

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
DOUTORADO EM SAÚDE PÚBLICA

Marcelo Henrique Santos Paiva

Caracterização molecular da resistência a inseticidas  
químicos em populações de *Aedes aegypti*

RECIFE

2013

MARCELO HENRIQUE SANTOS PAIVA

Caracterização molecular da resistência a inseticidas químicos em populações de *Aedes*  
*aegypti*

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães–CPqAM da Fundação  
Oswaldo Cruz-FIOCRUZ/MS para obtenção do grau de Doutor  
em Ciências.

Orientadores: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres  
Dr. Craig S. Wilding

RECIFE  
2013

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- P149c Paiva, Marcelo Henrique Santos.  
Caracterização molecular da resistência a inseticidas  
químicos em *Aedes aegypti* / Marcelo Henrique Santos  
Paiva. - Recife: s. n, 2012.  
128 p. : ilus., tab., graf.
- Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de  
Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.  
Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres.
1. *Aedes* - genética. 2. Resistência a Inseticidas. 3.  
Locos de Características Quantitativas. I. Ayres,  
Constância Flávia Junqueira. II. Título.

---

CDU 616.92

MARCELO HENRIQUE SANTOS PAIVA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS QUÍMICOS  
EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti*.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM da Fundação  
Oswaldo Cruz-FIOCRUZ/MS para obtenção do grau de Doutor  
em Ciências.

Aprovada em: 10/01/2013

---

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres (Orientadora)  
**CPqAM - FIOCRUZ**

**Banca Examinadora:**

---

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira (Titular Interno)  
**CPqAM - FIOCRUZ**

---

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Titular Interno)  
**CPqAM - FIOCRUZ**

---

Dr. Bartolomeu Acioli dos Santos (Titular Externo)  
**CPqAM - FIOCRUZ**

---

Dra. Maria Raquel Moura Coimbra (Titular Externo)  
**DEPAq - UFRPE**

Dedico este trabalho  
À minha esposa Duschinka  
Ao meu pai Pedro

## AGRADECIMENTOS

À minha eterna chefe Constância Ayres, por todos os anos de orientação e dedicação. Em todas as conquistas profissionais, há uma significativa parcela de contribuição dela.

Aos pesquisadores do Departamento de Entomologia, por inúmeras lições e aprendizado ao longo dos anos.

À Dra. Cláudia Oliveira, por ter contribuído na formação e finalização da tese;

Aos colegas estudantes, técnicos e colaboradores do Departamento de Entomologia, pela ajuda direta ou indireta no meu caminhar.

Aos companheiros do CPqAM: Amaranta, Dani Moura, Mari Marques, Gabriel, Marília, Luiz, Fábio, Christian, Fabiana e tantos outros, por todos os momentos de companheirismo e por amenizarem o estresse do dia à dia.

Aos colegas da turma de doutorado 2009-2013 do CPqAM, em especial à Andréia, Líliam, Diogo e Dani.

To David Severson, for showing me that scientific excellence comes from hard work and patience. Thanks for allowing me to be part of your Notre Dame Family.

To Diane, Paul, Akio, Becky, Joanne, Casey, Matt, Susanta, Brent, Melissa, Marilyn, Ericka, Roberta, Tony, Jeff and many others, for your friendship, guidance and companionship.

À minha família, em especial ao meu pai-herói Pedro, por me apoiar cegamente em todas as empreitadas e por estar ao meu lado em tudo.

À minha esposa Duschinka, por ser meu pilar emocional e científico, por crescermos juntos, por me aguentar e por me mostrar o quão vazio é viver longe dela.

A todos aqueles que passaram e contribuíram para minha formação acadêmico-científica.

PAIVA, Marcelo Henrique Santos. **Caracterização molecular da resistência a inseticidas químicos em *Aedes aegypti***. 2013. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

### RESUMO

A resistência a inseticidas químicos representa uma das maiores limitações em programas de controle de insetos. Dentre os diferentes mecanismos que levam o inseto à resistência, os principais são as alterações do sítio-alvo e a via metabólica. Essa última é representada por enzimas de detoxificação, como esterases, glutationas S-transferases e oxidases. Mais de 200 genes de detoxificação foram identificados em *Ae. aegypti*, o que torna complexa a identificação mutações pontuais envolvidas neste mecanismo. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar genes envolvidos na resistência a inseticidas em *Ae. aegypti*. Para o mapeamento de loci de herança quantitativa (QTL), microssatélites foram utilizados para genotipar indivíduos das gerações F<sub>0</sub> e F<sub>2</sub>, provenientes dos cruzamentos entre a linhagem resistente ao temephos RecR, e as susceptíveis Red e MoyoD. Um QTL foi mapeada no cromossomo II, respondendo a aproximadamente 97% da variação da resistência ao temephos. Diferentes genes de esterase foram identificados na região de QTL, demonstrando o envolvimento de outros genes de resistência na RecR, além daqueles identificados em trabalho prévio, com um *chip* de microarranjos. O presente trabalho estudou a região 5' UTR do gene da oxidase *CYP6N12*, identificado previamente como superexpresso na linhagem RecR. A análise da região revelou na RecR a presença de um alelo (R), com 14 pb a mais, que encontrava-se associado com a resistência ao temephos ( $f_R = 0,625$ ). Enquanto que, o mesmo alelo foi encontrado em menor frequência na RecRev ( $f_R = 0,12$ ). A presença desse alelo induziu a uma expressão do gene em 10 vezes na RecR e 4 vezes na RecRev. O sequenciamento de parte do gene da acetilcolinesterase de mosquitos da RecR e da linhagem susceptível Rockefeller, demonstrou a ausência de mutações nas duas colônias. Por fim, mutações no gene do canal de sódio foram avaliadas em populações de *Ae. aegypti* do Ceará, resistentes à cipermetrina. A mutação Ile1011Met foi encontrada em associação com a resistência em indivíduos do Crato, enquanto que o alelo mutante *1016Ile* foi detectado pela primeira vez no Crato e Juazeiro do Norte. A identificação e mapeamento dos genes de resistência a inseticidas químicos em *Ae. aegypti* poderão contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e manejo da resistência.

**Palavras-chave:** *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas químicos, Loci de Características Quantitativa.

PAIVA, Marcelo Henrique Santos. **Molecular characterization of chemical insecticide resistance in *Aedes aegypti***. 2013. Thesis (Doctorate in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

#### ABSTRACT

Resistance to chemical insecticides is one of the major limitations in insect control programs. Among different mechanisms that may lead to insect resistance, target site modifications and metabolic pathway are the main ones. The metabolic pathway is represented by detoxification enzymes, such as esterases, glutathione S-transferases and oxidases. More than 200 detoxification genes were identified in *Ae. aegypti*, which complicates the identification of point mutations involved in this mechanism. Therefore, this study aimed to identify and characterize genes involved in insecticide resistance in *Ae. aegypti*. In order to map quantitative trait loci (QTL), microsatellites were used to genotype individuals from F<sub>0</sub> and F<sub>2</sub> generations, derived from crosses between the temephos resistant strain RecR, and the susceptible Red and MoyoD. A QTL was mapped on chromosome II, responding to approximately 97% of the variation in temephos resistance. Different esterase genes in the QTL region were identified, demonstrating the involvement of other resistance genes in RecR besides those identified in previous work, with a microarray chip. The present thesis studied the 5' UTR region from the *CYP6N12* oxidase gene, previously identified as overexpressed in the RecR strain. The analysis revealed the presence of an allele (R) in the RecR, 14 bp longer, which was significant associated with resistance to temephos ( $f_R = 0.625$ ). Meanwhile, the same allele was found in the RecRev in a lower frequency ( $f_R = 0.12$ ). The presence of this allele induced a gene expression by 10 times in RecR and 4 times in RecRev. Sequencing of part of the acetylcholinesterase gene from RecR and susceptible Rockefeller mosquitoes, showed the absence of mutations in both colonies. Finally, mutations in the sodium channel were evaluated in *Ae. aegypti* from Ceará, resistant to cypermethrin. The Ile1011Met mutation was found in association with the resistance in mosquitoes from Crato, while the mutant allele *1016Ile* was first detected in Crato and Juazeiro. The identification and mapping of genes involved in resistance to chemical insecticides in *Ae. aegypti* may contribute to the development of new diagnostic methods and resistance management.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, resistance to chemical insecticides, Quantitative Trait Loci.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Nível de dominância calculado a partir da posição relativa da curva de mortalidade para os indivíduos heterozigotos em comparação à curva dos indivíduos homozigotos, em um dado nível de mortalidade. **28**
- Figura 2-** Dominância efetiva estimada através da análise da mortalidade dos indivíduos heterozigotos em comparação aos homozigotos, em uma dada concentração de inseticida. **29**
- Figura 3-** Bioensaio do tipo dose-resposta para avaliação do status de resistência a inseticidas químicos. Ensaios realizados em réplicas, contendo 20 larvas em cada copo plástico. **32**
- Figura 4-** Ensaios bioquímicos utilizados para o estudo de enzimas envolvidas no mecanismo de resistência metabólica em mosquitos. **33**
- Figura 5-** Dendograma representativo da expansão dos membros da família P450 CYP9 em *Aedes aegypti*, em comparação a membros da mesma família encontrados em *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster*. **38**
- Figura 6-** Dendograma construído com sequências de aminoácidos de GSTs encontradas em *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster*. **41**
- Figura 7-** Dendograma construído com sequências de aminoácidos de carboxilesterases encontradas em *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster*. **44**
- Figura 8-** Mapa de ligação genético, representativo dos 3 cromossomos, construído com marcadores de RFLP, SNP e SSCP em *Aedes aegypti*. **48**
- Figura 9-** Mapa do Estado de Pernambuco mostrando a origem das populações naturais de *Aedes aegypti*. **52**
- Figura 10-** Vetor repórter PGL3-Basic utilizado na quantificação da expressão de luciferase regulada pelo possível promotor da P450 CYP6N12. **62**

<b>Figura 11-</b>	Localização dos <i>primers</i> e das duas mutações estudadas no gene da acetilcolinesterase do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	<b>63</b>
<b>Figura 12-</b>	Visualização dos marcadores de microssatélites amplificados por PCR em gel de poliacrilamida 4%.	<b>67</b>
<b>Figura 13-</b>	Mapa de ligação de marcadores de microssatélites obtido na F <sub>2</sub> do cruzamento das linhagens de <i>Aedes aegypti</i> ♂RecR x ♀MoyoD.	<b>69</b>
<b>Figura 14-</b>	Mapa de ligação de marcadores de microssatélites obtido na F <sub>2</sub> do cruzamento das linhagens de <i>Aedes aegypti</i> ♂RecR x ♀Red.	<b>70</b>
<b>Figura 15-</b>	Quantificação dos valores de LOD, utilizados para a detecção de QTL, associados à resistência ao temephos, no cruzamento entre linhagens de <i>Aedes aegypti</i> ♂RecR x ♀MoyoD.	<b>72</b>
<b>Figura 16-</b>	Quantificação dos valores de LOD, utilizados para a detecção de QTL, associados à resistência ao temephos, no cruzamento entre linhagens de <i>Aedes aegypti</i> ♂RecR x ♀Red.	<b>73</b>
<b>Figura 17-</b>	Quantificação da expressão relativa de genes de esterase encontrados na região contendo QTL associado à resistência ao organofosforado temephos em <i>Aedes aegypti</i>	<b>75</b>
<b>Figura 18-</b>	Alinhamento das sequências nucleotídicas obtidas nas linhagens RecR, RecRev e Rock da região 5' UTR do gene <i>CYP6N12</i> da citocromo P450.	<b>77</b>
<b>Figura 19-</b>	Visualização em gel de agarose 2,5% de produtos de PCR alelo-específica da região 5' UTR do gene <i>CYP6N12</i> .	<b>80</b>
<b>Figura 20-</b>	Frequências genotípicas do polimorfismo da região 5' UTR do gene <i>CYP6N12</i> separadas por fenótipos em populações naturais de <i>Aedes aegypti</i> do Estado de Pernambuco.	<b>83</b>
<b>Figura 21-</b>	Relação entre as médias de expressão do gene <i>CYP6N12</i> entre os diferentes genótipos encontrados nas linhagens RecR e RecRev.	<b>86</b>
<b>Figura 22-</b>	Atividade do gene repórter induzida por sequências do gene	

- CYP6N12* obtidas em indivíduos das linhagens RecR, RecRev e Rock. **87**
- Figura 23-** Alinhamento das sequências nucleotídicas obtidas por amplificação do fragmento do gene da AChE em *Ae. aegypti* resistentes (RecR) e susceptíveis (Rock) ao inseticida temephos. **89**
- Figura 24-** Frequências genotípicas dos códons *kdr* 1011 e 1016 encontrados em *Aedes aegypti* susceptíveis e resistentes ao piretróide cipermetrina do estado do Ceará. **92**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Distribuição do número de indivíduos obtidos por cruzamentos recíprocos entre as linhagens Recife-Resistente (RecR) e Rockefeller (Rock).	<b>65</b>
<b>Tabela 2-</b>	Doses letais do temephos para matar 50% (CL <sub>50</sub> ) e 99% (CL <sub>99</sub> ) das populações de <i>Aedes aegypti</i> Moyo-in-Dry e Red-Eye, obtidas por bioensaio dose-diagnóstica.	<b>66</b>
<b>Tabela 3-</b>	Resultados de segregação e testes de $\chi^2$ de marcadores de microssatélites genotipados na F2 dos cruzamentos entre RecR X MoyoD e RecR X Red.	<b>68</b>
<b>Tabela 4-</b>	Mutações encontradas em três genes de carboxilesterases sequenciados em indivíduos da F0 e F2 provenientes do cruzamento RecR X Red.	<b>74</b>
<b>Tabela 5-</b>	Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo na região 5' UTR do gene <i>CYP6N12</i> em amostras susceptíveis e resistentes de <i>Aedes aegypti</i> de laboratório.	<b>81</b>
<b>Tabela 6-</b>	Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo na região 5' UTR do gene <i>CYP6N12</i> em amostras susceptíveis e resistentes à cipermetrina de <i>Aedes aegypti</i> do Estado de Pernambuco.	<b>81</b>
<b>Tabela 7-</b>	Relação entre as frequências alélicas e a expressão do gene <i>CYP6N12</i> em amostras de <i>Aedes aegypti</i> das linhagens RecR e RecRev.	<b>85</b>
<b>Tabela 8-</b>	Relação entre o genótipo e a expressão do gene <i>CYP6N12</i> em amostras de <i>Aedes aegypti</i> das linhagens RecR e RecRev.	<b>85</b>
<b>Tabela 9-</b>	Frequências genotípicas e alélicas para as mutações <i>kdr</i> 1011 em amostras susceptíveis e resistentes de <i>Aedes aegypti</i> do Ceará.	<b>93</b>
<b>Tabela 10-</b>	Frequências genotípicas e alélicas para as mutações <i>kdr</i> 1016 em amostras susceptíveis e resistentes de <i>Aedes aegypti</i> do Ceará.	<b>93</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABI</b>	Applied Biosystems
<b>A.C.</b>	Antes de Cristo
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>AIL</b>	<i>Advanced Intercrossed Line</i> – Linhagem Intercruzada Avançada
<b>PNCD</b>	Programa Nacional de Controle da Dengue
<b>MoReNaAa</b>	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de <i>Ae. aegypti</i> a Inseticidas
<b>Bti</b>	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
<b>CCE</b>	<i>Carboxylesterase</i> - carboxilesterase
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CL</b>	Concentração letal
<b>cM</b>	Centimorgans
<b>CT</b>	<i>Threshold cycle</i> – Limiar de detecção no ciclo
<b>CPqAM</b>	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
<b>Cyp</b>	<i>Cytochrome P450</i> – citocromo P450
<b>DDT</b>	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> – Ensaio imunoenzimático
<b>EM</b>	<i>Expected-Maximization</i> – Maximização do valor esperado
<b>est</b>	Esterase
<b>F</b>	Geração filial
<b>Fw</b>	<i>Forward</i>
<b>FUNASA</b>	Fundação Nacional de Saúde
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GSTs</b>	Glutathione S-transferases
<b>HMM</b>	<i>Hidden Markov Model</i> – Modelo Oculto de Markov
<b>Kb</b>	<i>Kilobase</i> - quilobase
<b>kdr</b>	<i>Knockdown resistance</i> – resistência do tipo nocaute
<b>L3/L4</b>	Lavas em terceiro/quarto estágio de maturação
<b>LOD</b>	<i>Logarithm of Odds</i> – Logaritmo do Método da Verossimilhança

<b>m</b>	Mol
<b>M</b>	Molar
<b>MoyoD</b>	Moyo-in-Dry
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>Nav</b>	Canal de Sódio Dependente de Voltagem
<b>OC</b>	Organoclorado
<b>OP</b>	Organofosforado
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i> – Fase de Leitura Aberta
<b>pg</b>	Picograma
<b>pM</b>	Picomolar
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PEAa</b>	Programa de Erradicação do <i>Aedes aegypti</i>
<b>PNPA</b>	<i>P-nitrophenyl acetate</i> – Acetato de p-nitrofenil
<b>QTLs</b>	<i>Quantitative Trait Loci</i> - Loci de Caracteres de herança Quantitativa
<b>RAPD</b>	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> – Polimorfismo do DNA Amplificado Randomicamente
<b>RecR</b>	Recife-Resistente
<b>RecLab</b>	Recife-Laboratório
<b>Red</b>	<i>Red-Eye</i>
<b>Rev</b>	<i>Reverse</i> – Reverso
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>Rock</b>	Rockefeller
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>rtd</b>	<i>Resistance to DDT</i>
<b>rtp</b>	<i>Resistance to pyrethroid</i>
<b>S6</b>	Sexto segmento
<b>SNPs</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> – Polimorfismos de um único nucleotídeo
<b>SSCP</b>	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> – Polimorfismo de

Conformação de Fita Simples.

**SSR** *Simple Sequence Repeats* – Repetição de Sequências Simples

**Super kdr** *Super knockdown resistance* – resistência do tipo super nocaute

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\text{TM}$	<i>Trademark</i>
<b>U</b>	Unidade
$\Delta$	Delta
♀	Fêmea
°C	Graus Celsius
♂	Macho
®	Marca registrada



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>22</b>
<b>3 PERGUNTA CONDUTORA</b>	<b>23</b>
<b>4 OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Geral</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Específicos</b>	<b>24</b>
<b>5 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>25</b>
<b>5.1 Os inseticidas químicos</b>	<b>25</b>
<b>5.2 A resistência a inseticidas químicos</b>	<b>27</b>
<b>5.3 O estudo da resistência</b>	<b>31</b>
5.3.1 Bioensaios dose-diagnóstica	32
5.3.2 Bioensaios dose-resposta	32
5.3.3 Ensaios bioquímicos	32
<b>5.4 Mecanismos de resistência a inseticidas químicos</b>	<b>33</b>
5.4.1 Penetração reduzida	34
5.4.2 Mudanças comportamentais	34
5.4.3 Alteração do sítio-alvo	34
5.4.4 Resistência metabólica	35
5.4.4.1 <i>Citocromo Oxidases P450</i>	36
5.4.4.2 <i>Glutathione S-transferases (GSTs)</i>	39
5.4.4.3 <i>Esterases</i>	42
<b>5.5 Ferramentas moleculares para o diagnóstico da resistência</b>	<b>45</b>
5.5.1 Mapas genéticos e identificação de Locos de Caracteres Quantitativos (QTL)	47
<b>6 METODOLOGIA</b>	<b>51</b>

<b>6.1 Populações de <i>Ae. aegypti</i></b>	<b>51</b>
6.1.1 Linhagens de laboratório	51
6.1.2 Populações de campo	51
<b>6.2 Cruzamentos e mapeamento dos Locos de Caracteres Quantitativos (QTL)</b>	<b>52</b>
6.2.1 Cruzamentos recíprocos	52
6.2.2 Genotipagem por marcadores moleculares	54
6.2.3 Análise Estatística	56
6.2.4 Análise de genes de esterases presentes em região de QTL	57
6.2.4.1 Sequenciamento de genes de esterase	57
6.2.4.2 qPCR em Tempo Real de genes de esterase	58
<b>6.3 Polimorfismo da região 5' do gene da P450 <i>CYP6N12</i></b>	<b>59</b>
6.3.1 Sequenciamento da região 5' do gene da <i>CYP6N12</i>	59
6.3.2 <i>Screening</i> do polimorfismo encontra na região 5' do gene da <i>CYP6N12</i> em populações naturais de <i>Aedes aegypti</i>	59
6.3.3 Associação entre a superexpressão da <i>CYP6N12</i> e a presença do polimorfismo observado na região 5' do gene	60
6.3.4 Associação entre o polimorfismo presente na região 5' UTR do gene da P450 <i>CYP6N12</i> e a regulação do gene através de ensaios com gene repórter luciferase	61
<b>6.4 <i>Screening</i> das mutações F290V e F455W do gene da AChE</b>	<b>62</b>
<b>6.5 Polimorfismos do gene do canal de sódio dependente de voltagem (<math>Na_v</math>)</b>	<b>63</b>
<b>7 RESULTADOS</b>	<b>65</b>
<b>7.1 Mapeamento dos Locos de Caracteres Quantitativos (QTL) associados à resistência ao inseticida temephos</b>	<b>65</b>
<b>7.2 Análise da região 5' UTR do gene da citocromo P450 <i>CYP6N12</i></b>	<b>76</b>
<b>7.3 <i>Screening</i> das mutações F290V e F455W no gene AChE nas linhagens RecR e Rock</b>	<b>87</b>

<b>7.4 Detecção de polimorfismos no canal <math>Na_v</math> em amostras do Estado do Ceará</b>	<b>91</b>
<b>8 DISCUSSÃO</b>	<b>94</b>
<b>9 CONCLUSÕES</b>	<b>104</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>105</b>
<b>APÊNDICE A</b> - Lista dos marcadores de SNP e RFLP utilizados para o mapeamento de QTL associados à resistência.	<b>123</b>
<b>APÊNDICE B</b> - Lista dos marcadores de microssatélites utilizados para o mapeamento de QTL associados à resistência.	<b>125</b>
<b>APÊNDICE C</b> - Relação dos <i>primers</i> utilizados para sequenciar genes carboxilesterases em indivíduos susceptíveis e resistentes provenientes da F2 dos cruzamentos recíprocos.	<b>129</b>
<b>APÊNDICE D</b> - <i>Primers</i> utilizados na quantificação da expressão de genes carboxilesterase em indivíduos susceptíveis e resistentes provenientes da F2 dos cruzamentos recíprocos.	<b>131</b>
<b>APÊNDICE E</b> - Esquema representativo do posicionamento dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene da <i>CYP6N12</i> em <i>Aedes aegypti</i> .	<b>133</b>
<b>APÊNDICE F</b> – Artigo: Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an <i>Aedes aegypti</i> laboratory strain from Brazil.	<b>135</b>
<b>APÊNDICE G</b> – Artigo: Insecticide resistance in <i>Aedes aegypti</i> populations from Ceará, Brazil.	<b>146</b>
<b>APÊNDICE H</b> – Artigo: Mapping Quantitative Trait Loci Influencing Resistance to the Organophosphate Temephos in the Dengue vector <i>Aedes aegypti</i> .	<b>159</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A dengue representa atualmente um importante problema de saúde pública, sendo o Brasil responsável por quase 80% do total de casos notificados da doença nas Américas e, 61% dos casos no mundo (GUBLER, 2011; TEIXEIRA et al., 2009). Considerando que nenhuma vacina está disponível para minimizar o impacto da doença, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) tem como uma das principais estratégias o controle de *Aedes aegypti* baseado quase que exclusivamente no uso de inseticidas químicos. O organofosforado (OP) temephos, de instabilidade química e alta toxicidade a vertebrados, é utilizado de forma contínua como larvicida para o tratamento focal de criadouros do mosquito, inclusive aqueles destinados ao armazenamento de água potável (CHAVASSE; YAP, 1997). Já os piretróides deltametrina e cipermetrina são utilizados para o controle de mosquitos adultos (BRAGA; VALLE, 2007b; TEIXEIRA et al., 2005).

Durante os últimos 30 anos, estes compostos foram usados intensivamente no controle de *Ae. aegypti* no Brasil. Como consequência da grande pressão de seleção, o primeiro caso de populações de mosquitos resistentes a inseticidas químicos no país foi registrado em 1995 em amostras do mosquito procedentes de Goiás (MACORIS et al., 1995). Desde então, estudos posteriores conduzidos pelo Ministério da Saúde (1999, 2000 e 2002) confirmaram que as populações de *Ae. aegypti*, em praticamente todo o território brasileiro, apresentavam resistência ao temephos (BRAGA et al., 2004; BRASIL, 2000; 2005; 2009; SAÚDE, 1999). Além disso, estudos realizados pelo Grupo Técnico Assessor para o Programa de Monitoramento da Resistência de *Ae. aegypti* aos Inseticidas (MoReNAa) demonstraram que populações brasileiras de *Ae. aegypti* encontravam-se resistentes a todas as classes de inseticidas químicos testadas. Desta maneira, alguns critérios foram estabelecidos visando o manejo da resistência na população de *Ae. aegypti*, como a substituição do larvicida químico pelo biolarvicida *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti); e o monitoramento de resistência através de bioensaios e testes bioquímicos de uma forma sistemática (BRASIL, 2009). Apesar desses critérios definidos pelo MoReNAa terem sido postos em prática, estes não foram empregados a tempo para resultar na reversão da resistência nas populações de *Ae. aegypti* (BRASIL, 2005; LIMA et al., 2011; MELO-SANTOS et al., 2010).

Diante desta situação, fica evidente a necessidade de uma avaliação do *status* de susceptibilidade do vetor no momento pré-aplicação do inseticida, visto que, naturalmente, alelos de resistência podem ocorrer em baixa frequência nas populações-alvo. A maioria dos casos em que o desenvolvimento da resistência ocorre em campo, está atribuída a poucos

genes de maior efeito. Inicialmente, esses genes são encontrados em baixas frequências nas populações-alvo e, com a contínua pressão de exposição, estes são selecionados e aumentam progressivamente suas frequências podendo chegar até a fixação do alelo de resistência na população (OVERGAARD, 2006). Sendo assim, é de fundamental importância para o controle de populações vetorais avaliações periódicas de monitoramento do *status* de resistência ao inseticida empregado e do mecanismo envolvido no processo de aparecimento de resistência. Os bioensaios com a dose-diagnóstica dos compostos permitem classificar uma determinada população como susceptível, com susceptibilidade alterada ou resistente. Os testes bioquímicos possibilitam a detecção do mecanismo de resistência presente em uma determinada população, assim como o padrão de resistência cruzada a outros inseticidas (BROGDON; MCALLISTER, 1998). Diferentes mecanismos podem estar envolvidos na redução da sensibilidade aos inseticidas, tais como: modificações comportamentais, alterações na cutícula do inseto, modificações nos sítios alvos dos inseticidas e a resistência por via metabólica. O mecanismo de resistência por alteração do sítio-alvo é caracterizado por mutações em moléculas, tais como a enzima acetilcolinesterase e o canal de sódio dependente de voltagem, que podem diminuir ou inviabilizar a ligação do inseticida ao seu alvo. A resistência por via metabólica é baseada na metabolização acelerada de compostos químicos por enzimas de detoxificação: como esterases, glutathione S-transferases (GSTs) e oxigenases P450 (OPPENORTH, 1985). Durante o processo de resistência, a superexpressão destas enzimas ou alterações em suas estruturas pode levar a uma metabolização ou sequestro do inseticida antes deste ligar-se ao sítio-alvo (HEMINGWAY et al., 2004). Estudos com populações de *Ae. aegypti* do Brasil demonstraram a presença da resistência metabólica, com alterações expressivas das esterases (MONTELLA et al., 2007) e GSTs (LIMA et al., 2011; MELO-SANTOS et al., 2010; MONTELLA et al., 2007), porém, nenhum destes estudos revela as bases moleculares do fenômeno.

A dificuldade em identificar genes individuais envolvidos no mecanismo de resistência metabólica foi evidenciada nos últimos anos, quando se comprovou a existência de 26 GSTs, 160 citocromos oxidase P450 e 49 carboxilesterases diferentes em *Ae. aegypti* (STRODE et al., 2008). O trabalho realizado por Strobe et al. (2008), representa um marco no estudo da resistência de *Ae. aegypti* a inseticidas químicos. O grupo desenvolveu um *chip* designado *Detox-chip*, o qual, através da técnica de microarranjos, possibilita a análise do perfil de transcrição de 204 genes possivelmente envolvidos no processo de resistência metabólica a inseticidas químicos neste mosquito. No entanto, a técnica de microarranjos possui limitações, pois apenas os genes presentes no *chip* podem ser estudados, e apenas

aqueles com mudanças na atividade transcricional podem ser identificados (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2008; STRODE et al., 2008).

Uma estratégia complementar que permite identificar genes candidatos envolvidos na resistência é a construção de mapas de ligação, os quais possibilitam uma análise detalhada e com considerável resolução do genoma do mosquito. O uso de marcadores genéticos polimórficos, tais como SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* - polimorfismos de um único nucleotídeo) e microssatélites (HART; CLARK, 2010; WEETMAN et al., 2010), permite identificar regiões cromossômicas, que contribuem para a variação de um caráter, os chamados Locus de Caracteres Quantitativos (*Quantitative Trait Loci* - QTL) (HART; CLARK, 2010). O mapeamento de QTL já possibilitou a identificação de regiões genômicas associadas à resistência aos inseticidas em mosquitos do gênero *Anopheles* (RANSON et al., 2000; RANSON et al., 2004; WONDJI; HEMINGWAY; RANSON, 2007) e *Ae. aegypti* (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2008). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo a identificação, mapeamento e caracterização de genes envolvidos na resistência a inseticidas químicos em populações de laboratório e de campo de *Ae. aegypti*.

## 2 JUSTIFICATIVA

A resistência a inseticidas químicos decorrente de alteração do sítio-alvo do inseticida, geralmente é associada a um número pequeno de mutações que podem ser mapeadas nos organismos. Por isso, métodos de identificação de alelos de resistência nas populações de vetores já foram desenvolvidos para praticamente todas as moléculas envolvidas, o que permite um *screening* rápido e fácil. Por outro lado, a resistência metabólica compreende um grande número de genes. Até o momento, mais de 200 genes de detoxificação já foram identificados em *Ae. aegypti* e, com este amplo arsenal de genes, identificar mutações pontuais responsáveis por este mecanismo e desenvolver métodos de diagnosticá-los torna-se uma tarefa muito difícil.

A técnica de construção de mapas de ligação e o mapeamento de Locos de Caracteres Quantitativos (QTL) possibilitam a identificação de genes candidatos, envolvidos no processo da resistência a inseticidas químicos. Essa estratégia complementar já foi utilizada na elucidação das bases moleculares da resistência a DDT e piretróides em mosquitos do gênero *Anopheles* e *Ae. aegypti*. Contudo, apesar do OP ser amplamente utilizado em todo o mundo, nenhum trabalho sobre mapeamento de QTL associado à resistência ao temephos em *Ae. aegypti* foi realizado até o momento. Sendo assim, o mapeamento de genes candidatos e a identificação de SNPs relacionados com a resistência a inseticidas químicos permitirão o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico da resistência a inseticidas químicos em *Ae. aegypti*. A elucidação das bases moleculares desse fenômeno proverá conhecimento sobre como os genes de resistência evoluem em populações de campo, bem como possibilitará a adequação de métodos de controle para o manejo da resistência.

### **3 PERGUNTA CONDUTORA**

Quais genes estão envolvidos na resistência a inseticidas químicos em *Ae. aegypti*?



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar genes envolvidos na resistência ao temephos em populações de *Aedes aegypti*.

### 4.2 Objetivos específicos

- a) Mapear Locos de Caracteres Quantitativos (QTL) associados à resistência ao organofosforado temephos na linhagem altamente resistente a esse composto (RecR);
- b) Investigar a presença de um polimorfismo presente na região 5' do gene *CYP6N12* em populações naturais de *Ae. aegypti*, bem como avaliar o papel desse polimorfismo nas linhagens RecR e RecRev;
- c) Identificar mutações no gene da acetilcolinesterase e associá-las ao processo de resistência na linhagem de *Ae. aegypti* RecR;
- d) Identificar mutações no gene do canal de sódio dependente de voltagem e associá-las com a resistência à cipermetrina em populações naturais de *Ae. aegypti*;

## 5 REFERENCIAL TEÓRICO

### 5.1 Os inseticidas químicos

Os primeiros registros do uso de compostos com atividade inseticida remetem à civilização da Suméria, há mais de 2500 anos A.C. Posteriormente, povos Chineses iniciaram o desenvolvimento de compostos inseticidas derivados de plantas, mercúrio e arsênico. Registros históricos mostram que o uso de compostos com atividade inseticida acompanhou o desenvolvimento da agricultura em vários pontos do mundo. Desde a segunda metade do século XIX, civilizações asiáticas utilizavam um pó básico à base de flores de piretro (*Pyrethrum carneum* e *Pyrethrum roseum*), que apresentava eficiente poder inseticida (RUIGT, 1985). Os primeiros investimentos em pesquisas para o desenvolvimento de compostos com atividade inseticida datam de 1867, quando a primeira formulação do arsênico verde Paris foi utilizada em larga escala (BECKER et al., 2010). O início da Segunda Guerra Mundial estimulou ainda mais os investimentos no desenvolvimento de novos compostos inseticidas: soldados eram dizimados nas trincheiras por doenças transmitidas por piolhos, tal como a febre tifóide. Apesar de vários compostos terem sido testados sem sucesso, em 1939 um inseticida do grupo dos organoclorados (OC), o diclorodifeniltricloroetano, amplamente conhecido como DDT, foi apresentado pelo químico suíço Paul Müller, como a grande promessa de eliminação dos insetos. O DDT tornou-se o composto químico mais famoso e mais utilizado do século 20, levando o Dr. Müller ao Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1948 (BECKER et al., 2010). O potencial do composto recém-descoberto foi demonstrado em 1943, quando uma epidemia de febre tifóide foi controlada em Nápoles, na Itália. Em seguida, o DDT desempenhou um papel fundamental durante a Segunda Guerra Mundial, controlando epidemias de febre tifóide. Este organoclorado era aplicado diretamente na pele e roupas de civis e soldados. Um segundo trunfo do DDT aconteceu anos mais tarde, quando o composto foi o componente-chave da campanha de erradicação da malária feita pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo até hoje utilizado em programas de controle de pragas (HEMINGWAY; RANSON, 2005). Em insetos, compostos OC produzem tremores pelo corpo, hiperexcitabilidade e perda de movimentos, ao destruir o equilíbrio de íons de sódio e potássio dos axônios (BECKER et al., 2010). Proteínas do canal de sódio dependente de voltagem e receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA) são os alvos desse grupo de pesticidas.

Posteriormente, uma segunda classe de inseticidas foi desenvolvida por cientistas alemães, que criaram o primeiro composto organofosforado (BECKER et al., 2010). Inseticidas organofosforados (OP) foram apresentados como sucessores dos organoclorados, pois apresentam uma série de vantagens em relação aos compostos OC, tais como baixa estabilidade química (baixa persistência) e por serem biodegradáveis (HEMINGWAY; RANSON, 2005). OPs agem inibindo a atividade da enzima acetilcolinestase nas sinapses neuronais, produzindo o acúmulo do neurotransmissor acetilcolina nas terminações nervosas. Uma vez fosforilada pelo inseticida, esta enzima torna-se inativa de maneira irreversível (BRAGA; VALLE, 2007a). Com a inibição da acetilcolinesterase, insetos produzem sinapses aleatórias, distorção muscular e paralisia do inseto (MADDRELL, 1980). Atualmente, o OP temephos é o único composto com atividade larvicida recomendado pela OMS para uso em água potável (CHAVASSE; YAP, 1997).

Os inseticidas da classe dos carbamatos foram introduzidos no mercado na década de 50, apresentando vantagens como uma baixa toxicidade para mamíferos e ação letal rápida e seletiva em insetos. O efeito tóxico observado em humanos é considerado baixo, sendo este atribuído mais pela exposição aguda do que pelo efeito acumulativo do composto (CASIDA; QUISTAD, 1998). Os carbamatos possuem um modo de ação semelhante aos inseticidas OPs, porém, inibem de forma reversível a enzima acetilcolinesterase (HEMINGWAY; RANSON, 2005).

Maiores avanços no desenvolvimento de compostos biosseguros e com ação específica em insetos culminaram com a introdução de inseticidas da classe dos piretróides. Estes compostos, extraídos do ápice da flor do *Chrysanthemum sp.*, possuem baixa toxicidade em humanos e são utilizados na forma de *sprays* residuais. Os piretróides praticamente substituíram o uso das três classes de inseticidas anteriormente descritas, em várias áreas do controle de pragas (HEMINGWAY et al., 2004). Esse grupo de inseticidas modifica canais de sódio dependentes de voltagem ( $Na_V$ ), impedindo o fechamento desses canais e consequente interrupção do impulso nervoso. O inseto apresenta disparos repetitivos e bloqueio da transmissão neuromuscular. A ação letal dos piretróides envolve os neurônios periféricos e centrais, enquanto que a ação paralisante, também chamada de *knockdown* ou nocaute, é produzido por efeitos de intoxicação em neurônios periféricos (HEMINGWAY et al., 2004).

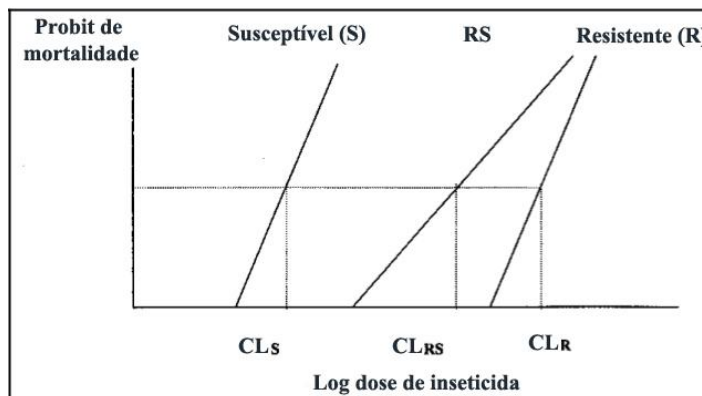
Baseado nos promissores resultados obtidos inicialmente em pragas de importância na agricultura e na saúde pública, inseticidas químicos tornaram-se o elemento mais importante em programas de controle de vetores (ZAIM; GUILLET, 2002). No entanto, o alto custo (mais de US\$ 50 milhões) associado ao longo período para a pesquisa e patente de um novo

composto (de 7 a 10 anos) resultou numa considerável diminuição do número de novos compostos inseticidas habilitados para o uso nos últimos anos (ROSE, 2001). Como consequência do intenso uso de compostos químicos, populações de insetos demonstraram, ao longo do tempo, a notável habilidade de desenvolver resistência aos inseticidas disponíveis no mercado e amplamente empregados em campo (BROGDON; MCALLISTER, 1998). Desde 1989, a resistência estava difundida em mais de 500 espécies de artrópodes, das quais mais de 100 eram espécies de mosquitos (GEORGHIOU; LAGUNES-TEJADA, 1991).

## 5.2 A resistência a inseticidas químicos

Resistência é definida como o desenvolvimento da capacidade de uma determinada linhagem de um organismo em tolerar diferentes doses de agentes tóxicos, que seriam letais para a maioria da população da mesma espécie (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1981). Em termos genéticos, a resistência é uma característica herdável, em que os alelos aumentam de frequência na população, como um resultado direto dos efeitos seletivos de um dado inseticida (CROW, 1957). Para compreender o processo dinâmico da evolução da resistência, é preciso entender os mecanismos que podem contribuir para o surgimento do fenótipo de resistência em uma população de insetos. O desenvolvimento da resistência em uma população está diretamente relacionado a alguns fatores, tanto genéticos como operacionais, tais como a aplicação mais frequente de pesticidas e ao aumento na dosagem do produto utilizado (GEORGHIOU, 1983). Dentre esses fatores, os principais são a frequência inicial do alelo R (resistência) na população, seu nível de dominância, as taxas de mutação e o custo biológico dessa variação (OVERGAARD, 2006). Segundo BOURGUET; GENISSEL; RAYMOND (2000), a dominância pode ser baseada na posição relativa da curva de mortalidade para os indivíduos heterozigotos em comparação à curva de mortalidade para ambos indivíduos homozigotos, em um dado nível de mortalidade (**figura 1**). Este resultado é chamado de nível de dominância da resistência a inseticidas.

**Figura 1-** Nível de dominância calculado a partir da posição relativa da curva de mortalidade para os indivíduos heterozigotos em comparação à curva dos indivíduos homozigotos, em um dado nível de mortalidade.

