



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL  
DOUTORADO EM BIOLOGIA ANIMAL

IÊDA FERREIRA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MEMBROS DE GLUTATIONA  
S-TRANSFERASES DA CLASSE EPSILON EM PROCESSOS BIOLÓGICOS  
DE *Aedes aegypti* E *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA:  
CULICIDAE)**

RECIFE  
2014

Iêda Ferreira de Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MEMBROS DE GLUTATIONA  
S-TRANSFERASES DA CLASSE EPSILON EM PROCESSOS BIOLÓGICOS  
DE *Aedes aegypti* E *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA:  
CULICIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Animal.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

RECIFE  
2014

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Oliveira, Iêda Ferreira de**

**Caracterização molecular de membros de glutatona s-transferase da classe epsilon em processos biológicos de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)/ Iêda Ferreira de Oliveira– Recife: O Autor, 2014.**

**103 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia Animal, 2014.**

**Inclui bibliografia**

- 1. Mosquito 2. *Aedes aegypti* 3. *Culex* 4. Enzimas I. Ayres, Constância Flávia Junqueira (orientadora) II. Título**

**595.772**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2014- 225**

IÊDA FERREIRA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MEMBROS DE GLUTATIONA S-TRANSFERASES DA  
CLASSE EPSILON EM PROCESSOS BIOLÓGICOS DE *Aedes aegypti* E *Culex  
quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Animal.

**Avaliado em:** 30/07/2014

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres (Orientadora)  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

---

Dra. Alessandra Lima de Albuquerque (Examinadora Externa)  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

---

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira (Examinadora Interna)  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

---

Dra. Duschinka Ribeiro Duarte Guedes (Examinadora Externa)  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

---

Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos (Examinadora Externa)  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

---

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dedico este trabalho a Deus e aos amores da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de minha inspiração e segurança.

À minha orientadora Constância, pela paciência e confiança em meu trabalho. Muito obrigada por todo o aprendizado e amizade ao longo desses anos.

Ao meu companheiro Tomé, pelo imenso apoio em todos os momentos.

Ao meu pequeno Zaire, que me fez ver o mundo bem mais belo e feliz.

Aos meus pais, familiares e amigos, pelo incentivo e compreensão.

À Dra. Maria Alice, pelos momentos de reflexão, pelo apoio e carinho de sempre.

À equipe do insetário do CPqAM, pela obtenção e manutenção das colônias de mosquitos, além da amizade.

À Dra. Duschinka Guedes, pela assistência prestada na ocasião das infecções dos mosquitos. À Dra. Ana Paula de Araújo e à Dra. Liliane Amorim, por ceder o material biológico necessário à execução de parte desse trabalho.

Aos demais pesquisadores e colegas do Departamento de Entomologia, pela amizade e cumplicidade.

À equipe do NPT/CPqAM, por sua contribuição nas etapas do sequenciamento de genes e realização do RT-PCR em tempo real.

Ao CPqAM, pela infra-estrutura. Ao CNPq/PAPES VI, pelo apoio financeiro.

Ao PPGBA/UFPE, pela oportunidade de participar e concretizar o curso de Doutorado.

Ao Prof. André Esteves, por tudo e mais.

Aos membros da banca, por aceitar o convite.

A todos os que contribuíram, de uma forma ou de outra, para viabilização e finalização desse trabalho.

“Só conheço uma liberdade, e essa é a liberdade do pensamento.”

*(Antoine de Saint- Exupéry)*

OLIVEIRA, Iêda Ferreira. Caracterização molecular de membros de glutathione S-transferases da classe epsilon em processos biológicos de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). 2014. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

## RESUMO

As glutathione S-transferase (GSTs) constituem uma superfamília de enzimas envolvida em diversos processos biológicos, por exemplo, detoxificação metabólica, transporte intracelular de substratos hidrofóbicos e proteção contra radicais livres. Em artrópodes, as classes delta e epsilon destacam-se por sua função no metabolismo de inseticidas. Até o momento, pouco se conhece sobre a diversidade dos genes *GSTs* dentro e entre as populações, assim como a função desses genes em outros processos biológicos, tais como no desenvolvimento e na resposta ao estresse. Este trabalho teve o objetivo de analisar a diversidade genética e padrões de transcrição de genes *GSTs* em *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Sequências de DNA foram obtidas por amplificação e sequenciamento, enquanto a expressão gênica foi realizada por experimentos de RT-PCRq. Os resultados revelaram ausência de polimorfismo nos genes *GSTE2* e *GSTE3* de *Ae. aegypti*, além de assinaturas de seleção em três populações de *Cx. quinquefasciatus*. Após a infecção com o vírus Dengue (DENV), *Ae. aegypti* mostrou regulação gênica tecido-específica para os quatro genes avaliados ao longo do tempo, com destaque para *GSTO* e *GSTX1*. A expressão dos genes *GSTE2* e *GSTE3* em *Cx. quinquefasciatus* variou de acordo com o tecido, o estágio de vida e o sexo analisado. A partir dos resultados observados, pode-se concluir que: 1) os genes *GSTEs* provavelmente estão sendo selecionados ao longo do tempo, indicando que eles desempenham importante papel na sobrevivência desses culicídeos na natureza; 2) os mosquitos *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* são capazes de regular a expressão dos genes *GSTs*, no tempo e no espaço, de acordo com a natureza do estímulo.

**Palavras-chave:** dengue, estresse oxidativo, inseticidas, mosquito, resistência metabólica.

OLIVEIRA, Iêda Ferreira. Molecular characterization of epsilon glutathione S-transferase members in biological processes of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). 2014. Thesis (Doctorate in Animal Biology) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

## ABSTRACT

Glutathione S-transferases (GSTs) comprise a superfamily of enzymes involved in several biological processes, such as metabolic detoxification, intracellular transport of hydrophobic substrates and protection against free radicals. In arthropods, delta and epsilon classes are important for their role in the insecticides metabolism. To date, little is known about the GSTs genes diversity within and between populations, as well as the gene functions in other biological processes, such as development and stress responses. This study aimed analyzes the genetic diversity and the transcription patterns of *GSTs* genes in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. DNA sequences were obtained by amplification and sequencing, and gene expression was performed by RT-qPCR assays. The resulting data reveal no polymorphism in *Ae. aegypti* *GSTE2* and *GSTE3* genes, and signatures of selection in three populations of *Cx quinquefasciatus*. After dengue virus (DENV) infection, *Ae. aegypti* showed tissue-specific gene regulation for the four genes analyzed over time, mainly to *GSTO* and *GSTX1* genes. *Cx. quinquefasciatus* *GSTE2* and *GSTE3* gene expression varied according to body tissue, life stage and gender. From the observed results, we can conclude that: 1) the *GSTEs* genes probably have been selected over time, indicating their important role in mosquito survival in nature; 2) the *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes are able to regulating the expression of *GST* genes, in time and space, depending on the nature stimulus.

**Key words:** dengue, insecticides, metabolic resistance, mosquito, oxidative stress

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Fêmeas dos mosquitos <i>Culex quinquefasciatus</i> (A) e <i>Aedes aegypti</i> (B).	19
Figura 2 –	Ciclo biológico do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .	19
Figura 3 –	Modo de ação do inseticida sobre o inseto.	31
Figura 4 –	Estrutura de uma glutatona S-transferase de classe epsilon do vetor da malária <i>Anopheles gambiae</i> .	37
Figura 5 –	Etapas de investigação realizadas na caracterização molecular de membros <i>GSTs</i> em processos biológicos de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i> .	47
Figura 6 –	Mapa do Brasil (A) destacando o estado de Pernambuco (B) e os 11 sítios de coleta de <i>Aedes aegypti</i> usados neste estudo.	49
Figura 7 –	Mapa do Brasil (A) destacando o Estado de Pernambuco (B) e os sete sítios de coleta de <i>Culex quinquefasciatus</i> usados neste estudo.	50
Figura 8 –	Esquema da região amplificada para o gene <i>GSTE2</i> de <i>Aedes aegypti</i> .	52
Figura 9 –	Esquema da região para o gene <i>GSTE3</i> de <i>Aedes aegypti</i> .	53
Figura 10 –	Esquema da alimentação sanguínea artificial e infecção oral com vírus dengue em fêmeas do vetor <i>Aedes aegypti</i> .	55
Figura 11 –	Esquema da região amplificada para o gene <i>GSTE2</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	59
Figura 12 –	Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos dos genes <i>GSTE2</i> (A) e <i>GSTE3</i> (B) de <i>Aedes aegypti</i> .	64
Figura 13 –	Expressão relativa dos genes <i>GSTE2</i> , <i>GSTE3</i> , <i>GSTO</i> e <i>GSTX1</i> ao longo do tempo em diferentes tecidos de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> infectadas com o sorotipo 2 do vírus Dengue (DENV-2).	66
Figura 14 –	- Expressão relativa dos genes <i>GSTE2</i> , <i>GSTE3</i> , <i>GSTO</i> e <i>GSTX1</i> ao longo do tempo em diferentes tecidos de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> infectadas com o sorotipo 2 do vírus Dengue (DENV-2).	68
Figura 15 –	Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos do gene <i>GSTE2</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	72
Figura 16 –	Distribuição <i>mismatch</i> para 137 indivíduos de <i>Culex quinquefasciatus</i> provenientes de nove populações de Pernambuco.	75
Figura 17 –	Relações filogenéticas entre os 33 haplótipos do gene <i>GSTE2</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	77

Figura 18 – Relações filogenéticas entre as 137 sequências do gene *GSTE2* de *Culex quinquefasciatus*. 78

Figura 19 – Padrões de expressão relativa dos genes *GSTE2* e *GSTE3* de *Culex quinquefasciatus* ao longo do desenvolvimento (A) e em diferentes órgãos (B). 80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos <i>primers</i> usados para PCR dos genes <i>GSTE2</i> e <i>GSTE3</i> de <i>Aedes aegypti</i> .	53
Tabela 2 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-PCRq de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> infectados com DENV-2.	57
Tabela 3 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações de qRT-PCR da expressão de <i>GSTEs</i> ao longo do ciclo de vida e em diferentes tecidos de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	61
Tabela 4 – Diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) intrapopulacional com relação aos sítios sinônimos e não-sinônimos da região que codifica a enzima <i>GSTE2</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	71
Tabela 5 – Número de indivíduos observados para cada haplótipo do gene <i>GSTE2</i> nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	73
Tabela 6 – Frequência dos diferentes haplótipos do gene <i>GSTE2</i> encontrados entre as sequências analisadas nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	74
Tabela 7 – Índices de polimorfismos do gene <i>GSTE2</i> em nove populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	75
Tabela 8 – Estimativa da distância genética entre haplótipos <i>GSTE2</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	76
Tabela 9 – Matriz de diferenciação genética entre populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18S	DNA ribossomal 18S
<i>Ae.</i>	Gênero <i>Aedes</i>
<i>An.</i>	Gênero <i>Anopheles</i>
cm	Centímetro
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
C <sub>T</sub>	Cycle threshold
<i>Cx.</i>	Gênero <i>Culex</i>
<i>CYP</i>	Gene citocromo oxidase
d	Dia
<i>D</i>	Teste <i>D</i> de Tajima
DENV	Vírus Dengue
DL	Desequilíbrio de ligação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
dpi	dia pós-infecção
EC	Enzyme comission
EDTA	Ethylene diamine tetracetic acid
EST	Esterase
FFU	Focus forming space units (unidades formadoras de focos)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Fw</i>	Primer forward
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutationa S-transferase
GSTD	Glutationa S-transferase de classe delta
GSTE	Glutationa S-transferase de classe epsilon
GSTO	Glutationa S-transferase de classe omega
GSTX	Glutationa S-transferase de classe xi
h	Horas
<i>H</i>	Número de haplótipos
HCl	Ácido clorídrico
<i>Hd</i>	Diversidade haplotípica
IC	Incompatibilidade citoplasmática
IGR	Insect Growth Regulator (regulador de crescimento de insetos)
KCl	Cloreto de potássio
Da	Dalton

<i>kdr</i>	Knockdown resistance (resistência knockdown)
L1	Primeiro estágio larval
L2	Segundo estágio larval
L3	Terceiro estágio larval
L4	Quarto estágio larval
M	Molar
MAPEG	Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism
mg	Miligrama
MIP	Manejo Integrado de Pestes
ml	Mililitro
N	Número de amostras
ng	Nanograma
NJ	Neighbor Joining
nm	Nanômetro
nt	Nucleotídeo
P450	Enzima Citocromo Oxidase
pb	Pares de base
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PIE	Período de Incubação Intrínseco
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RIDL	Release of Insects carrying a Dominant Lethal
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
ERO	Espécie reativa do oxigênio
rpL8	Proteína ribossomal L8
RPM	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
<i>R<sub>v</sub></i>	Primer reverse
<i>S</i>	Número de sítios polimórficos
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TBE	Tris Borato Ethylene Diamine Tetracetic Acid
TE	Tris – Ethylene Diamine Tetracetic Acid
TIE	Técnica do Inseto Estéril
TII	Técnica do Inseto Incompatível
U	Unidade enzimática

UPGMA Método da Média Aritmética não-Ponderada  
*W* Gênero *Wuchereria*  
 $\pi$  Diversidade Nucleotídica

## SUMÁRIO

<b>1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA</b>	15
<b>2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL</b>	18
<b>2.1 Os mosquitos <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) e <i>Culex quinquefasciatus</i> (Say, 1823)</b>	18
2.1.1 Biologia e ecologia	18
2.1.2 Importância Médica	21
<b>2.2 Controle de mosquitos vetores</b>	23
2.2.1 Manejo ambiental	24
2.2.2 Controle biológico	25
2.2.3 Controle genético	27
2.2.4 Controle químico	27
2.2.4.1 Organoclorados	28
2.2.4.2 Organofosforados	29
2.2.4.3 Piretróides	29
2.2.4.4 Carbamatos	30
2.2.4.5 Reguladores do crescimento de insetos	30
<b>2.3 Resistência a inseticidas</b>	30
2.3.1 Modo de ação do inseticida	31
2.3.2 Resistência: definição e causa	31
2.3.3 Mecanismos de resistência a inseticidas químicos	32
<u>2.3.3.1 Alterações comportamentais</u>	33
<u>2.3.3.2 Penetração reduzida</u>	33
<u>2.3.3.3 Alteração do sítio-alvo</u>	33
<u>2.3.3.4 Resistência metabólica</u>	34
<b>2.4 Glutathione S-transferases</b>	35
2.4.1 Definição, nomenclatura e classificação	35
2.4.2 Estrutura e modo de ação das GSTs citosólicas	36
2.4.3 Evolução e organização genômica em artrópodes	37
2.4.4 Expressão gênica de glutathione S-transferases em artrópodes	39
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	43
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b>	44

<b>5 HIPÓTESES</b>	45
<b>6 OBJETIVOS</b>	46
<b>6.1 Objetivo Geral</b>	46
<b>6.2 Objetivos Específicos</b>	46
<b>7 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	47
<b>7.1 Considerações Éticas</b>	47
<b>7.2 Mosquitos</b>	48
7.2.1 Mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	48
7.2.2 Mosquitos <i>Culex quinquefasciatus</i>	49
<b>7.3 Análise de polimorfismos nos genes <i>GSTE2</i> e <i>GSTE3</i> de <i>Aedes aegypti</i></b>	50
7.3.1 Amostragem de <i>Aedes aegypti</i>	50
7.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de <i>GSTE2</i> e <i>GSTE3</i>	51
7.3.3 Análise das sequências de <i>Aedes aegypti</i>	54
<b>7.4 Transcrição de genes <i>GSTs</i> em diferentes tecidos de <i>Aedes aegypti</i> RecLab pós-infecção com DENV-2</b>	54
7.4.1 Infecção oral dos mosquitos com o DENV-2	54
7.4.2 Dissecção dos mosquitos e extração de RNA total	55
7.4.3 RT-PCRq e análise da expressão relativa	56
<b>7.5 Análise de polimorfismos no gene <i>GSTE2</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i></b>	58
7.5.1 Amostragem de <i>Culex quinquefasciatus</i>	58
7.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de <i>GSTE2</i>	58
7.5.3 Análise das sequências de <i>Culex quinquefasciatus</i>	59
<b>7.6 Expressão de genes <i>GSTEs</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i> ao longo do ciclo de vida e em diferentes tecidos</b>	60
7.6.1 Coleta do material biológico e extração de RNA total	60
7.6.2 RT-PCRq e análise da expressão relativa de <i>GSTEs</i>	60
<b>8 RESULTADOS</b>	63
<b>Diversidade dos genes <i>GSTE2</i> e <i>GSTE3</i> em populações de campo de <i>Aedes aegypti</i></b>	63
8.1.1 Diversidade do gene <i>GSTE2</i>	63
8.1.2 Diversidade do gene <i>GSTE3</i>	63
<b>8.2 Expressão tecido-específica de genes <i>GSTs</i> em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> após alimentação sanguínea com vírus Dengue</b>	64
8.2.1 Primeira alimentação	65

8.2.2 Segunda alimentação	67
<b>8.3 Diversidade do gene <i>GSTE2</i> em populações de campo de <i>Culex quinquefasciatus</i></b>	69
<b>8.4 Padrões de expressão de <i>GSTE2</i> e <i>GSTE3</i> em <i>Culex quinquefasciatus</i></b>	79
8.4.1 Expressão ao longo do ciclo de vida	79
8.4.2 Expressão tecido-específica	79
<b>9 DISCUSSÃO</b>	81
<b>9.1 Ausência de polimorfismo nos genes <i>GSTE2</i> e <i>GSTE3</i> de <i>Aedes aegypti</i></b>	81
<b>9.2 Expressão tecido-específica de <i>GSTs</i> de <i>Aedes aegypti</i> após infecção com dengue</b>	84
<b>9.3 Diversidade e expressão de genes <i>GSTEs</i> em <i>Culex quinquefasciatus</i></b>	87
<b>10 CONCLUSÕES</b>	91
<b>REFERÊNCIAS</b>	92

## 1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Glutathione S-transferases (GSTs) são importantes enzimas da fase II do processo de detoxificação metabólica, presentes em quase todos os seres vivos. Elas catalisam a conjugação de vários eletrófilos com a glutathione reduzida (GSH) e, conseqüentemente, detoxificam compostos tóxicos endógenos e exógenos (xenobióticos). Além disso, protegem os tecidos contra danos oxidativos e estão envolvidas no transporte intracelular de substratos hidrofóbicos específicos (FROVA, 2006). Estas enzimas estão divididas em três principais grupos, de acordo com sua localização na célula: citosólicas, microsossomais e mitocondriais (SHEEHAN et al., 2001).

A maioria das classes GSTs é codificada por famílias multigênicas cuja heterogeneidade é aumentada pela formação de heterodímeros (DIXON; COLE; EDWARDS, 1999) e *splicing* alternativo (KAMPKÖTTER et al., 2003; RANSON; COLLINS; HEMINGWAY, 1998). Devido a este alto nível de complexidade desses genes, determinar as funções fisiológicas de GSTs individuais é uma tarefa extremamente difícil.

Mosquitos contêm as GSTs citosólica e microsossomal, mas a classe mitocondrial é desconhecida em qualquer espécie de inseto. As GSTs citosólicas de artrópodes são agrupadas em oito classes: delta, epsilon, omega, sigma, theta, zeta, xi e iota. As classes delta e epsilon são exclusivas de artrópodes, compõem cerca de 65% das GSTs citosólicas e são responsáveis pelo metabolismo de compostos tóxicos estranhos ao organismo (RANSON et al., 2001).

Em *An. gambiae*, as GSTs são as enzimas responsáveis por metabolizar o inseticida DDT (RANSON et al., 1997; 2000; 2001). O mesmo foi constatado em *D. melanogaster* (TU; AKGUL, 2005), *Culex quinquefasciatus* (PRAPANTHADARA et al., 2000) e *Aedes aegypti* (POLSON et al., 2011). Esses estudos relacionaram a resistência a inseticidas ao aumento da atividade deidroclorinase das GSTs sobre a molécula de DDT.

Ding et al. (2003) demonstraram que apenas um gene da superfamília GST de *An. gambiae* não é expresso no mosquito adulto e que ocorre *splicing* alternativo em pelo menos dois transcritos. Além disso, estudos de mapeamento genético confirmaram que a região 33B do cromossomo 3 contém o *locus* que controla a resistência a DDT nessa espécie (RANSON et al., 2000). Ensaio bioquímico demonstraram que a classe epsilon, presente nesse mesmo *locus*, é responsável pelo desenvolvimento da resistência. Todos os genes da família epsilon aumentam sua expressão sob influência desse inseticida e, em particular, a enzima *GSTE2* não só tem sua expressão aumentada em relação às outras GSTs de classe epsilon, mas mostra elevada atividade DDTase (LUMJUAN et al., 2005; PRAPANTHADARA; KETTERMAN,

1993; RANSON et al., 2001). Acredita-se que mutações nas regiões promotoras desses genes estejam relacionadas ao desenvolvimento de resistência a esse composto (DING et al., 2005).

Em *Ae. aegypti*, existem 26 genes para GSTs, alguns dos quais sofrem *splicing* alternativo e geram 29 diferentes transcritos citosólicos (LUMJUAN et al., 2007). Também já foi demonstrada a relação entre a atividade elevada de GSTs de classe epsilon com o fenótipo da resistência aos inseticidas DDT (LUMJUAN et al., 2005) e deltametrina (LUMJUAN et al., 2011).

A publicação do genoma de *Cx. quinquefasciatus* trouxe novas especulações sobre a função e evolução de genes e famílias gênicas em vetores (ARENSBURGER, et al., 2010). Contando com um repertório de quase 19 mil genes, essa espécie exibe múltiplos eventos de expansão de famílias gênicas, incluindo genes associados com a detoxificação de xenobióticos (YAN et al., 2012). A caracterização *in silico* da superfamília GST revelou a presença de 40 genes, sendo 35 prováveis formas citosólicas e cinco microssomais (NIRANJAN-REDDY; PRASAD; RAGHAVENDRA, 2011). Esses dados podem refletir adaptações aos habitats larvais muito mais poluídos que essa espécie costuma colonizar, em comparação às outras espécies de mosquito. Análises de expressão gênica de membros GSTs específicos em diferentes estágios do ciclo de vida de *Culex* podem ajudar no esclarecimento dessa questão.

O Plano Nacional para Controle da Dengue (PNCD) empregou, no período de 1996 a 2011, o organofosforado temefós no controle do mosquito *Ae. aegypti*. Após a substituição dessa classe de inseticida por piretróides no controle de adultos, as GSTs mostraram rápida alteração no nível de atividade em pouco anos (MONTELLA et al., 2007). No Brasil, não existe um programa nacional para o controle de populações de *Cx. quinquefasciatus*. Entretanto, os inseticidas químicos aplicados nos criadouros preferenciais de *Aedes* também podem, eventualmente, alcançar as populações de *Culex*. A influência desses compostos nas populações de *Cx. quinquefasciatus* do Brasil foi pouco explorada no momento (AMORIM et al., 2012).

Recentemente, Riveron et al. (2014) demonstraram que uma única mudança de aminoácido (L119F) em um gene *GSTE2* é capaz de conferir altos níveis de resistência metabólica ao DDT na espécie *An. funestus*. Portanto, é possível que variantes alélicas de genes GSTs também possam estar presentes em populações de campo de outros mosquitos, conferindo resistência a inseticidas.

Apesar da gama de trabalhos sobre a importância das GSTs na resistência aos inseticidas, pouco se sabe sobre outros possíveis papéis biológicos em artrópodes, como

aqueles envolvidos em funções constitutivas, na manutenção da homeostase e na defesa contra o estresse oxidativo. Chen et al. (2011) demonstrou a importância das GSTs na proteção de células C6/36 de *Ae. albopictus* contra os efeitos nocivos causados pelas espécies reativas do oxigênio (EROs), decorrentes da infecção com o vírus Dengue. Todavia, esse estudo não abordou o envolvimento de genes *GSTs* específicos.

Dessa forma, o principal objetivo desse trabalho foi contribuir para a caracterização da evolução molecular e do perfil de expressão gênica de glutathione S-transferases da classe epsilon nas espécies *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* em diferentes processos biológicos, visando usar esses conhecimentos no manejo da resistência e no controle de arboviroses.

## 2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

### 2.1 Os mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823)

Os mosquitos pertencem ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera. Até o momento, já foram descritas cerca de 3400 espécies e subespécies de mosquitos, distribuídas em 38 gêneros, todos da família Culicidae (SERVICE, 1996). Diversos trabalhos sugerem que algumas espécies consistem de complexos de espécies muito relacionadas, o que indica a existência de muitas formas reprodutivamente isoladas e nicho-específicas sem identificação ou que estão sofrendo especiação. A classificação atual reconhece três subfamílias: Anophelinae, Toxorhynchitinae e Culicinae (FOSTER; WALKER, 2002).

Os mosquitos possuem ampla distribuição global: ocorrem em regiões tropicais e temperadas, estendendo-se a regiões mais frias no Círculo Ártico. As únicas áreas onde estão ausentes são a Antártica e em algumas ilhas. Podem ser encontrados em elevações de 5500 metros ou em profundidades de 1250 metros abaixo do nível do mar (SERVICE, 1996).

As mais importantes espécies vetoras pertencem aos gêneros *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Psorophora*, *Haemagogus* e *Sabethes*. Determinadas espécies de *Culex* transmitem *Wuchereria bancrofti* e uma variedade de arboviroses. Já o gênero *Aedes* contém importantes vetores de vírus da febre amarela, dengue, encefalites e muitos outros. Em algumas áreas restritas, também são vetoras de *W. bancrofti* e *Brugia malayi*. Embora outras espécies não sejam transmissoras de doenças, possuem importância médica, pois causam incômodos e até alergias, por conta das picadas (LOZOVEI, 2011; SERVICE, 1996).

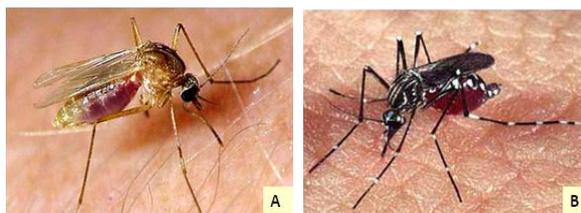
#### 2.1.1 Biologia e ecologia

*Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (Figura 1) são espécies trópico-cosmopolitas que, por sua estreita associação com o homem, são considerados mosquitos urbanos. Devido às características climáticas do Brasil, são amplamente encontrados no país (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Os mosquitos são insetos holometábolos (desenvolvem-se por metamorfose completa) e apresentam ciclo biológico que compreende as fases de ovo, quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Figura 2). Sua longevidade, desde a eclosão das larvas até a emergência do adulto, é relativamente curta (10-15 dias) em condições ambientais ótimas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FOSTER; WALKER, 2002).

Os ovos de *Ae. aegypti* medem, aproximadamente, um milímetro (mm) de comprimento e apresentam contorno alongado e fusiforme. São depositados individualmente nas paredes internas dos depósitos que servem como criadouros, próximos à superfície da água. A fecundação se dá durante a postura e o desenvolvimento do embrião se completa em 48 a 72 horas, em condições favoráveis de umidade e temperatura. Uma vez finalizado o desenvolvimento embrionário, os ovos são capazes de resistir a longos períodos de dessecação, fenômeno conhecido como diapausa (CLEMENTS, 1992). Essa condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias em recipientes secos, tornando-se o principal meio de dispersão do mosquito (dispersão passiva) e, conseqüentemente, um sério problema para seu controle.

Figura 1 – Fêmeas dos mosquitos *Culex quinquefasciatus* (A) e *Aedes aegypti* (B).



Fonte: Coxworth (2010) (A); Vieira (2010) (B).

Figura 2 – Ciclo biológico do mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: (Ovo) Centers for Disease Control (1982); (Larva) Russell (2000); (Pupa) Department of Medical Entomology (2000); (Adulto) Vieira (2010).

Por outro lado, as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* depositam seus ovos diretamente sob a lâmina d'água dos criadouros. Eles ficam agrupados sob a forma de jangada em número de 150 a 250 (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A seleção do local de oviposição é influenciada pelo feromônio de oviposição presente na superfície apical dos ovos, que tem a capacidade de atrair as fêmeas para criadouros já colonizados (FOSTER; WALKER, 2002).

As formas imaturas ocorrem no ambiente aquático e são representadas pelos quatro estádios larvais e um estágio de pupa. O corpo da larva está dividido em cabeça, tórax e abdômen, possuindo este último oito segmentos. O segmento posterior e anal do abdômen possui quatro brânquias lobuladas para regulação osmótica e um sifão para a respiração na superfície da água (SERVICE, 1996).

A fase larval é o período de alimentação e crescimento. As larvas são filtradoras e alimentam-se principalmente de material orgânico acumulado nas paredes e no fundo dos depósitos. A duração da fase larval depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade das larvas no criadouro (FOSTER; WALKER, 2002).

As pupas apresentam cefalotórax e abdômen, aparentando a forma de uma vírgula. Apesar de móveis, tendem a permanecer inativas, flutuando na superfície da água, o que facilita a saída do inseto adulto. Nessa fase do desenvolvimento, os indivíduos não se alimentam e levam de dois a três dias para atingir a forma adulta (CLEMENTS, 1992).

