

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

ELISAMA HELVECIO

CARACTERIZAÇÃO DO CLUSTER DE GLUTATIONA-S-TRANSFERASES DA
CLASSE EPSILON DE *Aedes aegypti* E O SEU PAPEL NA RESISTÊNCIA AOS
INSETICIDAS QUÍMICOS

RECIFE

2020

ELISAMA HELVECIO

**CARACTERIZAÇÃO DO CLUSTER DE GLUTATIONA-S-TRANSFERASES DA
CLASSE EPSILON DE *Aedes aegypti* E O SEU PAPEL NA RESISTÊNCIA AOS
INSETICIDAS QUÍMICOS**

Tese apresentada Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia celular e molecular básica e aplicada /Biologia celular e molecular de patógenos, vetores e hospedeiros.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Coorientadoras: Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo

Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos

RECIFE

2020

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

H485c Helvecio, Elisama.
Caracterização do cluster de glutationa-S-transferases da classe epsilon de *Aedes aegypti* e o seu papel na resistência aos inseticidas químicos. 2020 / Elisama Helvecio. -- Recife: [s.n.], 2020.
156 p. : ilus., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres; coorientadoras: Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo, Maria Alice Varjal de Melo Santos.

1. Mosquitos vetores. 2. Enzimas. 3. Cinética. 4. Diversidade genética. 5. Transcriptoma. I. Ayres, Constância Flávia Junqueira. II. Melo, Tatiany Patrícia Romão Pompílio de. Título. III. Santos, Maria Alice Varjal de Melo. IV. Título.

CDU 614.39

ELISAMA HELVECIO

**CARACTERIZAÇÃO DO CLUSTER DE GLUTATIONA-S-TRANSFERASES DA
CLASSE EPSILON DE *Aedes aegypti* E O SEU PAPEL NA RESISTÊNCIA AOS
INSETICIDAS QUÍMICOS**

Tese apresentada ao Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Biologia celular e molecular básica e aplicada /Biologia celular e molecular de patógenos, vetores e hospedeiros.

Aprovada em: 15/04/2020

Banca Examinadora

Dra. Flávia Figueira Aburjaile (Membro externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Fernando Ariel Genta (Membro externo)

Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz-RJ

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha (Membro interno)

Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz -PE

Dra. Rosângela Barbosa (Membro interno)

Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz -PE

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres (Orientadora)

Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz -PE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda a bondade em minha vida, por suas promessas em minha vida e por todas as bênçãos derramadas sobre mim.

Ao meu esposo William, meu eterno companheiro pela paciência, compreensão e por sempre estar ao meu lado. Te amo.

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

À toda a minha família pelo suporte.

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

À Dra. Tatiany Romão, por toda ajuda na construção desse trabalho, orientação e contribuições científicas, meu sentimento é de gratidão. Obrigada pelos momentos compartilhados com você.

Às meninas Ana Paula, Rose, Mônica, Suzany, Suzane, Nathaly e Eloína pela amizade ao longo desses anos, por escutarem minhas preocupações, me ajudar nos momentos desesperadores e também por compartilharem comigo momentos inesquecíveis.

Aos profissionais de bioinformática, Dr. Gabriel Wallau, Dr. Antonio Rezende, Dra. Maria Ribeiro e a Filipe Dezordi, por toda a contribuição científica neste trabalho.

Ao Dr. Thiago Napoleão e a Dra. Patrícia Paiva do Departamento de Bioquímica da UFPE por toda contribuição nas análises dos dados.

À Dra. Milena de Paiva do Departamento de Microbiologia do IAM, por toda contribuição direta neste trabalho.

Ao Dr. Osvaldo Pompílio Melo do departamento de microbiologia do IAM pelo auxílio científico na construção desse trabalho.

Aos meus queridos amigos e irmãos Ivete e Davi, pelas orações e apoio nessa jornada.

A todos do Departamento de Entomologia, em especial a Emanuel Holanda e a Pollyana Andrade pela contribuição direta ou indireta na realização desse trabalho, obrigada!

A FACEPE, pelo apoio financeiro.

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

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.

À banca examinadora pelas contribuições.

HELVECIO, Elisama. **Caracterização do cluster de Glutathione-S-Transferases da Classe Epsilon de *Aedes aegypti* e o seu papel na resistência aos inseticidas químicos.** 2020. Tese (Doutorado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

RESUMO

As Glutathione S-transferases (GSTs), especialmente das classes Delta e Epsilon, atuam no metabolismo de inseticidas que são usados para o controle de populações de insetos, porém o seu papel na resistência ao temephos não está totalmente elucidado. Assim, foram objetivos deste trabalho estudar o cluster de GSTs da classe Epsilon em populações de *Aedes aegypti* com diferentes perfis de susceptibilidade ao temephos. Para tanto, foi estudado o papel molecular da GSTE2 na resistência ao temephos em RecR, com a investigação de quatro polimorfismos de aminoácidos exclusivos em RecR e sua influência na atividade enzimática da GSTE2. Foram realizados ensaios de inibição da atividade enzimática utilizando o temephos como inibidor e parâmetros cinéticos foram avaliados. A GSTE2 da RecR apresentou maior capacidade de metabolização do substrato CDNB e o temephos se mostrou um inibidor fraco da GSTE2. Também foi observado que as mutações atuam em conjunto e são responsáveis pelas mudanças significativas nos parâmetros catalíticos em RecR. A diversidade genética do cluster Epsilon foi avaliada em populações naturais de *Ae. aegypti*. As populações continentais do mosquito, que sofreram pressão de seleção do temephos foram monomórficas para o cluster Epsilon. Nas populações insulares, com ausência de pressão de seleção ao inseticida, os genes do cluster foram polimórficos. Por último, foram investigados os perfis transcriptômicos de larvas de uma linhagem resistente (RecR) comparado a uma colônia susceptível (RecL). A análise do transcriptoma mapeou 6.084 genes, sendo 202 induzidos e 106 reprimidos na RecR. Em indução foram identificados genes que estão associados ao metabolismo de lipídeos, carboidratos e xenobióticos. Em repressão foram identificadas moléculas envolvidas com a síntese de proteínas, imunidade e apoptose. Pode-se concluir que o cluster Epsilon provavelmente está sendo selecionado em campo, sugerindo que ele exerce relevante papel na sobrevivência da espécie.

Palavras-chave: Mosquitos vetores. Enzimas. Cinética. Diversidade genética. Transcriptoma.

HELVECIO, Elisama. **Characterization of the *Aedes aegypti* Epsilon Class Glutathione-S-Transferases cluster and its role in resistance to chemical insecticides.** 2020. Thesis (Academic Doctorate in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2020.

ABSTRACT

Glutathione S-transferases (GSTs), specifically from the Delta and Epsilon classes, act on the metabolism of insecticides used to control insect populations, although their role in resistance to some compounds is not yet fully elucidated. Thus, the aim of this work was to study the cluster of GSTs of the Epsilon class in populations of *Aedes aegypti* with different susceptibility profiles to temephos. For this purpose, the molecular role of GSTE2 in resistance to temephos in RecR was studied, including the investigation of four exclusive polymorphisms of amino acids in RecR and its influence on the enzymatic activity of GSTE2. The GSTE2 of RecR showed a higher metabolism capacity of the CDNB substrate and temephos proved to be a weak inhibitor of GSTE2. It was also observed that the mutations act together and are responsible for significant changes in the catalytic parameters in RecR. The genetic diversity of the Epsilon cluster was evaluated in natural populations of *Ae. aegypti*. The continental populations of the mosquito, that were under pressure with the selection of temephos, were monomorphic for the Epsilon cluster. In island populations, without insecticide selection pressure, the cluster of genes were polymorphic. Finally, the larvae transcriptomic profiles of a resistant strain (RecR) compared to a susceptible colony (RecL) were investigated. The transcriptome analysis mapped 6,084 genes, of which 202 were up regulated including genes involved in metabolism of lipids, carbohydrates, and xenobiotics, and 106 were down regulated in RecR, as some molecules involved in protein synthesis, immunity, and apoptosis were identified. It can be concluded that the Epsilon cluster is probably being selected in the field, suggesting that it play an important role in the survival of the species.

Keywords: Mosquito vectors. Enzymes. Kinetics. Genetic diversity. Transcriptome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Processo de desenvolvimento da resistência aos inseticidas químicos em populações de insetos.	22
Figura 2-	Panorama da resistência ao temephos no Brasil.	25
Figura 3-	Representação da ação dos inseticidas em insetos susceptíveis e resistentes.	26
Figura 4-	Proteína do canal de sódio regulado por voltagem (<i>Nav</i>) e a localização das principais mutações encontradas em <i>Ae. aegypti</i> .	29
Figura 5-	Representação das etapas da reação de biotransformação de xenobióticos.	32
Figura 6-	Estrutura terciária de uma GST citosólica.	39
Figura 7-	Reação de conjugação catalisada pela GST citosólica.	40
Figura 8-	Alinhamento das sequências de aminoácidos da GSTE2 obtidas nas linhagens Liverpool, RecL e RecR.	45
Figura 9-	Mapa dos locais de amostragem de <i>Ae. aegypti</i> do estudo.	60
Figura 10-	Posição dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do Cluster Epsilon no cromossomo 2R de <i>Ae. aegypti</i> de acordo com a anotação do genoma AaegL3.5.	64
Figura 11-	Gel de agarose a 2% evidenciando a amplificação da PCR diagnóstica no gene <i>Nav</i> .	73
Figura 12-	Quantificação relativa do gene <i>GSTE2</i> em larvas e adultos em RecL e RecR.	75
Figura 13-	Avaliação molecular e bioquímica das proteínas recombinantes GSTE2 das linhagens RecL e RecR.	77
Figura 14-	Atividade catalítica para GSTE2 em <i>Ae. aegypti</i> . A atividade da GST contra o CDNB foi determinada na presença de CDNB 1 mM e GSH 9,5 mM.	78
Figura 15-	Porcentagem de atividade enzimática de GSTE2 recombinantes na presença do inibidor temephos.	80
Figura 16-	Modelagem 3D da proteína GSTE2 resistente de RecR e a localização das mutações específicas.	83
Figura 17-	Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas de GSTE6 em <i>Ae. aegypti</i> .	86
Figura 18-	Valores estatísticos de diversidade genética de GST Cluster Epsilon de <i>Ae. aegypti</i> das populações de Fernando de Noronha e Porto Novo.	89

Figura 19-	Exemplo de Inferência da rede de haplótipos em <i>Ae. aegypti</i> pelos três principais métodos, Minimum Spanning Networks (MSN), Median-Joining Networks (MJN) e redes TCS.	93
Figura 20-	Redes TCS para relações de haplótipos de <i>Defensina A</i> , <i>GSTE2</i> e <i>GSTE3</i> em <i>Ae. aegypti</i> .	94
Figura 21-	Redes TCS para relações de haplótipos de <i>GSTE1</i> , <i>GSTE4</i> e <i>GSTE5</i> em <i>Ae. aegypti</i> .	95
Figura 22-	Redes TCS para relações de haplótipos de <i>GSTE6</i> , <i>GSTE7</i> e <i>GSTE8</i> em <i>Ae. aegypti</i> .	96
Figura 23-	Qualidade das sequências obtidas no FastQC para estudo do transcriptoma em <i>Ae. aegypti</i> .	98
Figura 24-	Análise de componentes principais (PCA) das réplicas biológicas de RecL (RL1, RL2 e RL3) e RecR (RR4, RR5 e RR6).	100
Figura 25-	Normalização das bibliotecas de cDNA das linhagens RecR e RecL de <i>Ae. aegypti</i> .	100
Figura 26-	<i>Heatmap</i> do perfil de expressão gênica de RecR e RecL em <i>Ae. Aegypti</i> .	101
Figura 27-	Representação gráfica da distribuição dos genes expressos em RecR.	102
Figura 28-	Via do metabolismo de Glutathiona (aag00480) gerada pelo KEGG que exibe um conjunto de genes regulados.	110
Figura 29-	Exemplo de via metabólica gerada pelo KEGG que exibe um conjunto de genes reprimidos em <i>Ae. aegypti</i> resistente ao temephos. Via processamento de proteínas no retículo endoplasmático (04141).	111
Figura 30-	Rede de interação funcional entre proteína- proteína de genes induzidos na linhagem RecR.	112
Figura 31-	Rede de interação funcional entre proteína- proteína de genes reprimidos na linhagem RecR.	113
Figura 32-	Validação do experimento de RNAseq por RT-qPCR.	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Status de susceptibilidade das linhagens de <i>Ae. aegypti</i> aos inseticidas Cipermetrina, Deltametrina, λ -cialotrina e DDT.	72
Tabela 2-	Atividade enzimática de GSTs total em larvas e em adultos de (RecL e RecR) usando o CDNB como substrato.	74
Tabela 3-	Parâmetros cinéticos calculados para as diferentes proteínas de GSTE2.	79
Tabela 4-	Valores de IC ₅₀ de temephos com atividade de inibição sobre GSTE2 recombinantes.	81
Tabela 5-	Parâmetros genéticos e testes de neutralidade dos genes do Cluster Epsilon em populações de <i>Aedes aegypti</i> .	90
Tabela 6-	Parâmetros genéticos e testes de neutralidade do gene <i>DEFENSINA A</i> em populações de <i>Ae. aegypti</i> .	91
Tabela 7-	Resultados do mapeamento das bibliotecas de RecR e RecL.	99
Tabela 8-	Seleção de genes induzidos em <i>Ae. aegypti</i> na linhagem RecR resistente ao temephos.	105
Tabela 9-	Seleção de genes reprimidos em <i>Ae. aegypti</i> na linhagem RecR resistente ao temephos.	106
Tabela 10-	Descrição das vias metabólicas mapeadas para os genes induzidos em RecR.	109
Tabela 11-	Descrição das vias metabólicas mapeadas para os genes reprimidos em RecR.	110

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Principais genes das famílias de enzimas detoxificadoras encontrados superexpressos em <i>Ae. aegypti</i> em resposta a seleção ou exposição de inseticidas.	31
Quadro2-	<i>Primers</i> empregados para detecção de mutações no canal de sódio.	54
Quadro 3-	<i>Primers</i> utilizados para reações de mutagênese sítio-dirigida para avaliar o impacto das mutações de GSTE2RecL em seus parâmetros cinéticos.	56
Quadro 4-	Caracterização das populações de <i>Ae. aegypti</i> utilizadas no estudo	61
Quadro 5-	<i>Primers</i> utilizados para sequenciar os genes do Cluster Epsilon e <i>Defensina A</i> em <i>Ae. Aegypti</i> .	65
Quadro 6-	<i>Primers</i> utilizados para a validação do RNAseq.	70
Quadro 7-	Número de sequências utilizadas no estudo de diversidade genética do Cluster Epsilon e da <i>Defensina A</i> em populações naturais e linhagens de <i>Ae. aegypti</i> .	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
CA	Carbamato
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovariedade <i>israelensis</i>
Cal	Calreticulina
cDNA	DNA complementar
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DEG	Gene diferencialmente expresso
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
GO	Ontologia do gene
GSH	Glutathiona
GST	Glutathiona-s-Transferase
IA	Ingrediente ativo
IC₅₀	Concentração que inibe 50% de atividade enzimática
IGR	Inseticida regulador de crescimento
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
Kdr	<i>Knockdown resistance</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
L4	Larvas do 4º estágio
LncRNA	RNAs longos não codificadores
Metil	Hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase
Metalo	Metalloproteinase
Nav	Canal de sódio regulado por voltagem
Nav_v	Gene do canal de sódio dependente de voltagem (<i>Nav</i>)
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
OC	Organoclorado
OP	Organofosforado
Pb	Pares de base

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PM	Peso molecular
PI	Piretróide
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
P450	Oxidase de função múltipla
R²	Coefficiente de correlação
RecL	Linhagem Recife susceptível
RNA	Ácido ribonucleico
RR	Razão de resistência
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
RecR	Linhagem Recife resistente
SRCCV	Serviço de Referência de Culicídeos Vetores
UV	Ultravioleta
OMS	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

~	Aproximadamente
° C	Graus Célsius
®	Marca registrada
μl	Microlitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
m ²	Metro quadrado
U	Unidade
λ	Lambda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Uso do Temephos no Brasil	24
2.2 Mecanismos de resistência aos inseticidas químicos	25
2.2.1 Comportamental	26
2.2.2 Penetração reduzida.....	27
2.2.3 Insensibilidade do sítio alvo.....	27
2.2.4 Resistência metabólica	30
2.3 Fases de detoxificação enzimática	31
2.4 Oxidases de função múltipla (CYP)	33
2.5 Esterases (CCE)	34
2.6 Glutathione -S- transferase	35
2.6.1 Classificação e Nomenclatura	35
2.6.2 Estrutura das GST citosólicas	37
2.6.3 Funções das GSTs citosólicas	40
2.6.4 O papel das GSTs na resistência aos inseticidas químicos.....	42
2.7 Linhagem de <i>Ae. aegypti</i> resistente ao Temephos (RecR)	44
3 JUSTIFICATIVA	46
4 PERGUNTA CONDUTORA	47
5 HIPÓTESE	48
6 OBJETIVO GERAL	49
6.1 Objetivos específicos	49
7 METODOLOGIA	50
7.1 Caracterização funcional de GSTE2 em RecL e em RecR	50
7.1.1 Linhagens de <i>Ae. aegypti</i>	50
7.1.2 Ensaio de susceptibilidade a inseticidas	51
7.1.3 Detecção de mutações no gene do canal de sódio (Resistência sítio alvo)	52
7.1.4 Ensaio enzimático de GSTs totais.....	54
7.1.5 Avaliação da expressão gênica do gene <i>GSTE2</i> por RT-qPCR	55
7.1.6 Produção de proteínas recombinantes de GSTE2RecR e GSTE2RecL	55
7.1.7 Mutagênese sítio dirigida em GSTE2RecL.....	56

7.1.8 Determinação da atividade enzimática e dos parâmetros cinéticos de GSTE2 RecR e RecL e GSTE2 mutantes	57
7.1.9 Ensaio de inibição enzimática	57
7.1.10 Modelagem 3D de GSTE2RecL e GSTE2RecR.....	58
7.2 Análise da diversidade genética do Cluster Epsilon em populações de <i>Ae. aegypti</i>.....	58
7.2.1 Populações de <i>Ae. aegypti</i>	58
7.2.2 Extração de DNA	61
7.2.3 Genes estudados	61
7.2.4 Reações de PCR	62
7.2.5 Análise dos dados.....	62
7.3 Análise transcriptômica de RecR e RecL por sequenciamento de nova geração (RNAseq) ..	66
7.3.1 Linhagens de <i>Ae. aegypti</i>	66
7.3.2 Obtenção e preparação das amostras de RNA total.....	66
7.3.3 Construção das bibliotecas de cDNA	67
7.3.4 Processamento dos dados	67
7.3.4.1 Trimagem das leituras	68
7.3.4.2 Mapeamento das leituras.....	68
7.3.4.3 Análise da expressão diferencial	68
7.3.5 Validação do ensaio de transcriptoma (RNAseq) por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	69
8 RESULTADOS.....	71
8.1 Caracterização funcional de GSTE2 em RecL e em RecR.....	71
8.1.1 Perfil de susceptibilidade aos adulficidas.....	71
8.1.2 Genotipagem de mutações no gene do canal de sódio (<i>Nav</i>)	73
8.1.3 Atividade enzimática de GSTs totais	73
8.1.4 Expressão relativa de <i>GSTE2</i> em RecL e RecR	74
8.1.5 Caracterização das propriedades cinéticas de GSTE2RecL, GSTE2RecR	75
8.1.6 Identificação de aminoácidos responsáveis por diferenças na atividade catalítica	77
8.1.7 Inibição enzimática	79
8.1.8 Modelagem <i>in silico</i> de GSTE2RecL e GSTE2RecR	81
8.2 Análise da diversidade genética do Cluster Epsilon em populações de <i>Ae. Aegypti</i>.....	83
8.2.1 Análise das sequências.....	83
8.2.2 Índices de diversidade genética.....	87
8.2.3 Rede de Haplótipos	92

8.3 Caracterização do perfil transcriptômico de larvas da linhagem RecR resistente ao temephos	97
8.3.1 Resultados da análise do transcriptoma de larvas de RecR e RecL por RNAseq	97
8.3.2 Alinhamento e contagem das sequências	98
8.3.3 Análise de expressão diferencial	99
8.3.4 Análise de enriquecimento funcional por Ontologia do Gene (GO)	106
8.3.5 Identificação e caracterização das vias metabólicas do KEGG (<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>)	107
8.3.6 Enriquecimento funcional de redes de interações proteína-proteína	111
8.3.7 Resultados da validação da expressão diferencial de genes do RNAseq por RT-qPCR	113
9 DISCUSSÃO	115
10 CONCLUSÃO	127
APÊNDICE A- LISTA DE GENES SUPEREXPRESSOS NA LINHAGEM RecR	145
APÊNDICE B-LISTA DE GENES SUBEXPRESSOS NA LINHAGEM RecR	150
APÊNDICE C- REDES DE INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS INDUZIDAS EM RecR	154
APÊNDICE D- REDES DE INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS REPRIMIDAS EM RecR	155
APÊNDICE E- ARTIGO PUBLICADO	156

1 INTRODUÇÃO

Aedes aegypti é o principal vetor envolvido na transmissão dos arbovírus dengue, chikungunya e Zika, estes vírus afetam milhões de pessoas mundialmente (MURRELL; WU; BUTLER, 2011; RELICH; LOEFFELHOLZ, 2017; VU; JUNGKIND; ANGELLE DESIREE LABEAUD, 2017). O controle de vetores é uma estratégia importante para a redução da transmissão de doenças veiculadas por mosquitos em todo o mundo e está baseado, principalmente no uso de inseticidas químicos (NKYA *et al.*, 2013). No Brasil, o uso intensivo de organofosforados e piretróides por mais de duas décadas pelo Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), favoreceu o surgimento de várias populações resistentes de *Ae. aegypti* no país (ARAÚJO *et al.*, 2013; 2019; BESERRA *et al.*, 2007; BRAGA *et al.*, 2004; GAMBARRA *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2006; MONTELLA *et al.*, 2007). A resistência aos inseticidas químicos pode representar um grave problema para a efetividade de controle das populações de mosquitos.

O fenômeno da resistência a inseticidas não ocorre de forma uniforme em todas as espécies e surge em consequência de genes que conferem mudanças biológicas que são selecionadas, em um dado período de tempo, devido à exacerbada exposição a estes xenobióticos. Os principais mecanismos relacionados com a resistência aos inseticidas são: 1- Insensibilidade do sítio-alvo, que compreende modificações nas moléculas alvos dos inseticidas, comprometendo a ligação inseticida-sítio alvo; 2- Penetração reduzida do composto químico por modificação na cutícula do inseto; 3- comportamental; e 4- sequestro ou aumento na biodegradação dos inseticidas pelas enzimas de detoxificação, conhecida como resistência metabólica. Três grupos de enzimas desempenham papel fundamental na resistência metabólica, as oxidases de função múltipla (P450), as esterases e as glutathione-S-transferases (GSTs) (DAVID *et al.*, 2013; NKYA *et al.*, 2013).

A família multigênica das GSTs atua em processos celulares como a remoção de espécies reativas de oxigênio, regeneração de proteínas com grupo sulfidrílico reduzido, transporte intracelular, processos digestivos, síntese de prostaglandinas e detoxificação de xenobióticos (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; MCILWAIN; TOWNSEND; TEW, 2006; WONGSANTICHON; ROBINSON; KETTERMAN, 2015). Estas enzimas estão divididas em três principais grupos, de acordo com sua localização na célula: citosólicas, microsossomais e mitocondriais (SHEEHAN *et al.*, 2001).

As GSTs citosólicas são importantes enzimas da fase II do processo de detoxificação metabólica e 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, local onde ocorre a ligação da Glutathione e o sítio H, onde se ligam os substratos lipofílicos e hidrofílicos. A alta diversidade estrutural do sítio H, contribui para as GSTs se ligarem a diferentes substratos (SCIAN *et al.*, 2015). Essas enzimas atuam biotransformando os compostos tóxicos através da conjugação com o tripeptídeo glutathione (GSH) tornando-os mais solúveis em água, o que facilita sua excreção (WONGTRAKUL *et al.*, 2009). Em artrópodes as GSTs são divididas em oito classes: Delta, Epsilon, Ômega, Sigma, Theta, Zeta, Xi e Iota. As classes Delta e Epsilon são exclusivas de artrópodes e compõem cerca de 65% das GSTs citosólicas. Estas duas classes estão diretamente associadas ao processo de resistência aos inseticidas químicos (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005).

Os estudos voltados a entender melhor o papel das GSTs, sobretudo as de classe Epsilon no processo de resistência metabólica ao temephos em populações naturais de *Ae. aegypti* ainda são escassos. Os sequenciamentos dos genomas de mosquitos têm revolucionado as pesquisas sobre resistência aos inseticidas e acelerado os estudos sobre os processos biológicos relacionados com este processo, evidenciando a complexidade, sobretudo do mecanismo de resistência metabólica (ZHOU *et al.*, 2015). Porém, apesar do grande volume de dados e conhecimentos gerados sobre a base molecular da resistência, ainda permanece o desafio de identificar os alvos moleculares envolvidos diretamente no fenótipo da resistência aos inseticidas.

Esta tese trata sobre os mecanismos de resistência relacionados ao inseticida temephos em linhagens de laboratório e em populações do mosquito *Ae. aegypti*, mais especificamente o mecanismo de resistência metabólica através da investigação do papel do cluster Epsilon de Glutathione-S-transferase no evento de resistência ao temephos. Foi realizada a caracterização funcional da enzima GSTE2 em *Ae. aegypti*, através de estudos bioquímicos e moleculares. Também foi realizado o estudo da diversidade gênica dos oito membros da Classe Epsilon da Glutathione-S-transferase em populações naturais de *Ae. aegypti*, através do sequenciamento completo de todos os membros da classe, para detectar possíveis variantes alélicas no cluster Epsilon que possam estar relacionadas a resistência metabólica nesta espécie, além de aplicar um estudo de genética de populações, para verificar possíveis efeitos de seleção sobre o gene GSTE2 e os outros membros do cluster Epsilon. E por fim, foram investigados os genes e as

vias metabólicas que possivelmente estão associadas com a resistência ao temephos, através de uma análise de transcriptoma.

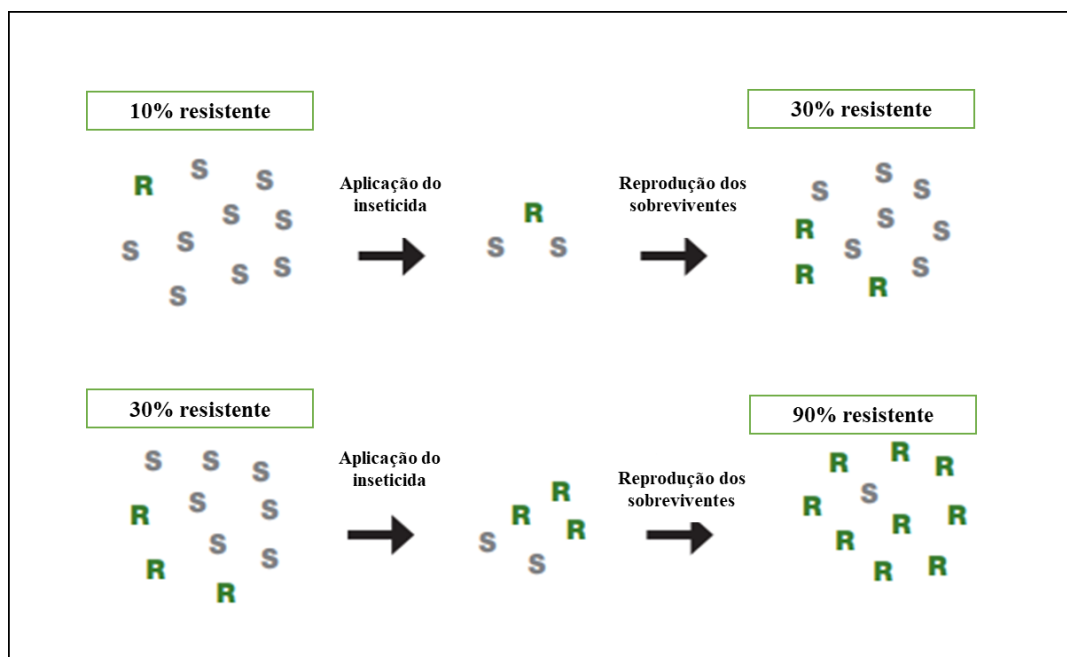
2 REFERENCIAL TEÓRICO

Inseticidas químicos são amplamente utilizados pelos programas de controle de insetos praga ou vetores de patógenos. Alguns aspectos tornam o uso desses compostos atrativos, como a eficácia, facilidades na aplicação em campo, baixo custo da maioria dos compostos químicos e a sua elevada persistência nos criadouros (PRIETO; SUÁREZ; GONZALEZ, 2002; ROSE, 2002; ZAIM; GUILLET, 2002). As quatro principais classes de inseticidas químicos utilizados no controle de insetos são: 1- organoclorados (OC), como o Diclorodifeniltricloroetano (DDT), lindano, aldrin e dieldrin; 2- organofosforados (OPs), como temephos, malathion e fenitrothion, 3- carbamatos (CA), tais como bendiocarb e propoxur e 4- piretróides (PIs), como por exemplo cipermetrina e deltametrina. Todas essas moléculas, atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos (BECKER *et al.*, 2010; WARE, WHITACRE, 2004).

A resistência é definida pela Organização Mundial da Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1981) como a “habilidade de uma espécie em sobreviver a doses de compostos tóxicos, as quais seriam letais para a maioria da população exposta, em um dado intervalo de tempo”. Esse fenômeno têm bases genéticas e pode afetar a fisiologia, morfologia e o comportamento dos insetos.

O Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) conceitua a resistência de forma prática e a define como “a seleção de uma característica hereditária em uma população de insetos que resulta na falha repetida de um produto inseticida em fornecer o nível de controle pretendido quando usado conforme o recomendado”. Segundo esse comitê, as alterações de susceptibilidade detectadas nos bioensaios podem não constituir necessariamente a resistência, se em campo não for observada diminuição no desempenho do inseticida. Mais de 40 anos de uso intensivo de inseticidas sintéticos para controle de insetos ocasionou a resistência a pesticidas em mais de 450 espécies (KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2013).

A prática de uso do inseticida por si só não gera a resistência, existem fatores genéticos, biológicos e operacionais que favorecem o desenvolvimento da resistência. Em relação aos fatores genéticos, sabe-se que os alelos de resistência ocorrem naturalmente nas populações de vetores não expostas a inseticidas, em baixa frequência, porém, ao longo do tempo de uso do composto, há um aumento na frequência desses alelos e os insetos que portam esses alelos sobrevivem e passam a característica da resistência para suas progênies (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2007). A figura 1 ilustra o processo de seleção citado acima.

Figura 1 -Processo de desenvolvimento da resistência aos inseticidas químicos em populações de insetos.

Fonte: Adaptado de Insecticide Resistance Action Committee (2011).

Legenda: R= resistente; S= suscetível.

De maneira geral, o uso contínuo e exacerbado de inseticidas resulta na seleção de insetos resistentes e, portanto, a resistência aumenta entre a população do inseto-alvo, na medida em que os indivíduos suscetíveis são eliminados. Não há uma uniformização na velocidade e desenvolvimento da resistência, para algumas espécies o processo se dá de forma rápida e para outras de forma lenta (KARUNAMOORTHI; SABESAN, 2013). Como exemplo, em moscas, o uso do DDT por muitos anos não levou a seleção da resistência para a maioria das espécies, diferente do observado para os mosquitos, grupo de insetos em que a resistência a inseticidas químicos está disseminada, em populações do mundo todo (GEORGHIU, 1990; KARUNAMOORTHI; SABESAN, 2013).

Alguns aspectos da biologia dos insetos também podem favorecer o rápido estabelecimento da resistência, tais como, número de gerações por ano, tamanho da progênie por geração e tipo de reprodução (DUSFOUR *et al.*, 2019). Os insetos com ciclo de vida curto e alta taxa de reprodução são mais propensos a desenvolverem resistência mais rapidamente do que aqueles com baixa taxa de reprodução e ciclo de vida longo, visto que, quanto mais gerações anuais mais insetos são expostos aos inseticidas. Outros aspectos também são relevantes para a condição de resistência, tais como, taxa de migração e isolamento populacional (DUSFOUR *et al.*, 2019). O aumento da resistência também pode estar relacionado a fatores operacionais, já que algumas ações realizadas nos programas de controle populacional de insetos podem

acelerar o surgimento em campo deste fenômeno, tais como: escolha do produto e o seu tempo de uso, época e aplicação do produto, persistência em campo, dosagem do composto, frequência de aplicação do inseticida, área de cobertura ou até mesmo a substituição de um inseticida por outro de maior toxicidade (CORBEL; N'GUESSAN, 2013).

A resistência tende a reduzir a vida útil dos inseticidas e também comprometer a eficácia dos inseticidas, recém-descobertos ou em desenvolvimento, quando um único mecanismo confere resistência a dois ou mais inseticidas. O DDT e os piretróides (PI), por exemplo, não são moléculas quimicamente relacionadas, porém, possuem o mesmo sítio alvo, que é o canal de sódio. Desta forma, mutações no gene que codifica para o Na_v podem levar a resistência tanto ao DDT quanto aos piretróides (APONTE *et al.*, 2019; BRENGUES *et al.*, 2003; CASIDA, 2017; LIMOEI *et al.*, 2006). Também pode ocorrer em menor frequência, mutações no gene que codifica para acetilcolinesterase e resulta na resistência cruzada entre inseticidas OPs e CA, pois a ACE é o sítio alvo dos dois compostos (AHOUA ALOU *et al.*, 2010; DJOGBÉNOU *et al.*, 2007; HEMINGWAY; DAVIDSON, 1983). Por outro lado, a resistência múltipla ocorre quando dois ou mais mecanismos distintos atuam simultaneamente em uma população exposta a um inseticida (VALLE *et al.*, 2019).

O estudo de Moyes *et al.* (2017), trouxe um panorama geral da resistência a inseticidas utilizados para controle de *Ae. aegypti* nas Américas, África e Ásia, com ênfase nos dados relacionados aos OPs e PIs. O trabalho coletou dados de bioensaios para os dois inseticidas em larvas e adultos que foram disponibilizados nos bancos de dados *online* no período de 2006 a 2015. Os autores mostraram que o nível de resistência para o temephos é alto no Brasil, Guiana Francesa e na região do Caribe, mas no oeste da África é baixo, e é variável nas regiões sul e sudeste da Ásia. Para os piretróides, o panorama é similar. Neste trabalho, os autores também enfatizaram a escassez de dados sobre a resistência a esses inseticidas nos continentes asiático e africano. Para os piretróides, especificamente deltametrina, inseticida mais comumente testado o panorama é similar ao observado com os dados de resistência ao temephos.

Os dados sobre o histórico de uso dos inseticidas, a verificação e o acompanhamento do desenvolvimento da resistência aos compostos inseticidas são fundamentais para o controle das populações de vetores, a fim de projetar sistemas eficientes de gerenciamento de uso dos inseticidas e também reduzir os riscos à saúde humana e ao meio ambiente (KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2013).

2.1 Uso do Temephos no Brasil

O temephos é um inseticida da classe dos organofosforados, usado para o controle de larvas de mosquitos. Este inseticida químico é recomendado pela OMS para uso em água potável e possui características que são vantajosas em comparação a outros inseticidas químicos, como por exemplo, são mais estável, não se acumula nos tecidos de plantas e animais, e sua formulação é em geral, de lenta liberação, o que favorece seu efeito residual prolongado (> 3 meses) nos criadouros (CHAVASSE; YAP, 1997).

O sítio alvo do inseticida temephos é a enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima 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 e inativada. Conseqüentemente, o neurotransmissor ACE se acumula nas sinapses nervosas, levando a propagação contínua do impulso elétrico, culminando com a morte do inseto (BELLINATO *et al.*, 2016; VERDÍN-BETANCOURT *et al.*, 2019).

Em 1967 o temephos começou a ser utilizado no Brasil de forma esporádica e quase vinte anos depois, em 1986 o seu uso foi intensificado logo após um surto de dengue no país (VALLE *et al.*, 2019). A rotina de uso do temephos foi implementada no Plano para Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa) em 1996, continuando no Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD) em 2001 e no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) em 2002. Em 1999, foi estruturada a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência do *Aedes aegypti* a Inseticidas (Rede MoReNAa), coordenada pelo Ministério da Saúde, com objetivo de monitorar a susceptibilidade das populações de *Ae. aegypti* aos inseticidas químicos empregados em seu controle (BRAGA;VALLE, 2007).

Os primeiros relatos de alteração na susceptibilidade nas populações de *Ae. aegypti* ao temephos no país foram detectados em 1999 (MACORIS *et al.*, 1999; MONTELLA *et al.*, 2007). Atualmente considera-se que a resistência ao temephos está disseminada pelo país (CHEDIAK, *et al.*, 2016; VALLE *et al.*, 2019). A figura 2 apresenta o mapa de distribuição da resistência ao temephos no Brasil. Segundo Valle *et al.* (2019), o temephos foi substituído gradualmente e de forma heterogênea por outras classes de inseticidas, como inseticidas biológicos, tais como o Bti (*Bacillus thuringiensis israelensis*) e os IGRs (inibidores de crescimento), a partir do ano de 2003 ao longo do país, tendo seu uso completamente interrompido em 2014.

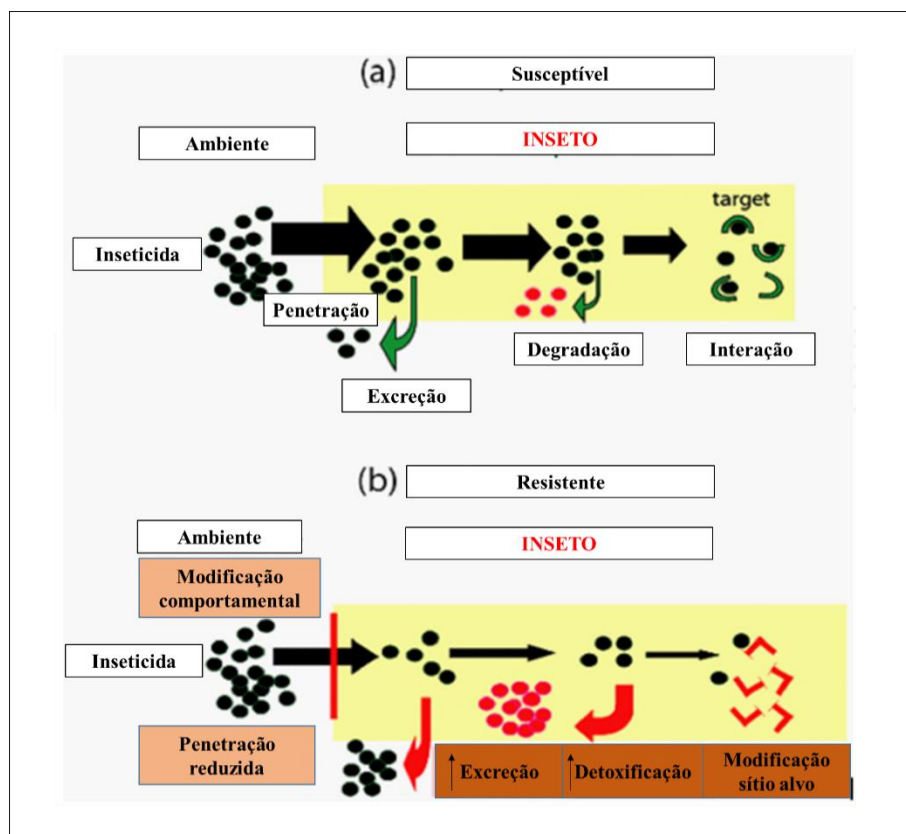
Figura 2- Panorama da resistência ao temephos no Brasil.

Fonte: Valle *et al.* (2019).

Legenda: Em verde, razão de resistência (RR) < 3; laranja, $3 \leq RR \leq 10$; vermelho, $RR > 10$.

2.2 Mecanismos de resistência aos inseticidas químicos

O estudo e a compreensão dos mecanismos de resistência aos inseticidas são a chave para prever como a resistência pode surgir, se espalhar e dificultar as ações de controle para a prevenção ou investigação (CARRASCO *et al.*, 2019). São descritos na literatura quatro principais mecanismos de resistência a inseticidas: comportamental, penetração reduzida, insensibilidade do sítio alvo e resistência metabólica. A Figura 3 representa didaticamente os mecanismos de resistência nos insetos, que serão descritos nas páginas seguintes.

Figura 3 – Representação da ação dos inseticidas em insetos susceptíveis e resistentes.

Fonte: Adaptado de Corben e Guessan (2013).

Legenda: a) Inseto susceptível; b) Inseto resistente.

2.2.1 Comportamental

Esse tipo de resistência é baseado em genes que conferem modificações no comportamento do inseto que passa a evitar os lugares tratados com inseticidas. Estas mudanças podem fazer com que os insetos reconheçam superfícies ou áreas tratadas, diminuindo o contato com os compostos químicos através da evasão de domicílios ou modificando horário de repasto sanguíneo (MATHENGE *et al.*, 2001).

Carrasco *et al.* (2019) propuseram uma classificação conceitual da resistência comportamental baseada nos tipos de respostas dos insetos aos seus inimigos naturais. Na resistência comportamental qualitativa, os mosquitos evitam (temporal ou espacial) o contato com inseticidas. Nesses casos, os mosquitos podem modificar temporariamente sua atividade para não corresponder ao momento do uso de inseticida, ou então os mosquitos podem reduzir o risco de exposição, evitando habitat onde inseticidas são aplicados.

Essas alterações têm sido observadas em diferentes espécies do gênero *Anopheles* no continente africano e asiático, após o uso de redes tratadas com inseticidas, conhecidas como ITNs

ou após a implementação da pulverização residual interna (IRS) (BAYOH *et al.*, 2014; DURNEZ; COOSEMANS, 2013; MEYERS *et al.*, 2016; NDENGA *et al.*, 2016; RUSSELL *et al.*, 2011b).

Os autores também discorrem sobre a resistência comportamental quantitativa, que atua reduzindo os efeitos diretos do inseticida após a ocorrência da exposição e também caracterizam o efeito de tolerância. Esses dois últimos tipos de resistência comportamental ainda não foram identificados em mosquitos, apenas em outras espécies de insetos (CARRASCO *et al.*, 2019; DE ROODE; LEFÈVRE; HUNTER, 2013).

2.2.2 Penetração reduzida

Um dos mecanismos mais conhecidos, consiste em modificações na cutícula do inseto que podem levar à redução da taxa de penetração do inseticida (INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE, 2011). A taxa de absorção menor ou mais lenta do composto, ocasionada pela cutícula mais espessa em um inseto, pode sinergizar com o mecanismo de resistência metabólica, proporcionando uma redução significativa na quantidade de inseticida que atinge o sítio-alvo (PLAPP, 1976; RAYMOND; HECKEL; SCOTT, 1989).

A penetração reduzida geralmente atua em conjunto com outros mecanismos, que podem resultar num aumento da resistência. Cavalcanti (2017) observou que fêmeas de *Ae. aegypti* do Estado de Pernambuco resistentes a PI e com atividade alterada para enzimas detoxificadoras, apresentaram a espessura da cutícula significativamente maior do que as fêmeas susceptíveis, caracterizando o mecanismo de resistência metabólica e o de penetração reduzida. O autor também detectou polimorfismos nos sítios 1011, 1016 e 1534 no gene *Nav*, que codifica o sítio alvo de PIs, que também podem estar envolvidos com a resistência aos PIs.

Yahouédo *et al.* (2017) encontraram a superexpressão de genes de *An. gambiae* relacionados com espessamento da cutícula em mosquitos resistentes a piretróides e DDT e também mostraram que a linhagem resistente do estudo apresentou a cutícula mais espessa em relação à linhagem susceptível.

2.2.3 Insensibilidade do sítio alvo

Este tipo de resistência é ocasionado por mutações nos genes que codificam proteínas alvos de ligação do inseticida no sistema nervoso central. As alterações estruturais nessas

proteínas podem dificultar ou impedir a ligação do composto químico, ocasionando um comprometimento da atividade do inseticida (MARTINS; VALLE, 2012).

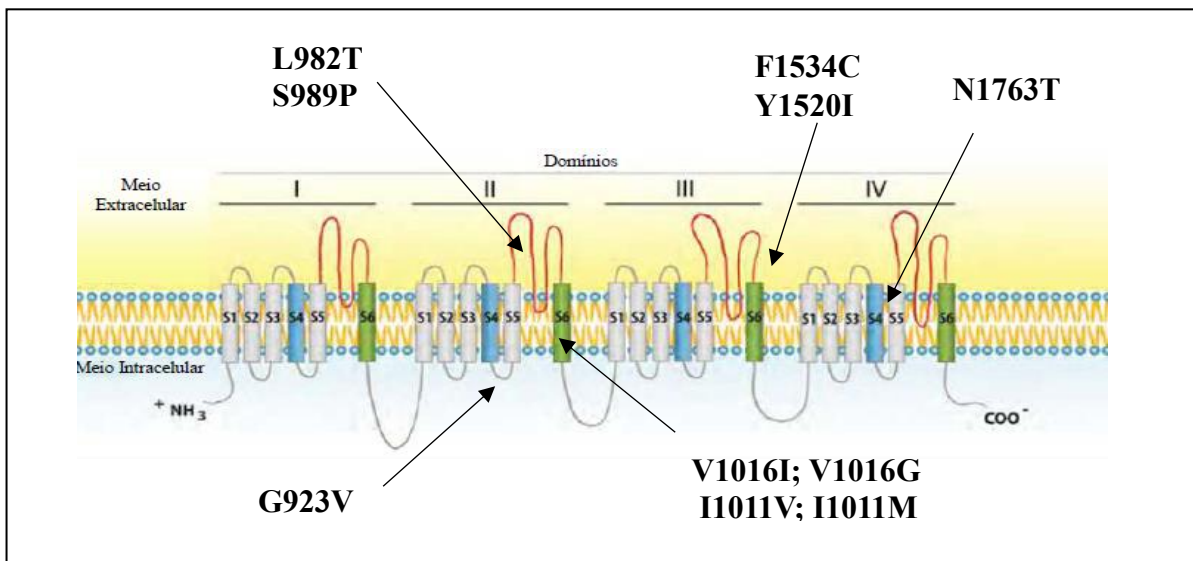
A acetilcolinesterase (AChE), sítio alvo dos OPs e carbamatos, é codificada pelo gene *ace*. Nos mosquitos são descritos dois genes, o *ace-1* e *ace-2*, o primeiro tem sido implicado na resistência aos OPs em insetos (KAKANI *et al.*, 2011; WEILL *et al.*, 2004). A mutação G119S na molécula codificada pelo gene *ace-1*, é frequente em espécies do gênero *Anopheles* e em *Culex pipiens*, já em *Ae. aegypti*, essa mutação não é comum em populações naturais do vetor (GRISALES *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2017; TMIMI *et al.*, 2018). Muthusamy; Shivakumar. (2015), encontraram essa mutação em baixa frequência nas populações do vetor em três distritos da Índia.

