



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA**

EUGÊNIO NUNES DO CARMO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GLUTATIONA S-TRANSFERASE
E GLICOSE 6-FOSFATO-DESIDROGENASE EM *AEDES AEGYPTI* EM
DIFERENTES TEMPOS DE QUIESCÊNCIA**

Barreiras-BA

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA**

EUGÊNIO NUNES DO CARMO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GLUTATIONA S-TRANSFERASE
E GLICOSE 6-FOSFATO-DESIDROGENASE EM *Aedes Aegypti* EM
DIFERENTES TEMPOS DE QUIESCÊNCIA**

Monografia apresentada como requisito para conclusão do componente TCC 2 do Curso de Medicina da Universidade Federal do Oeste da Bahia.

Professora orientadora: Larissa Paola Rodrigues Venâncio

Barreiras-BA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

C287 Carmo, Eugênio Nunes do.

Avaliação da atividade enzimática de glutathiona s-transferase e glicose 6-fosfato-desidrogenase em *Aedes aegypti* em diferentes tempos de quiescência. / Eugênio Nunes do Carmo. – 2022.

40f.

Orientador: Profª Drª Larrissa Paola Rodrigues Venâncio.

Monografia (Graduação) – Bacharelado em Medicina. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2022.

1. *Aedes aegypti*. 2. Quiescência. 3. G6PD. I. Venâncio, Larrissa Paola Rodrigues. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 610



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO FINAL DE CONCLUSÃO DE
CURSO

Aos **vinte e nove** dias do mês de **julho** de 2022, às **14 e 30** horas, em sessão pública na sala virtual meet.google.com/vev-niwv-opv da Universidade Federal do Oeste da Bahia, na presença da Banca Examinadora presidida pela **Profª Drª Larissa Paola Rodrigues Venancio** e composta pelos examinadores: **Profª. Drª. Izabela Barbosa Moraes (UFOB)** e **Prof. Dr. Jonilson Berlink Lima (UFOB)**, o aluno **Eugênio Nunes do Carmo** apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GLUTATIONA S-TRANSFERASE E GLICOSE 6-FOSFATO-DESIDROGENASE EM Aedes Aegypti em diferentes tempos de quiescência** como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Bacharelado em Medicina. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela **aprovação** do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao aluno e demais presentes e eu, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim e pelos demais examinadores.

Documento assinado digitalmente
gov.br LARISSA PAOLA RODRIGUES VENANCIO
Data: 05/08/2022 11:06:36-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Larissa Paola Rodrigues Venancio

Documento assinado digitalmente
gov.br IZABELA BARBOSA MORAES
Data: 29/07/2022 17:04:11-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Izabela Barbosa Moraes

Documento assinado digitalmente
gov.br JONILSON BERLINK LIMA
Data: 05/08/2022 11:04:49-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Jonilson Berlink Lima

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desse Trabalho de Conclusão de Curso contou com a colaboração de diversas partes, dentre as quais eu agradeço:

Agradeço primeiramente a Deus, por todo alicerce, o tempo todo.

À minha família, na figura dos meus pais, Antônio e Sahira e do meu irmão, João, meus portos seguros.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo auxílio financeiro, por meio do projeto “Perfil genético e bioquímico dos mecanismos de biotransformação e do metabolismo redox e sua relação com fenótipo de resistência a agentes químicos e quiescência em *Aedes aegypti*”, também sob coordenação da Prof^a Dr^a Larissa Paola Rodrigues Venâncio.

À Prof^a Dr^a Larissa Paola Rodrigues Venâncio, por orientar, pacientemente, toda a construção da pesquisa, fornecendo o direcionamento necessário para a escrita e para a execução da metodologia.

Ao amigo Lucas Mageski, que colaborou em todas as etapas desse trabalho, desde o projeto até a execução de uma nova pesquisa, e também pela companhia nos longos dias de laboratório.

Aos amigos que durante toda essa fase acadêmica ajudaram de alguma forma, seja com apoio, compreensão ou companhia.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Distribuição global dos casos de dengue em 2015	15
FIGURA 02	Distribuição global dos surtos de dengue em 2014	15
FIGURA 03	Ciclo de vida do <i>Ae. aegypti</i>	16
FIGURA 04	Esquema do mecanismo redox e suas reações	19
FIGURA 05	Coleta e armazenamento dos mosquitos	25
FIGURA 06	Gráfico da atividade enzimática de G6PD	29
FIGURA 07	Gráfico da atividade enzimática de GST	32
FIGURA 08	Gráfico da pluvialidade no ano de 2019 em Barreiras-BA	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	Quantificação da atividade de G6PD	28
TABELA 02	Diferença da atividade entre os tempos de quiescência em G6PD	28
TABELA 03	Quantificação da atividade de GST	31
TABELA 04	Diferença da atividade entre os tempos de quiescência em GST	32

LISTA DE SIGLAS

Aedes aegypti – *Ae. aegypti*

Glutaciona redutase – GR

Glicose-6-fosfato desidrogenase – G6PD

Glutaciona S-transferase – GST

Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida – NADP

Glutaciona peroxidase - GPx

Glutaciona dissulfeto - GSSH

Glutaciona reduzida – GSH

Fenilmetilsulfonil – PMSF

Isocitrato desidrogenase – IDH

Preparo para o estresse oxidativo – POS (do inglês prepare for oxidative stress)

CARMO, Eugênio Nunes. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GLUTATIONA S-TRANSFERASE E GLICOSE 6-FOSFATO-DESIDROGENASE EM *AEDES AEGYPTI* EM DIFERENTES TEMPOS DE QUIESCÊNCIA.** 39p, 2022. Monografia (Bacharelado em Medicina) – Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras.

RESUMO

Introdução: O *Aedes aegypti* é o responsável pela transmissão de doenças em diversos países do mundo, principalmente naqueles em regiões tropicais, como o Brasil. No país, ele é responsável por eventos endêmicos anualmente, principalmente em regiões menos desenvolvidas. Além das condições ambientais que são favoráveis ao seu desenvolvimento, o mosquito apresenta estratégias que auxiliam sua adaptação, como por exemplo, o uso de uma condição hipometabólica, a quiescência, quando as condições ambientais não são favoráveis para seu desenvolvimento, ainda no estágio de ovo. **Objetivos:** Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes, a G6PD e a GST em mosquitos *Ae. aegypti* adultos que emergiram de ovos mantidos em três tempos diferentes de quiescência (0, 60 e 120 dias), com o intuito de avaliar como a ocorre a modulação dessas enzimas após o período hipometabólico. **Resultados:** Foi observado um valor de p igual a 0,0014 para G6PD e de 0,0019 para GST, comprovando que há variação estatisticamente significativa entre os tempos de quiescência, sendo mais significativo ressaltar que na G6PD notou-se um aumento da atividade no t60, indicando o aumento do aporte de NADPH e uma diminuição próxima ao valor original no t120. Já a GST apresentou aumento da atividade no t60 mantendo-se estatisticamente equivalente até o t120. **Conclusão:** Sugere-se que a modulação destas enzimas está associada à adaptação para manutenção da quiescência do embrião durante o período de estiagem na região, que pelos dados meteorológicos, são de cerca de 120 dias. Além disso, aumento da atividade das duas enzimas avaliadas sugere que a teoria do preparo para o estresse oxidativo é positiva no mosquito, tendo aumentado agentes celulares antioxidantes que tem a finalidade de proteger a espécie da ação de radicais livres e espécies oxidantes durante essa fase hipometabólica. Assim, percebe-se que nos diferentes tempos de quiescência houve modulação nas atividades enzimáticas para que os mosquitos *Ae. aegypti* sobrevivam ao estresse oxidativo devido à reoxigenação devido ao fim do estado hipometabólico.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Quiescência. G6PD. GST. Estresse oxidativo. Enzimas antioxidantes.

CARMO, Eugênio Nunes. **EVALUATION OF ENZYMATIC ACTIVITY OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE AND GLUCOSE 6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE IN AEDES AEGYPTI AT DIFFERENT QUIESCENCE TIMES.** 39p, 2022. Monografia (Bacharelado em Medicina) – Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras.

ABSTRACT

Introduction: *Aedes aegypti* is responsible for the transmission of diseases in several countries around the world, especially in tropical regions, such as Brazil. In the country, it is responsible for endemic events annually, especially in less developed regions. In addition to the environmental conditions that are favorable to its development, the mosquito presents strategies that aid its adaptation, such as the use of a hypometabolic condition, quiescence, when environmental conditions are not favorable for its development, still in the egg stage. **Objectives:** In view of this condition, the present study evaluated the activity of antioxidant enzymes, G6PD and GST in *adult Ae. aegypti* mosquitoes that emerged from eggs kept at three different quiescence times (0, 60 and 120 days), to evaluate how the modulation of these enzymes occurs after the hypometabolic period. **Results:** The results showed a p value equal to 0.0014 for G6PD and 0.0019 for GST, proving that there is a statistically significant variation between quiescence times, and it is more significant to highlight that in the G6PD there was an increase in activity in t60, indicating an increase in the contribution of NADPH and a decrease close to the original value in t120. GST showed an increase in t60 activity, remaining statistically equivalent until t120. **Conclusion:** It is suggested that the modulation of these enzymes is associated with adaptation to maintain the embryo's quiescence during the dry season in the region, which by meteorological data, are about 120 days. In addition, increased activity of the two enzymes evaluated suggests that the theory of preparation for oxidative stress is positive in the mosquito, due to increased antioxidant cell agents that have the purpose of protecting the species from free radicals and oxidizing species during this hypometabolic phase. So, it can be seen that in the different quiescence times there was a modulation in the enzymatic activities so that the *Ae. aegypti* survive oxidative stress due to reoxygenation due to the end of the hypometabolic state.