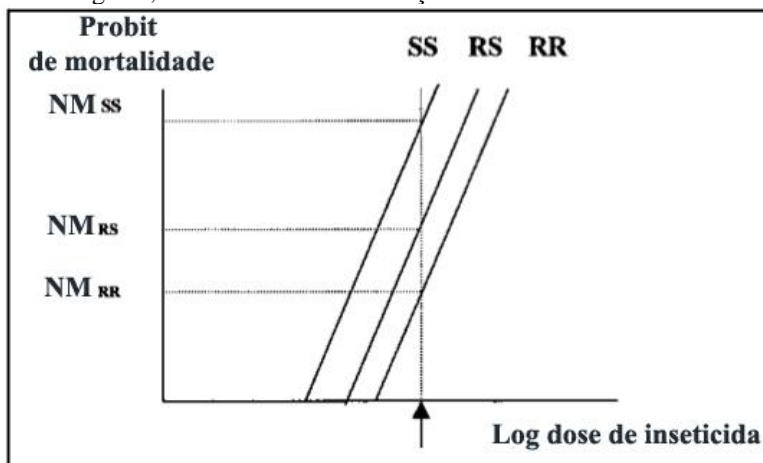


**Fonte:** Bourguet, Genissel e Raymond (2000).

**Legenda:** S – Susceptível; RS – Resistente/Susceptível; R – Resistente; CL – Concentração Letal.

Em segundo lugar, a dominância pode ser estimada através da análise da mortalidade dos indivíduos heterozigotos em comparação aos homozigotos, em uma dada concentração de inseticida (**figura 2**). Este resultado é chamado de dominância efetiva. Assim como o nível de dominância, a velocidade de desenvolvimento da resistência a inseticidas em uma dada população é diretamente relacionada a altas taxas de mutação. O custo biológico também pode influenciar a velocidade de desenvolvimento da resistência. A presença de genes de resistência pode conferir um custo biológico a insetos, uma vez que mutações em genes que codificam moléculas-alvo de inseticidas e enzimas de detoxificação induzem a súbitas mudanças fisiológicas, tais como um maior período de desenvolvimento larval e menor comprimento no tamanho da asa (BERTICAT et al., 2008; BOURGUET et al., 2004).

**Figura 2-** Nível de dominância estimado através da análise da mortalidade dos indivíduos heterozigotos em comparação aos homozigotos, em uma dada concentração de inseticida.



**Fonte:** Bourguet, Genissel e Raymond (2000).

**Legenda:** SS – Homozigoto susceptível; RS – Heterozigoto; RR – Homozigoto resistente; NM – Nível de Mortalidade.

Sendo assim, a resistência a inseticidas químicos deve ser avaliada como um processo de adaptação, resultante de uma pressão de seleção exercida em uma população de insetos (BRAGA; VALLE, 2007a). Quanto mais precocemente for detectada a resistência e seu *status* for frequentemente monitorado, maiores serão as chances de programas de controle ter sucesso. A resistência aos inseticidas químicos pode ser investigada por diferentes áreas, como a biológica, a bioquímica e a molecular, utilizando testes como o ensaio biológico e a análise bioquímica de enzimas que respondem à pressão de seleção imposta pelos inseticidas, ou a caracterização molecular dos genes que conferem resistência. Os ensaios biológicos com inseticidas possuem critérios bem definidos para a classificação quanto ao *status* de susceptibilidade da população: esta será considerada susceptível quando exposta ao inseticida e este cause mais de 98% de mortalidade; terá susceptibilidade alterada quando a mortalidade estiver entre 80 e 98% e será considerada resistente, quando os níveis de mortalidade forem inferiores a 80% (DAVIDSON; ZAHAR, 1973). Os testes bioquímicos permitem identificar o(s) mecanismo(s) de resistência, comparando-se a população de estudo a uma linhagem referência (BROGDON, 1989). Nesse teste, é possível identificar e estimar a atividade de enzimas envolvidas na metabolização de inseticidas e de proteínas-alvo dos compostos (BROGDON; DICKINSON, 1983).

Inúmeros estudos apontam a resistência a inseticidas químicos como sendo um dos principais fatores responsáveis pela falha de programas de controle de *Ae. aegypti* pelo mundo. Resistência a organofosforados e piretróides tem sido relatada em populações de *Ae. aegypti* provenientes de Cuba (BISSET et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2005), El Salvador (LAZCANO et al., 2009), Espanha (RAWLINS et al., 1998), Índia (SHARMA; SAXENA; LAL, 2004; SHETTY; SANIL; SHETTY, 2012); Malásia (CHEN et al., 2005), Martinica (MARCOMBE et al., 2009a; 2009b; 2012), México (FLORES et al., 2006), Panamá (BISSET; RODRIGUEZ; CACERES, 2003), República Dominicana (MEKURIA et al., 1991), Singapura (PING; YATIMAN; GEK, 2001), Tailândia (PONLAWAT; SCOTT; HARRINGTON, 2005; YAICHAROEN et al., 2005), Vietnã (HUBER et al., 2003) e de 17 ilhas caribenhas (RAWLINS; WAN, 1995).

No Brasil, a primeira campanha pública de eliminação de focos de *Ae. aegypti* foi iniciada por Oswaldo Cruz no início do século XX, com o intuito de controlar casos de febre amarela urbana (LOWY, 1990). Nos últimos anos, *Ae. aegypti* tem sido combatido multisetorialmente. A implantação do Programa de Erradicação de *Aedes aegypti*, o PEAA, em 1990, resultou em fortalecimento das ações de combate ao vetor, com um significativo aumento dos recursos utilizados para essas atividades, mas ainda com as ações de prevenção centradas quase que exclusivamente no uso de inseticidas químicos para a eliminação do mosquito em campo. Essa estratégia mostrou-se incapaz de responder à complexidade epidemiológica da dengue, principalmente por negligenciar investimentos em obras de saneamento, em educação em saúde e em desenvolvimento de recursos humanos (BRASIL, 2003).

O aumento no número de casos de dengue e os crescentes números da infestação vetorial no país obrigaram o Ministério da Saúde a fazer uma nova avaliação dos avanços e das limitações do programa. No cenário epidemiológico, tornava-se indispensável que o conjunto de ações fosse intensificado, permitindo um melhor enfrentamento do problema na busca da redução do impacto da dengue no Brasil. Em 2002, o PEAA foi modificado para o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), o qual mudou o paradigma de erradicação do vetor para ações que visavam o controle de *Ae. aegypti*. O PNCD incorporou elementos como a mobilização social e a participação comunitária, indispensáveis para responder de forma mais adequada a um vetor altamente domiciliado (BRASIL, 2003).

Desde 1999, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) relatou alterações da susceptibilidade a organofosforados em populações de *Ae. aegypti* procedentes de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (BRASIL, 1999). Naquele mesmo ano, teve início, em âmbito

nacional, a elaboração do programa de monitoramento da susceptibilidade aos inseticidas empregados no PNCD. No ano seguinte, populações de 67 municípios caracterizados como sentinelas foram investigadas pelo Ministério da Saúde. Entre aquelas populações de *Ae. aegypti*, a resistência foi detectada principalmente em indivíduos provenientes das regiões Sudeste e Nordeste (BRASIL, 2003). Posteriormente, o Grupo Técnico Assessor para o Programa de Monitoramento da Resistência de *Ae. aegypti* aos Inseticidas (MoReNAa) detectou que populações brasileiras de *Ae. aegypti* estavam resistentes a todas as classes de inseticidas químicos. Nesse contexto, alguns critérios foram estabelecidos para minimizar o impacto da resistência de *Ae. aegypti* ao larvicida químico temephos, este foi substituído pelo biolarvicida *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) em locais onde a resistência ao OP fora detectada, e em paralelo, a rede MoReNAa começou a monitorar a resistência ao temephos em populações de *Ae. aegypti* nos municípios brasileiros por meio de bioensaios com doses diagnósticas de inseticidas e ensaios bioquímicos (SAÚDE, 2009).

Desde então, o monitoramento e o manejo da resistência a inseticidas nas populações do mosquito, assim como o uso de substâncias com modos de ação diferentes dos inseticidas químicos convencionais, tornaram-se componentes importantes no controle de *Ae. aegypti* no país. No entanto, estudos demonstraram que a troca do inseticida químico pelo biológico aconteceu tardiamente, o que dificultou o retorno do *status* de susceptibilidade nessas populações brasileiras (BRASIL, 2005; MELO-SANTOS et al., 2010).

### 5.3 O estudo da resistência

As técnicas tradicionais de detecção e quantificação da resistência utilizadas em programas de vigilância entomológica em todo o mundo podem ser divididas em bioensaios, para a determinação da dose diagnóstica ou quantificação do grau de resistência na população; e os ensaios bioquímicos em microplacas com a finalidade de determinar qual o mecanismo de resistência envolvido. Embora os bioensaios e testes bioquímicos sejam usados extensivamente nos programas de controle da dengue através da redução da densidade populacional do *Ae. aegypti*, estas metodologias estão sendo gradualmente substituídas por técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e microarranjos (BASS; FIELD, 2011; COLEMAN, 2007; HOTELIER, 2010).



### 5.3.1 Bioensaios dose-diagnóstica

Dose diagnóstica é um ensaio “in-vivo” realizado de forma simples para a detecção da resistência nas populações expostas aos compostos inseticidas. É a OMS que disponibiliza a lista de dose-diagnósticas preconizada para vários inseticidas contra uma variedade de espécies de artrópodes transmissores de doenças (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1991). Dose-diagnóstica é a dose pré-determinada de um inseticida, que apresenta efeito letal para a maioria dos indivíduos susceptíveis de uma espécie, mas não afeta os indivíduos resistentes (BLACK; SEVERSON, 2002).

### 5.3.2 Bioensaios dose-resposta

Este tipo de ensaio é a ferramenta de escolha quando há a necessidade de monitorar o progresso da resistência em uma determinada população. Uma escala de diferentes doses de inseticidas é utilizada para se obter um espectro de respostas de mortalidade entre as amostras estudadas (**figura 3**). Tais respostas são obtidas em concentrações letais, utilizando o programa SPSS 8.0 para *Windows* (FINNEY, 1971).

**Figura 3-** Bioensaio do tipo dose-resposta para avaliação do *status* de resistência a inseticidas químicos. Ensaios realizados em réplicas, contendo 20 larvas em cada copo plástico.



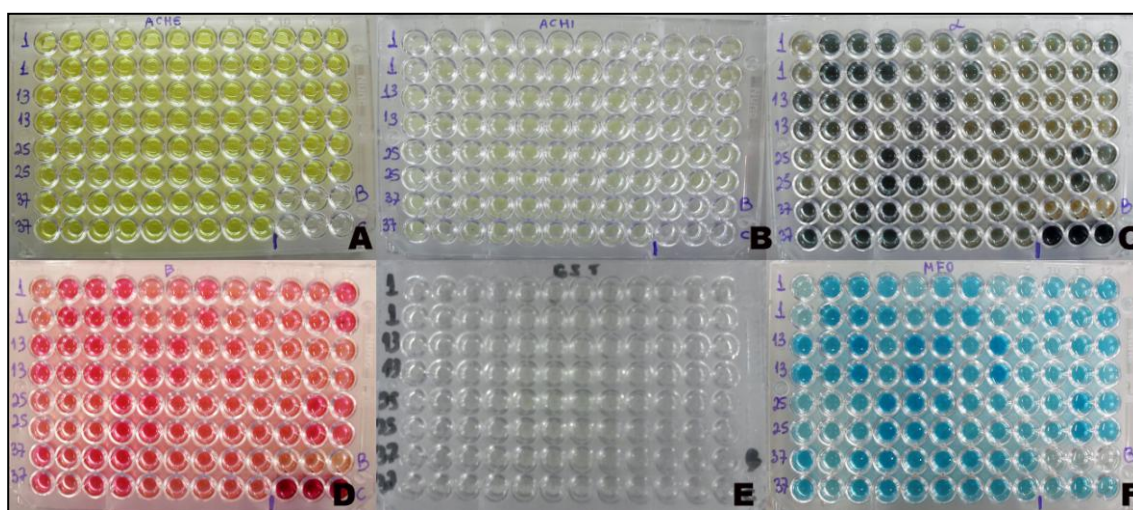
**Fonte:** dados do autor.

### 5.3.3 Ensaios bioquímicos

A utilização de ensaios bioquímicos é importante para a identificação e quantificação de enzimas envolvidas no mecanismo de resistência metabólica em uma determinada

população. Esses ensaios podem detectar atividades de esterases ( $\alpha$ ,  $\beta$  e PNPA), acetilcolinesterases (AChE), glutatona S- transferases (GSTs) e oxidases. Além dessas enzimas, os testes bioquímicos ainda permitem identificar a presença da forma mutante da enzima acetilcolinesterase, a acetilcolinesterase insensível (**figura 4**). A aferição da atividade enzimática de tais enzimas é realizada em leitor de ELISA, através da leitura da absorbância específica de cada uma delas (BROGDON; DICKINSON, 1983; HEMINGWAY, 2000). Recentemente, um novo método colorimétrico foi desenvolvido para a detecção específica da atividade de uma classe de GSTs, a Epsilon, associada à resistência ao DDT em *Ae. aegypti* (MOROU et al., 2010). Esses autores demonstraram que o novo método de detecção da atividade enzimática de GSTs é mais sensível do que os métodos bioquímicos comuns.

**Figura 4-** Ensaios bioquímicos utilizados para o estudo de enzimas envolvidas no mecanismo de resistência metabólica em mosquitos.



**Fonte:** Imagens gentilmente cedidas por Elisama Helvécio e Liliane Amorim.

**Legenda:** Detecção da atividade enzimática: A) Acetilcolinesterase; B) Acetilcolinesterase insensível; C)  $\alpha$ -esterases; D)  $\beta$ -esterases; E) Glutaciona S-transferases; F) Oxidases de função mista.

#### 5.4 Mecanismos de resistência a inseticidas químicos

A resistência surge como resultado de uma modificação genética que pode alterar características fisiológicas, morfológicas ou comportamentais de uma dada população. Os mecanismos de resistência conhecidos podem ser divididos em quatro categorias: penetração

reduzida, mudanças comportamentais, alteração do sítio-alvo e resistência metabólica (APPERSON; GEORGHIOU, 1975; BLACK IV; TABACHNICK, 2005).

#### 5.4.1 Penetração reduzida

Muitas formulações inseticidas são desenvolvidas para penetrar o inseto via cutícula. Mudanças como o espessamento dessa cobertura podem conferir resistência a um determinado grupo de compostos (BECKER et al., 2010). No entanto, o mecanismo de penetração reduzida, por si só, produz níveis de resistência baixos, mas quando em combinação com outros mecanismos de resistência, podem aumentar consideravelmente o nível de resistência, como o observado em *An. funestus* resistentes a piretróides procedentes de Moçambique (APPERSON; GEORGHIOU, 1975; WOOD et al., 2010).

#### 5.4.2 Mudanças comportamentais

Insetos podem apresentar mudanças de comportamento em decorrência da presença do inseticida em áreas tratadas. Estas mudanças podem fazer com que os insetos reconheçam superfícies ou áreas tratadas com inseticidas, apresentando maior tendência a não adentrar em regiões sob tratamento, reduzindo a taxa de invasão de domicílios ou modificando o horário de repasto sanguíneo (MATHENGE et al., 2001). Apenas um pequeno grupo de insetos foi documentado com este tipo de mecanismo de resistência, como por exemplo, uma população de *An. gambiae* resistente a inseticidas piretróides e organofosforados (DARRIET; HOUGARD; CORBEL, 2005).

#### 5.4.3 Alteração do sítio-alvo

Este tipo de resistência é ocasionado por mutações em genes que codificam proteínas alvos de ligação do inseticida no sistema nervoso central. As alterações estruturais ocorridas nessas proteínas podem dificultar ou impedir a ligação do composto químico, levando a um comprometimento parcial ou integral da atividade do inseticida em questão. Em muitos insetos, a enzima AChE, alvo dos inseticidas organofosforados e carbamatos, quando alterada, perde a sensibilidade aos compostos inseticidas, permitindo a transmissão normal do impulso nervoso (ALOUT et al., 2011; HEMINGWAY; RANSON, 2005; KLIOT;

GHANIM, 2012). Testes bioquímicos, que utilizam análogos de inseticidas, podem ser utilizados para detectar esse mecanismo de resistência.

Outro tipo de molécula-alvo é o receptor neuronal do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), alvo dos compostos organoclorados e ciclodienos. A resistência envolvendo a insensibilidade desse alvo é conferida por uma mutação pontual na região estrutural do gene, a qual altera o aminoácido alanina por uma serina, na posição 296 da proteína. Esta é uma mutação comum e estável, que persiste em frequência elevada em indivíduos resistentes de várias populações de insetos, mesmo após a interrupção do uso dos ciclodienos (ASIH et al., 2012; FFRENCH-CONSTANT et al., 2000; HEMINGWAY; RANSON, 2005; WONDJI et al., 2011).

Moléculas do canal de sódio dependentes de voltagem ( $Na_v$ ), alvo de inseticidas organoclorados e piretróides, funcionam regulando a entrada de íons de sódio na membrana de células do sistema nervoso. Várias mutações pontuais no gene de cópia única do canal  $Na_v$  já foram identificadas em diversas espécies de mosquitos resistentes, dentre eles *Anopheles gambiae*, *An. arabiensis*, *Culex pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Aedes albopictus* e *Ae. aegypti* (BAHNCK; FONSECA, 2006; BRENGUES et al., 2003; CHANG et al., 2009; JONES et al., 2012; KASAI et al., 2011; LIMA et al., 2011; MARCOMBE et al., 2012; MARTINEZ-TORRES et al., 1998; MARTINEZ-TORRES et al., 1999; OCHOMO et al., 2012; SILLER et al., 2011; SODERLUND, 2008; SODERLUND; KNIPPLE, 2003; YANOLA et al., 2011). As mutações mais frequentes estão situadas no gene que codifica o sexto segmento (S6) do domínio II da proteína e envolve uma série de mutações de sentido-trocado (MACIEL-DE-FREITAS; CODECO; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, 2007; MARTINEZ-TORRES et al., 1998; MARTINEZ-TORRES et al., 1999). Essas mutações levam a uma resistência conhecida como *knockdown* (*kdr*) e *super knockdown* (*super-kdr*) (WILLIAMSON et al., 1993). Estudos demonstram que a detecção de mutações no gene do canal  $Na_v$ , tais como Leu1014Fen, Ile1011Met, Val1016Ile e Fen1534Cis, é uma excelente ferramenta para avaliação da susceptibilidade em populações naturais, em momento pré-aplicação de compostos piretróides e DDT (DONNELLY et al., 2009).

#### 5.4.4 Resistência metabólica

A resistência do tipo metabólica é caracterizada pelo envolvimento de um grupo de famílias enzimáticas. Durante o processo de resistência, essas enzimas podem ser superexpressas e/ou sofrerem modificações estruturais em sua molécula, aumentando sua habilidade em detoxificar o inseticida (BRAGA; VALLE, 2007a; HEMINGWAY, 2000;

HEMINGWAY et al., 2004; RUSSELL et al., 2011). O metabolismo de xenobióticos pode envolver um processo de até 3 fases. Na fase 1, enzimas como as oxidases e esterases transformam o composto primário por oxidação, redução ou hidrólise para produzir um produto mais hidrossolúvel e, normalmente, menos tóxico do que o primário. Na fase 2, enzimas como as GSTs, conjugam o composto resultante da fase 1 a um açúcar, aminoácido ou a uma glutatona, para aumentar a solubilidade em água e reduzir ainda mais a toxicidade do produto. Em geral, metabólitos derivados da fase 2 possuem toxicidade muito baixa e podem ser acondicionados dentro de organelas citoplasmáticas. A fase 3, representada por moléculas transportadoras, consiste na conversão dos metabólitos da fase 2 em conjugados secundários são atóxicos para o transporte extracelular (REDDY et al., 2012; VAN EERD et al., 2003).

Com a elucidação dos genomas de mosquitos e anotação de inúmeros genes de detoxificação, ficou evidente que essas famílias gênicas estão rapidamente evoluindo e que cada espécie de mosquito possui um grupo único de genes metabólicos, com apenas poucos genes ortólogos entre as espécies (RANSON et al., 2002a; STRODE et al., 2008). A rápida expansão e diversificação desses genes de detoxificação provavelmente facilitaram a adaptação dos mosquitos em seus respectivos nichos, e, dentro de uma escala de tempo mais recente, possibilitaram aos mosquitos a sobrevivência a vários xenobióticos, incluindo os inseticidas (STRODE et al., 2008).

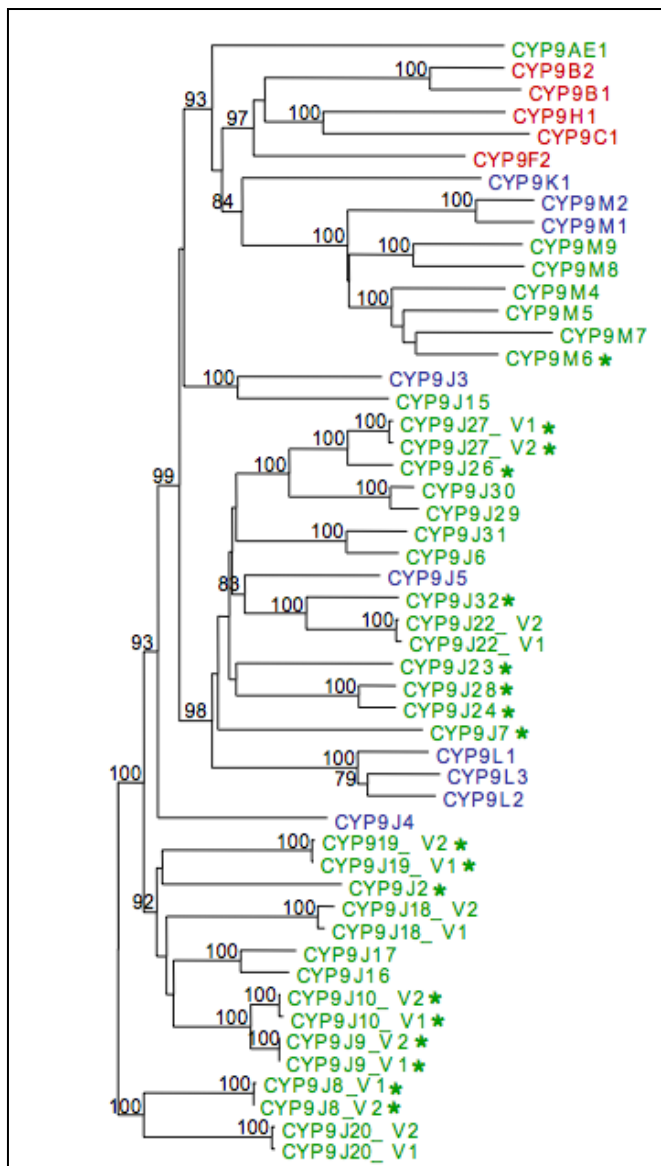
#### 5.4.4.1 Citocromo oxidases P450

As citocromo oxidases P450, também conhecidas como monooxigenases, fazem parte de uma família complexa de enzimas encontradas desde bactérias até mamíferos. São responsáveis pelo metabolismo oxidativo de vários compostos endógenos e exógenos (SCOTT; WEN, 2001). A diversidade dessa família de enzimas pode ser exemplificada pelas múltiplas isoformas da citocromo P450, diferentes padrões de expressão e uma grande variedade de substratos (FEYEREISEN, 1999). Inúmeros estudos demonstraram a elevação na atividade enzimática de monooxigenases em mosquitos resistentes a organoclorados, organofosforados e piretróides (HEMINGWAY et al., 2004). O envolvimento de oxidases no processo de resistência pode ser detectado por meio de bioensaios com o sinergista butóxido de piperonil (BRAGA; VALLE, 2007a). A maioria das P450 de eucariotos está localizada no retículo endoplasmático, enquanto que o restante encontra-se nas mitocôndrias (SCOTT; WEN, 2001). As citocromos P450 são agrupadas de acordo com a homologia da sequência de

aminoácidos, sendo nomeadas pela abreviação CYP, seguida de um número, uma letra e outro número (NELSON et al., 1993). P450s com similaridade de aminoácidos maior do que 40% são agrupadas dentro da mesma família, e membros com mais de 55% de homologia são agrupadas em subfamílias (NELSON et al., 1993). O mosquito *Ae. aegypti* possui um total de 160 genes de oxidases P450, além de várias sequências truncadas de P450 encontradas dentro ou flanqueando *clusters* do gene, além de próximas a sequências transponíveis (STRODE et al., 2008). Em relação às espécies como *An. gambiae* e *D. melanogaster*, este número de genes encontrados em *Ae. aegypti* representa uma expansão de aproximadamente 52% e 86%, respectivamente (STRODE et al., 2008). O maior *cluster* de genes P450 encontrado nesse mosquito é constituído por 18 genes da família CYP6, seguido por outro cluster de 16 genes da família CYP9. Essa última família encontra-se bastante expandida no genoma de *Ae. aegypti*, uma vez que apenas nove genes CYP9 são encontrados em *An. gambiae* e cinco em *D. melanogaster* (**figura 5**) (STRODE et al., 2008).

Na maioria dos casos onde a resistência fora associada à elevação na atividade da P450, o gene envolvido pertencia à família CYP6 e CYP9 (BARIAMI et al., 2012; BERGE; FEYEREISEN; AMICHOT, 1998; DAVID et al., 2005; DJOUAKA et al., 2008; GUZOV et al., 1998; MAITRA et al., 1996; MULLER et al., 2008; NIKOU; RANSON; HEMINGWAY, 2003; PITTENDRIGH et al., 1997; POUPARDIN et al., 2008; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2012; SABOURAULT et al., 2001; STRODE et al., 2012; STRODE et al., 2006; STRODE et al., 2008; TOMITA; SCOTT, 1995).

**Figura 5-** Dendograma representativo da expansão dos membros da família P450 CYP9 em *Aedes aegypti*, em comparação a membros da mesma família encontrados em *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster*.



**Fonte:** Strode et al., (2008).

**Legenda:** Sequências em verde são provenientes da família CYP9 de *Aedes aegypti*, em azul de *Anopheles gambiae* e em vermelho, de *Drosophila melanogaster*. Agrupamentos com valores de *bootstrap* superiores a 70% são indicados com asterisco (\*).

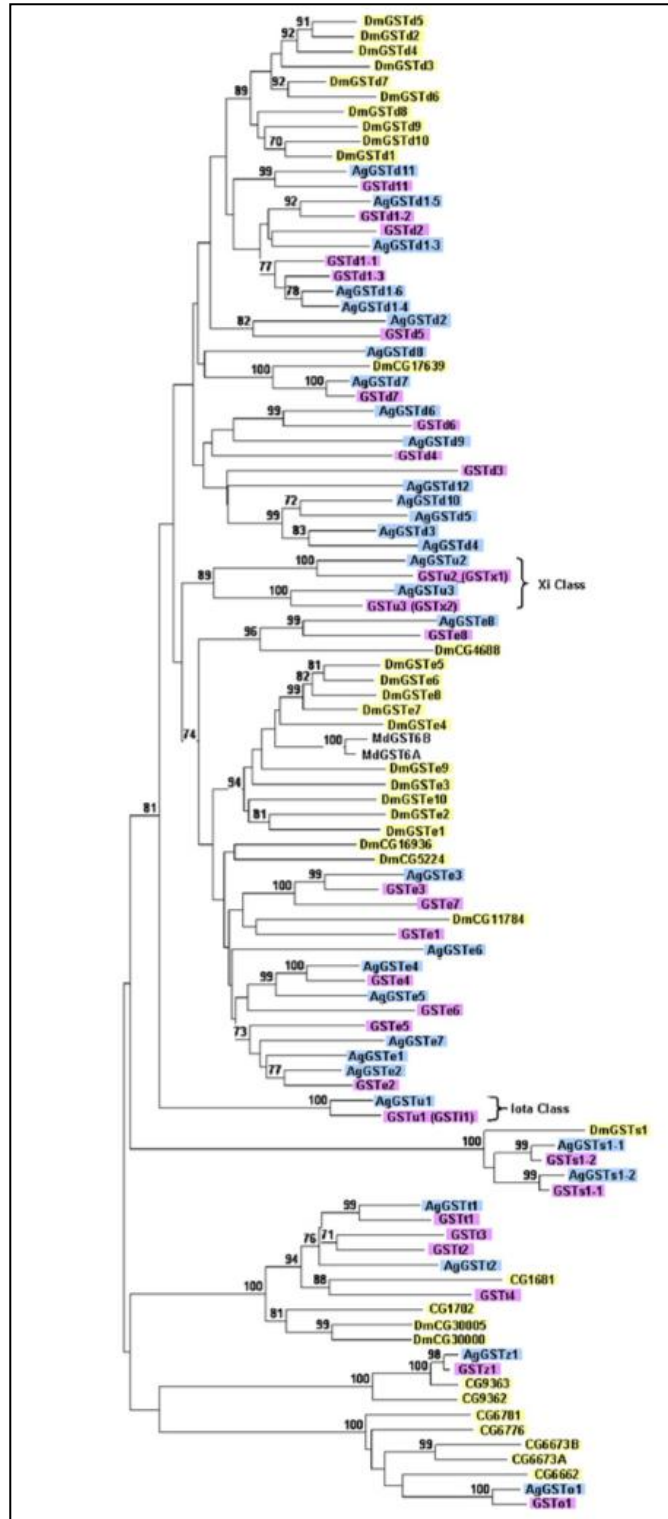
#### 5.4.4.2 *Glutathione S-transferases (GSTs)*

Essas enzimas, pertencentes a uma ampla família de enzimas multifuncionais, estão envolvidas na detoxificação de uma variedade de compostos – incluindo DDT, organofosforados e piretróides (SALINAS; WONG, 1999). As GSTs catalisam a conjugação da glutathione ao centro hidrofílico de compostos tóxicos, assim aumentando a solubilidade e auxiliando a excreção de tais xenobióticos (LUMJUAN et al., 2007). Essa superfamília enzimática pode ser subdividida em três grupos: GSTs citosólicas, microsossomais e mitocondriais (ROBINSON et al., 2004; SHEEHAN et al., 2001). Em mosquitos, apenas as GSTs citosólicas e microsossomais são encontradas (DING et al., 2003; HEMINGWAY et al., 2004; LUMJUAN et al., 2007). Os critérios seguidos para a classificação das GSTs são baseados na similaridade das sequências de aminoácidos (maior que 40%), na formação das estruturas terciárias, na habilidade em formar heterodímeros e na localização cromossômica (DING et al., 2003; HEMINGWAY et al., 2004; RANSON; HEMINGWAY, 2005). A nomenclatura estabelecida para as GSTs de insetos consiste em três partes: o nome da espécie na qual a GST foi isolada, a classe da GST e o número correspondente à ordem de descoberta do gene ou da organização no genoma (CHE-MENDOZA, 2010). Seis classes de GSTs citosólicas foram identificadas em insetos: Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Teta e Zeta (RANSON et al., 2001). As classes Delta e Epsilon, ambas encontradas apenas em artrópodes, são as mais abundantes dentre as GSTs citosólicas em *An. gambiae*, *D. melanogaster* e *Ae. aegypti* e estão implicadas na detoxificação de compostos inseticidas (RANSON et al., 2002a; STRODE et al., 2008). As outras quatro classes restantes possuem uma distribuição taxonômica mais abrangente e possuem funções de manutenção na célula (BOARD et al., 2000). Dentre as GSTs das classes Delta e Epsilon, apenas um membro de cada classe (GSTD7 e GSTE8) possui ortólogos (1:1:1) entre *An. gambiae*, *D. Melanogaster* e *Ae. aegypti* (STRODE et al., 2008). É possível que esses dois genes conservados encontrados em *Ae. aegypti* sejam os membros ancestrais das classes Delta e Epsilon, das quais os outros membros evoluíram por uma série de mecanismos, tais como duplicação gênica e diversificação (AYRES et al., 2011; LUMJUAN et al., 2007; STRODE et al., 2008). Diferente das citocromos P450, as GSTs não sofreram expansão em *Ae. aegypti* (**figura 6**). Apesar do menor número de genes, quando comparado ao encontrado no genoma da *D. melanogaster*, esse déficit é parcialmente compensado pelo *splicing* alternativo de duas GSTs em *Ae. aegypti*, aumentando o número de transcritos de 26 para 29 (LUMJUAN et al., 2007). Níveis elevados de GSTs já foram associados à resistência a inseticidas químicos em



populações de *Ae. aegypti* de diferentes partes do mundo (DING et al., 2003; LUMJUAN et al., 2005; MARCOMBE et al., 2012; ORTELLI et al., 2003). Segundo Montella et al. (2007), Melo-Santos et al. (2010) e Lima et al. (2011), elevações na atividade de enzimas GSTs também foram implicadas na resistência a compostos químicos, em populações brasileiras do mosquito.

**Figura 6-** Dendograma construído com seqüências de aminoácidos de GSTs encontradas em *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster*.



Fonte: Lumjuan et al., (2009).

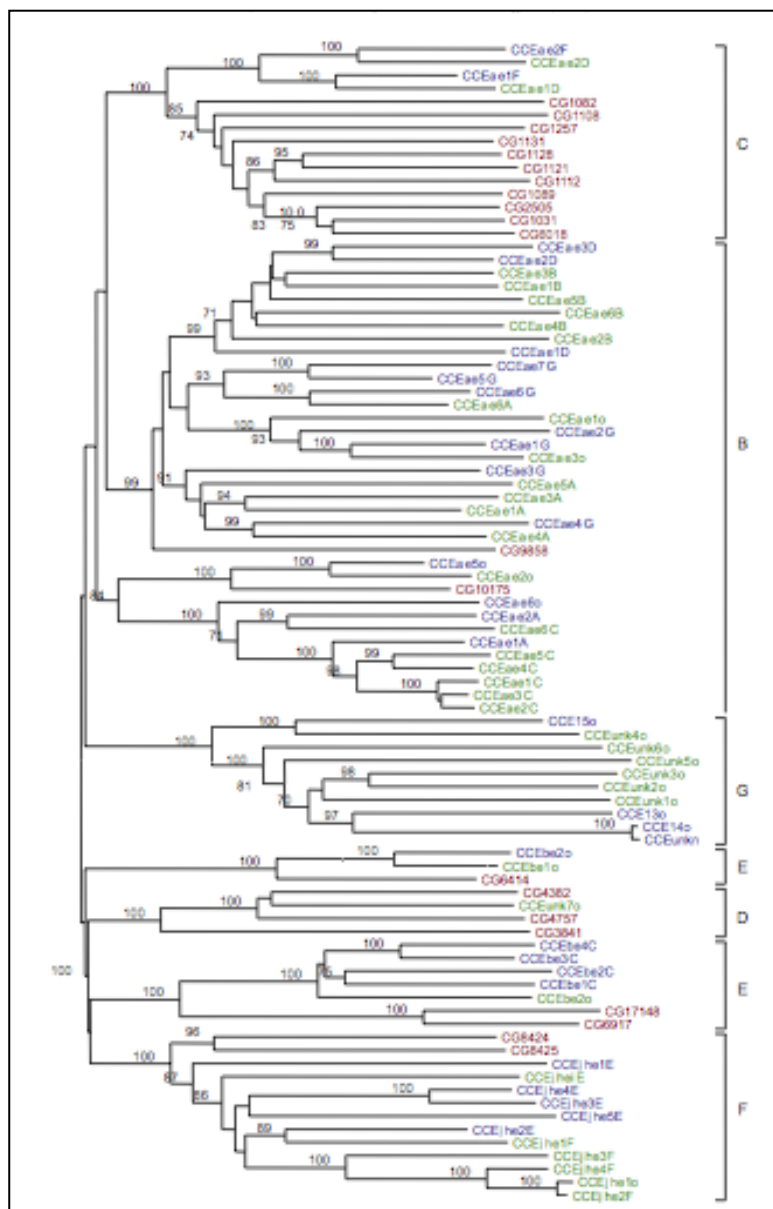
Legenda: Sequências de GSTs provenientes de *Ae. aegypti* encontram-se identificadas em rosa, em azul estão as seqüências de *An. gambiae* e em amarelo, as de *D. melanogaster*.

#### 5.4.4.3 Esterases

As esterases são enzimas multifuncionais pertencentes à superfamília das carboxilesterases. Além das esterases, essa superfamília inclui várias outras enzimas, tais como as proteases, lipases, peroxidase e hidrolases (HOTELIER et al., 2004). Esse grupo de enzimas desempenha um importante papel no metabolismo de compostos endógenos e exógenos, além da realização de uma série de funções cruciais no desenvolvimento e comportamento de insetos, como a degradação de moléculas odoríferas (MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012). Algumas dessas proteínas esterásicas são específicas para determinados substratos, como a esterase do hormônio juvenil e a acetilcolinesterase, enquanto que outras metabolizam substratos inespecíficos, tais como as esterases de função mista (OAKESHOTT et al., 2003). As proteínas pertencentes à superfamília das carboxilesterases não compartilham um alto grau de similaridade nas sequências de DNA e possuem diferentes especificidades de substratos. No entanto, o agrupamento dessas enzimas é baseado em suas similaridades estruturais e na conformação conservada de resíduos no sítio catalítico da enzima (HEMINGWAY et al., 2004; MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012). A maioria das classificações propostas para esse grupo de enzimas é focado nas propriedades catalíticas das esterases, bem como suas interações com os inseticidas. A superprodução de esterases não-específicas como uma resposta à pressão de seleção imposta por inseticidas organofosforados e carbamatos já foi documentada em várias espécies de mosquitos (HEMINGWAY et al., 2004; LIMA et al., 2011; MELO-SANTOS et al., 2010; MONTELLA et al., 2007; STRODE et al., 2012). A resistência mediada por esterases foi extensivamente estudada em mosquitos do gênero *Culex* (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998; LIU et al., 2011; NORRIS; NORRIS, 2011; TOMA et al., 2011). Nestas espécies, o aumento da atividade enzimática é observado em uma ou mais esterases. Por sua vez, essa atividade pode ser mensurada em ensaios bioquímicos, utilizando como substrato os acetatos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -naftil (BROGDON, 1989). Na maioria dos casos, a base genética da elevação da atividade de esterases é devido a um mecanismo de amplificação gênica (BLACKMAN, 1996; MOUCHES et al., 1986; VAUGHAN; HEMINGWAY, 1995). Até o momento, 49 genes de esterases foram identificados no genoma do mosquito *Ae. aegypti*. Esse número excede a quantidade de genes de esterases encontrados em *An. gambiae* e *D. melanogaster*. A maior parte dessa expansão ocorre no clado B das  $\alpha$ -esterases (**figura 7**) (STRODE et al., 2008). Nesse clado são encontrados três *clusters*, cada um contendo cinco a seis enzimas do tipo  $\alpha$ ,

que compartilham 38-91% de homologia. O alto grau de identidade encontrado nas comparações par a par, em conjunto com a falta de ortólogos da  $\alpha$ -esterase entre *An. gambiae* e *Ae. aegypti*, sugerem que, com exceção de dois genes, esse grupo esteja evoluindo rapidamente. Em *Cx. quinquefasciatus*, esses dois genes, chamados de *est $\alpha$ 2* e *est $\beta$ 2* (classificados de acordo com a especificidade de substratos), estão localizados em uma orientação invertida em um mesmo *amplicon*. A amplificação de um ou ambos os genes é considerada a principal causa da resistência a organofosfatos em populações naturais de *Culex* (HAWKES; HEMINGWAY, 2002; HEMINGWAY et al., 1998; PATON et al., 2000; VAUGHAN; ROCHELEAU; FFRENCH-CONSTANT, 1997). Ao contrário da rápida expansão de cópias de outras  $\alpha$ -esterase, esses dois genes (*CCEae1D* e *CCEae2D*) são bem conservados entre espécies de *Culex*, *Anopheles* e *Aedes* e mantém a orientação invertida em todas as espécies (**figura 7**) (STRODE et al., 2008).

**Figura 7-** Dendograma construído com seqüências de aminoácidos de carboxilesterases encontradas em *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster*.



**Fonte:** Strode et al., (2008).

**Legenda:** Sequências de carboxilesterases provenientes de *Ae. aegypti* encontram-se identificadas em verde, em azul estão as seqüências de *An. gambiae* e em vermelho, as de *D. melanogaster*.