O adulto representa a fase reprodutiva do vetor. Enquanto *Ae. aegypti* é considerado um mosquito de porte médio, marrom escuro, com faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira no mesonoto; *Cx. quinquefasciatus* possui dorso pardo-escuro, com escamas amarelas. Em ambas as espécies, o macho se distingue essencialmente da fêmea por possuir antenas plumosas e palpos mais longos (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; LOZOVEI, 2011). Logo após a emergência, o inseto procura repousar por um período em que ocorre a esclerotinização da cutícula e, no caso dos machos, a rotação da genitália em 180°. Dentro de 24 horas após emergirem podem acasalar. Quanto à longevidade, as fêmeas vivem em média 40 a 45 dias, enquanto os machos 15 a 25 dias (CLEMENTS, 1992).

Machos e fêmeas de mosquitos alimentam-se de carboidratos extraídos dos vegetais. Porém, apenas as fêmeas realizam a alimentação sanguínea ou hematofagia, a fim de obter as proteínas necessárias à maturação dos ovos. A maior parte dos animais vertebrados serve como fonte de repasto, mas *Ae. aegypti* e *Cx. quinquefasciatus* mostram marcada predileção pelo homem (antropofilia) (FOSTER; WALKER, 2002). As fêmeas de *Ae. aegypti*

apresentam hábito alimentar diurno, com picos nas primeiras horas da manhã e ao anoitecer. Contrariamente, fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* demonstram hábitos hematofágicos noturnos. O intervalo entre a alimentação sanguínea e a postura é de aproximadamente três dias, em condições satisfatórias de temperatura (CLEMENTS, 1992).

Os criadouros preferenciais de *Cx. quinquefasciatus* são coleções de água parada, com elevada carga de matéria orgânica em decomposição e detritos, como córregos, valetas e fossas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Por sua vez, a fêmea de *Ae. aegypti* fisiologicamente pronta para a oviposição é atraída por recipientes escuros de superfície áspera, contendo água com baixo teor de matéria orgânica. Seus criadouros preferenciais são os artificiais de caráter temporário, representados por recipientes abandonados a céu aberto, preenchidos pelas águas das chuvas, assim como aqueles utilizados para armazenar água de uso doméstico, como caixas d'água, tonéis, latões e cisternas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; LOZOVEI, 2011). Elas são capazes de distribuir os ovos de um mesmo ciclo gonotrófico em vários criadouros, comportamento denominado *skip-oviposition* (APOSTOL et al., 1993; CLEMENTS, 1992; COLTON; CHADEE; SEVERSON, 2003).

### 2.1.2 Importância Médica

Provavelmente originário do Nordeste da África, o mosquito *Aedes aegypti* foi introduzido nas Américas durante a colonização europeia. No Brasil, é conhecido desde o século XVII, quando foi registrada a primeira epidemia de febre amarela, em Recife, no ano de 1685. Atualmente, é o principal transmissor dos vírus Dengue, Chikungunya e da febre amarela urbana no mundo (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; LOZOVEI, 2011).

A febre amarela é uma doença febril aguda, de curta duração (no máximo, 12 dias) e de gravidade variável, cujo agente etiológico é um arbovírus do gênero *Flavivirus* (família Flaviviridae). A forma grave caracteriza-se clinicamente por manifestações de insuficiência hepática e renal, que podem levar o paciente à morte (LOZOVEI, 2011). É encontrada em países da África, das Américas Central e do Sul. Na forma urbana, que não ocorre no Brasil desde 1942, o vírus é transmitido pela picada do mosquito *Ae. aegypti* e a fonte de infecção é o homem. Na forma silvestre, a transmissão ocorre a partir de um macaco infectado para o homem, através da picada de mosquitos do gênero *Haemagogus*, em um ciclo envolvendo macaco-mosquito-homem. A vacinação é uma das formas mais eficazes de combater essa enfermidade (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999).

A dengue é uma doença reemergente e tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública internacional, cuja prevalência global tem crescido vertiginosamente nas últimas décadas. Estima-se que 50 a 100 milhões de infecções ocorram anualmente, incluindo 22 mil mortes, a maioria entre crianças (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2014b). Em sua forma clássica, essa arbovirose causa um quadro febril agudo, caracterizado por dores musculares e articulares intensas. Na forma hemorrágica e na síndrome do choque da dengue, a febre é alta, com manifestações hemorrágicas, hepatomegalia e insuficiência circulatória. A letalidade é significativamente maior do que na forma clássica, dependendo da capacidade do atendimento médico-hospitalar da localidade (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2014b; LOZOVEI, 2011).

A dengue tem como agente um arbovírus (gênero Flavivírus, família Flaviviridae) para o qual existem os sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, além do recentemente descoberto sorotipo 5, isolado de um paciente na Tailândia (MAMANI, 2014). A infecção por um deles pode conferir proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária contra os outros três. A transmissão ocorre quando a fêmea da espécie vetora se contamina ao picar um indivíduo infectado que se encontra na fase virêmica da doença, tornando-se, após um período de 10 a 14 dias, capaz de transmitir o vírus por toda sua vida através de suas picadas (LOZOVEI, 2011).

O processo descontrolado de urbanização, bem como o intenso tráfego de pessoas e de mercadorias, facilita a dispersão dos mosquitos e do vírus. Como não há uma vacina disponível para o controle da doença, o combate ao vetor passa a ser o único caminho para a prevenção de epidemias dessa doença (FOSTER; WALKER, 2002; LOZOVEI, 2011).

O arbovírus da febre Chikungunya pertence à família Togavirida, gênero *Alphavirus*. Ele foi detectado pela primeira vez em 1953, em um doente febril na Tanzânia (África). Desde então, alastrou-se por diversas regiões e causou inúmeras epidemias em vários países da África, da Ásia e, mais recentemente, da Europa e Américas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2014a; LOZOVEI, 2011). A infecção por Chikungunya assemelha-se à infecção por dengue, provocando doença febril aguda com artralgias e erupções cutâneas. Em áreas urbanas endêmicas, o vírus é transmitido aos humanos via picadas infectantes de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Em humanos, após a picada do mosquito infectado, o arbovírus desencadeia a doença dentro de 2 a 12 dias. Ainda não existem vacinas nem tratamento antiviral específico para essa doença (LOZOVEI, 2011).

Nas Américas, o mosquito *Culex quinquefasciatus* é o principal vetor da *Wuchereria bancrofti*, agente etiológico da filariose linfática. A filariose linfática é um grave problema de

saúde pública em vários países, atingindo cerca de 120 milhões de pessoas no mundo. Em sua forma sintomática, essa doença é extremamente dolorosa e desfigurante (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2013; LOZOVEI, 2011).

As larvas infectivas do filarídeo são transmitidas aos humanos após a picada de um mosquito infectado. Depois de penetrarem ativamente a pele do hospedeiro, elas desenvolvem-se em vermes adultos no interior dos vasos linfáticos, causando dano severo ou edema. O inchaço, que pode afetar os membros, mamas e genitália, deve-se à imunopatologia severa e consequente disfunção linfática (LAWRENCE, 2001). Apesar de essas manifestações conduzirem os indivíduos à inaptidão temporária ou permanente, elas causam rara mortalidade. A profilaxia da filariose linfática consiste em duas medidas básicas: o controle vetorial e o tratamento de todos os pacientes microfilarêmicos. Apesar dos grandes esforços, o controle da densidade populacional de vetores é difícil, devido ao aumento da resistência aos inseticidas químicos e à abundante disponibilidade de criadouros nos grandes centros urbanos, decorrentes da ocupação humana desordenada e de problemas de saneamento público (LAWRENCE, 2001; LOZOVEI, 2011).

*Cx. quinquefasciatus* também tem sido incriminado como vetor de arboviroses de importância em saúde pública. Na natureza, ele já foi encontrado infectado com os agentes etiológicos das encefalites Venezuelana, de Oropouche e de Saint Louis (LOZOVEI, 2011). Atualmente, grande atenção está voltada para o seu papel na transmissão da encefalite causada pelo Vírus do Nilo Ocidental (VNO) ao homem. Esse arbovírus do gênero *Flavivirus* tem as aves migratórias como principal hospedeiro e é transmitido ao homem através da picada de mosquitos infectados, sobretudo do gênero *Culex* (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2013). Desde sua introdução nos Estados Unidos, que ocorreu em 1999, quase 40 mil casos de infecção em humanos foram registrados, resultando em mais de 1.600 mortes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2014c).

## **2.2 Controle de mosquitos vetores**

Os quatro principais objetivos do controle vetorial consistem em: 1) evitar o aparecimento da forma adulta do mosquito; 2) manter as populações do mosquito em baixa densidade; 3) minimizar o contato entre o mosquito e o hospedeiro vertebrado; 4) reduzir a longevidade das fêmeas do mosquito, pois atuam na transmissão do patógeno. Todas essas ações minimizam os incômodos causados pelas picadas, além de interromperem a transmissão do patógeno ao hospedeiro vertebrado (SERVICE, 1996).

Atualmente, é consenso que a erradicação da maioria das espécies de mosquitos vetores é uma meta de difícil alcance. Portanto, o objetivo mais realístico dos programas modernos de controle vetorial consiste no manejo integrado de pestes (MIP). Pelo uso prudente de combinações de diferentes métodos (ambientais, químicos, físicos e/ou biológicos), o MIP visa reduzir a abundância do inseto e, conseqüentemente, a prevalência da(s) doença(s) por ele transmitida(s). Em geral, essas medidas de controle são direcionadas aos estágios aquáticos imaturos e/ou às formas adultas (LOZOVEI, 2011; MATTHEWS, 2011; SERVICE, 1996).

Medidas de vigilância também são essenciais, pois determinam a distribuição e a abundância do mosquito, assim como o nível de resistência e de competência vetorial. Seu objetivo é fornecer dados para que as agências de controle possam agir para impedir a ocorrência de problemas relacionados ao mosquito (FOSTER; WALKER, 2002).

### 2.2.1 Manejo ambiental

Algumas vezes referido como controle mecânico, é uma ferramenta tradicional no manejo de populações de insetos, que aplica princípios ecológicos e o conhecimento do comportamento e do ciclo de vida (REGIS et al., 1995). Consiste, basicamente, na redução da disponibilidade e/ou na modificação dos recursos utilizados pelo mosquito, por exemplo, locais para pouso de adultos e sítios de oviposição, eclosão ou desenvolvimento de larvas. Entre as principais medidas adotadas, pode-se citar: a drenagem de lagoas, a remoção de vegetação aquática e ciliar, a implementação de medidas sanitárias e o descarte de criadouros artificiais (MATTHEWS, 2011; SERVICE, 1996). No caso de *Culex quinquefasciatus*, que se reproduz em locais ricos em carga orgânica, a vedação de fossas impede que as fêmeas ovipositem na superfície da água (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; LOZOVEI, 2011).

A proteção pessoal é a abordagem mais simples e direta de prevenção. A exposição externa pode ser evitada durante o pico de atividade do mosquito. A utilização de roupas que impeçam a exposição de mãos, braços, pescoço e face é recomendada, assim como a aplicação de repelente na pele (FOSTER; WALKER, 2002; MATTHEWS, 2011; SERVICE, 1996). Os domicílios também podem ser protegidos pela aplicação de telas nas janelas e nas portas, que reduzem o acesso dos mosquitos aos moradores. Mosquiteiros e cortinas impregnadas com inseticidas piretróides ajudam tanto na proteção contra as picadas, quanto no combate ao mosquito, que morre ao entrar em contato direto com suas superfícies tratadas.

Muitos estudos mostram a importância de medidas como essas na redução da transmissão da malária na África (LOZOVEI, 2011 MATTHEWS, 2011).

### 2.2.2 Controle biológico

O controle biológico consiste na utilização de predadores, parasitas, competidores, patógenos ou toxinas resultantes do metabolismo de agentes biológicos para o controle de insetos (BECKER et al., 2010). Embora também chamadas de controle natural, as manipulações ambientais decorrentes desse tipo de controle não são naturais. Frequentemente, os predadores devem ser introduzidos ou a incidência dos parasitas e dos patógenos deve ser incrementada nos habitats, a fim de obter o controle efetivo (FOSTER; WALKER, 2002).

Em geral, esse método apresenta as seguintes desvantagens: dificuldade de implementação e manutenção, com relação aos métodos que utilizam inseticidas; inespecificidade do predador quanto às suas presas; além de constituir-se num processo lento, com resultados visíveis, por vezes, semanas após o início da intervenção biológica. Por outro lado, no controle biológico os agentes empregados são seletivos e inócuos para outras espécies não-alvo, para o homem e para o meio ambiente (BECKER et al., 2010; FOSTER; WALKER, 2002).

Peixes que se alimentam de larvas são os predadores mais usados com agentes de controle biológico. Originalmente nativas do sul dos Estados Unidos, *Gambusia affinis affinis* e *G. affinis holbrocki* são as subespécies mais comumente usadas (MARCONDES, 2011). Elas têm sido introduzidas em mais de 60 países na tentativa de controlar o número de larvas do mosquito. Elas são adequadas para predação de larvas de anofelinos que se alimentam na superfície da água. Como são peixes agressivos e supostamente competem com peixes nativos, alguns especialistas não recomendam sua introdução em novas áreas (BECKER et al., 2010).

Outra espécie de peixe comumente usada é *Poecilia reticulata*, que não é tão voraz quanto *Gambusia* spp. e pode tolerar a poluição orgânica (BECKER et al., 2010). Existem outros tipos de peixes, por exemplo: a carpa chinesa. Embora algumas vezes eles tenham reduzido o número de larvas em certos habitats, raramente são efetivos em diminuir o tamanho de população de mosquitos em grandes áreas (SERVICE, 1996). Outros predadores de formas imaturas incluem os girinos e as larvas de insetos aquáticos, como espécies de *Toxorhynchites*. Todavia, raramente são agentes de controle comprovadamente efetivos (BECKER et al., 2010).

Existem diversos patógenos e parasitas, tais como vírus, bactérias, protozoários, fungos e nemátodos, que causam mortalidade larval, mas são inofensivos aos humanos. Alguns deles têm sido produzidos comercialmente em massa para o controle de formas imaturas, por exemplo, *Romanomermis culicevorax* (SERVICE, 1996).

Do ponto de vista aplicado, nenhum dos vírus entomopatógenos conhecidos foram eficazes no controle de dípteros (BECKER et al., 2010). O fungo *Lagenidium giganteum* é considerado um potencial agente de controle biológico, visto que estudos mostraram sua eficácia em espécies de *Culex pipiens*, *Cx. tarsalis*, *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti* (BECKER et al., 2010). Todavia, a utilização desses agentes como entomopatógenos tem se deparado com problemas técnicos, tais como sua baixa especificidade, necessidade de aplicação em altas dosagens e dificuldade de cultivo *in vitro* (BECKER et al., 2010).

Utilizadas desde os anos 1960 para o controle de praga de insetos na agricultura, sem dúvida, as bactérias entomopatógenas são um dos agentes de maior relevância no controle vetorial (SERVICE, 1996). Com a descoberta da propriedade inseticida de *Lysinibacillus sphaericus* (Ls) (KELLEN et al., 1965) e do posterior isolamento de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelenses* (Bti) (GOLDBERG; MARGALIT, 1977), a sua aplicação para o controle de dípteros ganhou força. As larvas do mosquito morrem ao ingerirem as toxinas proteicas em forma de cristais produzidas pelas células da bactéria durante a fase de esporulação (SERVICE, 1996). *L. sphaericus* possui modo de ação similar a *B. thuringiensis*, porém ela é particularmente mais específica contra larvas de *Culex* e são mais persistentes e tolerantes na água com elevado conteúdo orgânico (LOZOVEI, 2011). Elas podem ser produzidas sob diversas formulações (líquidas e sólidas), distribuídas na superfície da água, que causam a morte da larva do mosquito quando são ingeridas. Possuem as vantagens de serem facilmente produzidas em massa, são toxicologicamente seguras para os humanos e para a vida selvagem e são geralmente específicas em matar larvas de dípteros. Apesar da possibilidade de algumas espécies de mosquito desenvolver resistência a Ls, quando submetidas à forte pressão de seleção, sob condições de laboratório ou de campo, estas não apresentam resistência cruzada com Bti (AMORIM et al., 2007). A principal desvantagem é que requer repetidas aplicações, do mesmo modo que a maioria dos inseticidas (LOZOVEI, 2011).

Bactérias endossimbiontes comuns em muitas espécies de insetos, como *Wolbachia*, são capazes de causar incompatibilidade citoplasmática (IC) no seu hospedeiro. A IC resulta na mortalidade embrionária precoce da prole e é decorrente da cópula de um macho do mosquito infectado com *Wolbachia* com fêmeas não-infectadas ou infectadas com uma linhagem de *Wolbachia* geneticamente incompatível (CHARLAT; CALMET; MERCOT,

2001). Como uma alternativa aos métodos de controle biológico, a técnica do inseto incompatível (TII) tem explorado a capacidade de *Wolbachia* manipular a reprodução no vetor. Recentemente, essa estratégia foi testada com sucesso na supressão de populações de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de quatro ilhas localizadas no Sudoeste do Oceano Índico (BOURTZIS et al., 2014), abrindo novos caminhos no controle vetorial.

### 2.2.3 Controle genético

Utilizada há décadas com sucesso no controle de pragas agrícolas, a técnica do inseto estéril (TIE) baseia-se na colonização, produção em massa, esterilização por radiação, transporte e liberação de grande número de insetos machos estéreis numa área alvo. Conseqüentemente, esses indivíduos competirão com os machos férteis pela cópula com as fêmeas, resultando em inseminações inférteis. Se um número suficiente de machos estéreis forem liberados por tempo suficiente, a população alvo entrará em colapso (SERVICE, 1996). Esse método apresenta algumas desvantagens, por exemplo: os machos irradiados frequentemente possuem menor capacidade de competição e tempo de vida reduzido; necessidade de separar as fêmeas dos machos, antes da sua liberação; necessidade de introdução de grande número de mosquitos (CARVALHO et al., 2014).

Uma medida alternativa à TIE é conhecida como "liberação de insetos carregando um gene letal" (RIDL - do inglês Release of Insects carrying a Dominant Lethal). Nessa estratégia, o produto da transgenia suprime a reprodução dos insetos alvos, quando cruzados com os mosquitos transgênicos, diminuindo a população (CARVALHO et al., 2014). O sistema RIDL emprega um gene letal dominante associado a uma região promotora específica de fêmeas, de modo que a expressão do gene letal possa ser desativada na presença de tetraciclina. Quando é necessário separar machos e fêmeas, esse antibiótico é removido, causando a morte de todas as fêmeas. Esse sistema tem funcionado e recentemente foi adaptado para *Aedes aegypti* e testado com sucesso (CARVALHO et al., 2014; PHUC et al., 2007).

### 2.2.4 Controle químico

O controle químico que emprega inseticidas de origem orgânica ou inorgânica constitui-se numa das metodologias mais adotadas no controle vetorial em saúde pública. Um dos mais antigos métodos de controle químico consistia em aplicar óleos minerais na

superfície da água de criadouros, com a finalidade de matar as larvas do mosquito por envenenamento e/ou afogamento (SERVICE, 1996).

Por muitos anos, outros compostos inorgânicos, como o arsenito de cobre e o verde Paris, também foram muito utilizados no combate das formas imaturas do mosquito, agindo como venenos, quando ingeridos. Entre as suas principais desvantagens se destacam a necessidade de repetidas aplicações, o alto custo e a elevada toxicidade (SERVICE, 1996).

Nos anos 1940, a chegada dos inseticidas de efeito residual, tais como o dicloro-difenil-tricloro-etano (DDT), revolucionou o controle de artrópodes em geral. Porém, devido à sua persistência no ambiente e ao seu acúmulo nas cadeias alimentares, bem como à emergência de insetos resistentes, eles foram sendo substituídos (ou mesmo proibidos), ao longo dos anos, por outras classes de inseticidas (MARCONDES, 2011).

No momento, inseticidas de quatro diferentes classes são amplamente usados no controle de vetores, são eles: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Todos esses grupos atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos (BECKER et al., 2010).

#### 2.2.4.1 Organoclorados

Os organoclorados são inseticidas compostos pelos elementos químicos carbono, hidrogênio e cloro. Classificam-se como: difenil-alifáticos, hexaclorociclohexanos, ciclodienos e policloroterpenos (BECKER et al., 2010).

O primeiro grupo de organoclorados é o mais antigo. Ele inclui o DDT, que foi descoberto durante o período da Segunda Guerra Mundial. Embora seu modo de ação nunca tenha sido claramente estabelecido, sabe-se que ele atua no canal de sódio, provavelmente mantendo-o aberto e destruindo o equilíbrio de íons sódio e potássio dos axônios. Desse modo, a transmissão normal de impulsos nervosos em insetos e mamíferos é interrompida (BECKER et al., 2010). Apesar das proibições e restrições impostas ao uso agrícola do DDT, até os dias de hoje, ele é indicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para uso no controle de vetores da malária em alguns países africanos (MARCONDES, 2011).

O benzenohexacloro (BHC) é um dos membros do grupo dos hexaclorociclohexanos (HCH). Esse grupo também é conhecido como lindano e mostra ação semelhante à do DDT. Por sua vez, os ciclodienos (por exemplo, clordano, aldrin, dieldrin) apresentam-se persistentes e estáveis no solo e atuam na inibição do receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA). Quanto aos policloroterpenos, apenas dois compostos foram desenvolvidos: toxafeno e estrobane. Basicamente, seu modo de ação equivale ao dos ciclodienos (BECKER

et al., 2010; BRAGA; VALLE, 2007).

#### 2.2.4.2 Organofosforados

Os inseticidas organofosforados (OP) incluem todos aqueles que contêm fósforo em sua estrutura química. Por sua vez, eles formam três subgrupos: os alifáticos (por exemplo, malation, vapon, vidrin), os derivados de fenil (por exemplo, etil e metil paration, fenitrothion) e os heterocíclicos (por exemplo, clorpirifos, clorpirifos-metil) (BRAGA; VALLE, 2007).

Com relação aos organoclorados, são biodegradáveis e não se acumulam nos tecidos. Porém, são mais tóxicos para os vertebrados e necessitam de aplicação periódica, devido à sua instabilidade química. O organofosforado temefós é o único larvicida desse grupo recomendado pela OMS para uso em água potável. De modo geral, os organofosforados inibem a acetilcolinesterase (AChE), uma importante enzima do sistema nervoso central. Essa enzima é fosforilada pelo inseticida, ficando irreversivelmente inativada. A inibição de AChE resulta no acúmulo de acetilcolina nas sinapses, impedindo a interrupção da propagação do impulso elétrico. Por fim, o sistema nervoso central continuará sendo estimulado, desencadeando o processo de paralisia que pode culminar com a morte do inseto (BECKER et al., 2010).

#### 2.2.4.3 Piretróides

Os piretróides são produzidos a partir de uma substância natural extraída de crisântemos, o piretro. O primeiro piretróide de uso comercial foi a aletrina, cuja síntese era muito complexa e envolvia 22 reações químicas até o produto final. Depois disso, essa classe de inseticidas evoluiu em mais três gerações, nas quais a terceira e a quarta geração possuem os membros de maior aplicação atual no controle de vetores, são eles: permetrina (3ª geração), cipermetrina (4ª geração) e deltametrina (4ª geração) (BRAGA; VALLE, 2007).

Eles são vantajosos, uma vez que são estáveis e muito ativos, biodegradáveis, não cumulativos e raramente provocam intoxicações agudas em aves e mamíferos. Entretanto, são extremamente tóxicos para os animais aquáticos. Sua principal desvantagem é o custo elevado (BECKER et al., 2010).

Os piretróides demonstram ação similar ao DDT, mantendo abertos os canais de sódio das membranas dos neurônios. Essas substâncias afetam o sistema nervoso periférico e central

do inseto pelo estímulo repetido de descargas nas células nervosas, resultando em paralisia (BECKER et al., 2010).

#### 2.2.4.4 Carbamatos

Os carbamatos são inseticidas derivados do ácido carbâmico. Assim como os organofosforados, apresentam ação letal rápida sobre os insetos, apesar do baixo poder residual. Embora realizem a reação de carbamilação, também inibem a AChE. Alguns carbamatos são potentes inibidores de aliesterase e exibem seletividade pronunciada contra as AChE de certas espécies (BECKER et al., 2010).

#### 2.2.4.5 Reguladores do crescimento de insetos

Mais recentemente, foram descobertos compostos químicos capazes de interferir em processos fisiológicos do inseto (BECKER et al., 2010). Conhecidos pelo termo geral de reguladores do crescimento de insetos ou IGR (do inglês, Insect Growth Regulator), dividem-se como hormonais e não-hormonais. Os primeiros IGRs (hidroprene, piriproxifen, fenoxicarb) modulam o sistema endócrino de formas imaturas, condicionando a muda para outro ínstar imaturo, originando larvas defeituosas (GRAF, 1993).

Por sua vez, os IGRs não-hormonais (diflubenzuron e triflumuron) são inibidores da síntese de quitina do inseto (MANSUR et al., 2010). Tais químicos possuem a vantagem de serem seguros para o meio ambiente, porque são específicos para mosquitos e provocam muito baixa toxicidade em mamíferos.

No Brasil, é recomendado que nas localidades onde existam populações de *Aedes aegypti* resistentes aos inseticidas de segunda geração, estes sejam substituídos por IGRs, como o diflubenzuron ou novaluron (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

### 2.3 Resistência a inseticidas

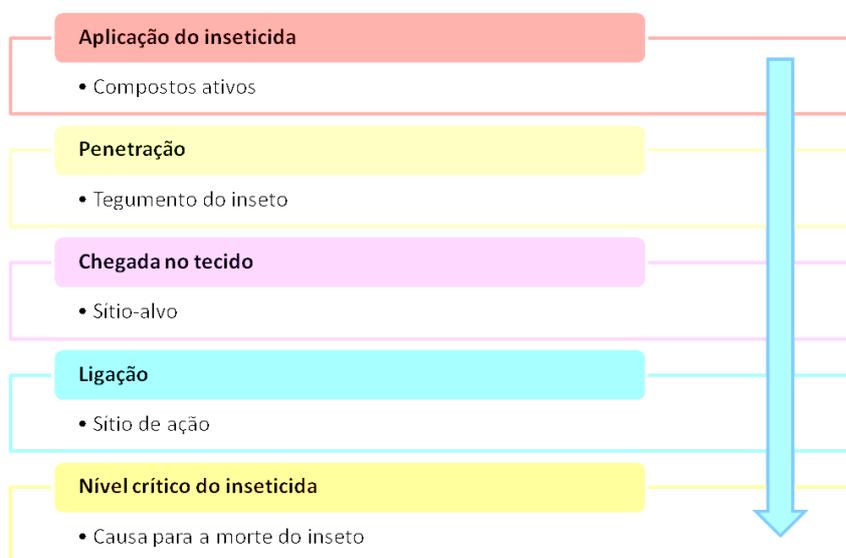
Apesar dos esforços para introduzir métodos ambientais e biológicos de controle de artrópodes, os inseticidas químicos são essenciais na maioria das campanhas de prevenção e de transmissão das doenças, especialmente quando meios alternativos de controle não estão disponíveis. Quando implementados de modo racional, eles podem ser altamente eficientes no controle de populações de vetores. Porém, a falta de recursos e de capacidade operacional, o

uso de inseticidas de pouca qualidade ou adulterados, assim como a emergência da resistência a inseticidas, podem comprometer seriamente os resultados das ações de combate ao vetor (KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2012).

### 2.3.1 Modo de ação do inseticida

Quando os inseticidas são prontamente aplicados, seu princípio ativo alcança gradativamente diversos sítios-alvos do inseto. Inicialmente, uma molécula ativa do inseticida rapidamente penetra o tegumento (cutícula) do inseto, alcançando o sítio de ação (por exemplo: enzima, tecido nervoso, proteína receptora, revestimento corporal). Nesse ponto, as moléculas do inseticida ligam-se ao sítio de ação e, caso sejam alcançados níveis críticos de concentração, pode ocorrer a morte do inseto (KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2012). O modo de ação do inseticida sobre o inseto é ilustrado na figura 3.

Figura 3 – Modo de ação do inseticida sobre o inseto.



Fonte: Adaptado de Karunamoorthi e Sabesan (2012)

### 2.3.2 Resistência: definição e causas

O uso indiscriminado de pesticidas tem levado ao desenvolvimento contínuo da resistência. Hoje, ela é a principal ameaça na prevenção e controle de doenças. Mais de quarenta anos de uso intensivo de inseticidas orgânicos sintéticos no controle de artrópodes vetores tem resultado na resistência de, aproximadamente, 450 espécies (KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (1957), a resistência é definida como a habilidade de uma população de insetos tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua mortalidade. Na natureza, populações de artrópodes podem apresentar uma proporção de indivíduos que portem alelos que lhes confirmam resistência a um determinado produto químico. Linhagens resistentes podem, conseqüentemente, emergir como o resultado do uso persistente de pesticidas, que matam os indivíduos com alelos suscetíveis, mas não matam aqueles que possuam alelos resistentes. A resistência a inseticidas pode, então, ser pensada como um processo de evolução acelerada de uma população, que responde a uma intensa pressão seletiva, com a conseqüente sobrevivência dos indivíduos que portem alelos que conferem resistência (KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2012).

Mutações aleatórias são uma das causas para a variabilidade encontrada nos diferentes alelos de um indivíduo. Desse modo, um pequeno número de indivíduos possui características que permitem sua sobrevivência sob doses de inseticidas normalmente letais. Por si, o inseticida não produz uma alteração genética, porém, seu uso continuado pode selecionar indivíduos resistentes (KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2012).

