

TESTE DE MICRONÚCLEO E ESTERASES COMO BIOMARCADORES DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DA CIPERMETRINA

JOÃO FELIPE MOREIRA NETO¹; CYNTHIA ANDRADE ARANTES¹; WARWICK ESTEVAM KERR²

Recentemente há uma tendência de substituição do uso dos inseticidas organofosforados e organoclorados pelos inseticidas piretróides por apresentarem uma baixa toxicidade aos mamíferos. Ao atingir os ambientes aquáticos, os piretróides atingem os peixes, predadores naturais das larvas de *Aedes aegypti*, que são particularmente sensíveis a esse tipo de composto. Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de tratamentos de curta (96 h) e longa (28 dias) duração com o inseticida piretróide Cipermetrina em peixes da espécie *Poecilia vivipara*, por meio do Teste de Micronúcleo e da análise de esterases. Os resultados obtidos pelo Teste de Micronúcleo revelaram não haver diferenças entre as taxas de micronúcleos dos grupos controle e tratados tanto nos tratamentos de curta, quanto nos de longa duração (curta duração, $F= 0.8756$, $P= 0,53$; longa duração, $F= 0.6718$, $P= 0.69$). A análise da atividade esterásica no gel de poliacrilamida revelou as bandas EST-1 e EST-2 que foram detectadas em todos os tempos de exposição, tanto no tratamento de curta quanto no de longa duração. Os valores de densidade óptica de EST-2 (classificada como uma carboxilesterase) nos grupos tratados sofreram um incremento significativo em relação aos grupos controle durante os tratamentos de curta e longa duração, apresentando maior índice após 21 dias de exposição ($F= 342,4690$; $P < 0,001$). Os resultados do Teste de Micronúcleo revelaram que a Cipermetrina não apresenta efeito clastogênico nas condições utilizadas no experimento. O incremento na atividade da EST-2, ao longo dos tratamentos pode ser explicado pela propriedade detoxificativa das carboxilesterases.

Palavras chave: Cipermetrina – Biomonitoramento – Carboxilesterase – Micronúcleo.

¹Bolsista Iniciação Científica FAPEMIG/UFU - Instituto de Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia, Bloco 2E sala 33, Uberlândia, CEP: 38400-020. email: joaofelipeneto@yahoo.com.br

²Orientador Iniciação Científica FAPEMIG/UFU - Instituto de Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia, Bloco 2E sala 33, Uberlândia, CEP: 38400-

Micronucleus Test and Esterase Pattern as Biomarkers of Cypermethrin Effects

Recently there is a tendency to substitute the use of organophosphorus and organochloride insecticides for pyrethroid insecticides for exhibit low toxicity to mammals. When achieve the aquatic environments, the pyrethroids achieve the fishes, natural predators of *Aedes aegypti* larva, which are particularly sensitive to this kind of compound. This work had the objective to evaluate the effects of short (96 h) and long (28 days) duration treatments with the pyrethroid insecticide Cypermethrin in fishes of *Poecilia vivipara*, using the Micronucleus Test and the esterase analysis. The obtained results by the Micronucleus Test showed that there aren't any differences between the micronucleus rates of Control (not exposed to Cypermethrin) and Treated (exposed to Cypermethrin) groups even in short as long duration treatments (short duration $F= 0.8756$, $P= 0.53$; long duration $F= 0.6718$, $P= 0.69$). The analysis of esterasic activity at polyacrylamide gel revealed the bands EST-1 and EST-2 that were detected in all times of exposition, even in short duration treatment as in the long duration one. The values of optic density of EST-2 (classified as a carboxylesterase) in the treated groups suffered a significant increase in relation to the control groups during the short and long duration treatments, exhibiting a higher index after 21 days of exposition ($F= 342.4690$; $P < 0.001$). The results of Micronucleus Test revealed that Cypermethrin seems not present the clastogenic effect at the conditions utilized in the experiment. The increasing in the EST-2 activity during the treatments can be explained by the detoxification property of carboxylesterases.

Key words: Cypermethrin – biomonitoring – carboxylesterases – micronucleus.

INTRODUÇÃO:

A dengue, uma das principais doenças transmitidas por vírus, é um problema gravíssimo especialmente em países tropicais como o Brasil, onde o clima e os hábitos urbanos oferecem condições ótimas para o desenvolvimento e proliferação de seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti* descrito por Linnaeus em 1762 (Forattini, 1999).

Em programas públicos de controle do vetor, têm sido utilizados inseticidas como organofosforados e piretróides. O piretróide cipermetrina, empregado no controle de insetos adultos, possui atividade neurotóxica e atua no sistema nervoso provocando hiperestimulação dos impulsos devido o fato de bloquear o movimento iônico de sódio através da membrana dos neurônios (De Lorenzo et al., 2006).