## 5.5 Ferramentas moleculares utilizadas na detecção da resistência

Atualmente, as técnicas moleculares permitem a identificação de genes responsáveis por conferir a característica herdável da resistência. A identificação da base genética da resistência fornece evidências sobre o processo responsável pela evolução do fenótipo da resistência a inseticidas químicos (WHO, 2011). Várias ferramentas diagnósticas foram desenvolvidas nos últimos anos para o estudo da resistência a inseticidas químicos. A detecção de mutações do tipo *kdr* (*knockdown resistance*), no gene do canal de  $Na_v$ , conferindo resistência a piretróides em diferentes espécies, vem sendo amplamente estudada nos últimos anos (BADOLO et al., 2012; BRENGUES et al., 2003; DIABATE et al., 2004; ETANG et al., 2006; FRYXELL et al., 2012; JONES et al., 2012; LIMA et al., 2011; LYND et al., 2005; LYND et al., 2010; MARCOMBE et al., 2012; MARTINEZ-TORRES et al., 1998; MARTINS et al., 2009a; MARTINS et al., 2009b; MORGAN et al., 2010; OCHOMO et al., 2012; WANG et al., 2012). Além da detecção molecular de mutações do tipo *kdr*, a identificação de mutações no gene da acetilcolinesterase também tem sido objetivo de estudos envolvendo populações de *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* resistentes a organofosforados (ANTHONY et al., 1995; WEILL et al., 2004a; WEILL et al., 2004b). No entanto, a maioria das ferramentas moleculares utilizadas no diagnóstico da resistência em mosquitos foi desenvolvida para mecanismos de resistência associados à herança monogênica. Como a resistência metabólica pode envolver um grande número de genes, a caracterização destes genes, bem como suas variantes, é de fundamental importância para o futuro desenvolvimento de ferramentas moleculares para o diagnóstico da resistência em mosquitos.

Em *An. gambiae*, a triagem de mutações no gene do canal de  $Na_v$  que conferem resistência a DDT e piretróides tornou-se um componente de rotina de muitas campanhas de controle do vetor (CHANDA et al., 2011; HIMEIDAN et al., 2011; MATHIAS et al., 2011; YEWHALAW et al., 2010). Dado que muitas mutações de resistência são recessivas, o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico molecular permite que os programas de controle identifiquem alelos de resistência quando estes estão em baixa frequência (GARCIA et al., 2009; KELLY-HOPE; RANSON; HEMINGWAY, 2008). A importância da detecção precoce de alelos de resistência foi recentemente demonstrada em estudos, que apontaram que sob forte pressão de seleção, a frequência desses alelos aumentam rapidamente em direção à sua fixação (GARCIA et al., 2009; LYND et al., 2010; MATHIAS et al., 2011). Sendo assim, programas de controle poderão ser adequados a partir dos primeiros sinais de disseminação desses alelos em uma população, quando esses ainda estiverem em baixa frequência.

Nos últimos anos, novas ferramentas, como a técnica de microarranjos, foram desenvolvidas para ajudar na identificação individual de níveis de transcrição de genes de detoxificação. Microarranjos contendo sondas para os genes candidatos de desintoxicação foram desenvolvidos para o vetor *An. gambiae* (DAVID et al., 2005) e também para o *Ae. aegypti* (STRODE et al., 2008). Estes estudos demonstraram que a maior expressão de um gene não é devida à superexpressão transitória causada pela exposição dos adultos ao piretróide permetrina, mas em vez disso, reflete a superexpressão constitutiva de um subconjunto comum de genes de desintoxicação em conjunto com genes que são exclusivamente expressos em cada população (MULLER et al., 2008). O desafio nestes estudos é que as linhagens susceptíveis utilizadas não possuem um *background* genético comum, e os resultados são influenciados pela variação geográfica e o efeito de colonização em colônias de referência (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2012). Em estudo prévio, Strode *et al.* (2012) identificaram por meio da técnica de microarranjos genes associados com a resistência metabólica em uma linhagem altamente resistente ao temephos, a Recife-Resistente (RecR). Esses autores identificaram genes de detoxificação superexpressos tanto em larvas, quanto em indivíduos adultos. Um desses genes, a citocromo P450 *CYP6N12*, apresentou o maior nível de expressão em ambos os estágios de desenvolvimento do mosquito. A análise da expressão do mesmo gene na colônia com resistência revertida, a RecRev, demonstrou que, uma vez interrompida a pressão de seleção imposta pelo temephos, a expressão da *CYP6N12* diminuiu consideravelmente.

No entanto, a técnica supracitada apresenta uma limitação, que é a cobertura gênica do *chip*. Vários outros trabalhos continuam a identificar novos genes implicados na detoxificação de organismos resistentes. Uma estratégia complementar que permite identificar genes candidatos envolvidos na resistência é a construção de mapas de ligação, possibilitando uma análise mais detalhada e com maior resolução do genoma do mosquito. Este tipo de mapeamento vem sendo beneficiado pelo seqüenciamento genômico, pelos mapas densos de marcadores genéticos polimórficos, como os SNPs e microssatélites, e a genotipagem de alta resolução (HART; CLARK, 2010; WEETMAN et al., 2010).

### 5.5.1 Mapas genéticos e identificação de Locos de Caracteres de Quantitativos (QTL)

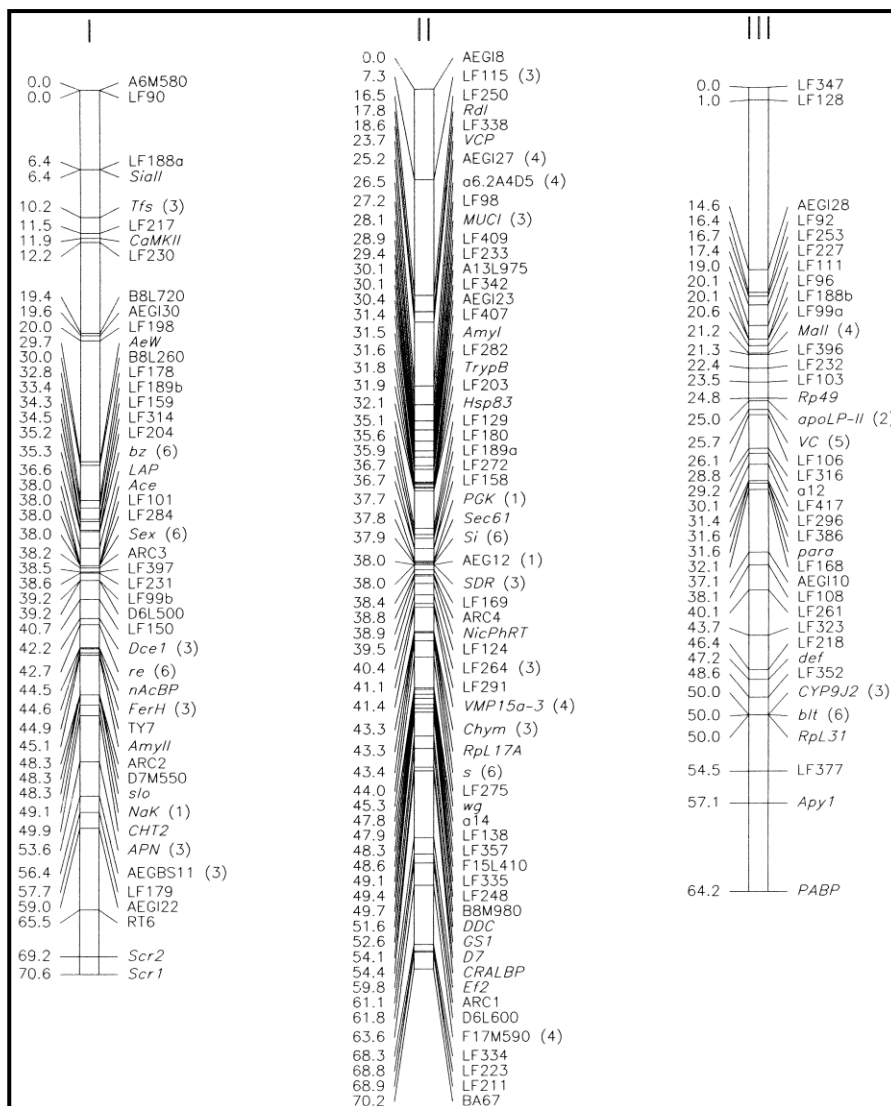
Os mapas genéticos consistem em uma representação da ordenação linear de um grupo de marcadores genéticos em grupos de ligação. Esse tipo de mapeamento é uma maneira de observar a segregação de genes e, conseqüentemente, demonstrar a posição relativa desses

nos cromossomos do organismo estudado (VIEIRA et al., 2006). A construção de mapas genéticos possibilita a análise mais completa de genomas, o detalhamento de características complexas, a localização de regiões genômicas que controlam determinados fenótipos e a quantificação dos efeitos de tais regiões no fenótipo estudado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os resultados obtidos no mapeamento molecular são diretamente influenciados por fatores como a escolha das linhagens parentais, o método de cruzamento a ser utilizado, o tipo e número de marcadores moleculares, bem como o método estatístico-computacional para estimar a ligação e distância entre os marcadores (COLLARD et al., 2005). A localização de regiões genômicas, associadas ao fenótipo de interesse, é baseada na análise da frequência de recombinação entre dois locos, em diferentes gerações de cruzamentos. Em cruzamentos experimentais controlados, quando as proporções genotípicas de dois genes, localizados em um mesmo cromossomo, afastam-se das proporções mendelianas, assume-se que esses locos estejam em ligação gênica (HARTL; JONES, 2001). Diante dessas informações, é possível relacionar a medida de distância genética entre dois locos (centiMorgans – cM) com a porcentagem de recombinação (LYNCH; WALSH, 1998).

Em *Ae. aegypti*, mapas genéticos tem sido o alvo de inúmeros estudos nos últimos anos. Mesmo antes da publicação do genoma do mosquito (NENE et al., 2007), alguns mapas genéticos já tinham sido construídos utilizando marcadores de RFLP (SEVERSON et al., 1993), RAPD (ANTOLIN et al., 1996) e SSCP (FULTON et al., 2001). Severson et al. (2002) construíram um mapa composto de ligação, abrangendo 205 cM, utilizando 141 marcadores de RFLP, SSCP e SNP (**figura 8**).



**Figura 8-** Mapa de ligação genético, representativo dos 3 cromossomos, construído com marcadores de RFLP, SNP e SSCP em *Aedes aegypti*.



**Fonte:** Severson et al., (2002).

**Legenda:** À esquerda dos cromossomos estão as distâncias no mapa em centiMorgans (cM) e, à direita, os marcadores mapeados que estão subdivididos em (1) SNP; (2) SSCP; (3) SNP e RFLP; (4) SSCP e RFLP; (5) SSCP e SNP; (6) marcadores morfológicos.

Microsatélites ou sequências simples repetidas (SSR) consistem de 1 a 6 nucleotídeos repetidos *in tandem*, distribuídos abundantemente em genomas de eucariotos (HANCOCK, 1999). Estes marcadores possuem um alto polimorfismo, decorrente de altas taxas de mutações por loco ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  por geração) e são flanqueados por sequências conservadas. Por essas razões, locos de microsatélites tornaram-se uma poderosa ferramenta para estudos genéticos em diversos organismos (TAUTZ, 1989; TAUTZ; RENZ, 1984; ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). Um grande número de regiões contendo

microssatélites foi encontrado no genoma de *Ae. aegypti*. Os primeiros estudos identificaram 33 marcadores de microssatélites (CHAMBERS et al., 2007; HUBER et al., 1999; SLOTMAN et al., 2007). Posteriormente, Lovin et al. (2009) desenvolveram e validaram um grupo de 31 novos marcadores de microssatélites, demonstrando a abundância dessas regiões no genoma desse mosquito.

Com o desenvolvimento e validação de uma ampla gama de marcadores moleculares neste mosquito, a identificação de novos alelos associados a caracteres complexos, foi facilitada pelos mapas genéticos e mapeamentos de locos de caracteres quantitativos (QTL) (ANTOLIN et al., 1996; BEERNTSEN et al., 1995; BLACK; SEVERSON, 2002; CHAMBERS et al., 2007; FULTON et al., 2001; MORI; SEVERSON; CHRISTENSEN, 1999; MORI et al., 2001; MUNSTERMANN, 1979; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2008; SEVERSON et al., 1997; SEVERSON et al., 2002; SEVERSON et al., 1994a; b; SHIN; MORI; SEVERSON, 2012; ZHONG et al., 2006). O mapeamento de QTL consiste na análise conjunta da segregação de genótipos de marcadores genéticos e de valores fenotípicos quantitativos de indivíduos. Regiões cromossômicas, associadas com a expressão de caracteres quantitativos, são detectadas quando se encontram em desequilíbrio de ligação com algum marcador genético (HART; CLARK, 2010). A técnica de mapeamento de QTL permite testar se determinadas regiões cromossômicas estão associadas com um fenótipo, como a resistência aos inseticidas químicos, além de possibilitar a detecção de novos fatores de transcrição e elementos regulatórios (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2008).

Inúmeros caracteres quantitativos foram analisados utilizando o mapeamento de QTL, tais como: autogenia e tamanho do corpo em *Ae. albopictus* (MORI et al., 2008), susceptibilidade de *Ae. aegypti* ao *Plasmodium gallinaceum* e à *Brugia malayi* (BEERNTSEN et al., 1995; SEVERSON et al., 1995a; SEVERSON et al., 1994a; SEVERSON et al., 1995b; SEVERSON; ZAITLIN; KASSNER, 1999; ZHONG et al., 2006), a competência vetorial para o vírus DENV2 (BOSIO et al., 2000) e a refratariedade do *An. gambiae* ao *Plasmodium cynomolgi* (COLLINS et al., 1997).

A característica poligênica observada na resistência a inseticidas químicos também já foi alvo de mapeamentos de QTL. Duas regiões contendo QTL foram mapeadas em *An. gambiae* resistentes a DDT, uma presente no cromossomo 3 (*rtd1*) e a segunda no cromossomo 2L (*rtd2*) (RANSON et al., 2000). Esses mesmos autores também estudaram através do mapeamento genético a resistência ao piretróide permetrina em *An. gambiae*. Mais uma vez, duas regiões contendo QTLs de maior efeito foram identificadas. A primeira, *rtp1*, é flanqueada pelo gene *Na<sub>v</sub>* no cromossomo III. Enquanto que a segunda, *rtp2*, está presente no

cromossomo III e é flanqueada por um grande cluster de citocromos P450 (RANSON et al., 2004). A resistência a piretróides também foi estudada em mosquitos da espécie *An. funestus*, considerada o principal vetor da malária em algumas regiões do continente africano. Esse estudo evidenciou o envolvimento da resistência metabólica em indivíduos resistentes, uma vez que nenhuma mutação no DNA de moléculas-alvo dos piretróides foi identificada. Uma região de QTL foi encontrada no cromossomo IIR, onde vários genes P450 estão situados (WONDJI; HEMINGWAY; RANSON, 2007; WONDJI et al., 2007). A resistência ao piretróide permetrina em *Ae. aegypti* foi investigada por mapeamento de QTL. Esse estudo demonstrou a presença de dois QTLs de grande efeito no cromossomo III, um correspondente ao gene *Nav* e outro a uma esterase *CCEunk7o*, além de QTLs adicionais de menor efeito para o fenótipo (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2008). Apesar da resistência a piretróides ter sido bem estudada em ambas as espécies acima mencionadas, não há na literatura estudos de mapeamento de QTL para a resistência a inseticidas organofosforados em mosquitos.

## 6 METODOLOGIA

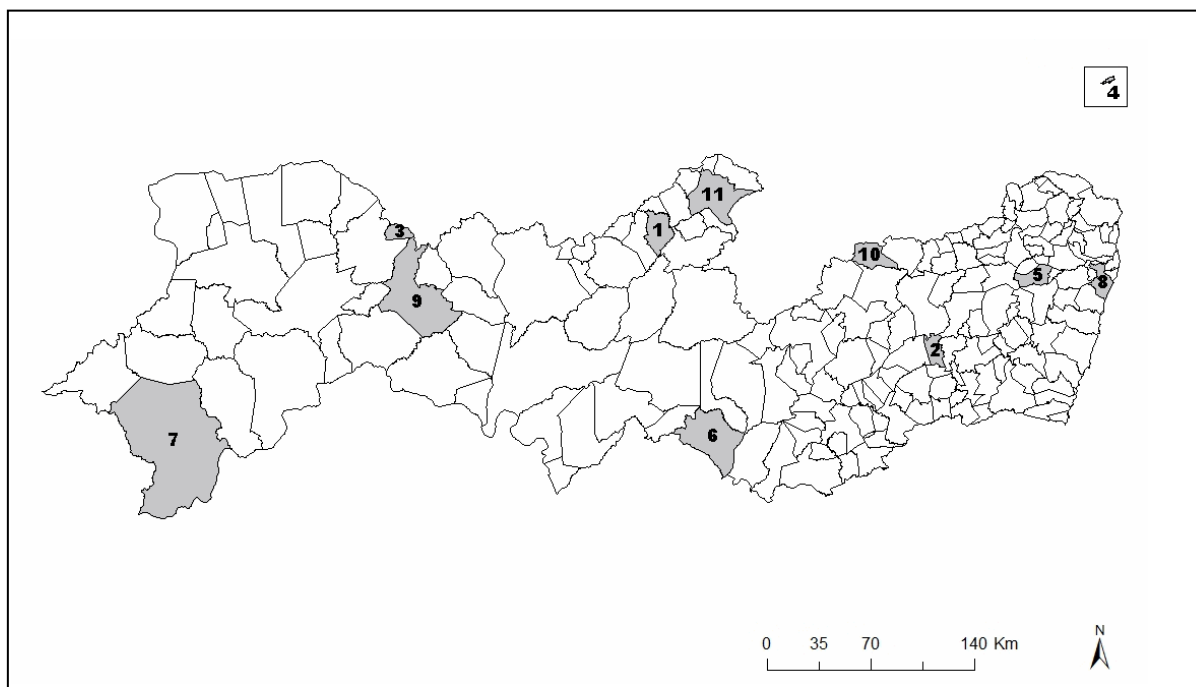
### 6.1 Populações de *Aedes aegypti*

#### 6.1.1 Linhagens de laboratório

Neste estudo, foram utilizadas seis linhagens de *Ae. aegypti* de laboratório, quatro delas susceptíveis a inseticidas químicos: Rockefeller (Rock), Recife - Laboratório (RecLabab), Red-Eye (Red) e Moyo-in-Dry (MoyoD). As colônias Rock e RecLab são mantidas no insetário do Departamento de Entomologia (CPqAM/FIOCRUZ) há mais de 10 anos, e as colônias Red e MoyoD são mantidas no insetário da Universidade de Notre Dame (Indiana – EUA), por mais de 40 anos, sem nunca terem sido expostas a qualquer inseticida (CRAIG; HICKEY, 1967; SEVERSON et al., 1994a; 1994b). A linhagem Recife-Resistente (RecR), foi originada da cidade de Araripina (localizada a aproximadamente 690 km da cidade de Recife), é altamente resistente ao organofosforados temephos, ao qual tem sido exposta continuamente (RR = 200). Além dessa, foi utilizada também nesse estudo uma linhagem que teve seu *status* de resistência ao temephos revertido, a Recife-Reversa (RecRev), derivada da linhagem RecR e mantida sem exposição ao temephos por mais de 15 gerações. Os processos de estabelecimento, manutenção e seleção/reversão destas duas últimas linhagens encontram-se descritos em Melo-Santos et al. (2010).

#### 6.1.2 Populações de campo

Amostras de mosquitos provenientes de 11 municípios do estado de Pernambuco foram gentilmente cedidas por Ana Paula Araújo, que fazem parte de seu trabalho de doutorado no Departamento de Entomologia do CPqAM. Os locais de coletas foram os municípios: Afogados da Ingazeira, Agrestina, Cedro, Fernando de Noronha, Glória do Goitá, Itaíba, Petrolina, Recife, Salgueiro, Santa Cruz do Capibaribe e São José do Egito (**figura 9**). Além destas, três outras populações do mosquito foram coletadas em Juazeiro do Norte, Crato e Barbalha, localizados na região sul do estado do Ceará. Todas as populações foram submetidas previamente a bioensaios com garrafas impregnadas com cipermetrina (piretróide) e classificadas em susceptíveis e resistentes.

**Figura 9-** Mapa do Estado de Pernambuco mostrando a origem das populações naturais de *Aedes aegypti*.

**Fonte:** Adaptado de IBGE (2012).

**Legenda:** Municípios: 1.Afogados da Ingazeira; 2.Agrestina; 3.Cedro; 4.Fernando de Noronha; 5.Glória do Goitá; 6.Itaíba; 7.Petrolina; 8.Recife; 9.Salgueiro; 10.Santa Cruz do Capibaribe; 11.São José do Egito

## 6.2 Cruzamentos e mapeamento dos Locos de Caracteres Quantitativos (QTL)

### 6.2.1 Cruzamentos recíprocos

Quatro linhagens de *Ae. aegypti* de laboratório foram utilizadas para os cruzamentos recíprocos e mapeamento de QTL: a RecR, Rock, Red e MoyoD. Inicialmente, os cruzamentos foram conduzidos no insetário do Departamento de Entomologia do CPqAM, entre a linhagem resistente RecR e a susceptível Rock, seguindo o protocolo conhecido como *Advanced Intercross Line* (AIL), estabelecido por Darvasi e Soller (1995). A geração parental foi obtida a partir de 40 casais, separados em gaiolas individuais. Vinte dessas gaiolas foram formadas por casais: RecR machos (♂) e Rock fêmeas (♀); enquanto que as restantes foram formadas por: Rock (♂) e RecR (♀). Os casais formados, em suas respectivas gaiolas, foram mantidos por 5 dias com alimentação com sacarose 10%, em sala sob condições controladas: 26 °C ± 2 °C, fotoperíodo de 12h/12h. No 6º dia os machos foram aspirados de cada gaiola, separados em microtubos de 1,5 ml estéril, etiquetados e

acondicionados em *freezer* – 80 °C. Para a obtenção dos ovos, cada gaiola recebeu um copo plástico (7,5 x 4,5 x 5 cm), contendo internamente um papel filtro embebido em água. As fêmeas de cada casal foram alimentadas individualmente no 6º, 8º e 11º dia, realizando o repasto sanguíneo em galinhas (*Gallus gallus*). A cada repasto sanguíneo, os papéis de filtro foram trocados e verificados quanto à presença de ovos. No 13º dia, as fêmeas foram aspiradas e congeladas, seguindo mesmo protocolo utilizado para os machos. Os ovos obtidos de cada casal parental foram colocados em recipientes plásticos individuais, contendo água para eclosão das larvas. A geração F<sub>1</sub> foi formada com três gaiolas de uma pupa ♂ e outra ♀ derivada de cada família parental, separadas até o desenvolvimento na forma adulta. O protocolo de cruzamentos dos indivíduos adultos e obtenção de ovos utilizados na F<sub>1</sub> foi o mesmo realizado para a geração parental. Após abertura dos ovos representativos da F<sub>2</sub>, bioensaios com temephos foram realizados com as larvas provenientes do 4º estágio de desenvolvimento (L4). Este bioensaio seguiu o protocolo descrito pela OMS (1981), utilizando uma dose discriminatória determinada como duas vezes a dose letal para matar 99% (LC<sub>99</sub>) da linhagem Rock (0,038 mg/L). Após a leitura do bioensaio, todos os indivíduos obtidos foram classificados como resistentes (sobreviventes) e susceptíveis (mortos), e armazenados em microtubos de 1,5 ml à – 80 °C para posterior genotipagem.

Após a identificação de um baixo número de marcadores informativos nos indivíduos provenientes dos cruzamentos acima descritos, um segundo grupo de cruzamentos recíprocos foi realizado na Universidade de Notre Dame, no insetário do Laboratório de Genética de Vetores, sob a orientação do Dr. David W. Severson. Esses experimentos utilizaram um protocolo diferente de cruzamentos do anteriormente empregado, além do uso de duas outras linhagens de *Ae. aegypti*. O primeiro passo desse novo grupo de cruzamentos foi a realização de bioensaios do tipo dose-exploratória com o OP temephos. Esses testes foram conduzidos em 1200 larvas (L3/L4) das linhagens Red e MoyoD, utilizando a metodologia descrita pela ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (1981). Esses ensaios permitiram testar a susceptibilidade destas populações ao temephos e, após análise dos resultados em *probits* (FINNEY, 1971). Foi calculada a dose exata de temephos para diferenciar o fenótipo de indivíduos provenientes da segunda geração dos cruzamentos.

A geração parental foi iniciada com a sexagem das pupas de cada uma das linhagens. Após a emergência dos adultos, os cruzamentos recíprocos foram estabelecidos com um macho (♂RecR) e cinco fêmeas (♀Red ou ♀MoyoD) por gaiola. Mosquitos foram alimentados com água açucarada e deixados para copular por 5 dias. No quinto dia, o macho de cada gaiola foi retirado e congelado a – 80 °C, e as fêmeas realizaram repasto sanguíneo

em camundongos anestesiados. Uma vez ingurgitadas, as fêmeas foram separadas em frascos de vidro cilíndricos, contendo 1 ml de água e papel filtro para oviposição. Após 3 dias, as fêmeas foram aspiradas e congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de DNA.

Para obtenção da  $F_1$ , os ovos provenientes de cada cruzamento recíproco foram colocados em recipientes plásticos individuais contendo água para eclosão das larvas e onde foram mantidas até a fase de pupa. Essas pupas foram separadas por sexo e família ( $\text{♂RecR} \times \text{♀Red}$  ou  $\text{♂RecR} \times \text{♀MoyoR}$ ). Cada cruzamento foi formado com um macho e sete fêmeas provenientes do mesmo cruzamento parental. O processo de alimentação e oviposição seguiu o mesmo protocolo descrito acima. Os ovos que precederam o início da geração  $F_2$  foram secos em estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posterior eclosão e bioensaio-exploratório das larvas com o temephos.

#### 6.2.2 Genotipagem por marcadores moleculares

O DNA de indivíduos provenientes de ambos os cruzamentos foi extraído individualmente homogeneizando a amostra em  $80\text{ }\mu\text{l}$  de NaOH 2N. Posteriormente, as amostras foram incubadas a  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, sendo em seguida acrescentados  $28,8\text{ }\mu\text{l}$  de Tris 1M (pH 8,0) e  $91,2\text{ }\mu\text{l}$  de ddH<sub>2</sub>O. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos e o volume completado para  $200\text{ }\mu\text{l}$  (RUDBECK; DISSING, 1998). O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific® - Waltham/EUA).

A genotipagem de indivíduos do cruzamento RecR x Rock foi realizada utilizando 35 marcadores de SNPs e RFLPs e 52 de microssatélites, previamente descritos e mapeados no genoma do *Ae. aegypti* (LOVIN et al., 2009; SEVERSON et al., 2002). Desses marcadores, 38 foram mapeados no cromossomo I, 15 no cromossomo II e 20 no cromossomo III. O restante dos marcadores tem localização desconhecida no genoma do mosquito. Todos esses marcadores foram testados na geração parental de cada AIL e, quando identificados como polimórficos, utilizados para a genotipagem de 20 indivíduos da geração  $F_2$ . No segundo grupo de cruzamentos (RecR x MoyoD e RecR x Red), os indivíduos parentais foram submetidos à genotipagem utilizando 76 marcadores de microssatélite, dos quais 52 foram previamente desenvolvidos e mapeados Lovin e colaboradores (LOVIN et al., 2009). Outros 24 novos marcadores de microssatélites foram identificados em *supercontigs* contendo genes de esterases. As sequências nucleotídicas desses *supercontigs* foram obtidos do VectorBase

(<http://www.vectorbase.org>), a partir do número de acesso de diferentes genes de esterases previamente publicados (STRODE et al., 2008). Regiões contendo microssatélites foram identificadas nas sequências de cada *supercontig*, utilizando o programa *Tandem Repeats Finder* (TRF) (BENSON, 1999). Os resultados obtidos no TRF foram analisados, utilizando como parâmetros de inclusão apenas as repetições *in tandem* de 2 a 4 nucleotídeos, com número total de repetições menor do que 30. Aproximadamente 800 pb do *supercontig* contendo o microssatélite foram submetidos ao programa *Primer3* v.4.0 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) para o desenho dos *primers*. Apenas os *primers* que amplificam fragmentos entre 150-400 pb foram considerados na análise final. Antes da síntese dos iniciadores, a sequência de cada *amplicon* foi verificada no VectorBase para identificar se a mesma se encontrava em cópia única no genoma do *Ae. aegypti*. Informações sobre os *primers* utilizados encontram-se no **apêndice A e B**. Foram realizadas PCRs *multiplex* com combinações de *primers* (no máximo 6 *primers* por combinação) que não resultassem em sobreposições de fragmentos. As reações foram preparadas em um volume final de 25 µl, contendo: 200 ng de DNA molde, 1 U de Taq DNA polimerase (PROMEGA<sup>®</sup> – Agora/EUA), 1X tampão da enzima (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 9.0, 0.1% Triton X), 200 µM de dNTP, 10 pmoles de cada *primer* e MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM. A amplificação foi realizada em um termociclador (Eppendorf), utilizando as seguintes condições: 94 °C por 1 minuto, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. Por fim, uma temperatura final de extensão a 72 °C por 10 minutos foi utilizada antes de a reação ser finalizada a 4 °C. Os produtos de PCR foram checados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo e visualizada em translumidor de luz U.V.

Como todas as PCRs foram realizadas em *multiplex*, os fragmentos resultantes da reação foram separados em gel de poliacrilamida 4% (31 cm x 38,5 cm x 0,4 cm) em condições desnaturantes. Para a eletroforese das amostras foram utilizadas cubas verticais Modelo S2 (Life Technologies<sup>®</sup> – Carlsbad/EUA), onde os géis foram pré-aquecidos a 45 °C antes da aplicação das amostras. Durante o pré-aquecimento, 5 µl da reação de PCR foram misturadas a 3 µl de DLM (0,1 ml de NaOH 1 N, 9,5 ml de formamida, 0,005 g de azul de bromofenol e 0,005 g de xileno cianol diluídos em 10 ml de ddH<sub>2</sub>O), desnaturadas em termociclador a 95 °C por 2 minutos e os tubos imediatamente colocados em gelo. Após desnaturação, 6 µl da mistura foram aplicadas em cada poço do gel. Uma mistura de 2,5 µl do marcador de peso molecular Ladder 100 (Invitrogen<sup>®</sup> – Carlsbad/EUA) e 2,5 µl do tampão DLM foram aplicados ao primeiro e último poços da placa. As condições de eletroforese



foram 2000 V, miliamperagem livre por aproximadamente 1 hora. A coloração foi iniciada com a incubação do gel com a solução de fixação-parada por 20 minutos a 60 RPM (200 ml de ácido acético glacial e 1800 ml de ddH<sub>2</sub>O), seguida de duas lavagens com 2 L de ddH<sub>2</sub>O, cada uma por 2 minutos a 60 RPM. A coloração do gel foi realizada em recipiente escuro contendo a solução de coloração (2 g de nitrato de prata, 2 L de ddH<sub>2</sub>O e 3 ml de formaldeído a 37%), incubada por 30 minutos a 60 RPM. Após a coloração, o gel foi lavado com 2 L de ddH<sub>2</sub>O por 10 segundos, e em seguida imerso na solução reveladora (60 g de carbonato de cálcio, 2 L de ddH<sub>2</sub>O, 3 ml de formaldeído a 37% e 400 µl de tiosulfato de sódio a 10 mg/ml) por 5 minutos. Após a visualização das bandas, a solução fixadora-parada foi acrescentada à mistura para interromper o processo de revelação. Em seguida, o gel foi lavado com 2 L de ddH<sub>2</sub>O por 10 minutos, e secos à temperatura ambiente por 24 horas. Todas as soluções utilizadas no processo de coloração foram preparadas minutos antes. Após secagem, os géis foram analisados em mesa de luz branca e posteriormente escaneados.

Uma vez identificados os locos polimórficos na geração parental, os *primers* selecionados foram marcados com fluorescência (6-FAM<sup>®</sup>, HEX<sup>®</sup>, NED<sup>®</sup>), reorganizados em novos grupos de *multiplex* e amplificados seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. Os produtos de PCR foram diluídos em ddH<sub>2</sub>O, de acordo com a intensidade de banda observada em gel de agarose a 2%. Para cada reação submetida ao analisador de fragmentos, foi preparada uma solução contendo 1 µl do produto de PCR diluído, 8,8 µl de Formamida HiDi<sup>®</sup> e 0,2 µl do padrão Rox 400HD<sup>®</sup> (Applied Biosystems<sup>®</sup> - Foster City/EUA). Essa mistura foi desnaturada a 95 °C por 2 minutos e imediatamente colocadas em gelo. As reações de análise de fragmentos foram realizadas em um sequenciador ABI 3730 e os fragmentos obtidos foram analisados com o GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems<sup>®</sup> - Foster City/EUA). Todos os indivíduos fenotipados da F<sub>2</sub> dos cruzamentos recíprocos foram genotipados com os marcadores polimórficos marcados com fluorescência, utilizando o mesmo protocolo acima descrito.

### 6.2.3 Análise Estatística

O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a associação entre os polimorfismos observados nos diferentes locos e a resistência ( $p < 0.05$ ) em cada família dos cruzamentos, tendo como hipótese nula que a susceptibilidade ou resistência a temephos era igual em cada grupo de genótipos. Estes genótipos ainda foram analisados quanto ao equilíbrio de Hardy-

Weinberg usando o Arlequin v.3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Apenas os marcadores com herança mendeliana foram utilizados para a construção dos mapas de ligação.

O dados obtidos com a genotipagem dos locos com herança mendeliana foram submetidos à análise de ligação multipontual com o programa MapMaker/QTL (LANDER et al., 1987). A possibilidade de ligação entre dois locos foi testada considerando um LOD (*Logarithm of Odds*) de 3.0, como limiar de significância. Frequências de recombinação foram convertidas em distâncias no cromossomo em centiMorgans (cM), usando a função de Kosambi (KOSAMBI, 1994). O programa R, com o auxílio do pacote R/qtl, foi utilizado para a identificação de possíveis regiões cromossômicas contendo locos de caracteres quantitativos (QTL). Este programa contém um poderoso método computacional para mapeamento de QTL, o Modelo Oculito de Markov (HMM), que facilita a identificação de erros de genotipagens. O algoritmo EM (*expectation-maximization*) foi escolhido para a análise devido à capacidade de maximizar a estimativa de verossimilhança com dados incompletos.

#### 6.2.4 Análise de genes de esterases presentes em região de QTL

##### 6.2.4.1 Sequenciamento de genes de esterase

Após o mapeamento de um QTL presente no cromossomo II de ambos os cruzamentos recíprocos, análises de bioinformática nessa região revelaram a presença de dois clusters contendo genes de esterases. Dois *supercontigs*, que estavam dentro de regiões cromossômicas contendo QTL, foram sequenciados e analisados quanto à presença de possíveis SNPs associados com a resistência ao temephos. Os genes contidos nesses *supercontigs* foram obtidos do VectorBase e o programa *Primer3* v0.4.0 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) utilizado para o desenho dos *primers* (**apêndice B**). Inicialmente, os indivíduos da geração parental foram sequenciados e analisados quanto à presença de mutações distintas entre macho e fêmea parental de cada família. Uma vez detectadas essas mutações na F<sub>0</sub>, cinco indivíduos resistentes e cinco susceptíveis da F<sub>2</sub> de cada família foram sequenciados. Os produtos de PCR foram purificados com o *QIAquick PCR purification kit* (QIAGEN<sup>®</sup> - Venlo/Holanda), de acordo com o protocolo do fabricante e submetidos à reação do sequenciamento, utilizando o *Big Dye Terminator Ready Reaction Kit* v1.1 (Applied Biosystems<sup>®</sup>). Em cada reação foram utilizados 0,5 µl do *Terminator Ready Reaction* v.1.1 (Applied Biosystems<sup>®</sup> - Foster City/EUA), 2,0 µl do tampão de sequenciamento ABI, 5 pmol

de cada *primer*, 50-60 ng do DNA molde e 10 µl de água ultrapura (Millipore® - Billerica/MA). O sequenciamento foi realizado em ambos os sentidos da fita de DNA, e as reações de sequenciamento realizadas em um termociclador (Eppendorf® - Hamburgo/Alemanha), utilizando as seguintes condições: 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 50 °C por 5s e 60 °C por 4 minutos. A reação foi novamente purificada, desta vez utilizando colunas *Centri-Sep* (Princeton Separations® - Freehold/EUA), liofilizadas em um concentrador e ressuspendidas em 15 µl de *HI-DI* (formamida) antes de serem colocadas no sequenciador ABI Prism 3700 *DNA Analyzer* (Applied Biosystems® - Foster City/EUA). Os eletroferogramas foram analisados com o programa Chromas Lite e BioEdit, enquanto que o Editseq e SeqMan (pacote de programas do DNASTAR) foram usados para editar as sequências obtidas e montar os *contigs* de cada gene de esterase, respectivamente.

#### 6.2.4.2 qPCR em Tempo Real de genes de esterase

PCRs quantitativas em Tempo-Real (qRT-PCR) foram feitas para comparar a expressão relativa de genes de esterases em indivíduos resistentes, utilizando os susceptíveis como referência do estudo. RNA total de larvas individuais, provenientes dos bioensaios com a F<sub>2</sub> de cada uma das famílias, foi extraído utilizando o RNeasy Mini Kit (QIAGEN® - Venlo/Holanda). Em seguida, essas amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen® - Carlsbad/EUA) e normalizadas para 100 ng antes da síntese do cDNA com oligo-dT (Invitrogen® - Carlsbad/EUA). O gene *rps17* (AAEL004175-RA) foi utilizado como controle endógeno (LAN; FALLON, 1992). *Primers* para os diferentes genes de esterases estão descritos no **apêndice C**. A qRT-PCR foi realizada com o *Quanti Tect SYBR Green PCR kit* (QIAGEN® - Venlo/Holanda), em triplicatas, sob as seguintes condições: 15 minutos a 95 °C (ativação da Taq polimerase); 40 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C e 30 segundos a 72 °C. A eficiência da PCR foi determinada pela amplificação seriada de diluições do cDNA de um indivíduo susceptível e consequente obtenção das curvas-padrão para cada gene. A expressão relativa das esterases foi calculada a partir da comparação dos resultados de expressão dos genes obtidos de indivíduos susceptíveis e resistentes, utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Diferenças nos valores de expressão relativa entre indivíduos susceptíveis e resistentes foram testadas utilizando o método não-paramétrico de Wilcoxon, tendo como hipótese nula que o valor do  $\Delta\Delta C_T$  era igual a 0 (YUAN et al., 2006).

### 6.3 Polimorfismo da região 5' do gene da P450 *CYP6N12*

Visando identificar polimorfismos na região 5' UTR da *CYP6N12*, possivelmente contendo a região regulatória do gene, indivíduos resistentes e susceptíveis foram submetidos a reações de sequenciamento. Adicionalmente, foi feito um *screening* do polimorfismo observado nas linhagens de laboratório (RecR e RecLab) e em mosquitos provenientes de populações naturais de *Ae. aegypti*. Além disso, a associação do polimorfismo com a resistência foi testada através de ensaio com gene repórter e via PCR em Tempo-Real (qRT-PCR).

#### 6.3.1 Sequenciamento da região 5' do gene da P450 *CYP6N12*

DNAs das linhagens RecR, RecRev e Rockefeller foram extraídos individualmente, de acordo com o protocolo descrito por Ayres et al. (2003). Os *primers* para a sequência da região 5' do *CYP6N12*, depositada no Vectorbase (AAEL009124) foram desenhados utilizando o *software Primersselect*, disponível no pacote DNASTAR<sup>®</sup> (Lasergene 7.1). O *primer forward* (5UTRfw: 5'-GCTTTGCTGTGTAGCCGCGA-3') anelava-se a 716 pb do códon ATG do gene, enquanto que o *primer reverso* (5UTRrev: 5'-TCCCAGCCGGGAAGTACGAGG-3') anela 129 pb após do sítio ATG, gerando a amplificação de um fragmento de 845 pb (**apêndice D**). As condições de PCR foram de 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C e 2 min a 72 °C, com uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o *kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*<sup>™</sup> (Amersham Pharmacia Biotech<sup>®</sup> - Uppsala/Suécia), e clonados utilizando o CloneJET<sup>™</sup> PCR Cloning Kit (Fermentas<sup>®</sup> - Waltham/EUA). Os plasmídeos foram purificados utilizando QIAprep *spin miniprep kit* (QIAGEN<sup>®</sup> - Venlo/Holanda) e sequenciados em ambos os sentidos, num sequenciador capilar ABI 3100 (Applied Biosystems<sup>®</sup> - Foster City/EUA). As sequências foram editadas e analisadas através do programa *CodonCode Aligner* (versão 3.7.1.1).

#### 6.3.2 *Screening* do polimorfismo encontrado na região 5' do gene da *CYP6N12* em populações naturais de *Aedes aegypti*

A presença do polimorfismo observado na região 5' do gene da *CYP6N12* nas colônias RecR e Rock foi investigado em populações naturais de *Ae. aegypti*. Novos *primers*

foram desenhados para permitir a genotipagem dos indivíduos em gel de agarose. Utilizando o mesmo protocolo acima descrito, o *primer forward* (5UTRsnp<sub>fw</sub>: 5'-GTCCATAACTATAACATTTAACGC-3') e o *primer reverso* (5UTRsnp<sub>rev</sub>: 5'-CGATAAAGAAAGGGTTTTTAGG-3') amplificaram fragmentos de 364 pb (alelo S) e/ou 377 pb (alelo R) (**apêndice D**). Estes fragmentos foram fracionados através de eletroforese em gel de agarose 2,5%. A genotipagem dessa região foi realizada em aproximadamente 20 indivíduos previamente fenotipados como susceptíveis ou resistentes, provenientes das cidades de Afogados da Ingazeira, Agrestina, Cedro, Fernando de Noronha, Glória do Goitá, Itaíba, Petrolina, Recife, Santa Cruz do Capibaribe e São José do Egito. O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a associação entre as frequências alélicas e o fenótipo ( $P < 0.05$ ) em cada localidade, tendo como hipótese nula que a frequência do alelo R era igual nos indivíduos susceptíveis e resistentes. O teste de *Odds Ratio* (OR) foi utilizado para testar quantas vezes a frequência do alelo R é maior entre os indivíduos resistentes, quando comparados aos susceptíveis, tendo a mesma hipótese nula utilizada no teste exato de Fisher.