Keywords: *Aedes aegypti*. Quiescence. G6PD. GST. Oxidative stress. Antioxidant enzymes.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	O MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> E AS ARBOVIROSES	14
2.2	A QUIESCÊNCIA NO MOSQUITO	16
2.3	O ESTRESSE OXIDATIVO	18
2.4	A GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE	19
2.5	A GLUTATIONA S-TRANSFERASE	20
2.6	O PREPARO PARA O ESTRESSE OXIDATIVO	20
3.	JUSTIFICATIVA	22
4.	OBJETIVO GERAL DO PROJETO	23
5.	OBJETIVO ESPECÍFICO DO PROJETO	23
6.	METODOLOGIA	23
6.1	Coleta de amostras biológicas	23
6.2	Preparo das amostras	25

6.3	Análise bioquímica da atividade enzimática	26
6.3.1	Atividade enzimática da GST (Glutathione S-transferase)	26
6.3.2	Atividade enzimática da G6PDH (Glicose 6-Fosfato Desidrogenase)	26
6.4	Análise Estatística	27
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
8.	CONCLUSÃO	36
8.	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

O *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) é o principal vetor de transmissão de quatro arboviroses bastante incidentes no Brasil: o vírus da dengue, o do zika, o da chikungunya e o da febre amarela. O cenário epidemiológico dessas doenças, mesmo com campanhas de prevenção sendo intensificadas nos períodos de alta, tem números significativos, sobretudo na Bahia, devido à suas características socioambientais e climáticas, que se assemelham muito às condições dos países de origem do mosquito, localizados na Oceania e no sudeste asiático (CAMPBELL, 2002; MENEZES et al, 2021).

Por conta dos hábitos antropofílicos, o *Ae. aegypti* consegue se adaptar facilmente às condições encontradas nos centros urbanos, transformando em reservatório para suas larvas diversos tipos de recipientes, desde que contenham água. Isso facilita a manutenção e proliferação da espécie, propiciando a ocorrência de epidemias ou endemias de arboviroses transmitidas por esse vetor no Brasil. No início do século XXI, o Brasil foi responsável por 61% de todas as notificações de dengue no mundo no ano de 2001, desde então, a situação epidemiológica do país não deixou de apresentar números problemáticos. Mesmo que em números menores em relação aos já apresentados, o país continua evidenciando altos níveis de incidência, principalmente se comparado à países da América Latina. A título de exemplificação, no ano de 2016, o Brasil foi responsável por cerca de 65% dos casos notificados de dengue em todo continente americano (TAVEIRA, 2001; LOZOVEI, 2001; BARROSO, 2020).

A partir do final do primeiro trimestre de 2020, por conta da pandemia de COVID-19, os números apresentaram uma distribuição curiosa, haja vista que no primeiro semestre do ano teve aumento significativo de casos em relação aos anos anteriores; porém, a partir do início das medidas mais restritivas geradas pela pandemia, os trimestres seguintes não seguiram a mesma sequência (LEANDRO, 2020). Esta situação pode indicar dificuldades no registro e atendimento de pacientes com arboviroses por conta da atenção especial no atendimento a pacientes infectados por SARS-CoV-2.

A apresentação clínica das três arboviroses mais comuns -dengue, zika e chikungunya- é semelhante, e podem variar de quadros leves e inespecíficos até

quadros graves e letais. Os principais sintomas e sinais para reconhecimento das doenças são hipertermia, náuseas, vômito, anorexia, diarreia, erupção cutânea, cefaleia, dores no corpo e fraqueza muscular. Algumas das principais repercussões decorrentes dessas viroses são a dengue hemorrágica, no caso da Dengue, a microcefalia, decorrente de infecções por Zika durante a gestação e a síndrome de Guillain-Barré, em virtude da Chikungunya (ZARA et al, 2016).

Assim, entende-se o porquê de tal espécie ser considerada uma grande ameaça à saúde pública brasileira. Portanto, é imprescindível compreender as características biológicas do mosquito, para que dessa forma, ferramentas mais eficazes sejam propostas para o combate e controle desse vetor no Brasil, sobretudo no nordeste e com mais foco ainda na região Oeste da Bahia, região endêmica para as arboviroses transmitidas pelo mosquito. Analisar o vetor em suas diferentes etapas do ciclo de vida e diferentes contextos ambientais, é relevante para propor medidas de controle e manejo desse mosquito (MANRIQUE-SAIDE, 2015; ZARA et al, 2016).

Dentre as estratégias utilizadas para o controle do mosquito, pode-se citar o uso de inseticidas ou pesticidas, controle físico do vetor, dentre outras formas. Contudo, o *Ae. aegypti* apresenta alguns artifícios fisiológicos que podem dificultar esse controle, como por exemplo, a quiescência. Este processo fisiológico é uma forma de adormecimento do ovo, que retarda o tempo que o mesmo leva para eclodir, ocasionado principalmente por fatores climáticos e ambientais, como a baixa umidade e altas temperaturas (MANRIQUE-SAIDE, 2015; AMARASINGHE, L. D. et al, 2020).

Deste modo, uma pergunta foi formulada a fim de orientar o desenvolvimento deste trabalho:

1. O mosquito apresenta um ciclo de vida cujas fases são passíveis de ação de manejo. A fase de ovo é a menos conhecida e talvez uma das fases mais importantes para manutenção e propagação do vetor no ambiente, especialmente pelo fato de manter o embrião em quiescência por um período longo de tempo. Os mecanismos envolvidos com o metabolismo de inseticidas são os mesmos envolvidos com o metabolismo redox, que controla o dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio geradas pelo processo de respiração celular. Então, qual é o perfil bioquímico destes elementos em diferentes tempos de quiescência?

Levando em consideração o questionamento apresentado, definiu-se como objeto de estudo avaliar o perfil bioquímico de elementos envolvidos nesse processo metabólico, a fim de prover conhecimento a respeito da biologia do vetor em termos de defesa antioxidante, para auxiliar na indicação de possíveis estratégias de controle efetivo do mosquito, além de conhecimento sobre a capacidade deste vetor de lidar com as possíveis injúrias geradas por espécies reativas de oxigênio, que podem influenciar também na capacidade de transmissão e manutenção de arbovírus nesta espécie.

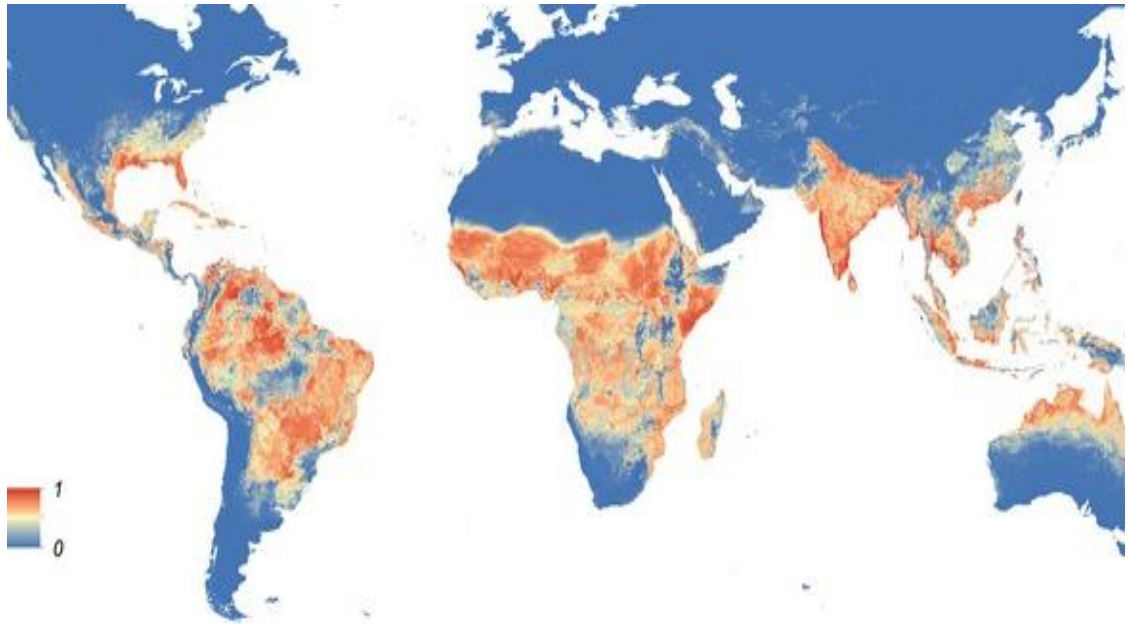
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O MOSQUITO *Aedes aegypti* E AS ARBOVIROSES

O *Ae. aegypti* é um artrópode, da família Culicidae, de hábitos diurnos e é facilmente reconhecido por ser de coloração preta com listras brancas e de hábitos urbanos. É um mosquito com vasta distribuição geográfica, predominando nas áreas tropicais e subtropicais situadas entre os paralelos de latitudes 45° Norte e 40° Sul e nas zonas isotermais intermediadas a 20°C. O primeiro registro de dengue no Brasil é datado em 1982, no estado de Roraima; desde então, é observado crescimento da área de transmissão dessa doença, e de ocupação do mosquito, para todo o território nacional, principalmente nas regiões com piores indicadores sociodemográficos (FORATTINI 2002; GADELHA 1985).