Outra molécula alvo de inseticidas é o canal de sódio dependente de voltagem (Nav), sítio alvo dos PIs. A atuação dos PIs mantém os canais Nav na conformação aberta e a condução contínua do íon Na⁺, impedindo a repolarização da membrana. Dessa forma, a propagação do impulso nervoso será mantida, levando o inseto a um quadro de descoordenação, seguido pela paralisia e culminando na sua morte, e este efeito é conhecido como *Knockdown* (VAIS *et al.*, 2001).

A proteína do canal de sódio possui grande tamanho (240KDa) e sua estrutura está organizada em quatro domínios homólogos (I-IV), cada um contendo seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6) e uma alça P-loop entre os segmentos S5 e S6 (Figura 4). Os segmentos transmembranares S4 são responsáveis pela ativação do canal por serem carregados positivamente, e em conjunto com os segmentos S1 a S3 formam os domínios sensores de voltagem. Os segmentos S5 e S6 formam o poro por onde passa o sódio, o poro central hidrofílico, e os P-loops, regiões de ligação entre S5 e S6, formam um filtro seletivo ao sódio (MARTINS; VALLE, 2012).

Mutações pontuais no gene que codifica para o canal de sódio são referidas como mutações tipo *Knockdown resistance* (kdr) (Figura 4). Insetos resistentes quando expostos a piretróides em geral não sofrem paralisia seguida por morte (*knockdown*), mas apresentam paralisia momentânea seguida de recuperação completa da locomoção do inseto após ser retirado do contato com o inseticida, sendo esse fenótipo denominado kdr (DABIRÉ *et al.*, 2009; GARCÍA *et al.*, 2009). A resistência do tipo kdr pode resultar em uma diminuição de 10 a 20 vezes na susceptibilidade ao inseticida. No entanto, algumas espécies podem exibir até 100 vezes mais resistência a piretróides, um efeito denominado super kdr (DAVIES *et al.*, 2007).

Figura 4- Proteína do canal de sódio regulado por voltagem (*Nav*) e a localização das dez principais mutações descritas em *Ae. aegypti* resistentes a piretróides.



Fonte: Adaptado de Martins e Valle (2012).

Legenda: Representação dos quatro domínios homólogos (I-IV), cada um com seis segmentos (S1-S6), entre os segmentos há uma hélice de ligação (cinza). Em azul, os segmentos de sensores de tensão (S4), em verde, o segmento S6, que forma o poro do canal em conjunto com os segmentos S5, ligados pelas alças P-loop, em vermelho. As setas indicam a localização das mutações já relatadas em *Ae. aegypti*.

Moyes *et al.* (2017), citam dez mutações localizadas entre os domínios II a IV em *Ae. aegypti* (Figura 3), que variam na frequência e disseminação geográfica. De acordo com esses autores, a mutação mais frequentemente encontrada é a F1534C, que ocorre nas Américas, Ásia e África e confere resistência a permetrina e deltametrina. Essa mutação também já foi identificada em *Aedes albopictus* resistente aos PIs (XU *et al.*, 2016). As outras mutações apresentam distintas distribuições geográficas, V1016I, sendo encontrada nas Américas e África, I1011V, localizada nas Américas e na Ásia, I1011M e G923V somente nas Américas e as outras cinco L982W, Y1520I, D1763Y, S989P, V1016G são encontradas apenas na Ásia.

Na literatura há relatos sobre a ocorrência simultânea de mutações na mesma população: D1763Y com V1016G, I1011M com G923V e Y1520I com F1534C (BRENGUES *et al.*, 2003; CHANG *et al.*, 2009; KUSHWAH *et al.*, 2015). Haddi *et al.* (2017), caracterizaram uma nova mutação V410L em uma linhagem brasileira de *Ae. aegypti* altamente resistente aos piretróides; essa mutação sozinha, ou em combinação com a mutação F1534C, reduziu a sensibilidade dos canais de sódio dos mosquitos para os piretróides tipo I e tipo II.

2.2.4 Resistência metabólica

A resistência metabólica se caracteriza pelo aumento na atividade das enzimas responsáveis pela metabolização dos inseticidas, garantindo a eliminação ou inativação da molécula circulante e impedindo que o inseticida atinja o sítio alvo. Existem três grandes famílias de enzimas relacionadas com resistência metabólica: oxidasas de função múltipla (P450), esterases e Glutathiona-S-transferases (GST) (LI *et al.*, 2018)

O processo de eliminação dos compostos tóxicos, ocorre via reação de biotransformação, que permite a modificação da molécula por meio de reações químicas, gerando produtos com propriedades mais hidrofílicas que irão ser mais facilmente excretados pelas células (GOODMAN; GILMAN, 2006).

A base molecular da resistência metabólica descrita até o momento na literatura elucidada algumas alterações gênicas que favorecem o aumento da atividade das enzimas detoxificadoras, são elas, a amplificação ou mutações nas regiões promotoras dos genes que codificam para as enzimas responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos. Ambas podem promover o aumento da transcrição desses genes e isso pode resultar em uma maior quantidade de enzimas para metabolizar os inseticidas (HEMINGWAY *et al.*, 2004). Também é possível que mutações pontuais nas sequências codificantes dos genes possam causar alterações na ligação entre enzima e o substrato, o que leva ao aumento na capacidade de metabolização do inseticida (HEMINGWAY *et al.*, 2004; IBRAHIM *et al.*, 2015; RIVERON *et al.*, 2014; RUSSELL *et al.*, 2011a). Existem vários genes envolvidos no processo de metabolização dos inseticidas em populações de vetores que revelam a complexidade deste mecanismo de resistência

O Quadro 1 exhibe dados coletados por Moyes *et al.* (2017), onde são relatados os principais genes dos grupos de enzimas detoxificadoras em *Ae. aegypti* que foram identificados como superexpressos por estudos de transcriptoma em resposta à seleção ou exposição aos inseticidas químicos.

Quadro 1- Principais genes das famílias de enzimas detoxificadoras encontrados superexpressos em *Ae. aegypti* em resposta a seleção ou exposição de inseticidas.

LOCALIDADE	INSETICIDA	RR	GENES SUPEREXPRESSOS
Brasil	Temephos	175x	<i>CYP6N12, CCEAE3A, GSTX2, AO10382.</i>
Tailândia	Temephos	5,9- 9,85x	<i>CCEAE3A, CCEAE6A, 1 gene CCE, CYP6Z8, CYP9M9, CYP6AH1, CYP4H28.</i>
Colômbia	Temephos	15x	<i>CYP6N12, CYP6M11, CYP6F3, 1 UGT gene.</i>
México, Peru	Temephos	42-390x	<i>CYP4H28, CYP6F3, CYP6Z8, CYP9M9, 9 outros genes P450, 8 genes GST e 10 genes CCE.</i>
Cuba, Ilhas Cayman	Piretróide	30-1000x	<i>CYP9J9 CYP9J10, CYP9J26, CYP9J27, CYP9J28, CYP6BB2, GSTE4.</i>
Singapura	Piretróide	1650x	<i>CYP9M4, CYP9M5, CYP9M6, CYP6Z7, CYP6Z8, CYP6BB2, CYP6F2, CYP6F3.</i>
Peru	Piretróide	10.2x	<i>CYP9J28, CYP9J32, CYP9J9, 2 CCE e GST.</i>

Fonte: Adaptado de Moyes *et al.* (2017).

Legenda: CYP: Oxidases de função múltipla; CCE (Esterases); UGT (UDP-glucuronosiltransferase); GST (Glutathiona –S-transferase); AO (Aldeído oxidase); RR (razão de resistência).

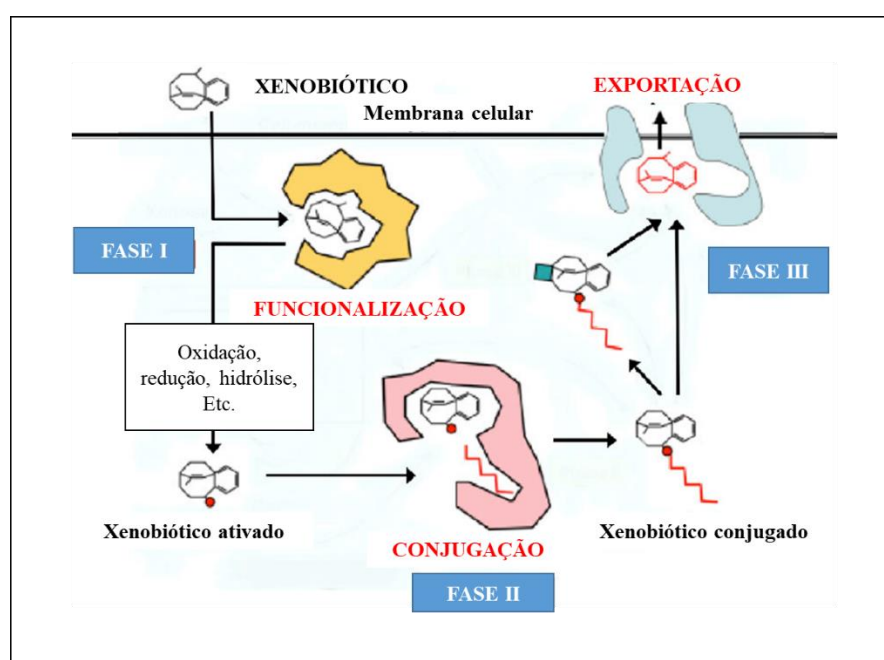
2.3 Fases de detoxificação enzimática

Conforme descrito acima, as reações de biotransformação de compostos xenobióticos, incluindo inseticidas sintéticos acontecem em três fases (Figura 5). Detalhando esse processo, na fase I, denominada funcionalização, ocorre a modificação química da molécula e os compostos iniciais se tornam mais polares ou hidrofílicos. As enzimas que atuam nessa fase são responsáveis por mediar diferentes tipos de reações, tais como desaminação, desalquilação, oxidação, peroxidação, hidroxilação alifática e aromática nos compostos xenobióticos. Essas reações introduzirão grupos funcionais, tais como amina, hidroxila, tiol e carboxila. Nessa fase, há o envolvimento de enzimas como as Oxidases de Função Múltipla (P450), responsáveis pela reação de oxidação, e as esterases pela reação de hidrólise, responsáveis por quebrar a molécula onde houver grupos ésteres (HEMINGWAY *et al.*, 2004).

Os produtos resultantes da fase I, podem seguir para fase II, a chamada fase de conjugação. As principais enzimas envolvidas nessa fase são as transferases, entre elas, Metiltransferases, Sulfotransferases, GSTs e Glucuronosil transferases (UDP) (MULETA, 2016). Essas enzimas são responsáveis pelas reações de conjugação, como metilação,

sulfatação, conjugação de aminoácidos ou glutathiona. Os compostos produzidos nesta fase tornam-se mais hidrofílicos e fáceis de serem excretados pelas células, visto que essas reações permitem a solubilização dos xenobióticos, reduzindo sua reatividade, toxicidade e mobilidade na célula. A última fase, a fase III, é a excreção, os produtos gerados na fase II são exportados para fora da célula por bombas de efluxo, as principais proteínas envolvidas nesta fase pertencem ao complexo proteico transmembranar transportadores ABC (EPIS *et al.*, 2014b; SARKADI *et al.*, 2006). Os transportadores ABC utilizam energia da hidrólise de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) para transportar diversos tipos de substâncias através da membrana celular como, por exemplo, componentes citotóxicos presentes nas células (GAHAN *et al.*, 2010; LICHT; SCHNEIDER, 2011). Alguns trabalhos relatam a superexpressão de genes pertencentes a família dos transportadores ABC em espécies do gênero *Anopheles* resistentes a inseticidas químicos. Em *Ae. aegypti* o silenciamento da glicoproteína (P-gps) pertencente a superfamília transportador ABC diminui significativamente a resistência ao temephos. Além disso, mutações no gene *ABCC2* tem sido relacionadas com a resistência ao larvicida biológico *Bacillus thuringiensis* em *Heliothis virescens*, *Bombix mori* e *Plutella xylostella* (BUSS; MCCAFFERY; CALLAGHAN, 2002; DERMAUW; VAN LEEUWEN, 2014; EPIS *et al.*, 2014a, 2014b; FIGUEIRA-MANSUR *et al.*, 2013; LIMA; GOULART; ROLIM NETO, 2014). Nos tópicos a seguir serão caracterizados os três principais grupos de enzimas detoxificadoras em mosquitos, com ênfase nas GSTs, objeto de estudo dessa tese.

Figura 5- Representação das etapas da reação de biotransformação de xenobióticos.



Fonte: Adaptado de Muleta (2016).

2.4 Oxidases de função múltipla (CYP)

As oxidases de função múltipla [Enzyme Commission Number (EC): 1.14] também são conhecidas como monoxigenases, citocromo oxidases ou oxidases de função múltipla. As CYP são enzimas heme-tiolato, pesam entre 45 a 55 kDa e são conhecidas pelo termo P450 pois é no comprimento de onda na qual de 450 nm que o grupo heme é reduzido e saturado com monóxido de carbono (HEMINGWAY *et al.*, 2004; OMURA; SATO, 1964).

Essas enzimas são conhecidas por seu papel de monooxigenase, catalisando a transferência de um átomo de oxigênio molecular para um substrato e reduzindo o outro para a água. No entanto, as P450 atuam também como oxidases, redutases, dessaturases, isomerases e podem catalisar pelo menos 60 reações químicas diferentes. Essas enzimas metabolizam compostos endógenos (hormônio juvenil e ecdisona, ácidos graxos, esteroides) e exógenos, contribuindo em várias funções: crescimento, desenvolvimento, nutrição e detoxificação de xenobióticos (FEYEREISEN, 2012).

As oxidases de função múltipla são identificadas pelo prefixo CYP, seguidos do numeral correspondente a identificação da família, uma letra em maiúsculo para a identificação da subfamília, seguida de um numeral correspondente ao gene individual (AI *et al.*, 2011). Membros da mesma família compartilham mais de 40% de identidade e membros de subfamílias compartilham mais de 55% de identidade (FEYEREISEN, 2012). Essa nomenclatura foi introduzida por Nebert *et al.* (1991) e é aceita universalmente.

Os genomas dos mosquitos revelam a grande expansão dos genes que englobam a família das P450, que são mais de 100 em *An. gambiae* (RANSON *et al.*, 2002), 160 em *Ae. aegypti* (STRODE *et al.*, 2008) e mais de 170 genes em *Cx. quinquefasciatus* (YAN *et al.*, 2012). As P450 estão envolvidas no metabolismo e detoxificação de diversos compostos e sua superexpressão é frequentemente associada com resistência a inseticidas químicos em mosquitos, sobretudo os genes P450 das subfamílias *CYP6* (*CYP6BB2*, *CYP6J28*) e *CYP9* (*CYP9J10* e *CYP9J26*) (MARCOMBE *et al.*, 2012; MUTHUSAMY; SHIVAKUMAR, 2015; SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2014; SMITH; KASAI; SCOTT, 2016; STRODE *et al.*, 2012).

2.5 Esterases (CCE)

As esterases (EC 3.1.1) fazem parte da superfamília das carboxilesterases, as quais compreendem um grande grupo de enzimas constituído por proteases, lipases e outras hidrolases (HOTELIER *et al.*, 2004). As proteínas dessas subfamílias não compartilham alto grau de similaridade nas sequências gênicas e possuem diferentes especificidades aos substratos. No entanto, o agrupamento dessas enzimas é baseado em suas semelhanças estruturais e na conformação conservada de resíduos no sítio catalítico da enzima (HEMINGWAY *et al.*, 2004; MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012).

A conformação tridimensional das carboxilesterases apresenta a dobra alfa/beta hidrolase, com alternância entre as fitas-beta e alfa-hélices, que se mantêm estabilizadas por pontes dissulfeto formadas entre resíduos de cisteína conservados ao longo da cadeia de aminoácidos. A família das carboxilesterases possui uma tríade composta por um resíduo nucleofílico de serina ou cisteína, um resíduo ácido de ácido glutâmico ou ácido aspártico e um resíduo de histidina. Essa tríade é conservada entre as diferentes carboxilesterases e corresponde ao sítio catalítico da enzima. A ausência do mesmo ou de um dos três componentes da tríade impossibilita a reação de hidrólise. Existem esterases que não possuem alguns desses três resíduos que compõe a tríade, sendo assim, essas proteínas atuam em outras funções, como reconhecimento de superfície e processos de sinalização do desenvolvimento neurológico (MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012; OAKESHOTT *et al.*, 2005).

De maneira geral, as esterases hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos carboxílicos, mas também podem atuar sobre outros substratos que contenham ligações amidas (OAKESHOTT *et al.*, 1993). As esterases de insetos hidrolisam *in vitro* três tipos de substratos: as α -esterases que hidrolisam preferencialmente o α -naftil-acetato, as β -esterases hidrolisam preferencialmente o β -naftil-acetato, e as PNPA esterases hidrolisam preferencialmente para-nitrofenil acetato (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998).

Os genomas dos mosquitos revelam a presença de 51 esterases em *An. gambiae* (RANSON *et al.*, 2002), 49 em *Ae. aegypti* (STRODE *et al.*, 2008), 71 genes em *Cx. quinquefasciatus* (YAN *et al.*, 2012). Em *Ae. aegypti*, a atividade elevada das esterases foi reportada como um dos principais mecanismos de resistência metabólica aos inseticidas organofosforados (BISSET *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2011; MONTELLA *et al.*, 2007; POLSON *et al.*, 2011).

Em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* os genes de alfa esterase *CCEae3* e *CCEae6* podem ser considerados um dos principais causadores de resistência ao temephos (GRIGORAKI *et al.*, 2015; POUPARDIN *et al.*, 2014). Há relatos de resistência de *Cx. quinquefasciatus* aos organofosforado devido à amplificação de cópias de genes que codificam para esterases, permitindo-lhes superproduzir essa enzima (BUSS; CALLAGHAN, 2004; FERRARI, 2015). As esterases também podem atuar sequestrando o inseticida, nesse caso o inseticida funciona como substrato para a primeira etapa do mecanismo de hidrólise, devido à ocorrência de uma ligação covalente entre a enzima e o substrato. O sequestro de inseticida é comum para organofosforado, porque essa classe de inseticida serve como um bom substrato para a primeira etapa do mecanismo de hidrólise. Esse modo de ação das esterases por sequestro já foi descrito em diferentes espécies de insetos (BASS; FIELD, 2011; GRIGORAKI *et al.*, 2016; MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012).

2.6 Glutathiona -S- transferase

As glutathiona-S-transferases (GSTs) – (EC 2.5.1.18) são enzimas multifuncionais encontradas em seres eucariontes e procariontes aeróbicos, envolvidas em diferentes reações e processos celulares, como isomerização, redução, transporte, armazenamento, biossíntese de prostaglandinas, transferência de grupos tióis, regulação da quinase por estresse, apoptose celular e atividade de peroxidase (CHE-MENDOZA; PENILLA; AMÉRICO RODRÍGUEZ, 2009; LUMJUAN *et al.*, 2007). Essa família de enzima foi identificada pela primeira vez em 1961 por Both e colaboradores, em fígados de ratos, onde foi observada a reação de catalisação da adição de glutathiona (GSH) ao 1,2, dicloro-4-nitrobenzeno (CDNB), e em 1991 teve sua estrutura determinada (OAKLEY, 2011).

2.6.1 Classificação e Nomenclatura

Em eucariotos, as GSTS são divididas em três grupos: mitocondriais, microsossomais e citosólicas (CHE-MENDOZA; PENILLA; AMÉRICO RODRÍGUEZ, 2009). As GSTs mitocondriais são encontradas apenas nas mitocôndrias e peroxissomos de mamíferos, as GSTs microsossomais são proteínas integrantes de membranas, conhecidas como MAPEGs - Proteínas Associadas à Membrana. As MAPEGs são proteínas triméricas, que pesam aproximadamente 50 kDa e estão envolvidas no metabolismo de eicosanoides e glutathiona, apresentam atividade

de peroxidase, atuando na defesa celular, contra o estresse oxidativo (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005). Até o presente momento as GSTs microsossomais não têm sido implicadas no metabolismo de inseticidas em insetos, mas foram identificadas GSTS microsossomais em insetos como em *An. gambiae*, *Drosophila melanogaster*, *Cx. quinquefasciatus* e também em *Ae. aegypti*, mas pouco se sabe sobre elas (NIRANJAN REDDY; PRASAD; RAGHAVENDRA, 2011; RANSON *et al.*, 2002; TOBA; AIGAKI, 2000).

As GSTs citosólicas são enzimas solúveis e abundantes, localizadas no citoplasma celular. São conhecidos inúmeros genes que codificam GSTs citosólicas, nos mamíferos de 15 a 20 genes, nos insetos mais de 10 genes, em plantas entre 40 e 60 genes e em bactérias entre 10-15 genes (FROVA, 2006). São subdividas em classes conforme critérios estabelecidos, tais como, estrutura primária, especificidade de substratos, propriedades imunológicas, estrutura terciária, habilidade em formar heterodímeros e também a localização dos seus genes nos cromossomos (DING *et al.*, 2003; HEMINGWAY *et al.*, 2004).

Nos insetos, as duas primeiras classes de GSTs imunologicamente distintas clonadas e sequenciadas, foram classificadas como Classe I e Classe II (FOURNIER *et al.*, 1992). Com o surgimento de novas tecnologias da biologia molecular, o sequenciamento dos genomas e com os diversos bancos de dados disponíveis *on line*, foi possível a identificação de novas classes de GSTs. Em 2001 Chelvanayagam e colaboradores, propuseram que o sistema de nomenclatura das GSTS já utilizado em mamíferos também fosse empregado para todos os organismos. Assim, a nomenclatura de GSTs 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 identificado em *An. gambiae*.

Atualmente oito classes de GSTs citosólicas foram identificadas em artrópodes: Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Teta, Zeta, Xi e Iota (LUMJUAN *et al.*, 2007; NIRANJAN REDDY; PRASAD; RAGHAVENDRA, 2011). As duas primeiras são específicas desse grupo de organismos, e são as mais abundantes, além de serem implicadas na detoxificação de compostos inseticidas (RANSON *et al.*, 2002; STRODE *et al.*, 2008). Também é sugerido que a classe Delta pode atuar no processo de adaptação dos insetos nos seus específicos nichos ecológicos. Em algumas espécies de mosquitos, a classe Epsilon, também possui atividade de peroxidases, na proteção contra metabólitos secundários provenientes de estresse oxidativo (LUMJUAN *et al.*, 2005; ORTELLI *et al.*, 2003).

As outras seis classes, desempenham papéis biológicos constitutivos, de manutenção celular (BOARD *et al.*, 2000). Em *An. gambiae*, foram descritos 28 genes que codificam GSTs citosólicas (RANSON *et al.*, 2002), em *Ae. aegypti* existem 26 genes que codificam GSTs (STRODE *et al.*, 2008) e em *Cx. quinquefasciatus* 35 genes foram descritos (YAN *et al.*, 2012). Recentemente Matthews *et al.* (2018) identificaram duplicação gênica em três membros do cluster Epsilon de *Ae. aegypti* na linhagem de Liverpool após a nova anotação do genoma do vetor em 2017. Foram identificadas três cópias de *GSTE2* e *GSTE5* e quatro cópias de *GSTE7*, arranjados em uma estrutura repetida *in tandem*.

2.6.2 Estrutura das GST citosólicas

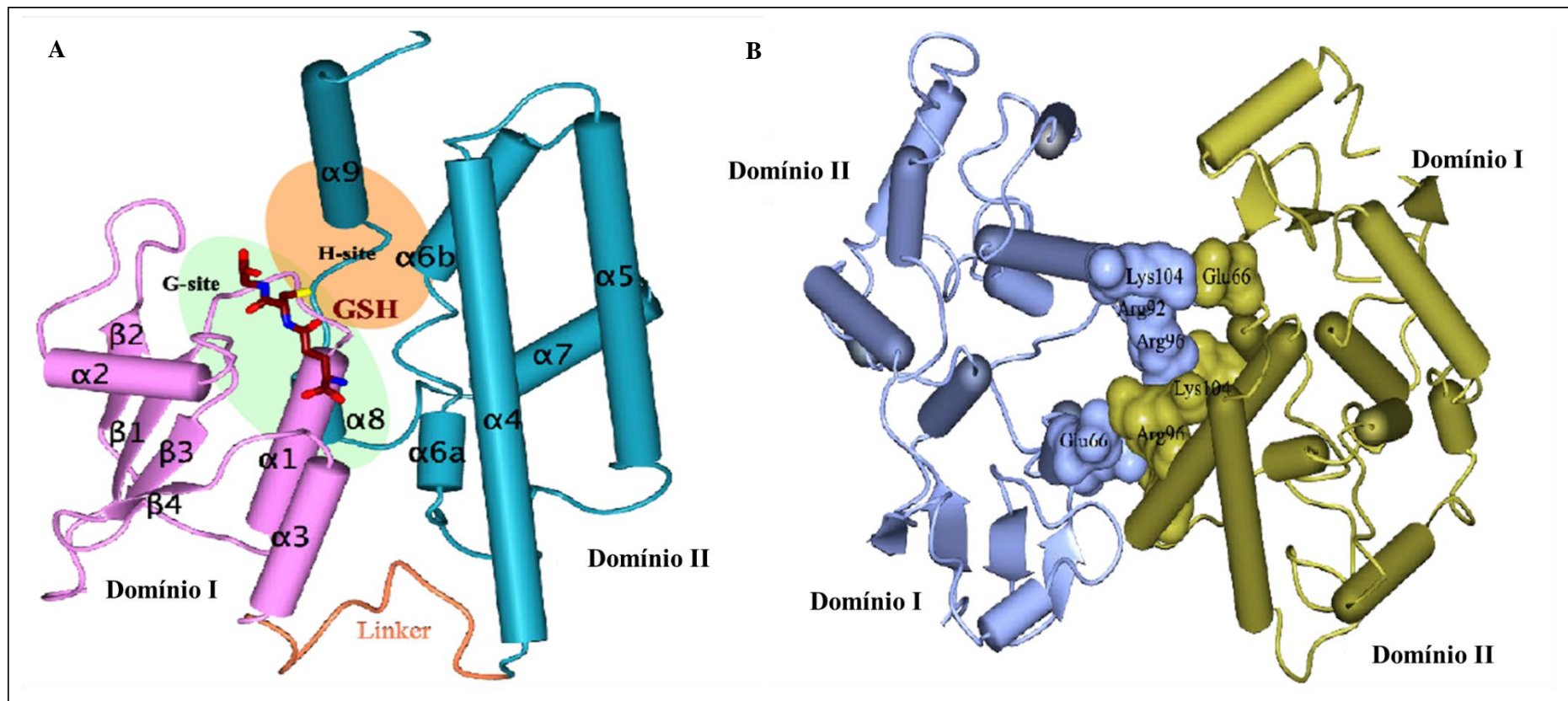
Estruturalmente as GSTs citosólicas são constituídas por dímeros formando homodímeros (subunidades idênticas) ou heterodímeros (subunidades diferentes), com aproximadamente 25 kDa, cada subunidade (DIRR; REINEMER; HUBER, 1994; FROVA, 2006). A heterodimerização é restrita a subunidades da mesma classe. Cada monômero é formado por dois domínios, que se unem por uma alça. O domínio I é N-terminal, local de ligação com a Glutathione (GSH), e o domínio II, na porção C-terminal é onde ocorre a ligação com substratos hidrofóbicos (Figura 6).

As diferentes classes de GSTs citosólicas, de modo geral apresentam topologias semelhantes e as diferenças estruturais estão concentradas ao redor do seu sítio ativo e na interface entre as subunidades (FROVA, 2006). Nas classes Delta, Epsilon, Theta e Zeta o resíduo do sítio catalítico é o aminoácido serina, na classe Ômega, é uma cisteína e na classe Sigma, esse papel é desempenhado pela tirosina (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005). O domínio N-terminal é formado por um motivo estrutural $\beta\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$ com as quatro folhas β flanqueadas pelas duas hélices alfa. Além disso, a presença de um *loop* irregular (conhecido como *loop* cis-prolina) conectando α_2 e β_3 é consistente com tioredoxinas clássicas, e ocorre no mesmo local onde são encontrados resíduos de aminoácidos que se ligam a Glutathione (sítio G) (FROVA, 2006). O domínio C-terminal é composto exclusivamente de α hélices e é composto por cinco hélices principais. Algumas classes de GST (Alfa, Ômega e Theta) podem ter uma α hélice extra e nessa região há a interação com substratos lipofílicos e eletrofílicos. A alta diversidade nessa região contribui para as GSTs se ligarem a diferentes substratos (MANNERVIK; DANIELSON, 1988). Uma sequência ligante curta, de aproximadamente 10 aminoácidos, conecta o domínio N-terminal ao domínio C-terminal. A

interação entre as duas subunidades que compõe o dímero, é formada através da interação entre o domínio N- terminal (domínio I) de uma subunidade e o domínio do C- terminal (domínio II) da outra subunidade. Resíduos das hélices α_3 e α_4 estão envolvidos nessas interações (FROVA, 2006).

Embora cada sítio ativo monomérico funcione independentemente, esses tipos de interações dinâmicas de bloqueio e chave podem melhorar a estabilidade da proteína e fornecer eficiência catalítica significativa para o sítio ativo, e a estrutura quaternária é essencial para sua atividade (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; SHEEHAN *et al.*, 2001). No banco de dados PDB (*Protein Data Bank*) estão depositadas pelo menos 74 estruturas tridimensionais de diversas classes de GSTS, obtidas através de estudos de cristalografia por difração de raio X.

Figura 6- Estrutura terciária de uma GST citosólica.



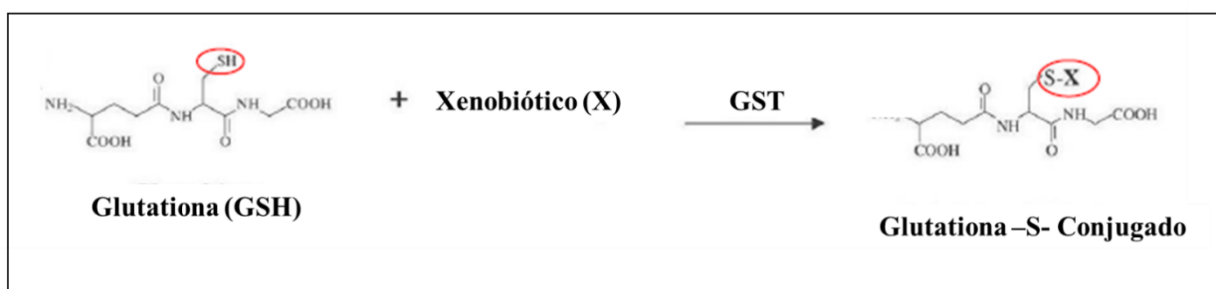
Fonte: Adaptado de Muleta (2016).

Legenda: A) Estrutura 3D do monômero de GST: A cor lilás representa o domínio I e a cor azul representa o domínio II. Os círculos verde claro e laranja representam os locais dos sítios G e H, respectivamente. O *linker* é representado na cor coral; B) Interações entre as subunidades. As cores azuis e verde escuro indicam os dois monômeros. Os resíduos de interação entre as duas subunidades são evidenciados e coloridos de acordo com suas respectivas subunidades.

2.6.3 Funções das GSTs citosólicas

As reações de conjugação de xenobióticos com a GSH é a principal função das GSTs citosólicas. As GSTs catalisam a conjugação da GSH a uma ampla variedade de compostos eletrofílicos endógenos e exógenos, com o objetivo de produzir metabólitos altamente hidrofílicos, que são menos reativos e mais fáceis de serem excretados pelas células (Figura 7) (TOWNSEND; TEW, 2003). O tripeptídeo GSH é formado pelos aminoácidos, glicina, cisteína e ácido glutâmico. A GSH é conhecido por proteger a célula contra compostos químicos oxidativos e eletrofílicos, apresenta um grupamento tiol (-SH) em sua estrutura, responsável por sua alta potência nucleofílica (CHE-MENDOZA; PENILLA; AMÉRICO RODRÍGUEZ, 2009; FROVA, 2006)

Figura 7- Reação de conjugação catalisada pela GST citosólica.



Fonte: Townsend; Tewe (2003).

Legenda: O círculo vermelho representa o grupamento tiol (-SH).

Já é bem caracterizado o papel das GSTs como enzimas de detoxificação em animais vertebrados e também nos invertebrados, por exemplo, em relação aos poluentes ambientais, como hidrocarbonetos poliaromáticos oxidados por CYP450s que são substratos para várias classes de GSTs. Na área da oncologia, alguns tumores humanos expressam níveis elevados de GST da classe Pi e há uma correlação clara entre a expressão da GST Pi com a resistência a quimioterápicos (LABORDE, 2010). GSTs citosólicas também apresentam funções não catalíticas, podendo atuar como ligandina, nas quais são capazes de se ligar a diversos ligantes endógenos e exógenos que não são substratos (TOWNSEND; TEW, 2003). Os locais de ligação ao ligante não substrato é denominado (sítio L), a localização exata deste sítio é variável, e depende da natureza química do ligante e a classe de GSTs, e até o momento sua natureza não é totalmente conhecida. Esses sítios já foram identificados em GSTs de *Schistosoma japonica*, *Arabidopsis thaliana* e de humanos (OAKLEY, 2011). Essas enzimas também participam no processo de biossíntese de leucotrienos, prostaglandinas e hormônios esteroides e no

catabolismo de aminoácidos aromáticos, além de atuar como peroxidases, isomerases e tiol transferases (BOARD *et al.*, 2000; THOM *et al.*, 2001).

As GSTs em insetos possuem atividade de DDTase, reação que metaboliza o DDT, através da retirada de um hidrogênio da molécula inseticida e liberação de uma molécula de cloro, o que gera o DDE, metabólito não tóxico (LUMJUAN *et al.*, 2005). Além da participação das GSTs na detoxificação de xenobióticos, também tem sido atribuído a essas enzimas um importante papel na metabolização de compostos endógenos tóxicos gerados pelo estresse oxidativo (WANG *et al.*, 2008). Nos insetos que realizam hematofagia, como os mosquitos, há uma produção contínua de espécies reativas de oxigênio (ROS), em razão da digestão do sangue produz em grande quantidade espécies reativas de oxigênio. Essas ROS desencadeiam uma cascata de reações que podem ser prejudiciais para as células (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005). As espécies reativas de oxigênio também podem ser produzidas quando os organismos são expostos a diversos agentes tóxicos, como inseticidas. A alta produção de ROS nas células gera um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e antioxidantes e acarreta danos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos. Esse processo leva à formação de radicais livres e como consequência à peroxidação de lipídeos, considerada bastante nociva para a célula (CATALÁ, 2010). A peroxidação de lipídeos gera aldeídos reativos, por exemplo, o 4-hidroxinonal (4-HNE) que, embora sejam componentes essenciais das vias de sinalização, podem ser tóxicos em altas concentrações. As GSTs têm um efeito protetor em vários estágios diferentes nesse processo (LOPACHIN; GEOHAGEN; GAVIN, 2009).

Estudos mostraram que o 4-HNE reage com biomoléculas contendo sítios nucleofílicos, como grupo sulfidril da glutathione, cisteína, lisina e resíduos de histidina (DOI *et al.*, 2004; LESGARDS *et al.*, 2011). No homem, a principal via de metabolização do 4-HNE é a conjugação da glutathione realizada pela GST Alfa (BALOGH *et al.*, 2010). Sawicki *et al.* (2003), demonstraram em *D. melanogaster*, que as GSTs metabolizam o 4-HNE. A proteína GSTE3-3 de *Anopheles cracens* exibe uma alta atividade para o 4-HNE, com os resíduos Y153 e T190 relacionados com a interação entre 4-HNE/GST, mecanismo similar ao encontrado em mamíferos, e esses resíduos se apresentam conservados na classe Epsilon (WONGTRAKUL *et al.*, 2009).

2.6.4 O papel das GSTs na resistência aos inseticidas químicos

As GSTs estão relacionadas com a resistência a diferentes classes de inseticidas químicos, isso ocorre seja por amplificação gênica ou superexpressão dos genes que codificam para as GSTs (HEMINGYWAY *et al.*, 2004). Em *Musca domestica*, foi encontrado amplificação do gene, *MdGSTD3* numa linhagem resistente ao organofosforado (SYVANEN; ZHOU; WANG, 1994; WANG; MCCOMMAS; SYVANEN, 1991). Ayres *et al.* (2011) caracterizaram o cluster de GSTs da classe Epsilon em quatro espécies do gênero *Anopheles*: *An. funestus*, *Anopheles plumbeus*, *Anopheles stephensi* e *An. darlingi*. Eles mostraram que os genes são diferencialmente expressos nos diferentes estágios de vida, 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 apresentaram *indel*. Em *Ae. aegypti* foi confirmada a associação entre uma elevada atividade catalítica de *GSTE2* com o fenótipo da resistência ao DDT e aos piretróides (LUMJUAN *et al.*, 2005, 2011).

Lumjuan *et al.* (2011) relataram a superexpressão dos genes *GSTE2*, *GSTE5* e *GSTE7*, com atividade de DDTase caracterizada para *GSTE5* em uma linhagem do mosquito *Ae. aegypti* resistente aos inseticidas DDT e permetrina. Neste trabalho, o silenciamento parcial dos genes *GSTE2* e *GSTE7* resultou no aumento da susceptibilidade aos piretróides, sugerindo que essas enzimas podem atuar na resistência a estes compostos. Saavedra-Rodriguez *et al.* (2014) selecionaram por cinco gerações linhagens de *Ae. aegypti* do Peru e México resistentes ao temephos e identificaram por microarranjo a superexpressão dos genes da classe Epsilon *GSTE2*, *GSTE3*, *GSTE5*, *GSTE6* e *GSTE7* e da classe delta. Os autores sugerem que as GSTs estejam envolvidas no metabolismo de compostos secundários gerados em decorrência da exposição ao temephos. Estudo de transcriptoma com fêmeas de *Ae. aegypti* resistentes a deltametrina também revelam o envolvimento de *GSTE5* e *GSTE7* no metabolismo de xenobióticos (FAUCON *et al.*, 2017).

Vários estudos evidenciaram que a alteração na atividade destas enzimas pode decorrer da exposição prolongada a inseticidas químicos (LIMA *et al.*, 2011; MARCOMBE *et al.*, 2012; POLSON *et al.*, 2011). Montella *et al.* (2007) avaliaram populações de *Ae. aegypti* de várias localidades do Brasil, num período de três anos e mostraram que houve um aumento das populações com alteradas atividades das GSTs, provavelmente em função do uso indiscriminado de inseticidas para controle de mosquitos. A classe Epsilon têm sido alvo de diversos estudos que investigam o processo de resistência a inseticidas químicos em diferentes

espécies. Esses trabalhos buscam caracterizar os membros dessa classe de GST e também compreender a função desempenhada por essas proteínas no processo de metabolização dos xenobióticos. O estudo de Araújo *et al.* (2013) com populações de *Ae. aegypti* provenientes de vários municípios do Estado de Pernambuco revelou uma alta razão de resistência ao inseticida temephos, alguns com valores acima de 100x, e elevado número de indivíduos com alterada atividade de GSTs totais.

A estrutura proteica de GSTE2 e sua interação com inseticidas têm sido estudadas e os dados demonstram associação com resistência. Wang *et al.* (2008), determinaram a estrutura cristalográfica de GSTE2 em *An. gambiae*, e identificaram os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos que interagem com o DDT (Leu9, Leu11, Ser12, Pro13, Pro14, Leu36, Leu37, His41, Ile55, Phe108, Met111, Phe115, Leu119, Phe120, Leu207 e Phe210) e resíduos hidrofílicos que interagem com a glutathiona (His53, Ile55, Glu67, Ser68 e Arg112). Riveron *et al.* (2014) descreveram a mutação L119F no gene *GSTE2* que confere resistência ao DDT em *An. funestus*. Os autores inferiram que essa mutação amplia a cavidade de ligação da GSTE2 com DDT, tornando o composto mais acessível a enzima e consequentemente aumentando o seu metabolismo.

Complementando esse trabalho, esse grupo investigou a associação entre a resistência metabólica mediada pela GSTE2 e os efeitos nos parâmetros biológicos em populações naturais de *An. funestus*. Eles observaram diminuição da fecundidade e fertilidade em mosquitos homozigotos e heterozigotos para a mutação L119F em *GSTE2*. Larvas heterozigotas para a mutação L119F apresentaram vantagens significativas no desenvolvimento larval, completando o seu ciclo em 9 dias, enquanto o tempo de desenvolvimento das larvas homozigotas suscetíveis e resistente foram de 11 dias para os dois genótipos e a longevidade foi maior nos mosquitos resistentes (TCHOUAKUI *et al.*, 2018).

Mitchell *et al* (2014), encontraram a mutação I114T em *An. gambiae*, que se localiza próximo ao domínio de ligação ao DDT e investigaram o efeito dessa mutação na estrutura da proteína. Os autores observaram que essa mutação está associada com a resistência ao DDT, porém não foram encontradas modificações significativas na estrutura proteica em decorrência dessa mutação.

2.7 Linhagem de *Ae. aegypti* resistente ao Temephos (RecR)

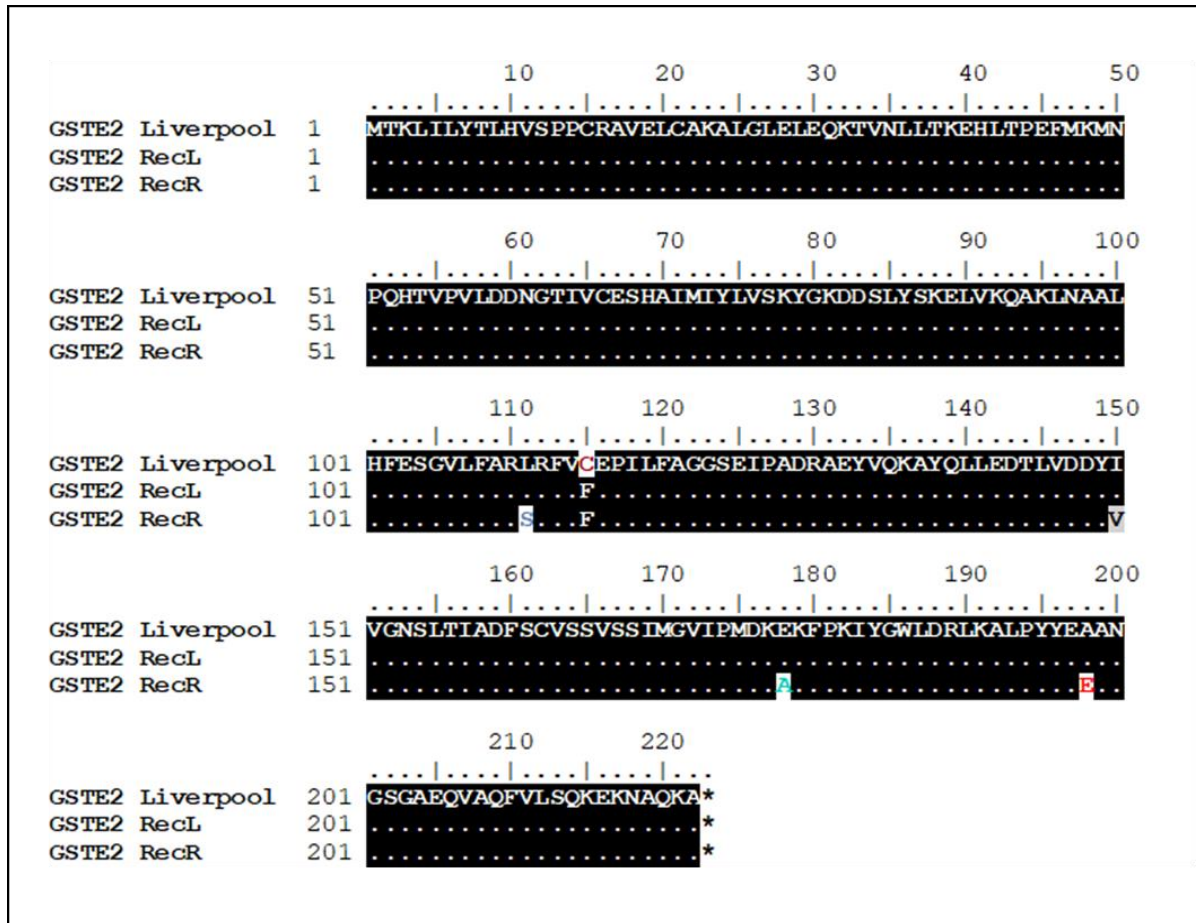
Melo-Santos *et al.* (2010) estabeleceram no insetário do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) uma linhagem de *Ae. aegypti* resistente ao temephos, denominada “Recife Resistente” (RecR). A linhagem RecR foi selecionada a partir da população parental proveniente do município de Araripina, Estado de Pernambuco, quando a razão de resistência (RR) inicialmente detectada para o temephos era cerca de 7 vezes. Atualmente essa linhagem encontra-se na geração F₄₂, com razão de resistência de 250 vezes.