A freqüente exposição das populações de *Aedes* aos inseticidas promove uma intensa pressão seletiva que favorece o aumento do número de insetos resistentes, comprometendo o controle e favorecendo a transmissão da dengue (Marcoris et al., 1999, Campos & Andrade 2001, Karunaratne & Hemingway 2001, Lima et al. 2003).

Entretanto, ao atingir os ambientes aquáticos, os inseticidas afetam os organismos alvo e não alvo, alterando a

estrutura dos ecossistemas e afetando, inclusive, os peixes que são predadores naturais das larvas de *Aedes aegypti* (Titenko-Holand et al., 1997, Das & John 1999, Çakir & Sarikaya 2005, Piña-Guzmán et al., 2006).

Estudos que envolvem marcadores para contaminação individual, populacional e do ambiente como ensaio de esterases e teste de micronúcleo são relevantes por fornecer parâmetros que possibilitam avaliar e prever os efeitos da propagação de inseticidas em sistemas biológicos, mostrando os possíveis impactos em diversas populações, alcançando uma ampla visão do impacto ambiental causado pelo uso exacerbado de inseticidas (Duquesne 2006).

Esterases compreendem um grupo de enzimas que participam da hidrólise de ésteres, peptídeos, amidas e haletos. São classificadas em acetilcolinesterases, quando inibidas pelo malation e sulfato de eserina; em carboxilesterases quando inibidas apenas pelo malation; arilesterases são as inibidas apenas por Sulfato de Cobre e acetilesterases não sofrem ação de inibidores (OAKESHOTT et al., 1993). Essas enzimas ocorrem em grande número de formas, codificadas por *loci* gênicos distintos e têm sido caracterizadas e purificadas em vários organismos, incluindo insetos. Estão envolvidas em atividades fisiológicas importantes,

incluindo o metabolismo de agroquímicos (WHEELLOCK et al., 2005).

Os testes de micronúcleos celulares vêm sendo usados com frequência na análise e biomonitoramento de recursos hídricos, empregando peixes como indicadores ambientais para avaliar a qualidade de recursos hídricos e os efeitos da poluição sobre esses organismos (BUCKER et al., 2006).

Por meio da execução deste trabalho foram monitorados os efeitos do piretróide cipermetrina em peixes da espécie *Poecilia vivipara*, demonstrando a provável necessidade da implementação de novas estratégias de controle do mosquito *Aedes aegypti* que sejam menos degradantes ao ambiente.

MATERIAL E MÉTODOS:

Material Biológico

Os peixes (*Poecilia vivipara*), popularmente conhecidos como “guppies”, utilizados neste trabalho foram mantidos em reservatório artificial na Universidade Federal de Uberlândia. Para os testes de micronúcleo e de inibição da atividade esterásica, foram selecionados peixes de mesma idade (aproximadamente 60 dias), sexo, dieta, tamanho e peso. Os peixes destinados à análise de esterases foram decapitados e suas cabeças foram

preservadas à temperatura de -80°C até o momento da análise.

Químicos

Amostras do inseticida piretróide cipermetrina (Cynoff[®], Cianamida, Brasil) foram doadas pelo Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia.

Os inibidores sulfato de cobre 1 mM, malation 0,4 mM e sulfato de eserina 1 mM e os substratos α e β naftil-acetatos foram utilizados para caracterização e identificação das esterases.

Exposição Dose –Tempo

Para aclimatização, os peixes foram mantidos nos aquários por sete dias antes do tratamento, sob temperatura ambiente e pH 7,4. Após aclimatização, os experimentos foram realizados com tratamentos de curta (96 h) e longa duração (28 dias). Os peixes foram submetidos à concentração de 0.012 mg/L de Cipermetrina para ambos os tratamentos (curta e longa duração) de acordo com recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1992). Grupos controle (pareados) foram observados concomitantemente aos tratados. O meio foi renovado a cada 24 h após o início do experimento. Os peixes foram alimentados 24 h antes e a cada 24 h após o início do experimento. Para o tratamento de curta

duração, os tempos de exposição foram de 24, 48, 72 e 96 horas, enquanto que no tratamento de longa duração os peixes foram coletados com 7, 14, 21 e 28 dias de exposição.

Atividade esterásica em gel de poliacrilamida

A cabeça dos peixes tratados com Cipermetrina e dos não tratados (Controle) foram maceradas em nitrogênio líquido e 400 μ L de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,5), contendo glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001%, sacarose 20%, EDTA 0,001 M e Triton X-100 0,5%. O sobrenadante obtido de centrifugação (4° C, 15.000 G, 15 min) foi removido e usado na análise das esterases. O conteúdo protéico das amostras foi determinado, em triplicata, pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando soroalbumina bovina como padrão e realizando leitura a 595 nm em espectrofotômetro (*Ultrospec 1100 pro* – Amersham Biosciences). Foram aplicados 10 μ g de cada amostra no gel de poliacrilamida 12%. A eletroforese foi realizada em quatro horas à 4° C, com voltagem constante de 100V e solução 0,1 M de tris-glicina (pH 8,3) como tampão de corrida. Após a realização da eletroforese, a atividade foi detectada pela incubação do gel por 60 min no escuro à 37° C em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,5),

contendo 3,2 mM de α e β naftil-acetatos e 2,4 mM de Fast Blue BB.