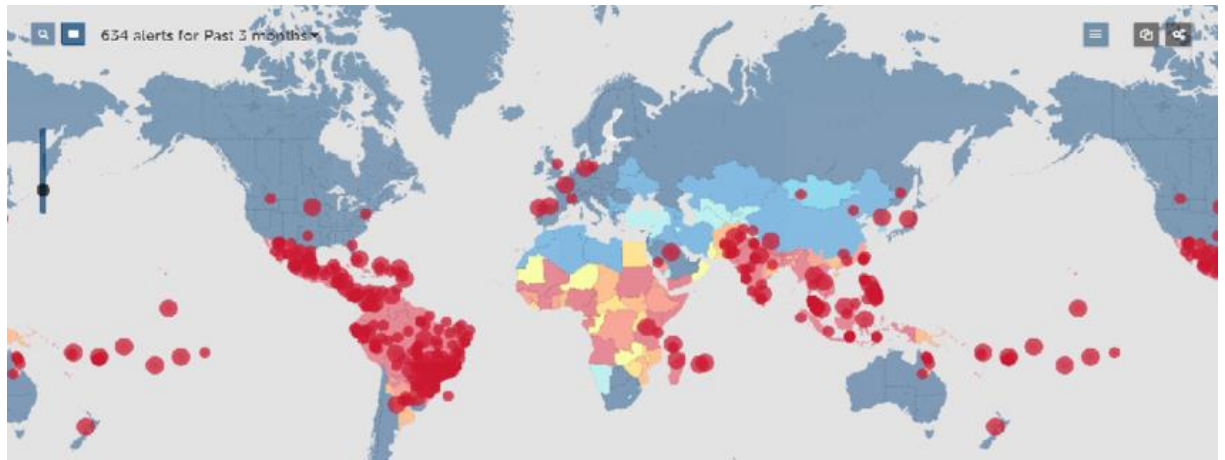
Conhecido por ser o mosquito vetor de quatro grandes viroses: dengue, zika, chikungunya e febre amarela, o *Ae. aegypti* tem dados alarmantes, principalmente no que se refere a primeira das três viroses. O dengue é o mais prevalente arbovírus no mundo, sendo encontrado em cerca de cem países tropicais e subtropicais. Aproximadamente metade da população mundial está em zona de risco para infecção por dengue. Já a infecção por Zika Vírus, mesmo não tendo a prevalência próxima à da dengue, apresenta outras preocupações, principalmente relacionadas ao seu potencial de causar defeitos congênitos em fetos e recém-nascidos, como foi visto recentemente no Brasil na última epidemia da doença em 2015, com bastante casos de nascidos com microcefalia. A seguir, as figuras 1 e 2 que apresentam a distribuição global dos casos de dengue, uma das arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti* em diferentes anos (UNO, 2018; TIAN, 2019; MUSSO, 2019).

FIGURA 1: Distribuição global dos casos de dengue em 2015.



FONTE: KRAEMER, 2015

FIGURA 2: Distribuição dos surtos de dengue em 2014



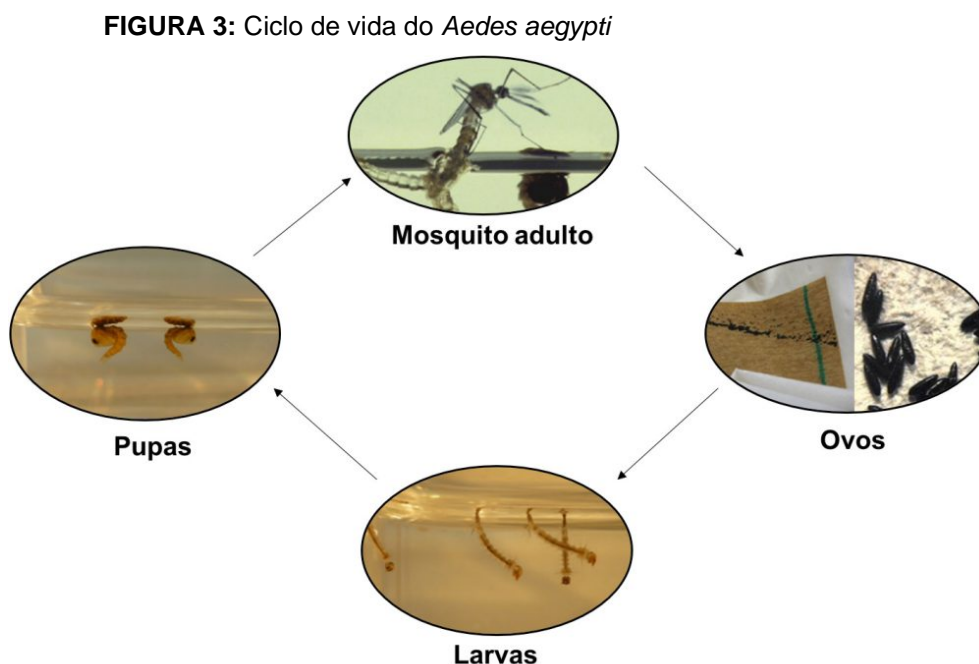
FONTE: <http://www.healthmap.org/dengue/index.php>

O número de mosquitos adultos é fortemente influenciado pela pluvialidade, apresentando estratégias de sobrevivência que permite o *Ae. aegypti* manter uma população com um tamanho considerável em períodos entre as estações/épocas chuvosas (CONSOLI, 1994).

O ciclo de vida do inseto é permeado por quatro fases: ovo, larva, pupa e o mosquito adulto. Os ovos de *Ae. aegypti* são elípticos e alongados, e em condições

ambientais favoráveis, o embrião está apto para eclodir em cerca de 4 a 7 dias, contudo, esse estágio de vida do mosquito é o mais resistente, podendo permanecer em estágio hipometabólico por até 18 meses. O estágio seguinte é o larval, sua morfologia é alongada, com formato de verme e coloração esbranquiçada. Habitam ambientes aquáticos, em diferentes ecossistemas, como pântanos, rios, lagos e recipientes antrópicos. Esse estágio é subdividido em quatro partes (L₁, L₂, L₃, L₄), o primeiro é o que rompe o ovo, por meio de um dente de quitina, exclusivo dessa fase e o último entra em metamorfose para avançar de estágio (CONSOLI, 1994; ACIOLE 2009; CANDIDO, 2011).

O terceiro estágio de vida, a pupa, representa a mudança de hábitat, deixando a vida aquática e indo para a vida terrestre. É um estágio mais lento, devido ao metabolismo mais lento dessa fase. A quarta e última fase de vida do *Ae. aegypti* é a adulta. Os mosquitos na forma que são mais conhecidos medem entre 3-6 mm de comprimento, tem corpo com uma coloração escura e faixas brancas; as fêmeas apresentam um aparelho bucal picador e são hematófagas obrigatórias, mas também se alimentam de outros produtos, como seiva de plantas (FORATTINI, 2002; ACIOLE, 2009; CANDIDO, 2011). Em seguida, Figura 3 com os estágios de vida do *Ae. aegypti*, sendo eles: ovo, larva, pupa e mosquito adulto.



Fonte: Adaptado de Center for Disease Control and Prevention, 2016.

2.2 A QUIESCÊNCIA NO MOSQUITO *Aedes aegypti*

Todos os animais necessitam de nutrição adequada como fonte de energia para os processos celulares responsáveis pelo crescimento e sobrevivência. No entanto, a disponibilidade de nutrientes no ambiente muda com as transições climáticas sazonais. Para superar períodos cujas condições são desfavoráveis, diferentes espécies adotam estratégias biológicas que são classicamente denominadas de diapausa, quiescência, torpor ou hibernação, dependendo da espécie e dos aspectos fisiológicos/metabólicos associados a cada uma. Artrópodes podem adotar diapausa, quiescência ou simplesmente resistência ao estresse abiótico como estratégias de sobrevivência (DA SILVA, 2019).

Os estágios de hipometabolismo de resistência costumam ser caracterizados por uma parada do desenvolvimento, que permite a sobrevivência em condições desfavoráveis, retomando períodos de crescimento e reprodução apenas quando as condições são favoráveis novamente. Mudanças fisiológicas específicas da espécie ocorrem durante diferentes formas de parada do desenvolvimento - como ovos, larvas, pupas, entre outras - incluindo diminuição do metabolismo, aumento da tolerância ao estresse e produção alterada de proteínas. Essas mudanças garantem proteção contra inúmeros estressores ambientais, como dessecação, temperaturas extremas e estresse oxidativo (DA SILVA, 2019).

O ciclo de vida do *Ae. aegypti* tem uma característica interessante, mas não exclusiva da espécie, que facilita sua sobrevivência em ambientes, temperaturas e climas inóspitos, até que essas condições se tornem melhores. Dá-se o nome de quiescência a esta característica. Esse fenômeno consiste na interrupção do desenvolvimento dos ovos do mosquito, sobretudo em locais com baixa umidade e alta temperatura. Esse fenômeno funciona, pois, ao receber estímulos ambientais negativos, o ovo com embrião já formado diminui consideravelmente sua atividade metabólica, inibindo a eclosão larval, apenas de forma momentânea. Essa condição é revertida quando as condições favoráveis à sobrevivência são retomadas (VINOGRADOVA, 2007; PEREZ; NORIEGA, 2013; OLIVA 2018).

As implicações decorrentes desse processo de quiescência são prejudiciais ao processo de combate ao vetor de arboviroses com impacto mundial tão amplo, como

as já supracitadas. Dentre as consequências desse fenômeno, tem-se o fato de que a dispersão passiva dos ovos é facilitada, levando ao aumento na dificuldade de tomar medidas eficazes para controlar a população de mosquitos. Mesmo não se tendo registros anteriores a 1982, suspeita-se que a chegada do vetor no Brasil foi via navios negreiros, e assim, a quiescência foi fator fundamental nesse processo de travessia oceânica. Além disso, outra implicação é a reinfestação em locais que já se havia controlado, devido a eclosão de ovos quiescentes assim que as condições se tornaram favoráveis (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; SILVA; SILVA, 1999; DINIZ et al., 2017).

2.3 O ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres, átomos ou moléculas com elétrons desemparelhados na última camada da sua eletrosfera, são produzidos constantemente nos organismos animais e vegetais. Essa produção ocorre de diferentes formas, em diferentes vias, como no metabolismo mitocondrial, na resposta inflamatória e em exercícios físicos. Eventos que são responsáveis pela formação de radicais livres variam entre fenômenos internos e externos. Nos primeiros, alguns exemplos seriam hipóxia, anóxia, respiração aeróbia ou ainda processos celulares que tem envolvimento com o combate a microrganismos invasores ou substâncias tóxicas. Fatores externos, como o uso de medicamentos, radiação e tabagismo, têm influência direta nos níveis dessas moléculas, que em excesso, principalmente em situações de desequilíbrio, levam o organismo ao estresse oxidativo, o que causa prejuízos, como a morte celular (KUMAR; PANDEY, 2015; PISOSCHI; POP, 2015; RADI, 2018; VELLOSA, 2021).