O *status* de resistência nas populações de vetores é dependente do volume e frequência de aplicações do inseticida e das características inerentes das espécies envolvidas. Em moscas, por exemplo, DDT foi utilizado por anos no seu controle e a resistência nunca se desenvolveu nesta espécie (KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2012). Em contraste, mosquitos têm características que propiciam o rápido desenvolvimento da resistência, incluindo curto ciclo de vida com progênie abundante (CLEMENTS, 1992).

No momento, estudos apontam que o fenômeno da resistência em populações de mosquitos vetores está ocorrendo em nível global. Além disso, há relatos de resistência para mais de uma classe de inseticida simultaneamente, tornando o seu controle um difícil desafio. Em Pernambuco, as duas principais espécies de mosquitos vetores (*Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*) têm mostrado resistência a diversas classes de inseticidas (ARAÚJO et al., 2013; MELO-SANTOS et al., 2010). Portanto, é urgente a implementação de ações de manejo da resistência, visando impedir ou retardar a evolução da resistência ou, alternativamente, manter o *status* de suscetibilidade.

### 2.3.3 Mecanismos de resistência a inseticidas químicos

Até o momento, o número de mecanismos envolvidos na resistência é pequeno. Do ponto de vista bioquímico, existem quatro principais mecanismos de resistência: alterações

comportamentais, diminuição da taxa de penetração pela cutícula, redução da sensibilidade do sítio-alvo e/ou aumento da detoxificação metabólica. Todos esses mecanismos são inespecíficos e, geralmente, conferem resistência cruzada, ou seja, a mais de um inseticida dentro de uma mesma classe química (BECKER et al., 2010).

#### 2.3.3.1 Alterações comportamentais

Ao entrar em contato com as superfícies tratadas com o inseticida, os insetos podem perceber sua presença e passar a evitá-lo. Isso tem sido observado em alguns culicídeos que entram nas casas, picam e saem sem repousar na parede tratada. Este foi o principal fator que impediu o controle de malária em certas áreas da Nigéria (DARRIET; HOUGARD; CORBEL, 2005).

#### 2.3.3.2 Penetração reduzida

Esse tipo de resistência ocorre quando o inseto resistente é capaz de absorver a molécula do inseticida muito mais lentamente do que o susceptível (MATTHEWS, 2011). Por conferir baixo nível de resistência, é considerado de importância secundária. Porém, em combinação com outros mecanismos, pode resultar num incremento da resistência. Apesar de sua base bioquímica não estar clara, sugere-se que a composição protéica do exoesqueleto tenha papel relevante (WOOD et al., 2010).

#### 2.3.3.3 Alteração do sítio-alvo

A maior parte dos inseticidas químicos age em nível de sistema nervoso central, em diferentes sítios-alvo. Portanto, a resistência de uma população de insetos pode ser decorrente de alguma alteração genética desses sítios, de forma a impedir ou reduzir a afinidade da ligação com o inseticida (KARUNAMOORTHY; SABESAN, 2012).

O mecanismo de resistência associado a piretróides é conhecido como resistência *kdr* (*knockdown*), e resulta de mutações no canal do sódio dependente de voltagem (o sítio alvo para DDT e piretróides). A mutação de um único aminoácido na região IIS6 transmembrana do gene do canal de sódio (por exemplo, Leu1014Fen, Ile1011Met, Val1016Ile e Fen1534Cis) confere resistência em diversas espécies, tais como *Anopheles gambiae*, *Aedes*

*aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (BAHNCK; FONSECA, 2006; BRENGUES et al., 2003; CHANG et al., 2009; JONES et al., 2012).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável pela degradação da acetilcolina e é o sítio-alvo de organofosforados e carbamatos. Sua resistência está relacionada com a afinidade reduzida da AChE pelo inseticida, o que permite a interrupção normal do estímulo nervoso (HEMINGWAY; RANSON, 2000).

Os receptores GABA de insetos são o sítio-alvo dos ciclodienos e policloroterpenos. Os quais são capazes de provocar a emissão de impulsos espontâneos que levam à contração muscular, seguida de convulsões, paralisia e morte (BECKER et al., 2010). Mutação de único par de bases do receptor, ocasionando a substituição de um aminoácido (alanina por serina), já foi associada com a resistência de populações de *Anopheles* (ASIH et al., 2012).

#### 2.3.3.4 Resistência metabólica

Os seres vivos estão continuamente expostos a compostos químicos naturais ou sintéticos, provenientes do meio externo (xenobióticos), que podem causar danos ao seu organismo. Componentes endógenos, tais como espécies reativas do oxigênio (EROs), também são uma ameaça, devido aos seus efeitos tóxicos (SHEEHAN et al., 2001).

Provavelmente como resposta a essas ameaças à sua sobrevivência, os seres eucariotos desenvolveram um eficiente sistema de detoxificação enzimática de ação integrada, que está dividido em três fases distintas. As fases I e II estão envolvidas na conversão de xenobióticos lipofílicos apolares em um metabólito mais solúvel em água e, portanto, menos tóxico e que possa ser eliminado mais facilmente pela célula na fase III (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005). A fase I é catalisada principalmente pelo sistema citocromo P450, uma família de proteínas microssomais responsável por diversas reações, entre elas a oxidação. Por sua vez, as enzimas de fase II catalisam a conjugação de xenobióticos ativados a um substrato endógeno mais hidrofílico, como a glutathione reduzida (GSH), o ácido UDP-glucurônico e a glicina. Quantitativamente, a conjugação à GSH, que é catalisada por glutathione S-transferases (GSTs), é a principal reação de fase II em muitas espécies (SHEEHAN et al., 2001).

O mecanismo de resistência metabólica está relacionado ao aumento da capacidade de metabolização de inseticidas, que leva à formação de produtos menos tóxicos por essa via anteriormente comentada. Na fase I, citocromo oxidases (P450) ou monooxigenases e

esterases (EST) reconhecem o inseticida e atuam diretamente sobre o composto, enquanto as GSTs complementam a detoxificação, na fase II (FROVA, 2006).

## 2.4 Glutathione S-transferases

### 2.4.1 Definição, nomenclatura e classificação

Por definição, as glutathione S-transferases ou GSTs (Enzyme Commission Number (EC): 2.5.1.18) compreendem uma complexa e bem distribuída superfamília de proteínas que compõem o sistema de detoxificação de fase II, envolvida no metabolismo de compostos endógenos e exógenos em organismos eucariotos. As enzimas GSTs possuem amplo espectro de especificidade, sendo capazes de metabolizar diversos componentes tóxicos hidrofílicos e hidrofóbicos, tais como: drogas, inseticidas e substratos tóxicos endógenos pela catálise da conjugação da GSH ao centro hidrofílico dos substratos (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005).

Inicialmente, o sistema de classificação mais aceito para GSTs de insetos reconhecia dois grupos imunologicamente distintos denominados de classes I e II (GRANT; MATSUMURA, 1989). Entretanto, com a maior disponibilidade de sequências genômicas, o sistema de nomenclatura originalmente desenvolvido para GSTs de mamíferos, baseado em letras gregas e números, mostrou-se robusto suficiente para abranger as enzimas dos demais grupos, inclusive dos invertebrados (CHELVANAYAGAM; PARKER; BOARD, 2001).

Três principais grupos são geralmente reconhecidos, cada um codificado por distintas famílias multigênicas. São elas: GSTs citosólica (ou solúveis), GSTs microsomal (ou MAPEG – Proteínas Associadas à Membrana envolvidas no metabolismo de Eicosanoides e Glutathione) e GST mitocondrial. Até o momento, esse último grupo não foi encontrado em insetos. Já as GSTs microsomais são proteínas triméricas, ligadas a membranas. Embora sejam muito diferentes em estrutura e origem evolucionária, elas catalisam reações similares a GSTs citosólicas. Porém, não têm sido implicadas no metabolismo de inseticidas. Por outro lado, a GST citosólica é a família mais abundante e frequentemente possui dezenas de membros em cada espécie. Por exemplo, 15 a 20 diferentes genes GSTs têm sido identificados no homem e em outros mamíferos, 40 a 60 em plantas, 10 a 15 em bactérias e mais de 10 em insetos (FROVA, 2006).

Atualmente, as GSTs são agrupadas em numerosas classes, a partir de uma variedade de critérios incluindo: homologia de sequência e relação filogenética com outras GSTs anotadas,

estrutura física dos genes e presença de domínios conservados (FRIEDMAN, 2011). Algumas vezes, essas enzimas são ubíquas através dos taxa, enquanto outras vezes são organismo-específico (FROVA, 2006).

No momento, pelo menos oito classes de GSTs citosólicas são reconhecidas em artrópodes: delta, epsilon, omega, sigma, teta, zeta, xi e iota (LUMJUAN et al., 2007; NIRANJAN-REDDY; PRASAD; RAGHAVENDRA, 2011). Delta e epsilon são específicas desse grupo. Elas são as maiores classes e juntas compreendem mais de 60% do genoma dos dípteros que já foram sequenciados (DING et al., 2003; LUMJUAN et al., 2007; NIRANJAN-REDDY; PRASAD; RAGHAVENDRA, 2011). Além disso, a maioria das GSTs implicadas no metabolismo de xenobióticos de insetos pertence a essas classes (LUMJUAN et al., 2007; ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005). As classes omega, sigma, teta e zeta possuem maior distribuição taxonômica e, provavelmente, desempenham papéis biológicos constitutivos. Surpreendentemente, a classe zeta está ausente no genoma de *Culex quinquefasciatus* (NIRANJAN-REDDY; PRASAD; RAGHAVENDRA, 2011). Por sua vez, as recentemente descritas classes iota e xi parecem ser exclusivas do grupo de mosquitos (LUMJUAN et al., 2007; NIRANJAN-REDDY; PRASAD; RAGHAVENDRA, 2011).

#### 2.4.2 Estrutura e modo de ação das GSTs citosólicas

Glutathione S-transferases (GSTs) citosólicas formam homodímeros ou heterodímeros com aproximadamente 25 kDa. A cadeia polipeptídica de cada monômero dobra-se em dois domínios que se unem por uma alça. O domínio N-terminal (Pfam\_PS50404; resíduos 1-80) consiste de quatro folhas beta e três alfa-hélices. Ele adota uma conformação similar ao domínio tiorredoxina encontrado em muitas proteínas que ligam GSH ou cisteína. Esse domínio, mais conservado, contém a maioria dos resíduos envolvidos na ligação da glutathione (sítio G). O domínio C-terminal (Pfam\_PS50405), maior que o anterior, consiste de um número variável de alfa-hélices. Seu sítio variável hidrofóbico (sítio H) interage com diferentes substratos eletrofilicos. Embora cada sítio ativo monomérico funcione independentemente, a estrutura quaternária é essencial para sua atividade (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; SHEEHAN et al., 2001).

Estruturas cristalinas representativas para GSTs citosólicas (Figura 4) estão disponíveis em bancos de dados de proteínas para a maioria das classes descritas. Apesar da limitada identidade de sequências, elas geralmente seguem padrões similares de dobramento, com

diferenças estruturais concentradas especialmente ao redor do seu sítio ativo e na interface entre as subunidades (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005).

Em uma reação de conjugação catalisada por GST, uma molécula de GSH reduzida e uma molécula de um segundo substrato são combinadas para formar uma ligação tioéster. A reação procede via ligação do substrato, a ativação do grupo tiol da GSH e subsequente ataque nucleofílico pela GSH aniônica sobre a ligação do componente hidrofóbico. Esta conjugação neutraliza os sítios eletrofílicos do substrato lipofílico e protege os componentes celulares, especialmente o oxigênio e nitrogênio nucleofílicos do DNA. A conjugação também resulta na produção de um produto mais solúvel em água e, portanto, mais prontamente excretável pela célula (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; FROVA, 2006).

A visão original de GSTs apenas como enzimas de detoxificação tem mudado gradualmente, e suas funções foram ampliadas para a biossíntese de hormônios e o catabolismo de aminoácidos aromáticos. Além disso, elas podem atuar como peroxidases, isomerases e tioltransferases ou possuir funções não-catalíticas, entre as quais o transporte de substratos hidrofóbicos e a modulação de processos de sinalização celular (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; LUMJUAN et al., 2007).

Figura 4 – Estrutura de uma glutathione S-transferase de classe epsilon do vetor da malária *Anopheles gambiae*.



Fonte: Protein Data Bank (2008)

#### 2.4.3 Evolução e organização genômica em artrópodes

As glutathione S-transferases (GSTs) constituem uma superfamília de proteínas muito primitiva que provavelmente evoluiu de um ancestral tioredoxina em resposta ao desenvolvimento da resposta ao estresse oxidativo. Existem evidências de que outras

proteínas que se ligam à cisteína e GSH compartilham o domínio tiorredoxina. Além disso, GSTs exibem similaridade estrutural e de sequência com várias proteínas relacionadas ao estresse em diversos organismos (SHEEHAN et al., 2001).

Segundo Friedman (2011), as GSTs frequentemente se agrupam por posição genômica como resultado de expansões gênicas recentes, explicadas pelo número de genes que codificam proteínas no genoma. Apesar de menos evidente, a história de vida do organismo também parece ser um fator que contribuiu para esse processo.

Entre os genomas correntemente disponíveis, os dípteros apresentam grandes expansões consistentes nesses genes. Por exemplo, Ding et al. (2003) identificaram 37 prováveis GSTs citosólicas em *Drosophila melanogaster* e 28 em *Anopheles gambiae*. Lumjuan et al. (2007) descreveram 26 genes para *Aedes aegypti* e outros pesquisadores reportaram 35 GSTs citosólicas para *Culex quinquefasciatus* (NIRANJAN-REDDY; PRASAD; RAGHAVENDRA, 2011). Por outro lado, *Apis mellifera* conta com apenas 11 GSTs (CLAUDIANOS et al., 2006). Do mesmo modo, o parasita exopterigoto *Pediculus humanus* possui 11 GSTs, distribuídas em cinco classes (LEE et al., 2010). Porém, esse padrão não é tendência em exopterigoto: o afídio de vida-livre *Acyrtosiphon pisum* contém 18 prováveis GSTs (RAMSEY et al., 2010).

A maioria das expansões gênicas concentra-se nas classes delta e epsilon, que são específicas de artrópodes. Por sua vez, os maiores clusters gênicos estão presentes em dípteros e coleópteros. Eles estão distribuídos entre diferentes cromossomos e provavelmente se formaram por duplicação gênica segmental e em *tandem* (FRIEDMAN, 2011). A maioria dos *clusters* contém membros de uma única classe GST e mostram alta similaridade de sequência. No geral, os *clusters* não são ortólogos entre gêneros, mas são formados independentemente (AYRES et al., 2011; FRIEDMAN, 2011; LUMJUAN et al., 2007; NIRANJAN-REDDY; PRASAD; RAGHAVENDRA, 2011; RANSON et al., 2002).

Análises filogenéticas permitiram a inferência da relação evolucionária entre os membros GSTs de artrópodes. Visto que a classe delta contém os artrópodes que divergiram mais cedo, ela é considerada mais antiga em origem do que a classe epsilon. Esta, por sua vez, está confinada a dípteros (*Culex*, *Drosophila*, *Aedes*, *Anopheles*), um coleóptero (*Tribolium castaneum*) e um lepdóptero (*Bombyx mori*). Não existem representantes em Hymenoptera. Friedman (2011) sugere que as GSTs epsilon evoluíram da classe delta no período que Hymenoptera e Coleoptera surgiram. Delta e epsilon possuem padrão geral de vasta e recente diversificação, evidenciado por clados individuais, refletindo eventos de especiação. Elas são apontadas como inovações mais recentes em artrópodes. Já as GSTs zeta, omega, teta e sigma

de artrópodes possuem homólogos, com relação a vertebrados. Portanto, suas origens predatam a divergência entre essas taxa. Ao contrário de delta e epsilon, possuem padrão geral com pouco ganho ou perda de genes.

#### 2.4.4 Expressão gênica de glutathione S-transferases em artrópodes

Em artrópodes, muitos genes que codificam glutathione S-transferases (GSTs) são diferencialmente expressos em resposta a diversos estímulos endógenos e/ou ambientais. Essa regulação é complexa e pode ocorrer de acordo com o estágio de desenvolvimento do animal e de modo tecido-específico (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005).

A maioria dos estudos sobre GSTs de artrópodes visa caracterizar os mecanismos de resistência a inseticidas sob forte pressão de seleção. Esse tipo de resistência é atribuído a um aumento na quantidade de uma ou mais enzimas de detoxificação em populações resistentes do artrópode, como resultado da amplificação gênica ou do aumento na taxa transcricional do(s) gene(s) que a(s) codifica(m) (DJOUAKA et al., 2008; HUNT et al., 2005; MARCOMBE et al., 2009).

Grant e Hammock (1992) mostraram que a super-expressão de GST-2 em uma linhagem de *Aedes aegypti* resistente ao DDT é controlada por uma mutação no seu repressor *trans*. O mapeamento genético do principal *loci* que confere resistência ao DDT em *Anopheles gambiae* apontou que tantos fatores *cis* quanto fatores *trans* são responsáveis pela super-expressão de GSTs da classe epsilon (DING et al., 2005).

Geralmente, as classes epsilon e delta são as mais exploradas nos trabalhos e o papel de alguns genes específicos já foi demonstrado na resistência a inseticidas. Na espécie *An. gambiae*, Ranson et al. (2001) mostraram que o gene *GST3-2* de uma linhagem resistente ao inseticida DDT é cinco vezes mais expresso com relação à linhagem susceptível, e que essa enzima apresentava atividade deidroclorinase. Cinco de oito *GSTEs* identificadas no mosquito *An. gambiae* também foram super-expressas em uma outra linhagem resistente ao DDT (DING et al., 2003). Em *Culex pipens*, Samra et al. (2012) demonstraram que a expressão dos genes *GSTD1* e *GSTD2* foi maior em uma linhagem resistente a compostos piretróides. Apenas a enzima recombinante *GSTD1* foi capaz de metabolizar o inseticida DDT, enquanto nenhuma delas exibiu atividade para permetrina.

Duas enzimas recombinantes de *An. cracens* (*AcGSTE2* e *AcGSTO1*) também foram capazes de metabolizar DDT e mostraram atividades peroxidase e tiol-transferase, sugerindo proteção contra os efeitos secundários (estresse oxidativo) ocasionados pela exposição ao

inseticida (WONGTRAKUL et al., 2009; 2010). Do mesmo modo, GSTs recombinantes de *An. dirus* apresentaram alta atividade para o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), sugerindo seu papel na resistência a inseticidas (JIRAJAROENRAT et al., 2001).

A comparação entre os perfis de transcrição de larvas de uma linhagem do mosquito *Ae. aegypti* resistente a temefós (organofosforado) e de uma colônia susceptível resultou na identificação de três genes *GSTs* diferencialmente expressos (*GSTII*, *GSTO1* e *GSTX2*). Por outro lado, *GSTE2* e *GSTE3* foram os únicos genes *GSTs* super-expressos em fêmeas (STRODE et al., 2012).

Lumjuan et al. (2005) relataram a super-expressão do gene *GSTE2* em uma linhagem do mosquito *Ae. aegypti* resistente aos inseticidas DDT e permetrina. Além disso, a caracterização da respectiva enzima recombinante confirmou seu papel no metabolismo do DDT. Mais recentemente, foi relatado que *GSTE2*, *GSTE5* e *GSTE7* também são expressos em elevados níveis em uma população resistente ao DDT dessa mesma espécie e que a enzima *GSTE5* exibe altos níveis DDTase. O silenciamento parcial dos genes *GSTE2* e *GSTE7* resultou no aumento da susceptibilidade à deltametrina, sugerindo que essas enzimas podem atuar na resistência a inseticidas piretróides (LUMJUAN et al., 2011).

Yamamoto et al. (2011) mostraram a indução do gene *GSTO* de *Bombyx mori* após a exposição a inseticidas e sugeriram seu papel na resposta ao estresse oxidativo causado por esses compostos. Os níveis de expressão de *BmGSTO* também aumentaram no intestino e no corpo gorduroso de larvas dessa espécie após o tratamento com foxina, um inseticida organofosforado (WANG et al., 2013).

Outro foco dos estudos sobre a expressão de GSTs em artrópodes consiste em avaliar a interação dos xenobióticos (naturais ou antropogênicos) encontrados no hábitat da larva do mosquito com a tolerância a inseticidas químicos. A exposição de larvas de *Ae. aegypti* a concentrações sub-letais de diferentes xenobióticos antropogênicos acarretaram no aumento da tolerância a inseticidas, com a indução de vários genes de detoxificação, incluindo *GSTs* (POUPARDIN et al., 2008; RIAZ et al., 2009). Utilizando o mosquito *Ae. aegypti* como modelo, Poupardin et al. (2012) conduziram experimentos de laboratório combinando a exposição de larvas com concentrações sub-letais de xenobióticos, seguida de sua seleção com o inseticida permetrina. Após dez gerações, os perfis de transcrição de muitos genes, incluindo *GSTs*, foram alterados pela seleção ao inseticida. Os pesquisadores sugeriram que o ambiente químico do inseto pode modelar a seleção de mecanismos metabólicos a longo e conduzir à resistência a inseticidas químicos.

Ao longo do desenvolvimento dos artrópodes, muitos processos biológicos complexos ocorrem em nível genético. Genes preferencialmente expressos em larvas são apontados como importantes na homeostase e na defesa contra agentes estressores. Já a expressão divergente entre larvas e adultos é interpretada como consequência das diferentes estratégias de vida adquiridas ao longo da evolução (HARKER et al., 2012).

Em *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, por exemplo, centenas de genes são diferencialmente regulados em cada estágio do ciclo de vida, resultando em alterações transcriptômicas durante o desenvolvimento (HARKER et al., 2012; VENANCIO et al., 2009). Do mesmo modo, o cluster *GSTE* de três espécies de *Anopheles* (*An. stephensi*, *An. plumbeus* e *An. funestus*) mostrou diferenças no padrão de expressão entre os genes nos diferentes estágios de vida (AYRES et al., 2011).

Na espécie *Spodoptera litura*, a expressão espacial e temporal de oito genes *GSTs* mostrou que *GSTE1*, *GSTS2* e *GSTO1* foram expressos em todos os estágios do desenvolvimento, da fase de ovo à forma adulta. *GSTE2*, *GSTE3*, *GSTS1*, *GSTS3* e *GSTU1* apresentaram maior nível de expressão no estágio larval e os níveis de expressão no intestino foram maiores do que em outros tecidos. A expressão de *GSTE1*, *GSTE3* e *GSTO1* aumentou com a exposição aos xenobióticos testados (HUANG et al., 2011).

Variações nos níveis de *GSTs* em diferentes tecidos também têm sido descritas em várias espécies. Em larvas de *B. mori*, foi relatada a expressão reduzida de *GSTD* e *GSTE* no corpo gorduroso, um tecido associado à detoxificação (YU et al., 2008). No estágio larval de *S. litura*, *GSTE2* apresentou maiores níveis de expressão no intestino e no corpo gorduroso, enquanto *GSTE3* foi detectado apenas no intestino (DENG et al., 2009). Rajarapu e Mittapalli (2013) reportaram altos níveis dos transcritos *GSTE1*, *GSTE3* e *GSTO1* no intestino e nos túbulos de Malpighi (sítio relacionado à homeostase) de larvas de *Agrilus planipennis*. No corpo gorduroso, a expressão de *GSTE1*, *GSTE2* e *GST1* foi mais expressiva. Além disso, esses autores associaram o gene *GSTE2* aos estágios de vida que se alimentam; *GSTS1* ao estágio pre-pupal; e os demais à expressão constitutiva, o que lhes sugerem um papel estrutural, não catalítico.

No início do período de incubação extrínseco (PIE), o vírus Dengue infecta e replica-se no epitélio intestinal do mosquito. Em seguida, ele distribui-se através da hemolinfa e replica-se novamente em outros órgãos, como o corpo gorduroso e a traqueia. Por fim, infecta a glândula salivar, em torno de 10 a 14 dias após o repasto sanguíneo. Ao longo desse processo, a fêmea do mosquito deve superar uma série de problemas decorrentes do forte estresse fisiológico sofrido por suas células (SALAZAR et al., 2007).

Diversos trabalhos relatam que as enzimas GSTs são induzidas sob condições de estresse, sugerindo seu papel na manutenção da homeostase e na defesa contra estresse oxidativo (AQUILANO; BALDELLI; CIRIOLO, 2014). Recentemente, mostrou-se a elevação significativa dos níveis de atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) em células C6/36 de *Ae. albopictus* infectadas com o sorotipo 2 do vírus Dengue (DENV-2), mas não em células BHK-21 de hamster. Ao mesmo tempo, foi demonstrado que o silenciamento do gene *GST* em células C6/36 infectadas com DENV-2 resultou no aumento da produção de superóxidos, indicando que essa enzima protege a célula contra os efeitos nocivos de espécies reativas do oxigênio (EROs) derivadas do estresse oxidativo causado pela infecção viral (CHEN et al., 2011). Além disso, as células silenciadas mostraram aumento na taxa de apoptose, revelando a importante função dessa enzima na prevenção da morte celular (CHEN et al., 2011; 2012).

### 3 JUSTIFICATIVA

Apesar das pesquisas e tentativas de controle de vetores, enfermidades como malária, dengue e filariose linfática permanecem como sérios problemas de saúde pública. Geralmente, em decorrência da ausência de vacinas para essas doenças, o seu controle depende quase inteiramente do combate ao mosquito, seja pelo manejo ambiental, por métodos de controle biológico ou pelo uso de inseticidas químicos.

Lamentavelmente, muitos programas de controle vetorial estão ameaçados devido à emergência de resistência aos inseticidas químicos existentes. Populações naturais de vetores resistentes a diferentes classes de inseticidas já foram detectadas em diversas regiões do mundo. Além disso, o manejo efetivo da resistência só é possível se os mecanismos que delimitam esse fenótipo forem bem compreendidos.

Glutathione S-transferases (GSTs) são enzimas comprovadamente envolvidas em mecanismos de resistência a inseticidas químicos, seja por alterações estruturais em suas moléculas ou por super-expressão gênica, que permite o metabolismo acelerado dos inseticidas. Por serem artrópode-específicas e desempenharem papel fundamental no metabolismo de xenobióticos, essas enzimas representam um excelente alvo para estudos moleculares e futuras aplicações biotecnológicas, como no desenvolvimento de métodos de diagnóstico da resistência mais eficientes ou de novos inseticidas para o combate de insetos vetores.

Apesar de existirem estudos descrevendo o *cluster* de genes GSTs da classe epsilon em diferentes espécies de mosquitos vetores, a evolução molecular, a divergência funcional e o papel fisiológico de membros individuais desse *cluster* ainda não foram elucidados. Neste contexto, a caracterização da estrutura e da função desses genes nas espécies *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* fornece entendimento adicional para sua evolução e diversificação, apresentando oportunidades para o desenvolvimento de novas estratégias de intervenção de doenças transmitidas por esses insetos.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

Como os genes *GSTs* evoluem em *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* e qual o seu papel biológico na resistência a inseticidas químicos nas duas espécies, na infecção ao vírus dengue em *Ae. aegypti* e nos diversos estágios do desenvolvimento e nos diferentes órgãos de *Cx. quinquefasciatus*?

## 5 HIPÓTESES

- Existem variantes alélicas nos genes *GSTEs* provenientes de populações naturais de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* potencialmente capazes de causar alterações na sequência de aminoácidos da respectiva proteína e, conseqüentemente, em sua estrutura e função biológicas, levando à alteração do fenótipo da susceptibilidade/resistência a inseticidas.
- Alguns genes *GSTs* de fêmeas de *Ae. aegypti* submetidas à infecção pelo vírus dengue são diferencialmente regulados ao longo do tempo em diferentes tecidos do mosquito.
- O perfil de expressão dos genes *GSTEs* varia de acordo com as diferentes fases do desenvolvimento e órgãos do mosquito *Cx. quinquefasciatus*.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo Geral

Investigar a evolução molecular e o perfil de expressão gênica de glutathione S-transferases da classe epsilon nas espécies *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

### 6.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a evolução molecular de genes *GSTEs* de populações de campo das espécies *Ae. aegypti* (*GSTE2* e *GSTE3*) e *Cx. quinquefasciatus* (*GSTE2*);
- b) descrever o perfil de transcrição temporal (diferentes momentos pós-infecção) e espacial (diferentes tecidos) dos genes *GSTs* de fêmeas de *Ae. aegypti* quando submetidas à infecção pelo vírus dengue;
- c) caracterizar o perfil transcricional dos genes *GSTEs* nas diferentes fases do desenvolvimento e em diferentes tecidos de *Cx. quinquefasciatus*.

## 7 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os trabalhos experimentais, cujas metodologias encontram-se descritas a seguir, foram desenvolvidos no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz - CPqAM/FIOCRUZ, no período de março de 2012 a março de 2014. O fluxograma abaixo mostra as principais etapas de investigação realizadas ao longo do trabalho (Figura 5).

Figura 5 – Etapas de investigação realizadas na caracterização molecular de membros *GSTs* em processos biológicos de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: Autora

### 7.1 Considerações Éticas

Este projeto não envolveu procedimentos relacionados à pesquisa com seres humanos e/ou animais de experimentação.