### 6.3.3 Associação entre a superexpressão do *CYP6N12* e a presença do polimorfismo observado na região 5' do gene

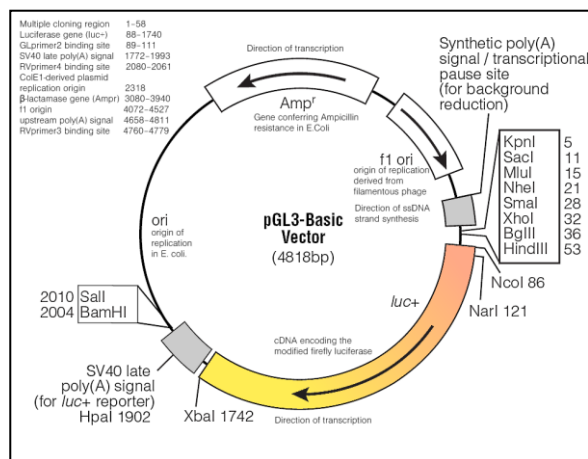
Com o objetivo de avaliar se a superexpressão do gene está associada com a presença do polimorfismo encontrado, amostras de RNA e DNA foram extraídas de amostras das linhagens RecR e RecRev utilizando o *AllPrep DNA/RNA/Protein kit* (QIAGEN® - Venlo/Holanda), de acordo com o protocolo do *kit*. O DNA foi usado para a genotipagem (presença ou ausência do polimorfismo) e o RNA foi usado na quantificação da expressão do gene *CYP6N12* por qRT-PCR. RNA total de indivíduos da RecLab foram extraídos utilizando o protocolo de extração de RNA por Trizol, seguindo o protocolo do fabricante. RNAs foram tratados com a turbo DNase (Ambion® - Carlsbad/EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Todas as amostras foram estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até sua utilização. Duzentos nanogramas (200 ng) de RNA total de cada amostra serviu como molde para a síntese de cDNA utilizando a enzima AMV *Cloned* transcriptase reversa (Invitrogen® - Carlsbad/EUA), com oligo-dT<sub>20</sub> (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. Reações de qRT-PCR foram realizadas com *QuantiTect SYBR Green PCR kit* (QIAGEN® - Venlo/Holanda), utilizando SYBR Green 1X e 0,2  $\mu\text{M}$  de cada *primer* (Fw: 5'-CGATCAATGTATCAACGAGTCCCTAAGG-3' e Rev: 5'-TATGAGGCGATGCAAGACATGC-3'). A eficiência da PCR foi determinada pela

amplificação seriada de diluições de um cDNA da RecLabab e consequente obtenção das curvas-padrão para o gene. A qRT-PCR foi normalizada usando como referência o gene *rpl8* (LAN; FALLON, 1992). A expressão relativa do gene *CYP6N12* foi calculada nas linhagens RecR e RecRev, em comparação à expressão do gene na linhagem RecLabab, utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

#### 6.3.4 Associação entre o polimorfismo presente na região 5' UTR do gene da P450 *CYP6N12* e a regulação do gene através de ensaios com gene repórter luciferase

Ensaio com o gene repórter luciferase foram utilizados para avaliar o papel do polimorfismo como possível regulador dos níveis de transcrição da *CYP6N12*. Sequências dessa região gênica foram obtidas de indivíduos da RecR, RecRev e Rock, clonadas com o *CloneJET<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit* (Fermentas<sup>®</sup> - Waltham/EUA), purificadas utilizando o *QIAprep spin miniprep kit* (QIAGEN<sup>®</sup> - Venlo/Holanda) e sequenciadas num sequenciador capilar ABI 3100 (Applied Biosystems<sup>®</sup> - Foster City/EUA), de acordo com o descrito no tópico 6.3.1. A partir dessas sequências, três pares de *primers* foram desenhados contendo um sítio de reconhecimento da enzima *HindIII*. Esse sítio facilitou a clonagem das sequências no vetor repórter pGL3-*Basic* (Promega<sup>®</sup> - Agora/EUA). As PCRs foram realizadas utilizando a enzima *Phusion high fidelity polymerase* (Fermentas<sup>®</sup> - Waltham/EUA), seguindo a metodologia estabelecida pelo fabricante. Os fragmentos foram clonados com o mesmo sistema descrito anteriormente, seguido da excisão dos fragmentos por digestão com a endonuclease *HindIII*. Em seguida, os fragmentos foram ligados ao vetor repórter pGL3-*Basic* (**figura 10**) e transformados em células competentes XL1-Blue (Agilent<sup>®</sup> - Santa Clara/EUA). O *Qiagen effectene transfection reagent* (Qiagen<sup>®</sup> - Venlo/Holanda) foi utilizado para transfectar os constructos e o *Dual-Luciferase Reporter Assay* (Promega<sup>®</sup> - Agora/EUA) em células eucarióticas. Os fragmentos foram testados em ambas as direções, e o vetor pGL3, sem o inserto, foi utilizado como controle da reação. Aproximadamente 600 ng do constructo com o gene repórter foram utilizados na co-transfecção com 1 ng do controle interno (o gene *actin-Renilla*) em 60 µl tampão de condensação de DNA, 4,8 µl do *enhancer* e 6 µl de *effectene*. A mistura foi incubada a 27 °C por 48 horas, seguido de lavagem das células com tampão PBS. As células foram lisadas em 1000 µl do tampão *passive lysis* (Promega), e a atividade da luciferase quantificada em luminômetro (EG&G Berthold<sup>®</sup> - Bad Wildbad/Alemanha). A atividade do constructo-luciferase foi normalizada pela atividade da *Renilla*-luciferase. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

**Figura 10-** Vektor repórter PGL3-Basic utilizado na quantificação da expressão de luciferase regulada pelo possível promotor da P450 *CYP6N12*



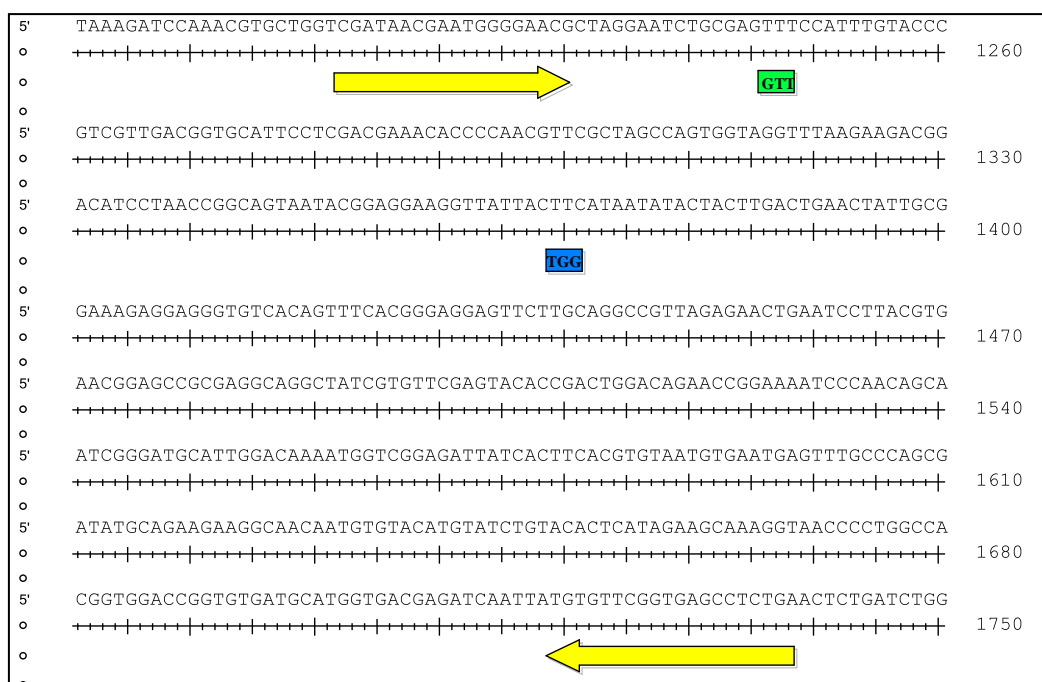
Fonte: Promega (2012).

#### 6.4 Screening das mutações F290V e F455W do gene da AChE

Visando identificar a presença de mutações no gene da acetilcolinesterase, PCRs foram realizadas para amplificar uma região, localizada no 5º éxon do gene, na qual foram identificadas duas mutações previamente associadas com a resistência em diferentes espécies de mosquito: a mutação F290V, encontrada em mosquitos resistentes da espécie *Cx. pipiens* (ALOUT et al., 2007a; ALOUT et al., 2007b), e a F455W, encontrada em *Cx. tritaeniorhyncus* resistentes (NABESHIMA et al., 2004). Para este ensaio, dez adultos da F<sub>17</sub> da RecR e 10 adultos da linhagem Rock foram analisados. Os primers (Set5F: 5'-CGATAACGAATGGGGAACG-3' e Set5R: 5'-TCAGAGGCTCACCGAACACA-3) foram desenhados com base no cDNA da AChE (EF209048 – MORI et al., 2001), utilizando o software *Primerselect*, disponível no pacote DNASTAR (Lasergene 7.1) (figura 11). O fragmento amplificado corresponde a uma região de 507 pb do gene. Cada PCR continha 1 U de Taq polimerase (Promega® - Agora/EUA), 0,5 mM dNTPs, 2 µM de cada primer, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 20 ng de DNA. As condições de PCR foram: 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C e 2 min a 72 °C, com uma extensão final de 10 min a 72 °C. Produtos de PCR foram purificados utilizando *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (Amersham Pharmacia Biotech® - Uppsala/Suécia) e sequenciados em ambas

as direções, utilizando um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems® - Foster City/EUA). A qualidade das sequências, edição e análise foram realizadas através do software BioEdit (versão 7.0.4.1

**Figura 11-** Localização dos *primers* e das duas mutações estudadas no gene da acetilcolinesterase do mosquito *Aedes aegypti*.



**Fonte:** Dados do autor.

**Legenda:** As setas em amarelo representam a localização dos *primers* utilizados para a amplificação de 507 pb do gene da AChE (EF209048). Os sítios das mutações F290V e F455W encontram-se destacados em verde e azul, respectivamente.

## 6.5 Polimorfismos do gene do canal de sódio dependente de voltagem ( $Na_v$ )

Com o objetivo de associar a presença de polimorfismos encontrados no gene do canal de sódio dependente de voltagem com a resistência ao inseticida cipermetrina, duas mutações foram estudadas em três populações de *Ae. aegypti* do Estado de Ceará: a Ile1011Met e a Val1016Ile (BRENGUES et al., 2003; MARTINS et al., 2009a; MARTINS et al., 2009b; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007). Os *primers* para ambas as mutações foram desenhados dentro do sexto segmento (S6) do domínio II da proteína do canal de sódio, como descrito por Saavedra-Rodriguez e colaboradores (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007) e Martins e colaboradores (MARTINS et al., 2009b). O DNA de cada mosquito foi extraído



com DNazol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. O volume final foi ajustado para 50 µl, utilizando 1X tampão de Tris-EDTA. A mutação Ile1011Met foi estudada por sequenciamento, enquanto que a Val1016Ile foi analisada por PCR diagnóstica. Ambas as reações de PCR foram realizadas utilizando 1 U de Taq polimerase Pfu (Promega® - Agora/EUA), 0,5 mM dNTPs, 2 µM de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 20 ng de DNA. As condições de PCR foram: 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 58 °C e 2 minutos a 72 °C, com uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados com o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (Amersham Pharmacia Biotech® - Uppsala/Suécia) e ambas as fitas de DNA sequenciadas, utilizando um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems® - Foster City/EUA). Eletroferogramas foram analisados com BioEdit software (versão 7.0.4.1), enquanto que a edição e análises das sequências foram realizadas com o pacote de software Lasergene (DNAsar, versão 7.1).

O estudo do polimorfismo Val1016Ile foi conduzido *via* PCR diagnóstica, utilizando os *primers* específicos para genotipagem, descritos por Saavedra-Rodriguez e colaboradores (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007): *primer* reverso (5'-GGATGAACCGAAATTGGACAAAAGC-3') e *primers forwards* (5'-Val-GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG-3' e 5'-Ile GCGGGCACAATTGTTTCCCACCCGCACTGA-3'). As condições das reações de PCR seguiram o mesmo protocolo descrito para a mutação Ile1011Met. As PCRs foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (*High-Resolution*) a 5% (Sigma-Aldrich) e os indivíduos classificados como homozigotos Val/Val (98 pb), heterozigotos Val/Ile (78-98 pb) e Ile/Ile (78 pb).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Mapeamento dos Locus de Caracteres Quantitativos (QTL) associados à resistência ao inseticida temephos

Dos 40 cruzamentos AILs (RecR x Rock) iniciados no insetário do Departamento de Entomologia (CPqAM), apenas 6 obtiveram êxito e chegaram até a F<sub>2</sub>. A dificuldade em alimentar as fêmeas individualmente, mortes prematuras e a não obtenção dos ovos ao final de cada geração, determinaram a redução no número de casais intercruzados. O número de indivíduos obtidos até a F<sub>2</sub> dos cruzamentos RecR x Rock encontra-se na **tabela 1**.

**Tabela 1:** Distribuição do número de indivíduos obtidos por cruzamentos recíprocos entre as linhagens Recife-Resistente (RecR) e Rockefeller (Rock).

Família	Parental	F <sub>2</sub>	
		Susceptível	Resistente
♂Rock/♀RecR13	2	12	48
♂Rock/♀RecR16	2	6	54
♂Rock/♀RecR19	2	12	48
♂RecR/♀Rock3	2	4	56
♂RecR/♀Rock4	2	10	50
♂RecR/♀Rock20	2	42	8

**Fonte:** Dados do autor.

Inicialmente, a genotipagem dos indivíduos foi realizada na geração parental das seis famílias acima descritas, utilizando 27 marcadores SNPs e RFLP, e 20 marcadores de microssatélites. Esses marcadores apresentaram uma distribuição média de 15 cM. Poucos polimorfismos foram observados entre indivíduos machos e fêmeas desses cruzamentos. Considerando a natureza polimórfica desses marcadores genéticos, seria esperado que um maior número de polimorfismos fosse observado entre os mosquitos da geração parental. Diante do baixo grau de polimorfismo observado entre indivíduos da RecR e Rock, uma alternativa considerada foi a utilização de uma linhagem susceptível diferente, com um

protocolo de cruzamentos que aumentasse as chances de obter mais indivíduos e um maior número de polimorfismos na geração parental.

Antes de iniciar o segundo experimento de cruzamentos recíprocos, foi realizado um bioensaio dose-exploratório com larvas das linhagens MoyoD e Red, uma vez que não havia informações sobre o *status* de susceptibilidade dessas colônias. O resultado de mortalidade para cada dose de temephos foi lançado no programa PROBIT e as doses letais (CLs) para cada concentração do inseticida foram obtidas. Este resultado permitiu estimar a dose a ser utilizada na F<sub>2</sub> dos novos cruzamentos. Os resultados dos bioensaios encontram-se descritos na **tabela 2**.

**Tabela 2:** Doses letais do temephos para matar 50% (CL<sub>50</sub>) e 99% (CL<sub>99</sub>) das populações de *Aedes aegypti* Moyo-in-Dry e Red-Eye, obtidas por bioensaio dose-diagnóstica.

Linhagem	CL <sub>50</sub> (mg/L) (95% IC)	CL <sub>99</sub> (mg/L) (95% IC)	Nº de ensaios	Nº de larvas
<b>MoyoD</b>	0,02069 (0.01978-0.02154)	0,03417 (0.02673-0.03027)	3	1200
<b>Red</b>	0,02184 (0.02101-0.02275)	0,03934 (0.02988-0.03311)	3	1200

**Fonte:** Dados do autor.

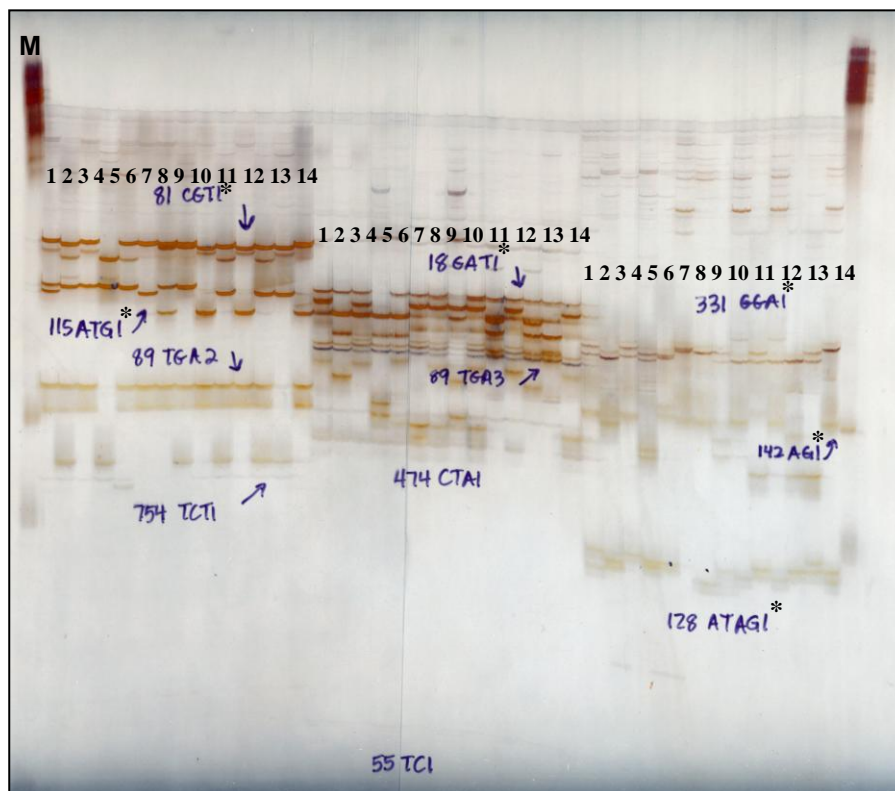
**Legenda:** IC – Intervalo de confiança

Sete famílias de cruzamentos recíprocos foram mantidas até a F<sub>2</sub>, sendo cada uma delas composta por um macho RecR e uma fêmea MoyoD ou Red. Os sete casais da geração parental foram submetidos a genotipagem com marcadores de microssatélites, separados em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (**Figura 12**). Das sete famílias, duas apresentaram um maior número de polimorfismos, tendo cada uma 26 marcadores polimórficos nas parentais: (♂3RecR x ♀4Moyo e ♂6RecR x ♀1Red). Para confirmar tais polimorfismos, o DNA de cada um dos membros desses dois casais foi submetido à PCRs com *primers* marcados com fluorescência e posterior análise de fragmentos.

Após análise final da geração parental, foi dada condições para a eclosão das larvas da F<sub>2</sub> e subsequente bioensaio visando identificar os indivíduos susceptíveis e resistentes. Para evitar diminuição no número de larvas susceptíveis, após a aplicação do temephos, o bioensaio foi monitorado a cada hora, por 24hs. Todas as larvas foram armazenadas em tubos de 1,5 ml, identificadas de acordo com o fenótipo e imediatamente acondicionadas a

-80° C. Após as 24hs do ensaio, foram obtidas 88 larvas susceptíveis e 95 resistentes provenientes do casal ♂3RecR x ♀Mo4; enquanto que 95 susceptíveis e 95 resistentes foram obtidas do casal ♂6RecR x ♀Red1. Posteriormente, os DNAs dos indivíduos de cada família foram extraídos individualmente e transferidos para placa de 96 poços. Estes foram submetidos a PCR com *primers* marcados, utilizando os marcadores informativos e todos os resultados foram checados por dois observadores. Apenas os marcadores que não continham alelos nulos e estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg foram utilizados para o mapeamento.

**Figura 12-** Visualização dos marcadores de microssatélites amplificados por PCR em gel de poliacrilamida 4%.



**Fonte:** Dados do autor.

**Legenda:** M. Marcador de peso molecular 100 pb. 1-14: Diferentes membros dos casais da geração parental 1-2. ♂3RecR e ♀MoyoD4; 3-4. ♂1RecR e ♀MoyoD3; 5-6. ♂2MoyoD e ♀RecR4; 7-8. ♂1MoyoD e ♀RecR2; 9-10. ♂6RecR e ♀Red1; 11-12. ♂1RecR e ♀Red1; 13-14. ♂2Red e ♀RecR3.

**Nota:** Novos *primers* desenvolvidos no presente projeto encontram com asterisco (\*).

A associação entre o genótipo obtido com cada marcador e o fenótipo observado nos indivíduos da F<sub>2</sub> foi testada utilizando o teste exato de Fisher. Cinco locos estavam associados com a resistência ( $P < 0,01$ ) no cruzamento ♂<sub>3</sub> RecR x ♀<sub>Mo4</sub>, enquanto que quatro locos ( $P < 0,01$ ) foram identificados nos indivíduos provenientes da família ♂<sub>6</sub> RecR x ♀<sub>Red1</sub> (**Tabela 3**).

**Tabela 3:** Resultados de segregação e testes de  $\chi^2$  de marcadores de microssatélites genotipados na F<sub>2</sub> dos cruzamentos entre RecR X Moyod e RecR X Red.

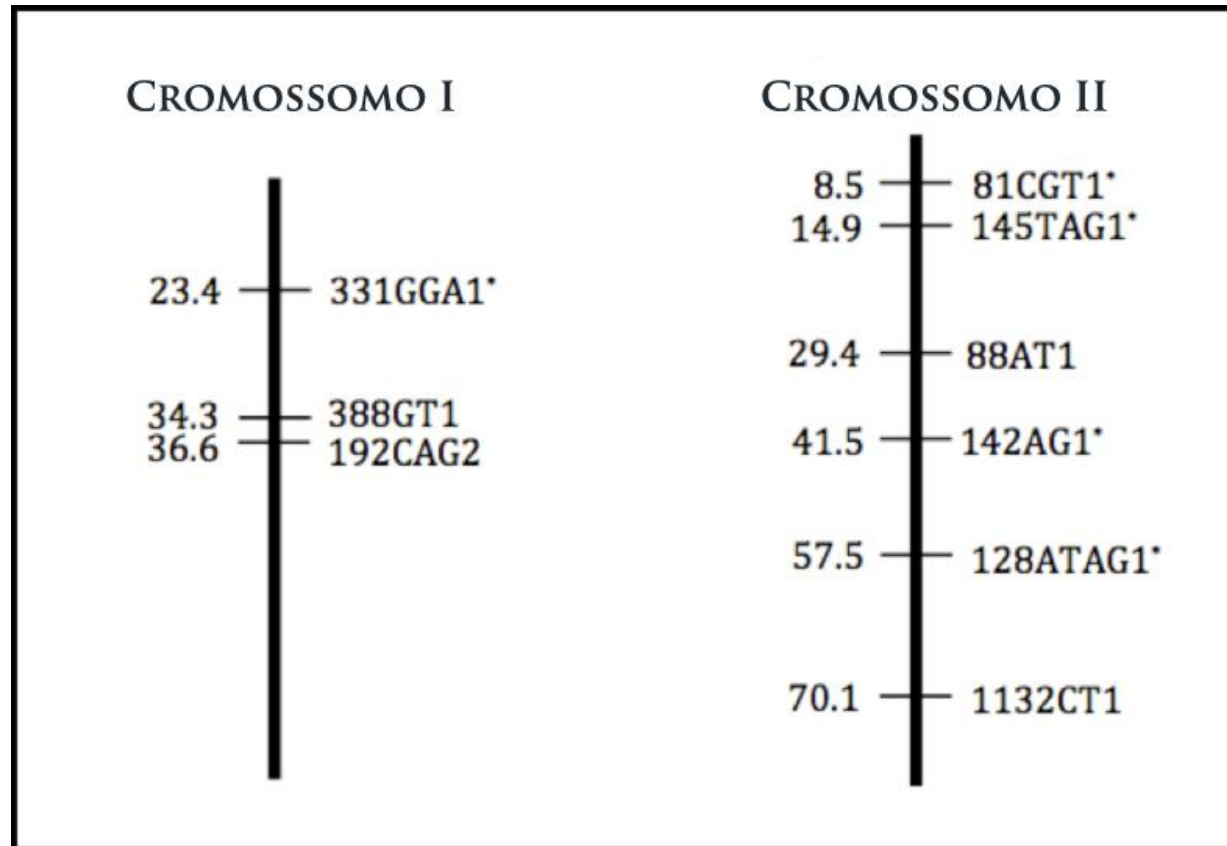
Marcador	RecR X Moyod				RecR X Red				
	Genótipo Parental		Segregação	$\chi^2$	Marcador	Genótipo Parental		Segregação	$\chi^2$
	♂	♀				♂	♀		
81CGT1	456	450	1:2:1	5.32	176TG1	165	162	1:2:1	6.7*
388GT1	248	267	1:2:1	2.57	68GAC1	383	372/374	1:2:1	5.29
192CAG2	492	483	1:2:1	2.49	81 AGA1	472	444	1:2:1	59.34**
331GGA1	318/327	315	1:2:1	2.21	148TCT1	164	161	1:2:1	71.48**
145TAG1	298	295	1:2:1	90.22**	88 AT1	219/221	260/267	1:2:1	75.3**
88 AT1	262	266	1:2:1	84.93**	142 AG1	266	230	1:2:1	94.53**
142 AG1	264	258	1:2:1	145.42**	86AC1	257	259	1:2:1	0.34
128ATAG1	173/181	177	1:2:1	82.89**	201AAT1	328	327	1:2:1	1.54
1132CT1	154	160/170	1:2:1	21.68**					

Fonte: Dados do autor.

Legenda: \* ( $P < 0,05$ ); \*\* ( $P < 0,01$ )

Dois grupos de marcadores foram observados em ligação na F<sub>2</sub> do cruzamento ♂<sub>3</sub>RecR x ♀<sub>Mo4</sub>, mapeados nos cromossomos I e II. Um novo marcador, o 331GGA1, foi mapeado pela primeira vez no cromossomo I e três outros no cromossomo II (81CGT1, 142AG1 e 128ATAG1). Estes marcadores estão em *supercontigs* contendo genes de esterases. Já a F<sub>2</sub> do cruzamento ♂<sub>6</sub>RecR x ♀<sub>Red1</sub> apresentou três grupos de marcadores em ligação: dois marcadores no cromossomo I, quatro no cromossomo II e dois no cromossomo III. Destes, dois novos marcadores foram mapeados no cromossomo II (81 AGA1 e 142 AG1). Os mapas de ligação para os dois cruzamentos estudados estão exibidos nas **figuras 13 e 14**.

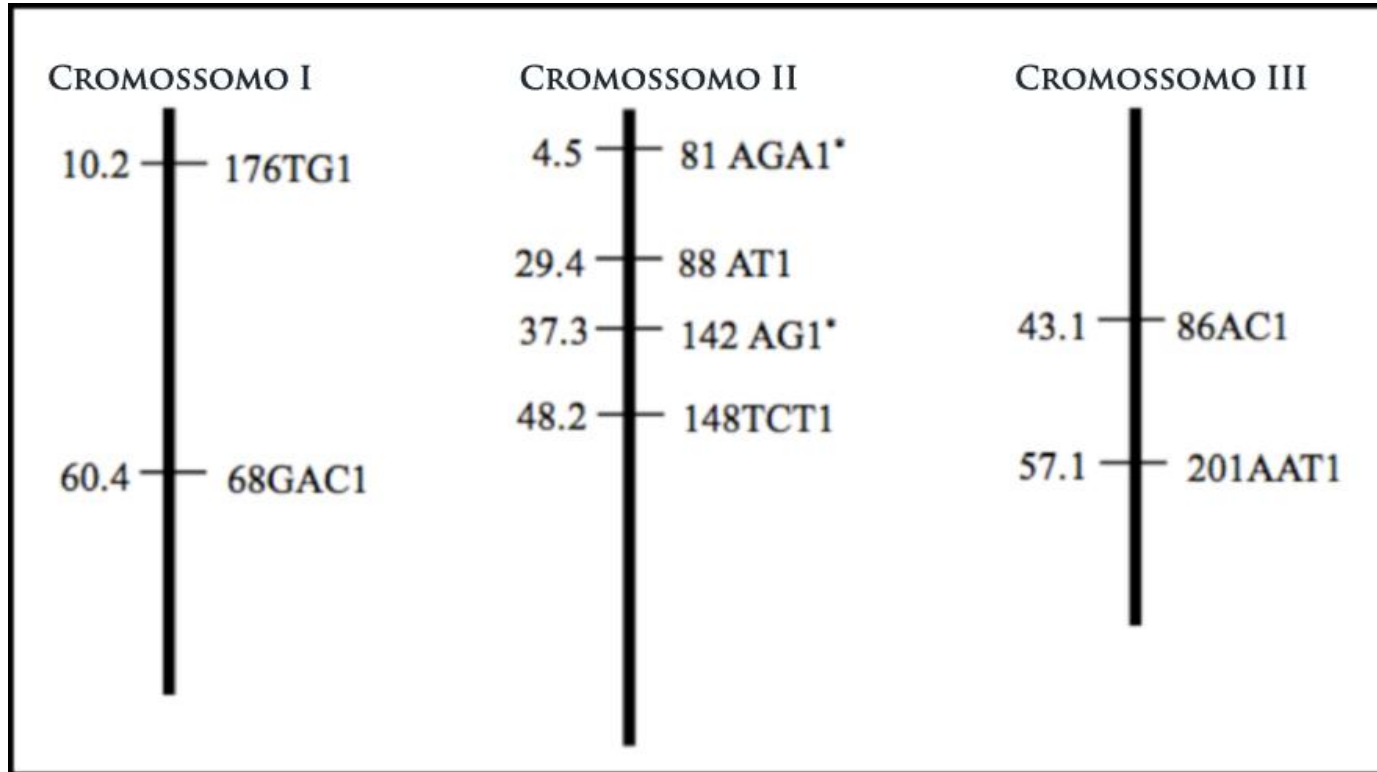
**Figura 13-** Mapa de ligação de marcadores de microssatélites obtido na F<sub>2</sub> do cruzamento das linhagens de *Aedes aegypti* ♂RecR x ♀MoyoD.



**Fonte:** Dados do autor.

**Legenda:** Mapa de ligação construído com marcadores de microssatélites, baseado na F<sub>2</sub> do cruzamento das linhagens de *Aedes aegypti* ♂RecR x ♀MoyoD (n = 182). Distâncias no mapa são representadas em centimorgans. Novos marcadores de microssatélites estão marcados com asterisco (\*).

**Figura 14-** Mapa de ligação de marcadores de microssatélites obtido na F<sub>2</sub> do cruzamento das linhagens de *Aedes aegypti* ♂RecR x ♀Red.



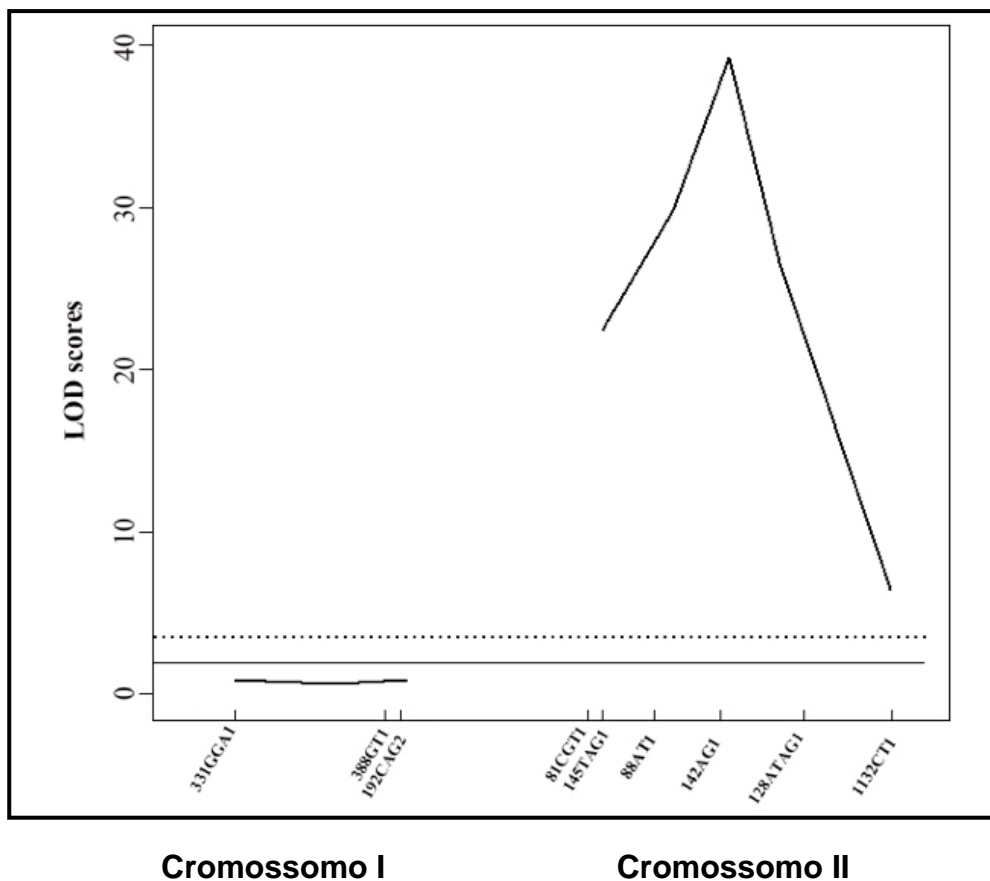
**Fonte:** Dados do autor.

**Legenda:** Mapa de ligação construído com marcadores de microssatélites, baseado na F<sub>2</sub> do cruzamento das linhagens de *Aedes aegypti* ♂RecR x ♀Red (n = 190). Distâncias no mapa são representadas em centimorgans. Novos marcadores de microssatélites estão marcados com asterisco (\*).

Utilizando o método de mapeamento por intervalo, com o algoritmo EM, foi conduzida uma análise independente entre os cruzamentos, com o objetivo de identificar regiões cromossômicas contendo QTL. Um QTL presente no cromossomo II foi identificado em ambas as famílias de cruzamento. Na família ♂3RecR x ♀Mo4, este QTL estava flanqueado pelos marcadores 88 AT1 e 142 AG1, que estavam estatisticamente associados com a resistência ao temephos ( $P < 0.001$ ). Este QTL excedeu o limiar de detecção de 95% (LOD = 2.26) em mais de dezessete vezes (LOD = 39.6,  $P < 0.001$ ) (**Figura 15**). No cruzamento ♂6RecR ♀Red1, um QTL foi encontrado na mesma posição, com uma discreta diferença no resultado do LOD. Enquanto o limiar de detecção de 95% foi de 2.12, o QTL encontrado apresentou LOD de 25.2 ( $P < 0.001$ ). Em ambos os cruzamentos, o QTL identificado apresentou efeito genético dominante e explicou cerca de 97% da variação fenotípica da resistência ao temephos. Apesar de outra região, próxima ao marcador 176 TG1 no cromossomo I, ter apresentado uma LOD ligeiramente maior do que o limiar, esta não apresentou diferença significativa para o limiar (**Figura 16**).



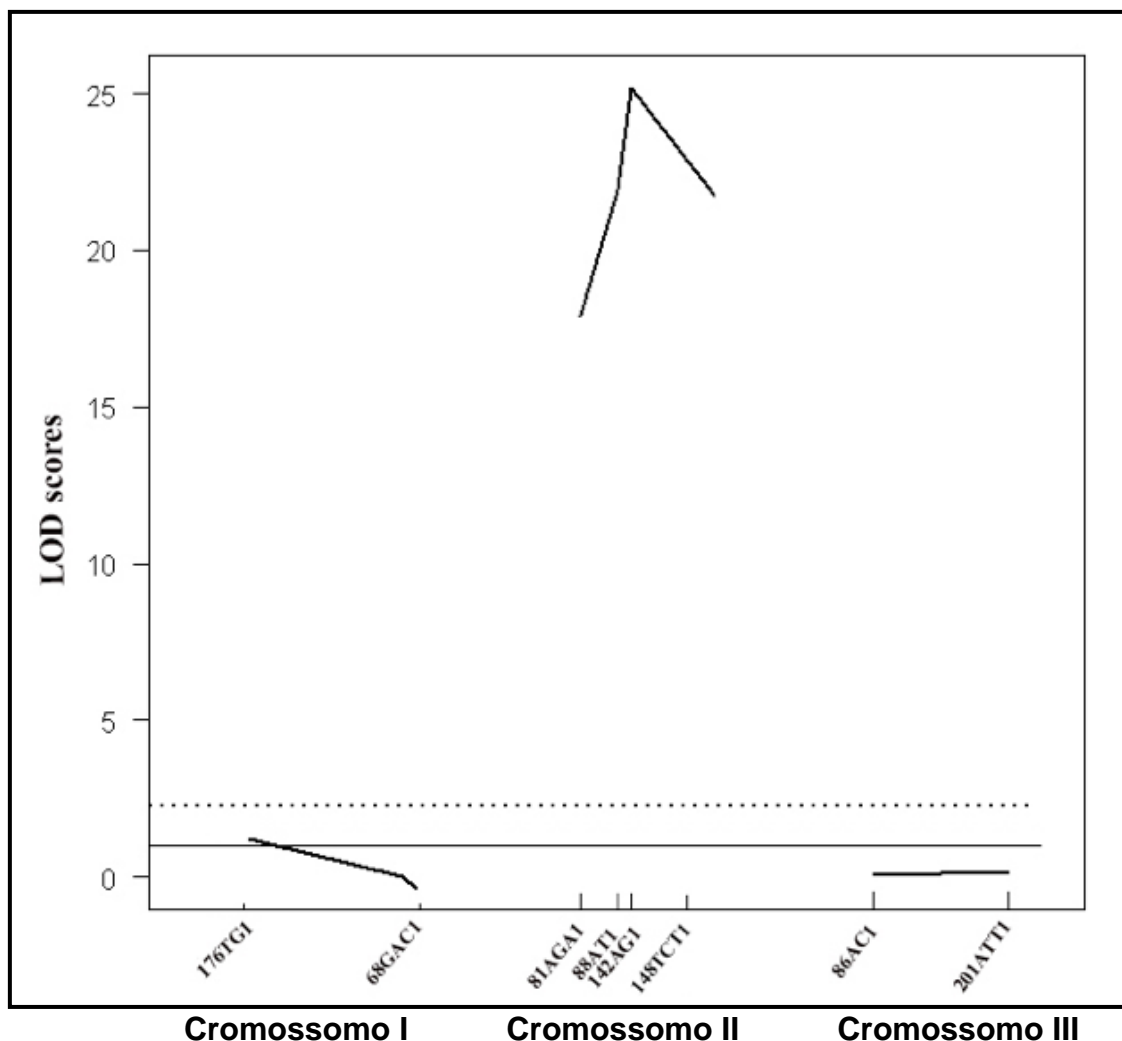
**Figura 15-** Quantificação dos valores de LOD, utilizados para a detecção de QTL, associados à resistência ao temephos, no cruzamento entre linhagens de *Aedes aegypti* ♂RecR x ♀MoyD.



**Fonte:** Dados do autor.

**Legenda:** Valor limiar de 95% e 99% está representado como linha contínua e tracejada, respectivamente.

**Figura 16-** Quantificação dos valores de LOD, utilizados para a detecção de QTL, associados à resistência ao temephos, no cruzamento entre linhagens de *Aedes aegypti* ♂RecR x ♀Red.



**Fonte:** Dados do autor.

**Legenda:** Valor limiar de 95% e 99% está representado como linha contínua e tracejada, respectivamente.

No total, sete genes de carboxilesterases (*CCEae3A*, *CCEae1C*, *CCEae2C*, *CCEae3C*, *CCEae4C*, *CCEae5C* e *CCEae6C*) presentes em dois *supercontigs* diferentes foram sequenciados em indivíduos da geração parental e da F<sub>2</sub> de ambos os cruzamentos. Todas essas esterases apresentaram mutações sinônimas, no entanto, apenas os genes *CCEae4C*, *CCEae1C* e *CCEae6C* apresentaram SNPs não-sinônimos (todas no cruzamento ♂6RecR x ♀Red1) (**Tabela 4**). A análise de todos os sítios polimórficos evidenciou que as mutações observadas na geração parental não estão associadas a um determinado fenótipo na F<sub>2</sub>.