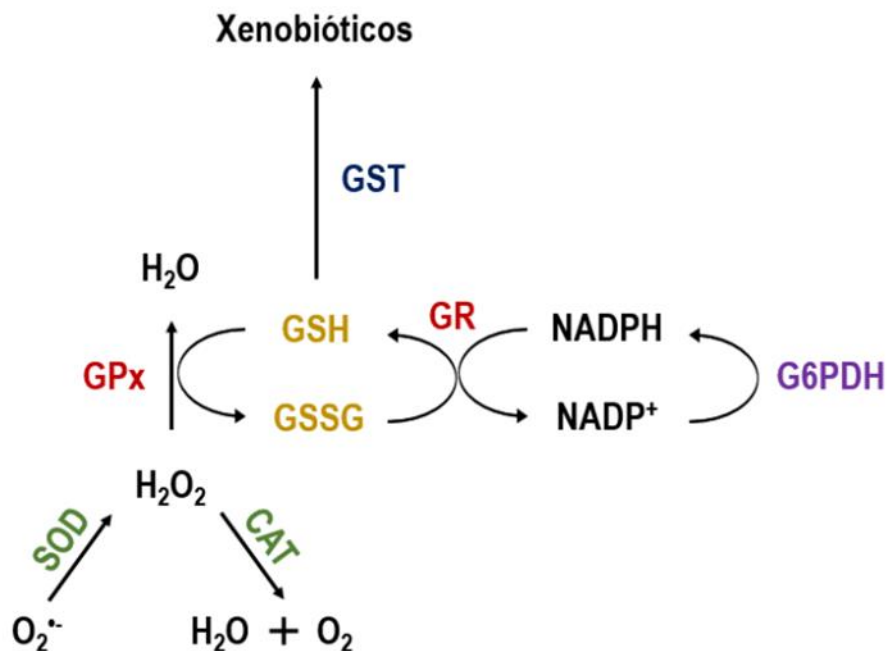
Os radicais livres são representados por inúmeros compostos diferentes, entretanto, dentre eles, vale o destaque para os derivados do oxigênio, haja vista o impacto que geram em sistemas biológicos. Essas espécies reativas de oxigênio (ERO) são: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O^{2-}) e o radical hidroxila ($OH\cdot$). O estresse oxidativo pode ter como resultados a degradação de importantes estruturas biológicas no funcionamento orgânico das células, consequentemente, pode causar ou agravar doenças (KUMAR; PANDEY, 2015).

2.4 GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzima citoplasmática expressa em tecidos animais e é fundamental para a sobrevivência das células. Ela catalisa a primeira etapa do ciclo das pentoses, que produz NADPH, uma das vias alternativas para a obtenção de energia celular. Para as hemácias, por exemplo, é essencial para a proteção desse tipo celular como agente antioxidante. Sua capacidade antioxidante é realizada reduzindo NADP a NADPH, em um processo em que a G6PD oxida duas substâncias, a G6P e a 6-fosfoglucolactona (NICOLIELO, 2006; MACIEL, 2007).

A NADPH, produto da redução de NADP no ciclo das pentoses, atua na detoxificação celular, sendo responsável por eliminar radicais livres e peróxidos. A remoção desses peróxidos é catalisada pela glutathiona peroxidase (GPx), que se conjuga à glutathiona reduzida (GSH), tornando-a em glutathiona dissulfeto (GSSH), como ilustrado na Figura 4.

FIGURA 4: Esquema do mecanismo redox e suas enzimas.



Fonte: MARTINS, 2018.

O esquema acima (figura 4) demonstra a cadeia de reações do mecanismo redox. Pode-se observar que a G6PD reduz a molécula de NADP a NADPH, que por sua vez é oxidada na presença da glutathione redutase (GR) transferindo um elétron à GSSH transformando-a em GSH. Nessa fase, a GST atua como responsável por catalisar o ataque nucleofílico da GSH, enquanto isso, a GPx faz parte da reação de redução do peróxido de hidrogênio em água (TARHAN, 2013).

2.5. GLUTATHIONE S-TRANSFERASE

A Glutathione S-Transferase (GST) é uma família enzimática que contém enzimas com elevada especificidade pela glutathione reduzida (GSH), e após combinadas, apresentam especificidade por um novo substrato. As GSTs são fundamentais na fase II de biotransformação ou detoxificação. Nos mosquitos, uma alta atividade de GST está relacionado a uma maior resistência e tolerância a pesticidas. Essa enzima catalisa o ataque nucleofílico de GSH a eletrófilos ou xenobióticos, por isso são tão importantes no processo de detoxificação. A desintoxicação a xenobióticos é realizada em três fases: nas fases I e III o produto é convertido à um composto químico com maior solubilidade em água e menor toxicidade, já a fase II, tem maior importância no metabolismo celular, sendo responsável pela metabolização e eliminação dos xenobióticos, sendo nessa etapa a conjugação com a glutathione (DE FREITAS, 2008; HUBER et al, 2008; SANTOS, 2018).

2.6. PREPARO PARA ESTRESSE OXIDATIVO (POS)

Fatores ambientais como a desidratação, hipóxia, congelamento e radiação ultravioleta, podem servir como gatilho em algumas espécies para o início de um estado hipometabólico, de uma maneira que possibilite a manutenção da espécie. As enzimas antioxidantes têm sua expressão aumentada quando passam por um período de exposição ao estresse (MOREIRA et al, 2020).

Foram Hermes-Lima e Storey (1998) que nomearam esse aumento das enzimas antioxidantes antes de um período hipometabólico como preparo para o estresse

oxidativo, justamente por tornar as condições de vida mais propícias para uma fase com demanda menor de oxigênio. Sendo essa medida uma forma preventiva dos danos que podem ser causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), com elevado potencial oxidante. As ERO mais conhecidas são: os radicais superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-) (HERMES-LIMA, STOREY, 1998; MOREIRA et al, 2020).

Mesmo numa fase hipometabólica, os animais continuam expostos a fatores adversos que podem gerar produtos oxidativos de variadas espécies, dentre eles as ERO, como a exposição à radiação ultravioleta, desidratações, alterações climáticas e até a privação de oxigênio. Por isso, esse momento de preparo para o estresse oxidativo é tão importante, fazendo com que o organismo seja capaz de combater essas moléculas como os radicais livres (HERMES-LIMA, STOREY, 1998; MOREIRA et al, 2020).

Recentemente diversas pesquisas elucidaram ainda mais os mecanismos dessa condição. Hermes-Lima e colaboradores (2015) propuseram que o aumento da expressão de moléculas antioxidantes em consequência da privação de oxigênio tem relação com alguns fatores, dentre eles: (1) o aumento temporário na geração de radicais livres, principalmente ERO, como efeito de os componentes da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial estarem num estado mais reduzido, (2) o aumento da produção de ERO pode causar um desequilíbrio redox, provocando oxidação celular e a produção de outras espécies oxidantes, (3) a expressão aumentada pode ser resultado da ativação de fatores de transcrição sensíveis ao mecanismo redox (como NF- $K\beta$, Nrf2, FoxOs, p53 e HIF- 1α), (4) por último, mudanças pós-traducionais em enzimas antioxidantes. Entretanto, existem também espécies animais em que esse preparo para o estresse oxidativo não existe, ou até situações em que as espécies antioxidantes diminuem a sua atividade.

De acordo com Moreira (2015), o POS (sigla vinda do inglês) pode ser classificado em três diferentes grupos, de acordo com alguns critérios. Os grupos para classificação são: POS-positivo, POS-negativo e POS-neutro. E os critérios adotados para classificar nos três diferentes grupos são os seguintes:

1. A ocorrência de pelo menos uma diferença estatisticamente significativa de regulação positiva de evento antioxidante. Se não houver mudanças, é classificado com neutro, se houver diminuição, negativo.

2. Foram definidos limites para a regulação ascendente e descendente. Um aumento de pelo menos 50% em alguma amostra e tempo, independe do que houve em outras amostras e tempos, enquanto o limite negativo é de uma diminuição de 25%.
3. Por fim, a ocorrência de mais casos de regulação positiva em relação aos de regulação negativa na amostra avaliada. Assim, faz-se necessário avaliar pelo menos dois parâmetros antioxidantes para enquadrar nesse critério.

3. JUSTIFICATIVA

O *Ae. aegypti* é o maior vetor de arboviroses conhecido, sendo responsável por milhares de mortes anualmente, além de vários casos graves, como a dengue hemorrágica e a microcefalia em fetos, decorrente da infecção por zika vírus durante a gravidez. Esses eventos geram muitos impactos na saúde, principalmente, por meio de investimentos no combate e prevenção, além dos altos custos hospitalares. Nesse sentido, um dos mecanismos que mais auxilia o mosquito em sua alta adaptação e dispersão é a quiescência, pois por meio dela consegue entrar em atividade hipometabólica quando as condições ambientais não são favoráveis para o seu desenvolvimento (ZARA et al., 2016; OLIVA, 2018).

Os ovos de *Ae. aegypti* em estado de quiescência apresentam moléculas oxidativas. Essas moléculas advêm tanto dos processos fisiológicos (em menor escala, haja vista que está em um estado hipometabólico), quanto das interações ambientais (radiação ultravioleta e desidratação, que ocorre numa frequência maior, pois os ovos continuam expostos às condições ambientais). Nesse sentido, as enzimas antioxidantes são fundamentais para a proteção contra os danos oxidativos, dentre elas a G6PD e a GST, uma atuando no ciclo das pentoses e a outra na fase II da detoxificação e na eliminação de hidroperóxidos (MARTINS, 2018).