## 7.2 Mosquitos

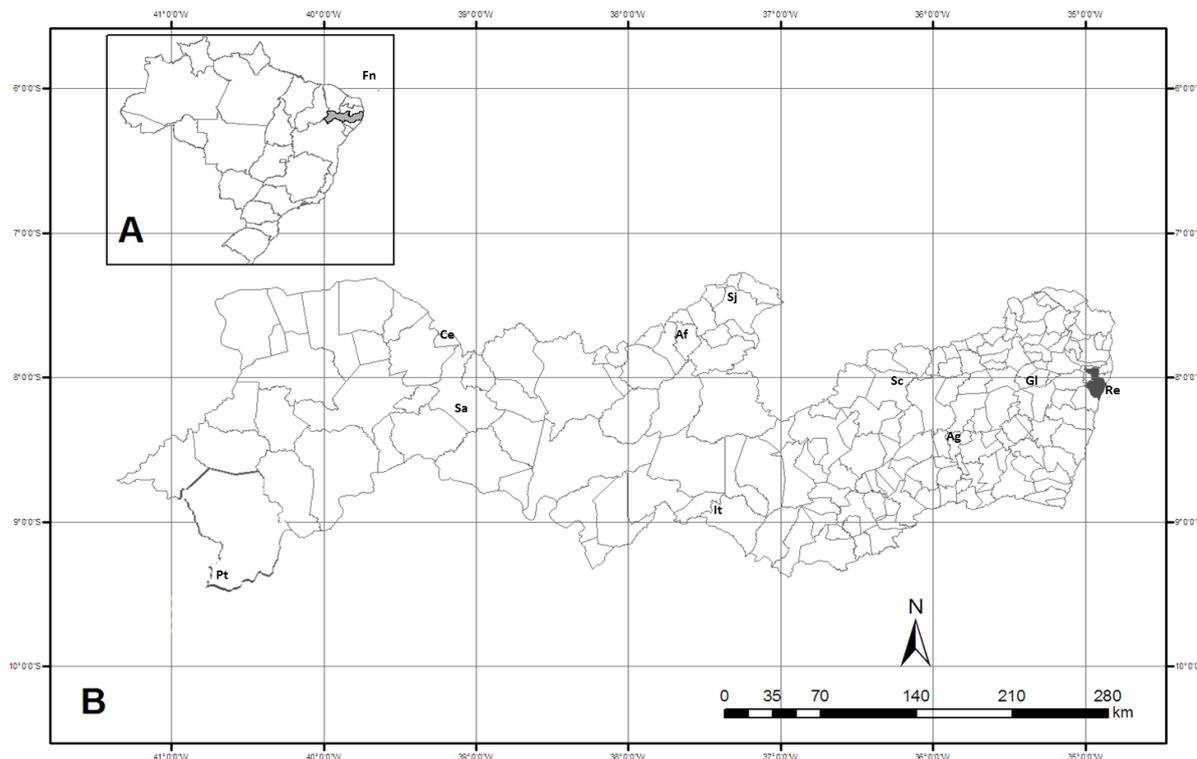
### 7.2.1 Mosquitos *Aedes aegypti*

Neste trabalho, foram utilizadas uma colônia de *Aedes aegypti* e uma linhagem resistente mantida em laboratório. A primeira, designada de Recife Laboratório (RecLab), é considerada padrão de susceptibilidade para todas as classes de inseticida. Essa colônia foi fundada a partir de indivíduos coletados em várias áreas da cidade do Recife/PE na década de 1990. A linhagem chama-se Recife Resistente (RecR) e é proveniente de indivíduos coletados no município de Araripina/PE. Ela é resistente ao inseticida organofosforado temefós e tem sido mantida sob pressão de seleção há vários anos no insetário do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM-FIOCRUZ). Maiores detalhes sobre o desenvolvimento desta linhagem estão descritos em Melo-Santos et al. (2010).

As larvas de RecLab e de RecR foram criadas em recipientes plásticos com água potável, alimentadas com ração para gatos (Whiskas®) autoclavada e mantidas sob fotoperíodo de 12:12 horas (claro:escuro), de acordo com as condições padrões estabelecidas pelo insetário do Departamento de Entomologia do CPqAM-FIOCRUZ. As pupas receberam o mesmo tratamento, exceto a alimentação, e seus recipientes foram telados. Após a emergência dos adultos, os mosquitos foram mantidos em gaiolas (30 cm x 30 cm x 30 cm), em salas climatizadas a  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com  $85 \pm 10\%$  de umidade relativa, fotoperíodo de 12:12 horas (claro:escuro) e alimentados com solução de sacarose 10% (m/v).

Para a análise da diversidade dos genes *GSTE2* e *GSTE3*, também foram utilizadas amostras de mosquitos provenientes do banco de DNA do Departamento de Entomologia do CPqAM-FIOCRUZ, gentilmente cedidas pela Dra. Ana Paula de Araújo. No total, foram analisadas onze populações de campo dessa espécie, coletadas em diferentes municípios de Pernambuco: Afogados da Ingazeira, Agrestina, Cedro, Fernando de Noronha, Glória do Goitá, Itaíba, Petrolina, Recife, Salgueiro, Santa Cruz do Capibaribe e São José do Egito (Figura 6), as quais foram previamente fenotipadas quanto ao *status* de susceptibilidade a inseticidas (ARAÚJO et al., 2013)

Figura 6 – Mapa do Brasil (A) destacando o estado de Pernambuco (B) e os 11 sítios de coletade *Aedes aegypti* usados neste estudo.



Nota: Af - Afogados da Ingazeira; Ag - Agrestina; Ce - Cedro; Fn - Fernando de Noronha; Gl - Glória do Goitá; It - Itaíba; Pt - Petrolina; Re - Recife (destacado em negrito); Sa - Salgueiro; Sc - Santa Cruz do Capibaribe; Sj - São José do Egito.

Fonte: Autora

### 7.2.2 Mosquitos *Culex quinquefasciatus*

Para a espécie *Culex quinquefasciatus*, foram utilizadas: a) a colônia de laboratório *Cx. quinquefasciatus* Recife Laboratório (LabCq), proveniente de indivíduos coletados em criadouros de áreas da cidade do Recife/PE, padrão de susceptibilidade ao inseticida temefós e a outros biolarvicidas bacterianos, e mantida no insetário há mais de 10 anos; e b) a linhagem *Cx. quinquefasciatus* RL2362 (CqRL2362), proveniente de indivíduos coletados no Recife e com alto nível de resistência (>100.000) ao inseticida biológico *Lysinibacillus sphaericus* 2362. O mecanismo de resistência caracterizado nessa linhagem é a ausência do receptor Cqm1 no epitélio intestinal, associada ao alelo *cqm1REC* em homozigose (ROMÃO et al., 2006). Ambas LabCq e CqRL2362 foram mantidas conforme as condições padrão do insetário do Departamento de Entomologia do CPqAM-FIOCRUZ descritas anteriormente.

Adicionalmente, amostras de *Cx. quinquefasciatus* provenientes do banco de DNA do Departamento de Entomologia do CPqAM-FIOCRUZ, gentilmente cedidas pela Dra. Liliane Amorim, foram utilizadas nos experimentos de análise da diversidade do gene *GSTE2*. Sete

populações de campo desse mosquito, coletadas em diferentes municípios do Estado de Pernambuco foram utilizadas: Água Fria (Recife), Alto da Conquista (Recife), Peixinhos (Olinda), Glória do Goitá, Ipojuca, Jaboatão dos Guararapes e Santa Cruz do Capibaribe (Figura 7). Essas populações naturais foram previamente fenotipadas quanto ao *status* da resistência a inseticidas (AMORIM et al., 2013).

Figura 7 – Mapa do Brasil (A) destacando o Estado de Pernambuco (B) e os sete sítios de coleta de *Culex quinquefasciatus* usados neste estudo.



Nota: 1 – Olinda (Peixinhos e Alto da Conquista); 2 – Recife; 3 – Jaboatão dos Guararapes; 4 – Ipojuca; 5 – Glória do Goitá; 6 – Santa Cruz do Capibaribe.

Fonte: Amorim et al. (2013)

### 7.3 Análise de polimorfismos nos genes *GSTE2* e *GSTE3* de *Aedes aegypti*

#### 7.3.1 Amostragem de *Aedes aegypti*

Um total de onze grupos amostrais foi formado, a partir da sua respectiva população de campo (descrição na seção 7.2.1). Cada amostra populacional foi composta por 10 fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* que permaneceram vivas (fenótipo resistente) mais 10 fêmeas que sofreram mortalidade (fenótipo suscetível), após avaliação da resistência/susceptibilidade à cipermetrina por ensaios com garrafa (ARAÚJO et al., 2013).

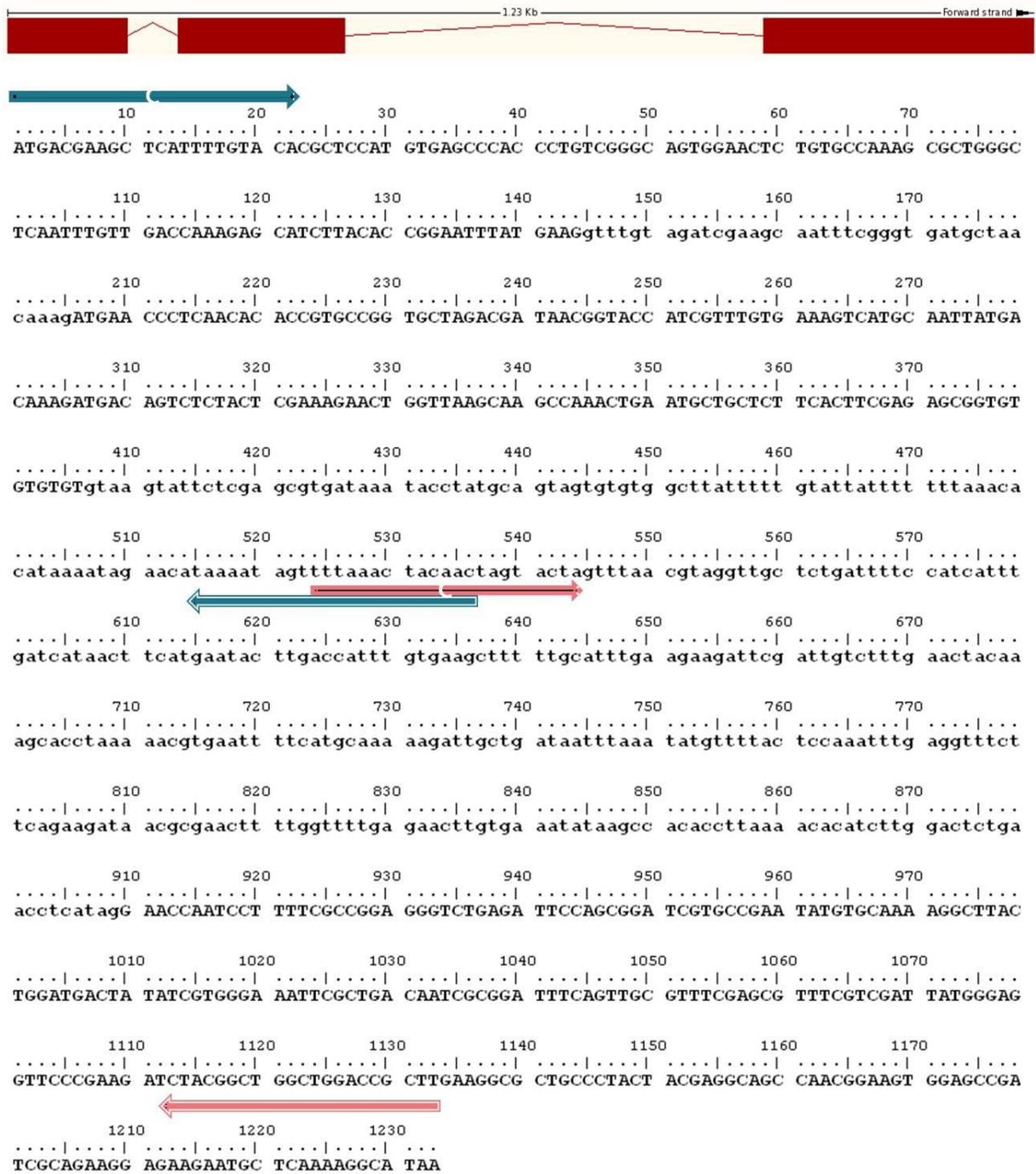
Adicionalmente 20 mosquitos (dez machos + dez fêmeas) da linhagem Recife Resistente (RecR) foram coletados e seu DNA foi extraído, de acordo com o protocolo de Ayres et al. (2003), a fim de serem incluídos nas análises de polimorfismos nos genes *GSTE2* e *GSTE3*.

### 7.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de *GSTE2* e *GSTE3*

Um par de *primers* foi desenhado pela utilização do programa Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000), a fim de amplificar um fragmento de 718 pb, englobando todo o gene *GSTE3* (Figura 9; Tabela 1). Para amplificar o gene *GSTE2*, foram utilizados dois pares, também desenhados com o mesmo programa: o primeiro, flanqueando um segmento no início da ORF de 637 pb e o segundo, um trecho de 610 pb; com uma região de sobreposição de 1203 pb entre os dois fragmentos (Figura 8; Tabela 1).

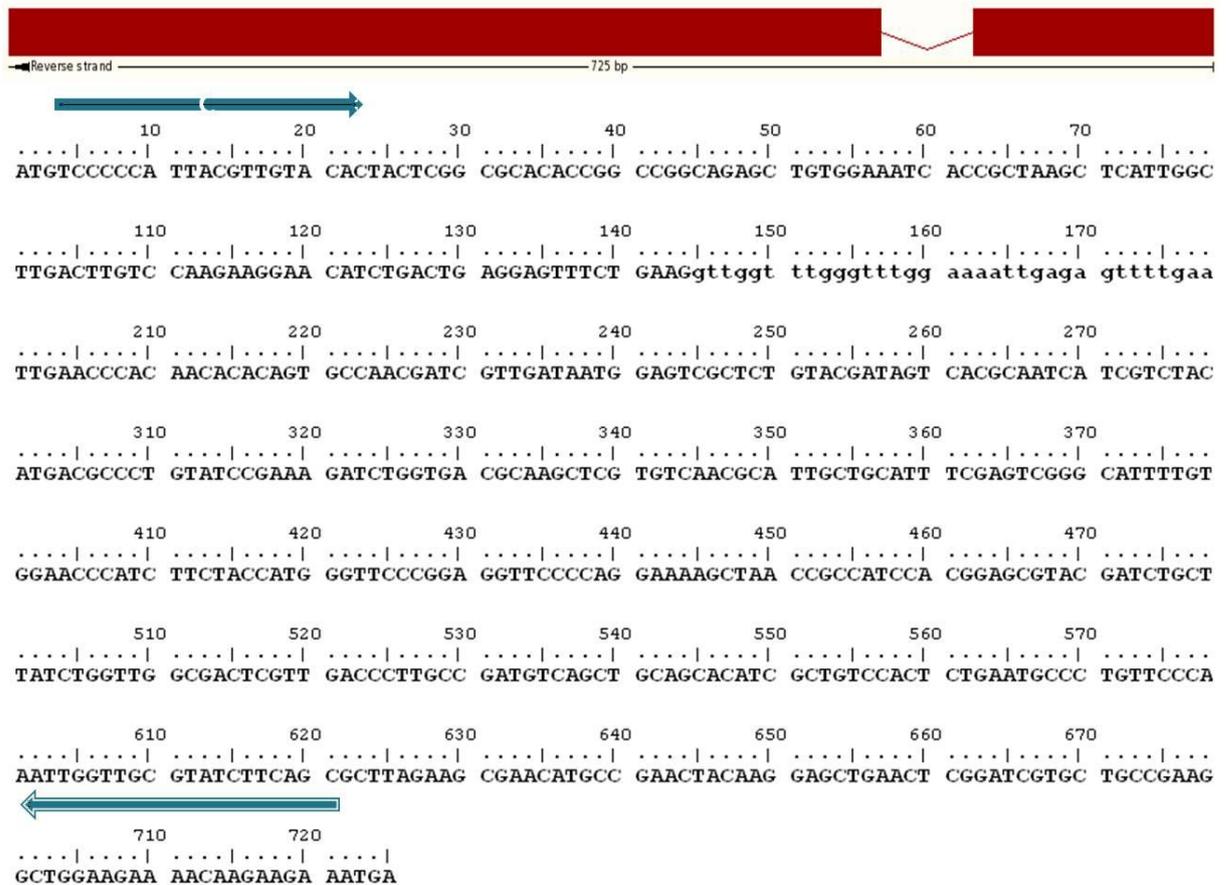
As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 20 µl, contendo 1x de PCR Master Mix (Promega), 50 pmol de cada *primer* e 50 ng de DNA molde. Para os genes *GSTE2* e *GSTE3*, as amostras foram incubadas a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C ou 54°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Controles negativos (reagentes sem o DNA molde) foram usados para checar possíveis contaminações nas reações.

Quatro microlitros de cada produto de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. O tamanho das bandas foi estimado pelo uso do marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Após quantificação e normalização, todos os *amplicons* foram diretamente sequenciados em ambas as direções no sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems), na Rede de Plataformas Tecnológicas do CPqAM/FIOCRUZ, usando a química ABI Big Dye (Applied Biosystems).

Figura 8 – Esquema da região amplificada para o gene *GSTE2* de *Aedes aegypti*.

Nota: Os éxons aparecem em letras maiúsculas, enquanto os íntrons estão em letras minúsculas. Os sítios de anelamento dos *primers* estão indicados pelas setas azuis (*GSTE2-C1*) e pelas setas cor-de-rosa (*GSTE2-C2*), direcionadas para a direita (*forward*) e para a esquerda (*reverse*).

Fonte: Autora

Figura 9 – Esquema da região para o gene *GSTE3* de *Aedes aegypti*.

Nota: Os éxons aparecem em letras maiúsculas, enquanto os íntrons estão em letras minúsculas. Os sítios de anelamento dos *primers* estão indicados por setas azuis, direcionadas para a direita (*forward*) e para a esquerda (*reverse*).

Fonte: Autora

Tabela 1 – Sequências dos *primers* usados para PCR dos genes *GSTE2* e *GSTE3* de *Aedes aegypti*.

Genes	Referência	Nome do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Tamanho do produto
<i>GSTE2</i>	AAEL007951 (Vectorbase)	<i>GSTE2</i> -1F	ATGACGAAGCTCATT TTTGTACAC	637 pb
		<i>GSTE2</i> -1R	GCTTCACAAATGGTCAAGTATTCA	
		<i>GSTE2</i> -2F	ACCATTTGTGAAGCTTTTTCGC	610 pb
		<i>GSTE2</i> -2R	TTATGCCTTTTGAGCATTCTTC	
<i>GSTE3</i>	AAEL007947 (Vectorbase)	<i>GSTE3</i> -F	GTCCCCCATTACGTTGTACACT	718 pb
		<i>GSTE3</i> -R	TTCTTCTTGTTTTCTCCAGCTTG	

Fonte: Autora

### 7.3.3 Análise das sequências de *Aedes aegypti*

O programa CodonCode Aligner versão 3.7.1 (CodonCode Corporation, Dedham, MA) foi usado para checar a qualidade das sequências e montar os *contigs* (critérios adotados: 70% de identidade mínima e 25 pb de tamanho mínimo de sobreposição). Aquelas com qualidade  $\geq 20$  foram utilizadas para a geração de sequências consenso. Arquivos no formato FASTA, contendo sequências de nucleotídeos e suas respectivas sequências traduzidas de aminoácidos para os genes *GSTE2* e *GSTE3* de *Aedes aegypti*, também foram obtidos, a partir da base de dados VectorBase. Essas sequências foram usadas nas análises, com a finalidade de comparar esses genes intraespecificamente.

Todas as sequências foram alinhadas com o auxílio do algoritmo ClustalW do programa BioEdit 3.7.1 (HALL, 1999) e os dados de genética populacional foram analisados pela utilização do programa DnaSP 5 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Alguns dos parâmetros estimados foram: número de haplótipos ( $h$ ), diversidade haplotípica, número de sítios segregantes ( $S$ ), diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) e taxa de mutação por sítio ( $\theta_w$ ). O teste  $D$  de Tajima de neutralidade também foi aplicado.

## 7.4 Transcrição de genes *GSTs* em diferentes tecidos de *Aedes aegypti* RecLab pós-infecção com DENV-2

### 7.4.1 Infecção oral dos mosquitos com o DENV-2

Com o objetivo de investigar o papel de alguns genes glutathione S-transferases (*GSTE2*, *GSTE3*, *GSTO*, *GSTX1*) na resposta à infecção por Dengue, o perfil de transcrição desses genes foi comparado em amostras de fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas e não infectadas com o vírus. O critério adotado para a seleção desses genes deveu-se ao seu possível papel na resistência a inseticidas (STRODE et al., 2012), bem como em outros processos biológicos, como na resposta ao estresse oxidativo (BARTHOLOMAY et al., 2007; CHOI et al., 2012).

O procedimento de infecção oral dos mosquitos com o sorotipo 2 do vírus Dengue (DENV2-3808) seguiu o protocolo descrito por Guedes (2012). Todo o procedimento foi conduzido no infectório do Departamento de Entomologia do CPqAM-FIOCRUZ, de acordo com normas internacionais de Biossegurança e de Bioproteção. A alimentação sanguínea artificial via membrana foi conduzida em fêmeas nulíparas de *Ae. aegypti* RecLab com cinco

a oito dias de emergência. Grupos de mosquitos (150-200 fêmeas), cuja alimentação com sacarose e água foi retirada 24 horas (24h) antes do experimento, foram alimentados durante 45 a 60 minutos com uma mistura de suspensão de vírus previamente expandida em células C6/36 e sangue de carneiro desfibrinado na proporção de 1:1. A mistura foi mantida aquecida em banho-maria circulante a 37°C, por meio de alimentadores de vidro cobertos por membrana de intestino de porco hidratada em solução salina (PBS, “Phosphate Buffered Saline” – NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 g/l, pH 7,4). A área de superfície dos alimentadores foi hidratada continuamente em PBS, a fim de manter sua flexibilidade. O grupo controle consistiu de mosquitos alimentados com sangue livre de partículas virais e foi incluído em cada ensaio. A figura 10 ilustra o sistema de alimentação artificial utilizado.

Depois da alimentação, os mosquitos foram anestesiados em gelo e mantidos em placa fria com a finalidade de separar as fêmeas ingurgitadas. Estas foram mantidas no infectório do insetário do CPqAM durante o período necessário até a coleta dos tecidos, sob as condições de manutenção previamente descritas. As fêmeas não ingurgitadas foram descartadas. Neste estudo, foram realizados dois experimentos (repetições biológicas): a primeira alimentação, cujo título viral do estoque usado foi de  $1 \times 10^5$  FFU/ml; e a segunda alimentação, que utilizou estoque viral cujo título foi igual a  $6 \times 10^5$  FFU/ml. Apesar de não ter havido a leitura do título no momento da infecção, as células já apresentavam forte efeito citopático, característico da infecção viral.

Figura 10 – Esquema da alimentação sanguínea artificial e infecção oral com vírus dengue em fêmeas do vetor *Aedes aegypti*.



Fonte: Guedes (2012)

#### 7.4.2 Dissecção dos mosquitos e extração de RNA total

Para cada grupo experimental (infectado e controle), foram coletadas de nove a doze fêmeas dos mosquitos em diferentes momentos ao longo de sete dias pós-alimentação (dpi): 6

horas dpi, 1 dpi, 3 dpi e 7 dpi. Os mosquitos foram dissecados à fresco em solução salina (PBS) sob microscópio estereoscópico. Intestinos, glândulas salivares, carcaças e cabeças foram reunidos em *pools* (n = 3) e armazenados em microtubos de 1,5 ml contendo 300 µl de um diluente para mosquitos contendo: PBS 1X, soro fetal bovino 10 %, antibiótico 1% e antifúngico 1%. Todas as amostras foram estocadas a - 80°C até sua utilização.

O RNA total de cada amostra (*pools* contendo órgãos de três ou quatro indivíduos) foi extraído usando o reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen), segundo as recomendações do fabricante. Após a recuperação do RNA, as amostras foram tratadas com DNase (Turbo DNase-Ambion, AM2239), a fim de remover qualquer contaminação com DNA genômico. A concentração e a qualidade das amostras do RNA isolado foram avaliadas por espectrofotometria (Nanodrop) aos níveis de absorvância de 260 e 280 nm.

#### 7.4.3 RT-PCRq e análise da expressão relativa

O nível de expressão dos transcritos de *GSTE2*, *GSTE3*, *GSTO*, *GSTX1* em diferentes órgãos de fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas com DENV-2 foi analisado por RT-PCRq nos seguintes tempos pós-alimentação: 6 horas (h), 1 dia (d), 3 d e 7 d. As amostras de RNA foram normalizadas em diferentes concentrações (10 ng/µl a 50 ng/µl), de acordo com o material biológico utilizado.

O kit SuperScript<sup>®</sup> III Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green One-Step RT-PCRq (Invitrogen) foi usado nas reações de RT-PCRq *one-step*. Cada reação continha SYBR Green Mix, Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase, ROX 1:10, RNA molde, 0,5 µM de *primer Fw* e 0,5 µM de *primer Rv*, em um volume final de 20 µl. As amplificações com o controle endógeno *rpL8* foram realizadas da mesma forma, só que em tubos separados em relação aos genes estudados. As sequências dos *primers* utilizados, bem como o tamanho dos fragmentos gerados, estão descritos na Tabela 2. Estes foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000).

As amostras foram amplificadas no termociclador 7500 Real Time PCR System<sup>®</sup> (Applied Biosystems). O programa de PCR foi o seguinte: uma etapa inicial a 50°C por 3 minutos que permitiu a transcrição reversa; outra etapa de 5 minutos a 95°C para ativar a Taq DNA polimerase, seguida por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 54°C por 30 segundos e 60°C por 30 segundos. Controles negativos foram incluídos para detectar contaminação dos reagentes (*mix* sem molde de RNA) e presença de DNA genômico não removido pelo

tratamento com DNase (*mix* sem transcriptase reversa). A especificidade da PCR foi checada após a amplificação, pela análise das curvas de dissociação dos produtos de PCR.

A expressão relativa do RNAm foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O primeiro passo desse método consiste na normalização dos valores de  $C_T$  de cada amostra, ou seja, na obtenção do  $\Delta C_T$  ( $C_{T, \text{alvo}} - C_{T, \text{rpL8}}$ ). Este é calculado pelo  $C_T$  da amplificação com os *primers* do controle endógeno (*rpL8*) subtraído do  $C_T$  da amplificação com os *primers* do gene de interesse (*GSTs*). O  $\Delta\Delta C_T$  foi obtido, então, pelo  $\Delta C_T$  de amostras não infectadas subtraído do  $\Delta C_T$  de amostras infectadas [ $(C_{T, \text{alvo}} - C_{T, \text{rpL8}})_{\text{tratado}} - (C_{T, \text{alvo}} - C_{T, \text{rpL8}})_{\text{controle}}$ ]. Para cada intervalo, a média do  $\Delta\Delta C_T$  dos três *pools* das amostras infectadas e das amostras não infectadas foi usada para calcular a expressão relativa entre os transcritos de amostras infectadas e de amostras não infectadas ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ). Quando as eficiências da amplificação dos genes de interesse e do controle endógeno não foram similares, os valores foram automaticamente corrigidos pelo programa 7500 V2.0.6 (Applied Biosystems). Em todos os casos, as amostras foram avaliadas em duplicata.

Tabela 2 – Sequências dos *primers* utilizados nas reações de RT-PCRq de mosquitos *Aedes aegypti* infectados com DENV-2.

Genes	Referência	Nome do primer	Sequência do primer (5'-3')	Tamanho do produto
<i>GSTE2</i>	AAEL007951 (Vectorbase)	q <i>GSTE2</i> -F	AAGATCTACGGCTGGCTGGA	100 pb
		q <i>GSTE2</i> -R	TCTGCGACAGGACAAACTGC	
<i>GSTE3</i>	AAEL007947 (Vectorbase)	q <i>GSTE3</i> -F	GCGCTTAGAAGCGAACATGC	86 pb
		q <i>GSTE3</i> -R	CCAGCTTGACTTTGAAGAATGC	
<i>GSTO1</i>	AAEL017085-RA (Vectorbase)	q <i>GSTO</i> -F	ACAGAGATTTGGTAAACTGTTGCA	121 pb
		q <i>GSTO</i> -R	CTCGCCAGATTCCTGCTC	
<i>GSTX1</i>	AAEL000092-RA (Vectorbase)	q <i>GSTX1</i> -F	GATTCGACCTGTCCAAGCATC	127 pb
		q <i>GSTX1</i> -R	TCGGTCACGAGTTCCTTGAA	
<i>rpL8</i>	Magalhães et al. (2008)	<i>rpL8</i> -F	TGGGGCGTGTTATTCGTGCACAG	122 pb
		<i>rpL8</i> -R	CAGGTATCCGTGACGTTCCGCA	

Fonte: Autora

## 7.5 Análise de polimorfismos no gene *GSTE2* de *Culex quinquefasciatus*

### 7.5.1 Amostragem de *Culex quinquefasciatus*

Para o mosquito *Culex quinquefasciatus*, foram formados sete grupos amostrais, correspondentes a cada uma das populações de campo descritas na seção 7.2.2. Foi utilizado um total de 20 mosquitos por amostra populacional, sendo 10 fêmeas e 10 machos do mosquito.