**Tabela 4:** Mutações encontradas nas carboxilesterases *CCEae4C*, *CCEae1C* e *CCEae6C* sequenciados em indivíduos da F0 e F2 provenientes do cruzamento RecR X Red.

<i>CCEae4C</i> (AAEL003187*)												
Pos**	Lvp	F <sub>0</sub>		F <sub>2</sub>								
		♂ <sub>R</sub>	♀ <sub>S</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
940	AGT (Ser)	Ser	Ser/Thr	Ser	Ser/Thr	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
967	TCC (Ser)	Ser	Ser/Phe	Ser	Phe	Phe	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
981	CCG (Pro)	Pro	Pro/Ser	Pro	Pro/Ser	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
1112	CGG (Arg)	Arg	Arg/Pro	Arg	Arg/Pro	Arg/Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
1158	AGT (Ser)	Ser	Ser/Gly	Ser	Ser	Ser/Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
1168	TCG (Ser)	Ser	Ser/Leu	Ser	Ser	Ser/Leu	Ser/Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
1243	TCC (Ser)	Cys	Ser/Tyr	Ser/Cys	Tyr/Cys	Ser	Cys	Ser	Cys	Ser/Cys	Ser/Cys	Cys
1366	CTC (Leu)	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
<i>CCEae1C</i> (AAEL003195*)												
Pos**	Lvp	F <sub>0</sub>		F <sub>2</sub>								
		♂ <sub>R</sub>	♀ <sub>S</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
1260	CAA (Gln)	Gln	Gln/Lys	Gln/Lys	Gln/Lys	Gln	Gln/Lys	Gln/Lys	Gln/Lys	Gln/Lys	Gln/Lys	Gln
<i>CCEae6C</i> (AAEL003198*)												
Pos**	Lvp	F <sub>0</sub>		F <sub>2</sub>								
		♂ <sub>R</sub>	♀ <sub>S</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
322	GAA (Glu)	Glu/Lys	Glu	Glu/Lys	Glu	Glu/Lys	Glu	Glu/Lys	Glu/Lys	Glu/Lys	Glu/Lys	Glu/Lys
349	GTC (Val)	Val/Phe	Val	Val/Phe	Val	Val/Phe	Val	Val/Phe	Val/Phe	Val/Phe	Val/Phe	Val/Phe
368	GGT (Gly)	Gly/Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly/Ala	Gly/Ala	Gly/Ala	Gly/Ala	Gly/Ala
436	ATT (Ile)	Ile/Val	Ile	Ile/Val	Ile	Ile/Val	Ile	Ile/Val	Ile/Val	Ile/Val	Ile/Val	Ile/Val
753	TTC (Phe)	Ile	Phe	Ile	Phe	Ile	Phe	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile

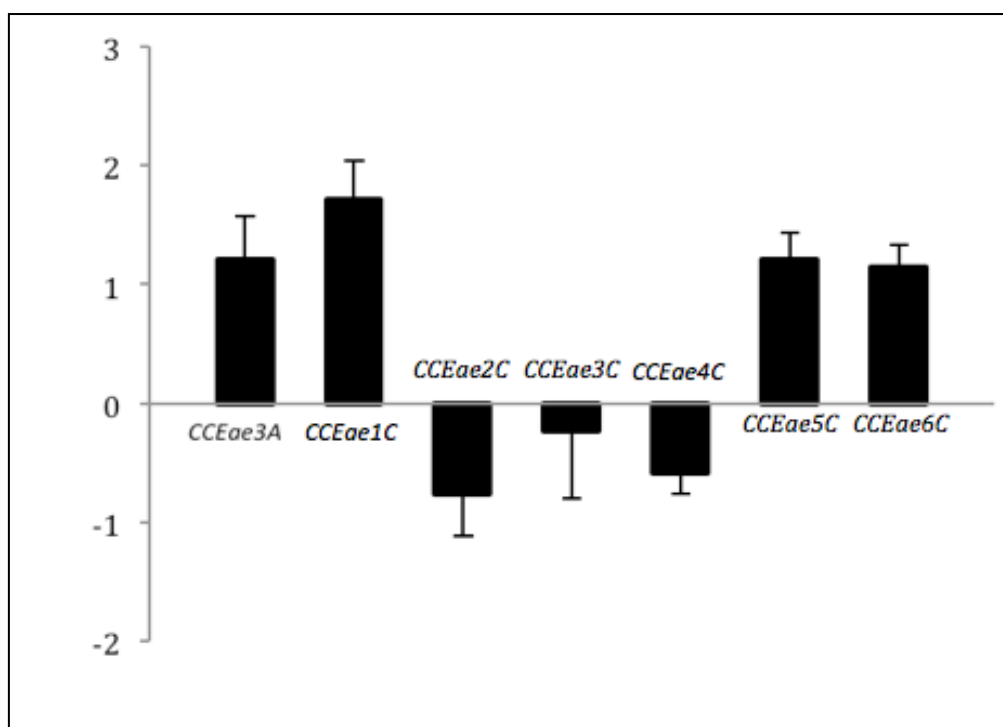
**Legenda:** Pos: posição; Lvp: Linhagem Liverpool; ♂<sub>R</sub>: Macho Resistente; ♀<sub>S</sub>: Fêmea Susceptível; S1-S4: indivíduos susceptíveis; R1-R4: indivíduos resistentes.

\*Vectorbase

\*\*Posição na ORF

Em contrapartida, a análise da expressão gênica evidenciou que quatro das esterases apresentaram níveis elevados de expressão em indivíduos resistentes, enquanto três apresentaram padrão de subexpressão, quando comparados à expressão desses genes em indivíduos susceptíveis. No cruzamento ♂3RecR x ♀Mo4, a esterase *CCae3A* estava 1,2 vezes mais expressa (s.d. = 0,4), enquanto que as esterases *CCEae1C* (1,7 vezes, s.d. = 0,3), *CCEae5C* (1,2 vezes, s.d. = 0,2) e *CCEae6C* (1,1 vezes, s.d. = 0,2) estavam elevadas no cruzamento ♂6RecR x ♀Red1 (**Figura 17**). O teste não-paramétrico de Wilcoxon demonstrou que a maior expressão observada nas esterases *CCEae5C* and *CCEae6C* é significativa ( $p = 0,0013$  and  $p = 0,019$ , respectivamente), no entanto, nenhuma das elevadas expressões observada excedeu o limiar de 2-fold.

**Figura 17-** Quantificação da expressão relativa de genes de esterase encontrados na região contendo QTL associado à resistência ao organofosforado temephos em *Aedes aegypti*.



**Fonte:** Dados do autor.

**Legenda:** O gene *CCEae3A* foi avaliado na  $F_2$  do cruzamento RecR x MoyoD, enquanto que as restantes na  $F_2$  da RecR X Red.

## 7.2 Análise da região 5' UTR do gene da citocromo P450 *CYP6N12*

O resultado do alinhamento das sequências da região 5' UTR da *CYP6N12* evidenciou polimorfismos entre indivíduos da RecR e RecRev (**Figura 18**). A RecR apresentou uma deleção de 19 nucleotídeos (entre os nucleotídeos 79 a 97), uma inserção de 37 nucleotídeos (entre os nucleotídeos 166-203), uma deleção de seis bases (nucleotídeos 378-373) e uma inserção de 2 nucleotídeos (de 450 a 460). Já indivíduos da RecRev apresentaram sequências nucleotídicas mais semelhantes à sequência do gene *CYP6N12*, obtida no banco de dados (AAEL009124). Dois indivíduos da RecRev apresentaram um padrão de polimorfismos idêntico ao da RecR (**Figura 18**). O fragmento observado predominantemente em indivíduos da RecR possuía 14 pares de base a mais do que o fragmento encontrado na maioria dos indivíduos da RecRev.

Figura 18- Alinhamento das sequências nucleotídicas obtidas nas linhagens RecR, RecRev e Rock da região 5' UTR do gene *CYP6N12* da citocromo P450.

(Continua)



**Figura 18-** Alinhamento das seqüências nucleotídicas obtidas nas linhagens RecR, RecRev e Rock da região 5' UTR do gene *CYP6N12* da citocromo P450.

(Continuação)

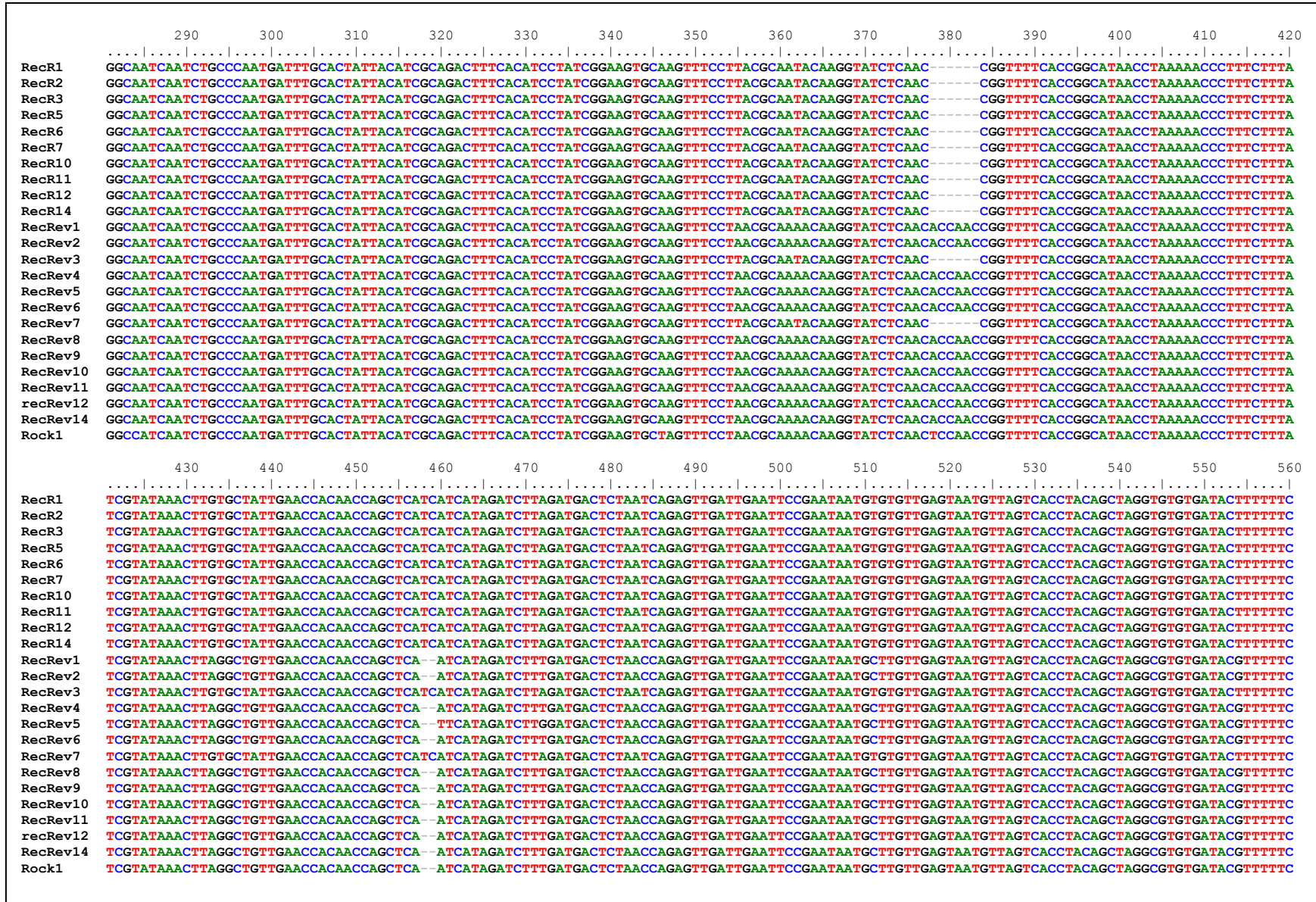


Figura 18- Alinhamento das sequências nucleotídicas obtidas nas linhagens RecR, RecRev e Rock da região 5' UTR do gene *CYP6N12* da citocromo P450.

(Conclusão)

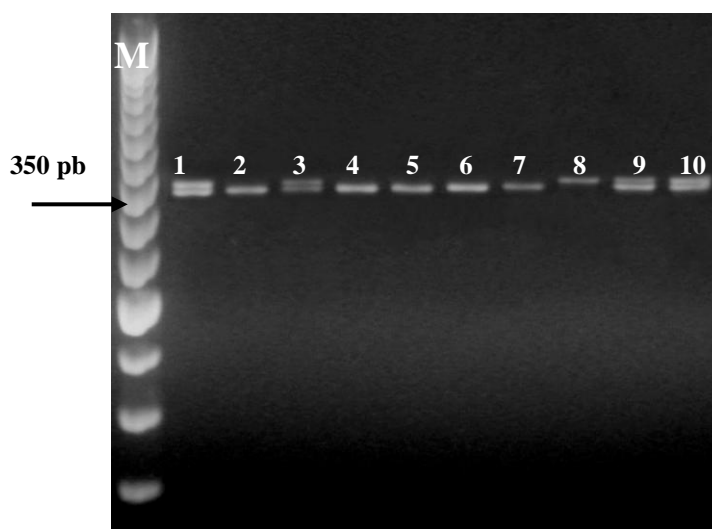


Fonte: Dados do autor.



A partir desses resultados, *primers* foram desenhados com o objetivo de identificar e estimar a frequência desse *indel* em populações naturais de *Ae. aegypti*. O fragmento observado na RecR, aqui considerado como alelo resistente (R), possuía 14 nucleotídeos a mais do que aquele encontrado na maioria dos indivíduos da RecRev (Alelo S) (**Figura 19**). A genotipagem foi realizada em indivíduos das linhagens RecR e RecRev, além de 11 outras populações naturais do Estado de Pernambuco. Os resultados da genotipagem revelaram, nas linhagens RecR e RecRev, a presença do alelo mutante R em diferentes frequências. Esse alelo foi encontrado com maior frequência nos indivíduos da RecR ( $f_R = 0,625$ ) do que na RecRev ( $f_R = 0,12$ ). Na linhagem resistente, esse alelo foi associado com a resistência ao inseticida temephos ( $p = 5,8 \times 10^{-5}$ ) (**Tabela 5**). Já em populações naturais, a distribuição do alelo mutante R foi observada em todas as localidades estudadas. A frequência do alelo R foi mais alta em indivíduos resistentes de Agrestina, Fernando de Noronha, Itaíba, Petrolina, Salgueiro e Recife (**Tabela 6**). A associação entre a presença do alelo R e a resistência à cipermetrina foi encontrada em Fernando de Noronha (OR = 14,181;  $p = 0,016$ ) e Salgueiro (OR = 12,633;  $p = 0,349$ ). Apesar do alelo R ter sido achado em indivíduos das localidades restantes, não foi observada associação entre esse alelo e o fenótipo resistente. A relação entre as frequências genotípicas, distribuídas por fenótipos, está mostrada na **figura 20**.

**Figura 19-** Visualização em gel de agarose 2,5% de produtos de PCR alelo-específica da região 5' UTR do gene *CYP6N12*.



**Fonte:** Dados do autor.

**Legenda:** M.: marcador de peso molecular Ladder 50pb (Invitrogen). **Poços 2, 4-7:** alelo S homozigoto (364 pb); **poço 8:** alelo R homozigoto (377 pb); **poços 1, 3, 9 e 10:** heterozigotos.

**Tabela 5:** Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo na região 5' UTR do gene *CYP6N12* em amostras susceptíveis e resistentes de *Aedes aegypti* de laboratório.

Linhagem	Fenótipo	Genótipo			Total	Frequência alélica	
		SS	RS	RR		S	R
RecR	Resistente	4 (0,20)	7 (0,35)	9 (0,45)	20	0,375	0,625*
RecRev	Susceptível	18 (0,857)	1 (0,048)	2 (0,095)	21	0,880	0,120

Fonte: Dados do autor.

Legenda: \*  $P < 0,05$ .**Tabela 6** Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo na região 5' UTR do gene *CYP6N12* em amostras susceptíveis e resistentes à cipermetrina de *Aedes aegypti* do Estado de Pernambuco.

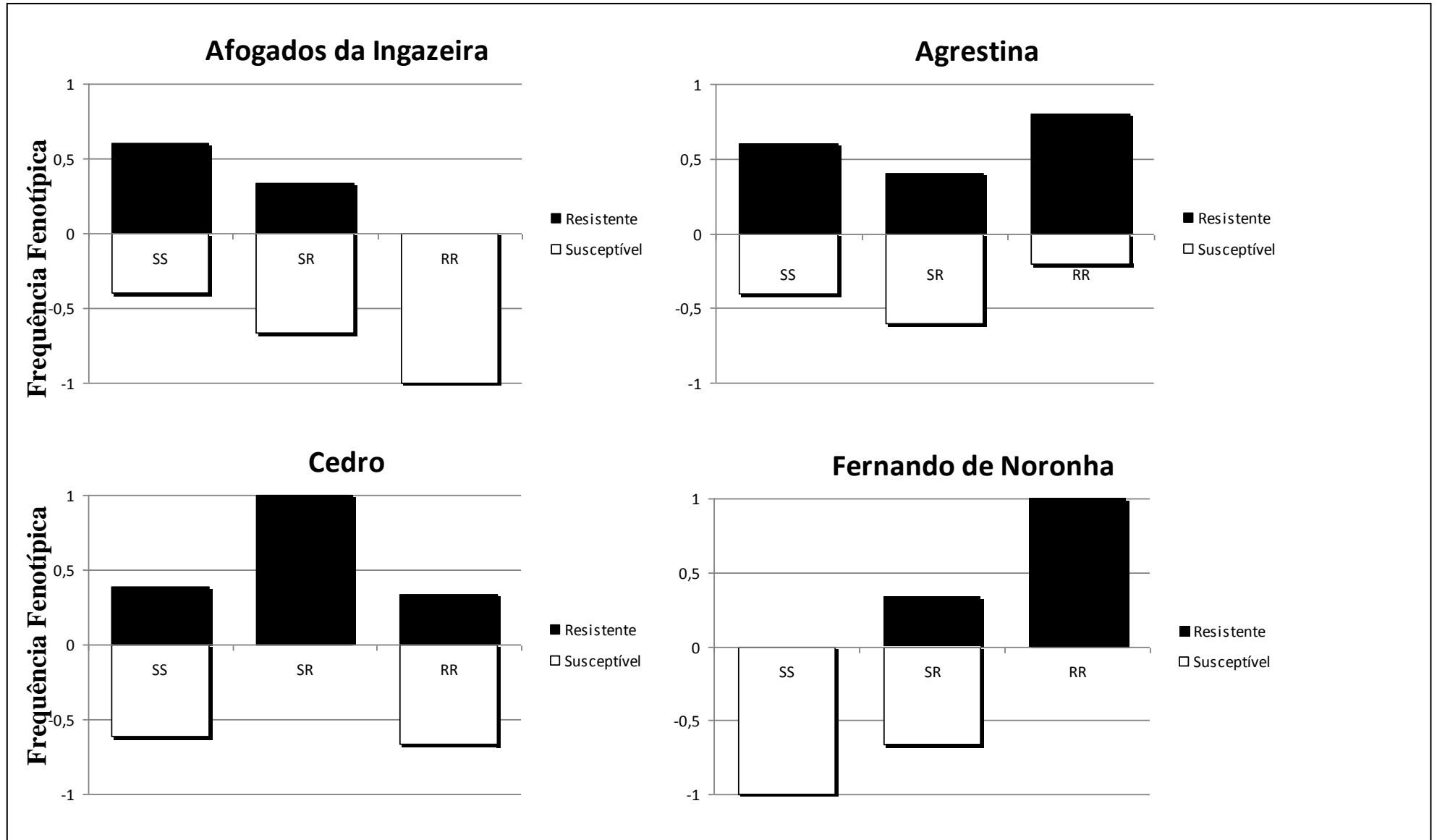
Cidade	Fenótipo	Genótipo			Total	N	Frequência alélica		OD (IC 95%)
		SS	RS	RR			S	R	
Afogados da Ingazeira	Susceptível	4 (0,40)	4 (0,40)	2 (0,20)	10	18	0,60	0,40	0,214 (0,104-0,438)
	Resistente	6 (0,75)	2 (0,25)	0 (0,0)	8		0,875	0,125	
Agrestina	Susceptível	2 (0,22)	6 (0,67)	1 (0,11)	9	20	0,555	0,455	1,487 (0,854-2,59)
	Resistente	3 (0,274)	4 (0,363)	4 (0,363)	11		0,455	0,555	
Cedro	Susceptível	8 (0,80)	0 (0,0)	2 (0,20)	10	17	0,75	0,25	2,94 (1,615-5,351)
	Resistente	5 (0,714)	1 (0,143)	1 (0,143)	7		0,505	0,495	
Fernando de Noronha	Susceptível	5 (0,56)	4 (0,44)	0 (0,0)	9	14	0,78	0,22	14,181 (7,176-28,025)
	Resistente	0 (0,0)	2 (0,40)	3 (0,60)	5		0,20	0,80*	
Glória do Goitá	Susceptível	7 (0,70)	1 (0,10)	2 (0,20)	10	20	0,75	0,25	0,75 (0,384-1,461)
	Resistente	6 (0,60)	4 (0,40)	0 (0,0)	10		0,80	0,20	
Itaíba	Susceptível	6 (0,60)	3 (0,30)	1 (0,10)	10	20	0,75	0,25	2,454 (1,347-4,4729)
	Resistente	1 (0,10)	7 (0,70)	2 (0,20)	10		0,45	0,55	
Petrolina	Susceptível	3 (0,30)	4 (0,40)	3 (0,30)	10	20	0,50	0,50	0,667 (0,380-1,167)
	Resistente	3 (0,30)	2 (0,20)	5 (0,50)	10		0,40	0,60	
Recife	Susceptível	6 (0,66)	3 (0,34)	0 (0,0)	9	19	0,83	0,17	0,051 (0,025-0,104)
	Resistente	7 (0,70)	2 (0,20)	1 (0,10)	10		0,80	0,20	
Salgueiro	Susceptível	7 (0,78)	1 (0,11)	1 (0,11)	9	16	0,835	0,165	12,633 (6,379-25,021)
	Resistente	2 (0,286)	0 (0,0)	5 (0,714)	7		0,286	0,714*	
Santa Cruz do Capibaribe	Susceptível	3 (0,30)	6 (0,60)	1 (0,10)	10	20	0,60	0,40	0,807 (0,455-1,433)
	Resistente	5 (0,50)	3 (0,30)	2 (0,20)	10		0,65	0,35	
São José do Egito	Susceptível	6 (0,60)	3 (0,30)	1 (0,10)	10	19	0,75	0,25	3,0 (1,648-5,459)
	Resistente	2 (0,22)	5 (0,56)	2 (0,22)	9		0,50	0,50	

Fonte: Dados do autor.

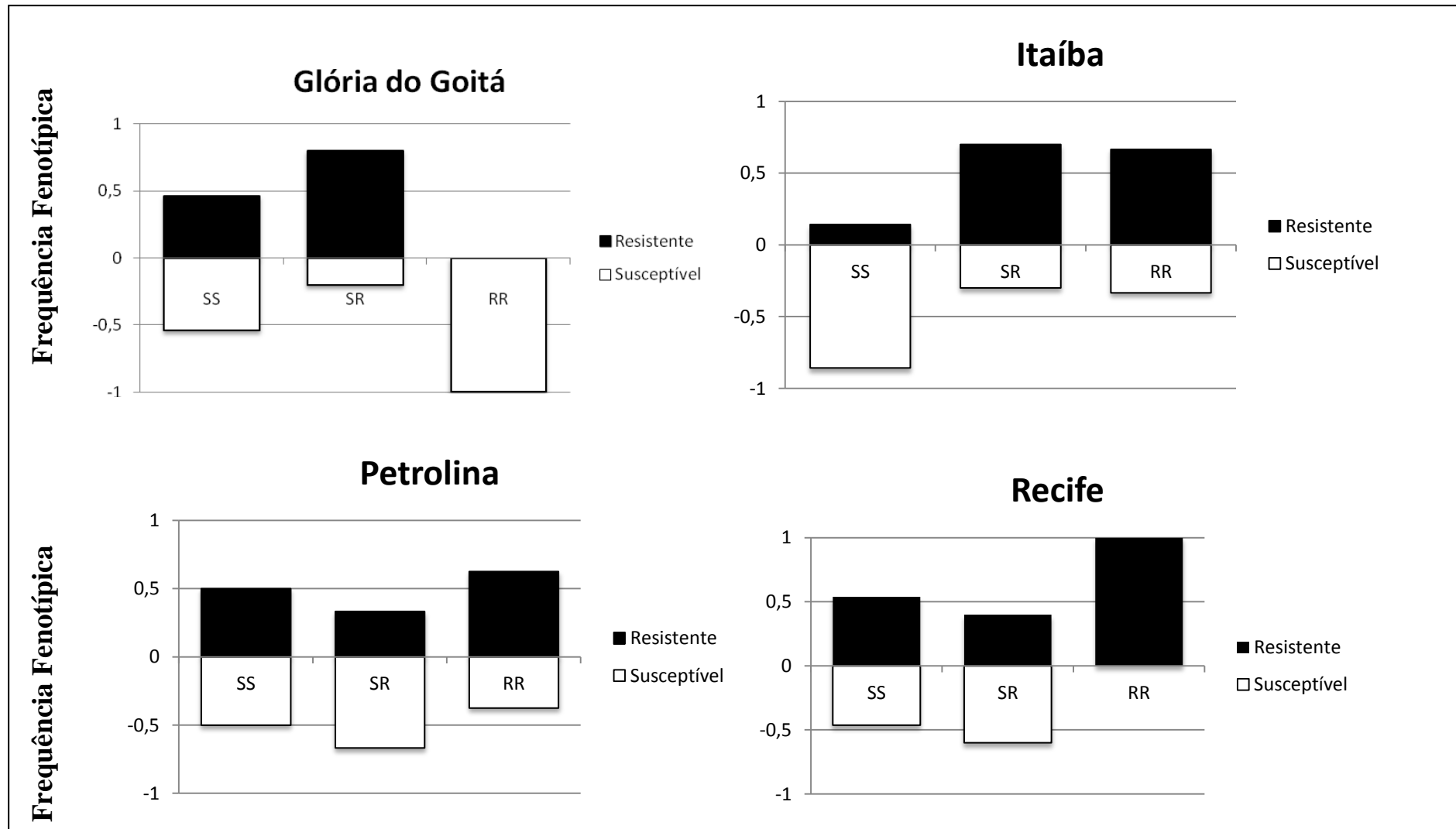
Legenda: \*  $P < 0,05$ ; IC – Intervalo de confiança

**Figura 20-** Frequências genóticas do polimorfismo da região 5' UTR do gene *CYP6N12* separadas por fenótipos em populações naturais de *Aedes aegypti* do Estado de Pernambuco.

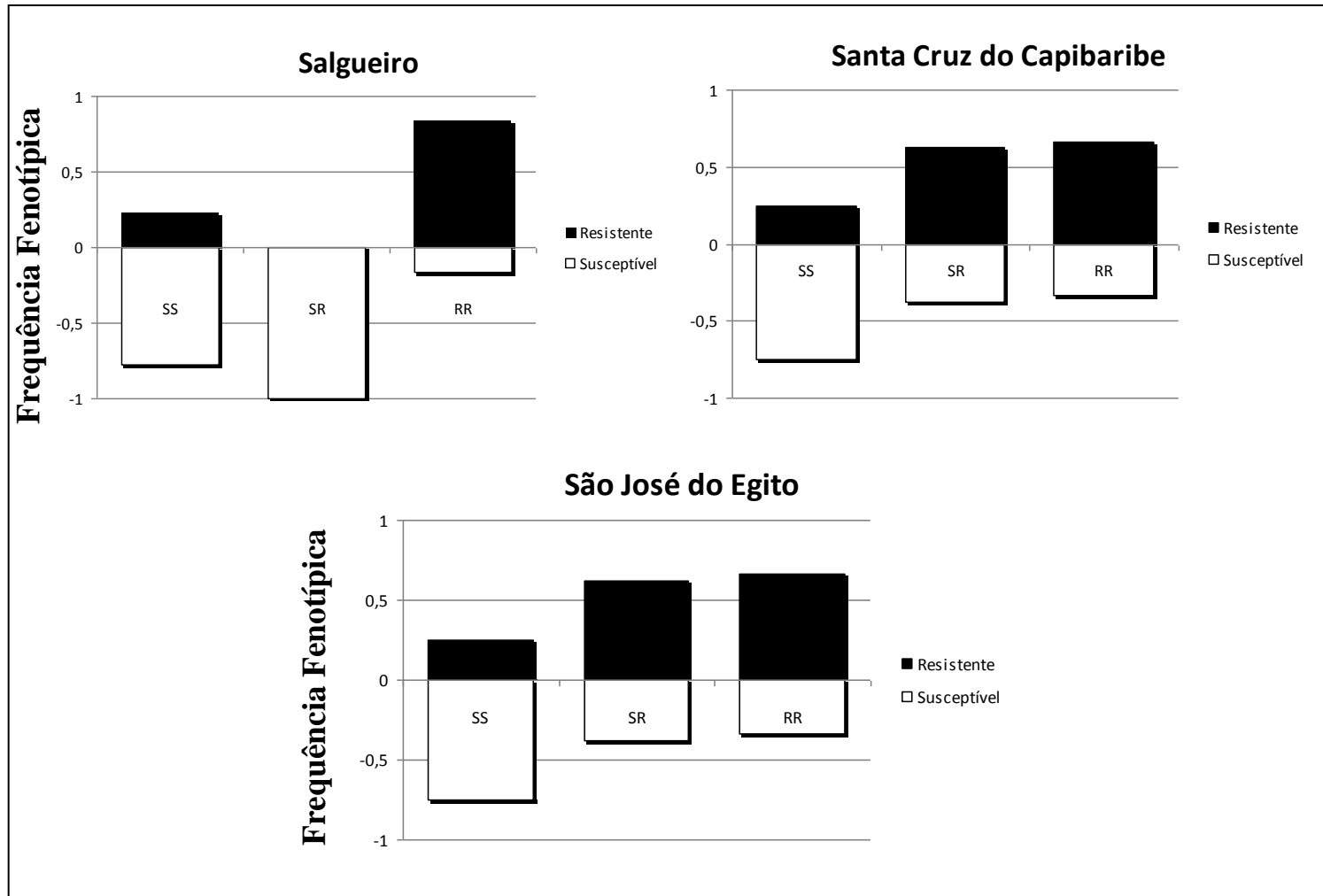
Continua



**Figura 20-** Frequências genóticas do polimorfismo da região 5' UTR do gene *CYP6N12* separadas por fenótipos em populações naturais de *Aedes aegypti* do Estado de Pernambuco. Continuação



**Figura 20-** Frequências genótípicas do polimorfismo da região 5' UTR do gene *CYP6N12* separadas por fenótipos em populações naturais de *Aedes aegypti* do Estado de Pernambuco. Conclusão



Fonte: Dados do autor.

A análise da associação entre a presença do polimorfismo na região 5' da *CYP6N12* e a superexpressão do gene foi realizada entre indivíduos das colônias RecR e RecRev. O gene *CYP6N12* apresentou uma superexpressão média de aproximadamente 10 e 4 vezes nas linhagens RecR e RecRev, respectivamente, em relação à expressão do gene na RecLabab (**tabela 7**). Em ambas as linhagens, a presença em homozigose do alelo mutante R induziu, na maioria dos indivíduos, a uma maior expressão do gene (**tabela 8 e figura 21**). Por outro lado, uma subexpressão do gene foi observada em dois indivíduos, um heterozigoto e outro homozigoto para o alelo S. Dentre os indivíduos provenientes da RecRev, a maior expressão do gene observada foi no indivíduo homozigoto para o alelo R (RecRev33) (**tabela 8**).

**Tabela 7:** Relação entre as frequências alélicas e a expressão do gene *CYP6N12* em amostras de *Aedes aegypti* das linhagens RecR e RecRev.

<b>Linhagem</b>	<b>Expressão Relativa Média</b>
RecR	10,15
RecRev	4,16

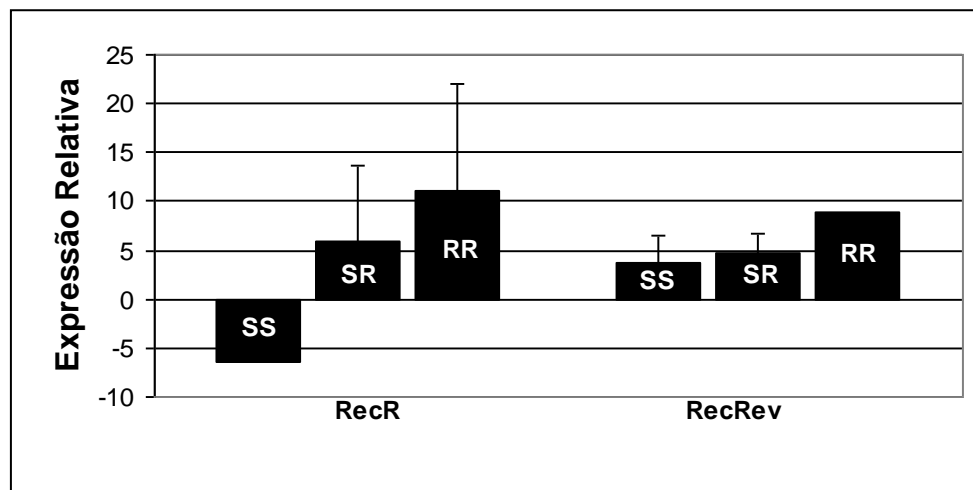
**Fonte:** Dados do autor.

**Tabela 8:** Relação entre o genótipo e a expressão do gene *CYP6N12* em amostras de *Aedes aegypti* das linhagens RecR e RecRev em relação à linhagem RecLabab.

<b>RecR</b>			<b>RecRev</b>		
<b>Indivíduos</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Fold Change</b>	<b>Indivíduos</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Fold Change</b>
RR1	SS	6,44	RRev28	SS	7,62
RR2	RR	3,88	RRev29	SS	4,07
RR5	RR	16,44	RRev31	SS	6,11
RR6	SR	8,74	RRev33	RR	9,62
RR7	SR	3,81	RRev36	SS	1,96
RR8	SR	13,27	RRev37	SS	3,86
RR9	SR	16,24	RRev38	SR	8,93
RR10	RR	13,39	RRev40	SS	2,14
RR12	RR	16,36	RRev41	SS	2,77
RR13	SR	11,17	RRev42	SS	2,69
RR18	SR	-5,31	RRev43	SR	3,34
RR19	RR	36,67	RRev45	SS	1,27
RR21	RR	7,44	RRev46	SS	1,61
RR22	SS	-6,49	RRev47	SS	2,17

**Fonte:** Dados do autor.

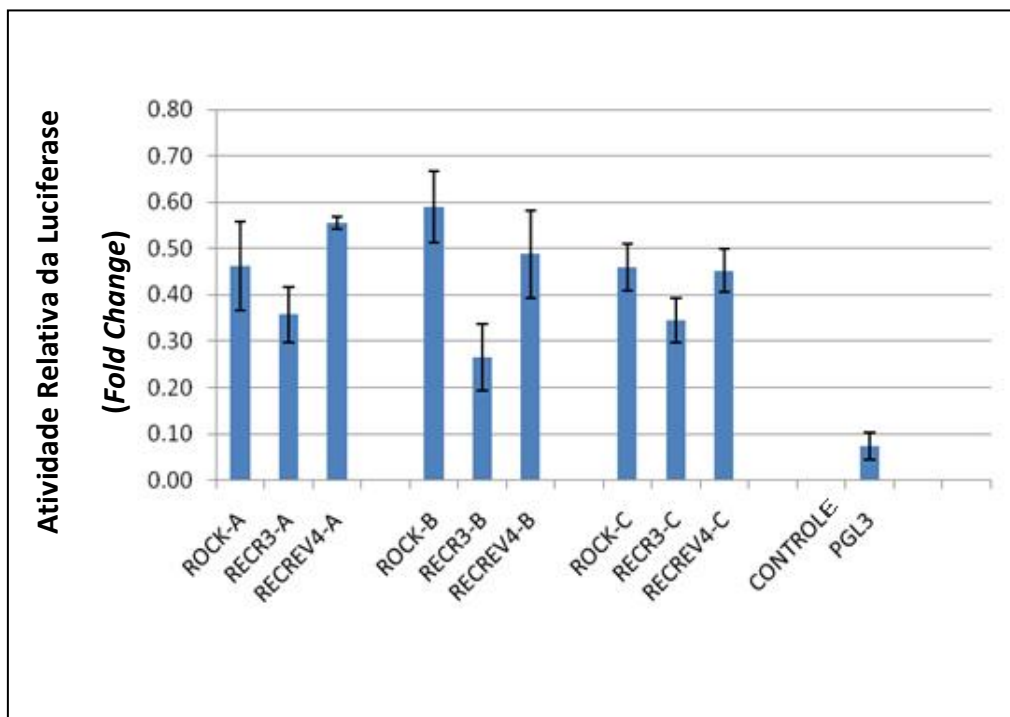
**Figura 21-** Relação entre as médias de expressão do gene *CYP6N12* entre os diferentes genótipos encontrados nas linhagens RecR e RecRev, em comparação à linhagem RecLabab.



Fonte: dados do autor.

Os ensaios com o gene repórter luciferase foram realizados usando sequências da região 5' da *CYP6N12* derivadas de indivíduos da RecR, RecRev e Rock. Três grupos de experimentos estão demonstrados na **figura 22**, representativos da amplificação de cada par de *primers* desenhados com sítios para digestão com *HindIII* (A, B e C). As sequências obtidas da Rock e RecRev induziram expressões similares do gene repórter, enquanto que as sequências da RecR levaram a uma expressão menor da luciferase. No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada na expressão do gene repórter entre a RecR, RecRev e Rock.

**Figura 22-** Atividade do gene repórter induzida por sequências do gene *CYP6N12* obtidas em indivíduos das linhagens RecR, RecRev e Rock.



**Fonte:** Dados do autor.

**Legenda:** Expressão relativa do gene repórter luciferase obtidas de três sequências (A, B e C) da região 5' do gene *CYP6N12* em indivíduos das linhagens RecR, RecRev e Rock. **Controle:** Plasmídeo GeneJET™ sem fragmento. **PGL3:** vetor PGL3 sem inserto.

### 7.3 Screening das mutações F290V e F455W no gene AChE nas linhagens RecR e Rock

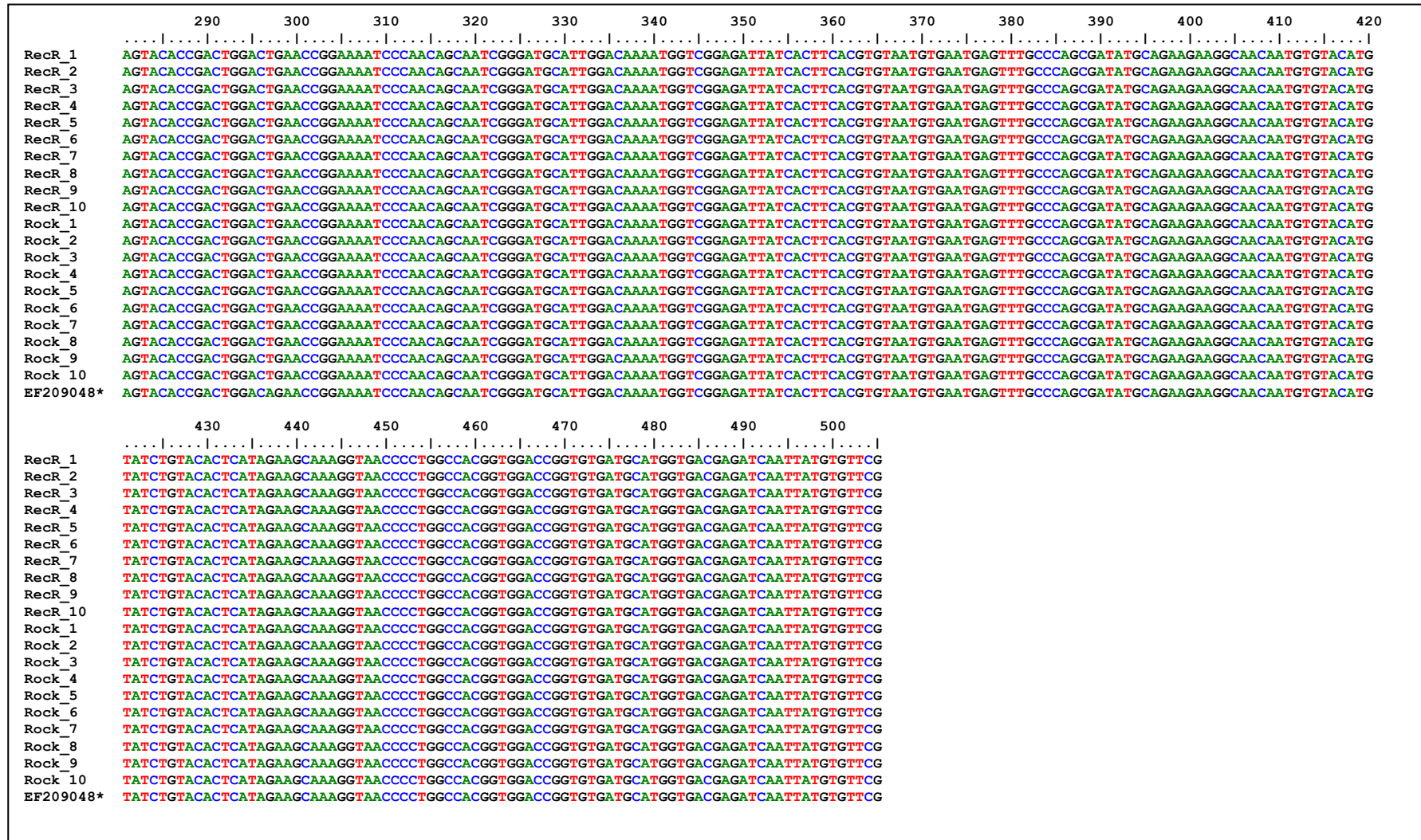
As reações de PCRs foram realizadas em 10 indivíduos de cada uma das linhagens (RecR e Rock). Em todos os indivíduos um fragmento de aproximadamente 507 pb foi amplificado, correspondendo à posição 1211 a 1718 da ORF (*Open Reading Frame*) do gene. Estes fragmentos foram purificados e sequenciados utilizando ambos os *primers*. Depois de sequenciados, os eletroferogramas foram analisados, as sequências foram editadas e os *contigs* formados. A sequência obtida para cada indivíduo foi utilizada em um *blast* com as sequências depositadas nos bancos de dados do NCBI (*National Centers for Biotechnology Information*) e Vectorbase, a fim de se confirmar a identidade do fragmento obtido. As sequências de todos os indivíduos foram alinhadas e o resultado final evidenciou a ausência



das mutações F290V e F455W (**Figura 23**). Além desses dois códon, nenhum outro sítio do fragmento sequenciado apresentou mutações.