A literatura conta com pouco material abordando o fenômeno de quiescência e seus mecanismos. Quando se fala de *Ae. aegypti* esse número se torna ainda mais reduzido. Contudo, em países tropicais, a principal zona em que o mosquito é encontrado, como é o caso do Brasil, é fundamental entender esses processos, devido aos impactos na saúde decorrentes das arboviroses que são transmitidas por esse

vetor. Nesse ínterim, o entendimento sobre a manifestação de G6PD e GST pode ajudar futuramente em ações que ajudem no controle desse mosquito com novas formas, haja vista que no estado quiescente, os pesticidas têm pouco efeito e o combate mecânico é pouco efetivo também (MANRIQUE-SAIDE, 2015; ZARA et al., 2016; AMARASINGHE, L. D. et al, 2020).

4. OBJETIVO GERAL

Investigar e determinar a ocorrência de modulação da atividade enzimática de Glutathione S-transferase (GST) e glicose 6-fosfato-desidrogenase (G6PD) em espécimes de *Ae. aegypti* adultos mantidos em diferentes períodos de quiescência durante a fase de ovo.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Quantificar a atividade de G6PD em mosquitos adultos cujos ovos originários foram mantidos em tempos diferentes de quiescência (tempo zero, tempo 60 dias e tempo 120 dias);
- b. Avaliar a atividade de GST em adultos que eclodiram de ovos em diferentes períodos de quiescência (tempo 0, tempo 60 dias e tempo 120 dias).
- c. Identificar se o perfil do vetor, com base nas enzimas avaliadas, enquadra-se na estratégia do preparo para estresse oxidativo.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Coleta de amostras biológicas

Na primeira etapa, foram empregadas ovitrampas para a captura de ovo da fêmea de *Ae. aegypti*, no mês de janeiro de 2020. (Figura 5A). As ovitrampas são formadas por um recipiente preto de formato cilíndrico e uma palheta Eucatex de formato retangular que possui uma face rugosa que fica voltada para o centro do recipiente (MACIEL-DE-FREITAS *et al.*, 2008). Esses instrumentos foram colocados em diversas localidades do município de Barreiras, a saber: Bandeirantes,

Barreirinhas, Flamengo, Jardim Ouro Branco, Morada da Lua, e Sandra Regina. Depois, a cada 7 dias, durante todo o período em que se conduziu o estudo, as paletas com ovos do mosquito foram recolhidas das ovitrampas.

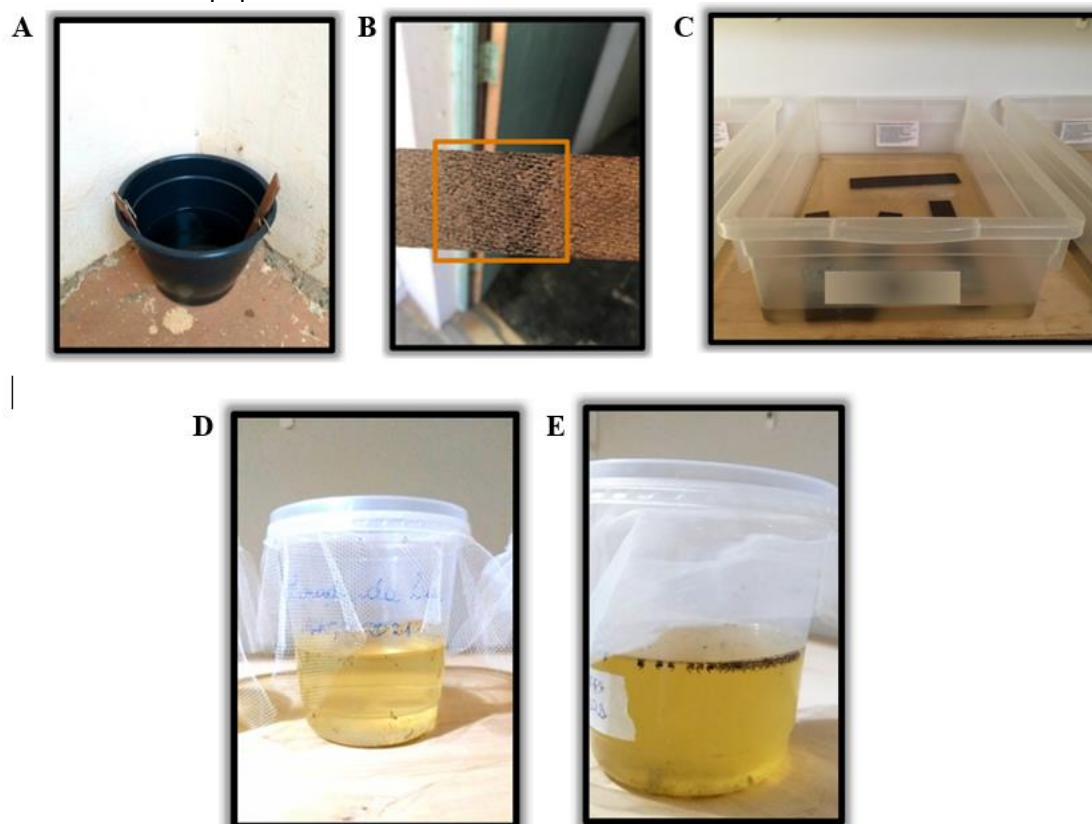
Posteriormente, em outra etapa do estudo, as paletas foram levadas para o LAIVE II – unidade Vetores, situado no campus Reitor Edgard Santos da Universidade Federal do Oeste da Bahia, para iniciar e acompanhar a eclosão dos ovos. As paletas, com a face rugosa voltada para cima, foram colocadas em um recipiente plástico com água, como é ilustrado na figura 5C. Após a eclosão dos ovos, iniciou-se a retirada dos estádios larvais com uma pipeta de plástico. Posteriormente, as larvas foram armazenadas em potes de plástico contendo água destilada. Imediatamente, os recipientes foram tampados com uma tela e lacrados com uma tampa perfurada, para permitir a entrada e saída de ar ambiente, como é indicado na figura 5D. Os potes foram devidamente identificados com etiquetas que indicavam o bairro no qual a amostra foi coletada.

Segundo Anjolette e Macoris (2016), as larvas do mosquito *A. aegypti* possuem quatro estágios larvais, denominados: L1, L2, L3 e L4. Nesse contexto, após 2 a 3 dias, as larvas anteriormente coletadas, agora em forma de pupas, foram transferidas para outro recipiente plástico com água e ali permaneceram até sua maturação, onde emergiram na forma alada (Figura 5E).

Por fim, os mosquitos, agora em sua forma adulta, foram novamente transferidos para outros potes plásticos vazios, levados ao freezer por até 3 minutos e, finalmente, eutanasiados. Em seguida, dez desses mosquitos foram colocados em microtubos de 2mL, o que se configura como 1 “pool” e armazenados em um freezer a -80 °C. Todos esses procedimentos foram realizados em visitas diárias à unidade, para que fosse possível acompanhar todo o desenvolvimento do *A. aegypti* (NUNES, 2019).

Destaca-se que os indivíduos gerados por ovos coletados das ovitrampas e que foram colocados em água para continuação do desenvolvimento marcam o estudo na fase 0 de quiescência. Já o segundo e terceiro grupo de mosquitos são formados pelos ovos que passaram por 60 e 120 dias de quiescência, respectivamente, seguindo o mesmo procedimento.

Figura 5 – Coleta e desenvolvimento dos espécimes avaliados no estudo. Tem-se: (A) Palhetas de Eucatex contendo ovos. (B) Palhetas de Eucatex contendo ovos. (C) Caixas de multiuso com palhetas preparadas para eclosão dos ovos coletados do campo. (D) Potes plásticos contendo larvas. (E) Potes plásticos contendo pupas.



Fonte: Acervo Grupo de Estudo em Genética Molecular (GEGMol).

6.2 Preparo das amostras

Para análise das atividades enzimáticas, a cada “pool”, microtubo contendo 10 mosquitos adultos, foi adicionado 100 μ L de tampão de homogeneização Tris-HCl 0,2 mM, pH 7,5, contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) dissolvido em etanol absoluto na concentração de 1M, foram feitas análises em 5 “pools” por tempo de quiescência. Em seguida, os mosquitos adultos contidos nos microtubos foram macerados e homogeneizados com auxílio de um macerador para microtubos. As amostras foram centrifugadas a 9.000xg, a 2°C, por 20 minutos. Ao término desta etapa, os sobrenadantes de cada amostra foram transferidos para novos microtubos de 1,5 mL devidamente identificado por tempo de quiescência e enzima, os quais, posteriormente, foram acondicionados a -80 °C para preservação da cinética reacional até o momento da mensuração da atividade.

6.3 Análise bioquímica da atividade enzimática

6.3.1 Atividade enzimática da GST (Glutathione S-transferase)

A avaliação e quantificação da atividade dessa enzima foram realizados de acordo com o protocolo *Glutathione S-Transferase (GST) Assay Kit*, cujo número de catálogo é CS0410, da fabricante Sigma-Aldrich, utilizando o leitor de microplacas Varioskan Lux (Thermo Fischer).

O ensaio enzimático baseou-se na quantificação da formação do produto CDNB e a análise espectrofotométrica foi realizada a 340nm. A reação foi conduzida com os seguintes reagentes e respectivas concentrações finais: tampão fosfato de potássio 200mM, pH 6,5; GSH e CDNB a 2mM. Foram usadas reações com volumes de 200µL. Nos três diferentes tempos de quiescência foram usados 20µL da amostra e 180µL de solução tampão de fosfato de potássio. O branco foi utilizado para avaliar a hidrólise espontânea, consistindo na mistura de 200µL de tampão fosfato de potássio. O controle foi feito por meio da mistura de 196µL de tampão fosfato de potássio e 4µL de solução de controle de GST do kit.

6.3.2 Atividade enzimática da G6PD (Glicose 6-Fosfato Desidrogenase)

A avaliação e medição da atividade dessa enzima foram feitos de acordo com o protocolo *Glucose-6-Phosphate dehydrogenase Assay Kit*, cujo número de catálogo é MAK015, da fabricante Sigma-Aldrich, utilizando o leitor de microplacas Varioskan Lux (Thermo Fischer).