Essa linhagem foi selecionada em laboratório com o objetivo de compreender a dinâmica e estudar a base molecular da resistência ao inseticida temephos. Strode *et al.* (2012) identificaram através do *detox* chip desenvolvido para *Ae. aegypti*, genes implicados na resistência metabólica em RecR. O estudo foi realizado com a RecR na geração F₂₀, com RR= 181 vezes. Foram avaliadas larvas L4, e fêmeas com três dias de idade. Nas larvas, foram identificados seis genes com superexpressão em RecR, um P450 (*CYP6N12*), três GSTs (*GSTII*, *GSTO1* e *GSTX2*), uma esterase *CCEae3a* e um Aldeído oxidase (*10982*). Já para as fêmeas foram encontrados 13 genes superexpressos, oito P450s (*CYP9J24*, *CYP9J32*, *CYP4H28*, *CYP6AG7*, *CYP6CB2*, *CYP6N12*, *CYP9M9* e *CYP9J10*), duas GSTs (*GSTE2* e *GSTE3*), duas aldo-keto redutases (*4118* e *15002*), e uma tiorredoxina peroxidase (*TpX5*).

Diniz *et al.* (2015), investigaram o custo biológico associado a resistência ao temephos na linhagem RecR, neste trabalho foram investigados 19 parâmetros biológicos. Os autores observaram que houve um grande comprometimento quanto a fecundidade, tempo de desenvolvimento larval, potencial reprodutivo e diminuição de reservas energéticas. Sugerindo um alto investimento metabólico destinado a manutenção dos mecanismos de resistência.

O estudo de caracterização funcional de *GSTE2* realizado em RecR identificou quatro mutações não sinônimas L111S, I150V, E178A e A198E, encontradas exclusivamente em RecR (Figura 8) (HELVECIO; 2014; HELVECIO *et al.*, 2020). A linhagem susceptível ao temephos mantidas no insetário do Instituto Aggeu Magalhães, RecL (Recife susceptível) não apresentou nenhuma dessas mutações na sequência codificadora de *GSTE2*.

Figura 8- Alinhamento das seqüências de aminoácidos da GSTE2 obtidas nas linhagens Liverpool, RecL e RecR.



Fonte: A autora.

Legenda: As modificações de aminoácidos encontradas em RecR (Linhagem de *Ae. aegypti* resistente ao temephos) e em RecL (linhagem de *Ae. aegypti* susceptível ao temephos), estão destacadas em relação a seqüência de GSTE2 de Liverpool disponível no *VectorBase*.

3 JUSTIFICATIVA

A resistência aos inseticidas químicos é um grave problema no controle de insetos de importância médica e pragas na agricultura. Conhecer a base genética e molecular da resistência é importante não só para criar estratégias que visem detectar e monitorar a resistência em campo, como também para implementar medidas de controle eficientes e auxiliar no desenvolvimento de novos inseticidas ou melhorar a eficiência dos já existentes. 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 em decorrência dos processos de duplicação gênica. Apesar da extensa literatura sobre resistência a inseticidas, as bases moleculares da resistência metabólica ainda são pouco compreendidas.

Em *Ae. aegypti*, os estudos ainda são escassos e pontuais. Assim, a utilização de diferentes abordagens moleculares para estudar as GSTs nesta espécie se torna relevante para compreensão do seu papel no processo de metabolização de xenobióticos, ressaltando que podem ser excelentes alvos de futuras aplicações biotecnológicas, seja no aperfeiçoamento de testes enzimáticos mais sensíveis do que os existentes atualmente para o monitoramento da resistência em campo, ou no melhoramento e até mesmo a criação de novos inseticidas ou novas abordagens para o controle de mosquitos de importância para a saúde pública.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual o papel do Cluster de GST Epsilon em linhagens e em populações naturais de *Ae. aegypti* resistentes ao temephos?

5 HIPÓTESE

O Cluster Epsilon de Glutathione-S-transferase em linhagens e em populações naturais de *Ae. aegypti* resistentes ao temephos está envolvido com a resistência metabólica ao temephos.

6 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a Glutathiona-S-transferase Epsilon 2 (GSTE2) e outros membros deste cluster em *Ae. aegypti* susceptíveis e resistentes ao temephos.

6.1 Objetivos específicos

- a) Comparar o perfil de expressão de *GSTE2* por RT-qPCR nas linhagens de *Ae. aegypti* susceptível (RecL) e resistente (RecR) ao temephos;
- b) Caracterizar a atividade e a cinética enzimática de GSTE2 recombinantes selvagens (RecR e RecL) e mutantes e investigar o seu papel na resistência ao temephos;
- c) Determinar a diversidade genética do cluster Epsilon em populações naturais de *Ae. aegypti* resistentes e susceptíveis ao temephos;
- d) Identificar polimorfismos associados à resistência nos genes que codificam para os membros de GST de classe Epsilon em populações naturais de *Ae. aegypti*;
- e) Caracterizar o transcriptoma em larvas de *Ae. aegypti* das linhagens susceptível (RecL) e resistente (RecR) ao temephos;

7 METODOLOGIA

Nos tópicos a seguir, estão descritadas todas as metodologias que foram utilizadas no trabalho para responder aos objetivos propostos.

7.1 Caracterização funcional de GSTE2 em RecL e em RecR

Sabe-se que a resistência ao temephos em *Ae. aegypti* pode ser mediada principalmente por mecanismos metabólicos (ARAÚJO et al., 2013; MELO-SANTOS et al., 2010), embora os mecanismos moleculares associados a essa resistência metabólica ainda estejam sendo elucidados.

Apesar do grande número de genes envolvidos no processo de resistência metabólica aos inseticidas que estão descritos na literatura e identificados em nossos dados de transcriptoma, diversos trabalhos indicam que a superfamília das GSTs, sobretudo a GST Epsilon 2, pode ter um papel relevante no processo de metabolização de xenobióticos em diferentes espécies de mosquitos, deste modo, o gene *GSTE2* foi investigado nas duas linhagens de *Ae. aegypti*.

Previamente, Helvecio (2014) caracterizou mutações não sinônimas que são exclusivas na sequência de *GSTE2* na linhagem RecR (S111L, I150V, E178A, A198E) e neste trabalho investigou-se o papel dessas mutações na atividade enzimática de *GSTE2* em RecR, a linhagem de *Ae. aegypti* resistente ao temephos. Além disso, ensaios de susceptibilidade aos inseticidas piretróides também foram realizados para investigar se outros mecanismos, como exemplo sítio alvo podem ser responsáveis pela resistência ao temephos, ou se a resistência cruzada está presente na linhagem RecR selecionada exclusivamente contra o temephos. O conjunto de dados produzidos nesta seção foram compilados no artigo intitulado “Polymorphisms in *GSTE2* is associated with temephos resistance in *Aedes aegypti*” e foi publicado na revista *Pesticide Biochemistry and Physiology* em 2020.

7.1.1 Linhagens de *Ae. aegypti*

Foram usadas nesta etapa do estudo duas linhagens de *Ae. aegypti* que estão descritas abaixo:

1) RecL: linhagem susceptível oriunda do município de Recife/PE mantida há mais de 20 anos no insetário do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) (Melo-Santos et al., 2001);

2) RecR: linhagem selecionada em laboratório, com elevada razão de resistência ao temephos, ($RR_{95} \cong 250$) testada em sua 38ª geração filial (F_{38}), cujos detalhes do processo de seleção estão descritos em Melo-Santos et al. (2010).

Essas linhagens estão sendo mantidas no insetário, do Instituto Aggeu Magalhães IAM/Fiocruz-PE pelo Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores (SRCCV), do Departamento de Entomologia. Resumidamente, as larvas foram criadas em água de torneira declorada e alimentadas com ração para gatos autoclavada (Whiskas®). Os adultos foram alimentados com 10% de solução de sacarose e as fêmeas realizaram repasto em desfibrinado de coelho, por um sistema de alimentação artificial sangue de camundongo. Todas as larvas e adultos foram mantidos a $26 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$, 70% de umidade relativa do ar e um fotoperíodo de 12h/12h claro/escuro.

7.1.2 Ensaios de susceptibilidade a inseticidas

Os ensaios com Os bioensaios a adulticidas piretróides para avaliação da susceptibilidade das linhagens Rockefeller, RecL e RecR foram realizados usando fêmeas não alimentadas de 3-4 dias de idade, seguindo o protocolo da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1998). Papéis de filtro Whatman Nº1 (15 por 12 cm) foram impregnados na SUCEM/Marília-SP, com os ingredientes ativos (I.A): cipermetrina (Sigma®, lote: SZBC047XV), na concentração de 146 mg i.a./m² (0,4%); deltametrina (Sigma®, lote: SZBC059XV), 18 mg i.a./m² (0,05%) e lambda-cialotrina (Sigma®, lote: SZBB332XV), 19,4 mg i.a./m² (0,05%) e DDT (4%). Para a realização dos ensaios, as fêmeas foram inicialmente aclimatadas por 60 min no tubo de recuperação (kit OMS). Posteriormente cerca de 25 fêmeas foram transferidas para os tubos de exposição, contendo os papéis impregnados com a dose diagnóstica de cada inseticida (quatro réplicas por inseticida), totalizando 100 fêmeas por população, além de dois tubos controle (50 fêmeas), contendo apenas o papel impregnado com óleo mineral. Os testes foram realizados em triplicatas, totalizando 450 fêmeas para cada inseticida. Os ensaios de susceptibilidade ao DDT foram realizados na Escola de Medicina Tropical de Liverpool no Reino Unido pela Dra. Lisa Reimer, utilizando o mesmo protocolo padrão.

As fêmeas foram expostas até o efeito nocaute. O número de mosquitos nocauteados foi registrado a cada 10 min até que estivessem todos desfalecidos. Depois foram transferidos para tubos de recuperação contendo 10% de açúcar e a mortalidade foi determinada após 24h. Linhagens com taxa de mortalidade de adultos abaixo de 80% foram classificadas como resistentes, mortalidade variando de 80 a 98% foram classificadas como status de susceptibilidade alterada e acima de 98% foram classificadas como suscetíveis (DAVIDSON; ZAHAR, 1973).

7.1.3 Detecção de mutações no gene do canal de sódio (Resistência sítio alvo)

Para a análise de mutações no gene do canal de sódio (Na_v), foram utilizadas 50 fêmeas de RecL e 50 de RecR. Os DNAs das fêmeas foram extraídos individualmente utilizando-se o método de extração por DNazol® (Invitrogen, EUA), com modificações. Cada fêmea foi macerada com 60 μ l do DNazol. Após a maceração, os homogenatos foram centrifugados a 12.000 g por 10 min a 4 °C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos de 1,5 ml contendo 80 μ l de etanol 100% refrigerado e homogeneizados por 1 min para precipitação do DNA. Uma nova centrifugação foi realizada a 12.000 g por 5 min a 4 °C. Após a segunda centrifugação, os sobrenadantes foram removidos, e os precipitados foram lavados uma única vez com 50 μ l de etanol 75% durante 1 minuto. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 1 min a 4 °C e os sobrenadantes foram removidos, os precipitados contendo o DNA foram ressuspensos em 50 μ l de tampão Tris-EDTA (T.E). A concentração e qualidade do DNA foram determinadas por espectrofotometria usando o NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific®).

Duas reações de PCR foram conduzidas com objetivo de investigar mutações nas regiões dos exons 20, 21 e 31 do gene Na_v , correspondente ao sexto segmento (S6) dos domínios II e III da proteína transmembranar do canal de sódio. As mutações investigadas foram L982W, I1011M, L1014F (exon 20), V016I (exon 21) e F1534C (exon 31), todas já descritas na literatura (MOYES *et al.*, 2017).

A primeira PCR foi realizada para amplificar um fragmento de 622 pb correspondente aos exons 20 e 21 que contém as quatro mutações. *Primers* específicos foram manualmente desenhados de acordo com a sequência gênica disponível no VectorBase (AAEL006019) (Quadro 2) (Araújo *et al.*, 2019). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μ l, com ~50 ng de DNA, 1X PCR Master Mix (Promega®), $MgCl_2$ 2,5 mM e 0.4 μ M de

cada *primer*. As condições de ciclagem foram: 5 min 94° C, seguido de 30 ciclos de 1 min 94° C, 1 min 67° C e 1 min 72° C, com extensão final de 10 min a 72° C.

A segunda PCR foi uma reação alelo-específica para genotipagem do sítio F1534C, localizado no exon 31 do gene *Nav* (HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010). Os *primers* foram utilizados em sistema tetraplex: dois externos (AaEx31P e AaEx31Q), que correspondem à amplificação de um fragmento de 350 pb, e dois internos (AaExwtf31 e AaEx31mut). Se o alelo for selvagem correspondente a fenilalanina, a amplificação será de 231 pb e se for o alelo mutante, correspondente a cisteína, o tamanho do fragmento será de 163 pb.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo ~50 ng de DNA; MgCl₂ 2,5 mM; 0,4 mM de cada dNTP; 0,5 uM de cada *primer* e 2,5 U de Taq polimerase. A ciclagem para esta reação de PCR foi: 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30s, 63 °C por 30s, 72 °C por 30s, e uma extensão final de 72 °C 10 min.

Nos dois tipos de PCR foram utilizados controles negativos, com todos os reagentes, porém sem DNA, com o objetivo de verificar possível contaminação. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e os tamanhos das bandas foram estimados pela comparação com padrões conhecidos do marcador de peso molecular DNA Ladder® 1Kb Plus (Invitrogen).

Os produtos da PCR do primeiro sistema foram purificados segundo as condições recomendadas pelo kit ilustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare®). 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 e submetidas ao sequenciamento de sanger. As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM/Fiocruz.

Quadro 2- *Primers* empregados para detecção de mutações no canal de sódio.

Mutações	Localização no gene <i>Na_v</i>	<i>Primers 5'-3'</i>
L982W I1011M L1014F V1016I	Exon 20 Exon 21	P_kdr2021F GACAATGTGGATCGCTTCCCG P_kdrR2021 GCACGGACGCAATCTGGC
F1534C	Exon 31	AaEx31ExF TCGCGGGAGGTAAGTTATTG AaEx31ExR GTTGATGTGCGATGGAAATG AaEx31wtF CCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATCTT AaEx31mutR CGTGAAGAACGACCCGC

Fonte: A autora.

7.1.4 Ensaios enzimáticos de GSTs totais

Para avaliar o perfil de atividade das GSTs totais, aproximadamente 100 larvas do 4^o *instar* e 100 fêmeas de um dia após a emergência de RecL e RecR F₃₇ foram submetidas a testes enzimáticos utilizando o substrato convencional CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) para quantificação da atividade enzimática. Os testes foram conduzidos em uma série de três repetições, por linhagem, com larvas e adultos, de acordo com o protocolo descrito por BRASIL (2006), com modificações. As larvas e os adultos foram homogeneizados individualmente com 300 µl de água e os homogenatos foram distribuídos em duplicatas nas microplacas de 96 poços, com glutathiona reduzida (GSH) 10 mM e CDNB 21 mM. A leitura da placa foi realizada com absorbância de 340 nm durante 20 min com intervalo de um minuto para cada leitura. Todas as leituras foram realizadas no espectrofotômetro Elx808 (Biotek).

Os resultados da absorbância foram analisados usando o *software GEN 5*, o qual transformou os dados originais (obtidos em valores de absorbância) em atividade enzimática, através do cálculo do desvio padrão das réplicas. A atividade enzimática específica obtida para cada indivíduo foi determinada a partir da concentração de proteínas totais.

Os perfis enzimáticos das linhagens avaliadas foram classificados em comparação com a linhagem Rockefeller (percentil 99). A atividade foi considerada inalterada se <15% dos indivíduos apresentassem atividade enzimática compatível com o percentil 99^o de Rockefeller, que expressa a atividade enzimática para 99% dos indivíduos desta linhagem. Valores entre 15% e 50% classificaram a atividade como alterada e acima de 50%, muito alterada, de acordo com os critérios definidos pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2006).

7.1.5 Avaliação da expressão gênica do gene *GSTE2* por RT-qPCR

O RNA total de amostras das linhagens RecR₃₇ e RecL foi obtido a partir de 10 *pools* de cinco larvas de 4º instar e 10 *pools* de cinco fêmeas usando o protocolo de extração de RNA por Trizol (Ambion). A RT-qPCR foi realizada com o kit Quantitect SYBR Green RT-PCR (QIAGEN) onde foram usados os primers *forward* 5' AAGATCTACGGCTGGCTGGA 3' e *reverse* 5'TCTGCGACAGGACAAACTGC 3' que são específicos para o gene *GSTE2*. Todas as reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicata, no sistema de PCR em tempo real da Applied Biosystems (ABI 7500). Para cada reação foram usados: SYBR Green Master mix 1X, 0,4 µM de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 0,2 U da enzima Transcriptase Reversa, 3 µl de cada amostra de RNA normalizada para 100 ng e água ultra pura para completar um volume final de 10 µl por reação. O gene *rpl8* (Proteína Ribossomal L8) foi usado como gene de referência, usando primers *forward* e *reverse* específicos 5'-TGGGGCGTGTTATTCGTGCACAG-3' e 5'-CAGGTATCCGTGACGTTCCGGCA-3'. 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 termociclagem de RT-qPCR utilizado é composto das seguintes etapas: uma etapa inicial a 50 °C por 30 min que permitiu a transcrição reversa; outra etapa de 15 min a 95 °C para ativar a Taq polimerase seguida por 40 ciclos de 94 °C por 15s, 54 °C por 30s e 72 °C por 30s. Controles negativos foram incluídos para detectar possíveis contaminações dos reagentes (mix sem molde de RNA). Uma amostra da linhagem susceptível RecL foi utilizada como calibradora e a expressão relativa do RNAm foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para avaliar as diferenças na expressão gênica por RT-qPCR entre as linhagens, diferenças estatisticamente significativas foram determinadas com o teste Mann-Whitney usando o programa *GraphPad Prism 5*.

7.1.6 Produção de proteínas recombinantes de GSTE2RecR e GSTE2RecL

Conforme mencionado no item 2.7 do referencial teórico, Helvecio (2014) encontrou mutações exclusivas na sequência codificadora de *GSTE2* na linhagem RecR e iniciou a

investigação do papel das mutações (L111S, I150V, E178A e A198E) na atividade catalítica de GSTE2. Para isso foram produzidas construções plasmidiais em pET28 das GSTE2 de RecR e RecL e neste trabalho nós produzimos essas proteínas em larga escala por expressão heteróloga em células de *Escherichia coli* BL21star para a realização de todos os experimentos mencionados a baixo.

7.1.7 Mutagênese sítio dirigida em GSTE2RecL

Para avaliar o impacto das mutações (L111S, I150V, E178A e A198E) nas propriedades bioquímicas de GSTE2 em RecR, foram realizados procedimentos de mutagênese sítio dirigida, utilizando o kit de mutagênese sítio-dirigida QuikChange (Stratagene) e oligonucleotídeos específicos (Quadro 3), segundo instruções do fabricante. Foram produzidos mutantes individuais e sobrepostos na sequência de RecL de GSTE2 clonada em pET28a (Invitrogen), foram elas: MutL111S_t323c, MutI150V_a448g, MutE178A_a533c, MutA198E_c593a, e um mutante possuindo todos estes quatro aminoácidos mutados (MutTotal). Todas as sequências mutadas foram confirmadas por sequenciamento automático.

Quadro 3- Primers utilizados para reações de mutagênese sítio-dirigida para avaliar o impacto das mutações de GSTE2 RecL em seus parâmetros cinéticos.

Primers	Posição da mutação	Sequência 5'-3'
Mut111F Mut111R	MutL111S_ t323c	5'-CAGTGTCCCTGTTTCGCTCGTTCGCGGTTTGTGTTTG-3' 5'-CAAACACAAACCGCGAACGAGCGAACAGGACACTG-3'
Mut150F Mut150R	MutI150V_ a448g	5'-AGGATACCCTGGTGGATGACTATGTTCGTGGGAAATT-3' 5'-AATTTCCCACGACATAGTCATCCACCAGGGTATCCT-3'
Mut178F Mut178R	MutE178A_ a533c	5'-GAAATTCCGATGGATAAGGCGAAGTTCCCGAAGATCTAC-3' 5'-GTAGATCTTCGGGAAGTTCGCCTTATCCATCGGAATTTTC-3'
Mut198F Mut198R	MutA198E_ c593a	5'-GCCCTACTACGAGGAAGCCAACGGAAGTG-3' 5'-CACTTCCGTTGGCTTCCTCGTAGTAGGGC-3'

Fonte: A autora.

7.1.8 Determinação da atividade enzimática e dos parâmetros cinéticos de GSTE2 RecR e RecL e GSTE2 mutantes

A atividade enzimática das GSTE2 recombinantes das duas linhagens e mutantes foi medida por meio de espectrofotometria em um leitor de microplacas (GEN5), quantificando a capacidade enzimática na promoção da conjugação de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathiona reduzida, seguindo o protocolo já mencionado na seção 9.4 (BRASIL, 2006). Para a determinação dos parâmetros cinéticos, a atividade GST foi medida usando-se diferentes concentrações de CDBN (0.4 a 25 mM) e concentrações fixas de GSH. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata. A velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_m) foram determinadas por análise de regressão não linear usando o *software GraphPad Prism* versão 8. Os ensaios foram realizados em três repetições independentes. Para os ensaios enzimáticos com GSTE2 recombinantes e mutantes, as diferenças na atividade enzimática foram determinadas através do teste estatístico ANOVA, seguido pelo teste de Tukey usando o *software GraphPad Prism* versão 8.

7.1.9 Ensaios de inibição enzimática

A avaliação da inibição da atividade enzimática de GSTE2 recombinantes, mutantes e de GST total foi realizada através de ensaios bioquímicos seguindo o protocolo de Brasil (2006) com modificações. Nestes ensaios, foram utilizadas concentrações fixas de GSH (9 mM) e CDBN (1 mM) com 1 µg de proteína, e adicionadas concentrações crescentes de temephos (0 µM a 400 µM), a concentração do inseticida variou conforme cada amostra. Os ensaios foram realizados em duplicatas, com três repetições independentes.

A porcentagem de inibição sobre atividade enzimática das proteínas recombinantes foi calculada comparando-se a atividade enzimática de cada amostra sem o inseticida e com o inseticida. Os valores correspondentes a atividade enzimática sem o inibidor foi estabelecida como referência, sendo considerada atividade máxima da enzima igual a 100%. Dessa forma, as porcentagens de inibição das amostras foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = [(AR-A) \times 100] / AR$$

AR= representa atividade da enzima sem inseticida;

A= representa a atividade da enzima com inseticida;

Também foram calculados os valores de IC₅₀ para cada tipo de proteína recombinante por regressão não linear com o *software GraphPad Prism* versão 8. A IC₅₀ corresponde à concentração de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50%.

7.1.10 Modelagem 3D de GSTE2RecL e GSTE2RecR

Para avaliar a influência das mutações que geraram mudanças de aminoácidos encontradas exclusivamente na GSTE2 da linhagem resistente RecR sobre a estrutura 3D da proteína, foi realizada a modelagem dos aminoácidos previstos com o *software Modeller* 9.13 (ŠALI; BLUNDELL, 1993), empregando os parâmetros default. A GSTE2 de *An. gambiae* (WANG *et al.*, 2008) foi usada como molde, pois é o homólogo mais próximo que possui estrutura 3D conhecida disponível, com 71% de identidade. Cinco melhores modelos foram gerados para cada proteína resistente RecR e susceptível RecL. A estrutura final 3D refinada foi avaliada através do programa *Ramachandram Plot* e verificada pelo servidor 3D da web SAVES (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>). Esses experimentos foram realizados em colaboração com o Dr. Gabriel Wallau do Departamento de Entomologia.

7.2 Análise da diversidade genética do Cluster Epsilon em populações de *Ae. aegypti*

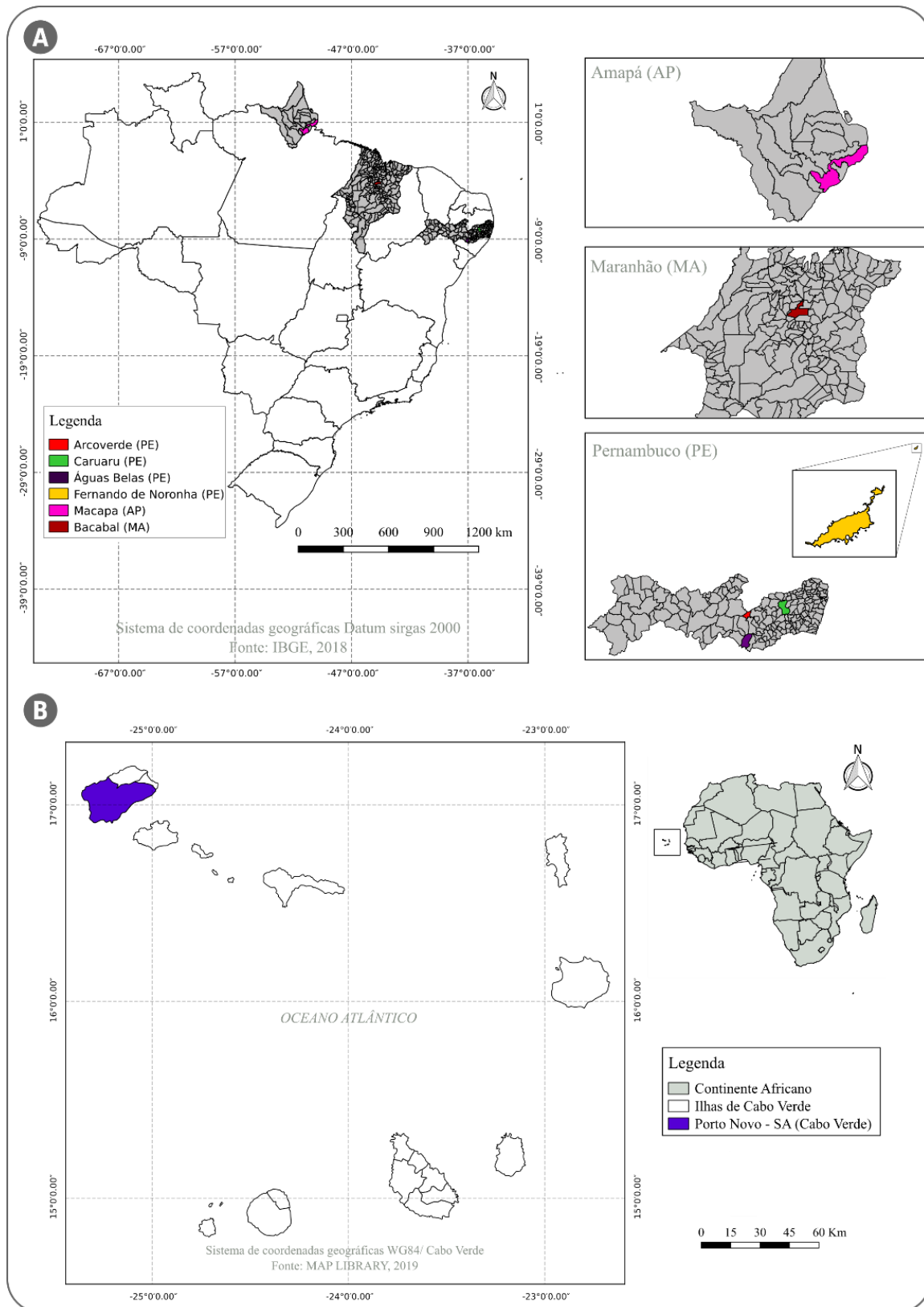
A diversidade genética das GSTs de classe Epsilon foi investigada em populações naturais de *Ae. aegypti*. As mutações exclusivas não sinônimas detectadas na sequência codificadora do gene *GSTE2* na linhagem RecR por Helvecio *et al.* (2014), impulsionaram a análise das demais sequências gênicas para os outros membros do cluster Epsilon em populações naturais de *Ae. aegypti*. O objetivo principal desta etapa de investigação foi detectar possíveis variantes alélicas no cluster Epsilon que pudessem estar relacionadas a resistência metabólica nesta espécie, além de aplicar um estudo de genética de populações, para verificar possíveis efeitos de seleção sobre o gene *GSTE2* e os outros membros do cluster.

7.2.1 Populações de *Ae. aegypti*

Para estudar a diversidade genética do Cluster Epsilon de GSTs, populações naturais de *Ae. aegypti* de seis municípios, quatro do estado de Pernambuco (Arcoverde, Caruaru, Águas Belas e Arquipélago de Fernando de Noronha), uma do Maranhão (Bacabal) e uma do Amapá (Macapá), representativos das regiões Nordeste e Norte do Brasil, foram avaliadas neste estudo.

Tais populações, com exceção de Águas Belas, foram previamente caracterizadas quanto ao seu fenótipo de resistência ao inseticida temephos (ARAÚJO *et al.*, 2013, 2019). Também foi incluída no estudo uma população africana de *Ae. aegypti* do arquipélago de Cabo Verde, Porto Novo - Ilha de Santo Antão (Figura 9). Vale destacar que esta ilha é a única, entre todas as ilhas do arquipélago, que nunca registrou casos de dengue ou Zika apesar da presença do mosquito. Esta população foi incluída na nossa análise com o objetivo de comparar o grau de diversidade genética dos genes GSTE das populações brasileiras com o de uma população sob outro contexto de controle vetorial diferente do brasileiro. O quadro 4 traz aspectos importantes sobre as populações dos mosquitos avaliados neste estudo para facilitar a compreensão dos resultados encontrados.

Além das linhagens RecR e RecL, foi utilizada nesta etapa a sub-linhagem RecRev, estabelecida no insetário do IAM, a partir da 14^a geração da RecR, submetida ao processo de reversão total da resistência ao temephos. O objetivo da inclusão da RecRev no trabalho foi ter uma população com o mesmo *background* genético da RecR, porém com outro perfil de susceptibilidade ao temephos.

Figura 9- Mapa dos locais de amostragem de *Ae. aegypti* do estudo.

Fonte: Editado no QGIS (2019).

Legenda:(a) Localização geográfica do Brasil e dos três estados onde os mosquitos foram coletados; (b) Localização geográfica do arquipélago de Cabo Verde e da ilha de Santo Antão.

Quadro 4- Caracterização das populações de *Ae. aegypti* utilizadas no estudo.

Populações	Status de susceptibilidade ao temephos	Período de uso estimado do temephos	Ano de coleta
Arcoverde (PE)	Resistente	1996-2012	2015
Caruaru (PE)	Resistente	1996-2012	2015
Águas Belas (PE)	NA	1996-2012	2015
Fernando de Noronha (PE)	Susceptível	Nunca utilizado	2014
Macapá (AM)	Resistente	1996-2012	2010
Bacabal (MA)	Resistente	1996-2012	2010
Porto Novo (CV)	NA	Uso esporádico	2016

Fonte: Araújo *et al.* (2013; 2019).

Legenda: NA: Não avaliado.

7.2.2 Extração de DNA

Para investigar polimorfismos nos genes que compõem a classe Epsilon, DNAs de amostras individuais de fêmeas de cada população foram extraídos utilizando o reagente DNAzol® segundo as instruções do fabricante, os quais foram armazenados a -20 °C. No total foram extraídos DNAs de 50 indivíduos, por população, com exceção de Santo Antão (25 fêmeas), Bacabal e Macapá (10 fêmeas).

7.2.3 Genes estudados

Foram estudados todos os oito genes que compõe o cluster Epsilon (*GSTE1*, *GSTE2*, *GSTE3*, *GSTE4*, *GSTE5*, *GSTE6*, *GSTE7*, *GSTE8*). Com o objetivo de investigar se o grau de diversidade genética observado nos genes das GSTs era decorrente de um fenômeno demográfico ou resultado de seleção natural agindo especificamente sobre estes genes, um outro gene foi adicionado ao estudo, o gene *Defensina A*. Sabe-se que este gene é um componente da resposta imune, associado à resposta do mosquito ao estresse e infecções por patógenos, não possui nenhuma associação conhecida com a resistência ao temephos e apresenta uma alta diversidade genética (LEHMANN *et al.*, 2009). É importante ressaltar que para esses dados, esse gene funcionou como um marcador nuclear independente, fisicamente (pois está localizado em um cromossomo distinto do cluster Epsilon) e apresenta funções diferentes do cluster GST Epsilon.

7.2.4 Reações de PCR

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μ l contendo $MgSO_4$ 1 mM, 0,1 mM de cada dNTP, 1,6 μ M de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*), tampão de PCR na concentração de 1X, 0,5U de *Taq* DNA Polymerase *High Fidelity* (5U/ μ l) e 50 ng de DNA. As amplificações por PCR foram feitas em um termociclador Mastercycler® nexus X2 programado para uma etapa de desnaturação a 94 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min variando de acordo com o par de *primer* utilizado e 72 °C por 2 min, e uma etapa final de 72 °C por 10 min.

Os *primers* específicos que foram utilizados em cada reação de PCR foram desenhados para amplificar toda a sequência gênica desde o primeiro códon que codifica para a metionina até o códon de parada, com auxílio do programa *Primer Select* do *DNAstar*, e utilizando a anotação do gene disponível no Vectorbase (versão de anotação do genoma - AaeGL 3.5). A localização dos primers nos genes estão sinalizadas na Figura 10. As sequências de *primers* de GST Epsilon e *Defensina A* usadas neste trabalho estão mostradas no Quadro 5.

Amostras de controles negativos (reagentes sem o DNA molde) foram usados para checar possíveis contaminações nas reações. Os produtos de PCR foram purificados utilizando QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante e foram aplicados em gel de agarose, corado com brometo de etídio, para visualização da integridade da banda. 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 Plus (Invitrogen). Após quantificação e normalização, todos os *amplicons* foram enviados para sequenciamento. As reações de sequenciamento de sanger foram realizadas no NPT do IAM/Fiocruz.

7.2.5 Análise dos dados

O programa *CodonCode Aligner* versão 3.7.1 (CodonCode Corporation, Dedham, MA) foi usado para checar a qualidade das sequências e montar os *contigs*. Sequências com qualidade ≥ 20 foram utilizadas para a geração de sequências consenso. Arquivos no formato FASTA, contendo as sequências de nucleotídeos e suas respectivas sequências traduzidas de aminoácidos para cada gene investigado também foram geradas. Essas sequências foram usadas

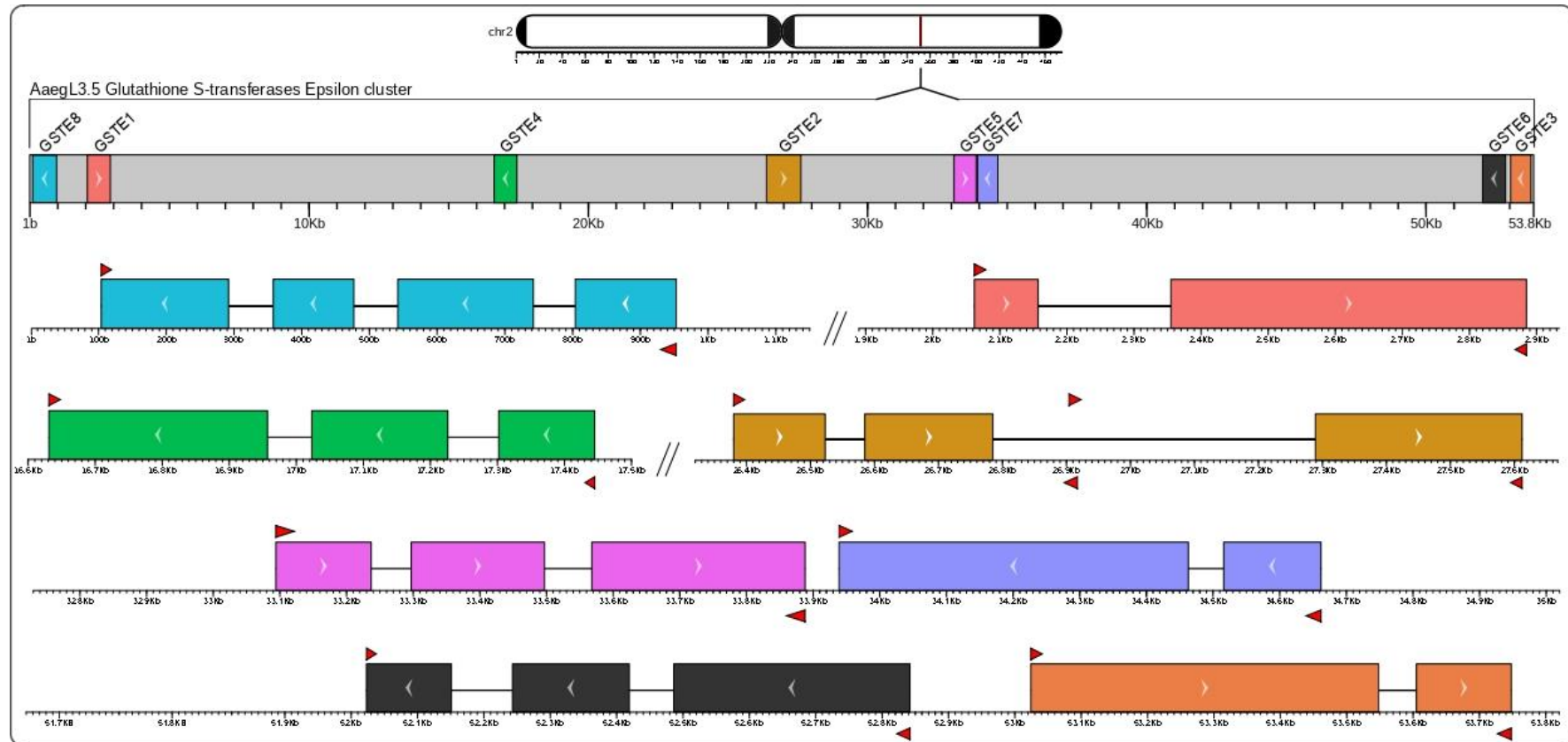
nas análises, com a finalidade de comparar esses genes. Todas as sequências foram alinhadas com o auxílio do algoritmo *ClustalW* do programa *BioEdit* versão 3.7.1 (HALL, 1999).

Diversos parâmetros de diversidade genética foram avaliados: número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade de haplótipos (Hd), diversidade nucleotídica (π), número médio de diferenças nucleotídicas (k) e desequilíbrio de ligação (LD), todos calculados pelo *software DnaSP* versão 6.12.03 (ROZAS *et al.*, 2017). Também foram analisados os testes de neutralidade usando as estatísticas Teste Tajima D, Fu e Li D *, Fu e Li F * e Fu Fs com o *DnaSP*.

Os parâmetros mencionados no parágrafo anterior foram estimados de duas maneiras, a primeira foi com todo o conjunto de dados para cada população (sem subamostragem) e a segunda, devido a diferenças no tamanho da amostragem entre as populações do estudo (ex. 50 indivíduos para 4 populações, 25 indivíduos para 1 e 10 indivíduos para 2 populações) que poderiam interferir na comparação e análise entre os parâmetros de diversidade, foram gerados 10 *subsets* de 10 indivíduos selecionados aleatoriamente (sem repetição) para cada população, com um script personalizado do Python. Os dois tipos de análises foram plotados em gráficos contendo os valores médios das 10 subamostragens com os valores do conjunto de dados inteiro e as duas formas de análises foram comparadas para escolha do melhor método.

Para visualizar as relações entre os haplótipos, foram realizadas três diferentes abordagens de rede haplotípica: Minimum Spanning Networks (MSN), Median-Joining Networks (MJN) e redes TCS com *software PopART* versão 1.7 (LEIGH; BRYANT, 2015)

Figura 10- Posição dos *primers* utilizados para amplificação do Cluster Epsilon no cromossomo 2R de *Ae. aegypti* de acordo com a anotação do genoma AaegL3.5.



Fonte: A autora.

Legenda: Os locais dos primers projetados para o sequenciamento são indicados na figura com setas vermelhas e cada cor representa um gene do Cluster Epsilon. Os mapas genômicos foram projetados com o pacote Karyoploter R.

Quadro 5- Primers utilizados para sequenciar os genes do Cluster Epsilon e *Defensina A* em *Ae. aegypti*.

Genes	Número de acesso VectorBase AaegL 3.5	Tamanho do fragmento (pb)	Primers (Sequências 5'-3')
<i>GSTE1</i>	AAEL007954	~824	<i>GSTE1F</i> ATGGGCAAATCAAACCTC <i>GSTE1R</i> CTATTTGCTCTTATTTCCCTC
<i>GSTE2</i>	AAEL007951	~1233	<i>GSTE2C1F</i> ATGACGAAGCTCATTTTG <i>GSTE2C1R</i> TTATGCCTTTTGAGCATTG <i>GSTE2C2F</i> ACCATTTGTGAAGCTTTTTGC <i>GSTE2C2R</i> GCTTCACAAATGGTCAAGTATTCA
<i>GSTE3</i>	AAEL007947	~725	<i>GSTE3F</i> ATGTCCCCCATTACGTTG <i>GSTE3R</i> TCATTTCTTCTTGTTTTCTTCC
<i>GSTE4</i>	AAEL007962	~815	<i>GSTE4F</i> ATGGGAAAAGTTCAAACCTC <i>GSTE4R</i> TTAATTCTTCCCGGC
<i>GSTE5</i>	AAEL007964	~795	<i>GSTE5F</i> ATGACCAAACCAATTGTATACACGCTCTAC <i>GSTE5R</i> TCAAGCCTTGCGAGCATTGGTCTCCATGAG
<i>GSTE6</i>	AAEL007946	~820	<i>GSTE6F</i> ATGGCCACCAACAGTC <i>GSTE6R</i> TTATTTTCAAGAAAGCTCTGTAC
<i>GSTE7</i>	AAEL007948	~724	<i>GSTE7F</i> ATGAGTTCCAAAATAGTGCTG <i>GSTE7R</i> TTATTTCTTATTGTTTTCATCCAG
<i>GSTE8</i>	AAEL007955	~853	<i>GSTE8F</i> ATGTCCAAACCGGTGCTG <i>GSTE8R</i> CTATTTTTTTCATTACAGCATGAAGTCTC
<i>DEFENSINA A</i>	AAEL003841	~361	<i>DEFAF</i> GTCATTTGTTTCTGGCTCTGTG <i>DEFAR</i> TCAATTCCGGCAGACGCAC

Fonte: A autora

7.3 Análise transcriptômica de RecR e RecL por sequenciamento de nova geração (RNAseq)

Foi investigado o transcriptoma da linhagem de *Ae. aegypti* RecR resistente ao temephos que é mantida no insetário do IAM sob pressão de seleção com o inseticida temephos, com a razão de resistência de ~250x, por meio de RNAseq. Esta abordagem buscou identificar genes diferencialmente expressos em RecR, em relação a colônia de referência, para a compreensão dos processos biológicos e caracterização das vias metabólicas que estão possivelmente envolvidos ou associados na resistência ao inseticida temephos.

7.3.1 Linhagens de *Ae. aegypti*

Foram usadas nesta etapa do estudo as linhagens de *Ae. aegypti* descritas abaixo:

- 1) Rockefeller: Linhagem de referência mundial de susceptibilidade a todos os inseticidas químicos;
- 2) RecL: Linhagem já caracterizada no item 7.1.1;
- 3) RecR: Linhagem já caracterizada no item 7.1.

7.3.2 Obtenção e preparação das amostras de RNA total

Para investigar o transcriptoma de larvas de *Ae. aegypti*, RecR e RecL, foram utilizadas 60 larvas no 4º estágio de desenvolvimento de cada linhagem. Os intestinos dessas larvas foram dissecados, separados em três *pools* de 20 larvas e armazenados em RNAlater até a extração de RNA. O RNA total foi extraído utilizando o kit RNeasy (Qiagen). Posteriormente, o material extraído foi submetido a uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% para avaliar a qualidade das amostras a partir da visualização das bandas de RNA ribossomal 28S, 18S e 5,8S. A qualidade e concentração dos RNAs totais foram determinadas por espectrofotometria usando o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific®), e com o Qubit™2000 (Thermo Scientific®). O *input* de RNA total utilizado nas etapas seguintes foi de 2 µg para cada amostra.

7.3.3 Construção das bibliotecas de cDNA

As bibliotecas de cDNA foram preparadas utilizando o kit TruSeq RNAm sample preparation v3® (Illumina). Foram seguidos os procedimentos descritos no protocolo do kit, com as seguintes etapas:

1) **Purificação e fragmentação do RNAm:** nessa etapa as moléculas de RNAm foram purificadas pela cauda poli-A, utilizando *beads* magnéticas que foram ligadas aos oligos (poly-T), com etapas de purificação, fragmentação do RNAm e preparação para a síntese de cDNA;

2) **Síntese da primeira fita de cDNA:** transcrição reversa dos RNAm que foram fragmentados no passo anterior utilizando primers hexâmeros randômicos;

3) **Síntese da segunda fita de cDNA:** o RNA molde foi removido e foi gerado um cDNA dupla fita;

4) **Adenilação da extremidade 3':** uma Adenina foi adicionada às extremidades 3' de cada fragmento *blunt* para evitar que eles se liguem uns aos outros durante a reação de ligação dos adaptadores;

5) **Ligação dos adaptadores:** os adaptadores foram ligados nas extremidades adeniladas do cDNA dupla fita, através do seu nucleotídeo complementar T, essa etapa preparou o cDNA para a hibridização na *flow-cell*;

6) **Enriquecimento dos fragmentos de cDNA dupla fita:** foi realizada uma PCR para obtenção de mais fragmentos de cDNA, para aumentar a quantidade de cDNA da biblioteca;

7) **Quantificação da biblioteca:** a quantificação da biblioteca foi realizada por RT-qPCR, utilizando o NEBNext® Library Quant Kit (New England BioLabs) e o produto da reação foi avaliado através de eletroforese para estimar o tamanho dos fragmentos de cDNA gerados. Após a quantificação, todas as amostras foram normalizadas para 17 pmol.

8) **Sequenciamento:** O sequenciamento das amostras foi realizado com MiSeq Reagent Kit v3® com 150 ciclos (Illumina) no equipamento MiSeq Sequencer® (Illumina) disponível no Núcleo de Plataforma Tecnológica (NPT) do IAM-Fiocruz-PE.

7.3.4 Processamento dos dados

As leituras obtidas tiveram sua qualidade checada pela ferramenta *FastQC* versão 0.11.5 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Esse programa oferece um conjunto de análises para cada biblioteca, as quais avaliam sua qualidade, sendo capazes de

identificar problemas na etapa da construção ou sequenciamento. A ferramenta fornece o diagnóstico sobre a qualidade das bases, quantidade de bases não identificadas, comprimento médio das sequências, identificação de sequências duplicadas ou super expressas, entre outros.