Caracterização das esterases

Para caracterização das esterases encontradas no gel de poliacrilamida, foram utilizados os inibidores sulfato de cobre 1 mM, malation 0,4 mM e sulfato de eserina 1 mM e os substratos α e β naftil-acetatos. Para cada inibidor, soluções estoque foram preparadas em água ultrapura ou etanol, conforme apropriado. De cada inibidor, 5 μ L de cada solução estoque foi incubada com 495 μ L do extrato enzimático por 30 min à 25 °C, antes da adição dos substratos. Foram feitos controles com água ultrapura e etanol (Oakeshott et al. 1993).

Teste de Micronúcleo

O sangue dos peixes foi coletado por punção caudal, utilizando seringa heparinizada com capacidade para 1 mL e agulha de parede fina (Udroiu 2006). Cada amostra foi imediatamente submetida à técnica de esfregaço em lâmina de vidro para microscopia de luz. O esfregaço foi fixado em metanol puro por 15 min, seguido de coloração com giemsa 10% solubilizado em tampão Sorensen (Na_2HPO_4 0,06 M; KH_2PO_4 0,06 M, pH 6,8) por 10 min. Foram analisados 2000 eritrócitos por indivíduo quanto à

freqüência de micronúcleos (MN). A freqüência foi expressa em número de micronúcleos por mil eritrócitos analisados, em cada amostra. Foram aceitos como micronúcleos os fragmentos circulares que equivaleram à cerca de 1/3 do núcleo principal e que apresentaram mesma coloração, intensidade e estiveram desconectados deste.

Análise estatística

A freqüência de micronúcleos e os valores de densidade óptica absoluta das bandas de esterase encontradas em todos os tempos de tratamento foram comparados estatisticamente com o controle pela análise de variância (ANOVA) e, entre si, por comparação múltipla das médias por meio do Teste de Tukey (Zar 1999).

RESULTADOS:

Teste de Micronúcleo

Verificando-se a freqüência de micronúcleos, como apresentado nas figuras 1 e 2, nos diferentes tipos de tratamento (tratamento de curta e longa duração), constatou-se pela Análise de Variância com um critério de classificação que as taxas de MN não tiveram diferenças estatísticas significantes entre os grupos controle (sem tratamento com Cipermetrina) e tratado (expostos à

Cipermetrina) com o aumento dos tempos de exposição.

Atividade Esterásica em gel de poliacrilamida

A análise da atividade esterásica no gel de poliacrilamida revelou duas bandas chamadas de EST-1 e EST-2 que foram detectadas em todos os tempos de exposição, tanto no tratamento de curta quanto no de longa duração. Os valores de densidade óptica das bandas EST-1 e EST-2 foram determinados pelo programa ImageMaster (Pharmacia Biossystem). As medidas das densidades ópticas de cada banda foram comparadas entre todos os grupos (tratados e controles) nos diferentes períodos de exposição dos animais à Cipermetrina. Após a exposição de curta duração à Cipermetrina, a densidade óptica de EST-1 não apresentou diferenças significativas entre os controles, entretanto, houve diferença entre controles e tratados para todo o período de exposição. Dentre os tratados, houve um decréscimo significativo da atividade de EST-1, sendo que o menor valor de densidade óptica foi avaliado com 96 horas de exposição (Figura 3). Esta resposta persistiu durante o tratamento de longa duração (Figura 4). A densidade óptica de EST-2 também não diferiu significativamente entre os controles, porém houve diferença entre controle e tratado em todos os tempos de

exposição, de modo que, durante o tratamento de curta duração os índices de densidade óptica dos grupos tratados foram sempre menores do que os dos grupos controle. Durante o tratamento de curta duração foi verificado em 24 horas de exposição à Cipermetrina o menor índice de densidade óptica, porém os índices de densidade óptica sofreram um incremento significativo ao longo de todo o tratamento de curta duração (Figura 5), persistindo durante o tratamento de longa duração (Figura 6).

Caracterização bioquímica das esterases

O padrão de bandas não apresentou diferenças entre os diferentes substratos. A caracterização bioquímica por meio dos inibidores indicou que as enzimas EST-1 e EST-2 são classificadas como carboxilesterases por terem sido inibidas apenas pelo malation.

