, v.4, p. 1-16, 2003.

DJOUAKA, R. F. et al. Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. BMC Genomics, London, v. 9, p. 538, 2008.

DOI, A. M. et al. Molecular cloning and characterization of a glutathione -S-Transferase from largemouth (*Micropterus salmoides*) liver that is involved in the detoxification of 4-hydroxynonanal. Biochemical Pharmacology, Kansas City, v. 67, p. 2129-2139, 2004.

EL-SHARKAWY, A.M. et al. Biochemical effects of some insecticides on the metabolic enzymes regulating glutathione metabolism. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, New York, v.52, p. 505-510, 1994.

ENAYATI, A.A. et al. Insect glutathione Transferases and insecticide resistance. Insect of Molecular Biology, Oxford, v.14, p. 3-8, 2005.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonanal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical Biology and Medicine, Los Angeles, v.11, p 81-128, 1991.

FERRARI, J. A. Insecticide resistance. In: BEATY B. J.; MARQUARDT, W. C. The biology of disease vectors. Colorado: Niwot, 1996. p. 512-529.

FEYEREISEN, R. Insect cytochrome P450. In: GILBERT, L. L., IATROU, K., GILL, S. Comprehensive Molecular Insect Science. New York: Pergamon;. 2005, p. 1-77.

FONTOURA, N. G. et al. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 107, n. 3, p. 387-395, 2012.

GAKUTA, T.; TOSHIRO, T. Disruption of the microsomal glutathione S-transferase-like gene reduces life span of *Drosophila melanogaster*. Gene, Amsterdam, v. 253, p. 179-187, 2000.

GLUTATIONA. In: WIKIPEDIA: a enciclopédia livre., 2014. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione_S-transferase>. Acesso em: 25 fev 2014.

GOODMAN, G. et al. (ed). The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11 ed. New York: McGraw-Hill, 2006.

GRISALES, N. et al. Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control. PloS Neglected Tropical Diseases, San Francisco. v. 7, n. 9, p. e2438, 2013.

HAZELTON, G. A.; LAING, C. A. Glutathione S-transferase activities in the yellow-fever mosquito [*Aedes aegypti* (Loisville)] during growth and aging. Biochemical Journal, London, v. 210, p. 281-287, 1983.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Palo Alto, v. 45, p. 51-88, 2005.

HELVECIO, E. Caracterização do perfil de enzimas ligadas à detoxificação de inseticidas químicos em populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) do estado de Pernambuco. 2012. 59p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade de Pernambuco, Recife, 2012.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. Seminars in Hematology, New York, v. 26, p. 277-85, 1989.

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

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 45, p. 371-391, 2000.

HEMINGWAY, J. et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford. v. 34, n. 7, p. 653-665, 2004.

HOU, I. et al. Functional promiscuity correlates with conformational heterogeneity in A-class glutathione S-transferases. The Journal of Biology Chemistry, Mayraland, v. 282, p. 23264-2374, 2007.

HUBSTACH, I. et al. Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. Biochemical Journal, London, v. 330, p. 175-179, 1998.

KOMALAMISRA, N. et al. Insecticide susceptibility of the dengue vector, *Aedes aegypti* (L.) in Metropolitan Bangkok. Southeast Asian. Journal of Tropical Medicine and Public Health, Bangkok, v. 42, n. 4, p. 814-823, 2011.

LANDER, J. E. et al. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanisms of the mitochondrial class Kappa enzyme rGSTK1-1. Biochemistry, Nashville, v. 43, p. 252-261, 2004.

LAZCANO, J. A. et al. Assessing the insecticide resistance of an *Aedes aegypti* strain in El Salvador. Revista Panamericana de Salud Pública, Washington, v. 26, n. 3, p. 229-234, 2009.

LLINAS, G. A. et al. Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 1, p. 113-116, 2010.

LESGARDS, J. F. et al. Effect of reactive oxygen and carbonyl species on crucial cellular antioxidant enzymes. Chemical Biological Interaction, Konstanz, v. 190, p28-34. 2011.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 37, n. 3, 2001.

LIMA, J. B. et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 68, n. 3, p. 329-333, 2003.

LIMA, E. P. et al. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do Estado do Ceará. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 39, n. 3, p. 259-263, 2006.