Dois grupos adicionais, sendo um deles da colônia *Cx. quinquefasciatus* Recife Laboratório (LabCq) e o outro da linhagem *Cx. quinquefasciatus* RL2362 (CqRL2362), compostos por 20 mosquitos cada (dez machos + dez fêmeas) também foram coletados e o seu DNA foi extraído, de acordo com o protocolo de Ayres et al. (2003), a fim de serem incluídos nas análises de polimorfismos no gene *GSTE2* de *Cx. quinquefasciatus*.

### 7.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de *GSTE2*

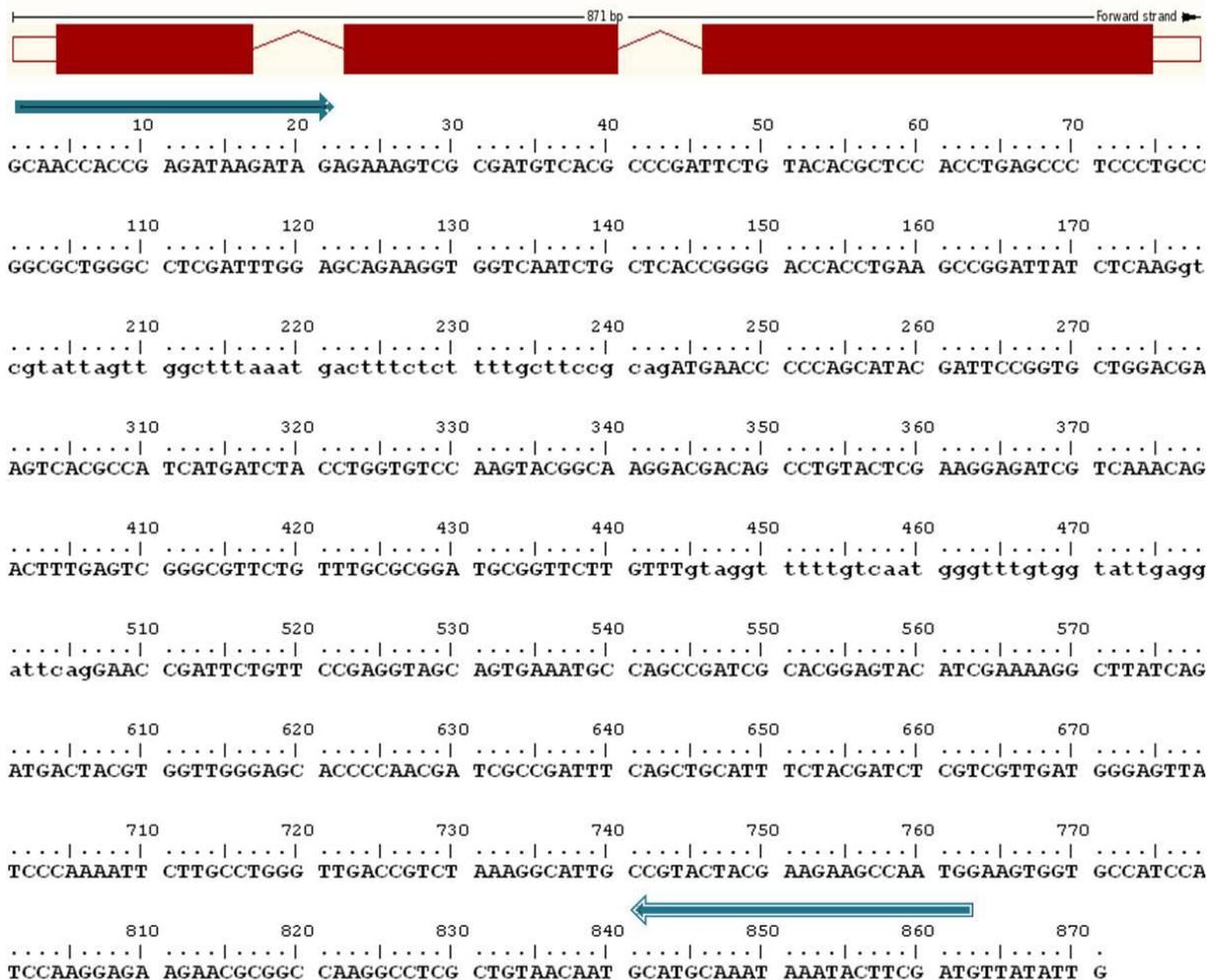
Os *primers* 5'-GCAACCACCGAGATAAGATAG-3' (Cq*GSTE2*G-Fw) e 5'-CATCGAAGTATTTATTTGCATGC-3' (Cq*GSTE2*G-Rv) foram desenhados a partir da sequência de DNA disponível na base de dados Vectorbase para o gene *GSTE2* de *Culex quinquefasciatus* (NIRANJAN-REDDY; PRASAD; RAGHAVENDRA, 2011) (número de acesso: CPIJ018627-RA), com o auxílio do programa Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Eles flanqueiam um segmento de 863 pb, que corresponde a quase toda matriz de leitura (ORF - Open Reading Frame) do gene, que é composto por três éxons e dois íntrons (Figura 11).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 µl, contendo 1x de PCR Master Mix (Promega), 50 pmol de cada *primer* e 50 ng de DNA molde. As amostras foram incubadas a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos. A fim de checar possíveis contaminações, controles negativos foram realizados em cada experimento.

Quatro microlitros de cada *amplicon* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. O tamanho das bandas foi estimado pelo uso de marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Após quantificação e normalização, todos os produtos de PCR foram

diretamente sequenciados em ambas as direções, por técnicos da Rede de Plataformas Tecnológicas do CPqAM/FIOCRUZ, no sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems), usando a química ABI Big Dye (Applied Biosystems).

Figura 11 – Esquema da região amplificada para o gene *GSTE2* de *Culex quinquefasciatus*.



Nota: Os éxons aparecem em letras maiúsculas, enquanto os íntrons estão em letras minúsculas. Os sítios de anelamento dos *primers* estão indicados por setas azuis, direcionadas para a direita (*forward*) e para a esquerda (*reverse*).

Fonte: Autora

### 7.5.3 Análise das sequências de *Culex quinquefasciatus*

O programa CodonCode Aligner versão 3.7.1 (CodonCode Corporation, Dedham, MA) foi usado para checar a qualidade das sequências. Aquelas com qualidade  $\geq 20$  foram utilizadas para a geração de sequências consenso. Para comparação intraespecífica, arquivos no formato FASTA contendo a sequência de nucleotídeos do gene *GSTE2* de *Culex*

*quinquefasciatus* e sua sequência de aminoácidos (número de acesso: CPIJ018627-RA) foram obtidos da base de dados VectorBase .

Todas as sequências foram alinhadas com o auxílio do algoritmo ClustalW do programa BioEdit 3.7.1 (HALL, 1999). Os dados genéticos populacionais foram analisados pela utilização dos programas DnaSP 5 (LIBRADO; ROZAS, 2009) e as análises evolucionárias moleculares e filogenéticas foram conduzidas na versão 5.10 do programa Mega (TAMURA et al., 2011).

## **7.6 Expressão de genes *GSTEs* de *Culex quinquefasciatus* ao longo do ciclo de vida e em diferentes tecidos**

### 7.6.1 Coleta do material biológico e extração de RNA total

Larvas de quarto estágio (L4), pupas e adultos (machos e fêmeas) recém-emergidos do mosquito *Culex quinquefasciatus* foram coletados e reunidos em *pools* de 10 indivíduos, a fim de realizar a expressão gênica de *GSTEs* em diferentes estágios do desenvolvimento. Quando o objetivo foi analisar a expressão em diferentes tecidos, fêmeas do mosquito foram dissecadas à fresco em solução salina (PBS) sob microscópio estereoscópico. Intestinos, glândulas salivares e túbulos de Malpighi isolados foram reunidos em *pools* (n = 10) e armazenados em microtubos de 1,5 ml contendo 500 µl do reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen). Todas as amostras foram armazenadas a - 80°C até sua utilização.

O RNA total de cada amostra (*pools* contendo órgãos de três ou quatro indivíduos) foi extraído usando o reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen), segundo as recomendações do fabricante. Após a recuperação do RNA, as amostras foram tratadas com DNase (Turbo DNase-Ambion, AM2239), a fim de remover qualquer contaminação com DNA genômico. A concentração e a qualidade das amostras do RNA isolado foram avaliadas por espectrofotometria (Nanodrop) aos níveis de absorvância de 260 e 280 nm.

### 7.6.2 RT-PCRq e análise da expressão relativa de *GSTEs*

Os perfis de transcrição dos genes *GSTE2* e *GSTE3* de *Culex quinquefasciatus* em diferentes órgãos e fases do desenvolvimento foram analisados por transcrição reversa seguida por PCR quantitativa (RT-PCRq). Todas as amostras de RNA usadas foram

normalizadas para a concentração de 50 ng/ $\mu$ l.

O kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR<sup>®</sup> (QIAGEN) foi usado nas reações RT-PCRq *one-step*. Cada reação continha SYBR Green Mix, transcriptase reversa, 100 ng de RNA molde, 0,5  $\mu$ M de cada *primer* (*forward* e *reverse*), em um volume final de 20  $\mu$ l. As amplificações com o controle endógeno (gene que codifica o DNA ribossomal *18S*) foram realizadas da mesma forma, só que em tubos separados em relação aos genes estudados. Os pares de *primers* foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000). As sequências dos *primers* de cada gene usado e o tamanho dos respectivos produtos amplificados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Sequências dos *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR da expressão de *GSTEs* ao longo do ciclo de vida e em diferentes tecidos de *Cx. quinquefasciatus*.

Genes	Gene	Nome do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Tamanho do produto
<i>GSTE2</i>	CPIJ018627-RA (Vectorbase)	Cq <i>GSTE2F</i>	TCAAACAGGCCAAGCTGAAC	166 pb
		Cq <i>GSTE2R</i>	ACCAGGGTGTCTTCCAACAG	
<i>GSTE3</i>	CPIJ018629-RA (Vectorbase)	Cq <i>GSTE3F</i>	AGATGTTTCGCAAGGCTTACC	120 pb
		Cq <i>GSTE3R</i>	AAGCCCATAGCCGAAGAAAT	
<i>18S</i>	Liu et al. (2011)	Cq18SF	CGCGGTAATTCCAGCTCCACTA	159 pb
		Cq18SR	GCATCAAGCGCCACCATATAGG	

Fonte: Autora

As amostras foram amplificadas no termociclador 7500 Real Time PCR System<sup>®</sup> (Applied Biosystems). O programa de PCR foi o seguinte: uma etapa inicial a 50°C por 30 minutos, que permitiu a transcrição reversa; outra etapa de 15 minutos a 95°C para ativar a Taq polimerase; seguida por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Controles negativos foram incluídos para detectar contaminação dos reagentes (*mix* sem molde de RNA) e presença de DNA genômico não removido pelo tratamento com DNase (*mix* sem transcriptase reversa). A especificidade da PCR foi checada após a amplificação, pela análise das curvas de dissociação dos *amplicons*.

A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), descrito na seção 7.4.3. Nesse caso, o quarto estágio larval (L4) e a glândula salivar foram utilizadas como amostras calibradoras nos experimentos do desenvolvimento e tecido-específico, respectivamente. Isso significa que o  $\Delta\Delta C_T$  foi obtido

pelo  $\Delta C_T$  de uma dessas amostras subtraído do  $\Delta C_T$  de um dos demais grupos de amostras de interesse [ $(C_{T, GSTE} - C_{T, 18S})_{\text{interesse}} - (C_{T, GSTE} - C_{T, 18S})_{\text{calibradora}}$ ]. Para cada intervalo, a média do  $\Delta\Delta C_T$  dos três *pools* de cada uma das amostras foi usada para calcular a expressão relativa entre os transcritos ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ). Quando as eficiências da amplificação dos genes de interesse e do controle endógeno não foram similares, os valores foram corrigidos pelo programa 7500 V2.0.6 (Applied Biosystems). Todas as amostras foram avaliadas em duplicata.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Diversidade dos genes *GSTE2* e *GSTE3* em populações de campo de *Aedes aegypti*

#### 8.1.1 Diversidade do gene *GSTE2*

Um total de 220 indivíduos das populações de campo foi sequenciado para o gene *GSTE2* de *Aedes aegypti* de campo, em ambos os sentidos, o que gerou 113 sequências com qualidade satisfatória. Após montagem, os *contigs* completos mostraram 1203 nucleotídeos (nt) de tamanho, englobando a maior parte de seu primeiro éxon, o segundo e terceiro éxons, além dos dois íntrons. Um pequeno segmento de 22 nt foi excluído do segundo íntron (posição +603 a +624), próximo ao sítio de anelamento dos *primers* *GSTE2*-C1R e *GSTE2*-C2F, devido à má qualidade das sequências nesse trecho. Como não foram observados polimorfismos nas sequências analisadas (éxons e íntrons), não houve diversidade haplotípica.

Quando as amostras de campo foram comparadas com sequências do gene *GSTE2* da linhagem Recife Resistente (RecR) e da base de dados VectorBase (AAEL007951), foram observados um total de 135 sítios polimórficos (11,2%). Destes, 22 (1,8%) estavam localizados na região de éxon e 113 (9,4%) na região de íntrons da proteína. Verificou-se a presença de mutações do tipo inserção/deleção (*indel*) nas sequências correspondentes ao primeiro e segundo íntrons. As sequências *GSTE2* derivadas das populações de campo foram idênticas à sequência identificada na linhagem RecR. Portanto, todas as diferenças observadas procederam de comparações com a sequência *GSTE2* de *Ae. aegypti* do Vectorbase. A sequência proteica deduzida mostrou 216 dos 222 resíduos de aminoácidos esperados para a proteína completa. Foram encontradas 16 mutações do tipo sinônimas e cinco mutações não-sinônimas nos sítios 104, 108, 143, 171 e 191 (Figura 12A).

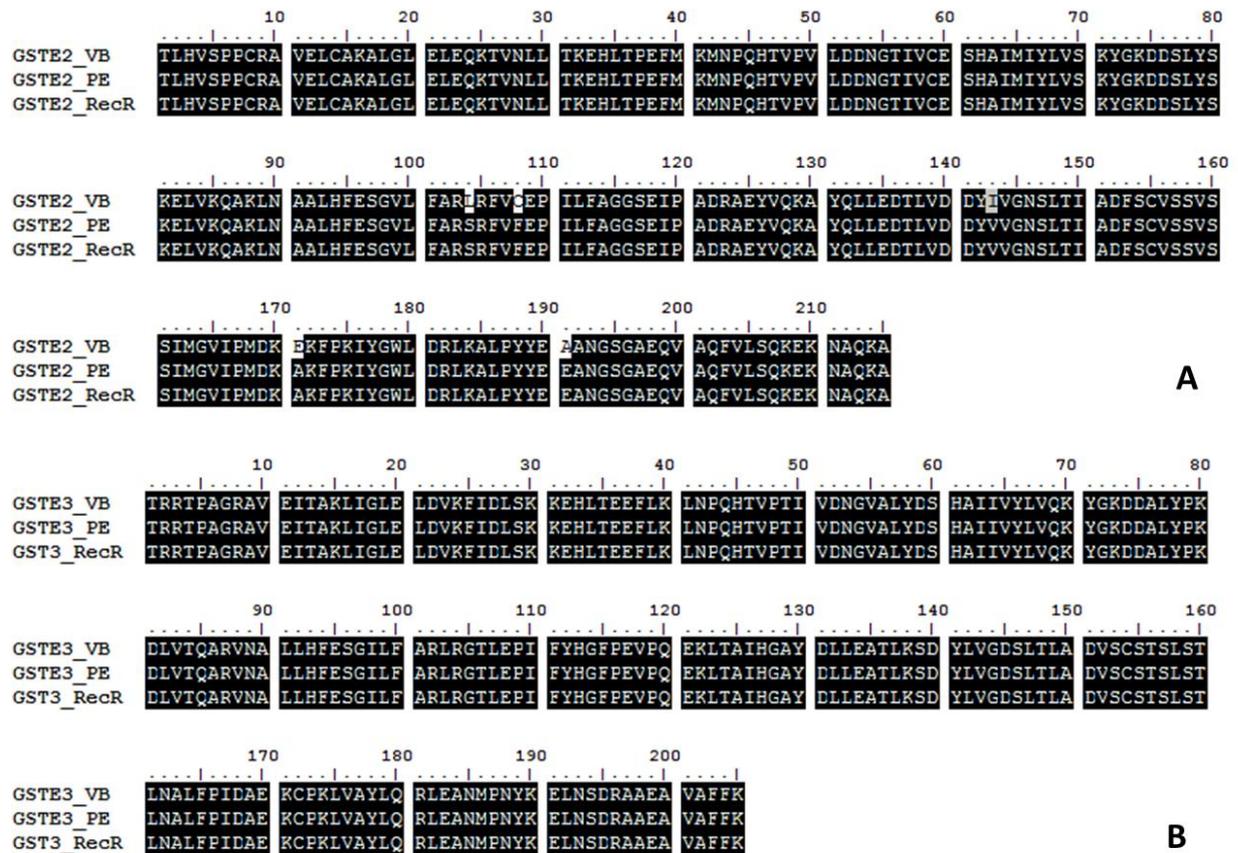
#### 8.1.2 Diversidade do gene *GSTE3*

Em relação ao gene *GSTE3*, foi obtido um total de 163 *contigs*. Eles englobaram um fragmento de 672 nucleotídeos (nt), contendo dois éxons e um íntron. Quando as sequências de todas as populações foram alinhadas, não foram observados polimorfismos entre elas. Portanto, essas sequências foram consideradas monomórficas entre si.

A análise comparativa dos polimorfismos de nucleotídeos entre as sequências genômicas *GSTE3* das populações de campo, de Recife Resistente (RecR) e do número de

acesso AAEL007951 do VectorBase, revelou 24 sítios polimórficos (3,6%). Entre estes, 21 (3,1%) estavam localizados na região codante e 3 (0,5%) na sequência do íntron da proteína. Novamente, as sequências das populações de campo foram idênticas às sequências de RecR. Dos 205 resíduos de aminoácidos obtidos pela tradução parcial da sequência de nucleotídeos, foram observadas apenas mutações do tipo sinônima (Figura 12B).

Figura 12 – Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos dos genes *GSTE2* (A) e *GSTE3* (B) de *Aedes aegypti*.



Nota: Os sítios conservados estão destacados em preto e os sítios similares estão sombreados em cinza. VB: sequência da proteína *GSTE3* de *Ae. aegypti* obtida na base de dados VectorBase; PE: sequência deduzida de aminoácidos a partir das sequências de nucleotídeo das populações de campo de Pernambuco; RecR: sequência derivada da linhagem de *Ae. aegypti* resistente ao temefós (RecR).

Fonte: Autora

## 8.2 Expressão tecido-específica de genes *GSTs* em fêmeas de *Aedes aegypti* após alimentação sanguínea com vírus Dengue

A quantificação dos transcritos gênicos de *GSTE2*, *GSTE3*, *GSTO* e *GSTX1* foi realizada pela comparação entre os grupos de fêmeas de *Aedes aegypti* da colônia Recife Laboratório (RecLab) alimentadas artificialmente com o sorotipo 2 do vírus Dengue (DENV-

2) e grupos controles (fêmeas não infectadas) para cada órgão ou intervalo de tempo considerado. Todos os quatro genes mostraram diferentes padrões de expressão espacial e temporal.

### 8.2.1 Primeira alimentação

Na primeira alimentação, a análise quantitativa do gene *GSTE2* mostrou baixos níveis de expressão nos órgãos avaliados. Seis horas (6h) após a infecção, houve uma sutil diminuição no nível de expressão no intestino e na carcaça (Figuras 13A e 13A). Porém, ao longo do tempo, a quantidade relativa de transcritos *GSTE2* aumentou gradativamente no intestino, chegando ao valor máximo de 1,6 vezes em relação ao grupo controle no sétimo dia pós-infecção (7 dpi). Na glândula salivar e na cabeça, a expressão relativa de *GSTE2* foi menor no grupo infectado no ponto 1 dpi, aumentando a expressão no ponto 3 dpi, com níveis de 1,8 e 1,2 vezes, respectivamente (Figura 13C e 13D). Entre os tecidos avaliados, a glândula salivar mostrou o maior nível de expressão relativa para o gene *GSTE2*, com pico de 1,8 vezes no ponto 3 dpi.

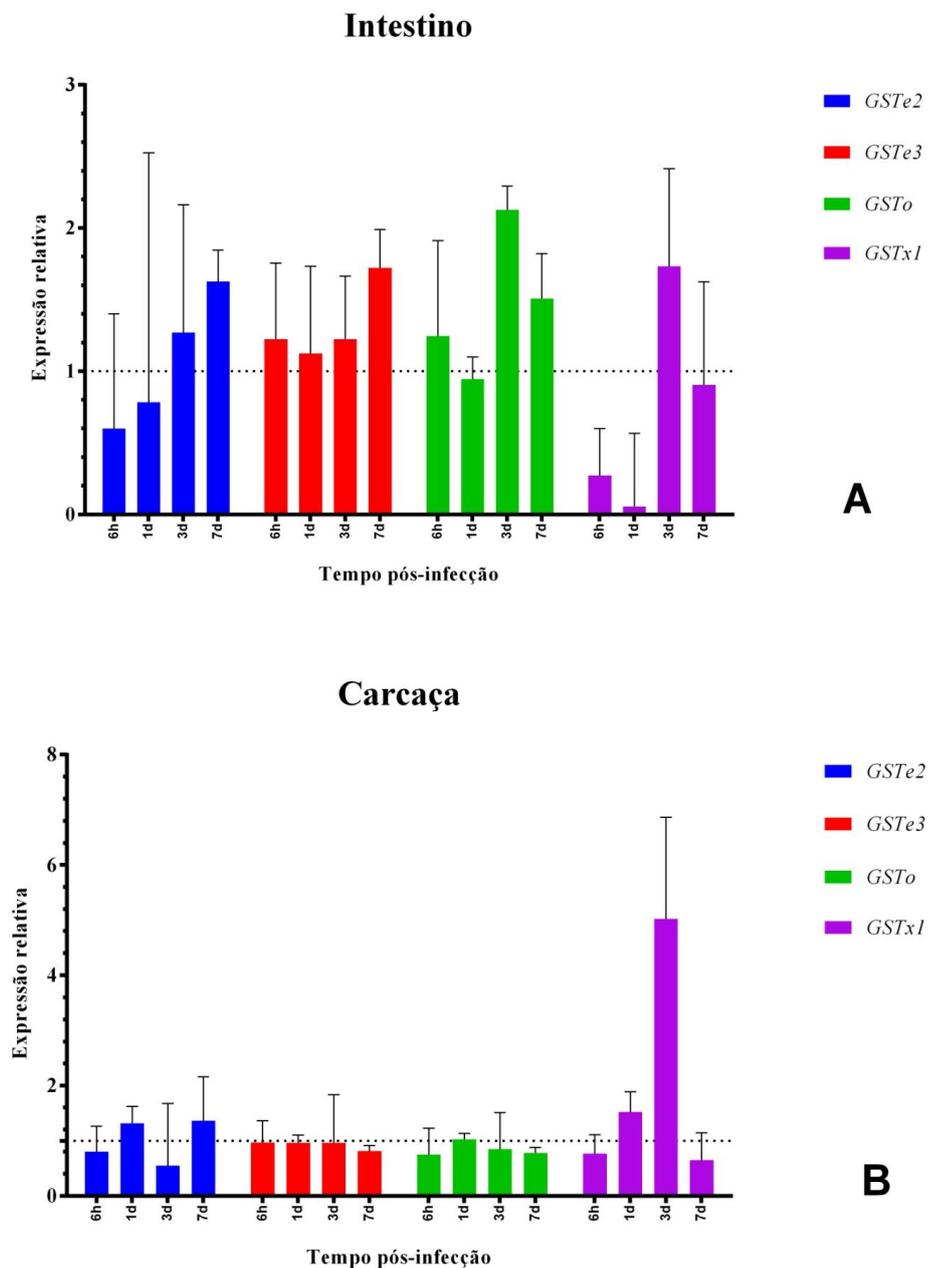
Com exceção da glândula salivar, a expressão do gene *GSTE3* nos demais órgãos do grupo infectado foi aproximadamente constante ao longo do tempo. Porém, no ponto 3 dpi, os níveis de transcritos diminuíram para 0,9 vezes na cabeça (Figura 13D); enquanto no ponto 7 dpi, eles aumentaram em 1,7 vezes no intestino (Figura 13A) e diminuíram em 0,8 vezes na carcaça (Figura 13B). Na glândula salivar, houve redução nos níveis de RNA mensageiro (RNAm) nos pontos 6h e 1 dpi, com recuperação da transcrição no terceiro dia para o valor de duas vezes com relação ao grupo controle (Figura 13C).

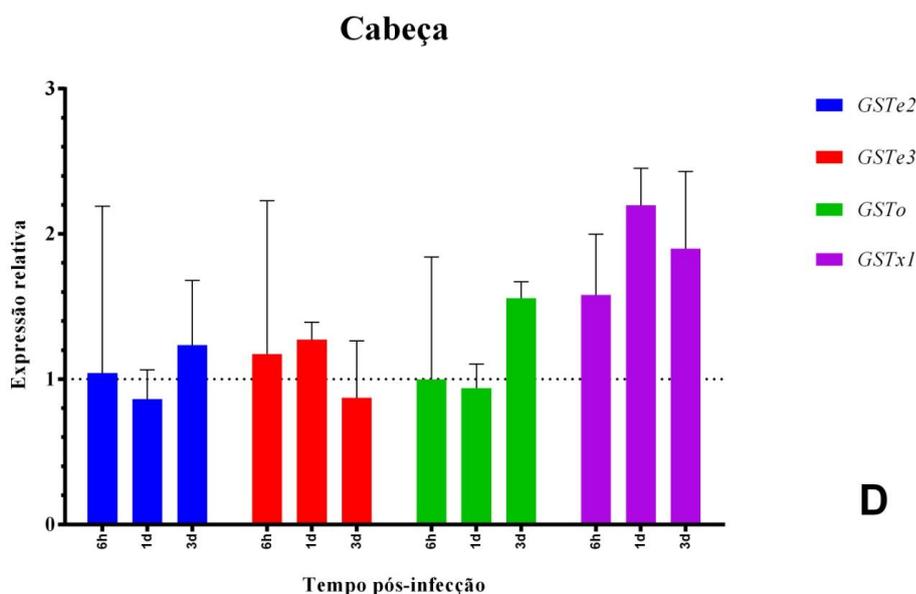
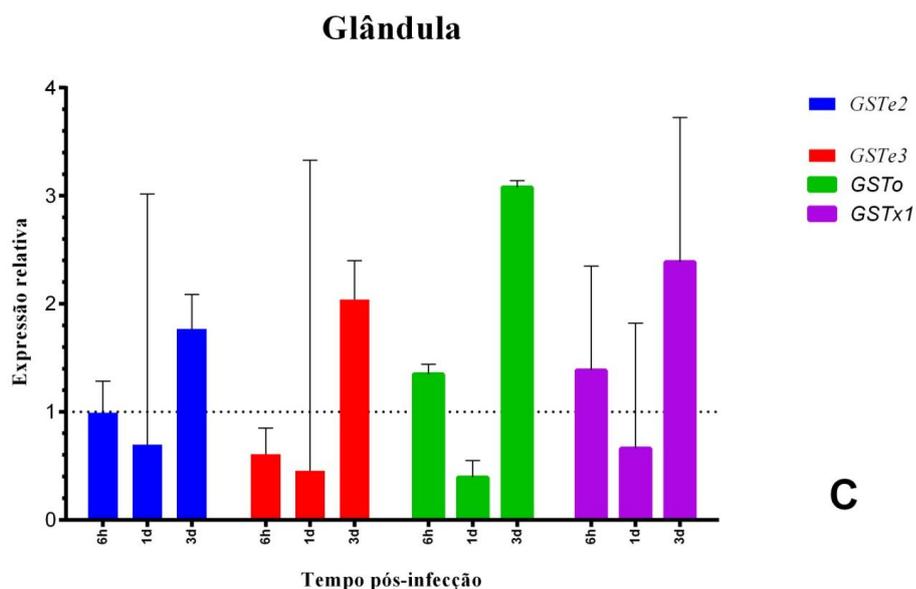
Os perfis de expressão do gene *GSTO* foram similares no intestino e glândula salivar de fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas com DENV-2. No primeiro dia após a infecção, houve diminuição na expressão em ambos os grupos. No ponto 3 dpi, observaram-se os maiores picos de expressão, sendo 2,1 vezes no intestino e 3,1 vezes na glândula salivar (Figura 13A e 13C). Na carcaça, a expressão do gene *GSTO* foi aproximadamente constante ao longo do tempo, sem a presença de picos (Figura 13B). Por outro lado, no ponto 3 dpi, também ocorreu pico de expressão para esse gene na cabeça (Figura 13D).