**Figura 23-** Alinhamento das sequências nucleotídicas obtidas por amplificação do fragmento do gene da AChE em *Ae. aegypti* resistentes (RecR) e susceptíveis (Rock) ao inseticida temephos. Conclusão



Fonte: Dados do autor.

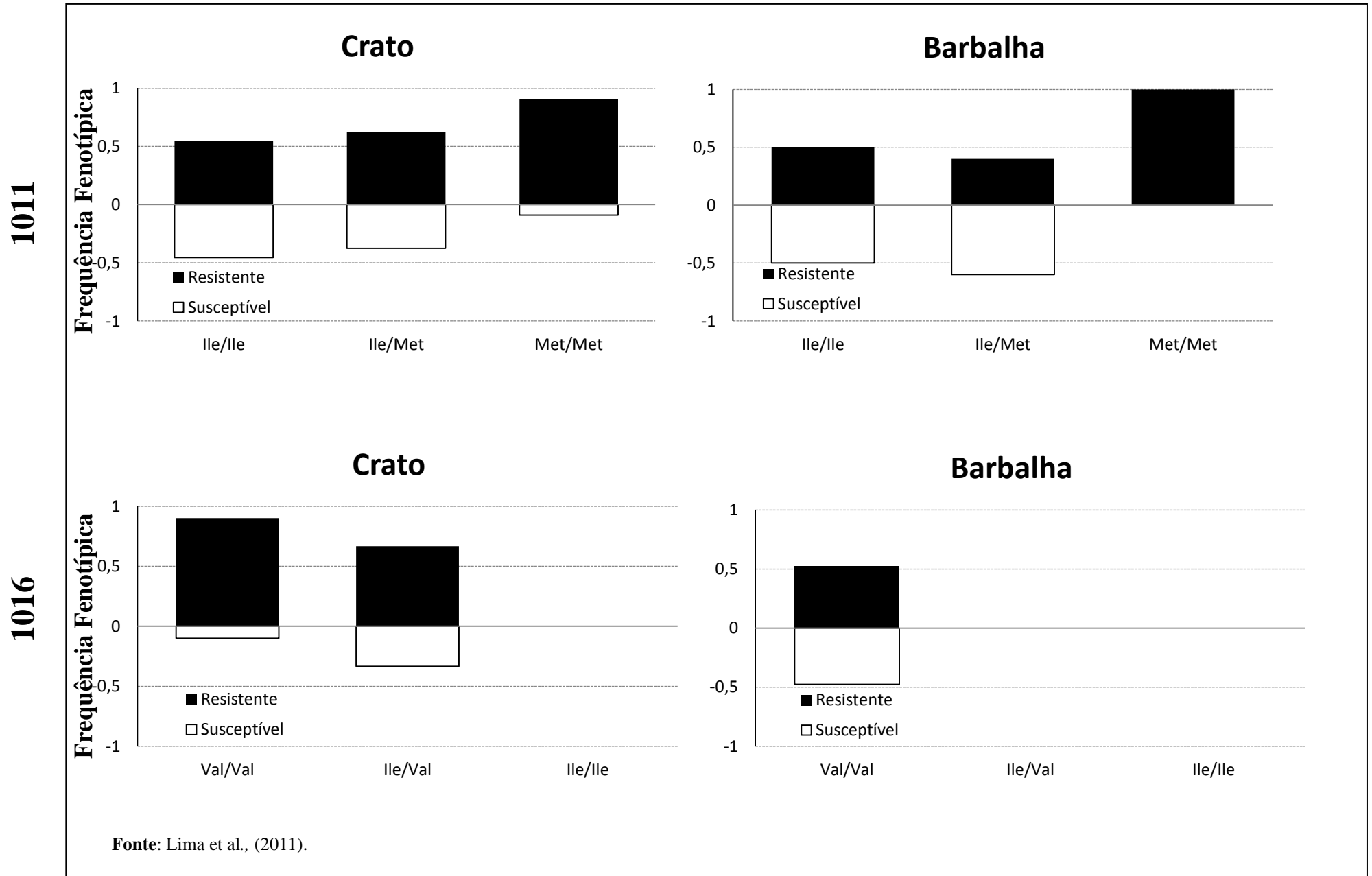
Legenda: Os sítios das mutações F290V e F455W encontram-se destacados em cinza. EF209048\*: sequência da AChE depositada no *GenBank*.

#### 7.4 Detecção de polimorfismos no canal $Na_v$ em amostras coletadas no Estado do Ceará

Resultados do sequenciamento dos indivíduos para o polimorfismo Ile1011Met presente no gene do canal  $Na_v$  revelaram a presença da mutação em todas as três populações. Foram observadas diferenças significativas nas frequências genotípicas entre indivíduos de Barbalha, Crato e Juazeiro do Norte, porém, apenas na comparação entre Crato e Barbalha para a mutação no códon 1011 ( $p = 0,0218$ ). O estudo do polimorfismo Val1016Ile revelou que o alelo mutante *1016Ile* estava presente em amostras do Crato e Juazeiro do Norte, apenas na forma heterozigota. Diferenças significativas nas frequências genotípicas da mutação Val1016Ile foram encontradas entre as populações de Crato e Juazeiro do Norte ( $p = 3,81 \times 10^{-5}$ ) e Crato e Barbalha ( $p = 7,0844 \times 10^{-7}$ ). A relação entre as frequências dos genótipos, distribuídos de acordo com o fenótipo, é mostrada na **figura 24** e nas **tabelas 9 e 10**.

As populações de Barbalha e Juazeiro estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ao contrário do observado em mosquitos provenientes da cidade do Crato. Essa população apresentou um *deficit* significativo de heterozigotos para a mutação Ile1011Met ( $p = 0,0197$ ), enquanto que um excesso de heterozigotos foi observado na Val1016Ile ( $p = 0,015$ ). A frequência do alelo *1011Met* foi mais alta em indivíduos resistentes do Crato, e associada significativamente com a resistência a cipermetrina ( $p = 0,0242$ ). Em Barbalha e Juazeiro do Norte, a resistência não foi associada com esse alelo (**Tabela 9**). Embora o alelo resistente *1016Ile* tenha sido observado nos indivíduos resistentes e susceptíveis do Crato, nenhuma associação foi achada entre esse alelo e o fenótipo resistente. Todos os indivíduos provenientes de Barbalha foram homozigotos para o alelo *1016Val*, desta maneira, nenhum teste de associação foi realizado com essa população. Como todos os indivíduos provenientes de Juazeiro do Norte foram fenotipados como susceptíveis nos bioensaios, não foi possível a realização de testes de associação para ambas as mutações (**Tabela 10**).

**Figura 24-** Frequências genóticas dos códons *ldr* 1011 e 1016, divididas por fenótipos, encontrados em *Aedes aegypti* susceptíveis e resistentes ao piretróide cipermetrina do estado do Ceará.



**Tabela 9:** Frequências genotípicas e alélicas para as mutações *ldr* 1011 em amostras susceptíveis e resistentes de *Aedes aegypti* do Ceará.

Cidade	Fenótipo	Genótipo			Total	N	Frequência Alélica	
		Ile/Ile	Ile/Met	Met/Met			Ile	Met
Crato	Susceptível	5 (0,56)	3 (0,33)	1 (0,11)	9	3	0,725	0,275
	Resistente	6 (0,29)	5 (0,24)	10 (0,48)	21	0	0,410	0,590*
Barbalha	Susceptível	4 (0,40)	6 (0,60)	0 (0,0)	10	2	0,700	0,300
	Resistente	4 (0,36)	4 (0,36)	3 (0,28)	11	1	0,540	0,460
Juazeiro	Susceptível	20 (0,54)	11 (0,30)	6 (0,16)	37	3	0,690	0,310
	Resistente	0	0	0	0	7	0	0

**Fonte:** Lima et al., (2011).

**Legenda:** N = número de indivíduos; Ile = isoleucina; Met = metionina; \* =  $p < 0,005$ .

**Tabela 10:** Frequências genotípicas e alélicas para as mutações *ldr* 1016 em amostras susceptíveis e resistentes de *Aedes aegypti* do Ceará.

Cidade	Fenótipo	Genótipo			Total	N	Frequência Alélica	
		Val/Val	Val/Ile	Ile/Ile			Val	Ile
Crato	Susceptível	1 (0,11)	8 (0,89)	0	9	3	0,555	0,445
	Resistente	9 (0,43)	12 (0,57)	0	21	0	0,715	0,285
Barbalha	Susceptível	10 (1)	0	0	10	2	1	0
	Resistente	11 (1)	0	0	11	1	1	0
Juazeiro	Susceptível	31 (0,84)	6 (0,16)	0	37	3	1	0
	Resistente	0	0	0	0	7	0	0

**Fonte:** Lima et al., (2011).

**Legenda:** N = número de indivíduos; Val = valina; Ile = isoleucina.

## 8 DISCUSSÃO

Este estudo representa o primeiro trabalho de mapeamento de Locos de Caracteres Quantitativos (QTL) associados à resistência ao temephos em mosquitos. Este larvicida é o inseticida de escolha para controle de diversas espécies de insetos. Entretanto, a resistência ao temephos em populações de *Aedes aegypti* tem surgido em várias áreas geográficas e as causas ou os mecanismos podem ser os mais diversos, dentre eles o aumento na atividade metabólica de enzimas de detoxificação (BRAGA; VALLE, 2007a; BRAGA et al., 2004; MELO-SANTOS et al., 2010; MONTELLA et al., 2007). No entanto, não há relatos na literatura associando a resistência ao temephos com alterações no gene da acetilcolinesterase em *Ae. aegypti*, indicando o mecanismo de resistência metabólica como o mais provável.

A linhagem RecR foi selecionada por 17 gerações com o objetivo de se estudar a base molecular da resistência (MELO-SANTOS et al., 2010). A resistência na RecR foi estudada através da análise de microarranjos, onde foi identificada a superexpressão de 13 genes em indivíduos adultos e 6 em larvas (STRODE et al., 2012). Levando-se em consideração a natureza poligênica da resistência metabólica a inseticidas químicos, o desenvolvimento de mapas genéticos e a identificação de locos controladores da característica quantitativa constituem uma alternativa à técnica de microarranjos, para a identificação de outros genes possivelmente envolvidos com o processo da resistência. No presente estudo, a abordagem de QTL foi usada para complementar os estudos anteriores e identificar outros elementos diferentes dos revelados pela técnica de microarranjos. Vários trabalhos avaliaram a resistência a inseticidas químicos em mosquitos por meio da técnica de mapeamento de QTL (RANSON et al., 2000; 2004; WONDJI; HEMINGWAY; RANSON, 2007; WONDJI et al., 2007; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2008).

O primeiro experimento de cruzamentos recíprocos, envolvendo mosquitos da linhagem resistente RecR e susceptível Rock, utilizou a metodologia de cruzamentos chamada de AIL (*Advanced Intercrossed Lines*) (DARVASI, 1998). Apesar da metodologia de AIL ter sido empregada com sucesso em diferentes estudos de mapeamento genético em mosquitos (BENNETT et al., 2005; BOSIO et al., 2000; GOMEZ-MACHORRO et al., 2004; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2008), dificuldades técnicas foram observadas nos cruzamentos RecR x Rock. Essas complicações, apesar de apontadas como constantes em experimentos realizados por outros grupos de pesquisas (WILDING, comunicação pessoal), diminuíram geração após geração o número de indivíduos obtidos por esses cruzamentos. Além disso, as genotipagens realizadas na geração parental evidenciaram um baixo grau de

polimorfismo entre os membros dos casais. Saavedra-Rodriguez et al. (2008) obtiveram êxito ao realizarem o AIL para o mapeamento de QTL associado à resistência ao piretróide (PYR) permetrina em *Ae. aegypti*. Esses autores analisaram 493 indivíduos provenientes da F<sub>3</sub> e, dos 146 marcadores de SNP usados para a genotipagem na geração parental, 99 foram identificados como polimórficos entre membros do casal. O protocolo de AIL também foi empregado com sucesso no estudo da base molecular da infecção do vírus dengue em *Ae. aegypti*. Gomes-Machorro et al. (2004) obtiveram famílias na F<sub>5</sub> com aproximadamente 150 indivíduos cada. Esses mesmos autores também identificaram 44 marcadores de SNP e RFLP polimórficos em um grupo de 108 genotipados na parental (GOMEZ-MACHORRO et al., 2004). É importante considerar que os resultados obtidos nos cruzamentos do presente estudo podem ter sido influenciados pela idade da linhagem Rock. Essa colônia, originária do Caribe, tem sido mantida em laboratório desde o início da década de 30 (LEE, 2009). Desta forma, é possível que muitos dos sítios analisados entre a RecR e Rock sejam idênticos, levando a um baixo número de polimorfismos entre indivíduos dessas linhagens.

Um novo experimento de intercruzamentos, em que tanto as linhagens quanto o protocolo utilizado foram diferentes do anterior foi conduzido. Para a maximização do número de marcadores polimórficos neste novo protocolo. Cada cruzamento da geração parental continha um macho e cinco fêmeas, enquanto que um macho e sete fêmeas foram utilizados para cada casal da F<sub>1</sub>. Duas linhagens de *Ae. aegypti* foram utilizadas no lugar da Rock: a MoyoD e a Red (THATHY; SEVERSON; CHRISTENSEN, 1994). Ambas as colônias, mantidas no insetário da Universidade de Notre Dame, nunca foram expostas a inseticidas químicos e apresentavam *background* diferente da RecR. Enquanto a colônia MoyoD é originária da cidade de Mombasa, no Quênia, a linhagem Red foi obtida a partir da população de laboratório de Liverpool, na Inglaterra (CRAIG; HICKEY, 1967; THATHY; SEVERSON; CHRISTENSEN, 1994).

Diferente dos resultados obtidos entre os cruzamentos do tipo AIL entre mosquitos da RecR x Rock, a genotipagem realizada entre diferentes casais parentais dos cruzamentos RecR x MoyoD e RecR x Red demonstraram um maior número de marcadores polimórficos entre os membros dos casais. Dois desses casais foram selecionados, baseado no maior número de sítios informativos, para a abertura dos ovos e continuação dos cruzamentos até a F<sub>2</sub>. A recombinação dos marcadores indicaram a presença de dois grupos de ligação no cruzamento RecR x MoyoD, e três grupos no cruzamento RecR x Red. Levando-se em consideração que os grupos de ligação são definidos como conjuntos de genes cujos locos estão localizados no mesmo cromossomo (CARNEIRO, 2002), seria esperado encontrar um



terceiro grupo de ligação no cruzamento RecR x MoyoD. Contudo, os marcadores provenientes do terceiro grupo de ligação não apresentaram segregação mendeliana, portanto foram excluídos da análise final. Em ambos os casos, a localização e ordem dos marcadores mapeados encontravam-se de acordo com o descrito por mapeamentos realizados anteriormente (MORI et al., 2008; MORI et al., 2001; SEVERSON et al., 1995a; SEVERSON et al., 1994a). A ordem linear dos marcadores mapeados nos dois cruzamentos desse trabalho sugere que a ordem dos genes seja conservada entre as populações providas de diferentes partes do mundo, uma vez que trabalhos prévios de mapeamentos utilizaram linhagens de *Ae. aegypti* da Alemanha, Trinidad e México (CHAMBERS et al., 2007; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2008; SEVERSON et al., 1995a). É importante destacar que, dentro dos grupos de ligação obtidos em ambos os cruzamentos, foram mapeados pela primeira vez marcadores de microssatélites localizados dentro de *supercontigs* que continham genes de esterases. Esses novos marcadores mapeados poderão ser incorporados em outros projetos de mapeamento genético em *Ae. aegypti*, aumentando ainda mais a resolução dos mapas de ligação desse mosquito.

No presente estudo, o mapeamento de caracteres quantitativos permitiu a localização de um QTL associado à resistência ao temephos, presente na porção intermediária do cromossomo II, em ambos os cruzamentos. Na progênie segregante RecR x MoyoD, esse QTL (LOD = 39,6) encontrava-se entre as posições 29,4 cM e 57,5 cM. Enquanto esse mesmo QTL (LOD = 25,2) foi encontrado entre as posições 29,4 cM e 48,2 cM no cruzamento RecR x Red. Estudos anteriores demonstraram a presença de diferentes QTL localizados no cromossomo II, que controlam a susceptibilidade de *Ae. aegypti* a patógenos, tais como *Brugia malayi*, *Plasmodium gallinaceum* e o vírus da febre amarela (BEERNTSEN et al., 1995; SEVERSON et al., 1995a; SEVERSON et al., 1994a; ZHONG et al., 2006). Os resultados obtidos aqui representam o primeiro mapeamento de QTL associado à resistência ao temephos em *Ae. aegypti*. A resistência a inseticidas químicos em mosquitos do gênero *Anopheles* foi bastante estudada por meio de mapeamento de QTL, mesmo antes da elucidação do genoma do *An. gambiae* (HOLT et al., 2002). Ranson et al. (2000) investigaram a base molecular da resistência metabólica ao DDT na linhagem ZAN/U, derivada da população de *An. gambiae* de Zanzibar, Tanzânia. Esses autores identificaram duas regiões de QTL, uma presente no cromossomo III e outra no II, as quais foram denominadas de *rtd1* e *rtd2* (*resistance to ddt 1 e 2*), respectivamente (RANSON et al., 2000). Resultados similares foram obtidos no mapeamento de genes implicados na resistência à cipermetrina, em uma linhagem resistente de *An. gambiae* originária de Kisumu, Quênia. Dois

QTL foram identificados no cromossomo III, sendo um deles flanqueado por vários *clusters* de citocromos P450. Um terceiro QTL foi detectado no cromossomo II, no qual estava contido o gene do canal de  $Na_V$  (RANSON et al., 2004). Utilizando a mesma estratégia, Wondji et al. (2007) revelaram a base molecular da resistência à permetrina em mosquitos da colônia de *An. funestus* FUMOZ, procedente de coletas realizadas no sul de Moçambique. O QTL encontrado estava próximo à região telomérica do cromossomo II, denominado de *rp1 – resistance to permethrin 1*. O mapeamento físico de genes candidatos demonstrou que esse QTL é geneticamente ligado a um *cluster* de genes de oxidases da família *CYP6* (WONDJI et al., 2007).

Apenas em 2008, um ano após a publicação do genoma do *Ae. aegypti* (NENE et al., 2007), foi publicado o primeiro estudo de mapeamento de QTL associado à inseticida nesse mosquito (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2008). Esses autores identificaram dois QTL no cromossomo I e no cromossomo II. Além desses, dois QTL de grande efeito, com valores de LOD quase dez vezes mais alto do que nos outros dois cromossomos, foram identificados no cromossomo III. Esses dois QTL foram associados ao gene do canal de  $Na_V$  e à esterase *CCEunk7o* (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2008). A elevação na atividade de esterases é considerada como o principal mecanismo de resistência a inseticidas OPs em insetos (HEMINGWAY, 2000; MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012). No presente trabalho, análises de bioinformática revelaram a presença de um *cluster* de genes de carboxilesterases na região de QTL mapeada. Sete genes de esterases (*CCEae3A*, *CCEae1C*, *CCEae2C*, *CCEae3C*, *CCEae4C*, *CCEae5C* e *CCEae6C*) foram sequenciadas e seus transcritos quantificados por RT-PCR em Tempo-Real. Apesar de várias mutações terem sido identificadas nesses genes, apenas os genes *CCEae1C*, *CCEae4c* e *CCEae6C* apresentaram mutações não-sinônimas. No entanto, nenhuma associação foi encontrada entre essas mutações e a resistência ao temephos. Por outro lado, a quantificação da expressão dessas esterases revelou uma maior expressão da esterase *CCEae3A* no cruzamento RecR x MoyoD, enquanto que as esterases *CCEae1C*, *CCEae5c* e *CCEae6C* apresentaram-se mais transcritas em indivíduos resistentes do cruzamento RecR x Red. Strode et al. (2012), ao utilizar o *Detox-chip* com a RecR, identificaram uma elevada expressão dos genes *CYP6N12*, *Aldeído oxidase 10382*, *GSTi1*, *GSTo1*, *GSTx2* e *CCEae3A*. Adicionalmente, o presente estudo revelou que as esterases *CCEae1C*, *CCEae5c* e *CCEae6C*, que não estão contidas no *chip*, também estão envolvidas no processo de resistência da RecR. É possível que um mapeamento mais refinado do QTL presente no cromossomo II, aponte o envolvimento de mais genes associados ao processo de resistência ao OP temephos na RecR. Com o propósito de

identificar genes candidatos presentes no QTL *rp1*, Wondji et al. (2009) analisaram as gerações F<sub>3</sub> e F<sub>6</sub> dos cruzamentos entre *An. funestus* susceptíveis e resistentes à permetrina. Esses autores identificaram no QTL *rp1* duas citocromos P450, as *CYP6P4* e *CYP6P9*, que se encontravam duplicadas no genoma do mosquito e se apresentavam superexpressas de 25 e 51 vezes em indivíduos resistentes, respectivamente. No entanto, análises das regiões 5' contendo o promotor não revelaram a base molecular da superexpressão desses genes (WONDJI et al., 2009).

Estudos sobre a base molecular da resistência a inseticidas químicos em mosquitos têm sido cada vez mais frequentes, uma vez que o desenvolvimento de métodos de diagnóstico molecular da resistência a xenobióticos pode auxiliar na implementação de estratégias de controle mais eficientes. No entanto, os únicos métodos de diagnóstico molecular empregados em programas de controle são exclusivos para detecção de mutações em genes que codificam moléculas de sítio-alvo de ligação do inseticida. Os resultados obtidos no presente trabalho, associado aos dados previamente publicados por Strode et al., 2012, demonstram a variedade de genes envolvidos na resistência metabólica da RecR. Devido a essa multiplicidade de genes de detoxificação e sobreposições de especificidades de substratos, uma grande variedade de combinações de enzimas pode estar envolvida em uma dada população resistente, dificultando assim o desenvolvimento de um método de diagnóstico molecular para uso em programas de controle de mosquitos. Além disso, é possível que mosquitos provenientes de diferentes regiões do mundo, resistentes a diferentes tipos de inseticidas organofosforados, possuam um grupo diferente de genes detoxificadores associados com a resistência.

Baseado nos resultados obtidos previamente na RecR, por meio da técnica de microarranjos, o presente estudo propôs-se a estudar mais detalhadamente o gene da P450 *CYP6N12*, uma vez que seu perfil de expressão acompanhou a evolução da resistência ao temephos na RecR (7,5 vezes mais expresso) e diminuiu consideravelmente quando a resistência foi revertida na RecRev, sendo o gene com maior nível de expressão na RecR em relação à linhagem susceptível (STRODE et al., 2012). O resultado do alinhamento das sequências da região 5' não-traduzida das linhagens RecR, RecRev e Rock demonstrou um distinto padrão de polimorfismos do tipo *indels* entre as três linhagens. Indivíduos da colônia RecR apresentaram um fragmento com 14 nucleotídeos a mais do que a maioria das sequências da RecRev. Duas dessas sequências obtidas na RecRev apresentaram padrão de *indels* idêntico ao obtido na RecR. Diante desses resultados, decidimos testar a possibilidade de associação entre esse polimorfismo e o perfil de expressão da *CYP6N12* entre indivíduos

da RecR e RecRev. Novos *primers* foram desenhados, permitindo assim realizar uma PCR-diagnóstica alelo-específica, baseada no polimorfismo observado na região 5'UTR de *CYP6N12*. Os resultados mostraram uma forte associação estatística ( $p = 5,8 \times 10^{-5}$ ) entre o alelo R (14 pb maior) e o fenótipo resistente em indivíduos da RecR, enquanto que, a frequência desse alelo foi de apenas 0,12 na colônia cuja resistência havia sido revertida. Para testar a influência do alelo R nos níveis de transcritos da *CYP6N12* produzidos, RNAs foram obtidos dos mesmos indivíduos submetidos à genotipagem e sua expressão relativa comparada à presença/ausência do alelo resistente. Em síntese, a maior frequência observada do alelo R na linhagem RecR foi relacionada à superexpressão de aproximadamente 10 vezes do gene *CYP6N12*, quando comparados à expressão do gene na RecLabab. Em contrapartida, indivíduos da RecRev apresentaram uma frequência menor do alelo R e uma superexpressão de aproximadamente 4 vezes da *CYP6N12* do que a RecLabab. A análise da associação entre o genótipo do indivíduo e a expressão do gene P450 evidenciou que, quando em homozigose, o alelo R induzia a uma maior expressão da *CYP6N12* em ambas as linhagens.

O polimorfismo da região 5' não-traduzida da *CYP6N12* também foi estudado em populações naturais de *Ae. aegypti*, resistentes à cipermetrina (DJOUAKA et al., 2008; MITCHELL et al., 2012; MULLER et al., 2008; RANSON et al., 2002b; STRODE et al., 2006). A análise desse polimorfismo nas amostras procedentes do Estado de Pernambuco revelou a presença do alelo R em todas as populações estudadas, porém apenas em Fernando de Noronha e Salgueiro foi observada uma associação significativa entre a presença do alelo mutante e o fenótipo da resistência à cipermetrina. Além da resistência a esse piretróide, as populações aqui estudadas também apresentam resistência cruzada ao temephos, com exceção de Recife (resistência moderada) e Fernando de Noronha (susceptível) (Araújo et al., dados não-publicados). Estudos apontam algumas oxidases P450 como potenciais marcadores para a predição da resistência a inseticidas químicos. A *CYP9J32*, por exemplo, é encontrada em forte associação com a resistência metabólica em *Ae. aegypti*. Níveis significantes de superexpressão dessa oxidase foram também observados em amostras resistentes a piretróides do Vietnam (BINGHAM et al., 2011), México e Tailândia (STRODE et al., 2008). A identificação de genes de citocromo oxidase individuais constitui uma fundamental informação na identificação de genes envolvidos no processo de resistência metabólica. Stevenson et al. (2012) utilizaram um sistema de *Escherichia coli* para expressar oxidases, visando investigar a habilidade dessas enzimas em metabolizar compostos piretróides. Esses autores demonstraram que *in vitro* as *CYP9J32*, *CYP9J24*, *CYP9J26* e *CYP9J28* são capazes de metabolizar os inseticidas permetrina e deltametrina, e, portanto possuem papel

fundamental na detoxificação de piretróides em *Ae. aegypti*. As *CYP9J26* e *CYP9J28* apresentaram níveis elevados de expressão em amostras resistentes a deltametrina desse mosquito provenientes das Ilhas Caiman e Cuba (BARIAMI et al., 2012). Em *An. gambiae*, vários genes P450 foram identificados com superexpressão em populações resistentes à permetrina, tais como o *CYP6Z1* (NIKOU; RANSON; HEMINGWAY, 2003), *CYP6Z2* (MCLAUGHLIN et al., 2008), *CYP325A3* (AWOLOLA et al., 2009; DAVID et al., 2005), *CYP6M2* (DJOUAKA et al., 2008; MULLER; DONNELLY; RANSON, 2007) e *CYP6P3* (DJOUAKA et al., 2008; MULLER et al., 2008). Todas essas oxidases, com exceção da *CYP325A3*, foram expressas *in vitro*, porém apenas a *CYP6P3* (MULLER et al., 2008) e a *CYP6M2* (STEVENSON et al., 2012) foram identificadas como capazes de metabolizar piretróides. Embora a identificação da superexpressão de genes de citocromos P450 seja frequente em populações naturais de mosquitos resistentes a inseticidas, poucos são os trabalhos que conseguem demonstrar o mecanismo molecular que leva ao aumento da atividade dessas enzimas. Wilding et al. (2012) demonstraram por expressão *in vitro* que a presença parcial de um elemento de transposição, achado na região 5' não-traduzida da *CYP9M10* em uma linhagem resistente a permetrina de *Cx. quinquefasciatus*, induz à expressão 10 vezes maior do gene. No entanto, a atividade do gene repórter não diminui quando esse *transposon* é excisado da sequência, indicando que esse elemento móvel não possui ação direta na resistência à permetrina na população estudada (WILDING et al., 2012). No presente trabalho, ensaios realizados com gene repórter demonstraram que o polimorfismo, observado na região 5' não-traduzida da *CYP6N12* da RecR, não foi capaz de induzir um maior aumento da expressão do gene quando comparado às atividades relativas obtidas com sequências da RecRev e Rock. Esse resultado sugere que o polimorfismo identificado na região 5' UTR não é o único fator envolvido na expressão do gene *CYP6N12*.

Com relação à análise das mutações F290V e F455W no gene (*ACE-1*) da enzima acetilcolinesterase (AChE), a comparação dos resultados obtidos nas colônias RecR e Rock, e a sequência depositada no Vectorbase demonstrou a ausência dessas mutações, além de uma identidade de 100% do fragmento obtido. Estudos anteriores demonstraram que, até o momento, três substituições não-sinônimas são encontradas em associação com a insensibilidade da AChE em mosquitos. A mutação G119S (nomenclatura baseada na classificação feita em *Torpedo californica*) (TOUTANT, 1989) foi encontrada em associação com a resistência em *Cx. pipiens*, *Cx. vishnui*; *An. gambiae* e *An. albimanus* (WEILL et al., 2003; WEILL et al., 2004b). A substituição F290V foi encontrada em associação com a resistência em *Cx. pipiens* (ALOUT et al., 2007a; ALOUT et al., 2007b) e a F455W em *Cx.*

*tritaeniorhyncus* (NABESHIMA et al., 2004). Por outro lado, a resistência a OPs via insensibilidade da AChE nunca foi reportada em *Ae. aegypti* e por conseguinte, nenhuma mutação tenha sido identificada na espécie (BISSET; RODRIGUEZ; FERNANDEZ, 2006). Weill et al. (2004b) demonstraram que, em *Ae. aegypti*, a probabilidade da mutação G119S ocorrer é mínima, pois necessitaria de dois eventos mutacionais nessa espécie (GGA – AGY). Esses mesmos autores demonstraram que esse códon encontrava-se imutável em amostras de *Ae. aegypti* provenientes de 26 países, incluindo mosquitos do Brasil (WEILL et al., 2004a). Considerando que a enzima AChE é a molécula de entrada de inseticidas OPs, a ausência de polimorfismos nas sequências dessa enzima na RecR aponta para um mecanismo de resistência diferente da alteração de sítio-alvo.

O estudo do polimorfismo Ile1011Met, presente no gene do canal de sódio dependente de voltagem ( $Na_V$ ), revelou uma significativa associação entre a frequência do alelo *1011Met* e a resistência à cipermetrina, na população do Crato. Apesar do alelo *1011Met* ter sido detectado em indivíduos provenientes de Barbalha e Juazeiro do Norte, nenhuma associação foi encontrada entre a frequência alélica e o fenótipo de resistência em mosquitos dessas localidades. A análise da mutação Val1016Ile demonstrou, pela primeira vez, a presença do alelo mutante *1016Ile* em amostras do Nordeste (Crato e Juazeiro do Norte). Esse alelo, em sua forma recessiva confere o fenótipo *kdr*, foi encontrado em nosso estudo apenas na forma heterozigótica. Resultados similares foram encontrados por Saavedra-Rodriguez et al. (2007), que encontraram o alelo *1016Ile* apenas sob a forma heterozigótica em amostras de *Ae. aegypti* da América Latina. Em estudo anterior, conduzido com populações do mosquito de diferentes regiões do Brasil, foi demonstrado que o alelo *1016Ile* era encontrado quase que exclusivamente na região Centro-Oeste, estando ausente do Nordeste e Sudeste (MARTINS et al., 2009a). É possível que além dessas duas mutações, outros polimorfismos nesse gene estejam associados com a resistência à cipermetrina nas populações aqui estudadas. Chang et al. (2009) identificou a associação entre duas mutações, a Val1016Gli e a Asp1763Tir, em uma linhagem de *Ae. aegypti* com a resistência à permetrina. A coexistência de duas mutações também foi reportada em uma população de *Ae. aegypti* resistente à deltametrina da Tailândia. Ao analisar três segmentos do 2º domínio do gene  $Na_V$ , Srisawat et al. (2010) observaram uma associação entre os alelos *989Pro* (Ser989Pro) e *1016Gli* (Val1016Gli) em indivíduos resistentes de Khu Bua. Nesse caso, a mutação Ser989Pro foi considerada como aditiva ao fenótipo resistente, já que o polimorfismo Val1016Gli já foi encontrado em indivíduos resistentes, na ausência da substituição Ser989Pro na Tailândia (BRENGUES et al., 2003). Além dessa associação, novos alelos de resistência do tipo *kdr* têm sido reportados

em *Ae. aegypti* resistentes a inseticidas PY e OC. A mutação Fen1269Cis foi identificada em mosquitos resistentes a permetrina e DDT do Vietnam, das Ilhas Caiman e Tailândia (HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010; KAWADA et al., 2010; YANOLA et al., 2011).

A detecção da associação significativa entre o fenótipo resistente e o alelo mutante, aqui demonstrado, é de fundamental importância para o desenho de novas estratégias de controle na região do Cariri-CE, uma vez que o uso contínuo de inseticidas PY pode promover o aumento exponencial da frequência do alelo na população, levando à sua fixação. García et al. (2009) identificaram um aumento drástico na frequência do alelo *1016Ile* em amostras de *Ae. aegypti* do México, entre os anos de 1996 e 2009. Segundo os autores, se não houver um custo biológico associado com o alelo *1016Ile* na ausência do uso de permetrina, esse aumento poderá fixar rapidamente o alelo mutante na população (GARCIA et al., 2009). Em trabalho similar, Lynd et al. (2010), estudando o polimorfismo Leu1014Fen em *An. gambiae*, observaram que em um período de 5 anos, a frequência do alelo *1014Fen* aumentam em mais de dez vezes (de 0,05 para 0,54). Esses autores afirmam que a seleção positiva gerada pelo uso indiscriminado de inseticidas pode levar a uma fixação do alelo em mosquitos do sudeste de Gana (LYND et al., 2010).

Estudos sobre a base molecular da resistência a inseticidas químicos têm sido cada vez mais frequentes, demonstrando a complexidade de elementos envolvidos no processo de detoxificação dos organismos. Diante da complexidade que existe no ecossistema urbano e da capacidade adaptativa do mosquito *Ae. aegypti*, a utilização de estratégias alternativas de controle, tais como a eliminação dos criadouros potenciais, saneamento básico, abastecimento regular de água e uso de diferentes formulações inseticidas podem aumentar as chances de sucesso nos programas de controle desse vetor. No entanto, as estratégias de controle de *Ae. aegypti* no Brasil são as mesmas desde o século passado, levando a uma larga disseminação pelo território nacional da resistência a compostos organofosforados e piretróides (ANDRADE, 1991; CAMPOS; ANDRADE, 2001; LUNA, 2004; POLANCZYK, 2003). É imprescindível verificar rotineiramente a eficácia das ferramentas de controle utilizadas, uma vez que a escolha de inseticidas é extremamente limitada. Outro elemento a ser considerado na problemática do manejo da resistência é o fator ambiental. A contínua utilização de compostos inseticidas pode causar desequilíbrios ambientais, eliminando insetos não-alvos, contaminando o meio ambiente, bem como causando intoxicações na população humana. Cada população de *Ae. aegypti* representa um caso específico de estudo, visto que a reversão da resistência dependerá de fatores como as condições ambientais, dos tipos de mutações envolvidas no fenótipo e do histórico de aplicações de inseticidas. Sendo assim, a conclusão

geral do presente trabalho é que vários genes estão envolvidos com a resistência ao temephos na mesma linhagem. Portanto, desenvolver um método diagnóstico que possa ser usado de forma generalizada será difícil, sendo necessário observar cada caso de resistência metabólica, pois cada solução pode ser única.



## 9 CONCLUSÕES

- a) A alta resistência ao temephos observada em *Aedes aegypti* da linhagem RecR está associada à presença de um QTL presente na porção intermediária do cromossomo II;
- b) Os genes de esterases *CCEae3A*, *CCEae1C*, *CCEae5c* e *CCEae6C*, presentes no QTL mapeado na linhagem RecR, apresentam uma discreta elevação em suas expressões quando comparados indivíduos resistentes aos susceptíveis;
- c) O polimorfismo observado na região 5' não-traduzida do gene da P450 CYP6N12 está associado com a elevada expressão desse gene nas linhagens RecR e RecRev;
- d) Esse mesmo polimorfismo está presente em populações naturais de *Ae. aegypti* resistentes à cipermetrina, provenientes do Estado de Pernambuco. Em amostras de Fernando de Noronha e Salgueiro, o polimorfismo encontra-se associado à resistência ao piretróide;
- e) As variações nucleotídicas observadas entre as sequências da região 5' UTR da *CYP6N12* não são as únicas responsáveis pela elevada expressão do gene;
- f) A resistência ao temephos observada na linhagem RecR não está associada a mutações no gene da acetilcolinesterase;
- g) A mutação no gene do canal de  $Na_v$  Ile1011Met apresenta associação com a resistência ao inseticida cipermetrina apenas na população de *Ae. aegypti* do Crato, apesar dessa mutação estar presente nas outras populações estudadas do Ceará;
- h) A análise da mutação Val1016Ile revelou pela primeira vez a presença do alelo de resistência *1016Ile* em uma população de *Ae. aegypti* do Nordeste.

## REFERÊNCIAS

- ALOUT, H. et al. Different amino-acid substitutions confer insecticide resistance through acetylcholinesterase 1 insensitivity in *Culex vishnui* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) from China. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 44, n. 3, p. 463-469, 2007a.
- \_\_\_\_\_. A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 37, n. 1, p. 41-47, 2007b.
- \_\_\_\_\_. High incidence of ace-1 duplicated haplotypes in resistant *Culex pipiens* mosquitoes from Algeria. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 41, n. 1, p. 29-35, 2011.
- ANDRADE, C. F.; MODOLO, M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis var israelensis* in integrated control. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 25, p. 184-187, 1991.
- ANTHONY, N. et al. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Federation of European Biochemical Societies Letters, Amsterdam, v. 368, n. 3, p. 461-465, 1995.
- ANTOLIN, M. F. et al. Intensive linkage mapping in a wasp (*Bracon hebetor*) and a mosquito (*Aedes aegypti*) with single-strand conformation polymorphism analysis of random amplified polymorphic DNA markers. Genetics, Austin, v. 143, n. 4, p. 1727-1738, 1996.
- APPERSON, C. S.; GEORGHIOU, G. P. Inheritance of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis* Coquillet. Bulletin of the World Health Organization, Geneva, v. 52, n. 1, p. 97-100, 1975.
- ASIH, P. B. et al. Existence of the rdl mutant alleles among the *Anopheles* malaria vector in Indonesia. Malaria Journal, London, v. 11, p. 57, 2012.
- AWOLOLA, T. S. et al. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto* from Nigeria. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 103, n. 11, p. 1139-1145, 2009.
- AYRES, C. F. et al. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 40, n. 4, p. 430-435, 2003.
- \_\_\_\_\_. Comparative genomics of the *Anopheline* glutathione S-transferase epsilon cluster. PLoS One, San Francisco, v. 6, n. 12, p. e29237, 2011.
- BADOLO, A. et al. Development of an allele-specific, loop-mediated, isothermal amplification method (AS-LAMP) to detect the L1014F kdr-w mutation in *Anopheles gambiae* s. l. Malaria Journal, London, v. 11, p. 227, 2012.