Figura I. Avaliação da Frequência Média de Micronúcleos durante o tratamento de curta duração. (ANOVA, $F= 0.8756$, $P= 0,53$).

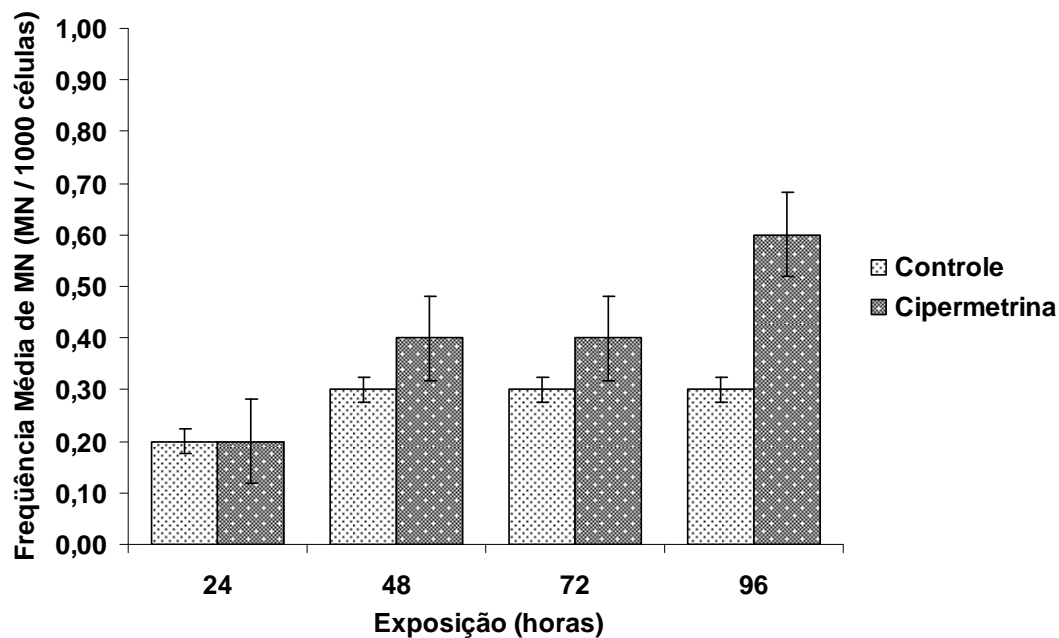


Figura II. Avaliação da Frequência Média de Micronúcleos durante o tratamento de longa duração. (ANOVA, $F= 0.6718$, $P= 0.69$)

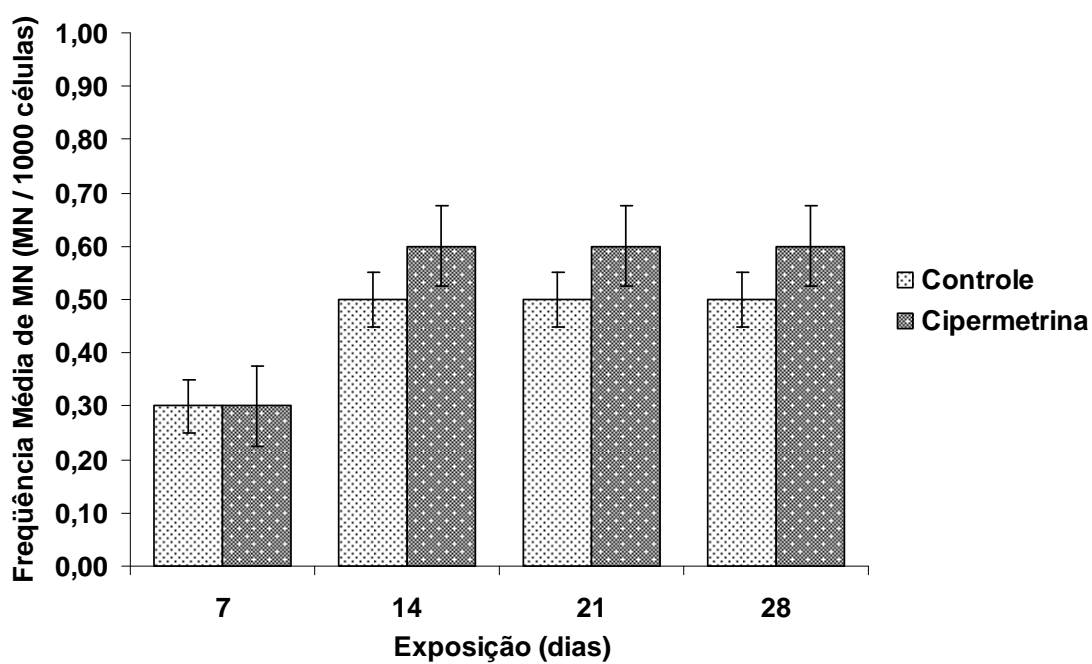


Figura III. Variação na Densidade Óptica Absoluta (pixels) da EST-1 durante o tratamento de curta duração. Médias indicadas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si (ANOVA, Teste de Tukey: $F= 31,8435$; $P < 0,001$).