Por fim, a expressão do gene *GSTX1* no intestino de fêmeas infectadas mostrou expressão diminuída no início da infecção viral, aumentando os níveis de transcritos apenas no ponto 3 dpi (1,7 vezes) e depois exibindo transcrição semelhante ao grupo controle (Figura 13A). Embora na carcaça *GSTX1* também tenha exibido baixos níveis de expressão relativa

no início do processo de infecção, ele aumentou os níveis de transcritos no ponto 1 dpi e, no intervalo analisado, chegou ao máximo da expressão no ponto 3dpi (Figura 13B). Durante o período observado, os níveis de transcritos desse gene na glândula salivar mostraram-se menores no grupo infectado do que no grupo controle no ponto 1 dpi, com aumento e pico de expressão no ponto 3 dpi (5,0 vezes) (Figura 13C). Na cabeça, porém, o ponto 1 dpi foi o de maior expressão relativa detectada (2,2 vezes) (Figura 13D).

Figura 13 – Expressão relativa dos genes *GSTE2*, *GSTE3*, *GSTO* e *GSTX1* ao longo do tempo em diferentes tecidos de fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas com o sorotipo 2 do vírus Dengue (DENV-2).





Nota: As barras representam o desvio padrão da expressão relativa a partir de três réplicas. A linha pontilhada representa o valor base (1,0) para comparação da expressão com os respectivos controles. Resultados da primeira alimentação (título do estoque viral =  $1 \times 10^5$  FFU/ml).

Fonte: Autora

### 8.2.2 Segunda alimentação

Na segunda alimentação, o perfil de expressão gênica temporal observado no intestino foi semelhante entre *GSTE2*, *GSTE3*, *GSTO* e *GSTX1*. No intervalo seis horas (6h) pós-infecção com DENV-2, houve intensa produção de transcritos e picos de expressão foram observados entre todos os genes avaliados (Figura 14). Com relação ao grupo controle, a expressão relativa variou de 6,3 vezes (*GSTE2*) a 23,5 vezes (*GSTO*). Apesar de os níveis de

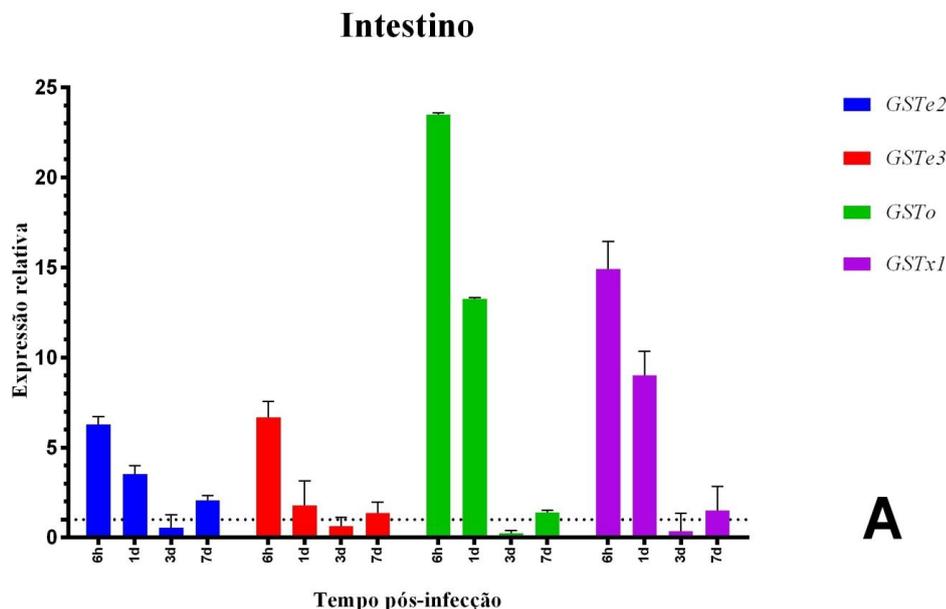
transcritos no grupo infectado terem sido menores que no grupo controle no ponto 3 dpi, a expressão foi maior no ponto 7 dpi.

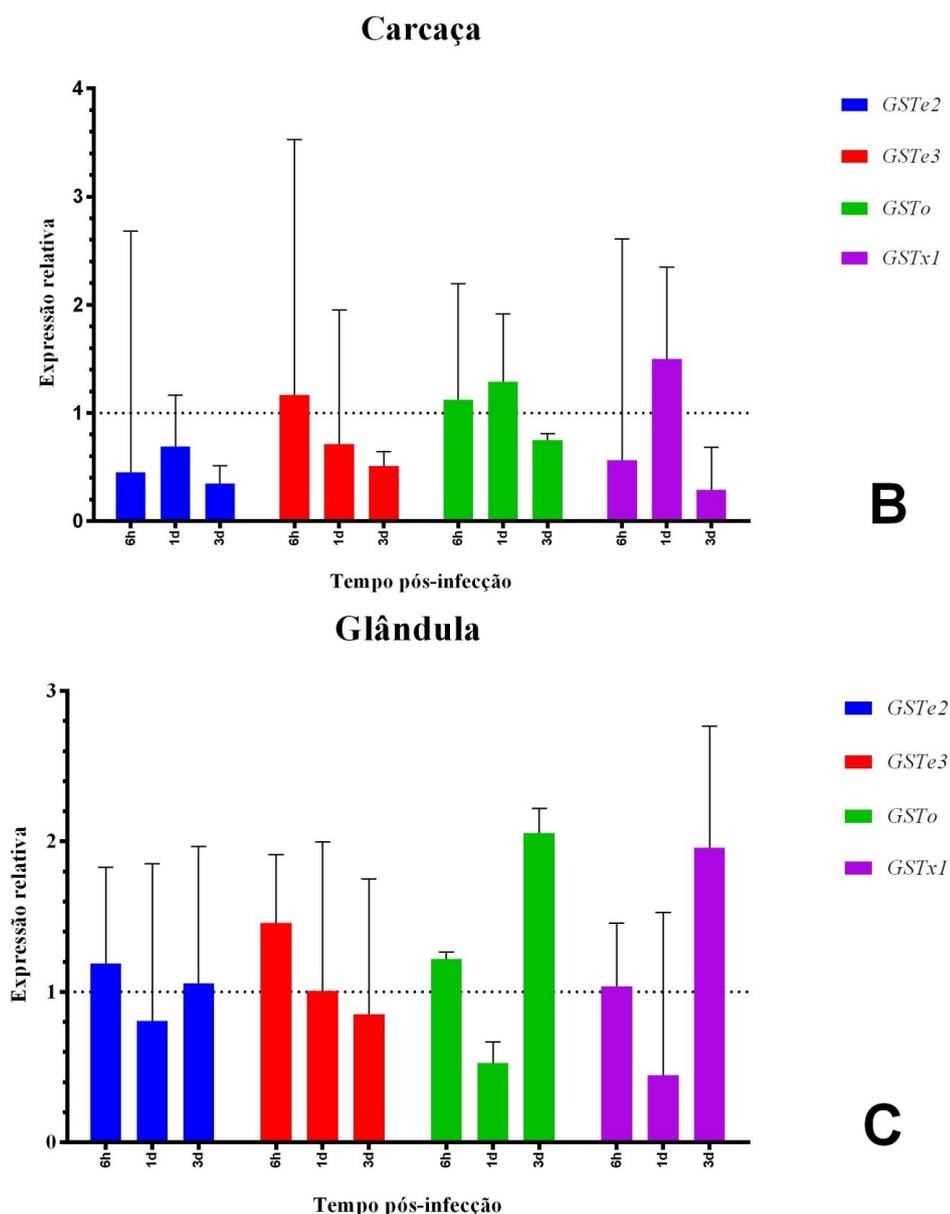
Diferentemente do que ocorreu no intestino, o gene *GSTE2* mostrou-se negativamente regulado na carcaça em todos os intervalos analisados. Apesar de o gene *GSTE3* ter exibido expressão de 1,2 vezes maior 6h pós-infecção, sua expressão diminuiu ao longo do tempo e apresentou valores próximos àqueles do gene *GSTE2*. Por sua vez, foram observados picos discretos de expressão dos genes *GSTO* e *GSTX1* no ponto 1 dpi (1,3 vezes e 1,5 vezes, respectivamente) e diminuição nos níveis de transcritos no ponto 3 dpi (Figura 14B).

Na glândula salivar, houve aumento na produção de RNA mensageiro (RNAm) dos genes *GSTE2*, *GSTE3* e *GSTO* no intervalo 6h. A expressão relativa do gene *GSTE2* foi ligeiramente menor no ponto 1 dpi, enquanto no ponto 3 dpi ocorreu o mesmo para o gene *GSTE3*. Por sua vez, os perfis de expressão ao longo do tempo para os genes *GSTO* e *GSTX1* mostraram-se semelhantes: no ponto 1 dpi observou-se regulação negativa para a produção de transcritos e picos de expressão no intervalo 3 dpi (Figura 14C).

Devido a problemas técnicos apresentados pelo software 7500 (Applied), durante o processamento dos resultados da PCR em tempo-real, alguns pontos de coleta realizados não puderam ter seus resultados resgatados (glândula salivar 7 dpi e cabeça 7 dpi, na primeira alimentação; carcaça 7 dpi, glândula salivar 7 dpi e cabeça 6h pós-infecção, 1 dpi, 3 dpi e 7 dpi, na segunda alimentação).

Figura 14 – Expressão relativa dos genes *GSTE2*, *GSTE3*, *GSTO* e *GSTX1* ao longo do tempo em diferentes tecidos de fêmeas de *Aedes aegypti* infectadas com o sorotipo 2 do vírus Dengue (DENV-2).





Nota: As barras representam o desvio padrão da expressão relativa a partir de três réplicas. A linha pontilhada representa o valor base (1,0) para comparação da expressão com os respectivos controles. Resultados da segunda alimentação (título do estoque viral =  $6 \times 10^5$  FFU/ml).

Fonte: Autora

### 8.3 Diversidade do gene *GSTE2* em populações de campo de *Culex quinquefasciatus*

Do total de 180 indivíduos sequenciados para o gene *GSTE2* de *Culex quinquefasciatus*, foram obtidas 137 sequências com qualidade satisfatória para as análises. Depois de montados, os *contigs* completos apresentaram 767 nucleotídeos (nt) de tamanho. Quando as sequências genômicas de *GSTE2* foram comparadas entre as sete populações

naturais e as duas linhagens de laboratório, foram observados 34 sítios polimórficos (4,7%), dos quais 29 estavam localizados nas regiões de éxons.

A sequência traduzida mostrou 212 dos 224 resíduos de aminoácidos esperados para a proteína completa. Nessa região, a diversidade nucleotídica intrapopulacional nos sítios não-sinônimos foi apenas 1,6 vezes maior do que nos sítios sinônimos (Tabela 4). Dos oito sítios variáveis, apenas dois deles não era *singletons*, estando localizados nos sítios 16 e 202 da sequência. Ao todo, foram observadas 18 mutações do tipo sinônima e oito não-sinônimas nos sítios 6, 9, 10, 16, 182, 202, 207 e 211 da proteína (Figura 15).

No total, foram identificados 33 haplótipos diferentes (H1-H33). Entre as populações analisadas, o H1 foi o haplótipo mais comum, estando presente em todas as populações, exceto na linhagem CqRL2362. Os haplótipos H2, H6, H11, H12, H13 e H27 foram classificados como moderados (observados pelo menos duas vezes ou três vezes). Observou-se também a presença de, pelo menos, dois haplótipos raros (*singletons*) e exclusivos em cada população analisada. Todas as populações foram polimórficas, exibindo de três (Glória do Goitá, Peixinhos e Santa Cruz do Capibaribe) a nove (Água Fria) haplótipos diferentes. A tabela 5 mostra a distribuição e a tabela 6 exibe as frequências dos diferentes haplótipos de *GSTE2* identificados em cada população.

O polimorfismo do gene *GSTE2* foi considerado baixo (média de 6,2 SNPs por 1 kpb). O menor valor foi observado na linhagem de laboratório CqRL2362 (0,0000009), enquanto a população de Jaboatão apresentou o maior índice (0,1035). Foi observado um SNP trialélico na posição 29 da sequência. A diversidade haplotípica total foi baixa ( $Hd = 0,4991$ ), variando de muito baixa (Peixinhos) a elevada (CqRL2362).

Com relação às análises de distribuição *mismatch*, todas as populações testadas apresentaram curvas de distribuição multimodal e irregular, diferentes do esperado sob a hipótese de expansão populacional recente, o que indica estabilidade demográfica (Figura 16). O teste  $D$  de Tajima não mostrou desvio significativo da expectativa neutra das mutações nas populações amostradas, com exceção de Peixinhos e Santa Cruz do Capibaribe. O número de haplótipos encontrados nas diferentes populações ( $h$ ), a diversidade haplotípica ( $Hd$ ), o número de sítios polimórficos entre os diferentes haplótipos ( $S$ ), a média do número de nucleotídeos diferentes ( $k$ ) e a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) estão descritos na Tabela 7.

A partir do cálculo de distância genética entre os haplótipos, foi montada uma matriz de distância e, a seguir, construído um dendrograma com a finalidade de mostrar as relações evolutivas entre os haplótipos encontrados no gene *GSTE2* (Tabela 8). A maioria dos haplótipos apresentou distância genética cujos valores variaram de 0,003 a 0,033. A análise da

estrutura da árvore permitiu inferir que os 33 haplótipos formam três grandes grupos que compartilham maior relação genética (Figura 17).

As populações apresentaram diferenciação genética moderada e baixo valor de fluxo gênico ( $Nm = 1,68$ ). A estimativa do número efetivo de migrantes por geração entre as populações e os valores do índice de fixação ( $Fst$ ) estão na tabela 9. As relações evolucionárias entre os taxa estão representados na figura 18.

Tabela 4 – Diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) intrapopulacional com relação aos sítios sinônimos e não-sinônimos da região que codifica a enzima *GSTE2* de *Culex quinquefasciatus*.

Populações	N	Região traduzida <sup>a</sup> não-sinônima <sup>b</sup>	Região traduzida sinônima <sup>c</sup>
LabCq	13	0,00288 (5)	0,00282 (1)
CqRL2362	5	0,00468 (4)	0 (0)
Água Fria	18	0,01297 (17)	0,00322 (1)
Alto da Conquista	18	0,00529 (13)	0,00179 (1)
Glória do Goitá	14	0,00590 (n.a.)	0,00298 (n.a.)
Ipojuca	19	0,00211 (6)	0,00121 (1)
Jaboatão	17	0,01312 (14)	0,00323 (1)
Peixinhos	19	0,00178 (8)	0,00121 (1)
Santa Cruz	14	0,00242 (8)	0,00161 (1)
<b>Total</b>	<b>137</b>	<b>0,00744 (75)</b>	<b>0,00260 (7)</b>

Nota: N: Número de sequências; <sup>a</sup>: Excluindo o íntron; ausência de *indels* na região traduzida; <sup>b</sup>: Diversidade nucleotídica em sítios não-sinônimos (substituição de aminoácidos) e a quantidade de tais sítios em parênteses; <sup>c</sup>: Diversidade nucleotídica em sítios sinônimos (mutações silenciosas) e a quantidade de tais sítios em parênteses.

Fonte: Autora

Figura 15 – Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos do gene *GSTE2* de *Culex quinquefasciatus*.

	10	20	30	40	50	60	70	80
Lab_1M	PILYTLHLSP	PCRAVELTAK	ALGLDLEQKV	VNLLTGDHLK	PDYLMNPPQH	TIPVLDDNGT	IIPESHAIMI	YLVSKYGKDD
2362_7M	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
2362_8M	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF_1F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF_1M	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF_2F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AC_5L	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AC_6L	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AC_12L	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
GG_1L	.....F..RN	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
GG_4L	.....L	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
GG_5L	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
IP_1F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
JB_2F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
JB_2M	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
JB_5F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PX_1F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PX_9M	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SC_2F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	90	100	110	120	130	140	150	160
Lab_1M	SLYSKEIVKQ	AKLNAALHFE	SGVLFARMRF	LFEPILFRGS	SEMPADRTEY	IEKAYQLLED	TLVDDYVWGS	TPTIADFSCI
2362_7M	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
2362_8M	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF_1F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF_1M	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF_2F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AC_5L	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AC_6L	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AC_12L	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
GG_1L	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
GG_4L	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
GG_5L	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
IP_1F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
JB_2F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
JB_2M	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
JB_5F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PX_1F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PX_9M	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SC_2F	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

	170	180	190	200	210
Lab_1M	STISSLMGVI	PLESTKYPKI	LAWVDRLKAL	PYEEANGSG	AVQLSSAVLA SK
2362_7M	.....	.....	.....	.....	.....
2362_8M	.....	.....	.....	.....	.....
AF_1F	.....	.....	.....	.....	.....
AF_1M	.....	.....	.....	.....	.....
AF_2F	.....	.....	.....	.....	.....
AC_5L	.....	.....	.....	.....	.....
AC_6L	.....	.....	.....	.....	.....
AC_12L	.....	.....	.....	.....	.....P.
GG_1L	.....	.....	.....	.....	.....
GG_4L	.....	.....	.....	.....	.....
GG_5L	.....	.....	.....	.....	.....
IP_1F	.....	.....	.....	.....	.....
JB_2F	.....	.....	.....	.....	.....
JB_2M	.....	.....	.....	.....	.....
JB_5F	.....	.....	.....G.....	.....	.....
PX_1F	.....	.....	.....	.....	.....
PX_9M	.....	.....	.....	.....	.....
SC_2F	.....	.....	.....	.....	.....

Nota: Os sítios conservados estão representados por pontos e os sítios variáveis por seus respectivos símbolos. Resíduos de aminoácidos similares estão circundados. Lab: Colônia de laboratório susceptível a organofosforados; 2362: Linhagem resistente a *Lysinibacillus sphaericus*; AF: População de campo de Água Fria; AC: Alto da Conquista; GG: Glória do Goitá; IP: Ipojuca; JB: Jaboatão; PX: Peixinhos; SC: Santa Cruz do Capibaribe.

Fonte: Autora

Tabela 5 – Número de indivíduos observados para cada haplótipo do gene *GSTE2* nas populações de *Culex quinquefasciatus*.

População	Haplótipos (H)																																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
LabCq	9	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CqRL2362	-	-	-	-	-	2	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AC	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AF	8	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	1	2	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GG	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IP	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
JB	9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	1	-	-	-	-	-
PX	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
SC	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>													

Nota: LabCq: Colônia de laboratório susceptível a organofosforados; CqRL2362: Linhagem resistente a *Lysinibacillus sphaericus*; AF: População de campo de Água Fria; AC: Alto da Conquista; GG: Glória do Goitá; IP: Ipojuca; JB: Jabotão; PX: Peixinhos; SC: Santa Cruz do Capibaribe.

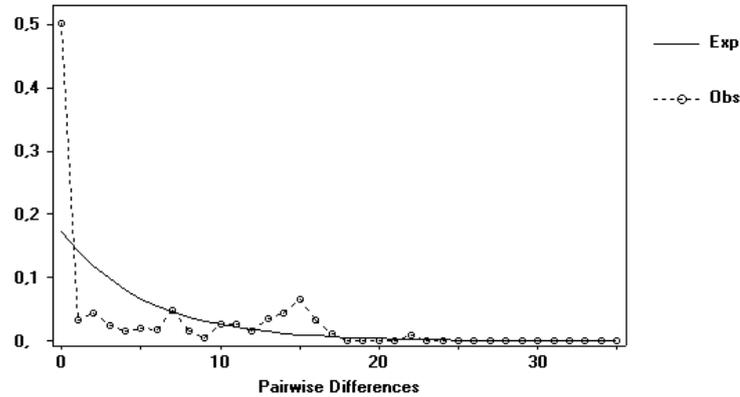
Fonte: Autora

Tabela 6 – Frequência dos diferentes haplótipos do gene *GSTE2* encontrados entre as sequências analisadas nas populações de *Culex quinquefasciatus*.

Haplótipo	Número de sequências	Frequência
H1	97	0,708
H2	2	0,015
H3	1	0,007
H4	1	0,007
H5	1	0,007
H6	2	0,015
H7	1	0,007
H8	1	0,007
H9	1	0,007
H10	1	0,007
H11	3	0,022
H12	3	0,022
H13	2	0,015
H14	1	0,007
H15	1	0,007
H16	1	0,007
H17	1	0,007
H18	1	0,007
H19	1	0,007
H20	1	0,007
H21	1	0,007
H22	1	0,007
H23	1	0,007
H24	1	0,007
H25	1	0,007
H26	1	0,007
H27	2	0,015
H28	1	0,007
H29	1	0,007
H30	1	0,007
H31	1	0,007
H32	1	0,007
H33	1	0,007
<b>Total</b>	<b>137</b>	<b>1</b>

Fonte: Autora

Figura 16 – Distribuição *mismatch* para 137 indivíduos de *Culex quinquefasciatus* provenientes de nove populações de Pernambuco.



Nota: Valores dos eixos X e Y referem-se aos números de diferenças e a suas frequências, respectivamente. Linhas descontínuas e linhas contínuas indicam valores observados e esperados (baseados no modelo de expansão populacional), respectivamente.

Fonte: Autora

Tabela 7 – Índices de polimorfismos do gene *GSTE2* em nove populações de *Culex quinquefasciatus*.

Populações	<i>h</i>	<i>Hd</i>	<i>S</i>	$\pi$	<i>K</i>	<i>D</i>
LabCq	5	0,538	9	0,00344	2,64103	-0,35207
CqRL2362	4	0,900	5	0,000009	2,60000	0,56199
Água Fria	9	0,804	23	0,01104	8,47059	1,05205
Alto da Conquista	5	0,405	17	0,00420	3,22222	-1,33704
Glória do Goitá	3	0,275	25	0,00483	3,70330	-2,32808*
Ipojuca	4	0,298	8	0,00169	1,29825	-1,48037
Jaboatão	7	0,721	18	0,1035	7,94118	1,92721
Peixinhos	3	0,205	10	0,00149	1,14620	-2,12573**
Santa Cruz	3	0,275	12	0,00239	1,83516	-2,04567**
<b>Total</b>	<b>33</b>	<b>0,4991</b>	<b>34</b>	<b>0,00628</b>	<b>6,37112</b>	<b>-0,80895</b>

Nota: *h*: Número de haplótipos por população; *Hd*: Diversidade haplotípica; *S*: Número de sítios polimórficos; *k*: média no número de nucleotídeos diferentes;  $\pi$ : diversidade nucleotídica; *D*: Teste de Tajima. \*Nível de significância de  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,05$ .

Fonte: Autora

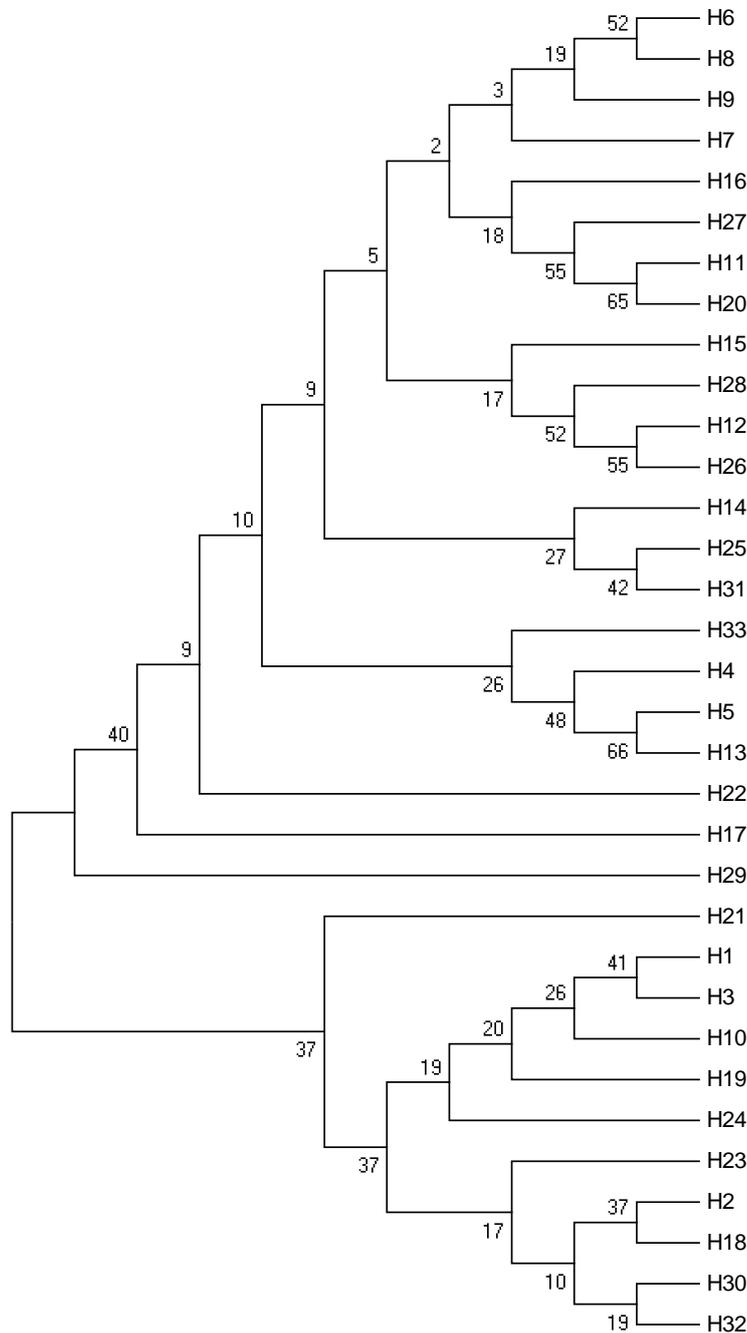
Tabela 8 – Estimativa da distância genética entre os haplótipos *GSTE2* de *Culex quinquefasciatus*.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32					
H1																																					
H2	0,003																																				
H3	0,000	0,003																																			
H4	0,009	0,007	0,009																																		
H5	0,008	0,008	0,008	0,004																																	
H6	0,018	0,016	0,018	0,009	0,013																																
H7	0,013	0,011	0,013	0,004	0,008	0,005																															
H8	0,020	0,017	0,020	0,011	0,014	0,001	0,007																														
H9	0,017	0,014	0,017	0,008	0,012	0,004	0,004	0,003																													
H10	0,001	0,004	0,001	0,011	0,009	0,020	0,014	0,018	0,016																												
H11	0,021	0,019	0,021	0,012	0,016	0,003	0,008	0,004	0,007	0,023																											
H12	0,020	0,017	0,020	0,011	0,014	0,007	0,007	0,008	0,008	0,021	0,007																										
H13	0,009	0,009	0,009	0,003	0,001	0,012	0,007	0,013	0,011	0,011	0,014	0,013																									
H14	0,016	0,013	0,016	0,009	0,013	0,005	0,005	0,007	0,007	0,017	0,005	0,009	0,012																								
H15	0,017	0,014	0,017	0,008	0,009	0,007	0,004	0,008	0,005	0,018	0,009	0,005	0,008	0,007																							
H16	0,019	0,016	0,019	0,009	0,013	0,003	0,005	0,004	0,007	0,020	0,003	0,007	0,012	0,003	0,007																						
H17	0,017	0,015	0,017	0,011	0,012	0,015	0,012	0,016	0,013	0,018	0,015	0,016	0,011	0,017	0,013	0,017																					
H18	0,004	0,001	0,004	0,008	0,009	0,015	0,009	0,016	0,013	0,005	0,017	0,016	0,011	0,012	0,013	0,015	0,016																				
H19	0,001	0,004	0,001	0,011	0,009	0,020	0,014	0,021	0,018	0,003	0,023	0,021	0,011	0,017	0,018	0,020	0,019	0,005																			
H20	0,021	0,019	0,021	0,012	0,016	0,003	0,008	0,004	0,007	0,023	0,000	0,007	0,014	0,005	0,009	0,003	0,015	0,017	0,023																		
H21	0,005	0,008	0,005	0,014	0,013	0,024	0,018	0,025	0,023	0,007	0,027	0,025	0,014	0,021	0,023	0,024	0,023	0,009	0,007	0,027																	
H22	0,029	0,027	0,029	0,020	0,024	0,011	0,016	0,012	0,014	0,031	0,008	0,014	0,023	0,013	0,017	0,011	0,023	0,025	0,031	0,008	0,033																
H23	0,004	0,004	0,004	0,011	0,009	0,015	0,009	0,016	0,013	0,005	0,017	0,016	0,011	0,012	0,013	0,015	0,018	0,003	0,005	0,017	0,009	0,025															
H24	0,003	0,003	0,003	0,009	0,011	0,016	0,011	0,017	0,014	0,004	0,019	0,017	0,012	0,013	0,014	0,016	0,017	0,004	0,004	0,019	0,008	0,027	0,004														
H25	0,011	0,008	0,011	0,007	0,008	0,008	0,005	0,009	0,007	0,012	0,011	0,009	0,009	0,005	0,007	0,008	0,017	0,007	0,012	0,011	0,016	0,019	0,007	0,008													
H26	0,018	0,016	0,018	0,009	0,013	0,005	0,005	0,007	0,007	0,020	0,008	0,001	0,012	0,008	0,004	0,005	0,017	0,015	0,020	0,008	0,024	0,016	0,015	0,016	0,008												
H27	0,020	0,017	0,020	0,011	0,014	0,004	0,007	0,005	0,005	0,021	0,001	0,005	0,013	0,007	0,008	0,004	0,013	0,016	0,021	0,001	0,025	0,009	0,016	0,017	0,009	0,007											
H28	0,023	0,020	0,023	0,013	0,017	0,009	0,009	0,011	0,011	0,024	0,007	0,003	0,016	0,009	0,008	0,007	0,018	0,019	0,024	0,007	0,028	0,014	0,019	0,020	0,012	0,004	0,005										
H29	0,009	0,007	0,009	0,011	0,012	0,012	0,007	0,013	0,011	0,011	0,015	0,011	0,013	0,009	0,008	0,012	0,016	0,005	0,011	0,015	0,014	0,023	0,005	0,007	0,007	0,009	0,013	0,013									
H30	0,001	0,001	0,001	0,008	0,007	0,017	0,012	0,018	0,016	0,003	0,020	0,019	0,008	0,014	0,016	0,017	0,016	0,003	0,003	0,020	0,007	0,028	0,003	0,004	0,009	0,017	0,019	0,021	0,008								
H31	0,013	0,011	0,013	0,009	0,011	0,008	0,005	0,009	0,007	0,014	0,008	0,009	0,012	0,003	0,007	0,005	0,017	0,009	0,014	0,008	0,018	0,016	0,009	0,011	0,003	0,008	0,007	0,009	0,007	0,012							
H32	0,003	0,003	0,003	0,009	0,008	0,019	0,013	0,020	0,017	0,004	0,021	0,020	0,009	0,016	0,017	0,019	0,017	0,004	0,004	0,021	0,008	0,027	0,004	0,005	0,011	0,019	0,020	0,023	0,009	0,001	0,013						
H33	0,014	0,012	0,014	0,005	0,009	0,004	0,009	0,005	0,008	0,016	0,007	0,011	0,008	0,009	0,011	0,007	0,013	0,013	0,016	0,007	0,020	0,014	0,016	0,014	0,009	0,009	0,008	0,013	0,016	0,013	0,012	0,015					

Nota: O número de substituições de bases por sítio entre duas sequências é mostrado. As análises utilizaram o modelo de 2-parâmetros de Kimura (KIMURA, 1980).