- BAHNCK, C. M.; FONSECA, D. M. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex* (*Culex*) *pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 75, n. 2, p. 251-255, 2006.
- BARIAMI, V. et al. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 6, n. 6, p. e1692, 2012.
- BASS, C.; FIELD, L. M. Gene amplification and insecticide resistance. Pesticide Management Science, West Sussex, v. 67, n. 8, p. 886-890, 2011.
- BECKER, N. P. D. et al. Mosquitoes and their control. 2nd. ed. New York, 2010.
- BEERNTSEN, B. T. et al. *Aedes aegypti*: a quantitative trait locus (QTL) influencing filarial worm intensity is linked to QTL for susceptibility to other mosquito-borne pathogens. Experimental Parasitology, New York, v. 81, n. 3, p. 355-362, 1995.
- BENNETT, K. E. et al. Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti*. Genetics, Austin, v. 170, n. 1, p. 185-194, 2005.
- BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Research, London, v. 27, n. 2, p. 573-580, 1999.
- BERGE, J. B.; FEYEREISEN, R.; AMICHOT, M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B - Biological Science, London, v. 353, n. 1376, p. 1701-1705, 1998.
- BERTICAT, C. et al. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. BMC Evolutionary Biology, London, v. 8, p. 104, 2008.
- BINGHAM, G. et al. Can piperonyl butoxide enhance the efficacy of pyrethroids against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti*? Tropical Medicine and International Health, Oxford, v. 16, n. 4, p. 492-500, 2011.
- BISSET, J.; RODRIGUEZ, M. M.; FERNANDEZ, D. Selection of insensitive acetylcholinesterase as a resistance mechanism in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Santiago de Cuba. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 43, n. 6, p. 1185-1189, 2006.
- BISSET, J. A.; RODRIGUEZ, M. M.; CACERES, L. Levels of resistance to insecticides and their mechanisms in 2 strains of *Aedes aegypti* from Panama. Revista Cubana de Medicina Tropical, Havana, v. 55, n. 3, p. 191-195, 2003.
- BISSET, J. A. et al. Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008. Medical Veterinary Entomology, Oxford, v. 25, n. 3, p. 233-239, 2011.
- BLACK IV, W. C.; TABACHNICK, W. J. Population Genetics of Disease Vectors. In: MARQUARDT, W. C. et al (Ed.). Biology of Disease Vectors. Burlington: Elsevier, 2005. Cap.32. p. 785.

BLACK, W. C.; SEVERSON, D. W. Genetics of vector competence. In: WC, M. (Ed.). Biology of disease vectors. Amsterdam: Harcourt Academic Press, 2002. p. 415-448.

BLACKMAN, R. L. et al. Inheritance of the amplified esterase genes responsible for insecticide resistance in *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). Heredity, Edinburgh, v. 77, p. 154-167, 1996.

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

BOSIO, C. F. et al. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. Genetics, Austin, v. 156, n. 2, p. 687-698, 2000.

BOURGUET, D. et al. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. Evolution, Lancaster, v. 58, n. 1, p. 128-135, 2004.

BRAGA, I.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiologia e Serviços de Saúde, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 279-293, 2007a.

\_\_\_\_\_. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 295-302, 2007b.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Reunião técnica para discussão do status de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil. Brasília, DF, 1999

\_\_\_\_\_. Reunião técnica para a discussão do status de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil. Brasília, DF, 2000.

\_\_\_\_\_. Monitoramento da Resistência das Populações de *Aedes aegypti* do País. Brasília, DF, 2003.

\_\_\_\_\_. Reunião técnica para a discussão do status de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil - Relatório final. Brasília, DF, 2005.

\_\_\_\_\_. Uso do larvicida diflubenzuron (PM25%) para o controle do *Aedes aegypti*. Brasília, DF, 2009.

\_\_\_\_\_. Reunião de avaliação do monitoramento da resistência das populações de *Aedes aegypti* do Brasil. Brasília, DF, 2009.

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

BROGDON, W. G. Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. Parasitology Today, Cambridge, v. 5, n. 2, p. 56-60, 1989.

BROGDON, W. G.; DICKINSON, C. M. A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions. Analytical Biochemistry, New York, v. 131, n. 2, p. 499-503, 1983.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 4, n. 4, p. 605-613, 1998.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. Larval susceptibility to chemical insecticides of two *Aedes aegypti* populations. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 232-236, 2001.

CARNEIRO, M. S. V., M. L. C. Mapas genéticos em plantas. Bragantia, Campinas, v. 61, n. 2, p. 89-100, 2002.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: past, present, or future? Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 43, p. 1-16, 1998.

CHAMBERS, E. W. et al. Microsatellite isolation and linkage group identification in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Journal of Heredity, Washington, v. 98, n. 3, p. 202-210, 2007.

CHANDA, E. et al. Insecticide resistance and the future of malaria control in Zambia. PLoS One, San Francisco, v. 6, n. 9, p. e24336, 2011.

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

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

CHE-MENDOZA, A. P., R.P.; RODRÍGUEZ, D.A. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. African Journal of Biotechnology, Nairobi, v. 8, p. 123-140, 2010.

CHEN, C. D. et al. Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to temephos in four study sites in Kuala Lumpur City Center and Selangor State, Malaysia. Tropical Biomedicine, Kuala Lumpur, v. 22, n. 2, p. 207-216, 2005.

COLEMAN, M. H., J. Insecticide resistance monitoring and evaluation in disease transmitting mosquitoes. Journal of Pesticide Science, Heidelberg, v. 32, n. 2, p. 69-76, 2007.

- COLLARD, B. C. Y. et al. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica, Wageningen, v. 142, p. 169-196, 2005.
- COLLINS, F. H. et al. Progress in the map-based cloning of the *Anopheles gambiae* genes responsible for the encapsulation of malarial parasites. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v. 91, n. 5, p. 517-521, 1997.
- CRAIG, G. B., JR.; HICKEY, W. A. Current status of the formal genetics of *Aedes aegypti*. Bulletin of the World Health Organization, Geneva, v. 36, n. 4, p. 559-562, 1967.
- CROW, J. F. Genetics of resistance to chemicals. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 2, p. 227-246, 1957.
- DARRIET, F.; HOUGARD, J. M.; CORBEL, V. Effect of pyrethroid and organophosphate bi-treated nets on the behaviour of Kdr+ *Anopheles gambiae* mosquitoes. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique, Paris, v. 98, n. 3, p. 201-204, 2005.
- DARVASI, A. Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. Nature Genetics, New York, v. 18, n. 1, p. 19-24, 1998.
- DARVASI, A.; SOLLER, M. Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic mapping. Genetics, v. 141, n. 3, p. 1199-1207, 1995.
- DAVID, J. P. et al. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. Proceeding of the National Academy of Sciences of USA, Washington, v. 102, n. 11, p. 4080-4084, 2005.
- DAVIDSON, G.; ZAHAR, A. R. The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. Bulletin of the World Health Organization, Geneva, v. 49, n. 5, p. 475-483, 1973.
- DIABATE, A. et al. The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. Tropical Medicine and International Health, Oxford, v. 9, n. 12, p. 1267-1273, 2004.
- DING, Y. et al. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. BMC Genomics, London, v. 4, n. 1, p. 35, 2003.
- DJOUAKA, R. F. et al. Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. BMC Genomics, London, v. 9, p. 538, 2008.
- DONNELLY, M. J. et al. Does kdr genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes? Trends in Parasitology, Oxford, v. 25, n. 5, p. 213-219, 2009.
- ETANG, J. et al. First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 74, n. 5, p. 795-797, 2006.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources, Oxford, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA:CENARGEN, 1998.

FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 44, p. 507-533, 1999.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. et al. Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 45, p. 449-466, 2000.

FINNEY, D. J. Probit Analysis. 3rd. ed. Cambridge: Cambridge University, 1971.

FLORES, A. E. et al. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 22, n. 4, p. 672-677, 2006.

FRYXELL, R. T. et al. The knockdown resistance mutation and knockdown time in *Anopheles gambiae* collected from Mali evaluated through a bottle bioassay and a novel insecticide-treated net bioassay. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 28, n. 2, p. 119-122, 2012.

FULTON, R. E. et al. SSCP analysis of cDNA markers provides a dense linkage map of the *Aedes aegypti* genome. Genetics, Austin, v. 158, n. 2, p. 715-726, 2001.

GARCIA, G. P. et al. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 3, n. 10, p. e531, 2009.

GEORGHIOU, G. P. Management of resistance in Arthropods. In: GEORGHIOU, G. P.; SAITO, T. (Ed.). Pest Resistance to Pesticides: Challenges and Prospects. New York: Plenum Press, 1983. p. 769-792.

GEORGHIOU, G. P.; LAGUNES-TEJADA, A. The Occurrence of Resistance to Pesticides in Arthropods. An index of cases reported through 1989. Rome: FAO, 1981.

GOMEZ-MACHORRO, C. et al. Quantitative trait loci affecting dengue midgut infection barriers in an advanced intercross line of *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 13, n. 6, p. 637-648, 2004.

GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. Tropical Medicine and International Health, Oxford, v. 39, n. 4 Suppl, p. 3-11, 2011.

GUZOV, V. M. et al. CYP12A1, a mitochondrial cytochrome P450 from the house fly. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, v. 359, n. 2, p. 231-240, 1998.

HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: genome context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.; SCHLÖTTERER, C. (Ed.). Microsatellites: Evolution and applications. New York: Oxford University Press, 1999. p. 1-9.

HARRIS, A. F.; RAJATILEKA, S.; RANSON, H. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 83, n. 2, p. 277-284, 2010.

HART, D. L.; CLARK, A. G. Genética Quantitativa Evolutiva: Princípios de Genética de Populações. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HAWKES, N. J.; HEMINGWAY, J. Analysis of the promoters for the beta-esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1574, n. 1, p. 51-62, 2002.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 30, n. 11, p. 1009-1015, 2000.

HEMINGWAY, J. et al. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B - Biological Sciences, London, v. 353, n. 1376, p. 1695-1699, 1998.

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

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

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Chemical Control of Vectors and Mechanisms of Resistance. In: MARQUARDT, W. C. et al (Ed.). Biology of Disease Vectors. Fort Collins: Elsevier, 2005. cap.41.

HIMEIDAN, Y. E. et al. Extensive permethrin and DDT resistance in *Anopheles arabiensis* from eastern and central Sudan. Parasite and Vectors, London, v. 4, p. 154, 2011.

HOLT, R. A. et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Science, Washington, v. 298, n. 5591, p. 129-149, 2002.

HOTELIER, T., ; NEGRE, V.; MARCHOT, P.; CHATONNET, A. Insecticide resistance through mutations in cholinesterases or carboxylesterases : data mining in ESTHER database. Journal of Pest Science, Heidelberg, v. 35, p. 315-320, 2010.

HOTELIER, T. et al. ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. Nucleic Acids Research, London, v. 32, p. D145-147, 2004.

HUBER, K. et al. *Aedes aegypti* in south Vietnam: ecology, genetic structure, vectorial competence and resistance to insecticides. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, London, v. 34, n. 1, p. 81-86, 2003.



\_\_\_\_\_. Short report: microsatellite sequences as markers for population genetic studies of the mosquito *Aedes aegypti*, the vector of dengue viruses. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 61, n. 6, p. 1001-1003, 1999.

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

KASAI, T. et al. Relationship between sodium intake and sleep apnea in patients with heart failure. Journal of the American College of Cardiology, New York, v. 58, n. 19, p. 1970-1974, 2011.

KAWADA, H. et al. Spatial distribution and pyrethroid susceptibility of mosquito larvae collected from catch basins in parks in Nagasaki city, Nagasaki, Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases, Tokyo, v. 63, n. 1, p. 19-24, 2010.

KELLY-HOPE, L.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Lessons from the past: managing insecticide resistance in malaria control and eradication programmes. Lancet Infectious Diseases, New York, v. 8, n. 6, p. 387-389, 2008.

KLIOT, A.; GHANIM, M. Fitness costs associated with insecticide resistance. Pest Management Science, West Sussex, v. 68, n. 11, p. 1431-1437, 2012.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. Annals of Eugenics, London, v. 12, p. 172-175, 1994.

LAN, Q.; FALLON, A. M. Sequence analysis of a mosquito ribosomal protein rpL8 gene and its upstream regulatory region. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 1, n. 2, p. 71-80, 1992.

LANDER, E. S. et al. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics, San Diego, v. 1, n. 2, p. 174-181, 1987.

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

LEE, H. L. J., H.; NAZNI, W. A.; VASAN, S. S. Comparative life parameters of transgenic and wild strain of *Aedes aegypti* in the laboratory. Dengue Bulletin, Geneva, v. 33, p. 103-114, 2009.

LIMA, E. P. et al. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara, Brazil. Parasite and Vectors, London, v. 4, p. 5, 2011.

LIU, Y. et al. Correlation between carboxylesterase alleles and insecticide resistance in *Culex pipiens* complex from China. Parasite and Vectors, London, v. 4, p. 236, 2011.

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

LOVIN, D. D. et al. Genome-based polymorphic microsatellite development and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and application to population genetics in Haiti. BMC Genomics, London, v. 10, p. 590, 2009.

LOWY, I. Yellow fever in Rio de Janeiro and the Pasteur Institute Mission (1901-1905): the transfer of science to the periphery. Bulletin of the History Medicine, Baltimore, v. 34, n. 2, p. 144-163, 1990.

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

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

LUNA, J. D. M., M. F.; ANJOS, A. F.; KUWABARA, E. F.; NAVARRO-SILVA, M. A. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 38, p. 842-843, 2004.

LYNCH, M.; WALSH, B. Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sunderland: Sinauer Associates, 1998.

LYND, A. et al. A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (kdr) detection in *Anopheles gambiae*. Malaria Journal, London, v. 4, n. 1, p. 16, 2005.

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

MACIEL-DE-FREITAS, R.; CODECO, C. T.; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. Body size-associated survival and dispersal rates of *Aedes aegypti* in Rio de Janeiro. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 21, n. 3, p. 284-292, 2007.

MADDRELL, S. H. P. The insect neuroendocrine system as a target for insecticides. London: Society for Chemical Industry, 1980. (Insect Neurobiology and Pesticide Action).

MAITRA, S. et al. Three second chromosome-linked clustered Cyp6 genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. Gene, Amsterdam, v. 180, n. 1-2, p. 165-171, 1996.

MARCOMBE, S. et al. Reduced efficacy of pyrethroid space sprays for dengue control in an area of Martinique with pyrethroid resistance. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 80, n. 5, p. 745-751, 2009a.

\_\_\_\_\_. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. PLoS One, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e30989, 2012.

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

MARTINEZ-TORRES, D. et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 7, n. 2, p. 179-184, 1998.

\_\_\_\_\_. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Insect Molecular Biology, Oxford, v. 8, n. 3, p. 339-346, 1999.

MARTINS, A. J. et al. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. Tropical Medicine and International Health, Oxford, v. 14, n. 11, p. 1351-1355, 2009a.

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

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

MATHIAS, D. K. et al. Spatial and temporal variation in the kdr allele L1014S in *Anopheles gambiae* s.s. and phenotypic variability in susceptibility to insecticides in Western Kenya. Malaria Journal, London, v. 10, p. 10, 2011.

MCLAUGHLIN, L. A. et al. Characterization of inhibitors and substrates of *Anopheles gambiae* CYP6Z2. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 17, n. 2, p. 125-135, 2008.

MEKURIA, Y. et al. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* from Santo Domingo, Dominican Republic. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 7, n. 1, p. 69-72, 1991.

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

MITCHELL, S. N. et al. Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. Proceedings of the National Academy of Natural Sciences of USA, Washington, v. 109, n. 16, p. 6147-6152, 2012.

MONTELLA, I. R. et al. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.

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

MORGAN, J. C. et al. Pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population from Uganda. PLoS One, San Francisco, v. 5, n. 7, p. e11872, 2010.

MORI, A. et al. Quantitative trait loci determining autogeny and body size in the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*). Heredity, Edingurgh, v. 101, n. 1, p. 75-82, 2008.

MORI, A.; SEVERSON, D. W.; CHRISTENSEN, B. M. Comparative linkage maps for the mosquitoes (*Culex pipiens* and *Aedes aegypti*) based on common RFLP loci. Journal of Heredity, Washington, v. 90, n. 1, p. 160-164, 1999.

MORI, A. et al. Comparative linkage map development and identification of an autosomal locus for insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex tritaeniorhynchus*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 10, n. 3, p. 197-203, 2001.

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

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

MULLER, P.; DONNELLY, M. J.; RANSON, H. Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. BMC Genomics, London, v. 8, p. 36, 2007.

MULLER, P. et al. Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. PLoS Genetics, San Francisco, v. 4, n. 11, p. e1000286, 2008.

MUNSTERMANN, L. E. C., G. B. J. Genetics of *Aedes aegypti*: updating the linkage map. Journal of Heredity, Washington, v. 70, p. 291-296, 1979.

NABESHIMA, T. et al. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. Biochemistry and Biophysics Research Community, New York, v. 313, n. 3, p. 794-801, 2004.

NELSON, D. R. et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. DNA and Cell Biology, New York, v. 12, n. 1, p. 1-51, 1993.

NENE, V. et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. Science, Washington, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007.

NIKOU, D.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. Gene, Amsterdam, v. 318, p. 91-102, 2003.

- NORRIS, L. C.; NORRIS, D. E. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes after the introduction of insecticide-treated bed nets in Macha, Zambia. Journal of Vector Ecology, Santa Ana, v. 36, n. 2, p. 411-420, 2011.
- OAKESHOTT, J. G. et al. The genomics of insecticide resistance. Genome Biology, London, v. 4, n. 1, p. 202, 2003.
- OCHOMO, E. et al. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles arabiensis* in western Kenya: phenotypic, metabolic and target site characterizations of three populations. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, 2012.
- OPPENOORTH, F. J. Biochemistry and genetics of insect resistance. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 47, p. 501-533, 1985.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. The technical basis for coordinated action against insecticide resistance: preserving effectiveness of modern malaria vector control. Geneva, 2011.
- \_\_\_\_\_. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides - Diagnostic test. Geneva, 1981. (Document WHO/VBC/81.806).
- \_\_\_\_\_. 14th report of the WHO Expert Committee on vector biology and control. Geneva, 1991. (Technical report series, n. 813).
- ORTELLI, F. et al. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. Biochemical Journal, London, v. 373, n. Pt 3, p. 957-963, 2003.
- OVERGAARD, H. J. *Malaria Mosquito Resistance to Agricultural Insecticides: Risk Area Mapping in Thailand*. Colombo: International Water Management Institute, 2006.
- PATON, M. G. et al. Quantitative analysis of gene amplification in insecticide-resistant *Culex* mosquitoes. Biochemical Journal, London, v. 346 Pt 1, p. 17-24, 2000.
- PING, L. T.; YATIMAN, R.; GEK, L. P. Susceptibility of adult field strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore to pirimiphos-methyl and permethrin. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 17, n. 2, p. 144-146, 2001.
- PITTENDRIGH, B. et al. Point mutations in the *Drosophila* sodium channel gene para associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides. Molecular and General Genetics, v. 256, n. 6, p. 602-610, 1997.
- POLANCZYK, R. A. G., M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 37, p. 813-816, 2003.
- PONLAWAT, A.; SCOTT, J. G.; HARRINGTON, L. C. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 42, n. 5, p. 821-825, 2005.

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

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

RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Mosquito glutathione transferases. Methods in Enzymology, New York, v. 401, p. 226-241, 2005.

RANSON, H. et al. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 9, n. 5, p. 499-507, 2000.

\_\_\_\_\_. Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 11, n. 5, p. 409-418, 2002b.

\_\_\_\_\_. Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 13, n. 4, p. 379-386, 2004.

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

RAWLINS, S. C. et al. A comparison of surveillance systems for the dengue vector *Aedes aegypti* in Port of Spain, Trinidad. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 14, n. 2, p. 131-136, 1998.

RAWLINS, S. C.; WAN, J. O. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 11, n. 1, p. 59-65, 1995.

ROBINSON, A. et al. Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. Biochemical Journal, London, v. 379, n. Pt 3, p. 541-552, 2004.

RODRIGUEZ, M. M. et al. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 21, n. 4, p. 437-445, 2005.

ROSE, R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 7, n. 1, p. 17-23, 2001.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods in Molecular Biology, Totowa, v. 132, p. 365-386, 2000.

RUDBECK, L.; DISSING, J. Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. Biotechniques, Natick, v. 25, n. 4, p. 588-590, 592, 1998.

RUIGT, G. S. F. Pyrethroids. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford: Pergamon Press, 1985. cap.7. p. 183-263.

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

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. et al. Quantitative trait loci mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. Genetics, Austin, v. 180, n. 2, p. 1137-1152, 2008.

\_\_\_\_\_. Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 21, n. 1, p. 61-77, 2012.

\_\_\_\_\_. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 16, n. 6, p. 785-798, 2007.

SABOURAULT, C. et al. Overproduction of a P450 that metabolizes diazinon is linked to a loss-of-function in the chromosome 2 ali-esterase (MdeltaE7) gene in resistant house flies. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 10, n. 6, p. 609-618, 2001.

SALINAS, A. E.; WONG, M. G. Glutathione S-transferases--a review. Current Medicinal Chemistry, Schipol, v. 6, n. 4, p. 279-309, 1999.

SCOTT, J. G.; WEN, Z. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. Pest Management Science, West Sussex, v. 57, n. 10, p. 958-967, 2001.

SEVERSON, D. W. et al. Molecular mapping of insecticide resistance genes in the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). Journal Heredity, Washington, v. 88, n. 6, p. 520-524, 1997.

\_\_\_\_\_. Linkage map organization of expressed sequence tags and sequence tagged sites in the mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 11, n. 4, p. 371-378, 2002.

\_\_\_\_\_. Comparative linkage maps for the mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti*, based on common RFLP loci. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 4, n. 1, p. 41-45, 1995a.

\_\_\_\_\_. Linkage map for *Aedes aegypti* using restriction fragment length polymorphisms. Journal of Heredity, Washington, v. 84, n. 4, p. 241-247, 1993.

\_\_\_\_\_. Chromosomal mapping of two loci affecting filarial worm susceptibility in *Aedes aegypti*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 3, n. 2, p. 67-72, 1994a.

\_\_\_\_\_. The suitability of restriction fragment length polymorphism markers for evaluating genetic diversity among and synteny between mosquito species. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 50, n. 4, p. 425-432, 1994b.

\_\_\_\_\_. Restriction fragment length polymorphism mapping of quantitative trait loci for malaria parasite susceptibility in the mosquito *Aedes aegypti*. Genetics, Austin, v. 139, n. 4, p. 1711-1717, 1995b.

SEVERSON, D. W.; ZAITLIN, D.; KASSNER, V. A. Targeted identification of markers linked to malaria and filarioid nematode parasite resistance genes in the mosquito *Aedes aegypti*. Genetics Research, Cambridge, v. 73, n. 3, p. 217-224, 1999.

SHARMA, S. N.; SAXENA, V. K.; LAL, S. Study on susceptibility status in aquatic and adult stages of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* against insecticides at international airports of south India. Journal of Communicable Diseases, Delhi, v. 36, n. 3, p. 177-181, 2004.

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

SHETTY, V.; SANIL, D.; SHETTY, N. J. Insecticide susceptibility status in three medically important species of mosquitoes, *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, from Bruhat Bengaluru Mahanagara Palike, Karnataka, India. Pest Management Science, West Sussex, v.69, n. 2, p. 257-267, 2012.

SHIN, D.; MORI, A.; SEVERSON, D. W. Genetic Mapping a Meiotic Driver That Causes Sex Ratio Distortion in the Mosquito *Aedes aegypti*. Journal of Heredity, Washington, v. 103, n. 2, p. 303-307, 2012.

SILLER, Q. et al. Update on the frequency of Ile1016 mutation in voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 27, n. 4, p. 357-362, 2011.

SLOTMAN, M. A. et al. Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti*, the vector of dengue and yellow fever. Molecular Ecology Notes, Oxford, v. 7, p. 168-171, 2007.

SODERLUND, D. M. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. Pest Management Science, West Sussex, v. 64, n. 6, p. 610-616, 2008.

SODERLUND, D. M.; KNIPPLE, D. C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 33, n. 6, p. 563-577, 2003.

SRISAWAT, R. K., N.; ESHITA, Y. Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti*. Applied Entomology and Zoology, Tokyo, v. 45, p. 275-282, 2010.

STEVENSON, B. J. et al. Pinpointing P450s associated with pyrethroid metabolism in the dengue vector, *Aedes aegypti*: developing new tools to combat insecticide resistance. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 6, n. 3, p. e1595, 2012.



- STRODE, C. et al. Expression Profile of Genes during Resistance Reversal in a Temephos Selected Strain of the Dengue Vector, *Aedes aegypti*. PLoS One, San Francisco, v. 7, n. 8, p. e39439, 2012.
- \_\_\_\_\_. Differential expression of the detoxification genes in the different life stages of the malaria vector *Anopheles gambiae*. Insect Molecular Biology, London, v. 15, n. 4, p. 523-530, 2006.
- \_\_\_\_\_. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 38, n. 1, p. 113-123, 2008.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research, London, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research, London, v. 12, n. 10, p. 4127-4138, 1984.
- TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 21, n. 5, p. 1307-1315, 2005.
- \_\_\_\_\_. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 25, sup. 1, p. S7-18, 2009.
- THATHY, V.; SEVERSON, D. W.; CHRISTENSEN, B. M. Reinterpretation of the genetics of susceptibility of *Aedes aegypti* to *Plasmodium gallinaceum*. Journal of Parasitology, Lawrence, v. 80, n. 5, p. 705-712, 1994.
- TOMA, L. et al. Status of insecticide resistance in *Culex pipiens* field populations from north-eastern areas of Italy before the withdrawal of OP compounds. Pest Management Science, West Sussex, v. 67, n. 1, p. 100-106, 2011.
- TOMITA, T.; SCOTT, J. G. cDNA and deduced protein sequence of CYP6D1: the putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 25, n. 2, p. 275-283, 1995.
- TOUTANT, J. P. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. Progress in Neurobiology, Oxford, v. 32, n. 5, p. 423-446, 1989.
- VAUGHAN, A.; HEMINGWAY, J. Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 270, n. 28, p. 17044-17049, 1995.
- VAUGHAN, A.; ROCHELEAU, T.; FFRENCH-CONSTANT, R. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. Experimental Parasitology, New York, v. 87, n. 3, p. 237-244, 1997.
- VIEIRA, E. A. et al. Mapeamento Genético de Caracteres Quantitativos e sua Interação com o Ambiente. Planaltina: EMBRAPA, 2006.

WANG, Z. M. et al. Detection and widespread distribution of sodium channel alleles characteristic of insecticide resistance in *Culex pipiens* complex mosquitoes in China. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 26, n. 2, p. 228-232, 2012.

WEETMAN, D. et al. Association mapping of insecticide resistance in wild *Anopheles gambiae* populations: major variants identified in a low-linkage disequilibrium genome. PLoS One, San Francisco, v. 5, n. 10, p. e13140, 2010.

WEILL, M. et al. Insecticide resistance: a silent base prediction. Current Biology, London, v. 14, n. 14, p. R552-553, 2004a.

\_\_\_\_\_. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. Medical Science, Paris, v. 19, n. 12, p. 1190-1192, 2003.

\_\_\_\_\_. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2004b.

WILDING, C. S. et al. A cis-regulatory sequence driving metabolic insecticide resistance in mosquitoes: functional characterisation and signatures of selection. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 42, n. 9, p. 699-707, 2012.

WILLIAMSON, M. S. et al. Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). Molecular and General Genetics, Berlin, v. 240, n. 1, p. 17-22, 1993.

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

WONDJI, C. S.; HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Identification and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the mosquito *Anopheles funestus*, malaria vector. BMC Genomics, London, v. 8, p. 5, 2007.

WONDJI, C. S. et al. Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. Genome Research, New York, v. 19, n. 3, p. 452-459, 2009.

\_\_\_\_\_. Mapping a quantitative trait locus (QTL) conferring pyrethroid resistance in the African malaria vector *Anopheles funestus*. BMC Genomics, London, v. 8, p. 34, 2007.

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

YAICHAROEN, R. et al. Characterization of deltamethrin resistance in field populations of *Aedes aegypti* in Thailand. Journal of Vector Ecology, Santa Ana, v. 30, n. 1, p. 144-150, 2005.

YANOLA, J. et al. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution

of this mutation throughout Thailand. Tropical Medicine and International Health, Oxford, v. 16, n. 4, p. 501-509, 2011.

YEWHALAW, D. et al. First evidence of high knockdown resistance frequency in *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) from Ethiopia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 83, n. 1, p. 122-125, 2010.

YUAN, J. S. et al. Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics, London, v. 7, p. 85, 2006.

ZAIM, M.; GUILLET, P. Alternative insecticides: an urgent need. Trends in Parasitology, Oxford, v. 18, n. 4, p. 161-163, 2002.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology, Oxford, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

ZHONG, D. et al. Amplified fragment length polymorphism mapping of quantitative trait loci for malaria parasite susceptibility in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Genetics, Austin, v. 173, n. 3, p. 1337-1345, 2006.

**APÊNDICE A** - Lista dos marcadores de SNP e RFLP utilizados para o mapeamento de QTL associados à resistência

**APÊNDICE A** - Lista dos marcadores de SNP e RFLP utilizados para o mapeamento de QTL associados à resistência.

**Apêndice A:** Lista dos marcadores de SNP e RFLP utilizados para o mapeamento de QTL associados à resistência

Marcador	Cromossomo	Localização	Primer <i>foward</i> (5' - 3')	Primer <i>reverso</i> (5' - 3')
LF90	I	0,0	GGCTCCCCGTAAGAACAAA	GTTTCCTTGCCGGACAGAT
LF178	I	38,0	CATCCGCATCAACAAGATGT	ACCCAGAGCCTCGATAACCT
LF179	I	38,4	GGCTTCACCCAACAACAAGT	CCAGCTTCAAGTCTCCAACC
nAcBP	I	42,2	AACGGAGAACAAAACACAAACA	CAAGCTTTCGGTCCCAATTA
FerH	I	47,2	AGCAGCGATGGAGAAGTGAT	GCATAGACTGCGGACAGACA
<i>cathbp</i>	I	5,0	CAAATTCGGAACCTCACCAG	TATCCACCCTTGCATCCATC
<i>transfer</i>	I	10,0	ATGCGGCCATCCAGGTTTCAG	CCCGCCGACTTCAGTTTCGT
ARC2	I	48,0	ACTACTGAGATAGGACGGAAGA	CCACTTGGACTTGGAGGT
APN	I	54,0	TCCATCACGGCAATCACA	AGATCCAGCCAGCATTTCG
<i>mucin</i>	II	28,0	GACAGCACCCACAGGCAAAT	GCTCCTTTCAACGGGACCTT
LF342	II	35,6	GATTATCGCCGAAAAGTGGA	AAACGAGGGCCTCTTCTAGC
LF158	II	37,9	GGGTCTGAAGATCACCGTGT	ACTCGGGCAATGCTGATAAC
LF223	II	52,6	TTCCAATCCTGCTCTTCCAT	CTGATCCTGGAGGGTAACGA
<i>chymo</i>	II	43,0	CCAGTTTGGCACTCGCTTCC	GACGGCAATGTCATCGGGAC
<i>sin3</i>	II	70,0	GTATCTGTTCTCTCGGTTGC	CCTGAAGTGCTGCTTCTGCT
LF128	III	1,0	GATGTGAAGCGTGTGTTTGG	TTTGGTACCGGTTTCTTGGG
LF111	III	19,0	AGTACTGGCAGCGGCATATT	GACAGCGATTCCGACAGTCT
<i>malt</i>	III	21,0	GGACTGGTGGGAACATGGAA	CTTATCGGACAACCGCTGGA
LF106	III	25,0	AAGGTTTCGCGATAAGCTCAA	GAACAACCATTTCGGGATCAG
<i>vitgC</i>	III	26,0	TGCACAGAAGACCACCAATG	TCGACTGTTCCGCTGAGTTA
<i>para</i>	III	32,0	ATGTGGGATTGTATGCTTG	GATGAACCAGAAATTGGAC
UGALS	III	46,0	AGGGCTACAATCCTGGCTAT	GTATTCTGGCTGCTTGACGT
APY	III	57,1	CAAGGGCCACGGATAATATG	AGATAAGGCGCCAATCCTTT
<i>apyr2</i>	III	57,2	TGATTGCATCGTCGTTGATT	CAACTTGCCTGTTTGTGTTT
<i>CCEae1o</i>	III	6,9	AGGTCCAGAAGCCAAACAGG	GGAAGCAGGTGTAGGTTTCAGAGTA
<i>CCRae1A</i>	Desconhecida	-	CAAGAGTTGCCACTGGATGA	ATAGGCTGCCATTACGAACA
<i>CCEae5A</i>	Desconhecida	-	ACTTGGCTTTCTTTGCCTACC	CCGCTTTGAGCGATTACTTTAT
<i>CCEjhe1F</i>	Desconhecida	-	TTGTGATGAGTGGGAATGCG	TCGGTACAGTGTCAATGGGTCT
<i>CCEunk7o</i>	III	24,6	ACGGAGTCTTTCTTGAAGGGTAA	CACTAACTGCACGAAGCGATG
<i>CCEunk4o</i>	Desconhecida	-	CTGCTGCTGCCACATAACC	CGCCGTGCTTCCAATC
<i>CCEae2D</i>	II	33,0	CGAGCGATTGTTATGTCTGG	AGCCCTTCTTCCGAGTTTC
<i>CCEae4B</i>	Desconhecida	-	AAACCCGAAGTGGCTTGT	GCTCTTGGTAACCGTGGC
<i>CCEae6B</i>	Desconhecida	-	CCATCGCAAAGCACCAG	TCAATAGCAAGCATTCCCTC
<i>CCEbe2o</i>	II	25,0	AGAAATCCGCCGAGAAAGC	GGAGTAAGGGAACCTGATGGAA
<i>NSCOE1</i>	Desconhecida	-	TATGACTAATCTTCCCATCACTCCA	GATAATGACCCGCAACCAAGT

**Fonte:** Severson et al., (2002) e Saavedra-Rodriguez et al., (2008).

**APÊNDICE B** - Lista dos marcadores de microssatélites utilizados para o mapeamento de QTL associados à resistência.

**APÊNDICE B:** Lista dos marcadores de microssatélites utilizados para o mapeamento de QTL associados à resistência.

Loco	Posição	Supercontig	Marcador	Repetição	Foward (5'-3)'	Reverso (5'-3')	Tamanho (pb)
LF90	1 0.00	SC 1.148	148 AAT1	AAT/TTA	TCCAGTTGAATTGACAAATTGC	AAATTTGCTGGTTCGCCTTA	286
Tsf	1 10.2	SC 1.176	176 TG1	TG/AC	CGATCGTTGAAGGCATTTTT	GAGGAACGAAACGCCAATTA	166
AEGI30	1 19.6	SC 1.12	12 ACG1	ACG/TGC	GTCACCCCAAGTAGCTTTGC	GAGGCTTTACTGCTGGTTCG	177
	1 19.6	SC 1.12	12 ATG1	ATG/TAC	TCTGCGCAACACTAAGCATC	AAAAAGCACACCGTTCTCGT	231
AeW	1 29.7	SC 1.71	71 AT1	AT/TA	GCACTGCTCAAATCACCAC	CAACACGCTCCATCCAGTTA	191
	1 29.7	SC 1.71	71 CGT1	CGT/GCA	CACCCATTACTTGCCGTTCT	CTCCCCAAACTCTTTAGCC	387
LF159	1 34.3	SC 1.388	388 GT1	GT/CA	ATTTCGGCCTACATGTGCTTC	ACAGGCCGATTTTGGTATGC	245
	1 34.3	SC 1.388	388 GT2	GT/CA	AGGCCATTCTTAGGGCATT	GGCAACGGCTGAGATAATTG	273
LF314	1 34.5	SC 1.123	123 CTG1	CTG/GAC	GTCCCCGTTTTCCGTTTTAT	AGGTTTTCTGTGGTGTTCG	391
LAP	1 36.6	SC 1.192	192 CAG1	CAG/GTC	CTTTCACCCGCATCGTTTAT	CGTGTCTGGTGAAGAAAAAT	499
	1 36.6	SC 1.192	192 CAG2	CAG/GTC	AGTTTCGCCTTCTCTCACCA	CGTAGGCAGAAGAGGTCCAG	486
	1 36.6	SC 1.192	192 CTT1	CTT/GAA	TTCCGGTATCTAGCGAAAGG	AAACGAGGGCTTAATCGTGA	400
LF284	1 38.0	SC 1.446	446 AAG1	AAG/TTC	TAATCGCAAATTGGGTGTCA	GAGCTTTGCATCATGAGGTG	285
	1 38.0	SC 1.446	446 CAC1	CAC/GTG	ATCAGTCCCAGCCATCTACAC	CGGACGATCACGTCTCAGTA	427
	1 38.0	SC 1.446	446 TG1	TG/AC	AGCCTCCCAAATTACGACCT	TGGTGGTACTGCAATCCAGA	300
Dce1	1 42.2	SC 1.1	1 AAG1	AAG/TTC	GTCAAGATGCACCACACCAG	TGCACAAGTCGGTCATGATT	322
AG3	1 44.6	SC 1.73	73 AG1	AG/TC	CGCCAAAACCTGAAAACCTGAA	AAGGGCGGTGATGACTTTCT	154
FerH	1 44.6	SC 1.252	252 AAG1	AAG/TTC	CTTTCAGATCGGACGTAA	ATCGGGAAGAGCGTTATTTT	225
AT1	2 29.4	SC 1.88	88 AT1	AT/TA	CGTCGACGTTATCTCCTTGTT	CCAACGCAAGATGCAAGATA	221
TY7	1 44.9	SC 1.88	88 CTA1	CTA/GAT	CGAAGTTCCCAACGTTAAA	AGCACGATAAGCATGGTGTG	383
	1 44.9	SC 1.88	88 CTC1	CTA/GAT	ATTTCCAACGACGAAACCTG	GAGAATTCCGGGGAAAAGAC	308
slo	1 48.3	SC 1.96	96 TCT1	TCT/AGA	GGCTAGTTGCGGGATGATTA	TGTAAACTTGTGGGGCCTTC	411
AC2	1 49.1	SC 1.650	650 AC1	AC/TG	AATACAACGCGATCGACTCC	AACGATTAGCTGCTCCGAAA	171
AEGBS11	1 56.4	SC 1.68	68 ATT1	ATT/TAA	TGTGCACCAAGAAAAATCGT	ATCTTCCACGAACGAAATGC	276
	1 56.4	SC 1.68	68 GAC1	GAC/CTG	CGTGTCCGGTGGACTATTCT	AACTTTTCGGTGAACCATCG	386
AEGI22	1 59.0	SC 1.438	438 A1	A/T	ACCGACATTGTCAAACGAAA	GTTCTGTGAGATCCCCTTGAA	102
RT6	1 65.5	SC 1.440	440 TGTA1	TGTA/ACAT	GGTCGTCTGGGGTGAAATAA	GCGCATTAAACGTGACAAG	294
LF115	2 7.3	SC 1.328	328 CTT1	CTT/GAA	ATCCGCTGGATTTACAATGG	CTGTCCAAGTGCGAACGTAA	229
LF103	3 23.5	SC 1.766	766 ATT1	ATT/TAA	TGCAAAGTCGAAGCAACAAG	GAATGCCATTTGCCTTCA	301
AG5	2 23.7	SC 1.210	210 AG1	AG/TC	TGATCTTGAGAAGGCATCCA	CGTTATCCTTTCATCACTTGTG	162
B07	2 35.8	SC 1.462	462 GA1	GA/CT	CAAACAACGAACTGCTCACG	GAATAAGTCACACGCGTCCA	343
CT2	2 36.7	SC 1.109	109 CT1	CT/GA	ACTGAACGCCAACCAAGC	AACACCATTCTTCAGCAGAT	355
LF138	2 47.9	SC 1.25	25 AAG1	AAG/TTC	CTTGCCACACGATGCTAAAA	TGAATTCAAACCCATACGTGA	214
AG7	2 48.3	SC 1.48	48 AG1	AG/TC	CGTGCGAGTGAATGAGAGAC	CATCCTCTCATCAGCTTCTAATAA	142
BA67	2 70.2	SC 1.1132	1132 CT1	CT/GA	TGACGCGTTTGACGTAGTTT	TCCGCAATTACGCTAACAAA	171
LF347	3 0.0	SC 1.301	301 ACG1	ACG/TGC	TTTCCGCGATGGAGAAATAC	CAACCGGAAGACAGAAAAGG	287
	3 0.0	SC 1.301	301 CT1	CT/GA	CTGAACGCGCCATAAATTCT	AGGAGTTCGTCCCAAGACAA	267