_____. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara, Brazil. Parasites & Vectors, London, v. 4, p. 1-12, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOKE, S. R. et al. Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and temephos. Tropical Biomedicine, Putrajaya, v. 27, n. 3, p. 493-503, 2010.

LUMJUAN, N. et al. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v.37, p.1026-1035, 2007.

LUMJUAN, N. et al. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. Insect Biochemical Molecular Biology, Oxford, v. 4, p. 203-209, 2011.

MA, B.; CHANG, F. N. Purification and cloning of a Delta class glutathione S-transferase displaying high peroxidase activity isolated from the German cockroach *Blattella germanica*. The FEBS Journal, Oxford v. 274, p. 1793-1803, 2007.

MACORIS, M. L. G. et al. Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the state of Sao Paulo, Brazil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.

MATHEGE, E. M. et al. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malarial mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v.38, n.4, p. 531-536, 2001.

MARCOMBE, S. Insecticide Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti* from Martinique: Distribution, Mechanisms and Relations with Environmental Factors. PLoS ONE, San Francisco, v. 7, n. 2, p. 1-19, 2012.

MANNERVIK, B.; DANIELSON, U. H. Glutathione transferases—structure and catalytic activity. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, Swenden, v.23, n. 3, p. 283-337, 1988.

MARTINS, A. J. et al. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 81, n. 1, p. 108-115, 2009.

MCLLWAIN, C. C.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K. D. Glutathione-S-Transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy, oncogene. Oncogene, Basingstoke v.25, p. 1639-1648, 2006.

MELLO-FILHO, A.C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. Biochemical Journal, London v. 218, p. 218-273, 1983.

MELO-SANTOS, M. A. V. et al. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. Acta Tropica, Basel, v. 113, n. 2, p. 180-189, 2010.

MONTELLA, I. R. Estudo dos mecanismos bioquímicos de resistência a inseticidas em diferentes populações *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) do Brasil. 2008. 101 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)- Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2007.

MONTELLA, I. R. et al. insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v.77, p.467-477, 2008.

MOREL, F. et al. A Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. The Journal of Biology Chemistry, Maryland v. 279, p. 16246-16253, 2004.

MOROU, E. et al. A simple colorimetric assay for specific detection of glutathione-S transferase activity associated with DDT resistance in mosquitoes. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 4, n. 8, p. 1-6, 2010.

MOUCHES, C. et al. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. Science, Washington, v. 233, n. 4765, p. 778-780, 1986.

NEBERT, D. Naming related P450 genes, based on divergent evolution. Current Contents, Philadelphia, v. 36, p. 10-20, 1993.

OCAMPO, C. B. et al. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. Acta Tropica, Basel, v. 118, n. 1, p. 37-44, 2011.

OAKESHOTT, J. G. et al. Evolutionary Genetics of Drosophila Esterases. Genetica, The Hague, v. 90, n. 2-3, p. 239-268, 1993.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Insecticide resistance and vector control. Tenth report of the Expert Committee on Insecticides [meeting held in Geneva from 14 to 19 September 1959]. Geneva, 1960.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Mosquito Larvae to Insecticides. Geneva, 1981.

PETERSEN, D. R.; DOORN, J. A. Reactions of 4-Hydroxynonenal with proteins and cellular targets. Free Radical Biology & Medicine, Los Angeles, v 37, n 7. p 937-945, 2004.

POLSON, K. A. et al. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. Acta Tropica, Basel, v. 117, n.1, p.31-38, 2011.

POUPARDIN, R. et al. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti* : impact on larval tolerance to chemical insecticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology , Oxford, v. 38, n. 5, p. 540-551, 2008.

PRABHU, K. S. et al. Microsomal glutathione s-transferase A1-1 with glutathione peroxidase activity from sheep liver : molecular cloning, expression and characterization. Biochemical Journal, London, v, 360, p. 345-354, 2001.

RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Mosquito glutathione transferases. Methods in Enzymology, New York, v. 401, p. 226-41, 2005.

REDDY, B. P. N.; PRASAD, G. B. K. S; RAGHAVENDRA, K. In silico characterization and comparative genomic analysis of the *Culex quinquefasciatus* glutathione S- transferase (GST) supergene family. Parasitology Research, Berlin v.4, p. 1165-1167, 2011.

RIAZ, M. A. et al. Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. Aquatic Toxicology, Amsterdam, v. 93, p. 61-69, 2009.