Fonte: Autora

Figura 17 – Relações filogenéticas entre os 33 haplótipos do gene *GSTE2* de *Culex quinquefasciatus*.



Nota: A história evolucionária foi inferida pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA). Os ramos da árvore estão em escala e são proporcionais às distâncias evolucionárias usadas para inferir a árvore filogenética. Os números apresentados nos ramos foram obtidos a partir de um *bootstrap* de 1.000 replicatas usando modelo de 2-parâmetros de Kimura (KIMURA, 1980).

Fonte: Autora



Tabela 9 – Matriz de diferenciação genética entre populações de *Culex quinquefasciatus*.

Populações	Cqq_Lab	Cqq_2362	AF	AC	GG	IP	JB	PX	SC
LabCq	-	0.15967	0.01547	-0.01013	0.00005	-0.00051	0.00017	0.01370	0.00005
CqRL2362	0.77821	-	0.07534	0.20059	0.27511	0.25018	0.09647	0.30746	0.27511
AF	0.14470	0.41666	-	0.03478	0.06459	0.06415	-0.00266	0.08986	0.06459
AC	-0.00734	0.75985	0.14288	-	-0.00898	-0.00964	0.02218	-0.00140	-0.00898
GG	0.00460	0.76175	0.17443	-0.03636	-	-0.01352	0.04455	-0.01326	-0.01744
IP	0.02505	0.84453	0.24481	-0.01577	0.02339	-	0.04299	-0.00989	-0.01352
JB	0.15019	0.46793	0.02156	0.12813	0.16625	0.22965	-	0.06620	0.04455
PX	0.03163	0.85306	0.25387	-0.01357	-0.03032	-0.03573	0.24389	-	-0.01326
SC	-0.00576	0.82380	0.21776	-0.02449	-0.04379	-0.01893	0.21552	-0.03530	-

Nota: Baseado no polimorfismo do gene *GSTE2*, calculado a partir do método da estatística F (abaixo da diagonal). Números efetivos de migrantes por geração (Nm) (acima da diagonal). LabCq: Colônia de laboratório susceptível a organofosforados; CqRL2362: Linhagem resistente a *Lysinibacillus sphaericus*; AF: População de campo de Água Fria; AC: Alto da Conquista; GG: Glória do Goitá; IP: Ipojuca; JB: Jaboatão; PX: Peixinhos; SC: Santa Cruz do Capibaribe.

Fonte: Autora

#### 8.4 Padrões de expressão de *GSTE2* e *GSTE3* em *Culex quinquefasciatus*

A quantificação dos transcritos dos genes *GSTE2* e *GSTE3* de *Culex quinquefasciatus* foi realizada pela comparação entre o quarto estágio larval (amostra calibradora) e os demais grupos na análise da expressão quanto aos estágios do desenvolvimento nesse vetor; e entre glândula salivar e os demais órgãos, na análise tecido-específica.

##### 8.4.1 Expressão ao longo do ciclo de vida

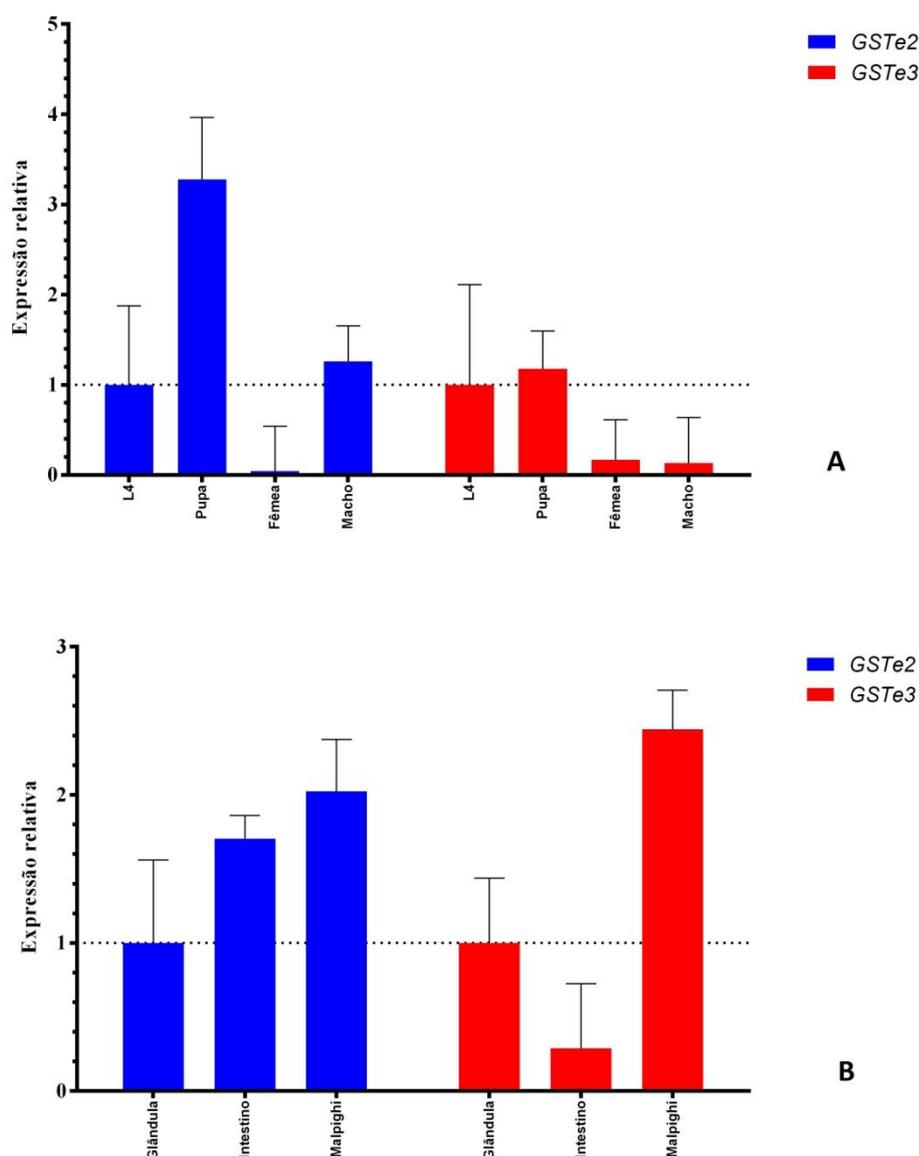
Os resultados mostraram que os genes *GSTE2* e *GSTE3* de *Culex quinquefasciatus* foram expressos em todos os estágios do desenvolvimento analisados (Figura 19). Na fase de pupa, foi possível observar picos de expressão para os dois genes, sendo que a abundância relativa dos transcritos foi maior para o *GSTE2* (3,2 vezes). Por sua vez, os níveis de transcritos *GSTE2* foram maiores nos machos, com relação ao grupo de fêmeas. Quando esses mesmos grupos foram comparados para o gene *GSTE3*, observaram-se baixos valores de expressão, com relação a larvas.

##### 8.4.2 Expressão tecido-específica

A análise quantitativa dos transcritos *GSTEs* em diferentes órgãos de fêmeas recém-emergidas de *Culex quinquefasciatus*, sugere que a abundância de RNA mensageiro (RNAm)

é gene-específica e tecido-específica. Os maiores níveis de expressão foram observados nos túbulos de Malpighi. Com relação à glândula salivar, a expressão dos genes *GSTE2* e *GSTE3* nos túbulos de Malpighi foi 2,0 vezes e 2,4 vezes maior, respectivamente. No intestino, a expressão relativa foi maior para o gene *GSTE2* e contrariamente menor para o gene *GSTE3*. Esses resultados são mostrados na figura 19.

Figura 19 – Expressão relativa dos genes *GSTE2* e *GSTE3* de *Culex quinquefasciatus* ao longo do desenvolvimento (A) e em diferentes órgãos (B).



Nota: Para ambos os genes analisados, o quarto estágio larval (A) e a glândula salivar (B) foram utilizados como amostras calibradoras para comparação da expressão. As barras representam o desvio padrão da expressão relativa a partir de três réplicas. A linha pontilhada representa o valor base (1,0) para comparação da expressão com as respectivas amostras calibradoras.

Fonte: Autora

## 9 DISCUSSÃO

### 9.1 Ausência de polimorfismos nos genes *GSTE2* e *GSTE3* de *Aedes aegypti*

Este foi o primeiro estudo populacional que explorou a existência de polimorfismos em genes que codificam glutathione S-transferases (GSTs) em *Aedes aegypti*. Surpreendentemente, não houve variabilidade genética para os genes *GSTE2* e *GSTE3* nas onze populações avaliadas.

Baixos níveis de diversidade genética podem estar relacionados a longos e/ou repetidos eventos de gargalo de garrafa populacionais ou efeito fundador, uma vez que ambos podem provocar a redução da variação genética via deriva gênica (HARTL, 2008). Sabe-se que as populações de *Ae. aegypti* do Brasil foram submetidas a intensivas campanhas de controle vetorial lideradas pela Organização Pan-Americana de Saúde que culminaram na erradicação do mosquito, primeiramente em 1955 e depois, no fim da década de 1960, após a detecção da espécie em algumas cidades. No entanto, a descontinuidade do programa favoreceu o ressurgimento das populações que iniciaram um novo processo de expansão cerca de uma década depois. Desde então, o panorama atual é a presença do vetor em quase todos os estados brasileiros, com índices elevados de infestação (SCHATZMAYR, 2000).

Vários estudos de campo já reportaram a estrutura populacional do mosquito *Ae. aegypti* no Brasil. Apesar de alguns tipos de marcadores moleculares serem mais sensíveis em revelar polimorfismos genéticos, como os marcadores microssatélites, todos os resultados apontaram considerável variabilidade e diferenciação genética entre as populações, seja em nível micro ou macro-geográfico (AYRES et al., 2003; BRACCO et al., 2007; DA COSTA-RIBEIRO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2006; 2007; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2004; PADUAN; ARAÚJO-JÚNIOR; RIBOLLA, 2006). Estas observações indicam a possível recuperação da variabilidade genética de *Ae. aegypti* no Brasil ao longo dos anos da expansão de suas populações. Portanto, os reduzidos níveis de diversidade genética encontrados nesse estudo possivelmente não estão relacionados ao efeito de gargalo populacional.

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são a fonte mais comum de variação genética em seres eucariotos, sendo importantes marcadores moleculares para estudos de associação, mapeamento de alta resolução e de genética de populações. Eles estão presentes em regiões codantes e não-codantes do genoma. Particularmente, são extremamente abundantes em dípteros, com cerca de 12 SNPs/kb em *Ae. aegypti* (MORLAIS; SEVERSON,

2003), similar às taxas encontradas em *Drosophila melanogaster* (MORIYAMA; POWELL, 1996) e diversas espécies do gênero *Anopheles* (COHUET et al., 2008; LEE et al., 2012; WONDJI; HEMINGWAY; RANSON, 2007). No entanto, essa diversidade nucleotídica varia de um gene nuclear para outro e as taxas de substituição são desiguais ao longo de regiões expressas ou não de um mesmo gene. Morlais e Severson (2003) relataram que genes sujeitos a elevada pressão seletiva mostram menor polimorfismo de nucleotídeos, como aqueles que expressam moléculas envolvidas na regulação transcricional ou traducional (*RpS11*, *RpL31*, *RPL17A*, *AEI8*, *Ef-2*). Genes expressos de modo ubíquo também exibiram menor taxa de substituição, comparados a genes tecido-específicos. Por fim, genes envolvidos em adaptações específicas, tais como os genes imunes, costumam exibir altos níveis de polimorfismo. Estas observações sugerem que tais variações não são neutras e estão relacionadas a funções individuais e, por conseguinte, a restrições seletivas.

Mosquitos estão expostos a uma gama de substâncias exógenas e a diversos patógenos ao longo de seu ciclo de vida. As formas imaturas, que particularmente estão confinadas a uma coleção aquática, precisam superar os desafios ambientais, a fim de garantir sua sobrevivência e reprodução na fase adulta. Portanto, os xenobióticos presentes no hábitat desses organismos devem exercer significativo impacto sobre a atividade de enzimas que lhes conferem proteção, como as GSTs. Este processo evolutivo de seleção mais “relaxada” (com posterior adoção de um possível papel funcional mais generalista para estas enzimas) pode explicar, em parte, a tolerância/resistência dos vetores a inseticidas, substâncias sintéticas cuja aplicação é mais recente no tempo (POUPARDIN et al., 2008; 2012). Ayres et al. (2011) identificaram assinatura de seleção positiva no gene *GSTE5* entre quatro espécies de *Anopheles*. Como este evento ocorreu anteriormente à exposição aos inseticidas, foi sugerido a esse gene um papel fundamental na adaptação a novos ambientes. É possível que isto seja também verdadeiro para as sequências expressas de *GSTEs* de *Ae. aegypti*. Entretanto, em virtude da ausência de variação genética nas amostras analisadas, não foi possível identificar estas marcas e, por fim, confirmar esta hipótese.

Mecanismos de resistência metabólica estão associados ao aumento na taxa de metabolização do inseticida por enzimas de detoxificação. De acordo com Montella et al. (2007), GSTs mostraram rápida alteração no nível de atividade em pouco anos (2001 a 2004), após a substituição de inseticidas da classe dos organofosforados pelos piperóides no controle de adultos. Como 90% ou mais dos indivíduos avaliados apresentaram atividade GST elevada, os autores sugeriram a ocorrência de forte pressão seletiva sobre esse sistema enzimático, como consequência da decisão nacional de introduzir uma classe diferente de

inseticida no manejo vetorial. Strobe et al. (2012) também mostraram que *GSTE2* e *GSTE3* são especificamente superexpressos em mosquitos adultos de uma linhagem de *Ae. aegypti* mantida sob seleção ao inseticida temefós.

Assim como nas regiões brasileiras avaliadas por Montella et al. (2007), as populações de *Ae. aegypti* de Pernambuco estiveram e ainda continuam sujeitas à pressão seletiva, decorrente da política de controle vetorial que foca na utilização massiva de inseticidas químicos. Os resultados dos ensaios com cipermetrina mostraram que as populações avaliadas aqui são resistentes a esse inseticida. Elas também foram altamente resistentes ao organofosforado temefós, com exceção das populações de Fernando de Noronha (que é susceptível, pois ainda não foi exposta a essa classe de inseticida) e de Recife (cuja resistência mostrou-se moderada). Além disso, todas exibiram atividade da enzima GST alterada nos ensaios bioquímicos (ARAÚJO et al., 2013). Portanto, é possível que mutações vantajosas para os genes GSTs que conferem melhor *fitness* ao vetor e, conseqüentemente, maior resistência e/ou tolerância a um ou vários inseticidas tenham se acumulado ao longo dos anos de exposição e seus alelos tenham se fixado nas populações.

O processo no qual uma mutação fortemente benéfica se torna rapidamente fixa em uma população, eliminando ou reduzindo a variação em sítios neutros suficientemente ligados a ela, é chamado de varredura seletiva (*selective sweep*). Conseqüentemente, a carona de genes ligados (*genetic hitchhiking*) reduz a quantidade de variação genética em uma região cromossômica que flanqueia a mutação benéfica. Se as varreduras genéticas ocorrerem com uma frequência tal que seja suficiente para fixá-la, as regiões com baixa recombinação raramente terão a chance de ganhar novamente variação genética por mutação e deriva gênica antes que o processo de recuperação seja interrompido pela próxima mutação benéfica (HARTL, 2008). Similarmente ao que ocorreu no Brasil, populações africanas do mosquito *An. gambiae* sofreram forte pressão seletiva para inseticidas. Baseado na análise da diversidade haplotípica de mutações do tipo *kdr*, Lynd et al. (2010) mostraram assinaturas genômicas de seleção positiva robusta e recente em populações de campo, causado pela resistência a DDT e piretróides. Riveron et al. (2014) também demonstraram que uma única mudança de aminoácido (L119F) em um gene *GSTE2* é capaz de conferir altos níveis de resistência metabólica ao DDT na espécie *An. funestus*. Desse modo, estas observações reforçam a ideia de pressão seletiva ocasionada pelo uso de inseticidas nas populações de *Ae. aegypti* de Pernambuco. Determinar se os genes *GSTE2* e *GSTE3* avaliados nesse estudo, e os demais membros dessa superfamília (que estão arrançados em *tandem*), assim como outros

*loci* vizinhos estão diretamente envolvidos na característica para resistência metabólica constitui um instigante desafio.

Diante da evidência de resistência para os inseticidas temefós e cipermetrina, do aumento na atividade de GSTs e da extrema conservação nas sequências dos genes *GSTE2* e *GSTE3* em populações de campo de *Ae. aegypti* do estado de Pernambuco, os resultados sugerem que a força seletiva decorrente da exposição prolongada aos inseticidas organofosforados sobre tais genes tenha sido tão intensa, que os mesmos se fixaram nessas populações ao longo do tempo. É possível que outras mutações nesses genes, como em regiões regulatórias, também possam influenciar sua expressão e/ou função. Estudos fisiológicos de variantes e modelos de silenciamento gênico são necessários para entender a adaptação funcional dessas proteínas-chave em mosquitos, incluindo *Ae. aegypti*. Tais análises comparativas fornecerão o contexto para interpretações evolucionárias das GSTs e seu papel específico na resistência a inseticidas.

## 9.2 Expressão tecido-específica de GSTs de *Aedes aegypti* após infecção com Dengue

Com o objetivo entender melhor os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo ocasionado pela infecção com o vírus DENV-2 no mosquito *Aedes aegypti*, os níveis de transcrição espacial e temporal de quatro diferentes genes glutathione S-transferases (GSTs) foram avaliados nesse trabalho. Os resultados mostraram a ocorrência de expressão diferencial de *GSTE2*, *GSTE3*, *GSTO* e *GSTX1* ao longo do tempo e nos diferentes tecidos de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com DENV-2.

Em uma das infecções, picos de expressão para os quatro genes GSTs foram prontamente observados no intestino no primeiro ponto de coleta pós-infecção (6h). Bonizzoni et al. (2012) reportaram que, dos 132 genes que apresentaram aumento na expressão em amostras de intestinos de fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas com DENV-1, *GSTD4* foi um dos dois genes que apresentou progressivo acúmulo no nível de transcritos já no 1º dia pós-infecção (1 dpi).

No entanto, os picos de expressão em amostras de intestinos infectados foram apenas observados nos intervalos 3 dpi (*GSTO* e *GSTX1*) e 7 dpi (*GSTE2* e *GSTE3*) na primeira alimentação. Um dos possíveis fatores que pode afetar a taxa de infecção por DENV no intestino é a quantidade de vírus oferecida durante a alimentação sanguínea (GUEDES, 2012; RICHARDSON et al., 2006). Na primeira infecção do nosso estudo, o título do estoque viral usado foi de  $1 \times 10^5$  FFU/ml, enquanto que na segunda infecção o título foi maior ( $= 6 \times 10^5$

FFU/ml). Logo, a taxa de infecção deve ter sido consideravelmente maior na segunda alimentação do que na primeira alimentação, explicando os diferentes tempos na resposta de *Ae. aegypti* quanto à regulação dos genes avaliados no intestino. Além disso, a comparação entre os diferentes níveis de expressão em cada uma das infecções também sugerem uma possível resposta dose-dependente das *GSTs* com relação ao título do estoque viral nesse órgão. Futuros estudos podem elucidar essas questões.

Surpreendentemente, foi detectado aumento dos níveis de transcritos nas glândulas salivares 6h pós-infecção e picos de expressão em 6h e 3 dpi, momento em que o vírus não é esperado estar presente nesse sítio (CARVALHO-LEANDRO et al., 2012). O mesmo ocorreu com o gene *GSTX1* na cabeça. Visto que a cabeça é uma estrutura discreta que é facilmente e rapidamente dissecada do corpo, pode-se assumir que existe baixo risco de contaminação por transcritos de outros tecidos. Portanto, esses resultados indicam que, no início da infecção, moléculas sinalizadoras podem estar trafegando do intestino infectado para o corpo do mosquito como um todo, afetando a expressão gênica em outros órgãos.

Ye et al. (2013), por exemplo, reportaram que os níveis de expressão do gene *GSTE2* foram 1,5 vezes maiores em amostras de cabeças de *Ae. aegypti* infectados com *Wolbachia*, com relação ao grupo controle (tratado com antibiótico; não-infectado). Por sua vez, análises transcriptômicas de glândulas salivares de *Ae. aegypti* mostraram que a infecção com DENV estimula a transcrição de genes com funções relacionadas à imunidade, processos metabólicos, transporte e respostas ao estresse (SIM; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2012). Além disso, o vírus também induziu a produção de transcritos da proteína que se liga ao odorante (OBPs) no aparato sensorial do mosquito, provavelmente facilitando os comportamentos de busca por hospedeiros e de indução de picadas (SIM; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2012).

Estudos sobre expressão gênica no intestino e na carcaça de *Ae. aegypti* indicam que as respostas antivirais em ambos os sítios envolvem os mesmos tipos de mecanismos de defesa, com padrões similares de resposta (XI; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2008). Porém, a abundância de transcritos entre diferentes órgãos e tecidos pode sofrer oscilações (BEHURA et al., 2011). No presente trabalho, a abundância relativa dos diferentes transcritos observada ao longo do tempo, comparando as amostras de intestino e de carcaça, foi heterogênea, corroborando a segunda hipótese. O aumento da expressão relativa dos genes *GSTO* e *GSTX1* na carcaça indica que eles foram os mais importantes dos quatro genes avaliados na resposta do mosquito à infecção viral.

Bartholomay et al. (2007) relataram que a infecção de *Ae. aegypti* com *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus* causou a diminuição dos níveis de expressão relativa de *GSTO* na hemolinfa em 1,6 vezes (24h pós-infecção) e 1,5 vezes (8h pós-infecção), respectivamente. Por outro lado, Choi et al. (2012) mostraram o aumento da expressão de *GSTE2* e *GSTE3* na hemolinfa de *Ae. aegypti* infectado com *E. coli*. É provável que a discordância entre os resultados desses dois estudos citados e o discutido aqui seja devido: aos diferentes tecidos analisados (hemolinfa vs. carcaça) e/ou aos diferentes tipos de respostas infecciosas avaliadas (antiviral vs. antibacteriana). Uma vez que os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, os mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos no processo de infecção devem sofrer influência de ambos, vetor e patógeno, culminando numa resposta de natureza diferente daquela desencadeada por bactérias.

Os resultados descritos aqui contribuem para um maior entendimento do papel das GSTs, particularmente na interação mosquito-arbovírus. Além disso, alguns aspectos importantes desse trabalho devem ser mencionados: 1) utilizou fêmeas de *Ae. aegypti* infectadas oralmente com DENV-2 como modelo, ao contrário do sistema *in vitro* (células C6/36 de *Ae. albopictus*) empregado por Chen et al. (2011); 2) avaliou a resposta rápida (do ponto de vista da dinâmica de infecção viral no vetor) na defesa antioxidativa das GSTs; 3) analisou a regulação gênica de enzimas GSTs pertencentes a diferentes classes em diferentes tecidos do mosquito.

Comumente, justifica-se o emprego de culturas de células na caracterização da resposta antiviral do mosquito devido à maior homogeneidade e sensibilidade do sistema, com relação aos tecidos que compõem o corpo do mosquito (XI; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2008). Porém, nem sempre seus resultados correspondem àqueles observados nos modelos *in vivo*. Por exemplo, a infecção de uma linhagem de células com DENV resultou na regulação positiva de apenas 4,1% de seus genes imunes, enquanto 22,5% desses genes foram ativados na carcaça. Além disso, diversos genes imunes foram negativamente regulados (SIM; DIMOPOULOS, 2010). Portanto, a utilização do sistema *in vivo* na análise da expressão gênica permitiu a obtenção de resultados mais realísticos, apesar da possível influência de fatores de confusão, que dificultam a interpretação dos dados.

Em estudos sobre a caracterização da regulação gênica resultante da infecção viral em mosquitos, a seleção dos pontos para a coleta das amostras geralmente é baseada no momento em que é esperado encontrar o vírus em determinado órgão do vetor. Análises de glândulas salivares, por exemplo, são realizadas dez ou 14 dias após a infecção. O critério adotado aqui, que considerou a resposta antioxidativa do mosquito à infecção com o vírus, foi satisfatório e

permitiu observar diferentes perfis de expressão gênica logo no início da infecção, mesmo em órgãos em que não é esperada a presença do vírus.

Em conjunto, a análise dos perfis transcricionais indica que a infecção de *Ae. aegypti* com DENV-2 dispara a regulação tecido-específica dos genes *GSTE2*, *GSTE3*, *GSTO* e *GSTX1*, provavelmente como resposta ao estresse oxidativo (MOLINA-CRUZ et al., 2008; PAN et al., 2012). Esses resultados abrem perspectivas para estudos sobre as interações entre vírus/vetor e sua coevolução. Futuras abordagens de genômica funcional, como RNA de interferência, podem contribuir na elucidação do papel desses membros específicos na determinação da capacidade vetorial no mosquito.

### 9.3 Diversidade e expressão de genes *GSTEs* em *Culex quinquefasciatus*

No Brasil, embora *Cx. quinquefasciatus* não seja alvo dos programas de controle que usam o temefós como larvicida, a utilização indiscriminada desse inseticida pode conduzir à emergência de resistência nas populações expostas indiretamente. Amorim et al. (2013), por exemplo, detectou nível de resistência moderado ao temefós em *Cx. quinquefasciatus* proveniente de uma população da cidade de Santa Cruz do Capibaribe, Pernambuco. Além disso, o perfil bioquímico das enzimas de detoxificação nessa população mostrou elevada atividade de  $\alpha$ -esterases,  $\beta$ -esterases e esterase total. As demais populações foram susceptíveis ao inseticida.

Com o objetivo de identificar possíveis assinaturas de seleção no gene *GSTE2* de *Culex quinquefasciatus*, sete populações naturais e duas linhagens de laboratório foram analisadas e os resultados foram interpretados segundo as orientações de Nielsen (2005). Considerando o estudo de assinaturas de seleção do ponto de vista da genética populacional (ou nível intraespecífico), a seleção pode afetar: 1) os níveis de variabilidade; 2) o desequilíbrio de *linkage* (DL); 3) a estrutura haplotípica; 4) e a distribuição alélica em cada sítio nucleotídico.

Com exceção das populações de campo de Água Fria (11 SNPs/1 kb) e de Jabotão (103 SNPs/1 kb), a diversidade genética foi considerada baixa para as demais populações analisadas, indicando que poucos sítios são polimórficos. Os valores de diversidade haplotípica observados também foram baixos ( $Hd = 0,4991$ ). Corroborando nossos resultados, baixos níveis de diversidade genética também foram reportados por Moraes et al. (2012) em populações de *Cx. quinquefasciatus* de nove cidades brasileiras e uma população da cidade da

Argentina. Eles mostraram que, dos dois marcadores mitocondriais utilizados, *nd4* foi monomórfico e *cox1* só exibiu quatro diferentes haplótipos.

Com exceção de H1, os demais haplótipos foram pouco compartilhados entre as populações de *Cx. quinquefasciatus* avaliadas. Isso sugere que o fluxo gênico e/ou a retenção de polimorfismos do gene ancestral tenham afetado a distribuição da diversidade genética de *GSTE2* entre essas populações (NIELSEN, 2005). Isso fica evidente quando todos os haplótipos são comparados e verifica-se que alguns deles são exclusivos de uma única população.