A atividade da G6PD foi medida quantificando a taxa de formação de NADPH, em comprimento de onda de 450nm. A reação foi constituída pelos seguintes reagentes e respectivas concentrações finais: tampão Tris-HCl 0,2mM, pH 7,5, tampão de ensaio de G6PDH, mix de substrato e mix desenvolvedor. Nos três diferentes tempos de quiescência foram usados 46µL do tampão de ensaio contendo a amostra, 2µL do mix de substrato e 2µL do mix desenvolvedor. Além disso, uma

solução padrão de NADH foi utilizada em diferentes soluções para que a uma curva padrão fosse definida para os cálculos das amostras.

6.4 Análise estatística

Os dados gerados foram avaliados quanto à distribuição e homocedasticidade das variâncias por meio dos testes de Shapiro Wilk e Levene, respectivamente. Os grupos foram avaliados utilizando o teste paramétrico ANOVA One-Way, seguido do teste *a posteriori* de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5% e os dados analisados por meio do programa STATISTICA 8.0.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, tem-se as medidas das atividades de G6PD e GST em relação aos três diferentes períodos de quiescência analisados (0, 60 e 120 dias).

7.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE

Os resultados da atividade enzimática de G6PD (média \pm desvio padrão) após os cálculos e análise estatística com o teste ANOVA *one-way* ($F= 6,24$; $gl= 2$) estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2 e nas Figura 6. O teste estatístico indicou diferença significativa entre os diferentes tempos de quiescência ($p= 0,014$). O primeiro tempo, 0 dias de quiescência apresentou atividade média de $5,62$ nmoles/min/mL $\pm 2,24$; já o grupo de 60 dias apresentou atividade média de $15,11$ nmoles/min/mL $\pm 8,09$; por fim, aos 120 dias de quiescência foram encontrados $5,2$ nmoles/min/mL $\pm 2,24$ em atividade (Tabela 1).

Tabela 1 – Quantificação da atividade enzimática de G6PD em amostras de *Aedes aegypti* em diferentes tempos de quiescência em Barreiras – Bahia, Brasil.

Tempo de quiescência (dias)	Atividade G6PD (nmoles/min/mL ± DP)	ANOVA one-way F gl	Valor de p
0	5,62 ± 2,24		
60	15,11 ± 8,09	6,24 2	0,0014*
120	5,2 ± 2,24		

Fonte: Autor (2022).

Nota: DP = Desvio-padrão; * valor estatisticamente significativo.

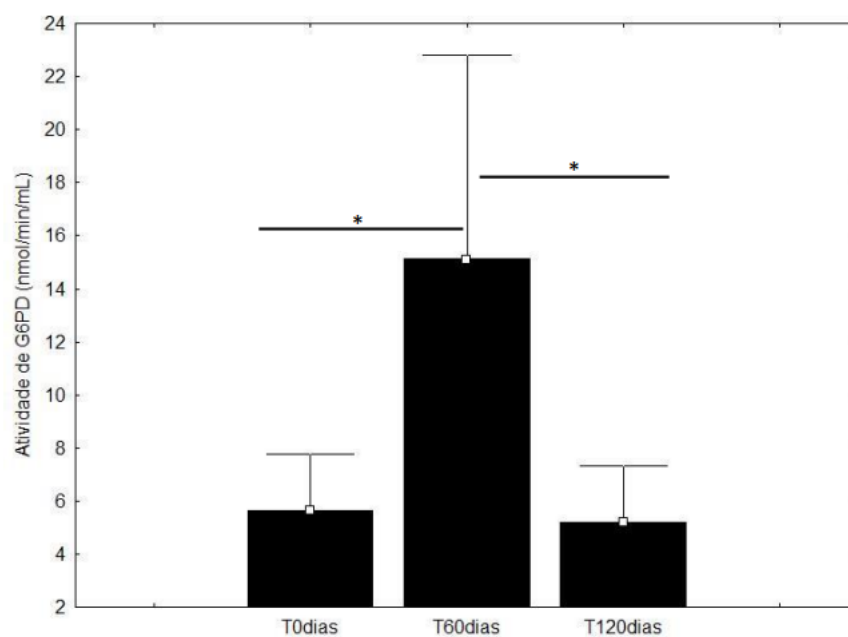
Após teste a posteriori (Bonferroni), identificou-se haver diferença estatisticamente significativa entre 0 e 60 dias e entre 60 e 120 dias em quiescência, conforme descrito na Tabela 2 e Figura 6.

Tabela 02 – Comparação das atividades enzimáticas da G6PD entre grupos amostrais de *Aedes aegypti* de Barreiras – Bahia, Brasil, em diferentes tempos de quiescência, por meio do Teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Comparação entre tempos de quiescência	Valor de p
0 dias vs. 60 dias	0,034*
60 dias vs. 120 dias	0,026*
0 dias vs. 120 dias	1,0

Fonte: Autor (2022). * estatisticamente significativo

FIGURA 6: Atividade enzimática de G6PD nos três diferentes períodos de quiescência.



Os asteriscos indicam que as diferenças são estatisticamente significantes (T0 vs T60 e T60 vs T120).

A estratégia hipometabólica é utilizada para sobrevivência da espécie a fim de economizar energia e passar por esse período desafiador, que no caso do *Ae. aegypti* é especialmente a diminuição da pluviosidade. A quiescência é um estado que os ovos do mosquito adotam com o intuito de reduzir o gasto energético, e isso tem influência na expressão de agentes antioxidantes durante os diferentes tempos de quiescência no mosquito. A teoria do preparo para o estresse oxidativo (do inglês *Preparation for Oxidative Stress* - POS), que enfatiza um provável aumento das enzimas responsáveis por combater os radicais livres, as quais pode-se citar a G6PD e a GST, é fortalecida por estudos em diferentes animais (HERMES-LIMA et al, 2015; MOREIRA et al. 2016; MARTINS, 2018).

Outro estudo que embasa essa teoria foi o desenvolvido por Martins (2018), que avaliou a atividade de várias enzimas, dentre elas as duas desse presente estudo, na espécie *Salvator merianae*. Em situações de jejum, devido a hibernação, é esperado uma diminuição da atividade de G6PD, haja vista que a catálise de carboidratos e a síntese de ácidos graxos é praticamente interrompida. Apesar disso, o estudo de Martins observou o aumento dessa enzima nessas situações hipometabólicas – a hibernação dos lagartos, cuja duração foi de aproximadamente

três meses- para assegurar o suprimento de NADPH. A mesma situação foi visualizada no presente estudo, ou seja, um aumento na atividade de G6PD. Contudo, em seguida foi observada a diminuição dessa atividade conforme o tempo de quiescência avançava. Em outros estudos isso também foi observado, como no caso de peixes da espécie *Sparus aurata*, que teve aumento nas taxas de G6PD de cerca de 29-42% após um período de estresse ambiental, nessa situação, ocasionada por hipóxia após retirar os peixes da água. Esses resultados corroboram com os apontamentos da teoria POS (PEREZ-JIMÉNEZ et al, 2012; ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2014; MARTINS, 2018).

Além das pesquisas já citadas, outro estudo que avaliou a atividade de G6PD, dessa vez em *Achatina fulica*, uma espécie de caracol, apresentou como resultado o aumento brusco dos níveis de G6PD após um período de estivação (estado de dormência comum em moluscos, peixes pulmonados, répteis e anfíbios durante o período de seca), em relação a animais que não passaram por essa condição (HERMES-LIMA et al, 2015).

Em contraponto, um estudo utilizando a espécie *Chlosyne lacinia* apresentou resultados contrários. Nele, a atividade de G6PD se manteve estável em quase todos os grupos experimentais. A exceção a esse achado foram as larvas com 60 dias de diapausa, que apresentaram níveis diminuídos de atividade dessa enzima. Diapausa é um estado hipometabólico, semelhante a quiescência, que artrópodes podem manifestar, e é desencadeado por estímulos ambientais e caracteriza-se por aumento da tolerância ao estresse oxidativo. De acordo com o autor, isso indica que a via das pentoses se manteve viável durante o período de diapausa desse inseto, tendo uma capacidade alta de produzir NADPH, o que implica em dois processos, a biossíntese e a manutenção de agentes antioxidantes (RAMNANAN, 2006; HERMES-LIMA et al, 2015; MOREIRA, 2021).

No presente estudo, os valores encontrados demonstraram uma diferença significativa entre t0 e t60 e entre t60 e t120. O t60 apresentou valores cerca de três vezes maior que os outros dois, sugerindo que nesse período houve aporte na capacidade de produção de NADPH, a fim de contribuir para a manutenção do estado reduzido celular, e possivelmente na produção de GSH (glutationa reduzida), um dos mais importantes antioxidantes celulares. Os níveis da atividade de G6PD retomam

os iniciais (t0) aos 120 dias em quiescência, podendo ser indicativo de sinal metabólico para o retorno ao estado de metabolismo normal.

7.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GLUTATIONA S-TRANSFERASE

Os resultados da atividade enzimática de GST (média \pm desvio padrão) após os cálculos e análise estatística com teste ANOVA *one-way* ($F = 11,08$; $gl = 2$) estão demonstrados nas Tabelas 03 e 04 e nas Figuras 07 e 08. Os valores médios de atividade enzimática variaram de 0,21 a 0,36 nmoles/mL/min, existindo diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tempos de quiescência ($p = 0,0019$). O primeiro tempo, 0 dias de quiescência, apresentou atividade média de 0,21 nmoles/mL/min \pm 0,004, já o grupo de 60 dias apresentou os seguintes valores 0,36 nmoles/mL/min \pm 0,06 e, por fim, aos 120 dias de quiescência foram encontrados 0,34 nmoles/mL/min \pm 0,065 (Tabela 3).

Tabela 3 – Quantificação da atividade enzimática de GST em amostras de *Aedes aegypti* em diferentes tempos de quiescência em Barreiras – Bahia, Brasil.