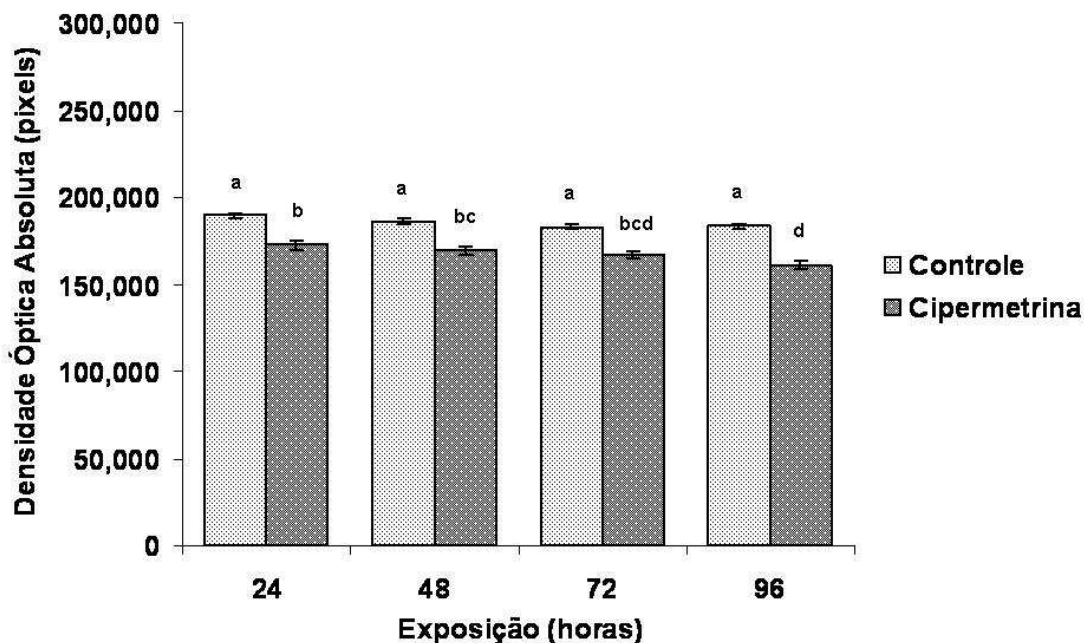


Figura IV. Variação na Densidade Óptica Absoluta (pixels) da EST-1 durante o tratamento de longa duração. Médias indicadas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si (ANOVA, Teste de Tukey: $F= 85,8021$; $P < 0,001$).

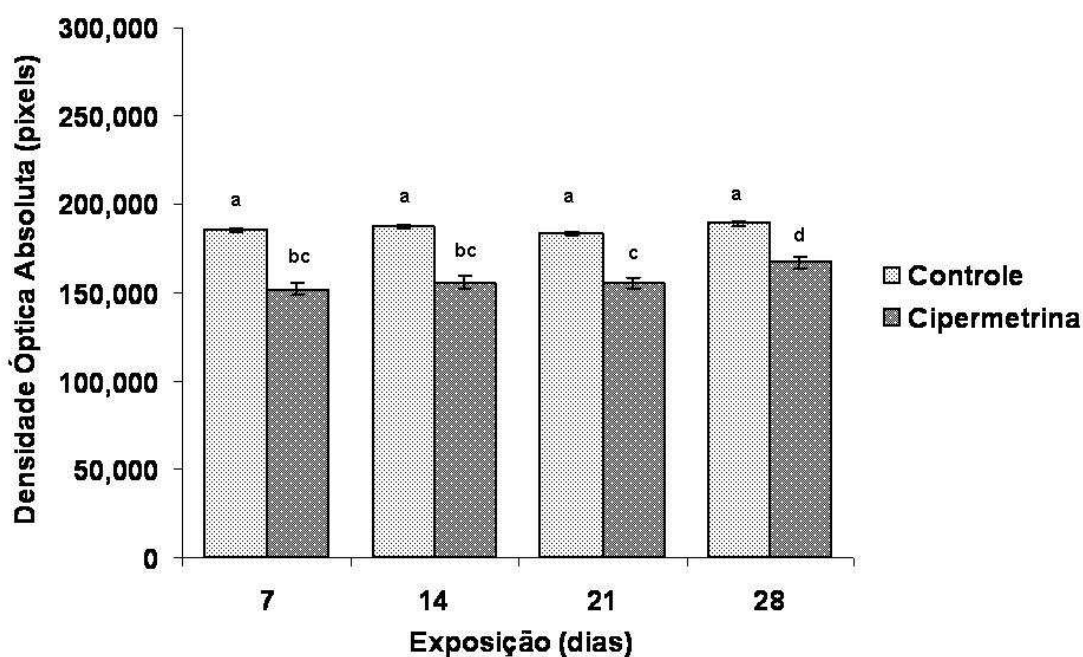


Figura V. Variação na Densidade Óptica Absoluta (pixels) da EST-2 durante o tratamento de curta duração. Médias indicadas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si (ANOVA, Teste de Tukey: $F= 1151.2933$; $P < 0.001$).