A fim de avaliar o efeito do fluxo gênico e/ou da retenção de polimorfismos ancestrais, o valor do *Fst* foi estimado. O valor de diferenciação genética encontrado para *GSTE2* ( $Fst = 0,129$ ) foi muito próximo do valor reportado para *loci* microssatélites provenientes dessas mesmas populações (AMORIM, 2013), confirmando sua diferenciação genética moderada. É importante ressaltar que apenas quatro haplótipos (H1, H2, H11, H12), dentre os 33 diferentes haplótipos observados, foram compartilhados entre, no máximo, duas populações. Desse modo, parece que ambos os processos estão presentes nas populações analisadas para o gene *GSTE2*.

Várias mutações do tipo não-sinônima foram encontradas na sequência traduzida de *GSTE2* das populações, com destaque para Água Fria, Jaboaão e Alto da Conquista. Todavia, quando esses dados foram comparados com os resultados provenientes da estatística *D* de Tajima, não foi observada evidência para seleção. É possível que inconsistências entre os dados gerados e o método usado tenham interferido na significância dos resultados (NIELSEN, 2005).

Por sua vez, o teste *D* de Tajima foi significativo para as populações de Glória do Goitá, Peixinhos e Santa Cruz do Capibaribe, evidenciando a ocorrência de seleção positiva para o gene investigado nesses grupos. Do mesmo modo que o gene *GSTE2* de *Cx. quinquefasciatus*, outros estudos também apontaram assinaturas de seleção em genes de mosquitos, como os relacionados à imunidade (CRAWFORD et al., 2012; PARMAKELIS, 2010; SIMARD et al., 2007) e à resistência a inseticidas (LYND et al., 2010; MITCHELL et al., 2014; RIVERON et al., 2014).

Os resultados de expressão gênica mostraram que ocorreu variação na abundância relativa dos transcritos dos genes *GSTE2* e *GSTE3* de *Cx. quinquefasciatus*, de acordo com o órgão onde foram expressos, a fase do ciclo de vida e o sexo do mosquito adulto. Apesar de ambos os genes estarem organizados em *clusters* no genoma, eles mostraram diferentes perfis

de expressão, sugerindo que são controlados por diferentes mecanismos reguladores (LUMJUAN et al., 2007).

Análises de expressão gênica em alta escala revelaram que, 12 horas após o repasto sanguíneo, fêmeas de *Aedes aegypti* aumentam significativamente a expressão total de *GSTE2* e *GSTE3*, diminuindo ao longo do tempo (DISSANAYAKE et al., 2010). Esse período coincide exatamente com a fase crítica da digestão no mosquito. Com base nos níveis de expressão relativa observados nesse trabalho, especulam-se outros papéis biológicos para os genes *GSTE2* e *GSTE3* nos túbulos de Malpighi e no intestino de *Cx. quinquefasciatus*, uma vez que eles também mostraram ser constitutivamente expressos.

Sob as condições de manejo no insetário, as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* expressaram baixos níveis de *GSTE2* e *GSTE3*, com relação às formas imaturas larvais. O mesmo ocorreu para o gene *GSTE3* em machos recém-emergidos, enquanto a expressão relativa para o gene *GSTE2* aumentou. Esses resultados corroboram com um estudo que comparou os níveis de expressão de *GSTE2* e *GSTE3* entre machos e fêmeas de *Ae. aegypti* (DISSANAYAKE et al., 2010) e de uma proteína GST de *Ae. albopictus* (SHUKOR et al., 2014). Aparentemente, os machos aumentam a expressão gênica de *GSTE2* e diminuem a expressão de *GSTE3*, com relação às fêmeas. Isso sugere que *GSTE2* esteja envolvido em processos relacionados ao desenvolvimento e/ou maturação sexual em machos do inseto.

Por fim, a expressão de ambos os genes mostrou-se um evento importante durante os estágios imaturos de *Cx. quinquefasciatus*, com destaque para a resposta de *GSTE2* em pupas. Larvas e pupas dessa espécie desenvolvem-se no ambiente aquático e, em condições naturais, elas mostram preferência por criadouros poluídos, ricos em matéria orgânica (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Além disso, na fase de pupa, elas não se alimentam, diminuem sua atividade e passam por enormes transformações bioquímicas e celulares que culminarão na metamorfose para a fase adulta (CLEMENTS, 1992). Desse modo, é possível que *GSTEs* estejam envolvidas contra os efeitos deletérios oriundos do processo de transformação para a forma adulta. De fato, glutathione S-transferases já foram envolvidas na proteção celular contra a infecção com dengue pela ativação de respostas antioxidantes e inibidores de apoptose (CHEN et al., 2011; 2012).

Apesar de os níveis de expressão relativa terem sido menores em larvas, com relação a pupas, o papel das *GSTES* na proteção contra xenobióticos na fase larval não deve ser descartado. Ressalta-se que as condições experimentais da água utilizada como meio para seu crescimento e desenvolvimento foram bastante diferentes das condições encontradas em campo. Diversos experimentos apontam que genes *GSTEs* de larvas de *Ae. aegypti* são

ativados em resposta à exposição a xenobióticos, sobretudo nas linhagens resistentes (DAVID et al., 2010; MARCOMBE et al., 2009; STRODE et al., 2008; TETREAU et al., 2012). Além disso, em espécies de *Anopheles*, foi sugerido que a seleção positiva observada no gene *GSTE5* pode ter sido resultado da adaptação das espécies a diferentes habitats. Portanto, o papel dessas enzimas na detoxificação de xenobióticos encontrados no meio ambiente merece ser explorado com maior atenção em *Cx. quinquefasciatus*.

Em conclusão, os resultados desse estudo indicam a ocorrência de seleção positiva para o gene *GSTE2* em, pelo menos, três populações de *Cx. quinquefasciatus* do Estado de Pernambuco. Uma vez que entre elas apenas uma mostrou alteração na susceptibilidade ao temefós (Santa Cruz do Capibaribe), enquanto as demais foram susceptíveis (AMORIM et al., 2013), parece que não apenas o larvicida temefós está exercendo pressão seletiva sobre *GSTE2* essas populações. Entender os mecanismos biológicos que estão delimitando essas alterações está além das possibilidades desse trabalho. Entretanto, é possível especular que outros tipos de xenobióticos (ou uma combinação de todos eles) estejam sendo os responsáveis por direcionar a evolução desse gene em condições naturais nos criadouros aquáticos, ao longo do tempo. O conjunto dos resultados apresentados aqui fornece um ponto de partida para elucidar o papel biológico das enzimas GSTEs no vetor *Cx. quinquefasciatus*. Futuras análises da estrutura tridimensional da proteína por métodos de modelagem poderão auxiliar no entendimento de cada sítio positivamente selecionado sobre a função final da proteína na proteção contra xenobióticos.

## 10 CONCLUSÕES

- As populações de campo de *Aedes aegypti* do estado de Pernambuco foram monomórficas para *GSTE2* e *GSTE3*, sugerindo que esses genes foram fixados nessas populações por seleção ao longo do tempo.
- *Aedes aegypti* regula a transcrição tecido-específica dos genes *GSTE2*, *GSTE3*, *GSTO* e *GSTX1* após a infecção com o DENV-2, provavelmente como resposta ao estresse oxidativo.
- A diversidade genética das populações de *Cx. quinquefasciatus* do Estado de Pernambuco foi baixa, com relação ao gene *GSTE2*.
- Poucos haplótipos foram compartilhados entre as populações de *Cx. quinquefasciatus* do Estado de Pernambuco, contribuindo para o aumento da diferenciação genética entre elas.
- As populações de Glória do Goitá, Peixinhos e Santa Cruz do Capibaribe mostraram seleção positiva para o gene *GSTE2*, de acordo com o Teste *D* de Tajima.
- Os genes *GSTE2* e *GSTE3* são diferencialmente regulados em *Culex quinquefasciatus*, de acordo com o tecido avaliado, o estágio de vida e o sexo do animal, o que sugere que eles possam ter papéis biológicos específicos no vetor.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, L. B. et al. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* IAB59 needs long term selection pressure. Biological Control, San Diego, v. 42, p. 155-160, 2007.
- AMORIM, L.B. Caracterização dos genes que conferem resistência a inseticidas químicos em *Culex quinquefasciatus*. 2013. 113 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- AMORIM, L.B. et al. Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide temephos in Pernambuco, Brazil. Pest Management Science, West Sussex, v. 69, n. 12, p. 1307-1314, 2013.
- APOSTOL, B.L. et al. Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v. 86, p. 991-1000, 1993.
- AQUILANO, K.; BALDELLI, S.; CIRIOLO, M.R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. Frontiers in Pharmacology, London, v. 5, p. 196, 2014.
- ARAÚJO, A.P. et al. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. Parasites & Vectors, London, v. 6, n. 1, p. 297, 2013.
- ARENSBURGER, P. et al. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. Science, Washington v. 330, n. 6000, p. 86-88, 2010.
- ASIH, P.B. et al. Existence of the rdl mutant alleles among the anopheles malaria vector in Indonesia. Malaria Journal, London, v. 11, p. 57, 2012.
- AYRES, C.F. et al. Comparative genomics of the anopheline glutathione S-transferase epsilon cluster. PLOS One, San Francisco, v. 6, n. 12, p. e29237, 2011.
- AYRES, C.F. et al. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 40, n. 4, p. 430-435, 2003.
- BAHNCK, C.M.; FONSECA, D.M. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex (Culex) pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 75, n. 2, p. 251-255, 2006.
- BARRIBEAU, S. M. et al. Gene expression differences underlying genotype-by-genotype specificity in a host-parasite system. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, v. 111, n. 9, p. 3496-3501, 2014.
- BARTHOLOMAY, L.C. et al. Profiling infection responses in the haemocytes of the mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 16, n. 6, p. 761-776, 2007.

BECKER, N.P.D. et al. Mosquitoes and their control. 2 ed. New York: Springer, 2010. 577 p.

BEHURA, S.K. et al. Global cross-talk of genes of the mosquito *Aedes aegypti* in response to dengue virus infection. PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 5, n.114, p. e1385, 2011.

BONIZZONI, M. et al. Complex modulation of the *Aedes aegypti* transcriptome in response to dengue virus infection. PLOS One, San Francisco, v. 7, n. 11, p. e50512, 2012.

BOURTZIS, K. et al. Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. Acta Tropica, Basel, v. 132, p. S150-163, 2014.

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. 573-580, 2007.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes Aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007.

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, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 87-94, 2003.

CARVALHO, D.O. et al. Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brazil. Journal of Visualized Experiments, Cambridge, v. 83, p. e3579, 2014.

CARVALHO-LEANDRO, D. et al. Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. Acta Tropica, Basel, v. 124, n. 2, p.113-119, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (EUA). Chikungunya Virus. [2014a]. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>>. Acesso em: 20 jun. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (EUA). Dengue Homepage. [2014b]. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>>. Acesso em: 20 jun. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (EUA). Eggs of *Aedes aegypti*. [1982]. Disponível em: <[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aedes\\_aegypti\\_eggs\\_%E2%80%93\\_CDC\\_5129.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aedes_aegypti_eggs_%E2%80%93_CDC_5129.jpg)>. Acesso em: 20 jun. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (EUA). Epidemic/Epizootic West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control. 4 ed. Colorado: Centers for Disease Control and Prevention, 2013. 69 p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (EUA). Parasites: Lymphatic Filariasis. [2013]. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/lymphaticfilariasis/epi.html>>. Acesso em: 20 jun. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (EUA). West Nile virus disease cases and deaths reported to CDC by year and clinical presentation, 1999-2013. [2014c]. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/cummulative/99\\_2013\\_CasesAndDeathsClinicalPresentationHumanCases.pdf](http://www.cdc.gov/westnile/resources/pdfs/cummulative/99_2013_CasesAndDeathsClinicalPresentationHumanCases.pdf)>. Acesso em: 20 jun. 2014.

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 Molecular Biology, Oxford, v. 39, n. 4, p. 272-278, 2009.

CHARLAT, S.; CALMET, C.; MERCOT, H. On the *mod resc* model and the evolution of *Wolbachia* compatibility types. Genetics, Austin, v. 159, n. 4, p. 1415-1422, 2001.

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

CHEN, T. H. et al. Additive protection by antioxidant and apoptosis-inhibiting effects on mosquito cells with dengue 2 virus infection. PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 6, n. 4, p. e1613, 2012.

CHEN, T. H. et al. Antioxidant defense is one of the mechanisms by which mosquito cells survive dengue 2 viral infection. Virology, New York, v. 410, n. 2, p. 410-417, 2011.

CHOI, Y.J. et al. Tissue-enriched expression profiles in *Aedes aegypti* identify hemocyte-specific transcriptome responses to infection. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 42, n. 10, p. 729-738, 2012.

CLAUDIANNOS, C. et al. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 15, n. 5, p. 615-636, 2006.

CLEMENTS, A.N. The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction. 1 ed. London: Chapman e Hall, v. 1, 1992.

COHUET, A. et al. SNP discovery and molecular evolution in *Anopheles gambiae*, with special emphasis on innate immune system. BMC Genomics, London, v. 9, n. 227, 2008.

COLTON, Y.M.; CHADEE, D.D.; SEVERSON, D.W. Natural skip oviposition of the mosquito *Aedes aegypti* indicated by codominant genetic markers. Medical and Veterinary Entomology, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 195-204, 2003.

CONSOLI, R. A.G.B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994. 228 p.

COXWORTH, B. Culex quinquefasciatus. [2010?]. Disponível em: <<http://www.gizmag.com/genome-of-west-nile-virus-carrying-mosquito-sequenced/16574/>> Acesso em: 20 jun. 2014.

CRAWFORD, J.E. et al. Evidence for population-specific positive selection on immune genes of *Anopheles gambiae*. G3, Bethesda, v. 2, n. 12, p. 1505-1519, 2012.

- DA COSTA-RIBEIRO, M.C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A.B. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, n. 8, p. 917-921, 2006.
- DA COSTA-RIBEIRO, M.C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A.B. Low gene flow of *Aedes aegypti* between dengue-endemic and dengue-free areas in southeastern and southern Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 77, n. 2, p. 303-309, 2007.
- DARRIET, F.; HOUGARD, J.M.; CORBEL, V. Effect of pyrethroid and organophosphate bi-treated nets on the behaviour of Kdr+ *Anopheles gambiae* mosquitoes. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, Paris, v. 98, n. 3, p. 201-204, 2005.
- DAVID, J.P. et al. Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. BMC Genomics, London, v. 11, n. 216, 2010.
- DENG, H. et al. Two epsilon glutathione S-transferase cDNAs from the common cutworm, *Spodoptera litura*: characterization and developmental and induced expression by insecticides. Journal of Insect Physiology, Oxford, v. 55, n. 12, p. 1174-1183, 2009.
- DEPARTMENT OF MEDICAL ENTOMOLOGY (ICPMR). Pupa of *Aedes aegypti*. [2002]. Disponível em: <[http://medent.usyd.edu.au/arbovirus/mosquit/photos/aedes\\_aegypti\\_pupa.jpg](http://medent.usyd.edu.au/arbovirus/mosquit/photos/aedes_aegypti_pupa.jpg)>. Acesso em: 20 jun. 2014.
- DING, Y. et al. Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress. Biochemical Journal, London, v. 387, pt. 3, p. 879-888, 2005.
- DING, Y. et al. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. BMC Genomics, London, v. 4, n. 1, p. 35, 2003.
- DISSANAYAKE, S.N. et al. aeGEPUCI: a database of gene expression in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. BMC Research Notes, London, v. 3, p. 248, 2010.
- DIXON, D.P.; COLE, D.J.; EDWARDS, R. Dimerisation of maize glutathione transferases in recombinant bacteria. Plant Molecular Biology, Dordrecht, v. 40, n. 6, p. 997-1008, 1999.
- DJOUAKA, R.F. et al. Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. BMC Genomics, London, v. 9, p. 538, 2008.
- 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.
- FOSTER, W.A.; WALKER, E.D. Mosquitoes (Culicidae). In: MULLEN, G.; DURDEN, L. (Orgs.). Medical and Veterinary Entomology. Burlington: Elsevier, 2002. p. 203-262.

FRIEDMAN, R. Organization of the glutathione S-transferase family in insects. Molecular Phylogenetics and Evolution, San Diego, v. 61, n. 3, p. 924-932, 2011.

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

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Manual de Vigilância Epidemiológica da Febre Amarela. Brasília: Ministério da Saúde, 1999. 60 p.

GOLDBERG, L. H.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosquito News, New York, v. 37, p. 355-358, 1977.

GRAF, J. F. The role of insect growth regulators in arthropods control. Parasitology Today, Amsterdam, v. 9, n. 12, p. 471-474, 1993.

GRANT, D.F.; HAMMOCK, B.D. Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. Molecular and General Genetics, Berlin, v. 234, n. 2, p. 169-176, 1992.

GRANT, D.F.; MATSUMURA, F. Glutathione S-transferase 1 and 2 in susceptible and insecticide resistant *Aedes aegypti*. Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, v. 33, n. 2, p. 132-143, 1989.

GUEDES, D.R.D. Análise da competência vetorial para o vírus dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco. 2012. 101 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, London, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARKER, B.W. et al. Transcription profiling associated with life cycle of *Anopheles gambiae*. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 49, n. 2, 316-325, 2012.

HARTL, D. Princípios de Genética de População. 3.ed. São Paulo: FUNPEC Editora, 2008. 217 p.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 45, p. 371-391, 2000.

HUANG, Y. et al. Structure and expression of glutathione S-transferase genes from the midgut of the Common cutworm, *Spodoptera litura* (Noctuidae) and their response to xenobiotic compounds and bacteria. Journal of Insect Physiology, Oxford, v. 57, n. 7, p. 1033-1044, 2011.

HUNT, R.H. et al. Laboratory selection for and characteristics of pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles funestus*. Medical and Veterinary Entomology, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 271-275, 2005.

JIRAJAROENRAT, K. et al. Heterologous expression and characterization of alternatively spliced glutathione S-transferases from a single *Anopheles* gene. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 31, n. 9, p. 867-875. 2001.

JONES, C.M. et al. Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, v. 109, n. 17, p. 6614-6619, 2012.

KAMPKÖTTER, A. et al. Functional analysis of the Glutathione S-transferase 3 from *Onchocerca volvulus* (*Ov-GST-3*): a parasite GST confers increased resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. Journal of Molecular Biology, London, v. 325, n. 1, p. 25-37, 2003.

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, Iran, v. 2, n. 1, p. 4-18, 2012.

KELLEN, W. R. et al. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. Journal of Insect Pathology, New York, v. 5, p. 98-103, 1965.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, New York, v. 16, p. 111-120, 1980.

LAWRENCE, R.A. Immunity to filarial nematodes. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 100, n. 1/2, p. 33-44, 2001.

LEE, S.H. et al. Decreased detoxification genes and genome size make the human body louse an efficient model to study xenobiotic metabolism. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 19, n. 5, p. 599-615, 2010.

LEE, Y. et al. Single-nucleotide polymorphisms for high-throughput genotyping of *Anopheles arabiensis* in East and southern Africa. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 49, n. 2, 307-315, 2012.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, Oxford, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. Methods, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 98, n. 1, p. 43-54, 2004.

LOZOVEI, A.L. Culicidae (Mosquitos). In: MARCONDES, C.B. (Org.). Entomologia Médica e Veterinária. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 107-174.

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

LUMJUAN, N. et al. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1026-1035, 2007.

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

LYND, A. et al. Field, genetic, and modeling approaches show strong positive selection acting upon an insecticide resistance mutation in *Anopheles gambiae* s.s. Molecular Biology and Evolution, Chicago, v. 27, n. 5, p.1117-1125, 2010.

MAGALHAES, T. et al. Expression of defensin, cecropin, and transferrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae), and the abnormal development of nematodes in the mosquito. Experimental Parasitology, New York, v. 120, n. 4, p. 364-371. 2008.

MAMANI, E. New serotype 5 of dengue virus: need to strengthen the molecular surveillance in Peru. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, Lima, v. 31, n. 1, p.169-180, 2014.

MANSUR, J. F. et al. The effect of lufenuron, a chitin synthesis inhibitor, on oogenesis of *Rhodnius prolixus*. Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, v. 98, n. 1, p. 59-67, 2010.

MARCOMBE, S. et al. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). BMC Genomics, London, v. 10, p. 494, 2009.

MARCONDES, C.B. Controle de artrópodes: Princípios gerais. In: \_\_\_\_\_. (Org.). Entomologia Médica e Veterinária. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 441-464.

MATTHEWS, G. Integrated Vector Management: Controlling Vectors of Malaria and Other Insect Vector Borne Diseases. 1. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2011. 249 p.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (Brasil) Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 160 p.

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.

- MOLINA-CRUZ, A. et al. C.Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 283, n. 6, p. 3217-2323, 2008.
- MONTELLA, I.R. et al. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.
- MORAIS, S.A. et al. Low genetic diversity in Wolbachia-Infected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Argentina. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo v. 54, n. 6, p. 325-329, 2012.
- MORIYAMA, E.N.; POWELL, J.R. Intraspecific nuclear DNA variation in *Drosophila*. Molecular Biology and Evolution, Chicago, v. 13, n. 1, p.261-277, 1996.
- MORLAIS, I.; SEVERSON, D.W. Intraspecific DNA variation in nuclear genes of the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 12, n. 6, p. 631-639, 2003.
- NIELSEN, R. Molecular Signatures of Natural Selection. Annual Review of Genetics, Palo Alto. v. 39, p. 197-218, 2005.
- 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, Berlin, v. 109, n. 4, p. 1165-1177, 2011.
- OCAMPO, C.B. et al. Differential expression of apoptosis related genes in selected strains of *Aedes aegypti* with different susceptibilities to dengue virus. PLOS One, San Francisco, v. 8, n. 4, p. e61187, 2013.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Insecticides seventh report of the expert committee. Geneva: World Health Organization, 1957. 32 p.
- PADUAN, K.S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.P.; RIBOLLA, P.E.M. Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* in Brazil elucidated by molecular markers. Genetics and Molecular Biology, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 391-395, 2006.
- PAN, X. et al. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, v. 109, n. 1, p. E23-31, 2012.
- PARMAKELIS, A. et al. *Anopheles* immune genes and amino acid sites evolving under the effect of positive selection. PLOS One, San Francisco, v. 5, n. 1, p. e8885, 2010.
- PHUC, H.K. et al. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. BMC Biology, London, v. 5, p. 11, 2007.

POLSON, K.A. et al. Characterisation of DDT and pyrethroid resistance in Trinidad and Tobago populations of *Aedes aegypti*. Bulletin of Entomological Research, London, v. 101, n. 4, p. 435-441, 2011.

POUPARDIN, R. et al. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. Insect Biochemistry Molecular Biology, Oxford. v. 38, n. 5, p. 540-51, 2008.

POUPARDIN, R. et al. Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. Aquatic Toxicology, Amsterdam, v. 114, n. 115, p. 49-57, 2012.

PRAPANTHADARA L.A.; KETTERMAN, A.J. Qualitative and quantitative changes in glutathione S-transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* confer DDT-resistance. Biochemical Society Transactions, London, v. 21, pt. 3, p. 304S, 1993.

PRAPANTHADARA, L. et al. Correlation of glutathione S-transferase and DDT dehydrochlorinase activities with DDT susceptibility in *Anopheles* and *Culex* mosquitoes from northern Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, Bangkok, v. 31, s. 1, p. 111-118, 2000.

PROTEIN DATA BANK. Structure of an insect epsilon class glutathione S-transferase from the malaria vector *Anopheles gambiae*. [2008]. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2IL3>>. Acesso em: 20 jun. 2014.

RAJARAPU, S.P.; MITTAPALLI, O. Glutathione-S-transferase profiles in the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*. Comparative Biochemistry and Physiology, Oxford, v. 165, n.1, p. 66-72, 2013.

RAMSEY, J.S. et al. Comparative analysis of detoxification enzymes in *Acyrtosiphon pisum* and *Myzus persicae*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 19, s. 2, p. 155-164, 2010.

RANSON, H. et al. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT-resistant strain of *Anopheles gambiae*. Biochemical Journal, London, v. 324, pt. 1, p. 97-102, 1997.

RANSON, H. et al. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. Science, Washington v. 298, n. 5591, p. 179-181, 2002.

RANSON, H. et al. Genetic mapping of two *loci* affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 5, p. 499-507, 2000.

RANSON, H. et al. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Biochemical Journal, London, v. 359, pt. 2, p. 295-304, 2001.

RANSON, H.; COLLINS, F.; HEMINGWAY, J. The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the *Anopheles gambiae* class I GST family. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, v. 95, n. 24, p. 14284-14289, 1998.

REGIS, L. et al. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 90, n. 1, p. 115-119, 1995.

RIAZ, M.A. et al. Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. Aquatic Toxicology, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 61-69, 2009.

RICHARDSON, J. et al. Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual *Aedes aegypti*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 74, n. 1, p. 132-141, 2006.

RIVERON, J.M. et al. A single mutation in the *GSTe2* gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. Genome Biology, London, v. 15, n. 2, 2014.

ROMÃO, T. P. et al. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. The FEBS Journal, Oxford, v. 273, n. 7, p. 1556-1568, 2006.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S; MISENER, S. Editors. Bioinformatics Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2000.

RUSSELL, R.C. *Aedes aegypti* larva. [2000]. Disponível em: <[http://medent.usyd.edu.au/photos/aedes\\_aegypti\\_larvae.jpg](http://medent.usyd.edu.au/photos/aedes_aegypti_larvae.jpg)>. Acesso em: 20 jun. 2014.

SALAZAR, M. I. et al. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. BMC Microbiology, London, v. 7, p. 9, 2007.

SAMRA, A.L. et al. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from pyrethroid-resistant *Culex pipiens*. Pest Management Science, West Sussex, v. 68, n. 5, p. 764-772, 2012.

SCHATZMAYR, H.G. Dengue situation in Brazil by year 2000. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95, s. 1, p. 179-181, 2000.

SERVICE, M. Medical Entomology for students. Londres: Chapman and Hall, 1996. 278 p.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochemical Journal, London, v. 360, pt. 1, p. 1-16, 2001.

SHUKOR, S.A. et al. Purification and expression of glutathione S-transferase from a Malaysian population of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Biologia, Elmsford, v. 69, n. 4, p. 530-535, 2014.

SIM, S.; DIMOPOULOS, G. Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. PLOS One, San Francisco, v. 5, n. 5, p. e10678, 2010.

- SIM, S.; RAMIREZ, J.L.; DIMOPOULOS, G. Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. PLOS Pathogens, San Francisco. v. 8, n. 3, p. e1002631, 2012.
- SIMARD, F. et al. Polymorphism at the defensin gene in the *Anopheles gambiae* complex: testing different selection hypotheses. Infection, Genetics and Evolution, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 285-292, 2007.
- SOUZA-NETO, J.A.; SIM, S; DIMOPOULOS, G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, v. 106, n. 42, p. 17841-17846, 2009.
- STRODE C. et al. 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.
- STRODE C. et al. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry Molecular Biology, Oxford, v. 38, n. 1, p.113-123, 2008.
- TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution, Chicago, v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- TETREAU, G. et al. Larval midgut modifications associated with Bti resistance in the yellow fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches. BMC Genomics, London, v. 13, p. 248, 2012.
- TU, C.P.; AKGUL, B. *Drosophila* glutathione S-transferases. Methods in Enzymology, New York, v. 401, p. 204-226, 2005.
- VENANCIO, T.M. et al. The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsin and the domain structure of peritrophins. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 18, n. 1, p. 33-44, 2009.
- VIEIRA, G. Mosquito *Aedes aegypti*. [2010?]. Disponível em: <<http://chc.cienciahoje.uol.com.br/a-dengue-em-criancas/>>. Acesso em: 20 jun. 2014.
- WONDJI, C.S.; HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Identification and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the mosquito *Anopheles funestus*, malaria vector. BMC Genomics, London, v. 8, n. 5, 2007.
- WANG, Y.H. et al. Changes in the activity and the expression of detoxification enzymes in silkworms (*Bombyx mori*) after phoxim feeding. Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, v. 105, n. 1, p. 13-17, 2013.
- WONDJI, C.S.; HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Identification and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the mosquito *Anopheles funestus*, malaria vector. BMC Genomics, London, v. 8, n. 5, 2007.

WONGTRAKUL, J. et al. Expression and characterization of three new glutathione transferases, an epsilon (AcGSTE2-2), omega (AcGSTO1-1), and theta (AcGSTT1-1) from *Anopheles cracens* (Diptera: Culicidae), a major Thai malaria vector. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 47, n. 2, p. 162-171, 2010.

WONGTRAKUL, J. et al. Molecular cloning and expression of several new *Anopheles cracens* epsilon class glutathione transferases. Protein and Peptide Letters, Copenhagen, v. 16, n. 1, p. 75-81, 2009.

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

XI, Z.; RAMIREZ, J.L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLOS Pathogens, San Francisco, v. 4, n. 7, p. e1000098, 2008.

YAN, L. et al. Transcriptomic and phylogenetic analysis of *Culex pipiens quinquefasciatus* for three detoxification gene families. BMC Genomics, London, v. 10, n. 13, p. 609, 2012.

YAMAMOTO, K. et al. Characterization of an omega-class glutathione S-transferase in the stress response of the silkworm. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 20, n. 3, p. 379-386, 2011.

YE, Y.H. et al. Infection with a Virulent Strain of *Wolbachia* Disrupts Genome Wide-Patterns of Cytosine Methylation in the Mosquito *Aedes aegypti*. PLOS One, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e66482, 2013.

YU, Q. et al Identification, genomic organization and expression pattern of glutathione S-transferase in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry Molecular Biology, Oxford, v. 38, n.12, p.1158-1164, 2008.