7.3.4.1 Trimagem das leituras

A trimagem das leituras foi realizada utilizando o programa para a filtragem e remoção das sequências dos adaptadores e também para eliminação das sequências de baixa qualidade identificadas em cada biblioteca. O programa *Trimmomatic* versão 0.36 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) possibilitou a retirada das sequências de baixa qualidade com *Phred* < 30 e com tamanho menor que 50 pb.

7.3.4.2 Mapeamento das leituras

O mapeamento das leituras filtradas de cada amostra, foi realizado através da ferramenta *Rsem*, utilizando como referência o genoma de *Ae. aegypti* (linhagem de Liverpool) disponível no banco de dados *online* VectorBase. Para essa etapa foram utilizados os parâmetros padrões do programa (LI; DEWEY, 2011).

7.3.4.3 Análise da expressão diferencial

A análise dos dados de RNAseq foi realizada em colaboração com Dr. Antonio Rezende coordenador da Plataforma de Sequenciamento de ácidos nucleicos de nova geração – PE, RPT01I do IAM/FIOCRUZ. O pacote R DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) foi utilizado para realizar a análise da expressão diferencial dos genes. Os genes com valor absoluto de (Log2) Fold Change (quantificação da expressão de um gene entre dois perfis diferentes utilizando o logaritmo de base 2 para fornecer uma simetria entre os dados), igual ou maior que 1,0 e com p-valor corrigido abaixo de 0,05 foram selecionados para a análise funcional de enriquecimento usando o STRINGdb (FRANCESCHINI *et al.*, 2012) e o *pathview*, que são pacotes de análise implementados no ambiente de programação R (LUO; BROUWER, 2013). O primeiro foi usado para atribuir a Ontologia do gene (GO) (<http://www.geneontology.org/>), e os termos das vias da base de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>). O segundo pacote, *pathview*, foi utilizado para mapear os DEGs

(genes diferencialmente expressos) e suas medidas de expressão diferencial para as vias KEGG enriquecidas.

Foram construídas redes de interação de proteínas a partir da lista de DEGs e visualizadas através do programa *Cytoscape* versão 3.5.1 (www.cytoscape.org) juntamente com o *plug-in* AutoAnnotate, versão 1.2 (www.baderlab.org/Software/AutoAnnotate). As redes foram agrupadas em clusters usando o algoritmo Community Cluster (GLay).

7.3.5 Validação do ensaio de transcriptoma (RNAseq) por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A validação da expressão de genes encontrados no RNAseq foi realizada por RT-qPCR. Para a realização desse experimento de validação, foram escolhidos dois genes induzidos, Citocromo P450 9J24 (CYP9J24), Glutationa-S-transferase Epsilon 2 (GSTE2) e três genes reprimidos Hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase (Metil), Metalloproteinase (Metallo) e Calreticulina (Cal).

A RT-qPCR foi realizada com o kit Quantitec SYBR Green RT-PCR (QIAGEN) na qual foram usados pares de primers específicos para todos os genes mencionados acima e dois genes de referência, *Actina* e *RPS17* (Quadro 6). Neste experimento, os RNAs utilizados foram os mesmos do experimento de RNAseq. Todas as reações de RT-PCR quantitativa foram realizadas em triplicata, no sistema de PCR em tempo real da Applied Biosystems (ABI 7500). Para cada reação foram usados: SYBR Green Master mix 1X, 0,3 µM de cada primer (*Forward* e *Reverse*), 0,2 U da enzima Transcriptase Reversa, 3 µl de cada amostra normalizada para 100 ng e H₂O para completar um volume final de 10 µl por reação.

A expressão relativa do RNAm foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A linhagem RecL foi utilizada como amostra de referência, e para avaliar as diferenças na expressão gênica por RT-qPCR entre as linhagens, diferenças estatisticamente significativas foram determinadas com o teste t de Student, com $p < 0,05$, usando o *software GraphPad Prism* versão 8.

Quadro 6- Primers utilizados para a validação do RNAseq.

Gene	ID VectorBase	ER ¹	Primers (5'-3')	Fragmento (pb)
<i>CYP9J24</i>	AAEL014613	11,74	F CAAGCAGGTCGGCGTCAAAG R CTCCAGCGCGAACCC	130
<i>GSTE2</i>	AAEL007951	3,46	F AAGATCTACGGCTGGCTGGA R TCTGCGACAGGACAACTGC	100
<i>Metil</i>	AAEL008330	0,03	F GCAAAACGGAGATCGAACACC R GTCCTGTTTTGTGATGTCCGCC	164
<i>Metallo</i>	AAEL011559	0,22	F CCGAGACCTTGACACCTG R CTCCTTCTAACATGCACTCAC	210
<i>Cal</i>	AAEL001005	0,32	F CGCGTCGGCCAAGTTC R GGTCCTTCTGGTCCACC	137
<i>Actina</i> ²	AAEL011197	-----	F CGTTCGTGACATCAAGGAAA R GAACGATGGCTGGAAGAGAG	175
<i>RPS17</i> ²	AAEL004175	-----	F AAGAAGTGGCCATCATTCCA R GGTCTCCGGGTCGACTTC	200

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: ¹ER= Expressão relativa; ² genes de referência descritos em Dzaki *et al.* (2017). GSTE2 (Glutathiona-S-transferase Epsilon 2); Metil (hexaprenyldihydroxybenzoato methyltransferase); Meta (Metalloproteinase); Cal (Calreticulina); RPS17(Proteína ribossomal S17).

8 RESULTADOS

Os resultados referentes a caracterização funcional de GSTE2 na linhagem RecR estão descritos no tópico 8.1. A análise da diversidade genética do Cluster Epsilon em populações de *Ae. Aegypti* está descrita no tópico 8.2 e os resultados relacionados com a caracterização do perfil transcriptômico de larvas da linhagem RecR resistente ao temephos estão descritos no tópico 8.3.

8.1 Caracterização funcional de GSTE2 em RecL e em RecR

Os subtópicos abaixo descrevem todos os resultados que estão relacionados com o estudo de GSTE2 na linhagem de *Ae. aegypti* RecR.

8.1.1 Perfil de susceptibilidade aos aduictidas

Os ensaios de suscetibilidade a aduictidas foram realizados para avaliar se mecanismos semelhantes podem ser responsáveis pela resistência ao temephos e piretróides, bem como a outros inseticidas químicos (DDT). Para avaliar a susceptibilidade das duas linhagens de *Ae. aegypti* RecL e RecR aos inseticidas cipermetrina, deltametrina e lambda cialotrina, aproximadamente 100 fêmeas de cada linhagem foram submetidas aos bioensaios de doses diagnósticas desses inseticidas (Tabela 1). As duas linhagens foram classificadas como susceptíveis para todos os três tipos de piretróides investigados. Foi possível observar uma mortalidade maior que 98% após 24 horas de exposição aos compostos. Os percentuais de mortalidade foram similares entre todos os mosquitos analisados.

Nossos resultados mostraram que RecR é resistente ao DDT, com uma taxa de mortalidade de 9% em 24 horas após a exposição ao inseticida (Tabela 1). Por outro lado, para RecL foi observada uma taxa de mortalidade de 86%, com fenótipo de susceptibilidade alterado. Esses ensaios foram realizados seguindo critérios estabelecidos por Davidson; Zahar (1973).

Tabela 1- Status de susceptibilidade das linhagens de *Ae. aegypti* aos inseticidas Cipermetrina, Deltametrina, λ -cialotrina e DDT.

Linhagens	Efeito nocaute (%) durante a exposição a inseticidas				Verificação final de mortalidade (%) 24 horas após o status de exposição e susceptibilidade			
	Cipermetrina	Deltametrina	λ -cialotrina	DDT	Cipermetrina	Deltametrina	λ -cialotrina	DDT
	60 min	60 min	60 min	60 min	Cipermetrina	Deltametrina	λ -cialotrina	DDT
Rockefeller	100	100	100	Não avaliado	100 (susceptível)	100 (susceptível)	100 (susceptível)	Não avaliado
RecL	100	100	100	79.5	100 (susceptível)	100 (susceptível)	100 (susceptível)	86 (susceptibilidade alterada)
RecR	100	100	100	6.9	100 (susceptível)	100 (susceptível)	100 (susceptível)	9 (resistente)

Fonte: A autora.

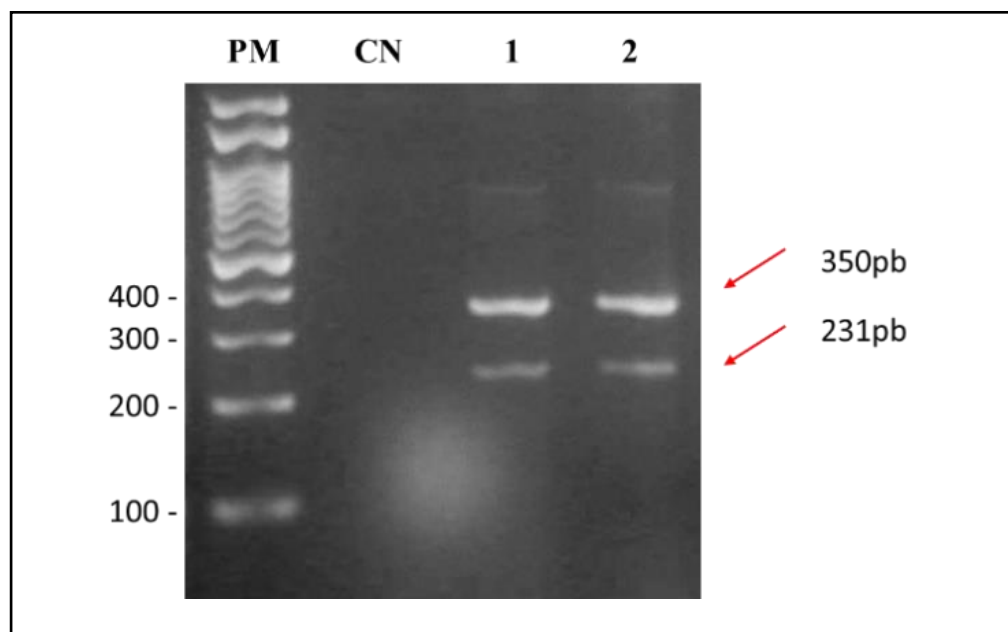
Nota: λ : lambda, min: minutos

8.1.2 Genotipagem de mutações no gene do canal de sódio (*Nav*)

O mecanismo de resistência do tipo insensibilidade do sítio alvo, foi investigado através da detecção de mutações já descritas na literatura em *Ae. aegypti*, localizadas no gene que codifica para proteína do canal de sódio (*Nav*), molécula alvo dos inseticidas piretróides. Foi realizada a genotipagem dos sítios L982W, I1011M, L1014F e V016I que estão localizados no gene *Nav*, e não foram detectados polimorfismos nesses sítios nas fêmeas de RecR e RecL.

A outra mutação estudada foi a F1534C, por meio de uma PCR diagnóstica que amplifica um fragmento do gene *Nav* localizado no exon 31. A genotipagem foi realizada diretamente através da visualização das bandas do DNA amplificado (Figura 11). Não foram detectadas mutações nessa posição.

Figura 11- Gel de agarose a 2% evidenciando a amplificação da PCR diagnóstica no gene *Nav*.



Fonte: A autora.

Legenda: PM: Peso molecular; CN (Controle negativo); 1 Homozigoto (RecL); 2 Homozigoto (RecR).

8.1.3 Atividade enzimática de GSTs totais

A investigação do mecanismo de resistência metabólica neste trabalho foi realizada por meio de ensaios enzimáticos para a GST total em larvas e adultos fêmeas de RecL e RecR utilizando o substrato CDNB (Tabela 2). A atividade enzimática para GST total na linhagem RecR foi maior nas larvas do que nas fêmeas adultas. Cerca de 81% das larvas apresentaram atividade maior do que o percentil 99% de Rock, enquanto que apenas 42% das fêmeas adultas

mostraram alterações para GST total. A linhagem susceptível RecL não mostrou modificações na atividade enzimática nem em larva nem em adultos, o que é compatível com o seu status de colônia de referência susceptível ao inseticida temephos.

Tabela 2-Atividade enzimática de GSTs total em larvas e em adultos de (RecL e RecR) usando o CDNB como substrato.

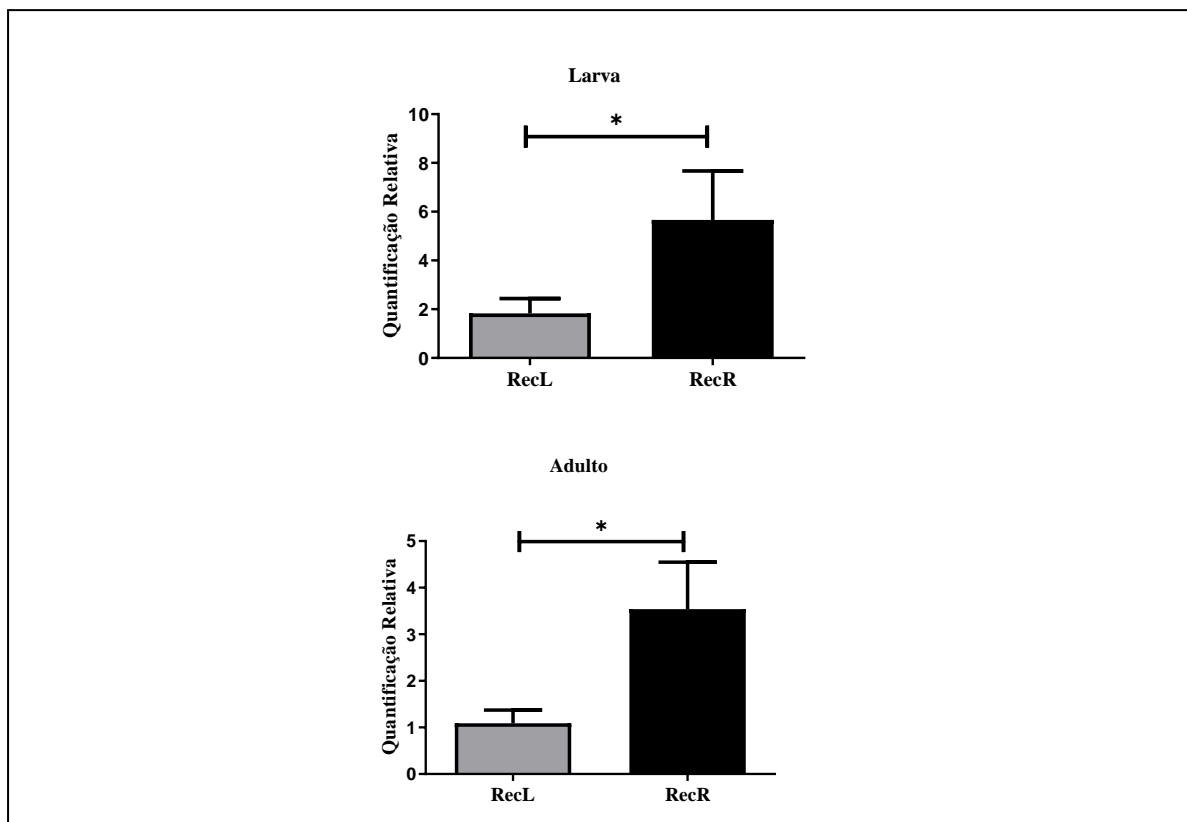
Linhagens	Número de larvas	p99 ¹	% >p99 ²	Classificação ³
Rockefeller	89	2,46	-	-
RecL	118	1,95	0	N
RecR	113	5,39	81	MA
Linhagens	Número de adultos	p99 ¹	% >p99 ²	Classificação ³
Rockefeller	70	2,84	-	-
RecL	106	2,81	0	N
RecR	78	4,37	42	A

Fonte: A autora.

Nota: ¹ Percentil 99; ² Porcentagem de indivíduos com atividade acima do percentil 99 de Rockefeller; ³ Classificação da atividade enzimática comparado com Rockefeller: N (normal), A (alterado- amarelo), MA (muito alterado- vermelho).

8.1.4 Expressão relativa de *GSTE2* em RecL e RecR

Este trabalho investigou o nível de expressão do gene *GSTE2* em RecL e em RecR na fase larvária (estádio L4) e na fase adulta (fêmeas) (Figura 12). Os resultados de quantificação relativa mostraram superexpressão do gene *GSTE2* em RecR, 6x mais expresso em larva (Whitney test; $p < 0.0002$), e 3,5x mais expresso em fêmeas dessa linhagem (Mann Whitney test; $p < 0,0006$).

Figura 12- Quantificação relativa do gene *GSTE2* em larvas e adultos em RecL e RecR.

Fonte: A autora.

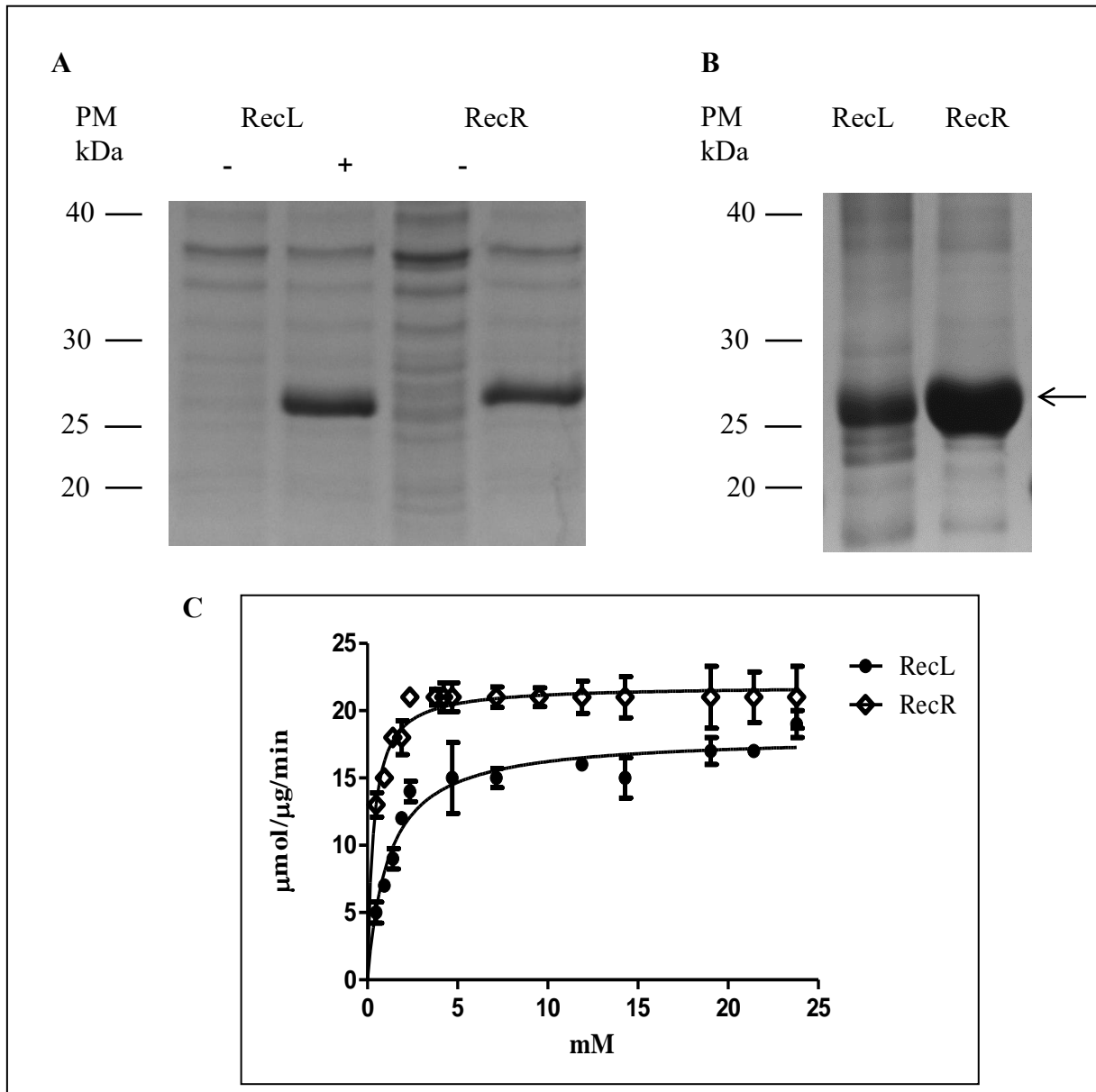
Legenda: O gene de referência *rpL8* foi utilizado para normalização. As barras indicam desvio padrão, o * indica resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,0005$).

8.1.5 Caracterização das propriedades cinéticas de GSTE2RecL, GSTE2RecR

Para avaliar as diferenças funcionais entre os dois alelos do gene *GSTE2* aqui identificados, os genes *RecL* e *RecR* de *GSTE2* foram subclonados no vetor de expressão bacteriano e as correspondentes proteínas recombinantes expressas em *Escherichia coli*. As proteínas recombinantes de ambas as linhagens exibiram um perfil de migração de ~ 26 kDa que é consistente com o seu peso molecular previsto (Figura 13a).

As diferenças na solubilidade entre as duas proteínas de *GSTE2* foram claramente visíveis após a lise bacteriana e purificação das proteínas, com rendimento de purificação para *GSTE2RecR* repetidamente maior do que *GSTE2RecL*, com a maior parte permanecendo no sedimento bacteriano insolúvel. Para o experimento mostrado na Figura 13b, por exemplo, realizado em paralelo para ambas as proteínas, o rendimento para *GSTE2RecR* foi de 2,4 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$, enquanto que para *GSTE2RecL* foi de 0,3 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$.

Para comparar os parâmetros cinéticos de GSTE2RecL, com GSTE2RecR, as proteínas recombinantes foram diluídas em concentrações idênticas e submetidas a ensaios bioquímicos para avaliar sua atividade catalítica. Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando concentrações fixas de GSH (10 mM) e concentrações crescentes de CDNB até o ponto de saturação (0,4 a 25 mM). GSTE2RecR apresentou maior atividade catalítica em relação a GSTE2RecL, bem como maior afinidade de ligação para o substrato CDNB, uma vez que o valor de K_m foi três vezes menor que o determinado para GSTE2RecL (Figura 13, 14 e tabela 3). Além disso, a GSTE2RecR alcançou o maior V_{max} . GSTE2RecR metaboliza uma quantidade maior de substrato do que a GSTE2RecL no mesmo período de tempo (Figura 13c). A eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) foi maior em GSTE2RecR em relação a GSTE2RecL (Tabela 3).

Figura 13- Avaliação molecular e bioquímica das proteínas recombinantes GSTE2 das linhagens RecL e RecR.

Fonte: A autora.

Nota: As proteínas foram expressas em *Escherichia coli* como fusões marcadas com cauda de histidina, purificadas por cromatografia de afinidade, separadas em SDS-PAGE a 15% e visualizadas com coloração azul de coomassie em gel.

Legenda: (A) sem IPTG (-) e com IPTG (+). (B) Purificação de proteínas SDS-PAGE. A seta indica que as proteínas RecL e RecR GSTE2 foram eluídas. (C) Cinética enzimática das proteínas recombinantes RecL e RecR.

PM: Peso Molecular. kDa: Kilo Dalton. As barras indicam o desvio padrão.

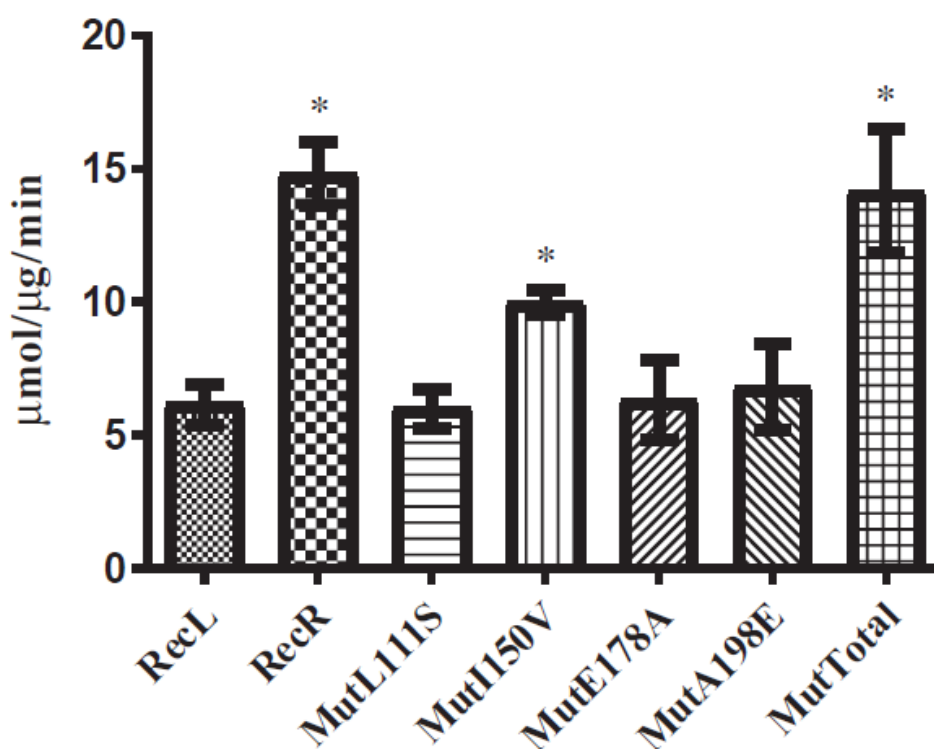
8.1.6 Identificação de aminoácidos responsáveis por diferenças na atividade catalítica

Para avaliar o papel das substituições encontradas em GSTE2RecR no desempenho da enzima, foram gerados cinco tipos de proteínas mutantes (MutL111S, MutI150V, MutE178A, MutA198 e MutTotal) através do processo de mutagênese sítio dirigida no gene RecL de

GSTE2. Os aminoácidos mutados foram escolhidos com base nas quatro substituições únicas encontradas na GSTE2RecR. A proteína mutante MutTotal foi produzida contendo todas as quatro mutações de GSTE2RecR introduzidas no alelo RecL para que as diferenças entre as proteínas RecL e mutante fossem apenas a substituição V172E.

As proteínas mutadas não exibiram diferenças no perfil de expressão e tamanho molecular e migraram com o mesmo peso molecular (dado não apresentado). Todas as proteínas mutantes mostraram atividade catalítica, embora variações tenham sido detectadas para parâmetros cinéticos (Figura 14 e tabela 3). A proteína MutI150V apresentou menor K_m , maior V_{max} e maior eficiência catalítica do que as outras três proteínas mutantes (L111S, E178A, A198E) (Tabela 3). Porém, apesar da proteína MutI150V apresentar parâmetros cinéticos diferentes e uma eficiência catalítica aprimorada em relação aos outros três mutantes de resíduos únicos, os valores dos parâmetros cinéticos, sobretudo a eficiência catalítica ainda foi menor do que os valores encontrados na MutTotal e GSTE2RecR. Os dados de cinética enzimática da proteína MutTotal foram semelhantes aos valores encontrados em GSTE2RecR.

Figura 14- Atividade catalítica para GSTE2 em *Ae. aegypti*.



Fonte: A autora.

Nota: A atividade da GST contra o CDNB foi determinada na presença de CDNB 1 mM e GSH 9,5 mM. Os experimentos foram conduzidos a 25 °C em tampão de fosfato de potássio a 90 mM, pH 6,5. Três ensaios independentes foram realizados.

Legenda: As barras indicam desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas foram avaliadas com o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,0001$ indicado por *).

Tabela 3- Parâmetros cinéticos calculados para as diferentes proteínas de GSTE2.

GSTE2	V_{max} (μmol/min/μg)	K_m (mM)	K_{cat} (s⁻¹)	K_{cat}/K_m (mM⁻¹ s⁻¹)
RecL	18,13±0,622	1,176±0,188	30,5	26,29
RecR	21,85±0,301	0,3241±0,038	36,41	113,78
MutL111S	19,49±0,818	1,269±0,218	32,48	25,59
MutI150V	18,08±0,449	0,5491±0,084	30,13	54,87
MutE178A	17,94±0,572	1,117±0,163	29,9	26,76
MutA198E	18,83±0,670	1,243±0,199	31,38	25,24
MutTotal	21,24±0,286	0,3542 ±0,044	35,8	100,0

Fonte: A autora.

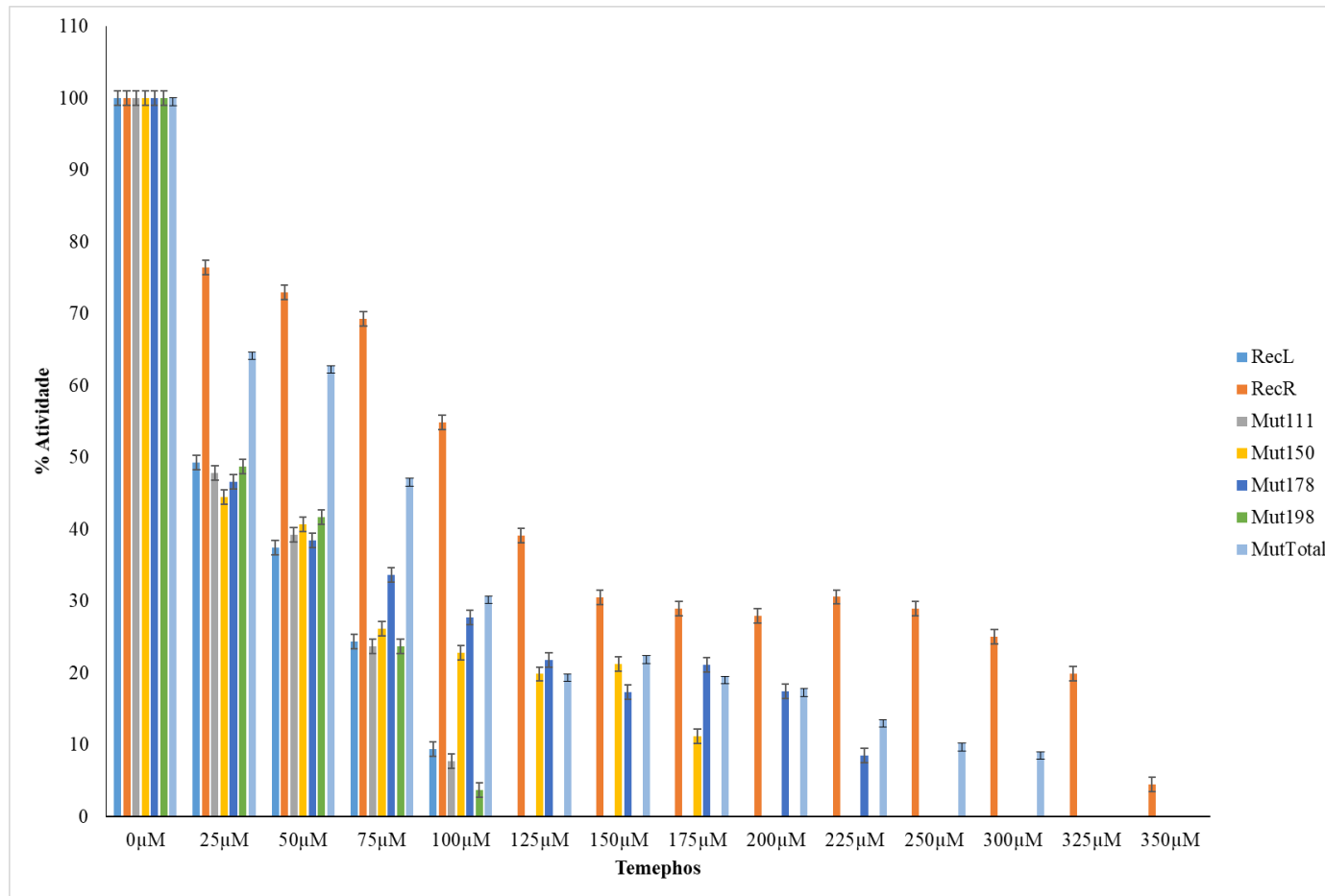
Nota: Os estudos cinéticos foram determinados variando a concentração de CDNB (0,4 a 25 mM) em concentração fixa de GSH (9,5 Mm). Resultados mostram média ± SE.

8.1.7 Inibição enzimática

Neste estudo foi avaliada a atividade enzimática das enzimas recombinantes GSTE2RecR, GSTE2RecL e mutantes com a adição do temephos agindo como inibidor. Foram utilizadas concentrações crescentes do inseticida até a inibição total da atividade catalítica de cada proteína. O gráfico mostrado na figura 15 ilustra a porcentagem de atividade enzimática para as sete proteínas de GSTE2s em frente ao aumento na concentração do temephos, os dados indicados são referentes a média de três ensaios realizados de forma independente junto com os seus respectivos desvios padrão.

Os resultados mostraram que o temephos foi capaz de inibir a atividade enzimática de GSTE2. De acordo com esses resultados, foi possível observar que GSTE2 RecL, MutL111S, MutE198A apresentaram perfis similares, pois foram 100% inibidas em 110 μM de temephos, para a proteína mutante MutI150V a inibição total ocorreu com concentração de aproximadamente 200 μM de temephos, para a MutE178A a dose foi de 250 μM de temephos. Em GSTE RecR os resultados de inibição da atividade foram bem diferentes, foi necessário um aumento em torno de 4x na concentração do temephos em comparação com GSTE RecL para perda de 100% da atividade. Os resultados de inibição obtidos pela proteína mutante MutTotal foram similares a GSTE RecR.

Figura 15- Porcentagem de atividade enzimática de GSTE2 recombinantes na presença do inibidor temephos.



Fonte: A autora.

Legenda: As barras indicam desvio padrão da média.

A curva dose resposta do inibidor para a determinação da IC₅₀ por regressão não linear foi construída para as proteínas estudadas e a tabela 4 exibe os valores de IC₅₀ para todas as sete proteínas. Embora GSTE2RecL, MutL111S, MutI150V, MutE178A e MutE198A tenham apresentado perfis de inibição enzimática distintos conforme foi visualizado no gráfico da figura 15, referentes as concentrações de temephos para inibição total da atividade enzimática de GSTE2 recombinantes, os valores de dose de temephos que inibe 50% da atividade enzimática foram semelhantes, cerca de 20 µM de temephos. Os valores de IC₅₀ de GSTE2RecR e a mutante MutTotal foram similares, 97 e 91 µM de temephos respectivamente, essas doses foram cinco vezes maiores do que as IC₅₀ da proteína recombinante susceptível, e altas o suficiente para inibir 100% da atividade das proteínas mutantes GSTE2RecL, MutL111S e MutE198A.

Tabela 4- Valores de IC₅₀ de temephos com atividade de inibição sobre GSTE2 recombinantes.

GSTE2	IC₅₀ (µM)¹	r²
RecL	20,46 ± 7,48	0,95
RecR	97,52 ± 10,56	0,96
MutL111S	18,01 ± 8,6	0,95
MutI150V	18,63 ± 6,05	0,96
MutE178A	20,47 ± 6,15	0,97
MutA198E	19,12 ± 7,21	0,94
MutTotal	91,73 ± 7,48	0,98

Fonte: A autora

Nota: ¹IC₅₀: Concentração do inseticida temephos capaz de 50% de atividade enzimática.

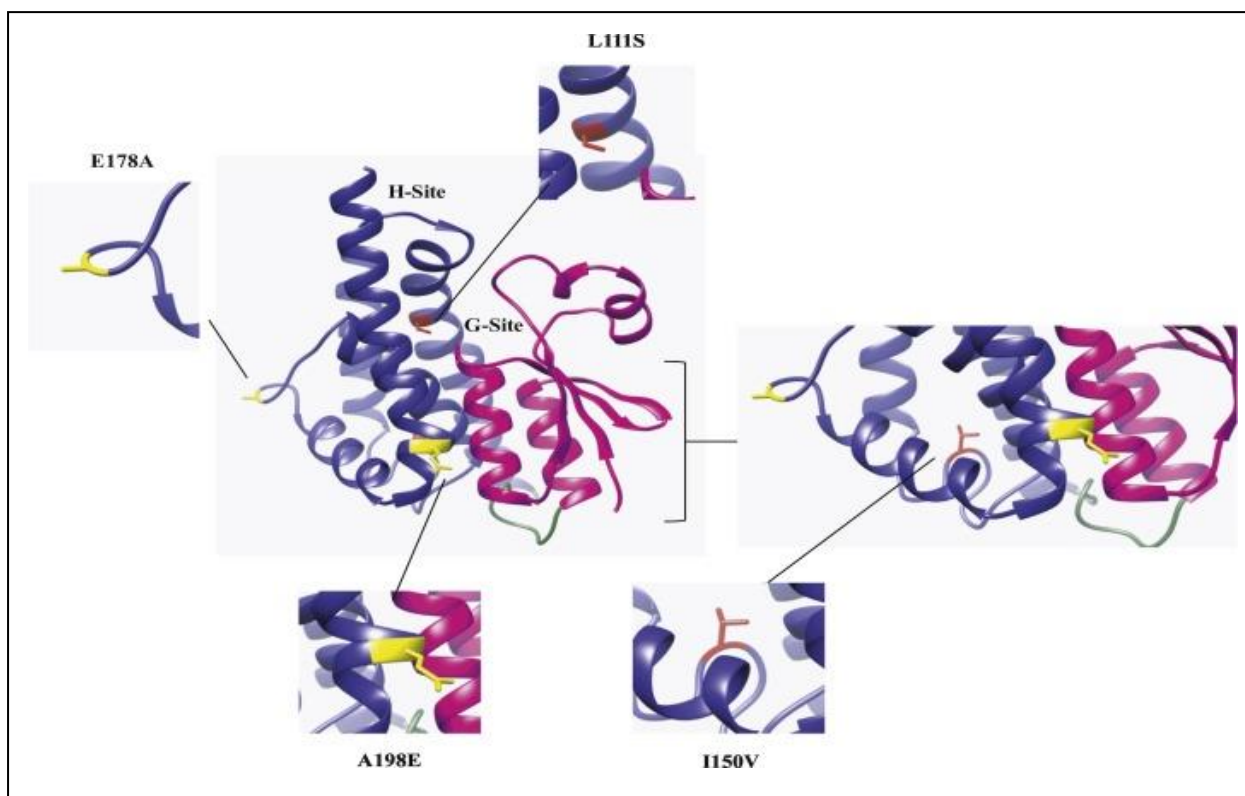
8.1.8 Modelagem *in silico* de GSTE2RecL e GSTE2RecR

A modelagem *in silico* foi realizada para investigar os possíveis impactos das mutações presentes em RecR (S111L, I150V, E178A, A198E) na sua estrutura proteica. A modelagem foi realizada com base em GSTE2 de *An. gambiae* (WANG *et al.*, 2008), que é estruturada em dois domínios, um domínio N-terminal menor (resíduos 1-79) e o maior C-terminal (resíduos 90-221) separado por um *linker* curto. Na GSTE2 de *An. gambiae*, tanto a glutathiona como o substrato da enzima ligam-se a uma fenda encontrada entre os dois domínios. O local de ligação da glutathiona (sítio G) envolve os resíduos H53, I55, E67, S68 e R112, enquanto o local de ligação ao substrato (sítio H) foi proposto como sendo um bolso hidrofóbico, provavelmente

dependente de diferentes resíduos, localizado nos dois domínios da proteína: L9, L11, S12, P13, P14, L36, L37, H41, I55, F108, M111, F115, L119, F120, L207 e F210. Em geral, os polipeptídios modelados apresentaram estruturas satisfatórias com torsão de ângulo bem definida nas parcelas do diagrama de Ramachandram. Além disso, 95, 50 e 83,33% dos resíduos apresentaram pontuação $\geq 0,2$ no perfil 3D / 1D na análise de verificação da estrutura 3D para os polipeptídios resistentes.

Os quatro resíduos exclusivos de aminoácidos mutados na GSTE2RecR estão todos localizados dentro do domínio C-terminal, com somente o resíduo L111 conhecido por fazer parte do pocket de ligação ao substrato (Figura 16).

O resíduo E178A está localizado na superfície externa da proteína e está localizado em uma alça não estruturada, enquanto A198E localiza-se dentro de uma das várias alfas hélices e também está voltado externamente. O resíduo I150V, cuja substituição impactou a atividade catalítica da enzima, também é encontrado em um *loop*, mas posicionado para face interna da proteína. Embora não tenham sido observadas alterações importantes na estrutura do modelo, comparando susceptíveis com modelos GST resistentes, L111S alterou a orientação do seu aminoácido adjacente R112 na proteína resistente. Essa mudança está localizada no bolso catalítico de GSTE2 como descrito para *An. gambiae* e poderia ter algum impacto na atividade catalítica desta enzima em *Ae. aegypti*, embora a avaliação feita neste trabalho não tenha demonstrado.

Figura16- Modelagem 3D da proteína GSTE2 resistente de RecR e localização das mutações específicas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: O modelo resistente é destacado por estruturas 2D alfa hélice, folha beta e loops como segue: domínio N-terminal - rosa; Domínio C-terminal - luz azul escuro. Sítio- H: Bolso de ligação DDT putativo; Sítio-G: local de ligação a GSH. Os átomos são mostrados nas quatro posições onde as mudanças de aminoácidos ocorreram e são coloridas em amarelo e vermelho.

8.2 Análise da diversidade genética do Cluster Epsilon em populações de *Ae. Aegypti*

Os subtópicos abaixo descrevem todos os resultados que estão relacionados com o estudo da diversidade genética do Cluster Epsilon em populações naturais do mosquito.

8.2.1 Análise das sequências

No estudo foi possível amplificar os oito genes do Cluster Epsilon em todas as populações analisadas, porém os números de sequências após avaliação da qualidade das sequências e exclusão daquelas com baixa qualidade, variaram conforme a população e conforme o gene (Quadro 7). Os genes estudados apresentaram tamanho esperado, conforme alinhamento com a sequência de referência Liverpool AegL 3.5 que está disponível no VectorBase.

Apenas mutações do tipo substituição de bases foram encontradas. Nenhuma mutação *indell* (adição ou deleção) foi detectada na região codificadora. Foram observadas substituições sinônimas e não sinônimas em todos os genes, com pelo menos uma troca de aminoácido. Somente em *GSTE6* foi visualizada uma mutação do tipo *nonsense*, uma troca de base na posição G538A, que gerou um códon de parada prematuro (TAA), formando uma proteína truncada de apenas 180 aminoácidos (Figura 17).

Para o cluster Epsilon, as três linhagens do estudo RecL, RecR e RecRev apresentaram polimorfismos em comparação com a linhagem de referência de *Ae. aegypti* de Liverpool. As sequências dos oito genes de GST Epsilon da colônia susceptível ao temephos RecL e de RecRev, linhagem que sofreu reversão total da resistência ao inseticida foram idênticas entre si, e similares a linhagem de referência Liverpool. Por outro lado, RecR apresentou polimorfismos exclusivos para todo o cluster Epsilon. Os indivíduos das populações de Arcoverde, Caruaru e Águas Belas apresentaram 100% das sequências idênticas em toda a região gênica (exons e íntrons) e idênticas as sequências do cluster de RecR. Já no arquipélago de Fernando de Noronha os genes foram todos polimórficos e com padrões bem característico, polimorfismos compartilhados com as linhagens susceptível RecL e polimorfismos compartilhados com a linhagem resistente RecR (Figura 17).

Diante desses resultados, foram adicionadas ao trabalho populações do mosquito de outras localidades, populações continentais, Macapá e Bacabal e também uma população insular localizada em Cabo Verde, a cidade de Porto Novo, o objetivo proposto foi investigar se essas sequências gênicas apresentavam o mesmo padrão encontrado em Pernambuco. Para Macapá e Bacabal as sequências também foram idênticas as populações continentais de Pernambuco, e em Porto Novo, foram identificados alelos compartilhados com Fernando de Noronha e diversos alelos exclusivos.

O monomorfismo nas sequências do cluster Epsilon identificados em todas as populações continentais do vetor levantou o questionamento se essa característica era inerente dessas populações, ou seja, se os indivíduos apresentavam baixa variabilidade genética ou se a fixação desses alelos observada em todos os oito genes foi em decorrência de um processo de pressão de seleção exercido no habitat da espécie.

Para auxiliar no entendimento desses achados, foi adicionado no estudo o gene Defensina A. A sua escolha foi baseada em aspectos já mencionados no tópico de procedimentos metodológicos, e que são imprescindíveis para as análises dos resultados. Os resultados obtidos para o gene *Defensina A* foi inteiramente distinto ao que foi encontrado para

o cluster Epsilon. O gene *Defensina A* foi amplificado em todos os mosquitos analisados, produzindo um fragmento de 361 pares de bases. O alinhamento das 87 sequências geradas do gene contra a linhagem de referência Liverpool revelou a presença de polimorfismo nos indivíduos de todas as sete populações e nas três linhagens analisadas, ressaltando que esses indivíduos consistiram nos mesmos utilizados para o estudo de diversidade do cluster Epsilon. Foram identificadas mutações sinônimas e não sinônimas e também foi observado o compartilhamento de alelos entre as três linhagens de *Ae. aegypti* com as populações naturais do mosquito, bem como a presença de alelos únicos nessas populações, sobretudo na população de Porto Novo, de maneira geral, o gene *Defensina A* foi polimórfico para todas as populações do mosquito.