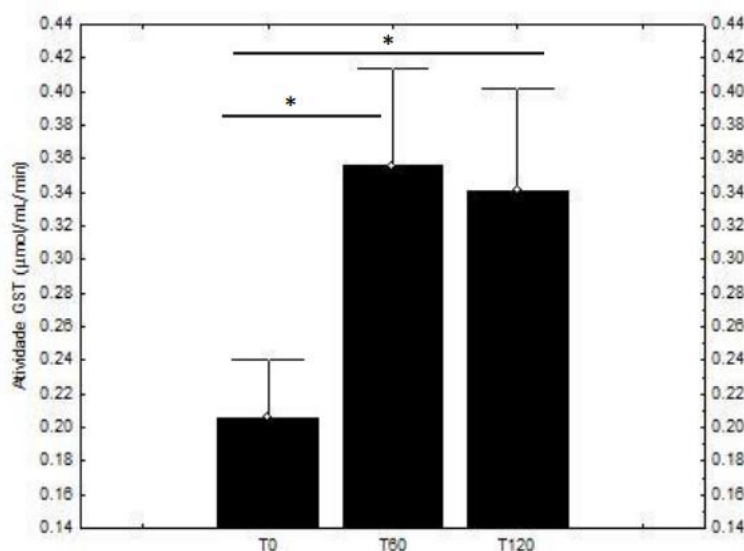
Tempo de quiescência (dias)	Atividade GST (umoles/mL/min \pm DP)	ANOVA <i>one-way</i> <i>F</i> <i>gl</i>	Valor de <i>p</i>
0	0,205698 \pm 0,0036188		
60	0,355698 \pm 0,061155	11,08 2	0,0019*
120	0,340830 \pm 0,064784		

Fonte: Autor (2022).

Nota: DP = Desvio-padrão; * valor estatisticamente significativo.

Após o teste *a posteriori* (Bonferroni), identificou-se haver diferença estatisticamente significativa entre 0 e 60 dias e entre 0 e 120 dias em quiescência, conforme descrito na Tabela 4 e Figura 7.

FIGURA 7: Atividade de GST em $\mu\text{mol/mL/min}$ nos três diferentes tempos de quiescência do ovo de *Ae. Aegypti*.



Os asteriscos indicam que houve diferença estatisticamente significante entre os tempos (T0 vs T60 e T0 vs T120).

Tabela 4 – Comparação das atividades enzimáticas da GST entre grupos amostrais de *Aedes aegypti* de Barreiras – Bahia, Brasil, em diferentes tempos de quiescência, por meio do Teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

Comparação entre tempos de quiescência	Valor de p
0 dias vs. 60 dias	0,0032*
60 dias vs. 120 dias	1,0
0 dias vs. 120 dias	0,007*

Fonte: Autor (2022).

As GSTs pertencem a uma superfamília multigênica de enzimas que catalisam a adição nucleofílica do tiol da GSH (glutathiona reduzida) em uma variedade de eletrófilos. Apresenta também atividade GPx selênio-independente (GPx: glutathiona

peroxidase) tendo como alvo hidroperóxidos orgânicos (JOANISSE; STOREY, 1996; VENANCIO et al., 2013). Houve um aumento na atividade de GST nos tempos de quiescência de 60 e 120 dias em relação ao tempo zero, indicando proteção não somente contra eletrófilos, que tendem a ser tóxicos para células, mas também contra oxidantes (WILLMORE; STOREY, 2005) durante os maiores períodos em quiescência.

De acordo com Moreira e colaboradores (2015), há três critérios para poder avaliar e classificar os diferentes perfis de POS. O aumento da atividade de GST, com valores estatisticamente significantes, se enquadra como uma situação de regulação positiva, compatível com o primeiro critério de inclusão da teoria POS. Sobre o segundo critério, ele determina como parâmetro o aumento de mais de 50% da atividade enzimática. Em *Ae. aegypti*, a atividade de GST apresentou aumento de cerca de 73% entre os tempos 0 e 60 dias. Por fim, o terceiro critério avalia a presença de mais de um caso de regulação positiva de agentes antioxidantes na mesma amostra: o presente estudo avaliou as enzimas GST e G6PD, com ambos apresentando aumento das atividades em algum dos tempos avaliados. Dessa forma, as atividades avaliadas no *Ae. aegypti* se enquadram na classificação de POS-positiva.

Pesquisas com outros animais em situação de hipometabolismo foram descritos na literatura, como no caso da exposição de *Mussels perna* à condição de hipóxia funcional, e o resultado obtido foi de aumento da atividade de GST em cerca de 50% nesse animal. Além disso, estudos em cnidários, *Veretillum cynomorium*, também apresentaram aumento na atividade de GST durante a situação de estresse metabólico, porém, ao interromper a condição estressora, que no caso dos cnidários era a exposição ao ar os níveis da enzima avaliada voltaram à normalidade (HERMES-LIMA et al, 2015).

Estudos com *Chlosyne lacinia*, redigidos por Moreira et al. (2021), apontam números interessantes sobre a atividade de GST. A atividade enzimática aumentou agudamente durante as primeiras 24 horas de diapausa, quando comparado ao grupo controle. Contudo, essa atividade diminuiu consideravelmente conforme o tempo de diapausa aumentava, caindo pela metade com o tempo de 120 dias e, após o período de diapausa, retornou a níveis semelhantes aos de antes do estado hipometabólico. De acordo com os autores, a GST e a isocitrato desidrogenase (IDH) foram as

enzimas cujas atividades tiveram aumentos mais acentuados, e se destacaram como proteínas associadas a diapausa. Ainda de acordo com os autores, mesmo que a GST tenha importante função na atividade antioxidante, não se pode desconsiderar o seu papel também em outros sistemas, como na ligação, metabolismo e transporte relacionado a hormônios, conforme foi demonstrado nos estudos com *Galleria mellonella*, por Tarhan et al. (2013).

No caso do *Ae. aegypti*, percebe-se que os tempos de 60 e 120 dias tiveram aumentos estatisticamente significativos em relação ao tempo de zero dias de quiescência, sugerindo uma progressão semelhante à da borboleta *Chlosyne lacinia*, ou seja, a atividade de GST aumenta bruscamente, tendo, assim, modulação semelhante à da borboleta. Além disso, a taxa de eclosão de ovos de *Ae. aegypti* não mostrou alterações entre os períodos de 0 a 120 dias, contudo, a partir de 150 dias de quiescência há uma diminuição brusca nessa taxa, chegando a quase zero.

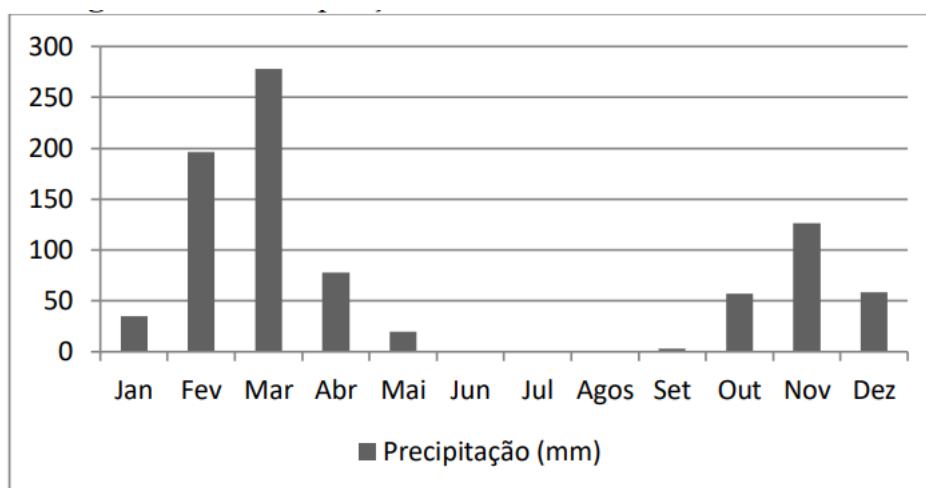
7.3 QUIESCÊNCIA E PLUVIOSIDADE

Uma hipótese a ser levantada acerca da atividade das enzimas G6PD e GST durante os diferentes tempos de quiescência é baseada na adaptação desta espécie ao período de estiagem na região de Barreiras-BA, período caracterizado por umidade baixa e pluviosidade praticamente ausente. Esta informação baseia-se na análise de dados meteorológicos do ano de 2019 dessa região, haja vista que foi o único que constava com os dados mensais completos desde 2018 até 2021, além de informações já descritas na literatura para a espécie e região.

Ao analisar os dados, foi percebido que a estiagem na região tem duração aproximada de 4 meses, permanecendo, dessa forma, boa parte do inverno na região de Barreiras-BA (meses de junho até setembro) (Figura 8). Arcanjo e colaboradores (2020) fizeram uma avaliação acerca da morfometria geométrica alar de uma população de mosquitos no município de Barreiras-BA. Nesse trabalho, os autores traçaram o perfil de estações de chuva e seca bem definidas na região, sendo o período de estiagem com 4 meses de duração. Esse período é marcado pelos baixos níveis de infestação do *Ae. aegypti*, o que sugere que durante esse período os embriões do mosquito entrem em estado hipometabólico (quiescência), até que seja

retomada a fase chuvosa no município. A partir dos dados de atividade de enzimas antioxidantes analisadas, pode-se inferir que esse período de cerca de 120 dias seja realizada a modulação das enzimas antioxidantes para controle de possível dano oxidativo enfrentado pelo embrião em quiescência. Lima e colaboradores (2021) avaliaram a eclosão de ovos de *Ae. aegypti* com 150 e 180 dias em quiescência coletados em Barreiras - BA e não registraram a eclosão desses ovos, indicando impacto possivelmente gerado pelo estresse oxidativo, levando à danos celulares irreversíveis e morte do embrião. Tal fato indica relação entre resistência e adaptação da espécie em termos metabólicos ao tempo de estiagem enfrentado na região. A seguir, a Figura 8 apresenta a pluvialidade no ano de 2019 no município de Barreiras-BA.