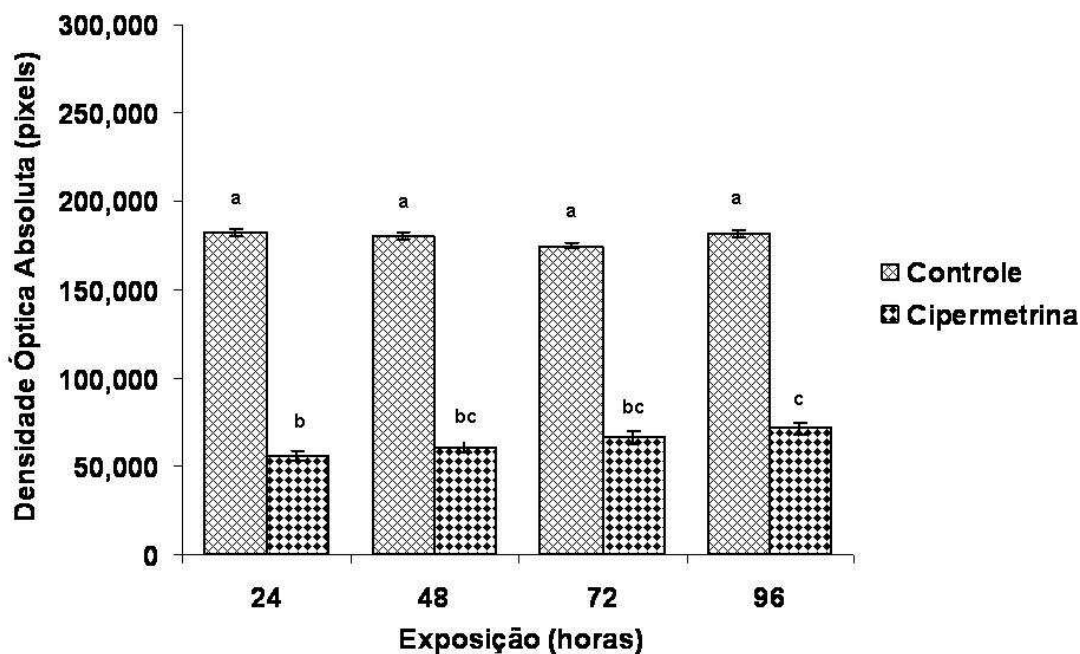
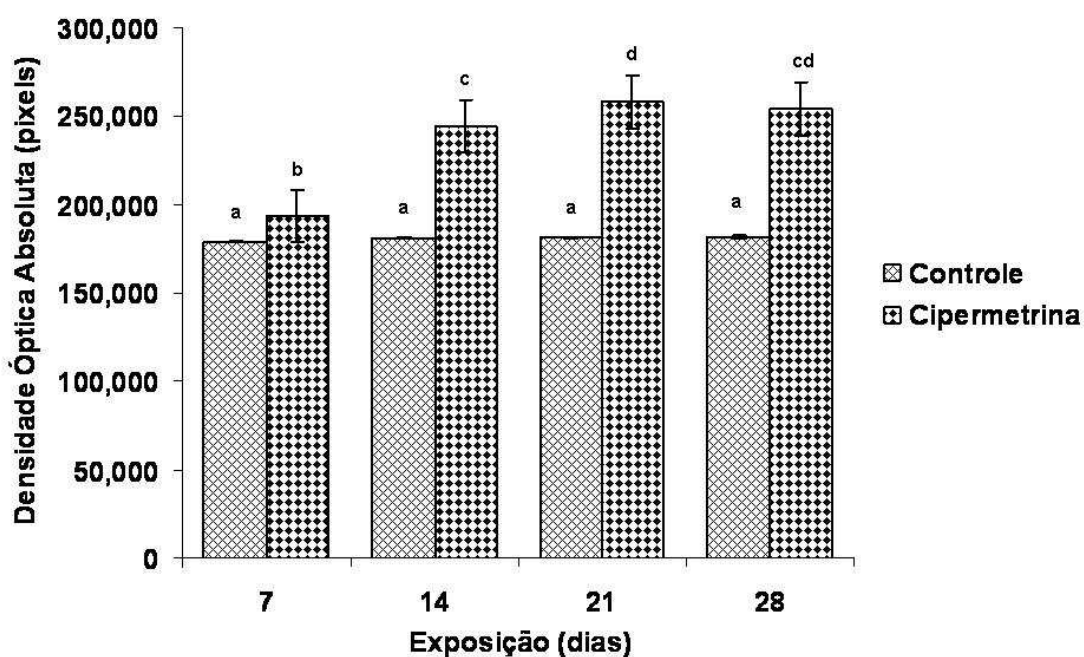