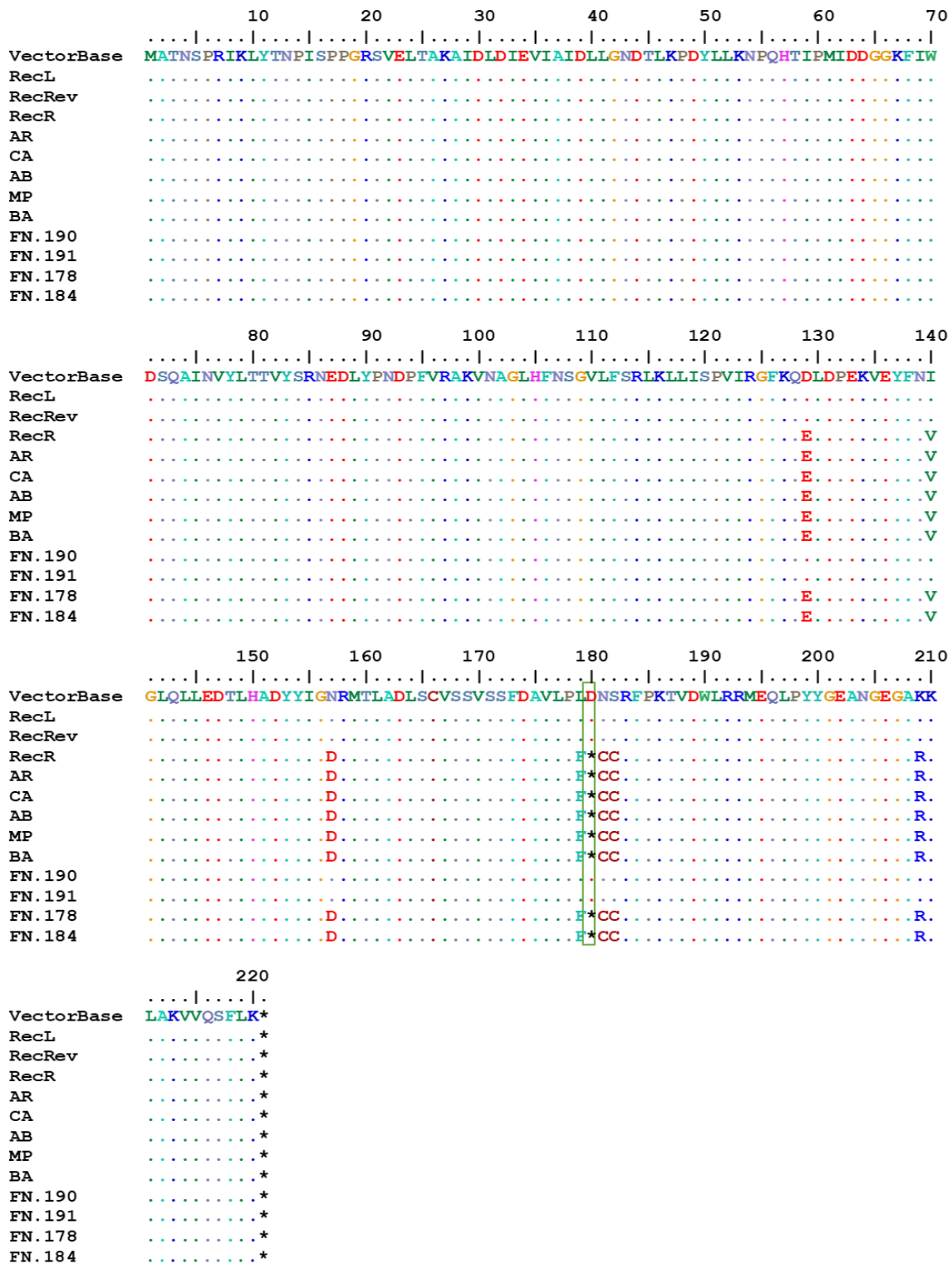
Quadro 7- Número de sequências utilizadas no estudo de diversidade genética do Cluster Epsilon e da defensina em populações naturais e linhagens de *Ae. aegypti*.

AMOSTRAS	<i>GSTE1</i>	<i>GSTE2</i>	<i>GSTE3</i>	<i>GSTE4</i>	<i>GSTE5</i>	<i>GSTE6</i>	<i>GSTE7</i>	<i>GSTE8</i>	DEF. A
RecL	5	5	5	5	5	5	5	5	5
RecRev	5	5	5	5	5	5	5	5	5
RecR	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Arcoverde	50	44	43	49	49	45	48	44	10
Caruaru	48	36	44	48	40	41	43	43	8
Águas Belas	43	38	49	39	43	39	46	46	10
F. Noronha	41	36	22	19	20	47	45	47	9
Macapá	10	8	10	10	9	10	10	10	10
Bacabal	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Porto Novo (CV)	22	15	24	19	9	17	25	19	15
Total de sequências	239	202	217	209	195	224	242	234	87

Fonte: A autora.

Legenda: DEF.A = Defensina A.

Figura 17- Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas de GSTE6 em *Ae. aegypti*.



Fonte: A autora.

Legenda: AR (Arcoverde); CA (Caruaru); AB (Águas Belas); MP (Macapá); BA (Bacabal); FN (Fernando de Noronha). D (Aspartato); E (Ácido glutâmico); F (Fenilalanina); C (Cisteína); Stop códon (*).

8.2.2 Índices de diversidade genética

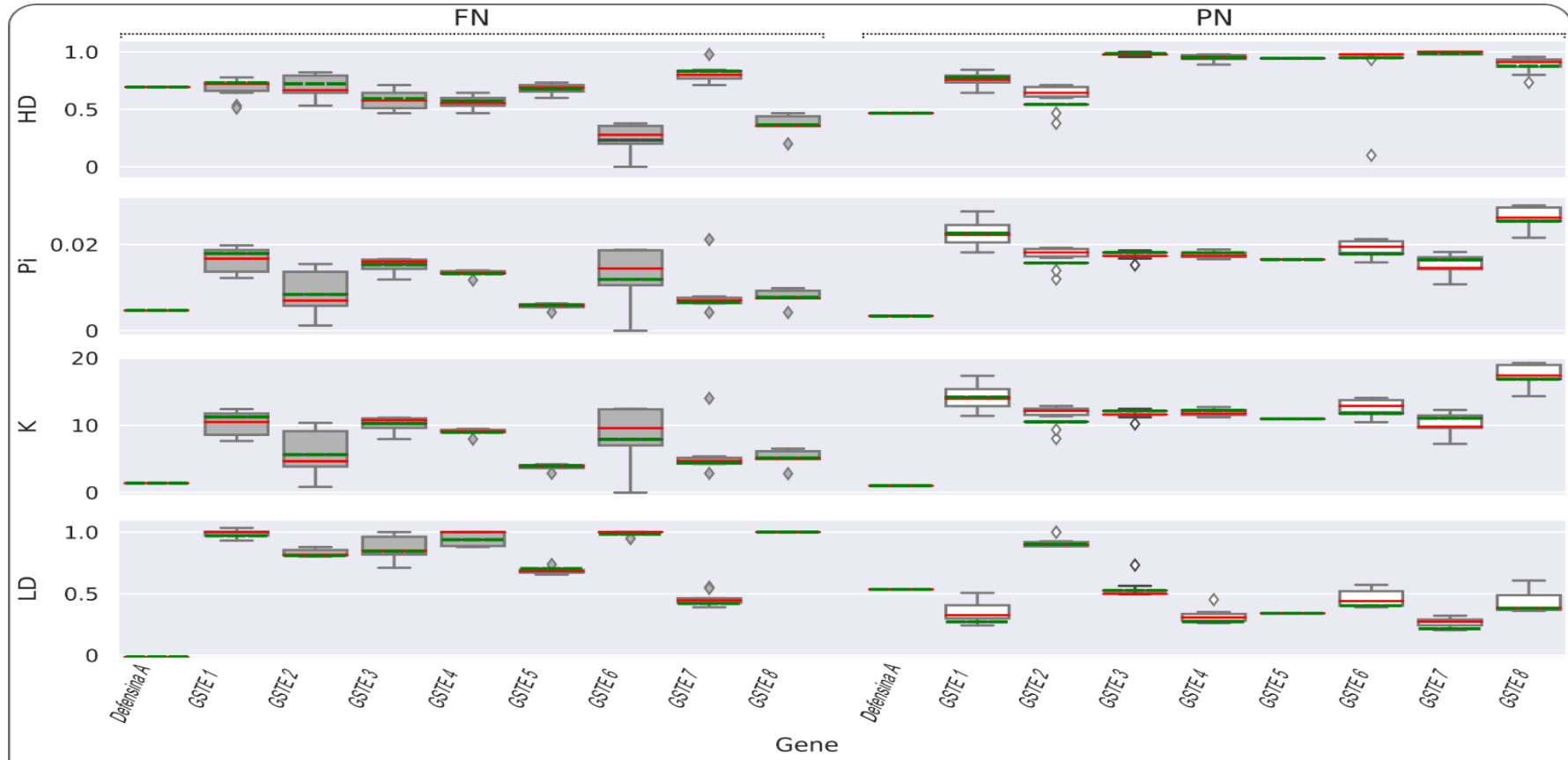
A diversidade genética do Cluster Epsilon em populações naturais de *Ae. aegypti* com diferentes perfis de susceptibilidade ao inseticida temephos foi estimada através dos resultados dos parâmetros genéticos calculados com o *software DnaSP*. Essas análises foram realizadas somente com as populações de campo e com a região codificadora de cada gene, as sequências de cada gene foram manualmente editadas e as regiões de íntrons foram excluídas.

Os índices de diversidade genética só foram calculados para as duas populações insulares que apresentaram polimorfismos, Fernando de Noronha e Porto Novo (Tabela 5). Os dados foram analisados de duas formas: 1- com todos os indivíduos de cada população por gene e 2- com os valores obtidos da média dos 10 *subsets* de sequência gênicas (construídas randomicamente) de cada população por gene. Os resultados dessas duas análises estão exibidos no gráfico da figura 18. A linha vermelha representa o resultado de diversidade feita pela primeira forma e em verde o resultado de diversidade obtido pela média dos *subsets*. Os valores encontrados pelos dois tipos de análise foram bem similares, não identificamos discrepância de valor em nenhum dos quatro parâmetros, sendo assim, foi escolhido a segunda opção pela padronização do número de sequências.

O número de sítios polimórficos entre os diferentes haplótipos (S), o número de haplótipos encontrados nas diferentes populações (h), a diversidade haplotípica (H_d), a média do número de nucleotídeos diferentes (k) e a diversidade nucleotídica (π), desequilíbrio de ligação (LD) para o cluster Epsilon estão descritos na Tabela 5.

O número de sítios polimórficos e o número de haplótipos foi maior em Porto Novo. Em Fernando de Noronha, a H_d variou de 0.26 a 0.8, com valor menor para *GSTE6* e maior para *GSTE7*, a diversidade nucleotídica (π) foi baixa para todos os genes (0.005-0.016). Nessa população, apenas *GSTE5* e *GSTE7* não apresentaram desequilíbrio de ligação (LD), para os outros genes, o r^2 foi próximo de 1, indicando forte desequilíbrio de ligação. Os testes de desvio de neutralidade significativos foram todos positivos. O teste de Tajima foi estatisticamente significativo em *GSTE3* e *GSTE4*. Os testes Fu e Li D* e Fu e Li F* foram significativos em *GSTE1*, *GSTE3* e *GSTE4*. E para o gene *GSTE5* apenas para Fu e Li F* foi significativo. Em Porto Novo, a diversidade haplotípica foi alta (0.7 a 0.99) e a diversidade nucleotídica (π) também foi baixa (0.005 – 0.026). Somente o gene *GSTE2* apresentou desequilíbrio de ligação, ($r^2 = 0.905$). Os testes de neutralidade não mostraram desvio significativo da expectativa neutra, com exceção de *GSTE5*, que foi positivo e estatisticamente significativo apenas para Fu e Li F*.

Para o gene Defensina A, os índices de diversidade genética foram calculados para as sete populações do estudo (Tabela 6). A diversidade haplotípica (H_d) foi moderada em cinco localidades, variando de (0.69 a 0.8), e baixa em Águas Belas ($H_d = 0.356$) e Porto Novo ($H_d = 0.467$). A diversidade nucleotídica foi muito baixa em todos os indivíduos analisados (0.00121 – 0.00524). Diferente dos genes do Cluster Epsilon, nenhuma população apresentou desequilíbrio de ligação e os testes de neutralidade aplicados não foram significativos.

Figura 18- Valores estatísticos de diversidade genética de GST Cluster Epsilon de *Ae. aegypti* das populações de Fernando de Noronha e Porto Novo.

Fonte: A autora.

Legenda: FN: Fernando de Noronha; PN: Porto Novo; Linhas verdes representam valores de referência baseados na análise de todos os indivíduos por população. Linhas vermelhas representam a média de cada subconjunto de valores populacionais. As barras indicam desvio padrão da média.

Tabela 5-Parâmetros de diversidade genética e testes de neutralidade dos genes do Cluster Epsilon em populações de *Aedes aegypti*.

	<i>GSTE1</i>			<i>GSTE2</i>			<i>GSTE3</i>			<i>GSTE4</i>		
	PC	FN	PN	PC	FN	PN	PC	FN	PN	PC	FN	PN
S	0	23	53	0	23	27	0	21	27	0	17	28
h	1	4	7	1	5	4	1	4	18	1	3	12
Hd	0	0.68	0.75	0	0.7	0.61	0	0.58	0.98	0	0.56	0.94
π/K	0 (0)	0.016/10.29	0.022	0(0)	0.0089/5.95	0.016/11.57	0 (0)	0.015/10.21	0.017/11.86	0 (0)	0.013/9.03	0.017/11.89
LD	NC	0.98	0.34	NC	0.83	0.905	NC	0.86	0.543	NC	0.95	0.314
D	NC	1.32	0.289	NC	-0.52	1.21	NC	2.034*	1.37	NC	2.34*	0.052
D*	NC	1.57*	-0.15	NC	-0.41	1.14	NC	1.51*	1.11	NC	1.53*	1.21
F*	NC	1.41*	-0.244	NC	-0.508	1.314	NC	1.85*	1.32	NC	1.95*	1.44
	<i>GSTE5</i>			<i>GSTE6</i>			<i>GSTE7</i>			<i>GSTE8</i>		
	PC	FN	PN	PC	FN	PN	PC	FN	PN	PC	FN	PN
S	0	8	24	0	35	34	0	11	37	0	14	48
h	1	3	27	1	3	13	1	11	21	1	2	10
Hd	0	0.68	0.94	0	0.26	0.97	0	0.806	0.99	0	0.37	0.886
π/K	0 (0)	0.005/3.78	0.0016/10.94	0 (0)	0.013/8.95	0.019/12.73	0 (0)	0.008/5.39	0.015/10.27	0 (0)	0.007/5.22	0.026/17.57
LD	NC	0.68	0.34	NC	0.98	0.45	NC	0.449	0.26	NC	1	0.42
D	NC	1.108	2.48*	NC	-0.94	0.56	NC	0.81	-0.156	NC	0.25	0.69
D*	NC	1.32	0.94	NC	-0.23	0.72	NC	0.69	0.04	NC	1.12	0.64
F*	NC	1.52*	1.12	NC	-0.44	0.74	NC	0.807	0.004	NC	1.02	0.74

Fonte: A autora.

Nota: PC, Populações continentais; FN, Fernando de Noronha; PN, Porto Novo; S, número de sítios polimórficos; *h*, haplótipos; Hd, diversidade haplotípica; π , diversidade nucleotídica; k, número médio de diferenças nucleotídica; LD, Desequilíbrio de ligação; D, teste de Tajima; D* teste de Fu e Li D e F* teste de Fu e Li F; NC, não calculado; * estatisticamente significativo.

Tabela 6- Parâmetros de diversidade genética e testes de neutralidade do gene DEFENSINA A em populações de *Ae. aegypti*.

	Arcoverde ¹	Caruaru ¹	Águas Belas ¹	Fernando de Noronha	Bacabal ¹	Macapá ¹	Porto Novo
S	4	4	1	5	4	3	6
h	4	5	2	4	4	4	4
Hd	0.733	0.806	0.356	0.694	0.778	0.73	0.467
π /K	0.0046/1.37	0.0052/1.55	0.0012/0.35	0.0047/1.38	0.0043/1.28	0.0043/1.28	0.0034/1.01
LD	NC	0.055	NC	0.0281	0.0396	0.0059	0.0485
D	-0.0982	0.23146	0.0149	-1.037	-0.3395	0.77	-1.5855
D*	-0.338	0.503	0.804	-1.239	-0.338	0.174	-1.956
F*	-0.313	0.487	0.684	-1.325	-0.379	0.358	-2.12

Fonte: A autora.

Nota:¹, Populações continentais; S, número de sítios polimórficos; h, haplótipos; Hd, diversidade haplotípica; π , diversidade nucleotídica; k, número médio de diferenças nucleotídicas; LD, Desequilíbrio de ligação; D, Teste de Tajima; D* e F* teste de Fu e Li; NC, não calculado;* estatisticamente significativo

8.2.3 Rede de Haplótipos

As redes de haplótipos foram inferidas por três métodos distintos: MSN, MJN e TCS. Foi possível observar que as redes geradas pelos três métodos apresentaram organização similares entre si (Figura 19), sendo assim, o método TCS foi selecionado para a construção das redes de haplótipos por atualmente ser o mais utilizado.

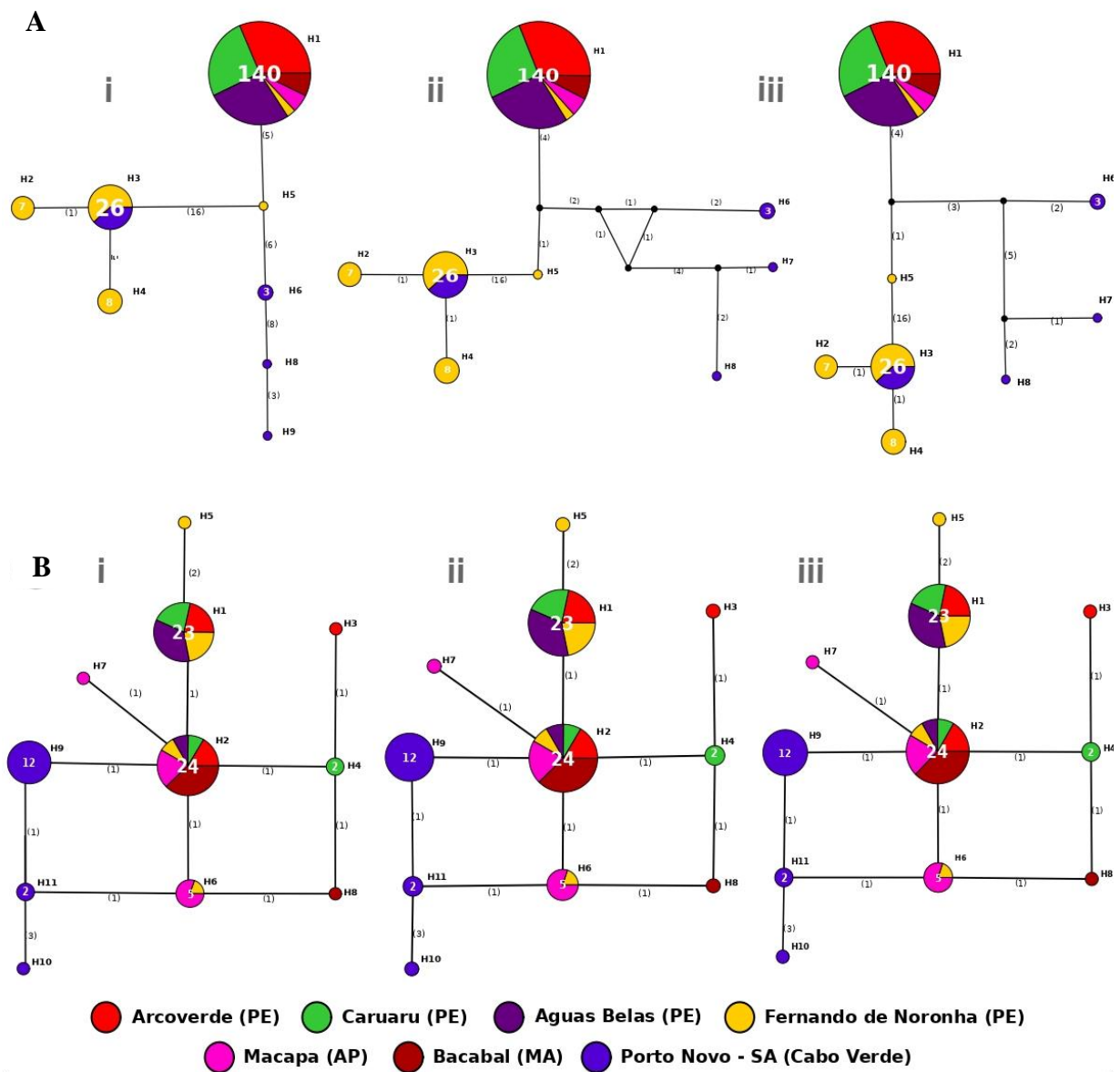
No Cluster Epsilon, o número de haplótipos (H) variou conforme o gene. A figura 20a e 20b ilustra a rede de haplótipos dos genes *GSTE2* e *GSTE3*, a figura 21 mostra as redes de haplótipos dos genes (*GSTE1*, *GSTE4*, *GSTE5*) e a figura 22 exibe as redes de haplótipos dos genes (*GSTE6*, *GSTE7* e *GSTE8*).

O haplótipo H1, foi o mais frequente e englobou todas as populações brasileiras do vetor (Figuras 20, 21 e 22). Esses resultados mostram que há fluxo gênico entre as populações continentais de *Ae. aegypti* de Pernambuco com a de Fernando de Noronha. Entretanto, Fernando de Noronha também possui haplótipos únicos e também haplótipos compartilhados com Porto Novo (Figura 20, 21 e 22). Estas duas populações compartilham haplótipos em 4 genes do cluster Epsilon *GSTE1*, *GSTE2* (Figuras 30 e 31), *GSTE6* e *GSTE8* (Figura 22). É possível observar que para esses genes, a proporção de indivíduos de Fernando de Noronha que compartilharam haplótipos com a população de Porto Novo foi maior em relação a proporção de indivíduos de Fernando de Noronha que compartilharam haplótipos com o continente.

Porto Novo apresentou uma alta variedade de haplótipos únicos e exclusivos para os oito genes do Cluster Epsilon condizente com as análises de diversidade (Figuras 20, 21 e 22). Porto Novo não compartilhou nenhum haplótipo com as populações continentais de *Ae. aegypti*, as distâncias entre indivíduos dessas populações foram de muitos passos mutacionais.

Para o gene *Defensina A*, foram identificados 11 haplótipos, próximos entre si, com distância de um ou dois passos mutacionais (Figura 20c). O H2 foi o haplótipo mais frequente, estando presente em seis populações, Arcoverde, Caruaru, Águas Belas, Fernando de Noronha, Macapá e Bacabal. Diferente dos resultados obtidos para o cluster Epsilon, *Defensina A* em Fernando de Noronha compartilhou 90% dos seus haplótipos com as populações continentais do mosquito. Fernando de Noronha, Caruaru, Macapá, Bacabal e Arcoverde apresentaram haplótipos exclusivos. Porto Novo, igualmente ao que ocorreu com o cluster Epsilon não compartilhou haplótipos com as populações continentais de *Ae. aegypti*.

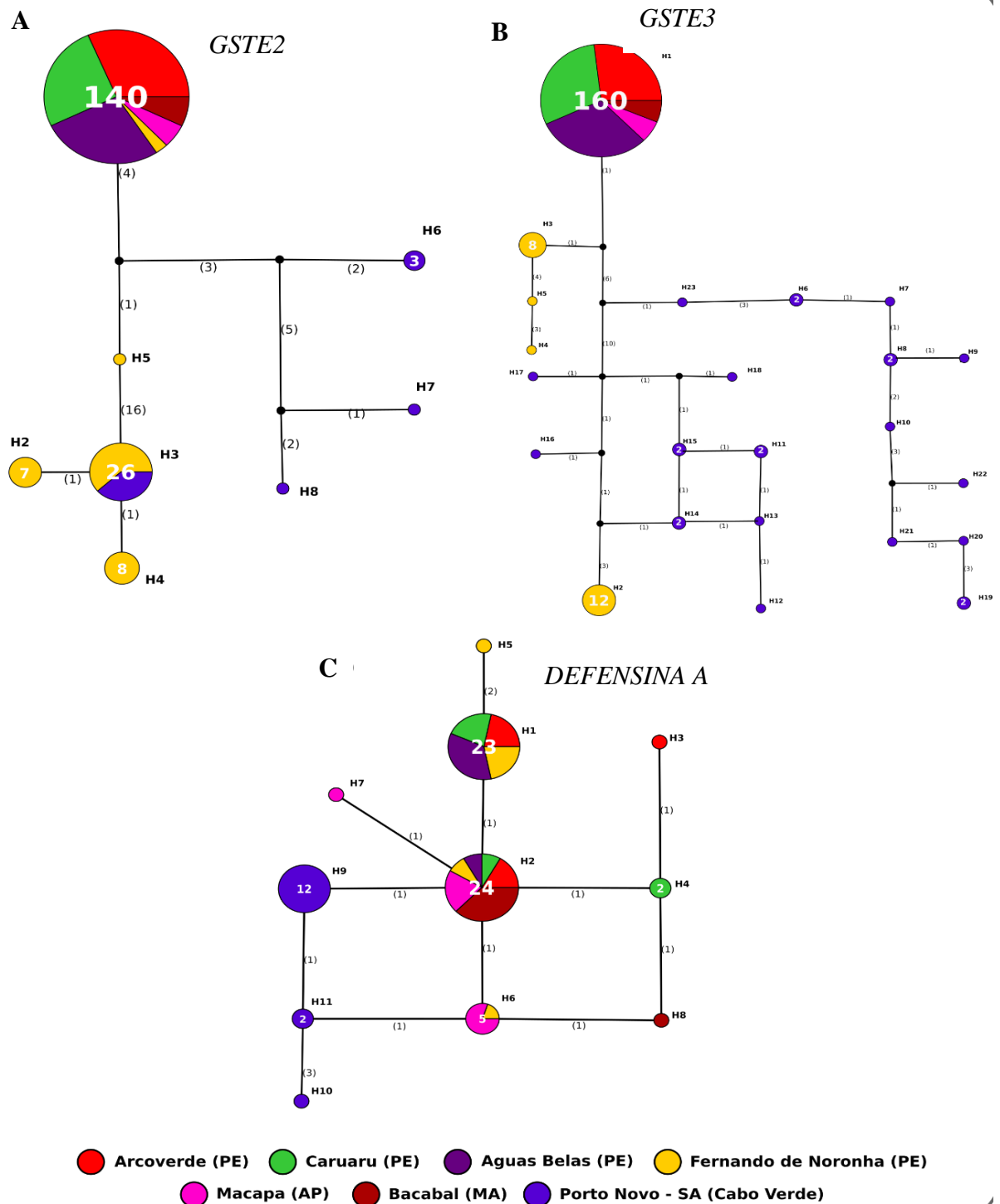
Figura 19- Exemplo de Inferência da rede de haplótipos em *Ae. aegypti* pelos três principais métodos, Minimum Spanning Networks (MSN), Median-Joining Networks (MJN) e redes TCS.



Fonte: A autora.

Legenda: (A) Gene *GSTE2*; i MSN; ii MJN e iii TCS networks. (B) Gene *Defensina A*; i MSN; ii MJN e iii TCS networks. O tamanho do círculo representa as frequências do haplótipo correspondente (o número dentro do círculo na cor branca representa o número de mosquitos que apresentaram aquele haplótipo).

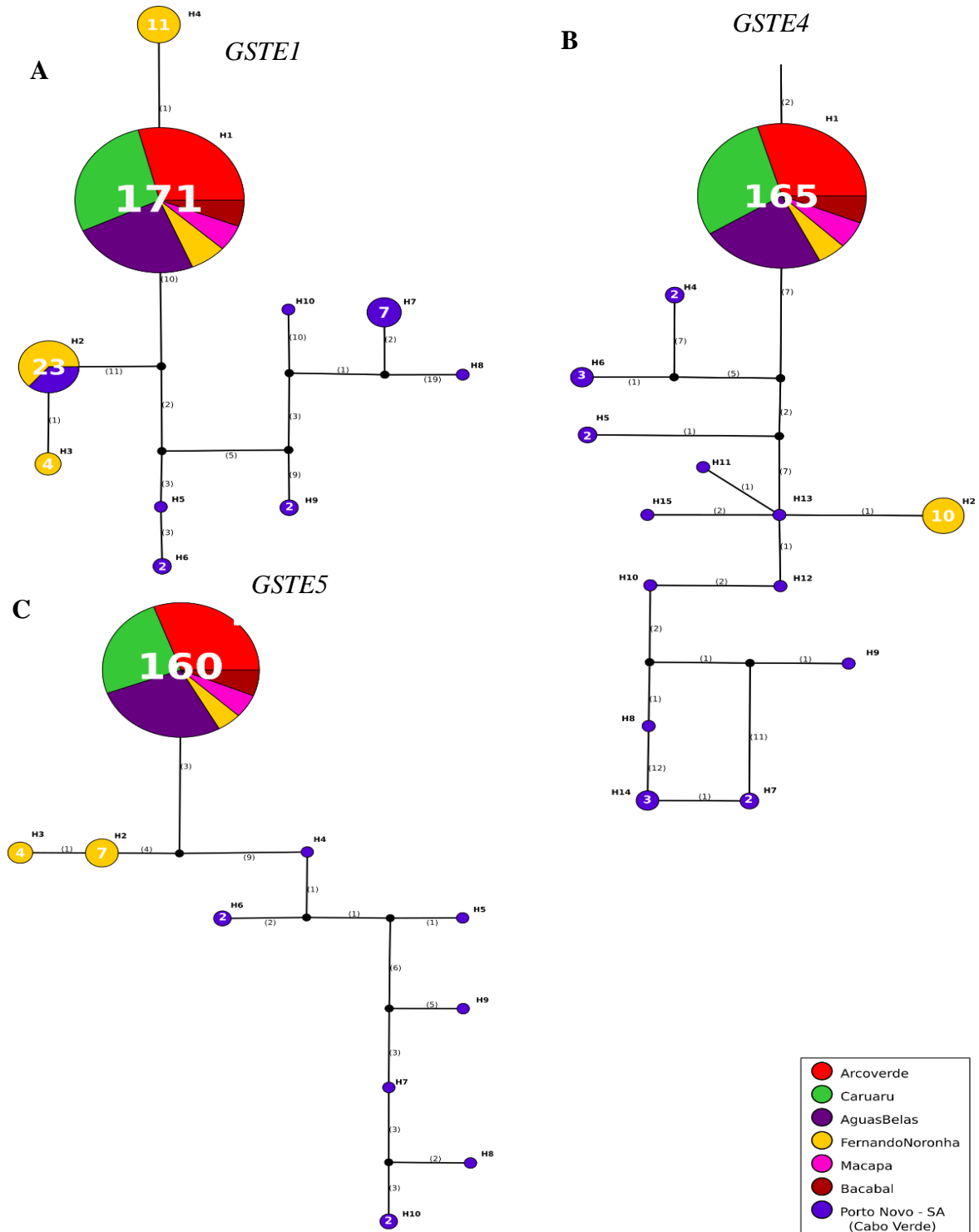
Figura 20 - Redes TCS para relações de haplótipos de *Defensina A*, *GSTE2* e *GSTE3* em *Ae. aegypti*.



Fonte: A autora.

Legenda: (A) *GSTE2*, (B) *GSTE3* e (C) *Defensina A*. Rede haplotípica mostrando as relações genealógicas entre os haplótipos detectados em diferentes populações de *Ae. aegypti*. O tamanho do círculo representa as frequências do haplótipo correspondente (o número dentro do círculo na cor branca representa o número de mosquitos carregando cada haplótipo).

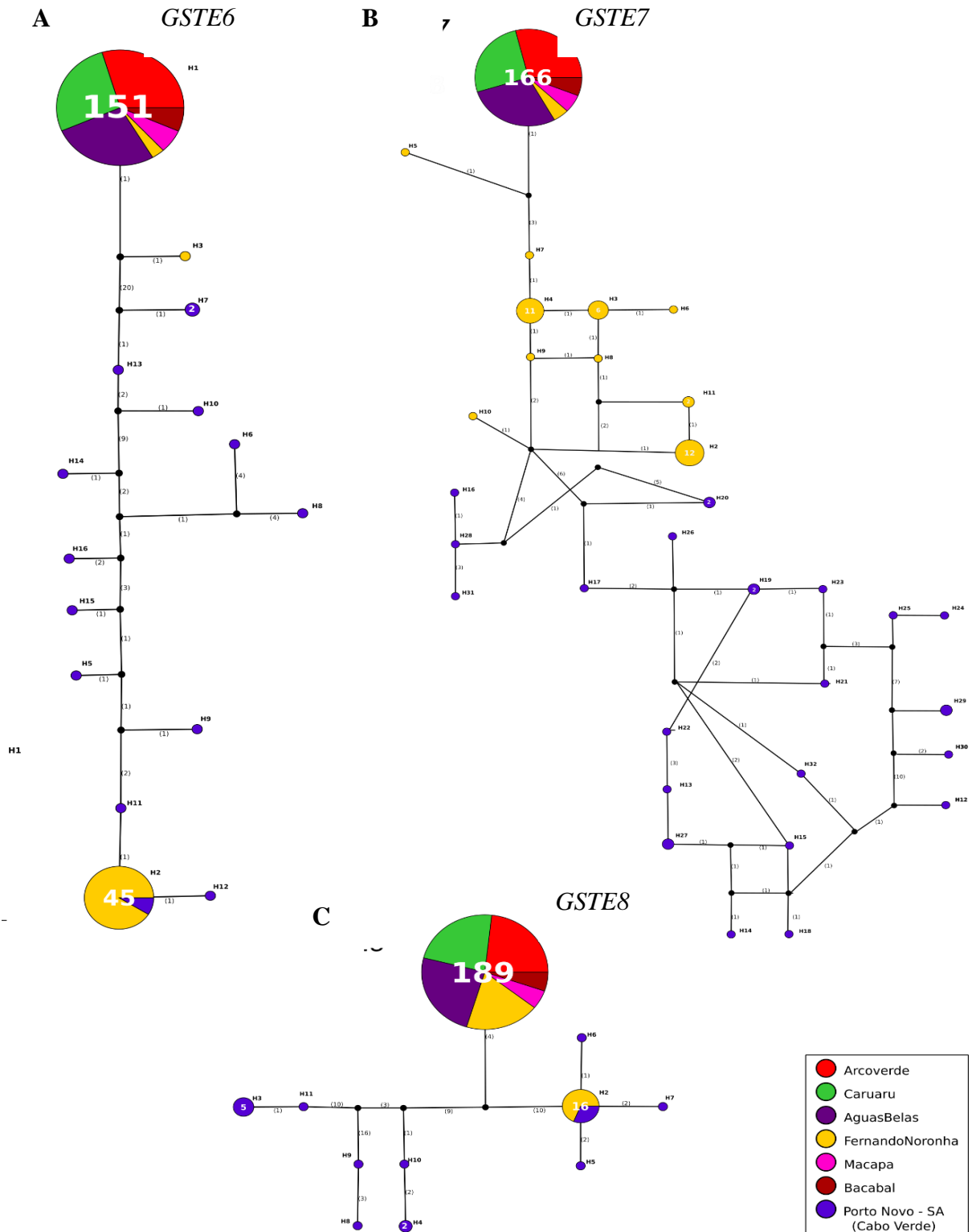
Figura 21- Redes TCS para relações de haplótipos de *GSTE1*, *GSTE4* e *GSTE5* em *Ae. aegypti*.



Fonte: A autora.

Legenda: (A) *GSTE1*, (B) *GSTE4* e (C) *GSTE5*. Rede haplotípica mostrando as relações genealógicas entre os haplótipos detectados em diferentes populações de *Aedes aegypti*. O tamanho do círculo representa as frequências do haplótipo correspondente (o número dentro do círculo na cor branca representa o número de mosquitos carregando cada haplótipo).

Figura 22- Redes TCS para relações de haplótipos de *GSTE6*, *GSTE7* e *GSTE8* em *Ae. aegypti*.



Fonte: A autora.

Legenda: (a) *GSTE6*, (b) *GSTE7* e (c) *GSTE8*. Rede haplotípica mostrando as relações genealógicas entre os haplótipos detectados em diferentes populações de *Ae. aegypti*. O tamanho do círculo representa as frequências do haplótipo correspondente (o número dentro do círculo na cor branca representa o número de mosquitos carregando cada haplótipo).

8.3 Caracterização do perfil transcriptômico de larvas da linhagem RecR resistente ao temephos

Os subtópicos abaixo descrevem todos os resultados que estão relacionados com o estudo do transcriptoma em larvas da linhagem RecR.

8.3.1 Resultados da análise do transcriptoma de larvas de RecR e RecL por RNAseq

O perfil transcriptômico de larvas de *Ae. aegypti* RecR e RecL, foi comparado através da análise de RNAseq para identificar moléculas diferencialmente expressas entre as linhagens, a partir de três réplicas biológicas de cada linhagem em três *pools* de 20 intestinos. Sequências de baixa qualidade foram identificadas com auxílio do *software FastQC* e removidas com o *software Trimmomatic*. Nesta etapa foram excluídas sequências cujas bases apresentaram valor *phred* médio inferior a 30. Figura 23 ilustra a qualidade das sequências após o processo de trimagem. Foram geradas aproximadamente 4,2 milhões de leituras, para RecR com conteúdo GC de 45%, e para RecL, foram aproximadamente 5,5 milhões de leituras conteúdo GC médio de 43 % (Tabela 7).

Figura 23– Qualidade das seqüências obtidas no FastQC para estudo do transcriptoma em *Ae. aegypti*.

Fonte: A autora.

Legenda: (A) linhagem RecR; (B) linhagem RecL. As cores verde, amarelo e rosa correspondem ao valor de *phred* das seqüências geradas no RNAseq. Em verde são localizadas seqüências com *phred* > 28, em amarelo seqüências com *phred* > 20 e < 28 e em rosa seqüências com *phred* < 20.

8.3.2 Alinhamento e contagem das seqüências

As leituras de cada biblioteca foram mapeados contra os transcritos totais de *Ae. aegypti* disponíveis no VectorBase, linhagem Liverpool, com o *software Rsem*, cerca de 95% das seqüências foram mapeadas (Tabela 7). A taxa de mapeamento único médio foi de 84 e 83% para RecR e RecL, respectivamente e a taxa de mapeamento múltiplo foi de 15% para RecR e 16% para RecL. As taxas de leituras não mapeadas foram baixas e variaram entre 4,2% e 4,4% (Tabela 7).

Tabela 7- Resultados dos mapeamentos das bibliotecas de RecR e RecL.

Amostras	RecR (Resistente)		RecL (Susceptível)	
	Nº de Reads	%	Nº de Reads	%
Total de reads	4,207,652		5,551,401	
Total de pares de bases	631,147,800		832,710,150	
Total de reads mapeado	4,023,787	95,63	5,307,270	95,6
Mapeamento único	3,387,181	84,18	4,444,734	83,75
Mapeamento múltiplo	636,606	15,82	862,536	16,25
Não mapeados	183,865	4,37	244,131	4,4

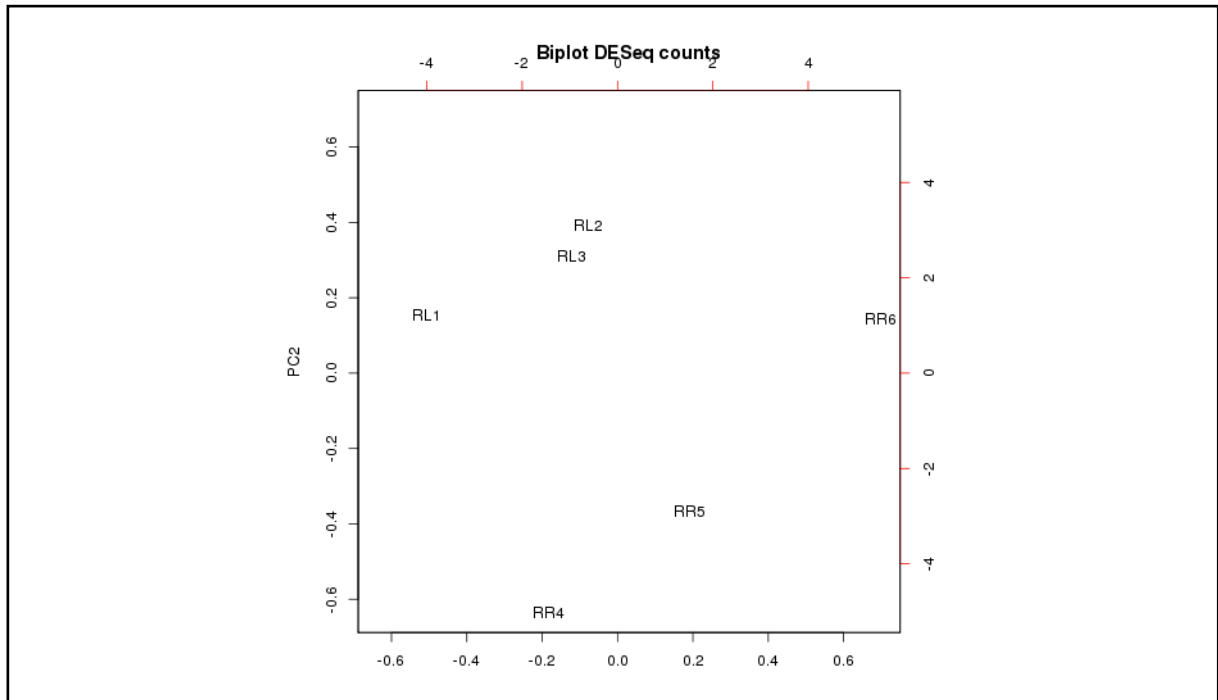
Fonte: A autora.

8.3.3 Análise de expressão diferencial

Foi gerado o gráfico de dispersão espontânea das amostras através da análise de componentes principais (PCA). Esta análise permite avaliar as semelhanças e diferenças entre as réplicas biológicas usadas em cada condição do estudo e determinar se elas podem ser agrupadas. Foi possível observar a formação de grupos distintos entre as réplicas de cada colônia, com as três réplicas biológicas de cada linhagem (Figura 24).

Foram mapeados de acordo com a anotação do VectorBase 6.084 genes (correspondente à $\cong 20\%$ do conteúdo total de genes presentes em *Ae. aegypti*). Para realizar as análises de expressão diferencial, as bibliotecas foram normalizadas no pacote DESeq2 e o resultado pode ser observado na figura 25.

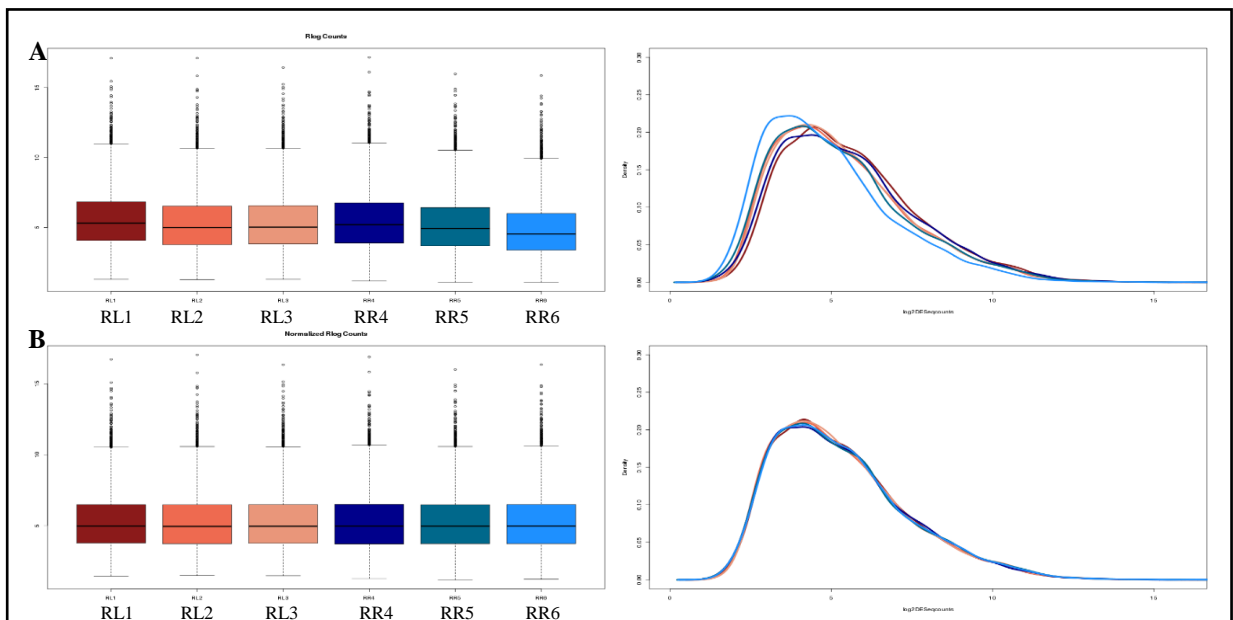
Figura 24- Análise de componentes principais (PCA) das réplicas biológicas de RecL (RL1, RL2 e RL3) e RecR (RR4, RR5 e RR6).



Fonte: A autora.

Legenda: RecL (Susceptível ao temephos); RecR (Resistente ao temephos).

Figura 25- Normalização das bibliotecas de cDNA das linhagens RecR e RecL de *Ae. aegypti*.

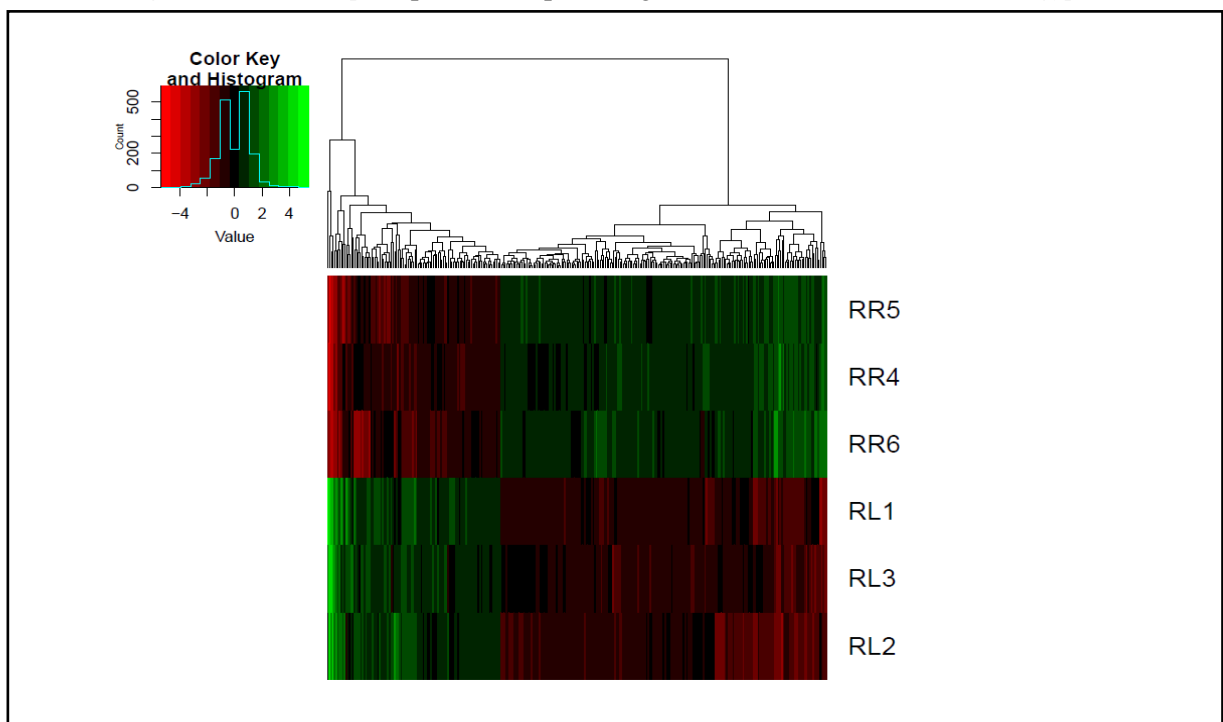


Fonte: A autora.