RIVERON, J.M. et al. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. Genome Biology. London, v. 15, p.1-20, 2014.

SAWICKI, R. et al. Cloning, expression and biochemical characterization of one epsilon-class (GST-3) and ten delta-class (GST-1) Glutathione-S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the epsilon class. Biochemical Journal, London, v. 370, p. 661- 669, 2003.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. et al. Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes after temephos selection. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 23, n. 2, p. 199-215, 2014.

SANTACOLOMA, L.; CHAVES, B.; BROCHERO, H. L. Susceptibility of natural populations of dengue vector to insecticides in Colombia. Biomedica , Bogotá, v. 32, n. 3, p. 333-343, 2012.

SHAUR, R. J. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. Molecular Aspects of Medicine, Washington, v. 24, p.149-159, 2003.

SHETTY, V.; SANIL, D.; SHETTY, N. J. Insecticide susceptibility status in three medically important species of mosquitoes, *Anopheles stephensi* , *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* , from Bruhat Bengaluru Mahanagara Palike, Karnataka, India. Pest Management Science , West Sussex, v. 69, n. 2, p. 257-267, 2013.

SINGH, S. P. et al. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. European Journal of Biochemistry, Berlin, v. 268, n. 10, p. 2912-2923, 2001.

STRODE, C. et al. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry and Molecular Biology , Oxford, v. 38, n. 1, p. 113-123, 2008.

_____. Expression profile of genes during resistance reversal in a temephos selected strain of the dengue vector, *Aedes aegypti* . PLoS ONE , San Francisco, v. 7, n. 8, p. e39439, 2012.

SCOTT, J. G. Cytochromes P450 and insecticide resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 29, n. 9, p. 757-777, 1999.

TEW, K. D. Redox in redux: emergent roles for glutathione –S- Transferase P (GSTP) in regulation of cell signaling and S-glutathionylation. Biochemical Pharmacology, Oxford v. 73, p. 1257-1269, 2007.

TIKAR, S. N. et al. Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. Parasitology Research, Berlin, v. 105, n. 1, p. 57-63, 2009.

ULLERY, J. C.; LAWRENCE, J. M. Protein modification by oxidized phospholipids and hydrolytically released lipid electrophiles: Investigating cellular responses. Biochimica et Biophysica Acta, Cambridge, v. 18, p. 2424-2435, 2012.

VALAVANIDS, J. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety, New York, v. 64, p. 178-189, 2006.

WARE, G. W. WHITARE, D. M. An introduction to insecticides. [S.L], 2004 Disponível em: < <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>.>. Acesso em: 9 abr. 2013).

WONDJI, C. S. et al. Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 41, n. 7, p. 484-491, 2011.

WONGTRAKUL, J. et al. Molecular cloning and expression of several new *Anopheles cracens* Epsilon class glutathione transferases. Protein&Peptide Letters, London, v. 16, n.16, p. 75-81, 2009.

WOOD, O. R. et al. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. Parasites & Vectors, London, v. 3, p. 3-67, 2010.

WU, H. et al. Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidante defense sytem in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). Chemosphere, Oxford, v. 83, p. 599-604, 2011.

WANG, Y. et al. Structure of an insect epsilon classe glutathione S-transferase from the malaria vector *Anopheles gambiae* provides an explanation for the high DDT-detoxification activity. Journal of Structure Biology. Maryland, v. 164, p. 228-235, 2008.

YAN, H. et al. Identification, genomic organization, and oxidative stress response of a sigma class glutathione S-transferase gene (AccGSTS1) in the honey bee, *Apis cerana cerana*. Cell Stress Chaperones, New York, v.8, n. 4, p. 415-426, 2013.

YANG, Y. et al. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling, Acta Biochemical, Polonica, v.50, p, 319-336, 2003.

YU, Q. et al. Identification, genomic organization and expression pattern of glutathione S-transferase in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 38, p. 1158-1164, 2008.

ZHANG, H. et al. Submicromolar concentrations of 4-hydroxynonenal induces glutamate cysteine ligase expression in HBE1 cells. Redox Reports, Edinburgh, v. 12, p. 101-106, 2007.

ZARKOVIC, N. et al. 4-Hydroxynonenal as a second messenger of free radicals and growth modifying factor. Life sciences, Oxford, v. 65, p. 1901-1904, 1999.

ZHAO, T. et al. The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, v. 367, p. 216-224, 1999.