Figura VI. Variação na Densidade Óptica Absoluta (pixels) da EST-2 durante o tratamento de longa duração (7, 14, 21, 28 dias) para os grupos Controle e Cipermetrina. Médias indicadas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si (ANOVA, Teste de Tukey: $F= 342,4690$; $P < 0,001$).



DISCUSSÃO:

Há uma tendência recente de substituição do uso dos inseticidas organofosforados e organoclorados pelos inseticidas piretróides (Casida & Quistad, 1998). As implicações ecológicas deste deslocamento em grande escala na aplicação do inseticida se devem ao fato dos piretróides apresentarem baixa toxicidade aos mamíferos (Abernathy & Casida, 1973; Casida et al., 1983) quando comparados aos organofosforados. Entretanto, diversos relatórios a respeito da sensibilidade de espécies de invertebrados aquáticos e de alguns peixes aos piretróides (Bradbury et al 1989, Werner et al. 2002, Denton et al. 2003).

Os piretróides são prontamente metabolizados na maioria dos animais, exceto nos peixes. Devido sua alta lipofilicidade, os piretróides penetram facilmente o corpo dos peixes, através das brânquias. Adicionalmente, algumas espécies de peixes são muito sensíveis à toxicidade dos piretróides devido à metabolização lenta destes compostos (Denton et al. 2003). Recentes estudos sugeriram que os peixes metabolizam os piretróides em taxas muito mais lentas que os mamíferos, todavia o metabolismo desses compostos sempre esteve ativo nesses animais. Estes trabalhos examinaram o citocromo P450 (Stegeman

& Lech 1991, Goksoyr 1995, Whyte et al., 2000) e a atividade da glutathione-transferase - GST (Parker et al. 1993, Bello et al. 2001). Entretanto, existe pouca informação sobre a ação das carboxilesterases, principalmente em peixes (Satoh & Hosokawa; 1998; Sogorb & Vilanova 2002, Stok et al. 2004, Wheelock et al. 2005).

O desenvolvimento de biomarcadores baseados no estudo de respostas biológicas de organismos a poluentes pode ser uma ferramenta bioquímica essencial para a implementação de programas de monitoramento ambiental. (Fulton & Key 2001). O Teste de Micronúcleo é utilizado para detectar quebras nos cromossomos durante a anáfase e importante por fornecer informações sobre os efeitos clastogênicos causados por poluentes (Grisolia & Starling 2001). Os resultados do Teste de Micronúcleo mostrados nas figuras I e II revelaram que a Cipermetrina não apresentou efeitos clastogênicos sobre os cromossomos, não formando assim micronúcleos durante a mitose advindos de danos causados no DNA durante os tempos e condições utilizadas no experimento.

Alguns animais têm seus corpos detoxificados da presença de inseticidas pela ação de enzimas como as carboxilesterases (Souza-Polezzi 2004). O incremento na atividade da EST-2, classificada como uma carboxilesterase, ao

longo dos tratamentos pode ser explicado por esta propriedade de detoxificação. Provavelmente, uma exposição mais prolongada ao piretróide produziria o mesmo efeito na EST-1. As carboxilesterases pertencem a uma classe de enzimas que hidrolisam as ligações éster de alguns compostos, produzindo o álcool e o ácido correspondentes como produtos da reação hidrolítica (Satoh & Hosokawa 1998, Wheelock et al. 2005). Essas enzimas são importantes no metabolismo e na desintoxicação subsequente de muitos compostos, incluindo os piretróides e os organofosforados. Carboxilesterases reduzem a toxicidade dos piretróides por hidrolisarem esses compostos a metabólitos menos tóxicos (Abernathy & Casida 1973, Wheelock et al., 2004).

Os efeitos dos inseticidas em animais não alvos vão desde alterações fisiológicas, relativamente simples, até a morte do organismo. Entretanto, as exposições a concentrações subletais de piretróides podem induzir mudanças em níveis individuais e populacionais nos organismos afetados. Individualmente, ocorrem alterações no metabolismo, especialmente provocadas por gasto extra de energia com processos de detoxificação, como a produção de carboxilesterases. As implicações na dinâmica das populações afetadas, como alterações nas taxas de

crescimento são conseqüências dos efeitos causados individualmente, mas que somados alteram a sobrevivência e reduzem a reprodutividade de toda a população afetada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abernathy CO, Casida JE 1973. Pyrethroid insecticides: esterase cleavage in relation to selective toxicity. *Science* 79: 1235-1236.