Legenda: (a) Representação das bibliotecas antes da normalização. (b) Representação das bibliotecas após a normalização.

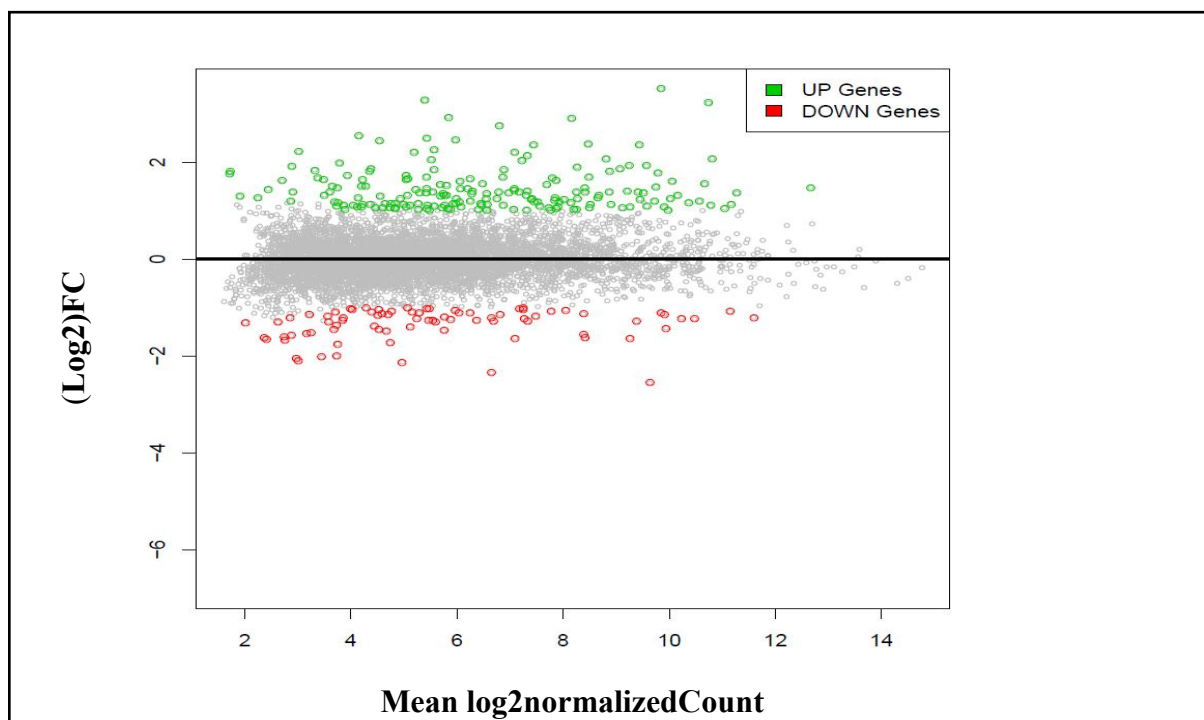
Cada linhagem apresentou um padrão exclusivo de expressão gênica, observado no *heatmap* (Figura 26). Com base no DESeq2, e utilizando a linhagem susceptível RecL como referência, 202 genes foram induzidos em RecR com valor absoluto de $(\text{Log}_2) \text{FC} \geq 1$ (Apêndice A) e um total de 106 genes (Apêndice B) foram reprimidos com $(\text{Log}_2) \text{FC} \leq -1$ e 5.776 genes não apresentaram diferença de expressão entre RecR e RecL (entre -1 e 1) (Figura 27), com $p < 0,05$. A lista completa dos genes induzidos e resprimidos em RecR. Conforme anotação do *VectorBase*, muitos genes diferencialmente expressos foram identificados como não caracterizados em *Ae. aegypti* então, adicionalmente foi realizado uma busca em outros dois bancos de dados para identificação desses genes, no Uniprot e no NCBI (Blastnr), com auxílio do *software Blast2Go*, sendo possível a identificação de mais de 80% dos genes ainda não caracterizados no *VectorBase*.

Figura 26- *Heatmap* do perfil de expressão gênica de RecR e RecL em *Ae. aegypti*.



Fonte: A autora.

Legenda: Em vermelho genes induzidos e em verde genes reprimidos em RecR.

Figura 27- Representação gráfica da distribuição dos genes expressos em RecR.

Fonte: A autora.

Legenda: No gráfico de MA plot cada ponto no gráfico corresponde a um gene. Em verde estão representados os 202 genes superexpressos ($cut\ off > 1$); em cinza os 5.776 genes sem diferença de expressão e em vermelho os 106 genes subexpressos ($cut\ off < -1$), $p < 0,05$.

Dentre os genes superexpressos em RecR, 26 apresentaram $(Log_2) FC > 2$ (Tabela 8). Nesta lista de genes, é possível destacar duas famílias multigênicas que estão envolvidas com a resistência metabólica a inseticidas químicos nos mosquitos. Foram identificados nove genes pertencentes a família das Oxidases de função múltipla (*CYP*), incluindo os quatro primeiros genes mais expressos (AAEL014613= *CYP9J24*, AAEL002005= *CYP12F6*, AAEL006989= *CYP6AG7* e AAEL007024= *CYP6AG3*), três genes *UDP-glucosyl/glucuronosyl transferases*, grupo de enzima de fase II, atuante no processo de metabolismo de xenobióticos. Nesta tabela mais acurada foram identificados genes envolvidos na formação de vesículas membranares, metabolismo de lipídeos, quitina, genes relacionados com a motilidade das células e detecção de sinais químicos e mecânicos, além de genes com participação na regulação do ciclo celular.

Na lista total de 202 genes induzidos em RecR com $(Log_2) FC > 1$ foram identificados genes que desempenham importantes funções biológicas (APÊNDICE A). São eles: seis membros de Glutationa-S-transferase, de classe Epsilon (*GSTE2*, *GSTE3* e *GSTE4*), Theta (*GSTT1* e *GSTT3*) e Sigma (*GSTS1*) e três Esterases (*CCEae3a*, *CCEae1c*, *CCEae3c*), além de genes envolvidos com a replicação, recombinação e reparo de DNA, estabilidade e manutenção

da estrutura de DNA e proteína, metabolismo de lipídeos e carboidratos e genes envolvidos com o transporte de substâncias nas membranas celulares.

O gene *GSTE2* apresentou um valor significativo de (Log₂) FC, porém uma particularidade correu para esse gene. Os dados de RNAseq foram mapeados com as duas últimas anotações do genoma de referência de *Ae. aegypti*, a anotação AaegL3.5 e a anotação AaegL5.1, de maneira geral, os resultados dos dois mapeamentos foram bem similares, porém foi observado uma divergência para o gene *GSTE2*. Conforme a anotação AaegL3.5, *GSTE2* foi o terceiro gene mais expresso em RecR, com (Log₂) FC de 3.4x, esse dado de expressão corroborou com o estudo prévio de Strode *et al.* (2012), porém na anotação AaegL5.1, *GSTE2* apareceu na 43^o e 44^o posição, cada um com (Log₂) FC de 1,7. Segundo Matthews *et al.* (2018), *GSTE2* está triplicado no genoma de *Ae. aegypti* e localizado em uma região repetida *in tandem*, o alinhamento entre as três sequências de *GSTE2* da anotação AaegL5.1, mostrou que essas três sequências (íntrons e exons) são iguais, porém no nosso estudo foram mapeados somente dois dos três genes de *GSTE2* (AAEL007951 e AAEL023692). De fato, para saber a exata posição de *GSTE2* na lista de DEGs, é necessário fazer o sequenciamento completo do genoma de amostras da linhagem RecR, objetivando identificar o número de cópias desse gene e a presença de polimorfismos que já foram caracterizados pelo nosso grupo. Na literatura *GSTE2* é identificado como um gene importante no metabolismo de inseticidas em *Ae. aegypti* resistente aos piretróides e DDT (LUMJUAN *et al.*, 2007; 2011), nesta tese nós caracterizamos funcionalmente esse gene em RecR e demonstramos por diferentes abordagens o importante papel que esse gene possui na resistência ao temephos.

Na lista de genes reprimidos obtidos em RecR, 25 deles apresentaram (Log₂) FC >-2 (tabela 9). O gene mais subexpresso identificado pelo RNAseq foi o gene 40S ribosomal protein S17 (AAEL025999), cuja função é a manutenção da integridade estrutural do ribossomo, organela essencial para a produção das proteínas. Outro gene subexpresso em larvas da linhagem resistente foi hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase (AAEL0083300). Esse gene codifica proteína que atua na via de metabolismo de ubiquinona, cujo papel fisiológico é crítico nos organismos, pois participa dos processos de produção de ATP. Porém, de acordo com Zhang; Li. (2013) o papel dessa enzima em insetos ainda é pouco conhecido. Os demais genes reprimidos listados na tabela 4 e na lista composta pelos 106 genes, atuam em diferentes processos biológicos, tais como síntese de proteínas, apoptose, digestão, imunidade, biossíntese de hormônios, entre outros. Também foram identificados em subexpressão dois genes que codificam para alfa esterases (*CCEae5c* e AAEL028198).

Na lista de genes diferencialmente expressos foi possível identificar pseudogenes e LncRNA (RNAs longos não codificadores). Nos genes induzidos foram encontrados dois Pseudogenes (AAEL026665 e AAEL027485) e sete LncRNAs (AAEL027370, AAEL027449, AAEL023819, AAEL021964, AAEL027939, AAEL028024, AAEL020535), dentre essas RNAs não codificantes os três primeiros apresentaram (Log₂) FC >2. Já para os genes reprimidos o número de pseudogenes foi menor, apenas um foi encontrado (AAEL026761) com (Log₂) FC >-2, porém o número de LncRNAs foi maior, totalizando nove LncRNAs, sendo que cinco desses genes com (Log₂) FC >-2 (AAEL022291, AAEL028017, AAEL028195, AAEL022772, AAEL022345, AAEL026339, AAEL022334, AAEL022617 e AAEL026540).

Tabela 8- Seleção de genes induzidos em *Ae. aegypti* com (Log2) FC>2 na linhagem RecR resistente ao temephos.

Nº	Gene	Descrição	(Log2) FC	P-valor
1	AAEL014613	Cytochrome P450 (CYP9J24)	3,55	1.09E-49
2	AAEL002005	Cytochrome P450 (CYP12F6)	3,39	7.26E-03
3	AAEL006989	Cytochrome P450 (CYP6AG7)	3,24	1.19E-57
4	AAEL007024	Cytochrome P450 (CYP6AG3)	2,87	4.30E-48
5	AAEL025053	Clavesin 1	2,68	2.95E-19
6	AAEL014411	Cytochrome P450 (CYP304B3)	2,64	8.99E-11
7	AAEL002138	Triacylglycerol lipase. putative	2,60	2.29E-07
8	AAEL027370	Long non-coding RNA (LncRNA)	2,56	9.13E-06
9	AAEL005179	uncharacterized serine-rich protein	2,56	2.92E-13
10	AAEL002670	AMP dependent ligase	2,49	1.61E-06
11	AAEL021861	Cytochrome P450 (CYP6AG4)	2,41	3.50E-27
12	AAEL008560	Glucosyl/glucuronosyl transferases	2,38	1.80E-41
13	AAEL003132	Intraflagellar transport (ND5)	2,34	7.87E-05
14	AAEL014617	Cytochrome P450 (CYP9J28)	2,32	7.66E-24
15	AAEL021812	Proteína não caracterizada	2,28	1.33E-13
16	AAEL011850	Cytochrome P450 (CYP315A1)	2,27	3.09E-12
17	AAEL014371	Glucosyl/glucuronosyl transferases	2,25	1.28E-29
18	AAEL027449	Long non-coding RNA (LncRNA)	2,23	6.26E-05
19	AAEL013262	Acidic endochitinase SP2	2,20	2.01E-25
20	AAEL023819	Long non-coding RNA (LncRNA)	2,19	2.68E-04
21	AAEL008266	endochitinase At2g43590-like	2,16	1.06E-04
22	AAEL028635	Cytochrome P450 (CYP9J19)	2,16	1.35E-15
23	AAEL022590	kinesin-like protein subito isoform X2	2,12	1.46E-04
24	AAEL001816	Glucosyl/glucuronosyl transferases	2,07	2.92E-13
25	AAEL006990	Phospholipid phosphatase	2,03	1.23E-19
26	AAEL022132	Pancreatic triacylglycerol lipase	2,02	9.03E-12

Fonte: A autora.

Tabela 9 - Seleção de genes reprimidos em *Ae. aegypti* com (Log2) FC<2 na linhagem RecR resistente ao temephos.

Nº	Gene	Descrição	(Log2) FC	P-valor
1	AAEL025999	40S ribosomal protein S17 hexaprenyldihydroxybenzoate	-7,23	2,38E-84
2	AAEL008330	methyltransferase	-5,25	2,51E-32
3	AAEL022291	Long non-coding RNA (LncRNA)	-4,84	1,57E-26
4	AAEL015140	Protein NPC2 homolog	-3,27	1,34E-26
5	AAEL025170	S-adenosylmethionine decarboxylase	-3,24	3,70E-12
6	AAEL013004	Proteína não caracterizada	-2,63	2,39E-06
7	AAEL010963	Brain chitinase and chia	-2,60	9,66E-49
8	AAEL001163	Macroglobulin/complement	-2,55	7,35E-08
9	AAEL028017	Long non-coding RNA (LncRNA)	-2,45	2,09E-07
10	AAEL027171	Proteína não caracterizada	-2,44	3,35E-05
11	AAEL001478	Bile acid beta-glucosidase, putative	-2,40	7,85E-11
12	AAEL026761	Pseudogene	-2,32	9,13E-05
13	AAEL011559	Metalloproteinase, putative	-2,24	1,48E-04
14	AAEL024532	Toll-like receptor 6 isoform X2	-2,24	7,80E-18
15	AAEL028195	Long non-coding RNA (LncRNA)	-2,19	2,75E-04
16	AAEL021447	Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase	-2,18	2,10E-05
17	AAEL006987	Putative phosphatidate phosphatase	-2,17	1,10E-05
18	AAEL027453	Nucleoside diphosphate kinase	-2,12	5,09E-04
19	AAEL022772	Long non-coding RNA (LncRNA)	-2,08	1,65E-04
20	AAEL022345	Long non-coding RNA (LncRNA)	-2,05	1,23E-04
21	AAEL024653	Protein son of sevenless	-2,05	1,47E-05
22	AAEL009339	Activin receptor type I, putative	-2,02	3,98E-05
23	AAEL002324	Vacuolar protein sorting-associated	-2,02	6,43E-05
24	AAEL020314	Protein NPC2 homolog	-2,01	1,72E-04
25	AAEL005073	Myosin-2 heavy chain-like	-2,00	2,13E-06

Fonte: A autora.

8.3.4 Análise de enriquecimento funcional por Ontologia do Gene (GO)

Após obtenção da lista dos GDEs induzidos e reprimidos, foi realizada a análise funcional. Foram atribuídos a Ontologia do Gene (GO) (<http://www.geneontology.org/>), a partir da identificação de possíveis categorias GOs significativamente representadas entre os GDEs. A análise de enriquecimento funcional nos genes listados como super e subexpressos, foi realizada para a identificação dos termos relacionados aos processos biológicos (BP), funções moleculares (MF) e componentes celulares (CC), na anotação pelo GO uma sequência pode ser associada a mais de uma categoria funcional, já que uma proteína pode estar relacionada a mais de um processo metabólico. A identificação de categorias GOs

significativamente representadas entre os GDEs nas linhagens estudadas foram obtidas através do pacote STRINGdb implementado no ambiente de programação R.

Foram anotados 146 termos enriquecidos positivamente em RecR, dentre os quais 83 foram categorizados em processos biológicos, 46 na função molecular e 17 nos componentes celulares. Os termos mais anotados em processos biológicos foram relacionados a processos metabólicos, localização celular, transporte transmembrana, resposta ao estresse, resposta ao estímulo, divisão celular, regulação, replicação, recombinação e reparo do DNA. Para função molecular os termos mais representativos foram relativos à ligação a íon, atividade de hidrolase, atividade redutase, atividade catalítica e atividade de transmembrana. Em componentes celulares, foram observados termos relacionados a membrana, componentes integrantes da membrana, organela, citoplasma, região extracelular entre outros.

Para os genes reprimidos, foram anotados apenas 13 termos significativamente representados, 10 para função molecular, três para processos biológicos e não foram identificados termos enriquecidos relacionados aos componentes celulares. Em função molecular os termos anotados estão relacionados a atividade de hidrolases, ligação a íon, ligação a metais de transição. Para processos biológicos, os termos anotados foram referentes a processos metabólicos primários, processos catabólicos e biológicos.

8.3.5 Identificação e caracterização das vias metabólicas do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

A análise das vias metabólicas do KEGG foi importante para a compreensão dos diferentes processos biológicos em que os genes DEGs identificados no RNAseq estão envolvidos. Como resultado desta análise foram mapeados ao todo 70 vias metabólicas, das quais 42 vias foram consideradas significativas, com $p < 0,05$, entre essas 37 apresentaram termos enriquecidos no perfil de superexpressão e cinco associados ao perfil de sub expressão.

Em RecR, as vias que se destacaram foram referentes ao metabolismo de carboidratos: metabolismo de galactose (aag00052), metabolismo de propanoato e metabolismo de ascorbato e aldarato (aag00053), metabolismo de aminoácidos: degradação de valina, leucina e isoleucina (aag00280), metabolismo da beta-alanina e metabolismo de glutathione (aag 00480), ao metabolismo energético: metabolismo de enxofre (aag00920) e degradação de ácidos graxos (aag00071), ao metabolismo de lipídeos: metabolismo do ácido alfa-linolênico (aag00592), alongamento de ácidos graxos (aag00062) e biossíntese de ácidos graxos insaturados (aag0140), vias envolvidas na detoxificação de xenobióticos: metabolismo de xenobióticos por

citocromo P450 (aag00980), metabolismo de drogas - citocromo P450 (aag00982), além de vias relacionadas com processamento da informação genética (aag04122), processo celular: Peroxissomo (aag 04146) e lisossomo (aag04142) e processo de transporte: ABC transporte (aag02010) (Tabela 10).

Foi observada uma forte regulação na via de metabolismo de glutathiona devido atuação de genes induzidos e reprimidos. Essa via possui um papel importante na manutenção de diversos processos biológicos, entre os quais a síntese e metabolismo de proteínas e proteção contra estresse oxidativo. Além de atuar nas reações de conjugação com as GSTs no metabolismo de inseticidas químicos.

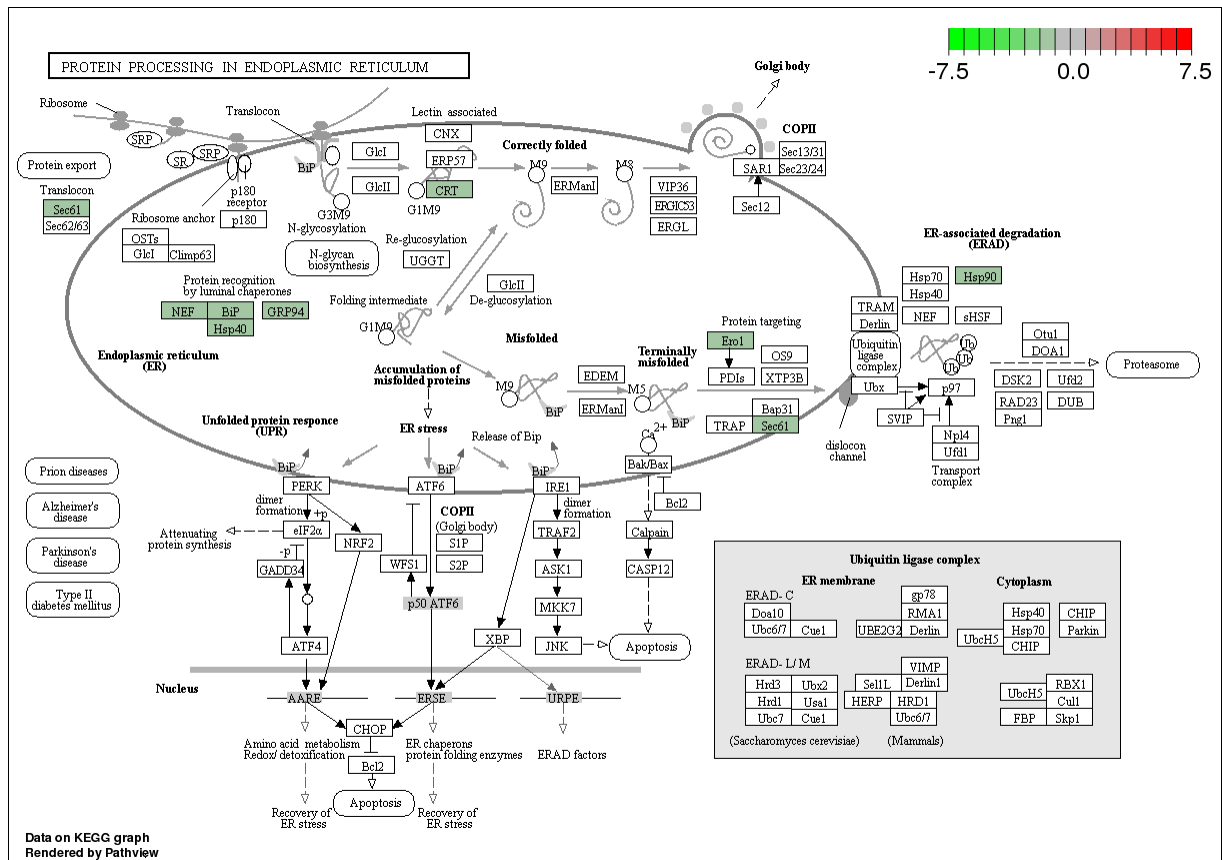
Na linhagem susceptível, cinco vias foram significativamente mapeadas, e estão associadas de maneira geral a processos de metabolismo: metabolismo e biossíntese de N-glicano (aag00510), metabolismo da cafeína (aag00232), metabolismo da riboflavina (aag00740), e associada com a síntese proteica: processamento de proteínas no retículo endoplasmático (aag04141) (Tabela 10). As figuras 28 e 29 exemplificam vias KEGG induzidas e reprimidas, respectivamente na linhagem RecR

Tabela 10- Descrição das vias metabólicas mapeadas para os genes induzidos em RecR.

Nº via no KEGG	Termos KEGG enriquecidos	Nº Genes	p- valor
aag01100	Metabolic pathways	19	5,03E-17
aag 00052	Galactose metabolism	3	2,37E-04
aag 00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	3	4,29E-04
aag 00480	Glutathione metabolism	3	5,14E-04
aag 00920	Sulfur metabolism	3	6,93E-04
aag 00053	Ascorbate and aldarate metabolism	3	7,42E-04
aag 00981	Insect hormone biosynthesis	2	1,60E-03
aag 00410	beta-Alanine metabolism	2	2,32E-03
aag 00640	Propanoate metabolism	2	2,32E-03
aag00860	Porphyrin and chlorophyll metabolism	2	2,32E-03
aag 01120	Microbial metabolism in diverse environments	2	3,71E-03
aag 00071	Fatty acid degradation	2	4,39E-03
aag 00260	Glycine, serine and threonine metabolism	3	5,20E-03
aag 00300	Lysine biosynthesis	2	5,69E-03
aag 00330	Arginine and proline metabolism	2	5,92E-03
aag 01212	Fatty acid metabolism	2	7,06E-03
aag 04146	Peroxisome	1	1,52E-02
aag 04142	Lysosome	2	1,65E-02
aag00750	Vitamin B6 metabolism	2	1,67E-02
aag 00604	Glycosphingolipid biosynthesis -	2	3,04E-02
aag 00230	Purine metabolism	1	3,04E-02
aag 00340	Histidine metabolism	2	3,04E-02
aag 00360	Phenylalanine metabolism	1	3,04E-02
aag 00450	Selenocompound metabolism	1	3,04E-02
aag 00592	alpha-Linolenic acid metabolism	1	3,04E-02
aag 04122	Sulfur relay system	1	3,04E-02
aag 00531	Glycosaminoglycan degradation	2	3,94E-02
aag 01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	1	3,94E-02
aag 02010	ABC transporters	1	4,07E-02
aag00062	Fatty acid elongation	1	4,18E-02
aag 00650	Butanoate metabolism	1	4,18E-02
aag 00790	Folate biosynthesis	1	4,18E-02
aag 00511	Other glycan degradation	1	4,26E-02
aag00 980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome	1	4,26E-02
aag00982	Drug metabolism - cytochrome P450	1	4,26E-02
aag 00380	Tryptophan metabolism	1	4,36E-02
aag 00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	1	4,87E-02

Fonte: a autora.

Figura 29- Exemplo de via metabólica gerada pelo KEGG que exibe um conjunto de genes reprimidos em *Ae. aegypti* resistente ao temephos. Via processamento de proteínas no retículo endoplasmático (aag04141).



Fonte: Adaptado de Qiu (2013).

Legenda: Verde: genes reprimidos

8.3.6 Enriquecimento funcional de redes de interações proteína-proteína

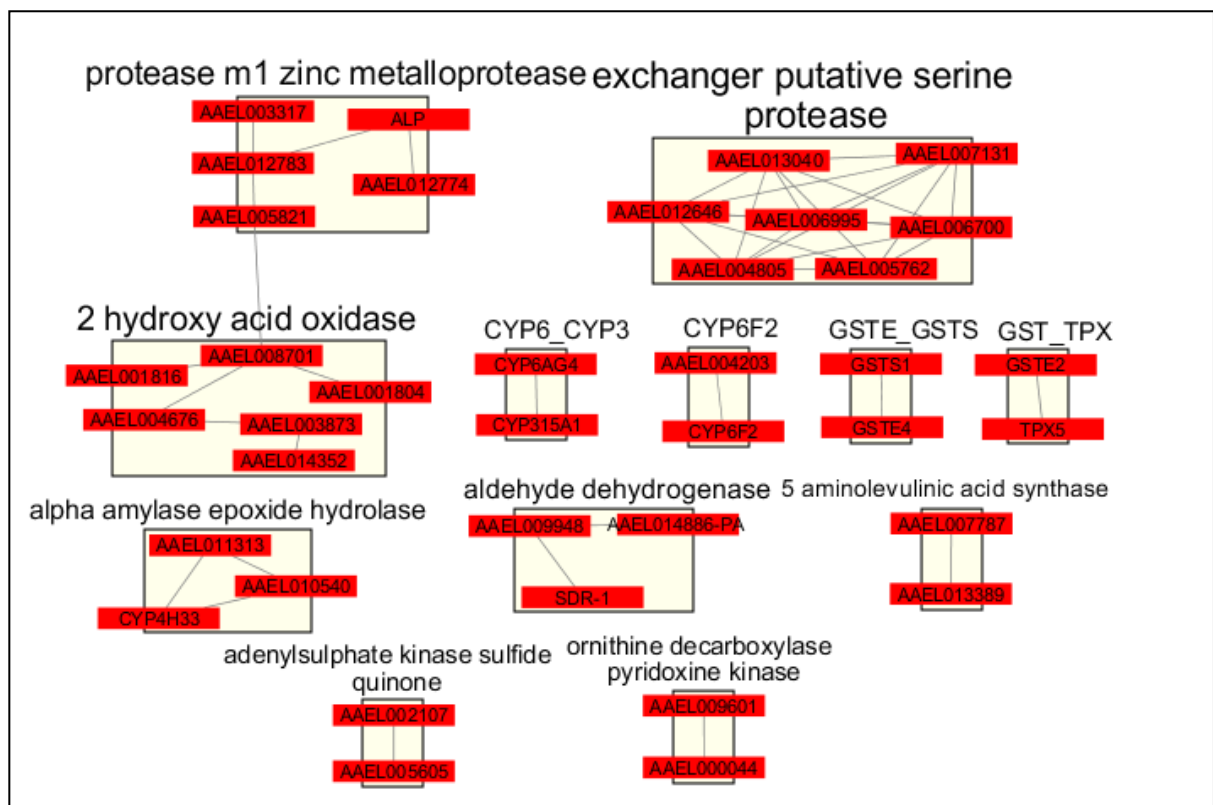
Neste estudo também foi investigada a interação proteína – proteína dos genes diferencialmente expressos identificados no RNAseq, através da construção de redes de interações pelo STRINGdb, e a integralização, clusterização e visualização pelo software *Cytoscape*.

Os genes induzidos agruparam-se em 12 clusters (Figura 30), e o número de genes variou entre os clusters. O cluster que teve um maior número de genes foi o “*Exchanger putative serine protease*”, com sete genes. As proteínas pertencentes a esse cluster estão relacionados ao metabolismo de quitina e transporte transmembrana de açúcares e de outras substâncias. O segundo cluster foi formado por seis genes “*2 hydroxy acid oxidase*” com proteínas envolvidas no processo catabólico de inositol e também nas atividades de oxidoreductase e glicosiltransferase. Além disso foram observadas sete interações entre apenas duas proteínas, quase todas com relação direta ao metabolismo de xenobióticos e as interações entre os clusters

foi visualizada somente entre dois clusters “*protease m1 zinc metalloprotease*” e “*2 hydroxy acid oxidase*”.

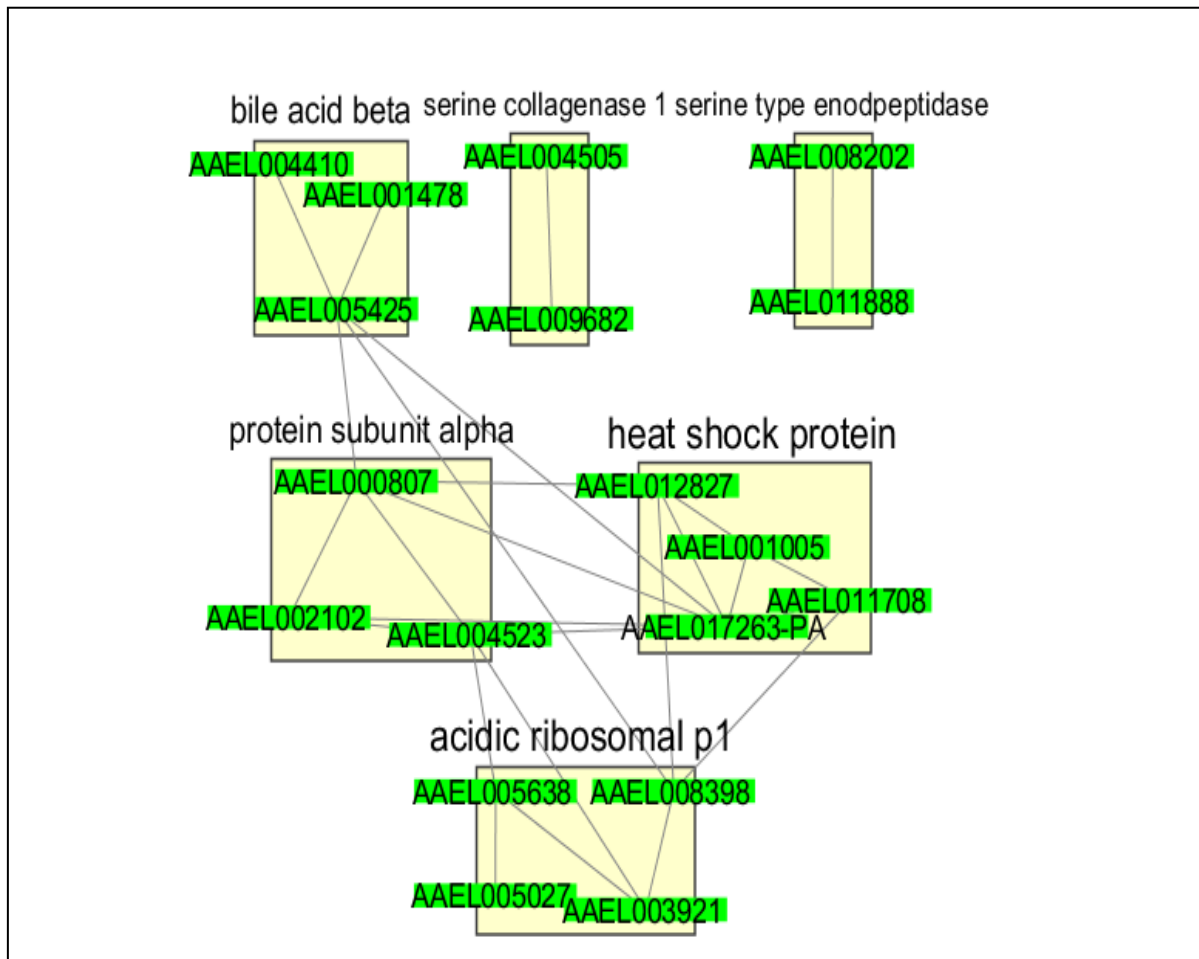
Na lista de genes reprimidos em RecR, foram observados apenas seis clusters, com menos genes em cada cluster, porém com maior rede de interação entre estes clusters (Figura 31). Os dois maiores clusters “*acidic ribosomal p1*” e “*heat shock protein*” apresentaram cada um quatro genes e correlação entre os processos biológicos desempenhados pelas proteínas que compõem esses dois clusters, são eles: autofagia, controle da expressão gênica, regulação da tradução proteica, processamento e transporte de proteínas secretadas e participação no processo de dobramento proteico. Nos apêndices C e D é mostrado a lista completa dos clusters induzidos e reprimidos em RecR e os seus respectivos genes.

Figura 30- Rede de interação funcional entre proteína- proteína de genes induzidos na linhagem RecR.



Fonte: A autora.

Figura 31- Rede de interação funcional entre proteína- proteína de genes reprimidos na linhagem RecR.



Fonte: A autora.

8.3.7 Resultados da validação da expressão diferencial de genes do RNAseq por RT-qPCR

A validação dos dados de RNAseq foi realizada através da seleção de DEGs com objetivo de avaliar o seu nível de expressão relativa por RT-qPCR, comparando-se a linhagem resistente com a susceptível. As amostras de RNA utilizadas das linhagens susceptíveis e resistentes nesse experimento foram as mesmas submetidas ao RNAseq. Foram selecionados dois genes induzidos e três genes reprimidos em RecR que exibiram diferentes valores de expressão relativa e com provável relevância biológica para o evento da resistência ao temephos.

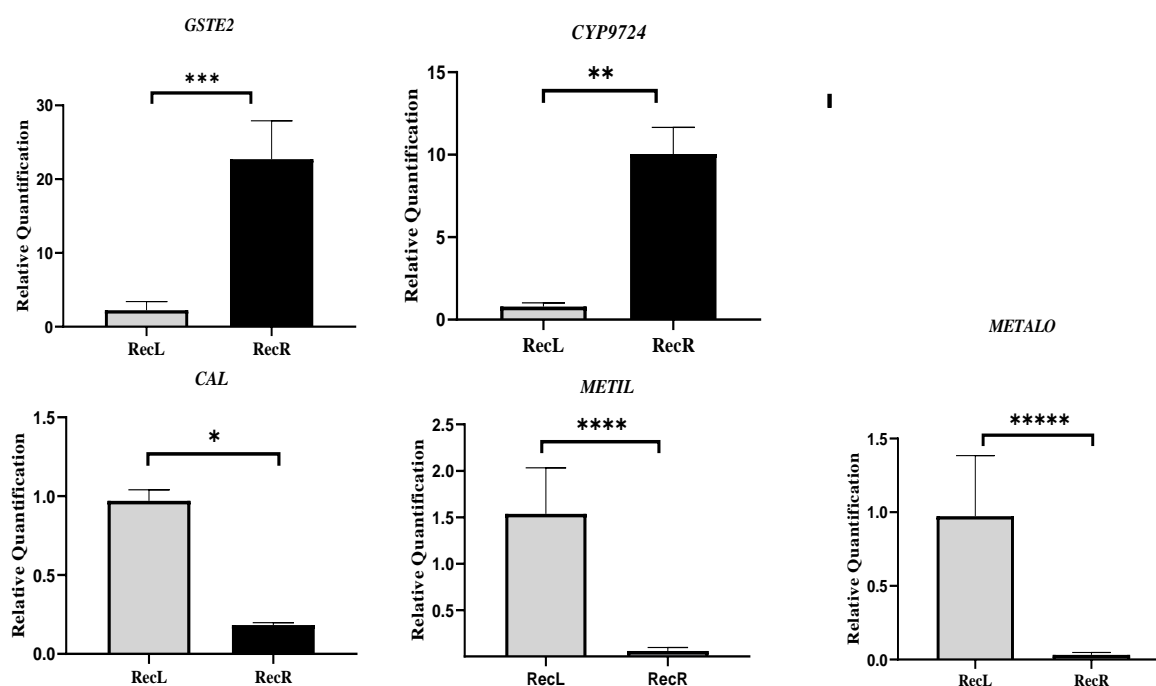
CYP9J24 foi escolhido por ser o gene mais superexpresso em RecR. O resultado da avaliação por RT-qPCR revelou um aumento significativo na expressão relativa do gene, cerca de 11x, e esses valores foram semelhantes aos encontrados no experimento de RNAseq. O gene *GSTE2*, com valor de com (Log2) FC > 1,7 foi escolhido devido a sua importância biológica em

espécies de insetos resistentes a inseticidas químicos. A expressão relativa desse gene também foi significativamente maior em RecR, corroborando com os dados de RNAseq (Figura 32).

Os três genes reprimidos em RecR foram selecionados porque obtiveram diferentes valores de expressão relativa no RNAseq, foram eles: hexaprenyldihydroxybenzoato methyltransferase - 0,03x (Metil), metalloproteinase - 0,22x (Metalo) e calreticulina - 0,32x. Os resultados de subexpressão encontrados em RecR pelo RNAseq corroboraram com os resultados de RT-qPCR, porém com uma pequena variação.

O experimento de validação foi efetivado com sucesso, visto que os níveis de expressão relativa obtidos a partir do RNAseq e RT-qPCR resultaram em uma forte correlação, com um coeficiente de correlação de Pearson, $R=0,88$ e esses resultados confirmam que os perfis de expressão diferencial por RT-qPCR encontrados para esses genes estão de acordo com o respectivo perfil detectado por RNAseq.

Figura 32 – Validação do experimento de RNAseq por RT-qPCR.



Fonte: A autora.

Legenda: GSTE2 (Glutationa-S-transferase Epsilon 2); Metil (hexaprenyldihydroxybenzoato methyltransferase); Meta (Metalloproteinase); Cal (Calreticulina) Barra representa desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas foram avaliadas com o teste T de Student * $p<0,0001$; ** $p<0,0006$; *** $p<0,0026$; **** $p<0,0056$; ***** $p<0,0166$.

9 DISCUSSÃO

No Brasil, o organofosforado temephos foi por décadas o inseticida de primeira escolha pelos programas de controle de *Ae. aegypti*. O uso indiscriminado deste composto favoreceu a seleção de populações resistentes em todo o país e este produto só foi completamente substituído por outros, com modo de ação diferente, em 2014 (CHEDIAK, *et al.*, 2016; VALLE *et al.*, 2019). Esta tese estudou o Cluster de GSTs Epsilon e o seu envolvimento com a resistência ao temephos em *Ae. aegypti*, a nível molecular, bioquímico e funcional.

No presente estudo, descrevemos diferenças importantes entre as sequências GSTE2 de *Ae. aegypti* resistente (RecR) e suscetível (RecL) ao temephos. Além disso, demonstramos que o alelo observado na linhagem RecR está fixado em várias populações naturais, o que sugere uma forte pressão de seleção causada pelo uso intensivo dessa larvicida no Brasil. Nós comprovamos que a ausência de diversidade genética nos genes membros do cluster Epsilon não foi causado por um evento demográfico, já que o gene da defensina apresentou alta diversidade genética nas mesmas populações estudadas. Isso demonstra que a seleção foi o fator responsável pela fixação dos alelos nos diversos genes GSTE, provavelmente um efeito de *selective sweep* provocou a perda da diversidade nos outros genes próximos da GST Epsilon. Este fenômeno também foi observado em populações de *An. funestus* resistente a piretróides para genes da família CYP (BARNES *et al.*, 2017).

A resistência ao temephos em *Ae. aegypti* já foi detectada para várias populações no Brasil e, desde 2002, tem sido registrada em inúmeros municípios do país (VALLE *et al.*, 2019). Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram atividade alterada de GST total em larvas e adultos de RecR e esses dados estão em concordância com uma avaliação realizada anteriormente por Araújo *et al.* (2013) e Melo-Santos *et al.* (2010) nessa linhagem. Alterações na atividade da GST total também foram observadas em populações de campo após a substituição do inseticida organofosforado por piretróides em programas de controle para adultos (MONTELLA *et al.* 2007). Os estudos realizados com populações de *Ae. aegypti* de vários municípios de Pernambuco revelaram valores altos de razão de resistência ao inseticida temephos acima de 100 vezes, e associados a um padrão de atividade de GST total alterada (ARAÚJO *et al.*, 2013; 2019).

A classe Epsilon tem sido implicada na resistência ao DDT em populações de *An. gambiae* e *Ae. aegypti* (LUMJUAN *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2008). Os principais mecanismos de resistência descritos são relacionados à eficiente atividade metabólica de

enzimas e/ou altos níveis de expressão das enzimas em populações resistentes (ARAVINDAN; MUTHUKUMARAVEL; GUNASEKARAN, 2014; LUMJUAN *et al.*, 2005, 2011; TCHOUAKUI *et al.*, 2018). Os resultados da avaliação da expressão gênica mostraram que existe uma superexpressão da *GSTE2* na linhagem resistente RecR, cerca de seis vezes maior que a expressão em RecL, corroborando com os resultados obtidos por Strode *et al.* (2012) e pelos nossos dados de transcriptoma. A expressão elevada do gene *GSTE2* evidenciada em larvas e adultos de RecR em relação a RecL é possivelmente um efeito adaptativo do processo de seleção de resistência nessa linhagem após anos de exposição ao temephos.

Outro achado interessante foi a confirmação da resistência ao DDT na linhagem RecR, embora a pressão de seleção seja exclusiva para o inseticida temephos. A taxa de mortalidade para o DDT encontrada nesta linhagem foi de apenas 9%. O resultado fornece fortes indícios do papel multifuncional das enzimas detoxificadoras superexpressas e inclusive da *GSTE2* em RecR. A ausência de mutações *Kdr* em RecR indica que a resistência cruzada observada entre o temephos e o DDT pode estar de fato associada a mecanismos metabólicos, possivelmente ligados à expressão diferencial de GST. Nossos resultados sugerem que mecanismos comuns ainda não identificados podem estar associados à resistência ao temephos e ao DDT e precisam ser investigados.

Recentemente foi dada atenção especial às mutações na região codificadora de genes que expressam enzimas metabólicas. Em populações de *An. funestus* resistente ao DDT, foi relatada a superexpressão do gene *GSTE2*, e uma única alteração de aminoácido L119F conferiu um alto nível de resistência metabólica ao composto (RIVERON *et al.*, 2014). O alelo resistente L119F está fixado apenas em mosquitos resistentes ao DDT e está ausente em populações suscetíveis. Em *GSTE2* de *An. gambiae*, a mutação I114T foi associada à resistência ao DDT em populações de campo desta espécie, atuando em conjunto com mutações *Kdr* (MITCHELL *et al.*, 2014). A análise das sequências de cDNA do gene *GSTE2* para RecR e RecL revelou a presença de polimorfismos que diferenciam as duas sequências. A linhagem RecR apresentou quatro substituições exclusivas de aminoácidos no gene *GSTE2*: L111S, I150V, E178A e A198E (HELVECIO *et al.*, 2020). Os quatro resíduos de aminoácidos encontrados exclusivamente na *GSTE2* de RecR também é modificado em *GSTE2* da linhagem ZAN / U de *An. gambiae* resistente ao DDT e que não possui mutações do tipo *kdr* no canal de sódio (MITCHELL *et al.*, 2014). No entanto, apenas o resíduo L111 foi sugerido desempenhar um papel importante na atividade metabólica dessa enzima para o inseticida devido à sua localização como parte do domínio de ligação ao DDT (WANG *et al.*, 2008), além de estar

previamente implicado na resistência ao DDT (RIVERON *et al.*, 2014). Nosso trabalho implica pelo menos outro resíduo polimórfico, I150, como sendo importante na resistência a inseticidas com um provável papel também na atividade catalítica ou em sua regulação.

A caracterização da atividade enzimática das proteínas GSTE2RecL, RecR e mutantes demonstrou diferenças específicas em suas propriedades. A eficiência catalítica e os parâmetros cinéticos dessas enzimas não foram os mesmos. A GSTE2RecR metabolizou uma quantidade significativamente maior de substrato que a GSTE2RecL no mesmo período de tempo. Essa característica presente na variante resistente é importante e pode se refletir em campo, onde os mosquitos são frequentemente expostos a inseticidas e a metabolização desses xenobióticos é ininterrupta. A proteína mutante MutI150V também exibiu uma eficiência catalítica maior em relação aos outros mutantes pontuais, porém essa eficiência foi menor do que a apresentada pela proteína MutTotal e pela RecR, esses resultados indicam que provavelmente essas mutações atuam em conjunto, com efeito aditivo e complementar, visto que a eficiência catalítica semelhante a RecR só foi detectada na proteína recombinante que tinha as quatro mutações simultâneas. Isto é reforçado no estudo de diversidade genética do cluster Epsilon nas populações de campo resistentes ao temephos, no qual todos os indivíduos analisados apresentaram sempre as quatro mutações juntas. Cabe ressaltar que, além da diferença no perfil de expressão da enzima, que corroborou com os dados anteriores, este trabalho mostra diferenças estruturais discretas (mutações) que também devem estar envolvidas com a resistência, mas que devem ser investigadas a posteriori.