FIGURA 8: Precipitação no ano de 2019 em Barreiras-BA



Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia, Ministério da Agricultura.

Outros estudos analisaram essa relação entre quantidade de dias de quiescência e a taxa de eclosão dos ovos. Oliva (2018) analisou os dados em dois municípios, Recife-PE e Aracaju-SE, apresentando um período de quiescência com boa viabilidade na eclosão de 130 e 100 dias, respectivamente. A variação na quantidade de dias pode ter envolvimento com a pluviosidade em cada um dos municípios (OLIVA, 2018). Dessa forma, como a capital sergipense tem um índice pluviométrico maior, com mais chuvas e maiores médias anuais os ovos de *Ae. aegypti* resistem

menos dias em quiescência, uma vez que períodos muito mais longos não são exigidos. A partir da teoria da seleção natural, entende-se que os grupos selecionados em cada região eram os mais aptos a sobreviver em cada localidade, o que contribui para a variação dos períodos.

8 CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho a avaliar os níveis de atividade enzimática de GST e G6PD em diferentes tempos de quiescência no *Ae. aegypti*. A partir dos dados obtidos e da análise feita, pode-se concluir que:

- a atividade enzimática de G6PD no mosquito adulto após diferentes tempos de quiescência aumentou significativamente após 60 dias em quiescência, com diminuição da atividade à níveis semelhantes ao tempo zero em quiescência no t120. Esta ocorrência sugere que a diminuição do estado reduzido da célula pode ser um indicativo adaptativo ao retorno do embrião ao estado ativo do metabolismo, dentro do período de estiagem, preparando o animal para o retorno da pluviosidade e do oxigênio.
- a atividade enzimática de GST apresentou aumento da atividade da enzima entre o t0 e t60, não alterando a partir deste tempo até 120 dias. Isto sugere que os níveis de GST aumentam, mantendo-se aumentada até o final do período, protegendo o embrião do ataque eletrofílico e de hidroperóxidos, até o retorno do metabolismo.
- a partir das análises deste estudo, é possível sugerir que *Ae. aegypti* enquadra-se como uma espécie positiva para teoria do preparo para o estresse oxidativo, haja vista que se enquadrou nos três critérios propostos por Moreira em 2016.

Assim, percebe-se que nos diferentes tempos de quiescência houve modulação nas atividades enzimáticas para que os mosquitos *Ae. aegypti* sobrevivam ao estresse oxidativo devido à reoxigenação devido ao fim do estado hipometabólico.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIOLE, S. D. G. Avaliação da atividade inseticida dos óleos essenciais das plantas Amazônicas Annonaceae, Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como alternativa de controle as larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). Dissertação. Mestrado em Biologia Humana e Ambiente.FCUL, p.86, 2009.

AMARASINGHE, L. D. et al. Comparative study on larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles and *Annona glabra* (Annonaceae) aqueous extract to control *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. e04322, 2020.

ARCANJO, D. B. M. C et al. Geometric morphometrics of *Aedes aegypti* populations and study of transmission of arboviral diseases in Barreiras, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 64, 2020.

BARROSO, I. L. D. et al. Um estudo sobre a prevalência da dengue no Brasil: Análise da literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 61878-61883, 2020.

BERG, JM et al. **Bioquímica 5º ed.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.

BESERRA, E. B. et al. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 99, p. 281-285, 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.** – Brasília : Ministério da Saúde, 2009. 160 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

CAMPBELL, G. L. et al. West Nile virus. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 9, p. 519-529, 2002.

CANDIDO, L. P. et al. Bioatividade de extratos vegetais sobre os diferentes estágios do ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L. 1762). 2011.

CONSOLI, R. A. G. B. J OLIVEIRA, R. L. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil.** Editora Fiocruz ,Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

DA SILVA, R. M. et al. Hypometabolic strategy and glucose metabolism maintenance of *Aedes aegypti* egg desiccation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 227, p. 56-63, 2019.

DE FREITAS, D. R. J.; VAZ JUNIOR, I. S.; MASUDA, A. Expressão e atividade enzimática de glutatona s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 99-104, 2008.

DINIZ, D. F. A. *et al* 2017. Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success. **Parasites and Vectors**. 10: 1–13.

FITZMAURICE, Christina *et al*. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA oncology**, v. 3, n. 4, p. 524-548, 2017.

FORATTINI, OT P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp, p.453-492, 2002.

GADELHA, D.T.A. 1985. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Rev. Bras. Mal. Trop**. 37: 29-36

HERMES-LIMA M. *et al*. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. **Free Radic Biol Med**, 25 set. 2015.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 120, n. 3, p. 437-448, 1998.

HORSTICK O.; TOZAN, Y. W. S. A. Reviewing dengue: still a neglected tropical disease? **PLoS Negl Trop Dis** 2015; 9: e0003632

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. DE Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v.21, n.5, p.1170-1179, 2008.

JOANISSE, D.R.; STOREY, K.B. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze tolerant wood frog. **American Journal of Physiology**, v.271, R545-R553, 1996.

LEANDRO, C. S. *et al*. Reduction of dengue incidence in Brazil in 2020: control or sub notification of cases due to COVID-19. **Res Soc Develop J**, v. 9, n. 11, 2020.

LIMA, L. M. *et al*. AVALIAÇÃO TRANSCRICIONAL DOS GENES DA ENZIMA ANTIOXIDANTE SUPERÓXIDO DISMUTASE NO MOSQUITO *Aedes aegypti* DURANTE O PERÍODO DE QUIESCÊNCIA. 2021. MOONOGRRAFIA (Graduação Medicina) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA, [S. l.], 2021.

LOZOVEI, A.L. 2001. Culicídeos (mosquitos), p.59-104. In C.B. Marcondes (org.), **Entomologia médica e veterinária**. 1ª ed. São Paulo, Atheneu, 432p.

MANRIQUE-SAIDE, P. *et al*. Use of insecticide-treated house screens to reduce infestations of dengue virus vectors, Mexico. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 308, 2015.

MARTINS, G. S. Efeitos da variação metabólica sazonal sobre a hematologia e sistema bioquímico antioxidante de *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae). 2018.

MENEZES, A. M. F. *et al.* Perfil epidemiológico da dengue na Bahia entre os anos de 2010 à 2019. **Brazilian Journal of Health Review**, [S. l.], p. 21494-21505, 11 set. 2021.

MOREIRA, D. C. *et al.* How widespread is preparation for oxidative stress in the animal kingdom? **Comp. Biochem. Physiol.**, p. 1-15, 2016.

MOREIRA, D. C. *et al.* Preparation for oxidative stress in *Proceratophrys cristiceps* (Anura, Odontophrynidae) naturally estivating in the Brazilian Caatinga. **Sci Total Environ**. 2020 Jun.

MOREIRA, D. C.; PAULA, D. P.; HERMES-LIMA, M. Changes in metabolism and antioxidant systems during tropical diapause in the sunflower caterpillar *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 134, p. 103581, 2021.

MUSSO, D. *et al.* Zika Virus Infection — After the Pandemic. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], 29 out. 2019. DOI DOI: 10.1056/NEJMra1808246. Disponível em: https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1808246#article_citing_articles. Acesso em: 29 jun. 2022.

NICOLIELO, D. B.; FERREIRA, R. I. P.; LEITE, A. A. Atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase em deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, p. 135-138, 2006.

OLIVA, L. O. Análise da quiescência em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e influência sobre parâmetros biológicos. 2018. PEREZ, M. H.; NORIEGA, F. G. *Aedes aegypti* pharate 1(st) instar quiescence: A case for anticipatory reproductive plasticity. **Journal of insect physiology**, v. 59, n. 3, p. 318–324, 2013.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A. *et al.* The effect of hypoxia on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed on diets supplemented with methionine and white tea. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 155, p. 506–516, 2012.

RAMNANAN, C. J.; STOREY, K. B. Glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation during hypometabolism. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 339, n. 1, p. 7-16, 2006.

SANTOS, A. S. dos. Estrutura e função: evolução da proteína Glutathione S-Transferase D1 nas espécies do cluster *Drosophila buzzatii* (grupo *Drosophila repleta*). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2018.

SILVA, H. H. da; SILVA I. G. da. 1999. The effect of the period of egg quiescence on the life cycle of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) under laboratory conditions]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 32: 349–355.

SILVA, H. H. G. da; SILVA, I. G. da. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 349-355, 1999.

SOUZA-NETO, J. A.; POWELL, J. R.; BONIZZONI, M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. **Infection, genetics and evolution**, v. 67, p. 191-209, 2019.

TARHAN, L.; KAYALI, H. A.; KARACALI, S.. The glutathione-related detoxication responses to juvenile and ecdysone hormones in *Galleria mellonella*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 158, n. 2, p. 117-121, 2013.

TAVEIRA, L.A.; FONTES, L.R.; NATAL, D. Manual de diretrizes e procedimentos no controle do *Aedes aegypti*. Ribeirão Preto: Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto, 2001.

TIAN, Y. *et al.* (2019) Human T Cell Response to Dengue Virus Infection. **Front. Immunol.** 10:2125. doi: 10.3389/fimmu.2019.02125

UNO, N. *et al.* Dengue virus and the host innate immune response. **Taylor and Francis Online**, [s. l.], 10 out. 2018. DOI <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0168-0>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1038/s41426-018-0168-0?needAccess=true>. Acesso em: 29 jun. 2022.

VENANCIO, L.P.R. *et al.* Pollution-induced metabolic responses in hypoxia-tolerant freshwater turtles, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.97, p.1-9, 2013

VINOGRADOVA, E. B. Diapause in aquatic insects, with emphasis on mosquitoes. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007.

WILLMORE, W.G; STOREY, K.B. Purification and properties of the glutathione Stransferases from the anoxia-tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*. **The FEBS Journal**, v.272, p.3602-3614, 2005.

ZARA, A. L. S. A. *et al.* Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.

ZWIETEN, R. VAN; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 377–386, 2014