Bello SM, Franks DG, Stegeman JJ, Hahn ME 2001. Acquired resistance to Ah receptor agonists in a population of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a marine superfund site: in vivo and in vitro studies on the inducibility of xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicology Science* 60: 77-91.

Bradbury SP, Coats JR 1989. Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Rev Environ Contam Toxicology* 108: 133-177.

Bradford M 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Bucker A, Carvalho W, Alves-Gomes JA 2006. Avaliação da mutagênese e

genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 36, n. 3, p. 357-364.

Çakir S, Sarikaya R 2005. Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides in the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology* 43: 443-450.

Campos J, Andrade CFS 2001. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Revista Saúde Pública* 35: 232-236.

Casida JE, Gammon DW, Glickman AH, Lawrence LJ. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides 1983. *Annu Rev Pharmacol Toxicology* 23: 413-438.

Casida JE, Quistad GB 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu Rev Entomology* 43: 1-16.

Das P, John G 1999. Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in vivo in *Etroplus suratensis* (Bloch) following exposure to organophosphorus pesticides. *Toxicology Letters* 104: 11-116.

Denton DL, Wheelock CE, Murray S, Deanovic LA, Hammock BD, Hinton DE

2003. Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae. *Environ Toxicol Chem* 22: 336-341.

Ecotoxicology and Environmental Safety 64: 122-127.

Duquesne S 2006. Effects of an organophosphate on *Daphnia magna* at suborganismal and organismal levels: Implications for population dynamics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65: 145-150.

Forattini OP 1999. Yellow fever. *Revista de Saúde Pública* 33: 534-537.

Fulton MH, Key PB 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology Chemistry* 20: 37-45.

Goksoyr A 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol Suppl* 17: 80-95.

Grisolia CK, Satarling FLRM 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage

treatment plant discharges. *Mutation Research* 491: 39-44.

Karunaratne SHPP, Hemingway J 2001. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bull. World Health Organization* 79: 1060-1064.

Lima JB, Da Cunha MP, Da Silva RC; Galardo AR, Braga IA, Ramos RP, Valle D 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Méd Hyg* 68: 329-333.

Marcoris MLG, Andrighetti MT, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VCB 1999. Alteração de resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Saúde Pública* 33: 521-522.

Oakeshott M, Van Papeenrecht EA, Boyce TM, Healy MJ, Russel RJ 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetics* 90: 239-268.

Parker LM, Lauren DJ, Hammock BD, Winder B, Hinton DE 1993. Biochemical and histochemical properties of hepatic

tumors of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Carcinogenesis* 14: 211-217.

Piña-Guzmán B, Solís-Heredia MJ, Rojas-García AE, Urióstegui-Acosta, M, Quintanilla-Veja B 2006. Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 216: 216-224.

Titenko-Holand N, Windham P, Kolachana F, Reinisch S, Parvatham S, Osorio AM, Smith MT 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: A study of malathion-exposed workers. *Mutation Research* 388: 85-95.

Satoh T, Hosokawa M 1998. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 257-288.

Sogorb MA, Vilanova E 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters* 128: 215-228.

Sousa-Polezzi RC, Bicudo HEMC 2004. Effect of Phenobarbital on inducing insecticide tolerance and esterase changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).

Genetics and Molecular Biology 27: 275-283.

Stegeman JJ, Lech JJ 1991. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ Health Persp* 90: 101-109.

Stok J, Huang H, Jones PD, Wheelock CE, Morisseau C, Hammock BD 2004. Identification, expression and purification of a pyrethroid hydrolyzing carboxylesterase from mouse liver microsomes. *J Biol Chem* 279:29863-29869.

Udroiu I 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology* 79: 201-204.

Werner I, Deanovic LA, Hinton DE, Henderson JD, de Oliveira GH, Wilson BW, Krueger W, Wallender WW, Oliver MN, Zalom FG 2002. Toxicity of stormwater runoff after dormant spray application of diazinon and esfenvalerate (Asana) in a French prune orchard, Glenn county, California, USA. *Bull Environ Contam Toxicol* 68 :29-36.

Wheelock CE, Miller JL, Miller MG, Shan G, Gee SJ, Hammock BD 2004. Development of toxicity identification evaluation (TIE) procedures for pyrethroid detection using esterase activity. *Environ Toxicol Chem* 11: 2699-2708.

Wheelock CE, Shan G, Ottea J 2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *J Pestic Sci* 30: 75-83.

World Health Organization (WHO) 1992. Vector resistance to pesticides. *Fifteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control* 818: 61-62.

Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE 2000. Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol* 30: 347-570.

Zar J 1999. *Biostatistical analysis*. 4th ed. Upper Saddle River- NJ: Prentice-Hall.