Um estudo recente usando uma GST de equino como um biossensor para detectar a presença de inseticida demonstrou que o temephos é realmente um inibidor não competitivo de GST e, portanto, não atua no mesmo local de ligação que o CDNB (BORAH *et al.*, 2017). Isso levanta a possibilidade de que a resistência ao temephos relacionada a GSTE2, no caso específico do temephos, seja causada por um papel da enzima na defesa contra compostos endógenos tóxicos derivados da exposição ao temephos ou por sua inibição direta por esse composto, e não por uma metabolização direta pela enzima. Nesse caso, a resistência ao temephos seria causada pelas mutações em GSTE2, eliminando os produtos tóxicos secundários gerados pela exposição a inseticidas e/ou inibição do inseticida. O primeiro mecanismo foi demonstrado em *Nilaparvata lugens*, envolvendo uma GST responsável por proteger os tecidos dos danos oxidativos causados pela exposição aos piretróides (VONTAS *et al.*, 2002). Similarmente, em *An. arabiensis*, GSTE4 não foi capaz de metabolizar piretróides, embora houvesse uma forte evidência de seu envolvimento na resistência a inseticidas (WILDING *et*

al., 2015). Qualquer um desses mecanismos seria distinto daquele envolvendo esterases, onde, por exemplo, a enzima CCEae3a demonstrou ser capaz de interagir com o temephos e causar resistência pelo sequestro da molécula (GRIGORAKI *et al.*, 2016).

No presente estudo, observamos que o temephos não atua como substrato para a GSTE2 e sim como um inibidor, corroborando com os achados de Borah *et al.* (2017). De acordo com estes autores, a inibição é do tipo não competitiva, nesse tipo de inibição reversível, o inibidor se liga em um local diferente do sítio ativo da enzima, no entanto é capaz de alterar a conformação do local ativo de modo que a enzima não esteja mais na conformação ideal para catalisar eficientemente a reação. A habilidade do inseticida temephos de inibir a atividade enzimática de GSTE2 foi investigada em RecL, RecR pelo cálculo de IC₅₀. O temephos se mostrou um inibidor da atividade de GSTE2RecL e as mutantes pontuais (concentrações similares e valores de IC₅₀ baixos), enquanto que a atividade GSTE2RecR e MutTotal foi fracamente inibida pelo temephos (valores de IC₅₀ altos), esses dados reforçam novamente o efeito aditivo dessas mutações em GSTE2 RecR e demonstram que na linhagem resistente, o temephos por ser um inibidor fraco possivelmente não altera a conformação estrutural da enzima e em consequência não compromete a sua atuação no metabolismo de compostos tóxicos.

O interesse em GSTs aumentou consideravelmente devido à sua potencial aplicação prática. Por exemplo, seu uso em kits de detecção de inseticidas em redes impregnadas de DDT já foi descrito (MOROU *et al.*, 2008), e o possível uso de drogas antifilaricidas baseadas em inibidores de GST (BHARGAVI; VISHWAKARMA; MURTY, 2005). Os resultados encontrados no atual estudo se somam aos descritos na literatura, sugerindo que o GSTE2 seja um bom candidato ao desenvolvimento de métodos de diagnóstico de resistência e também de novos inseticidas, que atuem como inibidores dessas enzimas de detoxificação.

Este foi o primeiro estudo populacional que explorou a diversidade genética dos oito genes que codificam para glutathiona-S-transferases do cluster Epsilon em *Ae. aegypti*, cujo objetivo foi buscar a presença dos polimorfismos detectados no gene GSTE2 de RecR nas populações de campo, com diferentes perfis de susceptibilidade ao temephos, e também detectar possíveis variantes alélicas nos demais genes do cluster Epsilon, que poderiam estar relacionados à resistência metabólica nesta espécie. Todas as cinco populações continentais (Arcoverde, Caruaru, Águas Belas, Bacabal e Macapá) tiveram as mesmas substituições de aminoácidos de GSTE2 RecR fixadas em seus alelos.

Surpreendentemente, não houve variabilidade genética para o cluster Epsilon nas populações continentais avaliadas. Apenas as populações insulares, Fernando de Noronha (Brasil) e Porto Novo (Cabo Verde), apresentaram polimorfismos entre os indivíduos nos oito genes do cluster. Fazendo uma correspondência com a exposição ao temephos nessas localidades, o composto foi utilizado nas populações continentais por cerca de 30 anos e acarretou na seleção de populações com razões de resistência muito elevadas, chegando a mais de 200x em Arcoverde e Caruaru, com significativa correlação entre o histórico de utilização do produto e o nível de resistência, conforme descrito em (ARAÚJO *et al.*, 2013; 2019). Por outro lado, nas áreas insulares, como Fernando de Noronha, o uso foi inexistente, haja vista a regulação de uso de inseticidas químicos nessa Área de Proteção Ambiental (APA), que hoje representa uma das poucas localidades onde o temephos nunca foi utilizado. Em Porto Novo, de acordo com as informações da delegacia de saúde local, o uso do temephos tem ocorrido de forma esporádica e restrita a determinados meses do ano.

É possível que mutações vantajosas nos genes GSTs Epsilon que conferem melhor aptidão ao vetor, ou seja o fenótipo de resistência e/ou tolerância a um ou mais inseticidas, tenham se acumulado ao longo dos anos de exposição e seus alelos tenham sido selecionados e fixados nas populações. A linhagem susceptível RecRev, derivada de RecR, que foi submetida a uma reversão completa da resistência na 14^a geração, mostrou sequências de genes do cluster Epsilon semelhantes à RecL, o que reforça que somente a contínua pressão de seleção ao temephos levou ao estabelecimento dessas mutações nas populações vetorais.

A ausência de polimorfismos observados aqui no gene *GSTE2* de populações continentais do mosquito é notória, uma vez que tais polimorfismos foram observados para o mesmo gene em outras espécies de mosquitos, como *An. arabiensis* (CRUZ *et al.*, 2019), *An. maculipennis* (SAATLOU *et al.*, 2019), *An. funestus* (TCHOUAKUI *et al.*, 2018) e em *Cx. quinquefasciatus* da mesma área geográfica deste estudo (OLIVEIRA, 2014). Outro membro da classe Epsilon, *GSTE4* também mostrou diversidade genética elevada em *An. arabiensis* de Uganda (WILDING *et al.*, 2015).

A ausência de diversidade para estes genes nas populações analisadas no nosso estudo poderia ser uma consequência do efeito de gargalo causado pela reintrodução relativamente recente de *Ae. aegypti* no Brasil, início da década de 70, com os alelos RecR e RecL coexistindo desde então. Porém, diversos estudos com marcadores de DNA mitocondrial (COI e ND4) encontraram alta variabilidade genética em amostras brasileiras da espécie (BRACCO *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2014; SCARPASSA; CARDOZA; CARDOSO JUNIOR, 2008),

portanto, a ausência diversidade genética do cluster Epsilon neste estudo possivelmente não está relacionada ao efeito de gargalo populacional.

Nossa hipótese é que o uso prolongado e exacerbado do temephos em campo, selecionou ao longo do tempo os polimorfismos já existentes, em baixa frequência, que conferiam vantagens adaptativas ao inseto, seguido de uma fixação dos mesmos nessas populações resistentes ao temephos. As variantes resistentes do cluster podem ter sido selecionadas em campo ao longo dos 30 anos de uso do inseticida até a fixação alélica. E a uniformização da fixação dos alelos em todas as populações continentais de *Ae. aegypti* aqui investigadas podem ser atribuídas à similaridade na exposição ao temephos em todos os municípios analisados, pois o esquema de uso desse larvicida foi recomendado pelo Ministério da Saúde e adotado nacionalmente no Brasil, exceto em Fernando de Noronha, cujo larvicida utilizado até o momento é à base de *Bacillus thuringiensis israelenses* (Bti). Os resultados de diversidade genética do cluster Epsilon parecem caracterizar um evento de varredura seletiva (*selective sweep*) e como consequência um efeito carona nos genes ligados (*hitchhiking*) que reduz a quantidade de variação genética em uma região cromossômica que flanqueia a mutação benéfica.

Porém, para a comprovação dessa hipótese é necessário o estudo e sequenciamento do genoma completo das populações estudadas, a fim de identificar a localização das assinaturas de varredura seletiva nos mosquitos e correlacioná-las com a resistência aos inseticidas. Weedall e colaboradores (2019) confirmaram padrões de varredura seletiva em população de *An. funestus* do Malawi nos locos de resistência aos piretróides *rp1* no cromossomo 2R, região onde se localiza o cluster dos genes *CYP6* identificado no trabalho como protagonista na resistência a permetrina. Kamdem *et al.* (2017) afirmam que as varreduras de genoma revelam assinaturas de seleção centradas nos genes envolvidos na resistência metabólica. Notavelmente, uma varredura seletiva contendo enzimas de detoxificação seria relevante para o estudo de espécies de mosquitos que exploram locais de reprodução, ou seja, criadouros, com elevado teor de poluição em ambientes urbanos.

Os resultados de diversidade genética e a construção da rede de haplótipos para o cluster Epsilon e para o gene Defensina foram elementos importantes que ajudaram a reforçar a nossa hipótese de que a intensa pressão de seleção ao temephos ocasionou a fixação de alelos vantajosos nas populações continentais do estudo.

Analisamos o gene Defensina A neste estudo como um marcador nuclear independente, de acordo com os dados da literatura, genes relacionados a resposta imune exibem altos níveis

de polimorfismos (DASSANAYAKE; SILVA GUNAWARDENE; TOBE, 2007). Nas três linhagens de laboratório (RecL, RecRev e RecR) e nas sete populações do estudo este gene foi polimórfico, com diversidade haplotípica nas populações de campo. Os testes de neutralidade aplicados para o gene Defensina A não foram significativos e sugerem que nenhum processo evolutivo está atuando sob este gene nas populações estudadas, resultando em um evento de evolução neutra, um perfil bem diferenciado do Cluster Epsilon. A rede de haplótipos mostrou que há fluxo gênico entre as populações de Pernambuco com Fernando de Noronha, no gene Defensina A, Fernando de Noronha compartilhou 90% dos seus haplótipos com as populações continentais, isso mostrou que a população de *Ae. aegypti* de Fernando de Noronha é evolutivamente próxima das populações continentais.

Para o cluster Epsilon foi observado um maior número de mosquitos de Fernando de Noronha compartilhando haplótipos com a população de Porto Novo, ressaltando que nessas duas localidades não houve pressão de seleção ao temephos. Três hipóteses podem explicar estes resultados. A primeira, e mais provável, seria por polimorfismos ancestrais que se mantêm nas duas localidades, onde a colonização foi mais recente e pode ter ocorrido pela mesma fonte populacional. Além disso, os testes de neutralidade apontam que poucos genes do cluster Epsilon nessas duas populações estão sob efeito de seleção e é possível que os polimorfismos ancestrais ainda se mantenham, pois em campo essas duas populações não estão sofrendo pressão de seleção pelo inseticida temephos. Chang *et al.* (2016) observaram que na província de Yunnan na China, local onde os piretróides não são frequentemente utilizados, em duas populações de *An. sinenses* os testes de neutralidade não forneceram evidências de seleção em regiões do gene que codifica o canal de sódio. Por outro lado, na parte central da China, onde há o uso intenso de piretróides, foi observada uma diminuição da variabilidade genética no gene *Nav*, com alta frequência da mutação *kdr* (L1014F). Os autores sugerem que a baixa variação nas regiões adjacentes desse gene pode ser consequência de uma varredura seletiva recente associada ao uso intenso de inseticidas após a seleção e/ou fixação dos genótipos de resistência.

As outras duas hipóteses, menos prováveis, seriam a possibilidade de ocorrência de fluxo gênico entre as populações, mediado pela dispersão passiva de mosquitos adultos ou ovos, através de transporte marítimo, embora não existam registros conhecidos de rotas frequentes de embarcações direta entre as duas ilhas e a terceira hipótese, por processo de convergência evolutiva. Apesar de haver diferentes hipóteses para compreender os resultados, o principal fator observado que contribuiu para a ausência de variabilidade do cluster Epsilon nas populações continentais foi o uso massivo e ininterrupto do temephos por um longo período de

tempo, em todo o país. Araújo *et al.* (2013) demonstraram ainda que mesmo uma população (Recife) do estado de Pernambuco, cujo a exposição ao temephos havia sido suspensa há mais de oito anos, a reversão da resistência ao composto acontecia de forma lenta, provavelmente por conta do fluxo gênico com outras populações locais ainda expostas ao organofosforado ou porque tal característica conferia vantagens adaptativas.

Melo-Santos *et al.* (2010) estabeleceram a linhagem RecR para estudos relacionados com a resistência ao temephos e essa vem sendo mantida desde então sob pressão de seleção por mais de 40 gerações. Um trabalho prévio do grupo utilizando o *detox chip* identificou, de forma limitada, um pequeno conjunto de genes superexpressos em amostras de RecR da F₂₀ (STRODE *et al.*, 2012). No atual estudo foi investigado o transcriptoma total de intestinos de larvas da RecR comparado a linhagem susceptível RecL, o objetivo foi detectar de forma pioneira nesta espécie o perfil de diferencial de genes e vias metabólicas que estão sendo expressos em resposta a exposição contínua ao temephos. A informação sobre a expressão gênica é importante para caracterizar a função dos genes envolvidos no processo biológico estudado e a descoberta de novos genes candidatos (YAN *et al.*, 2012).

A análise comparativa do transcriptoma entre RecR x RecL mapeou 6.084 genes, com padrões de expressão gênica distintos entre as duas linhagens. Foram identificados 202 genes induzidos e 106 genes reprimidos na linhagem resistente. Uma quantidade significativa destes genes está relacionada com a resistência metabólica e a detoxificação de xenobióticos. Outros estudos com espécies diferentes de insetos também obtiveram resultados similares ao nosso (GRIGORAKI *et al.*, 2015; YAN *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2015).

A família das oxidases de função múltiplas (P450) identificada pela sigla CYP foi super-representada no RNAseq, correspondendo a pelo menos 23 genes induzidos, formando cinco grupos, CYP3, CYP4, CYP6, CYP9 e CYP12. A família CYP6, a mais representada, com 12 genes, é específica de insetos e possui relações evolutivas com as famílias CYP3 e CYP5 de vertebrados. Estudos vinculam os membros da família CYP6 ao metabolismo dos xenobióticos (FEYEREISEN, 2006; GRIGORAKI *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2015). A atividade enzimática total das CYPs na linhagem RecR foi avaliada por Araújo *et al.* (2013), de acordo com esses resultados, essas enzimas apresentam alteração moderada em sua atividade enzimática, esses dados mostram concordância com os dados obtidos neste trabalho.

O estudo de Weedall *et al.* (2019) investigou o transcriptoma de *An. funestus* resistente aos piretróides e identificou polimorfismo cis-regulatório no gene *CYP6P9a* que leva à superexpressão deste gene e reduz a eficácia dos mosquiteiros tratados com o inseticida, o seu

ortólogo em *Ae. aegypti* não foi identificado nos dados de RNAseq deste trabalho. Em *Cx. quinquefasciatus*, as P450 também apresentaram um papel protagonista no metabolismo do inseticida bendiocarb (SILVA MARTINS *et al.*, 2019), embora para algumas linhagens resistentes ao biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus* não tenha sido detectada tal associação, uma vez que os genes que codificam para essas enzimas foram identificados tanto em indução como em repressão (MENEZES, 2019).

O nosso estudo identificou também, em menor quantidade, membros de GSTs das classes Epsilon (GSTE2, GSTE3 e GSTSE4), Sigma e Theta. A classe Epsilon, especificamente *GSTE2* têm sido frequentemente estudadas em populações africanas de *An. funestus* e *An. gambiae*, e associada/ implicada na resistência ao DDT (MITCHELL *et al.*, 2014; RIVERON *et al.*, 2014; WEEDALL *et al.*, 2019). Nos nossos dados não identificamos nenhum membro da classe Delta nos genes diferencialmente expressos, diferente do observado por Zhou *et al.* (2015) em *An. sinenses*, cuja classe esteve fortemente associada a resistência à deltametrina.

Na linhagem resistente ao temephos RecR identificamos genes que codificam para as esterases em indução (*CCEae3a*, *CCEae1c*, *CCEae3c*) e em repressão, (*CCEae5c*, AAEL028198) e em ambos os perfis, valores de (Log₂) FC não foram tão expressivos. Esses dados discordam de diversos trabalhos que assinalam essa família de enzima como principal responsável pelo metabolismo de organofosforados (ARAÚJO *et al.*, 2013, 2019; BISSET *et al.*, 2011; GRISALES *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2011; MONTELLA *et al.*, 2007). Grigoraki *et al.* (2015) e Poupardin *et al.* (2014) identificaram através da análise do transcriptoma total, de ensaios de quantificação da expressão gênica e também por identificação de polimorfismos nas sequências de aminoácidos, dois genes que codificam para esterases *CCEae3a* e *CCEae6a* e que são responsáveis pelo metabolismo do temephos em populações de *Ae. albopictus* da Grécia e *Ae. aegypti* da Tailândia. Paiva e colaboradores (2016) identificaram a localização de um QTL associado à resistência ao temephos em RecR, no cromossomo 2 denominado rtt1 (resistência ao temephos 1) e identificaram por análise de bioinformática um conjunto de genes que codificam esterases (*CCEae3a*, *CCEae1c*, *CCEae2c*, *CCEae3c*, *CCEae4c*, *CCEae5c* e *CCEae6c*) localizados na região de QTL mapeada, além disso, no trabalho de Paiva e colaboradores (2016) foi identificado no gene *CCEae5c* um aumento discreto, porém significativo de sua expressão (1,2x). Saavedra-Rodriguez *et al.* (2012) também identificaram o gene *CCEae5c* em superexpressão em *Ae. aegypti* resistente a permetrina. Esses resultados não corroboram com os nossos achados, haja vista que nos dados obtidos por transcriptoma e

mapeados com duas anotações do genoma de *Ae. aegypti* (AaegL5.1 e AaegL3.5) esse gene foi subexpresso em RecR, com valores de expressão relativa maior do que 3 vezes.

É importante destacar que todos os cinco genes que codificam para as esterases identificados nos dois perfis são membros do clado de alfa esterase, o grupo de atividade catalítica da família das carboxilesterases que tem sido associado com a função de detoxificação de xenobióticos e resistência aos inseticidas/organofosforados por meio de sequestro (LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007). É possível que as alfa esterases participam dos processos de metabolismo de diferentes inseticidas e em diferentes espécies de insetos, portanto mais estudos são necessários a fim de melhor elucidar o papel das esterases no metabolismo do temephos em RecR.

Os termos de ontologia do gene (GO) e vias metabólicas Kegg significativamente representados foram caracterizados para melhor compreensão dos mecanismos biológicos afetados pela indução e repressão de genes/proteínas. Três categorias da função molecular foram super-representadas: atividade de redutase, atividade catalítica e ligação. Esses termos também foram significativamente representados em *Cx. quinquefasciatus* resistente a permetrina (REID *et al.*, 2012). Em processos biológicos foram identificados termos relacionados com o metabolismo, manutenção e integridade do DNA, isso sinaliza que as larvas resistentes apresentam um padrão de resposta para danos no DNA, uma vez que a exposição contínua a inseticidas pode acarretar em aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e a indução de peroxidação de lipídeos, ambos danosos para o DNA. Segundo Mota *et al.* (2019) estes processos levariam a um aumento na expressão de genes relacionados com as funções de conservação e reparo do DNA, para a contínua manutenção e integridade do genoma.

Verificamos em nossos resultados que a categoria mais representativa obtida nas análises de KEGG esteve relacionada com o metabolismo, com destaque para o metabolismo de aminoácidos, carboidratos e lipídeos, os quais podem ter um papel importante no fitness de mosquitos. Diniz *et al.* (2015) identificaram a existência de custo biológico para a manutenção da resistência ao temephos na linhagem RecR. Essa linhagem apresentou menor concentração de lipídios e de carboidratos em comparação com a linhagem susceptível. Segundo os autores, este comportamento pode estar relacionado à maior produção de enzimas detoxificadoras, visto que a exposição ao inseticida atua como estímulo para a expressão genes participantes da via de metabolismo de açúcares, utilizados por sua vez como fonte energética no processo de degradação de xenobiótico, justificando assim, a indução dos genes que atuam nessas vias metabólicas. Rezende *et al.* (2019) identificaram genes superexpressos em uma linhagem de

Cx. quinquefasciatus resistente a bactéria *Lysinibacillus sphaericus* cepa IAB59 envolvidos com o metabolismo de lipídeos.

O metabolismo de outros aminoácidos na resistência ao temephos também atua de forma semelhante ao metabolismo de lipídeos e carboidratos mencionados previamente. Martin-Park *et al.* (2017) observaram que em larvas de *Cx. quinquefasciatus* expostas ao temephos a concentração do aminoácido arginina aumentou após exposição ao composto, os autores associaram esses resultados ao aumento na produção de energia em decorrência da atuação de enzimas detoxificadoras. Em nossos dados a via de metabolismo de arginina (aag00330) e de outros sete aminoácidos foram significativamente representadas em RecR.

Outras moléculas identificadas no transcriptoma, foram as proteases, quinases e fosfatases. Estudos mostram que essas moléculas atuam no processo de reposta imune e de digestão nos insetos (GULLEY; ZHANG; MICHEL, 2013; XING *et al.*, 2017; ZOU *et al.*, 2006). Em *Ae. aegypti* já foi demonstrado que as serino proteases podem atuar bloqueando a infecção pelo vírus dengue (CONWAY *et al.*, 2014), também pode atuar na detoxificação de diferentes inseticidas (HUANG *et al.*, 2006; SHITOMI *et al.*, 2006). Há também um estudo que mostra a participação desse gene no processo de disseminação do vírus chikungunya em *Ae. aegypti*, ao facilitar o escape do vírus do intestino médio (DONG *et al.*, 2017). O estudo com *Cx. pallens* forneceu a primeira evidência de que “zinc m1 metaloprotease” pode desempenhar um papel na regulação da resistência a deltametrina (ZOU *et al.*, 2016). No presente estudo foram identificados dois genes que codificam essas proteínas induzidas (AAEL012783 e AAEL012774), e embora o mecanismo de ação do inseticida deltametrina seja diferente, é possível que esse gene responda à exposição ao temephos. Algumas redes de interações proteicas identificadas nesse estudo foram constituídas por proteínas pertencentes a esses grupos de enzimas. O papel dessas proteínas no evento de resistência ao temephos também precisa ser melhor elucidado.

No RNAseq foram detectados LncRNA (RNAs não codificadores longos), esses genes podem regular a expressão gênica em processos fisiológicos, patológicos e imunológicos. Evidências mostram a importância dos lncRNAs na regulação das interações patógeno/hospedeiro, porém muitas funções desempenhadas por essas moléculas ainda são desconhecidas, principalmente nos insetos (SATYAVATHI; GHOSH; SUBRAMANIAN, 2017). Nos nossos dados identificamos LncRNA em indução e em repressão com altos valores de (Log2) FC. Sabe-se que lncRNAs não são conservados entre as espécies e sua expressão é específica no estágio do desenvolvimento e nos tecidos, estudos futuros na linhagem RecR

envolvendo essas moléculas são necessários para a compressão das possíveis funções desempenhadas pelos lncRNAs em *Ae. aegypti*. Ayres *et al.* (2011) identificaram nas regiões 3'UTR em genes de GSTs Epsilon, doze potenciais alvos de miRNA em *An. gambiae*, que é outra família de RNA que não codifica proteínas e também é reguladora da expressão gênica em eucariotos. Em resumo, a análise do transcriptoma de larvas resistentes ao temephos por RNAseq revelou uma gama de respostas de expressão diferencial de genes envolvidos em detoxificação, metabolismo, resposta a estresse oxidativo, imunidade, entre outros processos potencialmente associados com a resistência ao temephos.

Sumarizando nossos resultados, o transcriptoma evidenciou o papel fundamental do mecanismo metabólico na resistência ao temephos em RecR. A análise genética e bioquímica do GSTE2 de ambas as linhagens mostra diferenças importantes entre elas. Os polimorfismos encontrados entre as linhagens resistentes e suscetíveis fornecem informações valiosas para melhor compreender o modo de interação entre a enzima, seus substratos específicos e o GSH, embora acreditemos, mediante nossos dados, que outras GSTs também estejam desempenhando um papel na resistência metabólica e devam ser investigadas. O conjunto de dados apresentados nesta tese evidencia a importância do cluster Epsilon no metabolismo do temephos. No geral, nossos resultados também podem ser usados para apoiar o desenvolvimento de ferramentas úteis para monitorar a evolução da resistência e para desenhar estratégias adequadas de gerenciamento da resistência em populações naturais de mosquitos.

10 CONCLUSÃO

- a) A resistência ao temephos leva à superexpressão do gene *GSTE2* e à alterações na atividade enzimática das GSTs totais na linhagem RecR;
- b) A proteína resistente *GSTE2* RecR possui maior eficiência catalítica em relação a proteína susceptível *GSTE2* RecL. As quatro mutações presentes na sequência codificadora de *GSTE2* RecR são responsáveis pela aumento da eficiência catalítica da variante resistente;
- c) O inseticida temephos atua como inibidor da atividade enzimática de *GSTE2*. Na presença do temephos, a proteína recombinante susceptível *GSTE2* RecL é inibida pelo temephos comparada a proteína resistente *GSTE2* RecR;
- d) O perfil de baixa variabilidade genética para todos os membros de GST do Cluster Epsilon sugerem a fixação destes genes por processo de seleção pelo temephos e com evidências de *selective sweep*;
- e) A Linhagem RecR resistente ao temephos apresenta um perfil transcriptômico diferencial, em relação à linhagem RecL, colônia susceptível ao temephos, apresentando a superexpressão de um conjunto de genes envolvidos com a resistência metabólica, dentre eles genes da família CYP e membros do cluster Epsilon (*GSTE2*, *GSTE3* e *GSTE4*), bem como com a regulação de vias metabólicas específicas em resposta a exposição ao temephos.

REFERÊNCIAS

- AHOUA ALOU, L. P. *et al.* Distribution of ace-1R and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae* s.s. populations from Côte d'Ivoire. **Malaria Journal**, Londres, v. 9, n. 1, 2010. Disponível em: <https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-9-167>. Acesso em: 11 jan. 2020.
- AI, J. *et al.* Genome-wide analysis of cytochrome P450 monooxygenase genes in the silkworm, *Bombyx mori*. **Gene**, Amsterdam, v. 480, n. 1–2, p. 42–50, 2011.
- APONTE, A. *et al.* Mechanisms of pyrethroid resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* from Colombia. **Acta Tropica**, Basel, v. 191, p. 146–154, 2019.
- ARAÚJO, A. P. *et al.* The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: A basis for management. **Parasites & Vectors**, Londres v. 6, n. 1, p. 122-133, 2013.
- _____. Screening *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Pernambuco, Brazil for resistance to temephos, diflubenuron, and cypermethrin and characterization of potential resistance mechanisms. **Journal of insect science**, Tucson, v. 19, n. 3, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6556078/>. Acesso em: 20 dez. 2019.
- ARAVINDAN, V.; MUTHUKUMARAVEL, S.; GUNASEKARAN, K. Interaction affinity of delta and epsilon class glutathione-s-transferases (GSTs) to bind with DDT for detoxification and conferring resistance in *Anopheles gambiae*, a malaria vector. **Journal of Vector Borne Diseases**, Delhi, v. 51, n. 1, p. 8–15, 2014. Disponível em: <http://www.mrcindia.org/journal/issues/511008.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2019.
- AYRES, C. *et al.* Comparative genomics of the anopheline glutathione s-transferase epsilon cluster. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 12, p. e29237, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0029237>. Acesso em: 01 dez. 2019.
- BALOGH, L. M. *et al.* Substrate Specificity Combined with stereopromiscuity in glutathione transferase A4-4-dependent metabolism of 4-hydroxynonenal. **Biochemistry**, Washington, v. 49, n. 7, p. 1541–1548, 23 fev. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2829664/>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- BARNES, K. G. *et al.* Genomic footprints of selective sweeps from metabolic resistance to pyrethroids in african malaria vectors are driven by scale up of insecticide-based vector control. **PloS Genetics**, San Francisco, v. 13, n. 2, p. e1006539, 2 fev. 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1006539> Acesso em: 02 dez. 2019.
- BASS, C.; FIELD, L. M. Gene amplification and insecticide resistance. **Pest Management Science**, West Sussex ,v.8, p. 886-890, 2011.
- BAYOH, M. *et al.* Persistently high estimates of late night, indoor exposure to malaria

vectors despite high coverage of insecticide treated nets. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 7, n. 1, p. 380-385, 2014.

BECKER, N.P.D. *et al.* **Mosquitoes and their control**. New York: Ed. Springer, 2010. 577 p.

BELLINATO, D. F. *et al.* resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in brazilian *aedes aegypti* populations. **BioMed Research International**, New York, v. 2016, p. 1–12, 2016.

BESERRA, E. B. *et al.* Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) populations to organophosphates temephos in the Paraíba State, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 2, p. 303–307, 2007.

BHARGAVI, R.; VISHWAKARMA, S.; MURTY, U. S. Modeling analysis of GST (glutathione-S-transferases) from *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. **Bioinformation**, Singapura v. 1, n. 1, p. 25–27, 2 jun. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1891627/> . Acesso em: 12 out. 2019.

BISSET, J. A. *et al.* Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 233–239, 2011.

BOARD, P. G. *et al.* Identification, characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 32, p. 24798–24806, 2000.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BORAH, H. *et al.* Glutathione-S-transferase-catalyzed reaction of glutathione for electrochemical biosensing of temephos, fenobucarb and dimethoate. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 9, n. 27, p. 4044–4051, 2017.

BRACCO, J. E. *et al.* Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: Evidence of multiple introductions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 572–579, 2007.

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.

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

BRENGUES, C. *et al.* Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 87–94, 2003.

BUSS, D. S.; CALLAGHAN, A. Molecular comparisons of the *Culex pipiens* (L.) complex

esterase gene amplicons. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 433–441, 2004.

BUSS, D. S.; MCCAFFERY, A. R.; CALLAGHAN, A. Evidence for p-glycoprotein modification of insecticide toxicity in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 218–222, 2002.

CARRASCO, D. *et al.* Behavioural adaptations of mosquito vectors to insecticide control. **Current Opinion in Insect Science**, Amsterdam, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214574518301469>. Acesso em: 05 jan. 2020.

CASIDA, J. E. Pesticide interactions: mechanisms, benefits, and risks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 65, n.23, p.4553-4665, 2017.

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

CAVALCANTI, A. **Caracterização da resistência aos piretroides pelo mecanismo de penetração reduzida em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), do estado de Pernambuco**. 2017. 98 f. Mestrado (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde)- Instituto Aggeu Magalhães. 2017.

CHANG, C. *et al.* A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 272–278, 2009.

CHANG, X. *et al.* Landscape genetic structure and evolutionary genetics of insecticide resistance gene mutations in *Anopheles sinensis*. **Parasites & Vectors**, Londres v. 9, n. 1, p. 228-233, 2016.

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.).

CHEDIAK, M. *et al.* Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 5, p. 311–321, 2016.

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

CHELVANAYAGAM, G.; PARKER, M.W.; BOARD, P.G Fly fishing for GSTs: a unique nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. **Chemical-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 133, n. 1-3, p. 256-260, 2001.

CONWAY, M. J. *et al.* Mosquito saliva serine protease enhances dissemination of dengue virus into the mammalian host. **Journal of Virology**, Washington, v. 88, n. 1, p. 164–175, 2014.

CORBEL, V.; N'GUESSAN, R. *Anopheles* mosquitoes- New insights into malaria vectors . Londres: Ed. InTech, 2013. 790p .

CRUZ, D. L. *et al.* Detection of alleles associated with resistance to chemical insecticide in the malaria vector *Anopheles arabiensis* in Santiago, Cabo Verde. **Malaria Journal**, Londres, v. 18, n. 1, p. 120-126, 2019.

DABIRÉ, K. R. *et al.* Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F kdr mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 103, n. 11, p. 1113–1120, 2009.

DASSANAYAKE, R. S.; SILVA GUNAWARDENE, Y. I. N.; TOBE, S. S. Evolutionary selective trends of insect/mosquito antimicrobial defensin peptides containing cysteine-stabilized α/β motifs. **Peptides**, New York, v. 28, n. 1, p. 62–75, 2007.

DAVID, J.-P. *et al.* Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, Londres, v. 368, n. 1612, p. 201-204, 2013.

DAVIDSON, G.; ZAHAR, A. R. The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 49, n. 5, p. 475–483, 1973.

DAVIES, T. G. E. *et al.* DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. **IUBMB Life**, Londres, v. 59, n. 3, p. 151–162, 2007.

DE ROODE, J. C.; LEFEVRE, T.; HUNTER, M. D. Self-medication in animals. **Science**, New York, v. 35, p. 150-155, 2013.

DERMAUW, W.; VAN LEEUWEN, T. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 45, p. 89-110, 2014.

DING, Y. *et al.* The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. **BMC genomics**, Londres v. 4, n. 1, p. 35-41, 2003.

DINIZ, D. F. A. *et al.* Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. **Parasites & vectors**, Londres, v. 8, p. 662-670, 2015.

DIRR, H.; REINEMER, P.; HUBER, R. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases: Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 220, n. 3, p. 645–661, 1994.

DJOGBÉNOU, L. *et al.* Characterization of Insensitive Acetylcholinesterase (<I>ace-1^{<I>R</I>}) in <I>Anopheles gambiae</I> (Diptera: Culicidae): Resistance Levels and Dominance</I>. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 44, n. 5, p. 805–

810, 2007.

DOI, A. M. *et al.* Molecular cloning and characterization of a glutathione S-transferase from largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver that is involved in the detoxification of 4-hydroxynonenal. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 67, n. 11, p. 2129–2139, 2004.

DONG, S. *et al.* Chikungunya virus dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* is associated with temporal basal lamina degradation during bloodmeal digestion. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 9, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5636170/>. Acesso em: 1 jan. 2020.

DURNEZ, L.; COOSEMANS, M. **Anopheles mosquitoes- New insights into malaria vectors** . Londres: Ed. InTech, 2013,790p .

DUSFOUR, I. *et al.* Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: Advances and challenges. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 10, p. e0007615, 2019. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007615>. Acesso em: 25 dez. 2019.

DZAKI, N. *et al.* Evaluation of reference genes at different developmental stages for quantitative real-time PCR in *Aedes aegypti*. **Scientific Reports**, Londres, v. 7 n. 1, p.1- 12 . 2017.

ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 3–8, 2005.

EPIS, S. *et al.* ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi*. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 7, n. 1, p. 349-355, 2014a.

EPIS, S. *et al.* Temporal dynamics of the ABC transporter response to insecticide treatment: Insights from the malaria vector *Anopheles stephensi*. **Scientific Reports**, Londres, v. 4 n. 2, p. 10-14, 2014b.

FAUCON, F. *et al.* In the hunt for genomic markers of metabolic resistance to pyrethroids in the mosquito *Aedes aegypti*: An integrated next-generation sequencing approach. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Londres, v. 11, n. 4, p. e0005526, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005526>. Acesso em: 30 dez. 2019.

FERRARI, J. A. Genetic Characterization of Esterase Activity Variants Associated with an Esterase Gene Amplification in a Strain of *Culex pipiens* from California. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 31, n. 1, p. 7–15, 2015.

FEYEREISEN, R. Evolution of insect P450. **Biochemical Society Transactions**, Londres, v. 34, n.6, p. 1525-1257, 2006.

FEYEREISEN, R. **Insect Molecular Biology and Biochemistry**, Amsterdam: Ed. Elsevier, 2012. 574p.

FIGUEIRA-MANSUR, J. *et al.* Silencing of *P-glycoprotein* increases mortality in temephos-treated *Aedes aegypti* larvae. **Insect Molecular Biology**, Londres, v. 22, n. 6, p. 648–658, 2013.

FOURNIER, D. *et al.* Insect glutathione S-transferases: Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 3, p. 1840–1845, 1992.

FRANCESCHINI, A. *et al.* STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 41, n. D1, p. D808–D815, 2012.

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. **Biomolecular Engineering**, Amsterdam, v. 4, n. 23, p. 149-169, 2006.

GAHAN, L. J. *et al.* An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **PLoS Genetics**, Londres, v. 6, n. 12, p. 1–11, dez. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC21187898/>. Acesso em: 13 jan. 2020.

GAMBARRA, W. P. T. *et al.* Spatial distribution and esterase activity in populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) resistant to temephos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 2, p. 178–184, 2013.

GARCIA, G. DE A. *et al.* The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Londres, v. 12, n. 2, p. e0006227, 12 fev. 2018. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006227>. Acesso em: 13 out. 2019.

GARCÍA, G. P. *et al.* Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. **PLoS neglected tropical diseases**, Londres, v. 3, n. 10, p. e531, 13 out. 2009. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000531>. Acesso em 2 jan. 2020.

GEORGHIOU, G. **Managing Resistance to Agrochemicals**. New York: American Chemical Society, 1990. v. 421.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. L. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: Ed. E.McGraw-Hill, 2006. 1000p.

GRIGORAKI, L. *et al.* Transcriptome Profiling and Genetic Study Reveal Amplified Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance, in the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Londres, v. 9, n. 5, p. e0003771, 22 maio 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003771>. Acesso em 16 dez. 2019.

- GRIGORAKI, L. *et al.* Functional and immunohistochemical characterization of CCEae3a, a carboxylesterase associated with temephos resistance in the major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 74, p. 61–67, 2016.
- GRISALES, N. *et al.* Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control. **PLoS neglected tropical diseases**, Londres, v. 7, n. 9, p. e2438, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002438>. Acesso em: 16 jan. 2020.
- GULLEY, M. M.; ZHANG, X.; MICHEL, K. The roles of serpins in mosquito immunology and physiology. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 138–147, 2013.
- GUO, D. *et al.* ACE: an efficient and sensitive tool to detect insecticide resistance-associated mutations in insect acetylcholinesterase from RNA-Seq data. **BMC bioinformatics**, Londres, v. 18, n. 1, p. 330–336, 2017.
- HADDI, K. *et al.* Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. **Scientific Reports**, Londres, v. 7, p. 46549–64553, 2017.
- HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Londres, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HARRIS, A. F.; RAJATILEKA, S.; RANSON, H. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 83, n. 2, p. 277–284, 2010.
- HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. GLUTATHIONE TRANSFERASES. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 45, n. 1, p. 51–88, 2005.
- HELVECIO, E. **Caracterização funcional do gene da Glutathiona-S-Transferase Epsilon 2 (GSTE2) em *Aedes aegypti***. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) –Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2014.
- HELVECIO, E. *et al.* Polymorphisms in GSTE2 is associated with temephos resistance in *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdã, v. 165, n. 5, p. 1–10, 2020.
- 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.
- HEMINGWAY, J.; DAVIDSON, G. Resistance to organophosphate and carbamate insecticides in *Anopheles atroparvus*. **Parassitologia**, Roma, v. 25, n. 1, p. 1–8, 1983.
- 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.
- HOTELIER, T. *et al.* ESTHER, the database of the / -hydrolase fold superfamily of proteins. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 32, n. 90001, p. 145 – 147, 2004.

HUANG, L. F. *et al.* Aminopeptidase P mediated detoxification of organophosphonate analogues of sarin: Mechanistic and stereochemical study at the phosphorus atom of the substrate. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 7, n. 3, p. 506–514, 2006.

IBRAHIM, S. S. *et al.* Allelic Variation of Cytochrome P450s Drives Resistance to Bednet Insecticides in a Major Malaria Vector. **PLOS Genetics**, Londres, v. 11, n. 10, p. e1005618, 30 out. 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1005618>. Acesso em: 20 jan. 2020.

INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE [S.l.]. **Prevention and Management of Insecticide Resistance in Vectors of Public Health Importance**. [S.l.], 2011. Disponível em: http://www.iraonline.org/content/uploads/VM-Layout-v2.6_LR.pdf. Acesso em: 30 dez. 2019.

KAKANI, E. G. *et al.* Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides. **Insect biochemistry and molecular biology**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 150–158, 2011.

KAMDEM, C. *et al.* Pollutants and Insecticides Drive Local Adaptation in African Malaria Mosquitoes. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 34, n. 5, p. 1261–1275, 2017.

KARUNAMOORTHY, K.; SABESAN, S. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Disease with Special Reference to Mosquitoes: A Potential Threat to Global Public Health. **Health Scope**, Palo Alto, v. 2, n. 1, p. 4–18, 2013.

KUSHWAH, R. B. S. *et al.* Pyrethroid-Resistance and Presence of Two Knockdown Resistance (kdr) Mutations, F1534C and a Novel Mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Londres, v. 9, n. 1, p. e3332, 8 jan. 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003332>. Acesso em 19 jan. 2020.

LABORDE, E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. **Cell Death and Differentiation**, Londres, v. 9, n. 17, p. 1373–1380, 2010.

LEHMANN, T. *et al.* Molecular evolution of immune genes in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 2, p. e4549, 2009. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004549>. Acesso em: 19 dez. 2019.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. popart: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, Sheffield, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.

LESGARDS, J.-F. *et al.* Effect of reactive oxygen and carbonyl species on crucial cellular antioxidant enzymes. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 190, n. 1, p. 28–34, 2011.

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or

without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 12, n. 1, p. 323-330, 2011.

LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. **Annual Review Entomology**, Palo Alto v. 52, p. 231–253, 2007.

LI, Y. et al. Evidence for multiple-insecticide resistance in urban *Aedes albopictus* populations in southern China. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 11, n. 1, 2018.

LICHT, A.; SCHNEIDER, E. ATP binding cassette systems: Structures, mechanisms, and functions. **Central European Journal of Biology**, Varsóvia, v.6, n.1 , p. 20-25, 2011.

LIMA, E. et al. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 4, n. 1, p. 5, 2011.

LIMA, E. P. et al. *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 259–263, 2006.

LIMA, E. P.; GOULART, M. O. F.; NETO, M. L. R. Evaluation of the role of ATP-binding cassette transporters as a defense mechanism against temefos in populations of *Aedes aegypti*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 7, p. 964–966, 2014.

LIMOEE, M. et al. Detection of pyrethroid resistance and cross resistance to DDT in seven field-collected strains of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). **Journal of Biological Sciences**, Deira, v. 6, n. 2, p. 382–387, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOPACHIN, R. M.; GEOHAGEN, B. C.; GAVIN, T. Synaptosomal toxicity and nucleophilic targets of 4-hydroxy-2-nonenal. **Toxicological Sciences**, Sapporo, v. 107, n. 1, p. 171–181, 2009.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, Londres, v. 15, n. 12, p. 550-557, 2014.

LUMJUAN, N. et al. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti* White star. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 35, n. 8, p. 861–871, 2005.

_____. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1026–1035, 2007.

_____. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 203–209, 2011.

LUO, W.; BROUWER, C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. **Bioinformatics**, Oxford, v. 29, n. 14, p. 1830–1841, 2013.

MACORIS, M. D. L. G. *et al.* Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saude Publica**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 521–522, 1999.

MANNERVIK, B.; DANIELSON, U. H. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. **CRC critical reviews in biochemistry**, Cleveland, v. 23, n. 3, p. 283–337, 1988.

MARCOMBE, S. *et al.* 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. e30989, 21 fev. 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0030989>. Acesso em: 26 dez .2019.

MARTIN-PARK, A. *et al.* Profiles of Amino Acids and Acylcarnitines Related with Insecticide Exposure in *Culex quinquefasciatus* (Say). **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 1, p. e0169514, 13 jan. 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169514>. Acesso em: 31 dez. 2019.

MARTINS, A. J.; VALLE, D. **Insecticides - Basic and Other Applications**. Londres: Ed. Intech. 2012. 750p.

MARTINS, W. F. S. *et al.* Transcriptomic analysis of insecticide resistance in the lymphatic filariasis vector *Culex quinquefasciatus*. **Scientific Reports**, Londres, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

MATHENGE, E. M. *et al.* Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. **Journal of medical entomology**, Honolulu, v. 38, n. 4, p. 531–536, 2001.

MATTHEWS, B. J. *et al.* Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs arbovirus vector control. **Nature**, Londres, v. 563, n. 7732, p. 501–507, 2018.

MENEZES, H. S. **Avaliação da capacidade de competição de dois alelos de *Culex quinquefasciatus* que conferem resistência ao biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus***. 145f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde)- Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

MCILWAIN, C. C.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. **Oncogene**, Basingstoke, v. 25, n. 11, p. 1639–1648, 2006.

MELO-SANTOS, M. A. V. *et al.* Evaluation of a New Tablet Formulation Based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. israelensis for Larvicidal Control of *Aedes aegypti*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 859–860, 2001.

_____. 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.

MEYERS, J. I. *et al.* Increasing outdoor host-seeking in *Anopheles gambiae* over 6 years of vector control on Bioko Island. **Malaria Journal**, Londres, v. 15, n. 1, p. 239-246, 2016.

MITCHELL, S. N. *et al.* Metabolic and target-site mechanisms combine to confer strong DDT resistance in *Anopheles gambiae*. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e92662, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0092662>. Acesso em 25 dez. 2019.

MONTEIRO, F. A. *et al.* Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e3167, 18 set. 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003167>. Acesso em: 26 dez. 2019.

MONTELLA, I. R. *et al.* Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.

MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R.; VALLE, D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance--a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 4, p. 437-449, 2012.

MOROU, E. *et al.* A dehydrochlorinase-based pH change assay for determination of DDT in sprayed surfaces. **Analytical biochemistry**, New York, v. 378, n. 1, p. 60-64, 2008.

MOTA, M. B. S. *et al.* DNA damage response and repair in perspective: *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 3, n. 2, p. 2-14, 2019.

MOYES, C. L. *et al.* Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. e0005625, 20 jul. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28727779>. Acesso em 25 nov. 2019.

MULETA, A. W. **Glutathione transferases as detoxification agents: structural and functional studies**. 2016. 72f. Tese (Doutorado em Ciências da Vida Molecular)- Universidade de Turku, Turku, 2016.

MURRELL, S.; WU, S.-C.; BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 2, p. 239-247, 2011.

MUTHUSAMY, R.; SHIVAKUMAR, M. S. Susceptibility status of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos from three districts of Tamil Nadu, India. **Journal of vector borne diseases**, Delhi, v. 52, n. 2, p. 159-165, 2015.

NDENGA, B. A. *et al.* Malaria vectors and their blood-meal sources in an area of high bed net ownership in the western Kenya highlands. **Malaria Journal**, Londres, v. 15, n. 1, p. 76-82, 2016.

NEBERT, D. W. *et al.* The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, and Recommended Nomenclature. **DNA and Cell Biology**, New York, v. 10, n. 1, p. 1–14, 1991.

NIRANJAN REDDY, B. P.; 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**, v. 109, n. 4, p. 1165–1177, 2011.

NKYA, T. E. *et al.* Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 407–416, 2013.

OAKESHOTT, J. G. *et al.* Evolutionary genetics of Drosophila esterases. **Genetica**, Dordrecht, v. 90, n. 2–3, p. 239–268, 1993.

_____. **Comprehensive Molecular Insect Science**. Londres: Elsevier, 2005. 300p.

OAKLEY, A. Glutathione transferases: A structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*, New York, v. 2, p. 138-151, 2011.

OLIVEIRA, I. F. DE. **Caracterização molecular de membros de glutathione s-transferases da classe epsilon em processos biológicos de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (diptera: culicidae)**. 2014. 107f. Tese. (Doutorado em Biologia Animal)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

OMURA, T.; SATO, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. ii. solubilization, purification, and properties. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 239, n. 3, p. 2379–2385, 1964.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces**. Geneva: OMS, 1998. Disponível em: http://www.who.int/whopes/resources/who_cds_cpc_mal_98.12/en/. Acesso em: 19 fev. 2018

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **The use of DDT in malaria control. WHO position statement**. Geneva: OMS, 2007.

ORTELLI, F. *et al.* Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. **The Biochemical journal**, Londres, v. 373, n. Pt 3, p. 957–963, 2003

PAIVA, M. H. S. *et al.* Identification of a major Quantitative Trait Locus determining resistance to the organophosphate temephos in the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. **Genomics**, Amsterdã, v. 107, n. 1, p. 40–48, 2016.

PLAPP, F. W. Biochemical Genetics of Insecticide Resistance. **Annual Review of Entomology**, Palo alto, v. 21, n. 1, p. 179–197, 1976.

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.* Identification of Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Londres, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002743>. Acesso em: 02 dez. 2019.

PRIETO, A. V.; SUÁREZ, M. F.; GONZALEZ, R. Susceptibilidad de dos poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Cali (Valle, Colombia) a Temefos (Abate) y Triflumuron (Starycide). **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 45, n. 1, p. e7817, 2002.

QGIS A Free and Open Source Geographic Information System. Versão 3.1.2. Disponível em: <https://qgis.org/en/site/>. Acesso em: 2 mar. 2019.

QIU, Y. Q. KEGG Pathway Database. In: DUBITZKY W. *et al.* (ed.). Encyclopedia of Systems Biology. New York: Springer, 2013. Disponível em: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway:map00480. Acesso em: 20 jan. 2019

RANSON, H. *et al.* Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. **Science**, New York, v. 298, n. 5591, p. 179–181, 2002.

RAYMOND, M.; HECKEL, D. G.; SCOTT, J. G. Interactions between pesticide genes: model and experiment. **Genetics**, Austin, v. 123, n. 3, p. 543–51, 1989.

REID, W. R. *et al.* The Transcriptome Profile of the Mosquito *Culex quinquefasciatus* following Permethrin Selection. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 10, 5 out. 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047163>. Acesso em: 03 jan. 2020.

RELICH, R. F.; LOEFFELHOLZ, M. Zika Virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, Filadélfia, v. 37, n. 2, p. 253–267, 2017.

REZENDE, T. M. T. *et al.* A differential transcriptional profile by *Culex quinquefasciatus* larvae resistant to *Lysinibacillus sphaericus* IAB59 highlights genes and pathways associated with the resistance phenotype. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 12, n. 1, p. 407-413, 2019.

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**, Londres, v. 15, n. 2, p. 27- 32, 2014.

ROSE, R. I. Pesticides and public health: Integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 1, p. 17-23, 2001.

ROZAS, J. *et al.* DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 34, n. 12, p. 3299–3302, 2017.

RUSSELL, R. J. *et al.* The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. **Evolutionary applications**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 225–248, 2011a.

RUSSELL, T. L. *et al.* Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. **Malaria Journal**, Londres, v. 10, n. 1, p. 80–86, 2011b.

SAATLOU, Z. A. *et al.* Identification of novel Glutathione S-Transferases epsilon 2 mutation in *Anopheles maculipennis* s.s. (Diptera: Culicidae). **Heliyon**, Londres, v. 5, n. 8, p. 2019.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. *et al.* Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, Londres, v. 21, n. 1, p. 61–77, 2012.

_____. Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes after temephos selection. **Insect Molecular Biology**, Londres, v. 23, n. 2, p. 199–215, 2014.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. **Journal of Molecular Biology**, Londres, v. 234, n. 3, p. 779–815, 1993.

SARKADI, B. *et al.* Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: Participation in a chemoimmunity defense system. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 3, n.2, p. 23–29, 2006.

SATYAVATHI, V.; GHOSH, R.; SUBRAMANIAN, S. Long non-coding RNAs regulating immunity in insects. **Non-coding RNA**, Basel, v. 3, n.1, p. 12–19, 2017.

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**, Londres, v. 370, n. 2, p. 661–669, 2003.

SCARPASSA, V. M.; CARDOZA, T. B.; CARDOSO JUNIOR, R. P. Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 78, n. 6, p. 895–903, 2008.

SCIAN, M. *et al.* Comparison of epsilon- and delta-class glutathione S-transferases: the crystal structures of the glutathione S-transferases DmGSTe6 and DmGSTe7 from *Drosophila melanogaster*. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, Copenhagen, v. 71, n. Pt 10, p. 2089–2098, 2015.

SHEEHAN, D. *et al.* Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **The Biochemical journal**, Londres, v. 360, n. Pt 1, p. 1–16, 2001.

SHITOMI, Y. *et al.* A novel 96-kDa aminopeptidase localized on epithelial cell membranes

of *Bombyx mori* midgut, which binds to Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 139, n. 2, p. 223–233, 2006.

SMITH, L. B.; KASAI, S.; SCOTT, J. G. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 133, p. 1–12, 2016.

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.
Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3411583/>. Acesso em: 02 jan. 2020.

SYVANEN, M.; ZHOU, Z. H.; WANG, J. Y. Glutathione transferase gene family from the housefly *Musca domestica*. **Molecular & general genetics : MGG**, Berlin, v. 245, n. 1, p. 25–31, 1994.

TCHOUAKUI, M. *et al.* Fitness costs of the glutathione S-transferase epsilon 2 (L119F-GSTe2) mediated metabolic resistance to insecticides in the major African malaria vector *Anopheles funestus*. **Genes**, Basel, v. 9, n. 12, p. 3-13, 2018.

THOM, R. *et al.* The structure of a zeta class glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana*: Characterisation of a GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism. **Journal of Molecular Biology**, Londres, v. 308, n. 5, p. 949–962, 2001.

TMIMI, F.-Z. *et al.* Insecticide resistance and target site mutations (G119S ace-1 and L1014F kdr) of *Culex pipiens* in Morocco. **Parasites & vectors**, Londres, v. 11, n. 1, p. 51-55, 2018.

TOBA, G.; AIGAKI, T. Disruption of the microsomal glutathione S-transferase-like gene reduces life span of *Drosophila melanogaster*. **Genes**, Basel, v. 253, n. 2, p. 179–187, 2000.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, Basingstoke, v. 22, n. 47, p. 7369–7375, 2003.

VAIS, H. *et al.* The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 57, n. 10, p. 877–888, 2001.

VALLE, D. *et al.* Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 114, n. 3, p. 45-57, 2019.

VERDÍN-BETANCOURT, F. A. *et al.* In vitro inhibition of human red blood cell acetylcholinesterase (AChE) by temephos-oxidized products. **Scientific Reports**, Londres, v. 9, n. 1, p. 12-14, 2019.

VONTAS, J. G. *et al.* Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper,

Nilaparvata lugens. **The Biochemical journal**, Londres, v. 362, n. 2, p. 329–337, 2002.

VU, D. M.; JUNGKIND, D.; ANGELLE DESIREE LABEAUD. Chikungunya Virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, Philadelphia, v. 37, n. 2, p. 371–382, 2017.

WANG, J. Y.; MCCOMMAS, S.; SYVANEN, M. Molecular cloning of a glutathione S-transferase overproduced in an insecticide-resistant strain of the housefly (*Musca domestica*). **Molecular & general genetics : MGG**, Berlim, v. 227, n. 2, p. 260–6, 1991.

WANG, Y. *et al.* Structure of an insect epsilon class glutathione S-transferase from the malaria vector *Anopheles gambiae* provides an explanation for the high DDT-detoxifying activity. **Journal of Structural Biology**, Orlando, v. 164, n. 2, p. 228–235, 2008.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **The Pesticide Book**. Ohio:Ed. Meister Media Worldwide, 2004. 488p.

WEEDALL, G. D. *et al.* A cytochrome P450 allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 11, n. 484, p. 24-32, 2019.

WEILL, M. *et al.* The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. **Insect molecular biology**, Londres, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2004.

WILDING, C. S. *et al.* Parallel evolution or purifying selection, not introgression, explains similarity in the pyrethroid detoxification linked GSTE4 of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlim, v. 290, n. 1, p. 201–215, 2015.

WONGSANTICHON, J.; ROBINSON, R. C.; KETTERMAN, A. J. Epsilon glutathione transferases possess a unique class-conserved subunit interface motif that directly interacts with glutathione in the active site. **Bioscience reports**, New York, v. 35, n. 6, p. 60-68, 2015.

WONGTRAKUL, J. *et al.* Molecular cloning and expression of several new *Anopheles cracens* epsilon class glutathione transferases. **Protein and peptide letters**, Schiphol, v. 16, n. 1, p. 75–81, 2009.

XING, P. *et al.* Comparative Transcriptome Analyses of Resistant and Susceptible Near-Isogenic Wheat Lines following Inoculation with *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **International Journal of Genomics**, New York, v. 1, p.1-16, 2017.

XU, J. *et al.* Multi-country Survey Revealed Prevalent and Novel F1534S Mutation in Voltage-Gated Sodium Channel (VGSC) Gene in *Aedes albopictus*. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 10, n. 5, p. e0004696, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4856356/>. Acesso em: 18 dez. 2019.

YAHOUÉDO, G. A. *et al.* Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. **Scientific Reports**, Londres, v. 7, n. 1, p. 110-115, 2017.

YAN, L. *et al.* Transcriptomic and phylogenetic analysis of *Culex pipiens quinquefasciatus* for three detoxification gene families. **BMC Genomics**, Londres, v. 13, n. 1, p. 609-615,

2012.

ZAIM, M.; GUILLET, P. Alternative insecticides: An urgent need. **Trends in Parasitology**, New York, v.4, n.18, 161-163, 2002.

ZHANG, H.; LI, Z. X. In vitro and in vivo characterization of a novel insect decaprenyl diphosphate synthase: A two-major step catalytic mechanism is proposed. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 442, n. 1–2, p. 105–111, 2013.

ZHANG, J. *et al.* Midgut transcriptome of the cockroach *Periplaneta americana* and its microbiota: Digestion, detoxification and oxidative stress response. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 5, 1 maio 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859610/>. Acesso em 12 dez. 2019.

ZHOU, D. *et al.* Genomic Analysis of Detoxification Supergene Families in the Mosquito *Anopheles sinensis*. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 11, p. e0143387, 20 nov. 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0143387>. Acesso em 02 jan. 2020.

ZOU, F. *et al.* Identification of protease m1 zinc metalloprotease conferring resistance to deltamethrin by characterization of an AFLP marker in *Culex pipiens pallens*. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 9, n. 1, p. 172-178, 2016.

ZOU, Z. *et al.* Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: Possible involvement in embryonic development and innate immunity. **Insect Molecular Biology**, Londres, v. 15, n. 5, p. 603–614, 2006.

APÊNDICE A- LISTA DE GENES SUPEREXPRESSOS NA LINHAGEM RecR**Quadro 8-** Lista de genes induzidos na linhagem RecR de acordo com a anotação do Vectorbase.

(continua)

Nº	gene_id	Descrição	(Log2)FC	pvalor
1	AAEL014613	CYP9J24	3,55	1,09E-49
2	AAEL002005	CYP12F6	3,39	8,92E-20
3	AAEL006989	CYP6AG7	3,24	1,19E-57
4	AAEL007024	CYP6AG3	2,87	4,30E-48
5	AAEL025053	Não caracterizado	2,68	2,95E-19
6	AAEL014411	CYP304B3	2,64	8,99E-11
7	AAEL002138	triacylglycerol lipase, putative	2,60	2,29E-07
8	AAEL027370	LncRNA	2,56	9,13E-06
9	AAEL005179	Não caracterizado	2,56	2,92E-13
10	AAEL002670	AMP dependent ligase	2,49	1,61E-06
11	AAEL021861	CYP6AG4	2,41	3,50E-27
12	AAEL008560	glucosyl/glucuronosyl transferases	2,38	1,80E-41
13	AAEL003132	intraflagellar transport 52 homolog	2,34	7,87E-05
14	AAEL014617	CYP9J28	2,32	7,66E-24
15	AAEL021812	Não caracterizado	2,28	1,33E-13
16	AAEL011850	CYP315A1	2,27	3,09E-12
17	AAEL014371	glucosyl/glucuronosyl transferases	2,25	1,28E-29
18	AAEL027449	LNCRNA	2,23	6,26E-05
19	AAEL013262	Não caracterizado	2,20	2,01E-25
20	AAEL023819	LncRNA	2,19	2,68E-04
21	AAEL008266	Não caracterizado	2,16	1,06E-04
22	AAEL028635	CYP9J19	2,16	1,35E-15
23	AAEL022590	Não caracterizado	2,12	1,46E-04
24	AAEL001816	glucosyl/glucuronosyl transferases	2,07	2,92E-13
25	AAEL006990	Não caracterizado	2,03	1,23E-19
26	AAEL022132	Não caracterizado	2,02	9,03E-12
27	AAEL006353	sulfotransferase (sult)	1,94	2,01E-25
28	AAEL019847	Não caracterizado	1,93	5,22E-05
29	AAEL004188	Não caracterizado	1,91	4,41E-09
30	AAEL014893	CYP6BB2	1,88	6,50E-04
31	AAEL007741	sterol desaturase	1,88	4,61E-08
32	AAEL025530	Não caracterizado	1,85	2,47E-13
33	AAEL025363	Não caracterizado	1,84	1,89E-21
34	AAEL017302	Farnesol dehydrogenase	1,82	2,73E-05
35	AAEL006359	sulfotransferase (sult)	1,82	1,37E-15
36	AAEL005029	Não caracterizado	1,81	3,24E-04
37	AAEL004575	beta-galactosidase	1,80	9,51E-05
38	AAEL012704	Não caracterizado	1,79	1,28E-08
39	AAEL003954	juvenile hormone-inducible protein,	1,79	4,66E-12
40	AAEL001960	Cytochrome P450	1,78	2,12E-15
41	AAEL020124	Não caracterizado	1,78	5,64E-03
42	AAEL014609	CYP9J26	1,76	1,09E-12

Quadro 8- Lista de genes induzidos na linhagem RecR de acordo com a anotação do Vectorbase.

(continuação)

Nº	gene_id	Descrição	(Log2)FC	pvalor
43	AAEL007951	GSTE2	1,75	7,26E-03
45	AAEL012783	protease m1 zinc metalloprotease	1,75	1,81E-17
46	AAEL017334	Não caracterizado	1,75	3,53E-04
47	AAEL028145	Não caracterizado	1,74	6,82E-03
48	AAEL015070	alkaline phosphatase	1,74	1,63E-07
49	AAEL004805	potassium-dependent sodium-calcium	1,73	5,24E-03
50	AAEL009328	hydroxyacyl dehydrogenase	1,72	2,65E-12
51	AAEL008313	Não caracterizado	1,69	2,71E-09
52	AAEL013040	Não caracterizado	1,68	9,32E-03
53	AAEL019603	Não caracterizado	1,67	2,16E-16
54	AAEL027406	Não caracterizado	1,65	5,21E-08
55	AAEL008957	Não caracterizado	1,65	1,01E-05
56	AAEL026665	Pseudogene	1,63	5,26E-18
57	AAEL024524	Não caracterizado	1,62	6,61E-07
58	AAEL025895	Não caracterizado	1,59	9,32E-03
59	AAEL014684	CYP6F3	1,59	7,26E-03
60	AAEL008386	ATP-binding cassette sub-family	1,58	2,61E-12
61	AAEL021964	LncRNA	1,58	1,69E-02
62	AAEL002658	AMP dependent ligase	1,57	9,93E-04
63	AAEL017209	Não caracterizado	1,57	4,03E-04
64	AAEL026083	Não caracterizado	1,55	1,83E-02
65	AAEL006207	Não caracterizado	1,55	2,27E-17
66	AAEL004768	Não caracterizado	1,53	1,39E-03
67	AAEL005706	triacylglycerol lipase	1,52	8,59E-06
68	AAEL007010	CYP6AG4	1,51	3,67E-05
69	AAEL003195	Carboxy/choline esterase Alpha	1,51	7,57E-11
70	AAEL012929	Protein real-time	1,51	3,64E-03
71	AAEL003864	Não caracterizado	1,50	4,22E-03
72	AAEL011677	AMP dependent coa ligase	1,50	1,96E-02
73	AAEL020585	Não caracterizado	1,48	2,29E-07
74	AAEL009764	xaa-pro aminopeptidase	1,48	1,23E-06
75	AAEL011598	Gustatory receptor	1,47	7,51E-06
76	AAEL003971	Não caracterizado	1,47	9,68E-03
77	AAEL023844	Não caracterizado	1,47	4,08E-06
78	AAEL002917	Não caracterizado	1,46	5,86E-05
79	AAEL025740	Não caracterizado	1,44	9,73E-03
80	AAEL005043	ATP-dependent bile acid permease	1,44	6,68E-15
81	AAEL002107	sulfide quinone reductase	1,43	1,79E-08
82	AAEL012395	ATP-binding cassette transporter	1,43	5,11E-07
83	AAEL014886	4-aminobutyrate aminotransferase	1,43	1,22E-08
84	AAEL018042	Não caracterizado	1,43	3,33E-05
85	AAEL000904	Carboxylic ester hydrolase	1,43	2,44E-13
86	AAEL012774	protease m1 zinc metalloprotease	1,41	6,92E-16

Quadro 8- Lista de genes induzidos na linhagem RecR de acordo com a anotação do Vectorbase.

(continuação)

Nº	gene_id	Descrição	(Log2)FC	pvalor
87	AAEL007787	5-aminolevulinic acid synthase	1,41	1,26E-10
88	AAEL029008	Não caracterizado	1,41	3,05E-06
89	AAEL010529	Não caracterizado	1,40	2,01E-04
90	AAEL021106	Não caracterizado	1,40	4,12E-08
91	AAEL009128	CYP6M6	1,40	5,56E-03
92	AAEL004175	40S ribosomal protein S17	1,40	3,53E-08
93	AAEL001730	Não caracterizado	1,39	6,62E-04
94	AAEL009129	CYP6Z9	1,39	8,89E-11
95	AAEL016975	Não caracterizado	1,39	1,24E-05
96	AAEL009051	Thioredoxin Peroxidase.	1,39	6,68E-05
97	AAEL002085	CYP4H31	1,38	2,09E-07
98	AAEL004884	hemomucin	1,37	2,63E-06
99	AAEL023728	Não caracterizado	1,37	5,03E-03
100	AAEL025503	Não caracterizado	1,36	9,47E-03
101	AAEL003810	sugar transporter	1,34	5,07E-03
102	AAEL004203	Não caracterizado	1,34	8,59E-07
103	AAEL008157	Não caracterizado	1,33	3,17E-07
104	AAEL004676	(s)-2-hydroxy-acid oxidase	1,32	7,26E-05
105	AAEL014435	juvenile hormone-inducible protein,	1,32	7,26E-04
106	AAEL026023	Não caracterizado	1,32	8,44E-09
107	AAEL000044	ornithine decarboxylase	1,31	1,32E-05
108	AAEL015038	palmitoyl-protein thioesterase	1,31	6,45E-04
109	AAEL017071	Carboxylic ester hydrolase	1,31	2,19E-06
110	AAEL006995	sodium/solute symporter	1,30	2,51E-03
111	AAEL003184	mfs transporter	1,30	3,40E-03
112	AAEL007962	GSTE4	1,29	1,82E-07
113	AAEL001144	Não caracterizado	1,29	1,08E-04
114	AAEL007669	oxidoreductase	1,29	3,16E-02
115	AAEL008217	serine-type endopeptidase,	1,29	8,42E-05
116	AAEL027939	LncRNA	1,28	1,26E-02
117	AAEL027485	Pseudogene	1,28	6,90E-04
118	AAEL028024	LncRNA	1,28	1,55E-02
119	AAEL018273	Não caracterizado	1,27	2,74E-09
120	AAEL009945	Não caracterizado	1,26	1,17E-02
121	AAEL027751	Não caracterizado	1,26	9,13E-05
122	AAEL000314	malate dehydrogenase	1,26	1,66E-05
123	AAEL004486	valacyclovir hydrolase	1,25	5,13E-05
124	AAEL001844	zinc carboxypeptidase	1,25	6,15E-08
125	AAEL007131	sugar transporter	1,25	1,41E-02
126	AAEL010858	AMP dependent ligase	1,25	4,39E-04
127	AAEL012341	lysosomal acid lipase, putative	1,24	1,70E-02
128	AAEL012646	Não caracterizado	1,24	2,52E-05
129	AAEL004507	valacyclovir hydrolase	1,24	8,06E-08
130	AAEL022408	Não caracterizado	1,24	1,28E-06

Quadro 8- Lista de genes induzidos na linhagem RecR de acordo com a anotação do Vectorbase.

(continuação)

Nº	gene_id	Descrição	(Log2)FC	pvalor
131	AAEL003181	CCEAE3C	1,24	1,19E-12
132	AAEL012206	microtubule-associated protein tau	1,24	1,84E-05
133	AAEL017244	Não caracterizado	1,23	2,32E-03
134	AAEL023274	Não caracterizado	1,22	4,52E-03
135	AAEL005702	Não caracterizado	1,22	2,25E-02
136	AAEL008960	Regulator of telomere elongation helicase 1 homolog (EC 3.6.4.12)	1,21	2,52E-02
137	AAEL005152	Não caracterizado	1,21	1,17E-02
138	AAEL021532	Putative rhythmically	1,21	2,22E-08
139	AAEL010382	aldehyde oxidase	1,21	1,23E-06
140	AAEL007349	Não caracterizado	1,20	3,12E-03
141	AAEL005762	leucine-rich transmembrane proteins	1,20	2,96E-02
142	AAEL027539	Não caracterizado	1,20	2,49E-05
143	AAEL004743	multidrug resistance protein 2 (ATP-binding cassette protein c)	1,20	7,34E-04
144	AAEL003091	glucosyl/glucuronosyl transferases	1,19	8,04E-04
145	AAEL012685	Não caracterizado	1,19	2,38E-03
146	AAEL010926	Não caracterizado	1,18	2,30E-03
147	AAEL007816	CYP4D23	1,18	1,23E-06
148	AAEL001833	juvenile hormone-inducible protein, putative	1,18	3,73E-06
149	AAEL026582	Não caracterizado	1,17	1,67E-09
150	AAEL011313	Epoxide hydrolase	1,17	2,95E-09
151	AAEL003213	Não caracterizado	1,17	2,01E-02
152	AAEL022793	Não caracterizado	1,16	1,55E-02
153	AAEL007947	GSTE3	1,16	2,23E-04
154	AAEL014678	CYP6F2	1,16	3,00E-02
155	AAEL009475	carbamoyl-phosphate synthase	1,15	1,01E-03
156	AAEL011109	Não caracterizado	1,15	3,16E-02
157	AAEL024264	Não caracterizado	1,14	1,78E-03
158	AAEL014662	AMP dependent coa ligase	1,13	1,87E-03
159	AAEL008663	aldo-keto reductase	1,12	1,43E-02
160	AAEL002638	CYP9J6	1,12	9,03E-03
161	AAEL005127	ribonuclease UK114, putative	1,12	4,66E-02
162	AAEL008841	acyl-CoA oxidase	1,12	2,68E-07
163	AAEL008857	deoxyribonuclease I, putative	1,11	2,94E-06
164	AAEL005821	alanyl aminopeptidase	1,11	3,20E-06
165	AAEL002426	Não caracterizado	1,10	3,01E-05
166	AAEL002870	dipeptidyl peptidase iii	1,10	1,48E-05
167	AAEL020535	LncRNA	1,10	2,04E-02
168	AAEL025929	Não caracterizado	1,10	8,59E-06
169	AAEL009948	aldehyde dehydrogenase	1,09	2,06E-06
170	AAEL010540	alpha-amylase	1,09	8,36E-08
171	AAEL003317	alkaline phosphatase	1,09	9,51E-05

Quadro 8- Lista de genes induzidos na linhagem RecR de acordo com a anotação do Vectorbase.

(continuação)

Nº	gene_id	Descrição	(Log2)FC	pvalor
172	AAEL017297	CYP6M9	1,09	1,45E-04
173	AAEL025460	Não caracterizado	1,08	6,37E-03
174	AAEL003873	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	1,08	2,83E-03
175	AAEL010017	cytochrome B5 (cytb5)	1,08	2,39E-08
176	AAEL027157	Não caracterizado	1,08	1,89E-07
177	AAEL011928	Não caracterizado	1,08	3,13E-02
178	AAEL007637	AAA ATPase	1,07	2,39E-02
179	AAEL005605	adenylsulphate kinase	1,07	9,71E-06
180	AAEL012952	Não caracterizado	1,07	5,10E-06
181	AAEL011756	aldehyde dehydrogenase	1,07	3,68E-06
182	AAEL006700	trypsin, putative	1,07	2,04E-02
183	AAEL021099	Não caracterizado	1,06	5,61E-03
184	AAEL023597	Não caracterizado	1,05	3,41E-02
185	AAEL014958	galactokinase	1,05	4,71E-04
186	AAEL019722	Não caracterizado	1,05	3,53E-08
187	AAEL002353	Não caracterizado	1,05	1,99E-02
188	AAEL011741	GSTS1	1,05	3,68E-06
189	AAEL021728	Não caracterizado	1,04	7,84E-04
190	AAEL008632	ABC transporter	1,04	7,49E-04
191	AAEL008701	myoinositol oxygenase	1,04	4,44E-06
192	AAEL008144	AMP dependent ligase	1,03	4,10E-02
193	AAEL009601	pyridoxine kinase	1,03	3,73E-07
194	AAEL003722	ribonuclease UK114, putative	1,02	8,21E-03
195	AAEL000126	molybdopterin cofactor synthesis	1,02	1,32E-03
196	AAEL019857	Não caracterizado	1,02	3,36E-05
197	AAEL026716	Não caracterizado	1,01	4,07E-05
198	AAEL007375	pyruvate dehydrogenase	1,01	1,67E-05
199	AAEL013389	coproporphyrinogen iii oxidase	1,01	5,41E-04
200	AAEL013798	CYP4H33	1,01	6,61E-07
201	AAEL011496	chitinase	1,00	3,14E-02
202	AAEL013812	Não caracterizado	1,00	4,51E-05

Fonte: A autora.

APÊNDICE B-LISTA DE GENES SUBEXPRESSOS NA LINHAGEM RecR**Quadro 9-** Lista de genes reprimidos na linhagem RecR de acordo com a anotação do Vectorbase.

(continua)

Nº	gene_id	Descrição	(Log2)FC	pvalor
1	AAEL025999	40S ribosomal protein S17	-7,23E+12	2,38E-70
2	AAEL008330	hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase	-5,25E+12	2,51E-18
3	AAEL022291	LncRNA	-4,84E+12	1,57E-12
4	AAEL015140	Não caracterizado	-3,27E+12	1,34E-12
5	AAEL025170	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme-like	-3,24E+12	3,69E-12
6	AAEL013004	Não caracterizado	-2,63E+12	2,39E-06
7	AAEL010963	brain chitinase and chia	-2,60E+12	9,66E-35
8	AAEL001163	Macroglobulin/complement	-2,55E+12	7,35E-08
9	AAEL028017	LncRNA	-2,45E+12	2,09E-07
10	AAEL027171	Não caracterizado	-2,44E+12	3,35E-05
11	AAEL001478	bile acid beta-glucosidase, putative	-2,40E+12	7,85E-11
12	AAEL026761	Pseudogene	-2,32E+12	9,13E-05
13	AAEL011559	metalloproteinase, putative	-2,24E+12	1,48E-04
14	AAEL024532	TLR4 interactor with leucine rich repeats	-2,24E+12	7,00E-18
15	AAEL028195	LncRNA	-2,19E+12	2,75E-04
16	AAEL021447	galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase S-like	-2,18E+12	2,10E-05
17	AAEL006987	putative phosphatidate phosphatase	-2,17E+12	1,10E-05
18	AAEL027453	nucleoside diphosphate kinase-like	-2,12E+12	5,09E-04
19	AAEL022772	LncRNA	-2,08E+12	1,65E-04
20	AAEL022345	LncRNA	-2,05E+12	1,23E-04
21	AAEL024653	protein son of sevenless	-2,05E+12	1,47E-05
22	AAEL009339	activin receptor type I, putative	-2,02E+11	3,98E-05
23	AAEL002324	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog	-2,02E+12	6,43E-05
24	AAEL020314	protein NPC2 homolog	-2,01E+12	1,72E-04
25	AAEL005073	myosin-2 heavy chain-like	-2,00E+12	2,13E-06
26	AAEL020573	Não caracterizado	-1,99E+12	7,03E-05
27	AAEL022523	Não caracterizado	-1,99E+12	1,41E-03
28	AAEL013897	n-acetylglucosaminyltransferase vi	-1,87E+12	2,94E-07
29	AAEL004750	nonmuscle myosin heavy chain-A, putative	-1,86E+12	1,83E-05
30	AAEL000729	RNA-binding protein Musashi homolog Rbp6	-1,84E+12	7,56E-04
31	AAEL026999	Não caracterizado	-1,84E+12	1,35E-10
32	AAEL006522	turtle protein, isoform	-1,82E+12	4,38E-03

Quadro 9- Lista de genes reprimidos na linhagem RecR de acordo com a anotação do vectorbase.

(continuação)

Nº	gene_id	Descrição	(Log2)FC	pvalor
33	AAEL004798	Mucin-like peritrophin	-1,77E+12	6,28E-03
34	AAEL026339	LncRNA	-1,75E+12	7,01E-03
35	AAEL022334	LncRNA	-1,72E+12	4,19E-16
36	AAEL025610	Não caracterizado	-1,72E+12	1,92E-04
37	AAEL012827	endoplasmic	-1,71E+12	8,00E-17
38	AAEL014228	Pickpocket	-1,70E+12	4,64E-03
39	AAEL013349	lethal(2)essential for life protein, l2efl	-1,70E+12	5,87E-03
40	AAEL010263	Não caracterizado	-1,69E+11	3,04E-03
41	AAEL010326	Phosphotriesterase-related protein (EC 3,1	-1,69E+12	8,99E-11
42	AAEL003201	CCEAE5C	-1,66E+12	7,00E-18
43	AAEL028198	Carboxylic ester hydrolase	-1,66E+12	7,00E-18
44	AAEL001005	calreticulin	-1,66E+12	2,50E-17
45	AAEL026215	heat shock 70 kDa protein cognate 3	-1,63E+12	1,71E-10
46	AAEL022617	LncRNA	-1,61E+12	1,07E-02
47	AAEL023781	CREB-regulated transcription coactivator	-1,60E+12	1,68E-02
48	AAEL017987	pollen-specific leucine-rich repeat extensin-like protein 3	-1,58E+12	1,77E-02
49	AAEL027238	guanylate cyclase 32E	-1,57E+12	7,71E-03
50	AAEL008390	guanylate cyclase	-1,56E+12	1,44E-02
51	AAEL002102	ero1-like protein	-1,55E+12	2,23E-05
52	AAEL023525	probable serine/threonine-protein kinase kinX	-1,52E+12	1,87E-02
53	AAEL022695	Não caracterizado	-1,48E+12	3,20E-02
54	AAEL021147	Preproallatostatin	-1,46E+12	8,77E-05
55	AAEL005956	caspase (short)	-1,46E+12	8,77E-07
56	AAEL008202	serine-type endopeptidase,	-1,45E+12	2,89E-10
57	AAEL007060	lipase	-1,45E+12	1,70E-02
58	AAEL004505	serine collagenase 1 precursor, putative	-1,44E+12	4,05E-02
59	AAEL006708	hedgehog	-1,42E+12	1,76E-02
60	AAEL001256	Não caracterizado	-1,41E+12	1,30E-02
61	AAEL023629	rab GTPase-binding effector protein 1	-1,40E+12	1,68E-02
62	AAEL026540	LncRNA	-1,40E+12	4,70E-03
63	AAEL012837	Não caracterizado	-1,40E+12	1,08E-04
64	AAEL023005	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog	-1,39E+12	3,64E-02
65	AAEL004879	dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 3	-1,39E+12	1,50E-03
66	AAEL023709	Não caracterizado	-1,39E+12	1,50E-03

Quadro 9- Lista de genes reprimidos na linhagem RecR de acordo com a anotação do Vectorbase.

(continuação)

Nº	gene_id	Descrição	(Log2)FC	pvalor
67	AAEL010337	CRAL/TRIO domain-containing protein	-1,38E+12	2,43E-02
68	AAEL004410	protein phosphatase	-1,38E+12	4,78E-02
69	AAEL005638	60S ribosomal protein L7	-1,37E+12	7,67E-03
70	AAEL007668	mitochondrial ribosomal protein, S29, putative	-1,37E+12	2,54E-02
71	AAEL012344	lipase 1 precursor	-1,31E+12	6,00E-05
72	AAEL018117	Putative salivary secreted mucin 3	-1,31E+12	1,64E-03
73	AAEL023112	Não caracterizado	-1,28E+12	3,53E-08
74	AAEL010384	aldehyde oxidase	-1,28E+12	2,96E-04
75	AAEL011564	choline-phosphate cytidyltransferase a, b	-1,28E+12	3,46E-04
76	AAEL012557	serine collagenase 1 precursor, putative	-1,28E+12	2,18E-02
77	AAEL005027	acidic ribosomal protein P1, putative	-1,28E+12	1,91E-05
78	AAEL014339	proteína não caracterizada F13E9,13, mitochondrial	-1,28E+12	1,86E-02
79	AAEL006327	sulfotransferase (sult)	-1,27E+12	1,36E-06
80	AAEL011708	heat shock protein	-1,27E+12	6,24E-05
81	AAEL010572	late endosomal/lysosomal MP1 interacting protein, putative	-1,26E+12	1,73E-02
82	AAEL008600	zinc carboxypeptidase	-1,25E+12	5,26E-07
83	AAEL018137	Não caracterizado	-1,24E+12	1,23E-06
84	AAEL003921	ubiquitin, putative	-1,24E+12	3,41E-02
85	AAEL011191	protein phosphatase 1 binding protein	-1,23E+12	6,90E-04
86	AAEL000811	GPCR Methuselah Family	-1,19E+12	9,65E-03
87	AAEL021232	UDP-N-acetylglucosamine--dolichyl-phosphate	-1,19E+12	3,05E-02
88	AAEL022333	Não caracterizado	-1,17E+12	1,03E-04
89	AAEL005425	cyclin-G-associated kinase	-1,16E+12	2,43E-02
90	AAEL007052	lipase	-1,16E+12	3,42E-06
91	AAEL017331	gamma-glutamyltranspeptidase 1	-1,15E+12	4,25E-02
92	AAEL008398	leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 1	-1,15E+12	1,78E-02
93	AAEL023643	chymotrypsin-2-like	-1,14E+12	6,68E-05
94	AAEL013441	Toll-like receptor	-1,14E+12	4,39E-04
95	AAEL006181	amidase	-1,13E+12	6,64E-02
96	AAEL027611	spectrin beta chain, non-erythrocytic 5	-1,13E+12	2,46E-06
97	AAEL009682	serine collagenase 1 precursor, putative	-1,13E+12	2,09E-06
98	AAEL011099	molybdopterin-binding	-1,12E+12	1,57E-03
99	AAEL011888	serine-type endopeptidase,	-1,12E+12	8,74E-07

Quadro 9- Lista de genes reprimidos na linhagem RecR de acordo com a anotação do Vectorbase.
(continuação)

Nº	gene_id	Descrição	(Log2)FC	pvalor
100	AAEL000744	troponin C	-1,12E+12	1,67E-04
101	AAEL005701	retinaldehyde binding protein	-1,11E+12	8,00E-03
102	AAEL000807	tetratricopeptide repeat protein, putative	-1,10E+12	3,49E-04
103	AAEL013963	tumor necrosis factor induced protein	-1,10E+12	2,93E-02
104	AAEL006171	n-myc downstream regulated	-1,03E+12	1,52E-03

Fonte: A autora.

APÊNDICE C- REDES DE INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS INDUZIDAS EM RecR

Quadro 10- Redes de interação entre proteínas induzidas em RecR.

X_mclCluster	Gene id	Anotação
1.Exchanger serine protease (7 genes)	AAEL012646-PA	proteína não caracterizada
	AAEL006995-PA	sodium/solute symporter
	AAEL006700-PA	trypsin, putative
	AAEL005762-PA	leucine-rich transmembrane proteins
	AAEL013040-PA	Vitamin K-dependent protein
	AAEL007131-PA	sugar transporter
	AAEL004805-PA	potassium-dependent sodium-calcium
2. 2 hydroxy acid oxidase (6 genes)	AAEL004676-PA	(s)-2-hydroxy-acid oxidase
	AAEL008701-PA	myoinositol oxygenase
	AAEL014352-PA	proteína não caracterizada
	AAEL003873-PA	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
	AAEL001804-PA	UDP-glucuronosyltransferase 2C1
	AAEL001816-PA	glucosyl/glucuronosyl transferases
3. protease m1 zinc metalloprotease (5 genes)	AAEL005821-PA	alanylaminopeptidase
	AAEL003317-PA	alkaline phosphatase
	AAEL015070-PA	alkaline phosphatase
	AAEL012783-PA	protease m1 zinc metalloprotease
	AAEL012774-PA	protease m1 zinc metalloprotease
4.aldehyde dehydrogenase (3 genes)	AAEL014886-PA	4-aminobutyrate aminotransferase
	AAEL009948-PA	aldehyde dehydrogenase
	AAEL017302-PA	Farnesol dehydrogenase
5. alpha amylase epoxide hydrolase (3 genes)	AAEL013798-PA	cytochrome P450(CYP4H33)
	AAEL010540-PA	alpha-amylase
	AAEL011313-PA	Epoxide hydrolase
6.ornithine decarboxylase pyridoxine kinase (2 genes)	AAEL009601-PA	pyridoxine kinase
	AAEL000044-PA	ornithine decarboxylase
7. adenylylphate kinase sulfide quinone (2 genes)	AAEL002107-PA	sulfide quinone reductase
	AAEL005605-PA	adenylylphate kinase
8.CYP6F2 (2 genes)	AAEL014678-PA	cytochrome P450 (CYP6F2)
	AAEL004203-PA	proteína não caracterizada
9.5 aminolevulinic acid synthase (2 genes)	AAEL013389-PA	coproporphyrinogen iii oxidase
	AAEL007787-PA	5-aminolevulinic acid synthase
10. CYP6_CYP3 (2 genes)	AAEL011850-PA	cytochrome P450 (CYP315A1)
	AAEL007010-PA	cytochrome P450 (CYP6AG4)
11.GSTE_GSTS (2 genes)	AAEL007962-PA	glutathione transferase(GSTE4)
	AAEL011741-PA	glutathione transferase (GSTS1)
12. GST_TPX (2 genes)	AAEL009051-PA	Thioredoxin Peroxidase.
	AAEL007951-PA	glutathione transferase(GSTE2)

APÊNDICE D- REDES DE INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS REPRIMIDAS EM RecR

Quadro 11- Redes de interação entre proteínas reprimidas em RecR.

X_mclCluster	Gene id	Anotação
1. acidic ribosomal p1 (4 genes)	AAEL008398-PA	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 1
	AAEL003921-PA	ubiquitin, putative
	AAEL005638-PA	60S ribosomal protein L7
	AAEL005027-PA	acidic ribosomal protein P1, putative
2. heat shock protein (4 genes)	AAEL017263-PA	hypoxia up-regulated protein 1
	AAEL012827-PA	Endoplasmin
	AAEL011708-PA	heat shock protein
	AAEL001005-PA	Calreticulin
3. protein subunit alpha (3 genes)	AAEL000807-PA	tetratricopeptide repeat protein, putativ
	AAEL004523-PA	preprotein translocase secy subunit (sec61)
	AAEL002102-PA	ero1-like protein
4. bile acid beta (3 genes)	AAEL004410-PA	protein phosphatase
	AAEL001478-PA	bile acid beta-glucosidase, putative
	AAEL005425-PA	cyclin-G-associated kinase-like
5. serine collagenase 1 (2 genes)	AAEL004505-PA	serine collagenase 1 precursor, putative
	AAEL009682-PA	serine collagenase 1 precursor, putative
6. serine type endopeptidase (2 genes)	AAEL008202	serine-type endopeptidase
	AAEL011888	serine-type endopeptidase

Fonte: A autora

APÊNDICE E- ARTIGO PUBLICADO

Pesticide Biochemistry and Physiology 165 (2020) 104464



Contents lists available at ScienceDirect

Pesticide Biochemistry and Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pestPolymorphisms in *GSTE2* is associated with temephos resistance in *Aedes aegypti*

Elisama Helvecio^{a,1}, Tatiya Patrícia Romão^{a,b,1}, Danilo de Carvalho-Leandro^b,
 Iêda Ferreira de Oliveira^c, Antonio Emanuel Holanda D. Cavalcanti^a, Lísa Reimer^a,
 Milena de Paiva Cavalcanti^c, Ana Patrícia Silva de Oliveira^d, Patrícia Maria Guedes Paiva^d,
 Thiago Henrique Napoleão^d, Gabriel Luz Wallau^e, Osvaldo P. de Melo Neto^b,
 Maria Alice Varjal Melo-Santos^a, Constância Flávia Junqueira Ayres^{a,1}

^a Department of Entomology, Instituto Aggeu Magalhães, RIOCED, Recife, PE 50740-465, Brazil

^b Universidade Federal de Pernambuco, CAP UPE, Recife, PE 50740-520, Brazil

^c Department of Biology, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE 52371-900, Brazil

^d Department of Biochemistry, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-420, Brazil

^e Department of Insect Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, United Kingdom

ARTICLE INFO

Keywords:

Aedes

Entomology

Glutathione S-Transferase

Oxidative stress

Gene expression

Insecticide resistance

ABSTRACT

The glutathione S-transferases (GSTs) are enzymes involved in several distinct biological processes. In insects, the GSTs, especially delta and epsilon classes, play a key role in the metabolism of insecticides used to control insect populations. Here, we investigated its potential role in insecticide resistance, examining the *GSTE2* gene from susceptible (RecL) and resistant (RecR) strains of the mosquito *Aedes aegypti*, vector for several pathogenic arboviruses. Total GST enzymatic activity and the *GSTE2* gene expression profile were evaluated, with the *GSTE2* cDNA and genomic loci sequenced from both strains. Recombinant *GSTE2* and mutants were produced in a heterologous expression system and assayed for enzyme kinetic parameters. These proteins also had their 3D structure predicted through molecular modeling. Our results showed that RecR has a profile of total GST enzymatic activity higher than RecL, with the expression of the *GSTE2* gene in resistant larvae increasing six folds. Rear exclusive RecR mutations were observed (L111S, I150V, E178A and A198K), which were absent in the laboratory susceptible strains. The enzymatic activity of the recombinant *GSTE2* showed different kinetic parameters, with the *GSTE2* RecR showing an enhanced ability to metabolize its substrate. The I150V mutation was shown to induce significant changes in catalytic parameters and a 3D modeling of *GSTE2* mapped two of the RecR changes (L111S and I150V) near the enzyme's catalytic pocket, also implying an impact on its catalytic activity. Our results reinforce a potential role for *GSTE2* in the metabolic resistance phenotype while contributing to the understanding of the molecular basis for the resistance mechanism.

1. Introduction

The mosquito *Aedes aegypti* is the main vector of the Dengue, Chikungunya and Zika viruses, responsible for diseases which together affect millions of people worldwide (Murrell et al. 2011; Rulich and Loeffelholz 2017; Vu et al. 2017). An important strategy for the reduction of the burden associated with the diseases caused by these arboviruses is vector control, and this has been based mainly on the

elimination of breeding sites and the use of chemical insecticides (Nkya et al. 2013). Resistance to insecticides however is a serious problem that has impacted the effort to reduce mosquito population numbers. Temephos is a powerful organophosphate larvicide that can effectively be used to control a number of pathogen-carrying insects, including mosquitoes. In Brazil, the intensive use of this larvicide for many years, as part of the national dengue control program, led to the emergence of *Ae. aegypti* resistant populations (Chesluk et al. 2016; Araújo et al.

Abbreviations: CDMB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; GSTE, Glutathione S-Transferase Epsilon class; GSTL, reduced glutathione; MscV, Voltage-gated sodium channel transmembrane protein; RecL, Recife susceptible strain; RecR, Recife resistant strain; RecRev, Recife resistant reversion strain

¹ Corresponding authors.

E-mail addresses: elisa@cpqam.fiocruz.br, tay@cpqam.fiocruz.br (T.P. Romão).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.10.002>

Received 9 May 2019; Received in revised form 10 September 2019; Accepted 13 October 2019

Available online 24 October 2019

0048-2875/ © 2019 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).