B19	3	13.6	SC 1.30	30 CAT1	CAT/GTA	ATTGGCGTGAGAACATTTTG	GAGGAGTGAGCAGATAGGAGTG	177
AEG128	3	14.6	SC 1.288	288 CTA1	CTA/GAT	AGGGAATGACGTCTCACAG	TTGGTTCATTGGGCTTTGC	321
LF103	3	23.5	SC 1.766	766 ATT1	ATT/TAA	TGCAAAGTCGAAGCAACAAG	GAATGCCATTTGCCTTCA	301
LF168	3	32.1	SC 1.69	69 TGA1	TGA/ACT	CACCTCCGCTAGAGAACTGG	CGAATAGGGCAATCCTGAAA	214
AC4	3	43.7	SC 1.86	86 AC1	AC/TG	GCGAATCGGTTCCCATAGTA	ACCCATCGAATTTCCATTCA	257
Rpl31	3	50.0	SC 1.217	217 CTT1	CTT/GAA	TGGACTTCCCCAGATGCAATGA	CAACACGGAAGCAAAGTTGA	257
Apy1	3	57.1	SC 1.201	201 AAT1	AAT/TTA	GATCGTTCGACAGCATCTGA	GGAAAGCTCATCGCCTACTG	336
PABP	3	64.2	SC 1.470	470 AG1	AG/TC	CGGGAGGACACACTGACTTT	GTGGCAAGTAACCCCAAAGA	252
	3	64.2	SC 1.470	470 CT2	CT/GA	GTTGGGAGTGTCCGCATAGT	GCTCCGGTCATCTTGAATGT	315
<i>CCEae1o</i>	desconhecido		SC 1.115	115 ATG1	ATG/TAC	TGGAAGTCACGTGTTGGGTA	TGTGAAATGCGTAGCCTCAG	378
			SC 1.115	115 GTC1	ATG/TAC	ACCTCGCGAGTTTAGCAGAA	GGTCTACGCGTTTGGTTTA	252
<i>CCEae1A_a</i> , <i>CCEae1A_b</i> , <i>CCEae3A</i> , <i>CCEae4A</i> , <i>CCEae5A</i> , <i>CCEae6A</i>	desconhecido		SC 1.142	142 AG1	AG/TC	TGAGCTTCCCCGATTTTCAC	AACTAGCGGATGGCTCTCAA	252
			SC 1.142	142 AG2	AG/TC	AACGAGATCCGCAAAGAGAA	TGATTGTTGAAGCGTCTTGC	449
<i>CCEae2o</i>	desconhecido		SC 1.258	258 CTT1	CTT/GAA	TTCAACTCATGGCGGATTTT	CACTTTCCTTGCCAAACGAT	227
<i>CCEae1B</i> , <i>CCEae2B</i> , <i>CCEae3B</i> , <i>CCEae4B</i> , <i>CCEae5B</i> , <i>CCEae6B</i>	desconhecido		SC 1.55	55 TC1	TC/AG	TTTGCTCGCTCATCACAAAC	TCATGCGCAAGACAAGTAGG	359
			SC 1.55	55 TC1	TC/AG	CCTTGCTCAAACGTTCCAAT	GGCTTGGCACTTTTCGTTTA	168
<i>CCEae1C</i> , <i>CCEae2C</i> , <i>CCEae3C</i> , <i>CCEae4C</i> , <i>CCEae5C</i> , <i>CCEae6C</i>	desconhecido		SC 1.81	81 CGT1	CGT/GCA	TGTTACCGACGAGTCTGACG	ATGCATTCCGCTCTCTGAGT	454
			SC 1.81	81 AGA1	AGA/TCT	CCAGGGTTGAAGTTCGAAAA	CAGAAAATCCAACGGCAAAT	469
<i>CCEae1D</i> , <i>CCEae2D</i>	desconhecido		SC 1.474	474 CTA1	CTA/GAT	TGACCACGCATAGCAGAGAG	TGCAGTTGGCTATTGGATCA	260
<i>CCEunk1o</i> , <i>CCEunk5o</i> , <i>CCEunk6o</i>	desconhecido		SC 1.1	1 GTT1	GTT/CAA	ATAGGTGCGCCTGATTGTTG	AAGGATCCAACCTGGATGTGC	349
			SC 1.1	1 GT1	GT/CA	CACTAGCTCTTCGGGACCAC	CCGTGCGATACCAAGTTTTT	214
<i>CCEbe1o</i>	desconhecido		SC 1.754	754 TCT1	TCT/AGA	CTGATGTGCGCCATAGGGATT	GGGCGTTAATGTCAAGAGGA	216
			SC 1.114	114 AC1	AC/TG	TATGAGTGC GGTTTGACTCG	ATCACCCCTTTGGAAAATCC	274
			SC 1.114	114 AC2	AG/TC	CAAAATCGAACCATCAACC	CAGCATTGTCCACTGTGCT	388
			SC 1.114	114 AG1	AC/TG	TGACGTCCACAGCTCAACAT	GAAGGTCGATGCAACAGGAT	161
			SC 1.114	114 AG2	AG/TC	GGTCTCAATTGCCTTTTCA	ACCGTCCACGTTAGTGTGGT	390
<i>CCEjhe1F</i> , <i>CCEjhe2F</i> , <i>CCEjhe3F</i> , <i>CCEjhe4F</i>	desconhecido		SC 1.145	145 TAG1	TAG/ATC	ACACCGCACCCCTCTAGTTA	AACTATCGTGCCACTGCAAA	294
			SC 1.128	128 ATAG1	ATAG/TATC	CGTCGCATCCCTTATCAAAT	TGCCACCTGTCACTAAGCTG	180
			SC 1.128	128 AAG1	AAG/TTC	TGTTTTCAATCACCGCATCAT	GTCCCCGTGTTTAAAAAGA	307
			SC 1.331	331 CCGA1	CCGA/GGCT	AGATGCGCCTACATTTGGTC	AAATCGAAACTCGCATCGTT	228
<i>CCEunk3o</i>	desconhecido		SC 1.331	331 GGA1	GGA/CCT	CTGAAAGTGGAGCCCTTGAC	TTCGTTACAATCCTCGCACA	333

<i>CCEunk4o</i>	desconhecido	SC 1.35	35 TGA1	TGA/ACT	CATTTTGGAGCTGTGGCTTT	TCAACATCCAATCGGCATAA	272
<i>CCEglt1G</i> ,		SC 1.18	18 TTC1	TTC/AAG	CGATGCAAGTATCCGAGACA	TACTGCGCTGACTTTGTTCC	218
<i>CCEglt2G</i> ,		SC 1.18	18 AAG1	AAG/TTC	CATGGTGCACAAGGACATTC	AGGCTCCCGAAAATTTGTTT	461
<i>CCEglt1H</i> ,	desconhecido						
<i>CCEglt2H</i> ,		SC 1.18	18 GAT1	GAT/CTA	TGAAGAGCGAGAGGTGTGAA	CACGCTAATAGTGGCATGGA	375
<i>CCEglt3H</i> ,							
<i>CCEglt4H</i>							
		SC 1.89	89 TGA1	TGA/ACT	AACCAGCGAGCAAGATGAGT	AAGTGGCATTGGAATAATCG	329
<i>CCEglt1J</i>	desconhecido	SC 1.89	89 TGA2	TGA/ACT	CCTGTCTCAGCAACAAGCAA	TCTGCTTCCCGGTATGATTC	268
		SC 1.89	89 TGA3	TGA/ACT	TTTTTCGTCCGAATCCTCAAC	CCTTTAACGCGGTCAACAAT	308

**Fonte:** Lovin et al., 2009 e dados do autor.

**APÊNDICE C** - Relação dos *primers* utilizados para sequenciar genes carboxilesterases em indivíduos susceptíveis e resistentes provenientes da F2 dos cruzamentos recíprocos.

**APÊNDICE C:** Relação dos *primers* utilizados para sequenciar genes carboxilesterases em indivíduos susceptíveis e resistentes provenientes da F2 dos cruzamentos recíprocos.

<i>Supercontig</i>	<i>Vectorbase</i>	<i>Carboxilesterase</i>	<i>Foward (5'-3)'</i>	<i>Reverso (5'-3')</i>	<i>Tamanho (pb)</i>
1.142	AAEL005112	<i>CCEae3A</i>	142EX1_FW: CTGCACAGAGGCAACAACAT	142EX1_REV: CTGCAAAATGTGGTGTTCAGG	945
			142EX2_FW: TCCTTCCATCCATCCTAGCTT	142EX2_REV: TTCGCCGAAATATAACCATT	789
			142EX3_FW: GCTTTTCATTTGAAGGTAAATCG	142EX3_REV: CAAAGGGCATTTTTATGATTGA	521
	AAEL003195	<i>CCEae1C</i>	3195_FW1: TAAAACCCGCTGCGTTTAAG	3195_REV1: CGAAGGGTTTAAATCCACGA	1176
			3195_FW2: CAATCTGGTACCGCTTTGGT	3195_REV2: GCTCATGCTATGCCAAGCTA	1134
	AAEL003187	<i>CCEae4C</i>	3187_FW1: TGTGACATCCAGCTGTGGTT	3187_REV1: TTATGCTGCGCTGTTAATCG	1176
			3187_FW2: GCTTTCGGTGGTGATCCTAA	3187_REV2: TGCAAATGTCATCCACGGTA	1196
1.81	AAEL003201	<i>CCEae5C</i>	3201_FW1: GGCCTGTTTTGCAGCTACTT	3201_REV1: GGACGGTCTTGCCAATAGAA	1061
			3201_FW2: ATAACCCACGGGAAATGTCA	3201_REV2: GGCAGTCATCGAGAAAGAG	1058
	AAEL003198	<i>CCEae6C</i>	3198_FW1: TCGCATGCTTAGTGTTACCG	3198_REV1: CAGTAGGCGCAAAATCCAAT	958
			3198_FW2: AAAGTGGGGCCTCAAAGATT	3198_REV2: TAATCGAAATGCCATCGTCA	1122

**Fonte:** Dados do autor.

**APÊNDICE D** - *Primers* utilizados na quantificação da expressão de genes carboxilesterase em indivíduos susceptíveis e resistentes provenientes da F2 dos cruzamentos recíprocos

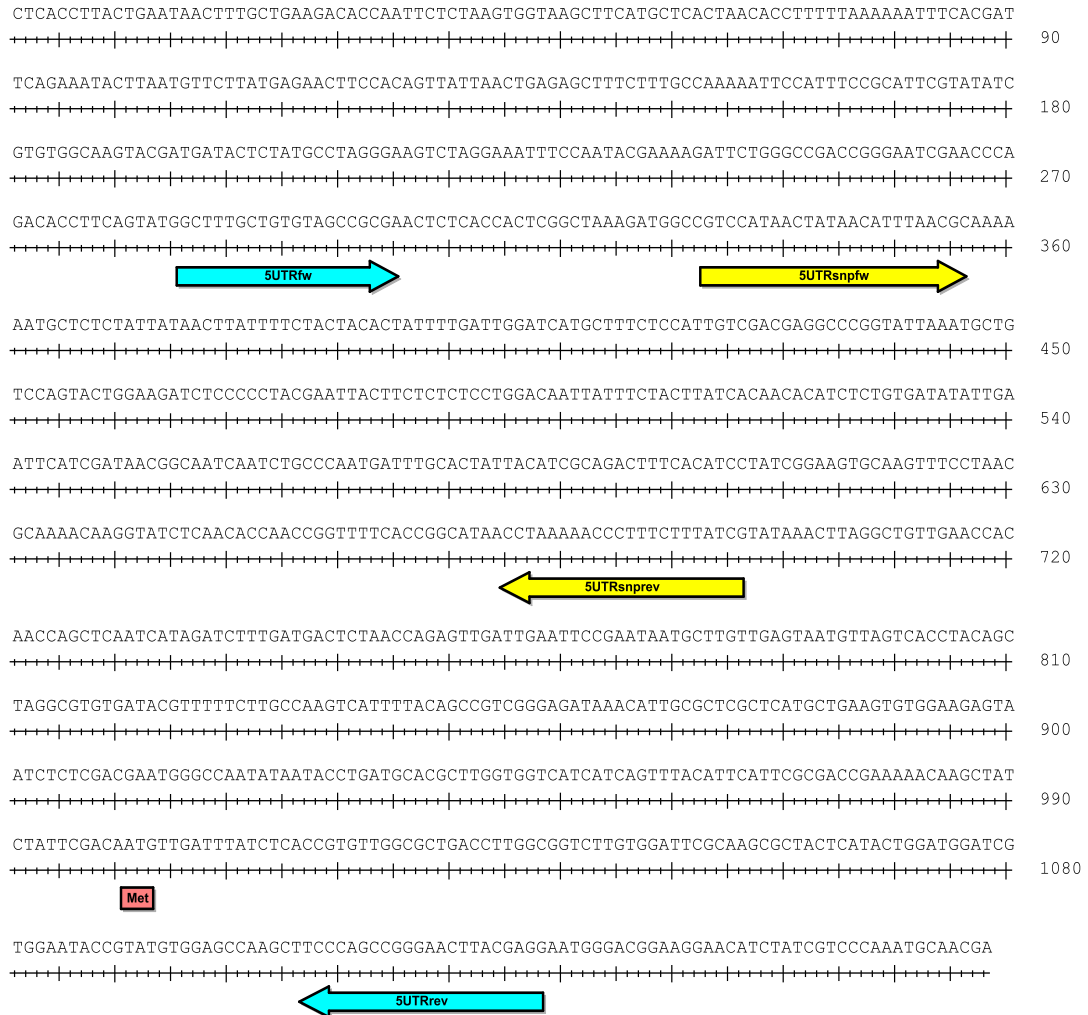
**APÊNDICE D:** *Primers* utilizados na quantificação da expressão de genes carboxilesterase em indivíduos susceptíveis e resistentes provenientes da F2 dos cruzamentos recíprocos.

<i>Supercontig</i>	<i>Vectorbase</i>	<i>Carboxilesterase</i>	<i>Foward (5'-3')</i>	<i>Reverso (5'-3')</i>	<i>Tamanho (pb)</i>
1.142	AAEL005112	<i>CCEae3A</i>	q5112_FW: CATTCAAACCTCTCGGTTGA	q5112_REV: GAAGCAATCGGTCTTCTGGA	89
	AAEL003195	<i>CCEae1C</i>	q3195_FW: TCTTCGTCCCTCACTTTTGG	q3193_REV: AGAGCGATCCTGCCAGTAGA	95
1.81	AAEL003196	<i>CCEae2C</i>	q3196_FW: TCAAAGAACCATCACCGACA	q3196_REV: GGCTCTGGAGAGTTGACTGG	90
	AAEL003181	<i>CCEae3C</i>	q3181_FW: AATCCAGCAAACCTTGTTTCG	q3181_REV: GTAGGGCCGTATCGGAATTT	94
	AAEL003187	<i>CCEae4C</i>	q3187_FW: GGATGGACTGGAGTGAAGGA	q3187_REV: AGTCTTCGTCCCCGGAGTAT	91
	AAEL003201	<i>CCEae5C</i>	q3201_FW: GCGATGGTTATGACGGAGAT	q3201_REV: ACACCATGACTGGTCGTGAA	84
	AAEL003198	<i>CCEae6C</i>	q3198_FW: ATTACGGGAATATCCGCACA	q3198_REV: AATAATCCGCACGATTTCGAC	86

**Fonte:** Dados do autor.

**APÊNDICE E** - Esquema representativo do posicionamento dos *primers* utilizados na amplificação do gene da *CYP6N12* em *Aedes aegypti*.

**APÊNDICE E:** Esquema representativo do posicionamento dos *primers* utilizados na amplificação do gene da *CYP6N12* em *Aedes aegypti*.



Fonte: Dados do autor.



**APÊNDICE F** - Artigo: Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil.



## Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil

M.A.V. Melo-Santos<sup>a,\*</sup>, J.J.M. Varjal-Melo<sup>a</sup>, A.P. Araújo<sup>a</sup>, T.C.S. Gomes<sup>a,c</sup>, M.H.S. Paiva<sup>a,b</sup>, L.N. Regis<sup>a</sup>, A.F. Furtado<sup>a</sup>, T. Magalhaes<sup>a</sup>, M.L.G. Macoris<sup>d</sup>, M.T.M. Andrighetti<sup>d</sup>, C.F.J. Ayres<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife PE, Brazil

<sup>b</sup> Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES), Av. Portugal, 584, Bairro Universitário, Caruaru PE, Brazil

<sup>c</sup> Mestrado em Biologia Animal, Departamento de Zoologia/UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, Recife PE, Brazil

<sup>d</sup> Superintendencia de Controle de Endemias, SUCEN, Núcleo de Pesquisa/Serviço Regional 11 Marília, Av. Santo Antonio 1627, Marília SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 August 2009

Received in revised form 20 October 2009

Accepted 22 October 2009

Available online 30 October 2009

#### Keywords:

Mosquito

Insecticide resistance

Laboratory selection

Biochemical assay

Cross resistance

Resistance reversal

### ABSTRACT

Insecticide resistance is one of the main problems in vector control programs. Because insects have developed resistance to all classes of available chemical insecticides, a proper surveillance and management of resistance in areas where these compounds are being utilized is crucial for the success of control programs. Since the mechanisms and molecular bases of resistance are various, they must be characterized to allow efficient monitoring strategies. Here we report the establishment of an *Aedes aegypti* strain resistant to temephos, named RecR, selected under laboratory conditions. The parental *A. aegypti* population was obtained from eggs collected in an area where temephos had been used for 8 years, and presented a baseline resistance ratio (RR) of 7. After 17 generations under selective pressure, the RR has increased to 180. Biochemical assays indicate that metabolic mechanisms are involved on temephos resistance in the selected strain. These experiments showed that, compared to the susceptible colony Rockefeller, RecR present higher activity of glutathione S-transferases (GSTs),  $\alpha$ - and  $\beta$ -esterases, and, to a lesser degree, mixed function oxidases (MFO). At the 14th or 17th generations, there was no cross resistance of these insects to deltamethrin, cypermethrin and malathion, while a low resistance level (RR = 3) was observed for pyriproxyfen, a juvenile hormone analogue. Experiments on resistance reversal, performed through three different field simulated schemes using the resistant strain, showed that temephos susceptibility can be recovered. The establishment of an *A. aegypti* colony resistant to temephos is extremely valuable for a deeper understanding of resistance mechanisms and thus for further improvements in control strategies against this vector. With the urgent need on improving methodologies to monitor resistance, molecular studies such as microarrays, and resistant colonies such as RecR will certainly hasten such studies.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The mosquito *Aedes aegypti* is the most important disease vector in urban environments, due to its great adaptability to such conditions (Regis et al., 2008) and its efficient vectorial capacity for some arboviruses, as dengue (DENV) (Anderson and Rico-Hesse, 2006). Due to the lack of vaccines for most arthropod-borne diseases, including dengue, vector control is the main strategy to prevent or contain disease outbreaks.

A powerful tool in vector control programs are insecticides. The use of the chemical dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), an organochlorine, was thought to be the great solution for controlling insects of public health concern in the 1950s and 1960s. After

the appearance and rapid dissemination of DDT resistance, other chemical insecticide classes have been developed and widely used. These include the organophosphates (OP), carbamates and, more recently, pyrethroids. However, resistance to these compounds has also been developed in the field and poses one of the greatest challenges in vector control strategies (Hemingway and Ranson, 2000).

Resistance in insects may arise through different mechanisms that can be divided, among others, into metabolic or target-site insensitivity. Distinct mechanisms can work independently or synergistically and confer resistance to most available insecticides. Metabolic resistance is achieved either by super-expression of detoxifying enzymes or by alterations in their amino acid sequences which confer them higher metabolic efficiency. In the first case, the super-expression of these molecules may be a consequence either of gene amplification or mutations in the gene's regulatory region. The most important detoxifying enzymes are esterases, glutathione

\* Corresponding author. Tel.: +55 81 21012645; fax: +55 81 21012516.

E-mail address: [mavarjal@cpqam.fiocruz.br](mailto:mavarjal@cpqam.fiocruz.br) (M.A.V. Melo-Santos).

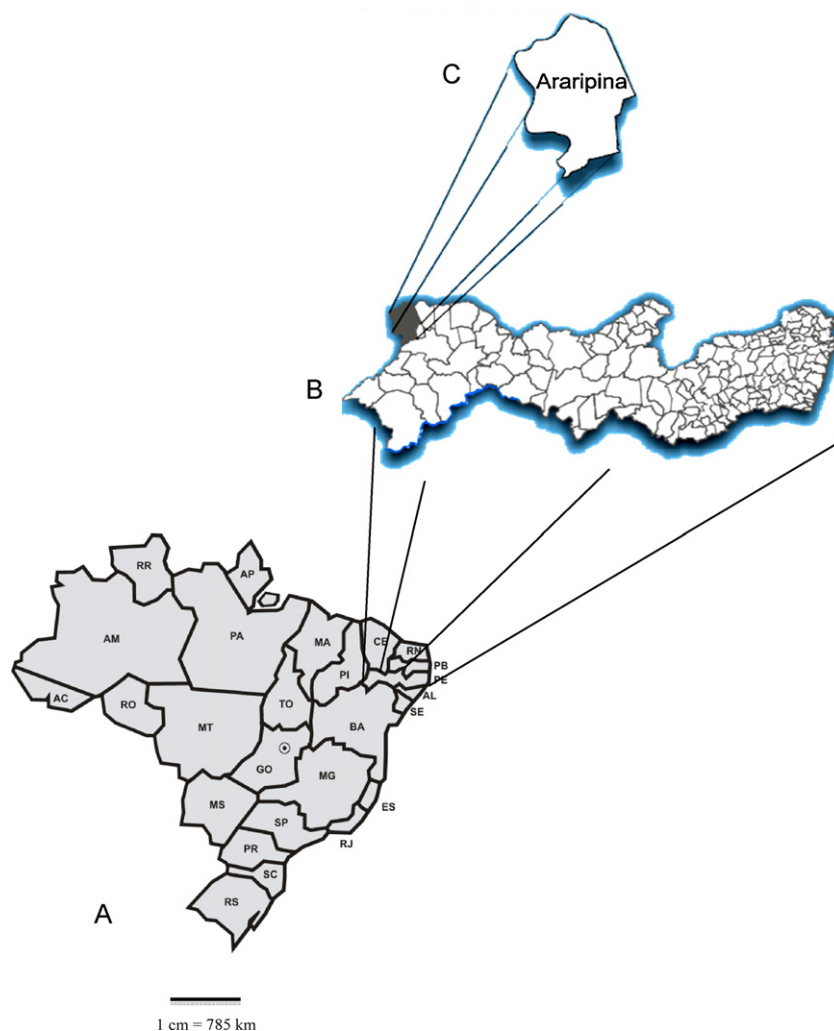
S-transferases (GSTs) and monooxygenases. Target-site insensitivity arises by nucleotide modifications on the DNA sequence coding the insecticide's target molecule such that it no longer interacts with the insecticide. In this case, the target molecule is usually part of the insect's central nervous system (Hemingway et al., 2004).

Detoxifying enzymes act in a cascade. The so-called phase I enzymes, recognize the xenobiotic and activate them by oxidation, reduction or hydrolysis. The oxidative reactions typically involve cytochrome P450 monooxygenases. Phase II enzymes (constituted mainly by GSTs) catalyze the conjugation of a xenobiotic substrate to a water-soluble compound, turning it into a less toxic metabolite that can be eliminated more easily from the cell by phase III proteins. Considering these enzymes act in concert, it is not surprising that in the same population, more than one enzyme present altered activity. In fact, a few studies show that the same mosquito population may present altered activity of more than one detoxifying enzyme type (Montella et al., 2007; Andrighetti et al., 2008).

Temephos, an OP, is the most used larvicide throughout the world for *A. aegypti* control (Rawlins, 1998; Rodriguez et al., 2002; Flores et al., 2006; Braga and Valle, 2007a; Jirakanjanakit et al., 2007; Tikar et al., 2009). In Brazil, this chemical started being sporadically utilized in some municipalities of the Northeast region in the 1960s (Montella et al., 2007), and after the first major dengue

epidemics in the country, in 1986, its use became more frequent. In 1996, with the implementation of the Program for *A. aegypti* Eradication (Programa de Erradicação do *A. aegypti*—PEAa), which has been changed in 2002 to the National Program for Dengue Control (Programa Nacional de Controle da Dengue—PNCD), temephos use throughout the country was intensified (Braga and Valle, 2007a). However, detection of altered susceptibility to temephos in 1999 in wild *A. aegypti* populations led the Ministry of Health to create a resistance monitoring network (Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti* a Inseticidas—MoReNAa), which was also responsible for planning strategies to manage resistance to all insecticides being utilized by PNCD (Braga et al., 2004; Braga and Valle, 2007b,c). Currently, 90% of populations surveyed by the network present some level of resistance to temephos (Ministério da Saúde, 2009).

A deeper understanding on the mechanisms conferring insecticide resistance in insects under control programs is crucial, since it will allow the development of more efficient monitoring methodologies. Here, we report the establishment of an *A. aegypti* colony resistant to temephos, originated from individuals collected in a city of Pernambuco, Brazil, where resistance was detected during vector control activities in 2004. The initial characterization of temephos resistance in this strain is reported and we emphasize that this colony can serve as a valuable source for further studies involving temephos resistance.



**Fig. 1.** (A) Map of Brazil; (B) map of Pernambuco; (C) municipality of Araripina, location where *Aedes aegypti* eggs were collected to establish the Recife-Resistente (RecR) strain.

**Table 1**  
Lethal doses of temephos that kill 50 (LC<sub>50</sub>) and 90% (LC<sub>90</sub>) of Recife-Resistente (RecR) individuals and the respective resistance ratio (RR), compared to Rockefeller LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>, according to temephos multiple dose bioassays. The total number of larvae exposed to these doses is shown.

Mosquito strain and generation (when applied)	LC <sub>50</sub> (mg/L) (fiducial limits)	LC <sub>90</sub> (mg/L) (fiducial limits)	Number of exposed larvae	Mortality	RR <sub>50</sub>	RR <sub>90</sub>
Rockefeller <sup>a</sup>	0.003 (0.0024–0.0038)	0.004 (0.0033–0.0074)	–	–	1.0	1.0
RecR-F0 (parental)	0.021 (0.017–0.024)	0.028 (0.025–0.034)	5200	50.0%	7.0	7.0
RecR-F3	0.028 (0.025–0.034)	0.034 (0.029–0.043)	5600	68.4%	9.3	8.5
RecR-F7	0.063 (0.053–0.072)	0.088 (0.081–0.098)	12,000	70.0%	21.0	22.0
RecR-F10	0.140 (0.125–0.156)	0.212 (0.197–0.235)	8870	58.0%	46.7	52.5
RecR-F14	0.330 (0.272–0.360)	0.500 (0.480–0.570)	7900	65.8%	110.0	125.0
RecR-F17	0.500 (0.430–0.650)	0.720 (0.610–0.760)	14,600	75.4%	166.7	180.0

<sup>a</sup> Standard susceptible strain to insecticides.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *Aedes aegypti* strains

*A. aegypti* specimens from Araripina, located at 7°32'45"S and 40°34'W, and 690 km from Recife, Pernambuco, Brazil (Fig. 1), were used as the parental population for the selection of the temephos-resistant colony. Mosquito eggs were collected in that location in August 2004, with the use of ovitraps that were installed in the peridomiciliary area of 50 houses for a period of 7 days. Eggs were taken to the insectary of the Department of Entomology, at CPqAM/FIOCRUZ, and raised until adult phase under standard conditions (26° ± 2 °C and 12 h/12 h light/dark photoperiod). Approximately 1000 individuals, including males and females, were used to establish the parental colony of the resistant strain, named Recife-Resistente (RecR).

*A. aegypti* Rockefeller was used as the standard susceptible strain in all tests. This colony has been maintained in the Department's insectary for over 10 years.

*A. aegypti* Modified-Rock, a strain with an incipient temephos resistance (RR = 2.0) was used for resistance reversal experiments only.

*A. aegypti* from Araripina were collected again in October 2008 (after more than 4 years of continuous exposure to temephos), in order to measure resistance evolution in the field, in comparison to the one achieved in the laboratory.

### 2.2. Insecticides

Five insecticides in technical grade were used to perform bioassays: malathion (94.5% lot 70731-V) from Fyfanon, cypermethrin (98% lot 127 K 1099) from Vectocell, deltamethrin (99.1% lot DGDLT057) from Bayer CropScience Ltda, pyriproxyfen (98.5% lot 2006018) from Sumitomo Chemical Co., and temephos (92.5% or 96.6% lots 002/05, 010/07, 041/07 and 042-07) from Fersol Indústria e Comércio S/A or the standard powder Pestanal (97.5% lot 6333X) from SIGMA.

### 2.3. RecR selection process

The selection strategy for the RecR strain involved the exposure of larvae from all generations to temephos concentrations corresponding to LC for 50% (LC<sub>50</sub>) of larvae, estimated by dose–response bioassays. For that, homogenous groups of 200 late 3rd instar larvae (L3) were placed in plastic trays containing temephos in 1 L of distilled water. After 24 h, mortality was registered and survivors were transferred to clean water recipients. Larvae were fed until pupal development, when they were counted and transferred to adult cages. Live adults were also counted (by counting pupae exuviae) in order to obtain the cumulative mortality until emergence.

Starting from the parental individuals, at every 3–4 generations, RecR individuals were submitted to temephos multiple concen-

tration bioassays according to WHO protocol (1981), in order to estimate the lethal concentrations for 50% (LC<sub>50</sub>) and 90% (LC<sub>90</sub>) of larvae. Estimated LC<sub>50</sub> was used to expose larvae in the selection process, however, as the bioassays were not performed in all generations, the same temephos concentration was used in at least 3–4 consecutive generations. Table 1 shows the number of exposed larvae in generations utilized in bioassays.

For the bioassays, groups of L3 were exposed to serial concentrations of the insecticide (varying from 7 to 10 concentrations), tested in triplicates, totalizing 420–600 larvae/bioassay. After a period of 24 h, larval mortality was recorded. For LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> estimation, mortality results based on temephos concentration were analyzed through Log-Probit linear regression (Finney, 1971), by using SPSS 8.0 for Windows. Three bioassays were performed per generation. Both LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> were used to calculate the resistance ratio (RR), which measures the resistance fold-increase of the RecR colony compared to the Rockefeller strain. The RR was calculated by dividing the LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> of RecR strain by the LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> obtained for Rockefeller. RR based on LC<sub>50</sub> (RR<sub>50</sub>) was included in the results as additional information, however results are discussed based on RR using LC<sub>90</sub> (RR<sub>90</sub>). This choice was based on the premise that small alterations in susceptibility are better viewed on higher doses of insecticides.

### 2.4. Comparison of temephos resistance between lab and field *Aedes aegypti*

To compare resistance evolution in the field and in the lab, RR<sub>90</sub> was calculated in individuals collected in Araripina (place where the parental RecR individuals were originated from) in 2008 through bioassays (as described above), and compared to the RR<sub>90</sub> obtained for the RecR 17th generation (F17). It is important to mention that since 1996, mosquito populations in Araripina have been continuously exposed to temephos and pyrethroids, according to PNCD recommendations. Temephos treatment cycles are performed bimonthly, i.e. six annual treatment cycles (Ministério da Saúde, 2002).

### 2.5. Biochemical assays

Biochemical tests were performed with third instar larvae and with 1-day-old adult females from the F17, in order to start characterizing the resistance mechanism of the RecR strain. The activity of the enzymes glutathione-S-transferases (GST),  $\alpha$ - and  $\beta$ -esterases, and mixed function oxidases (MFO) were evaluated according to a protocol from the Centers of Disease Control (Brogdon, 1989) and the results were analyzed according to the standard method adopted by the MoReNAa network (Montella et al., 2007) for larvae and adults. In both life stages, enzyme activity was evaluated in RecR and Rockefeller strains. The percentage of RecR individuals with enzyme activity higher than the 99 percentile of Rockefeller strain was classified as “unaltered” (U) when it was below 15%,

“altered” (A) when it was between 15 and 50% and “highly altered” (HA) when it was higher than 50%. This classification has been previously described (Valle et al., 2006).

## 2.6. Acetylcholinesterase sequencing

PCR was conducted to amplify a region of the acetylcholinesterase (AChE) gene, since the enzyme encoded by this gene is the target of organophosphate s. The amplified region encompasses the two residues that have been found mutated in strains of *Culex pipiens*, *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. vishnui*, *Anopheles gambiae* and *An. albimanus* resistant to organophosphates (F290V and F455W) (Weill et al., 2004) and is located within the gene's 5th exon. For this assay, ten adults from F17 RecR and from Rockefeller were analyzed. Primers (F: 5'-CGATAACGAATGGGGAACG-3' and R: 5'-TCAGAGGCTCACCGAACACA-3') were designed based on the full length AChE cDNA (accession on GenBank: EF209048) using the PrimerSelect software, available in the DNASTAR package (Lasergene 7.1). These primers amplify a region of around 500 bp of the gene. PCR conditions were: 5 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C and 2 min at 72 °C, with a final extension for 10 min at 72 °C. PCR amplicons were purified using GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia Biotech) and sequenced using an ABI 3100. Sequences were edited and analyzed through the BioEdit (version 7.0.4.1) software.

## 2.7. Cross resistance to different insecticides

### 2.7.1. Insect growth regulator

The estimation of emergence inhibition (EI) concentrations of pyriproxyfen, a juvenile hormone analogue that prevents larvae from developing into adults, was also performed through dose–response bioassays in RecR-F17 *A. aegypti* individuals (WHO, 2005; Andrighetti et al., 2008) using individuals of the Rockefeller strain as the standard susceptible controls. The stock solution of pyriproxyfen (250 mg/L) was prepared in deionized water and stored at 4 °C. The working solution (2.5 mg/L) was prepared immediately before each test. Three bioassays were performed using 720 L3 exposed to eight different concentrations of the insecticide (90 larvae per dose) and 80 larvae serving as the control group (4 replicates with 20 larvae each). The number of dead larvae, pupae and adults was recorded at 48 h post-exposure and after that at every 24 h until all individuals were dead or had emerged. For each concentration, the total number of dead individuals was used to estimate EI concentrations using Polo-PC software. The RR based on EI for 50 (EI<sub>50</sub>) and 90% (EI<sub>90</sub>) of larvae were calculated comparing RecR individuals with the Rockefeller strain. According to Mazzarri and Georghiou (1995), RR < 5 characterizes low level resistance, 5–10 characterizes moderate resistance, and RR > 10 a high resistance level. RR<sub>90</sub> was utilized to determine status of resistance to pyriproxyfen.

### 2.7.2. Adulticides

Cross resistance tests with deltamethrin and cypermethrin, both pyrethroids, and malathion, an organophosphate, were performed with the RecR strain by using the protocol described by Brogdon and McAllister (1998). Briefly, bottles were impregnated separately with a single dose of each insecticide. This dose kills 100% of Rockefeller individuals and was previously calculated (deltamethrin = 5 µg/bottle, cypermethrin = 8 µg/bottle and malathion = 12 µg/bottle). Impregnation was done 12 h prior to the test and bottles were left in a dark and dry environment at room temperature. Bottles impregnated with the solvent (acetone) only, served as the negative controls. Three independent assays were performed and for each test, one control and three bottles impregnated with the insecticide were used. In each bottle, 15–25 unfed

*A. aegypti* adult females, 1–2-day-old, from either strain (RecR or Rockefeller) were introduced. The bottles were left in the vertical position and mortality was recorded at every 15 min during 2 h. The time required for 100% mortality of Rockefeller individuals was considered as standard for susceptibility. Mortality was registered when mosquitoes were unable to fly when the bottle was gently rotated. Due to the knockdown effect commonly seen in insects exposed to pyrethroids, mosquitoes counted as dead were transferred to a clean recipient with no insecticide, and observed 24 h later, when the final mortality was registered, as described by da-Cunha et al. (2005). Because these tests were performed over a period of time according to available resources, different generations were tested for each insecticide. For deltamethrin assays, females from F14 were used, whereas cypermethrin and malathion tests were performed with individuals from F17.

### 2.7.3. Resistance reversal

Three strategies were adopted to study resistance reversal in RecR strain. In the first, temephos exposure was terminated in the resistant strain, starting at F14. This sub colony was named RecRev1. The second strategy was to stop temephos exposure and to introduce 30% of individuals presenting a low resistance level (Modified-Rock strain) into the resistant colony, per generation. This sub colony was called RecRev2. The third strategy consisted of interrupting temephos exposure and adding 50% of susceptible individuals (Rockefeller strain) into the resistant population (RecR), starting at the F17, per generation, and was named sub colony RecRev3. For all strategies, at every three generations from the crossing experiments, individuals were submitted to dose–response bioassays with temephos. Both LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> were obtained based on bioassays results and RR values were calculated.

## 3. Results

### 3.1. Temephos resistance level in RecR strain and in field population

The initial resistance ratio (RR) based on LC<sub>90</sub> bioassays of *A. aegypti* mosquitoes collected in Araripina (parental) in 2004, was estimated as 7, i.e. this field population was 7-fold more resistant to temephos than the Rockefeller strain. Under laboratory selection, the 3rd and 7th generations (F3 and F7) presented a RR<sub>90</sub> of 8.5 and 22, respectively, showing a gradual increase in resistance. This increase continued and at the 10th, 14th and 17th generations (F10, F14 and F17), the RR<sub>90</sub> was 52.5, 125 and 180, respectively. In this study, the F17 was the last generation to be assayed for RR estimation and up to this point there was a 25.71-fold-increase in resistance. These results are shown in Table 1, which also shows RRs and temephos doses corresponding to both LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>.

The RR of *A. aegypti* collected in Araripina in 2008 was found to be approximately 240, i.e. higher than that observed in RecR F17 (RR = 180).

### 3.2. Detoxifying enzymes activity

Individuals from the RecR strain showed higher activities of GST, α- and β-esterases, and, to a much lesser extent, MFO, when compared to the Rockefeller strain. The most significant difference was observed on GST activity, where 94% and 72% of larvae and adults, respectively, were above the 99 percentile of Rockefeller individuals. According to these results, GST activity in RecR insects is “highly altered”.

Tests with larvae showed that 43.6% and 49% of individuals were above the 99 percentile of Rockefeller for α- and β-esterases, respectively, being classified as “altered” activity, close to the



**Table 2**  
Activities of glutathione S-transferases (GST),  $\alpha$ - and  $\beta$ -esterases, and Multi-Function Oxidases (MFO) in Recife-Resistente (RecR) larvae. The number of tested individuals, the 99 percentile obtained for the Rockefeller strain, and RecR number and percentage of individuals above the Rockefeller 99 percentile are shown.

Enzyme assayed	<i>Aedes aegypti</i> strain	Number of larvae <sup>a</sup>	p99 <sup>b</sup>	N > p99 <sup>c</sup>	% > p99 <sup>d</sup>	Classification <sup>e</sup>
GST	Rockefeller	176	2.29	–	–	–
	RecR	175	–	165	94	HA
$\alpha$ -Est	Rockefeller	148	26.70	–	–	–
	RecR	149	–	65	43.6	A
$\beta$ -Est	Rockefeller	147	20.51	–	–	–
	RecR	149	–	73	49.0	A
MFO	Rockefeller	142	0.033	–	–	–
	RecR	143	–	16	11.2	U

<sup>a</sup> Number of tested individuals.

<sup>b</sup> 99 percentile for Rockefeller.

<sup>c</sup> Number of RecR individuals with 99 percentile above than the 99 percentile for Rockefeller.

<sup>d</sup> Percentage of individuals with 99 percentile above than the 99 percentile for Rockefeller.

<sup>e</sup> Classification of enzyme activity compared to control (Rockefeller): unaltered (U); altered (A) and highly altered (HA).

**Table 3**  
Activities of glutathione S-transferases (GST),  $\alpha$ - and  $\beta$ -esterases, and Multi-Function Oxidases (MFO) in Recife-Resistente (RecR) adults. The number of tested individuals, the 99 percentile obtained for the Rockefeller strain, and the RecR percentage of individuals above the Rockefeller 99 percentile are shown.

Enzyme assayed	<i>Aedes aegypti</i> strain	Number of adults <sup>a</sup>	p99 <sup>b</sup>	N > p99 <sup>c</sup>	% > p99 <sup>d</sup>	Classification <sup>e</sup>
GST	Rockefeller	149	1.64	–	–	–
	RecR	138	–	99	72	HA
$\alpha$ -Est	Rockefeller	147	17.9	–	–	–
	RecR	120	–	70	58	HA
$\beta$ -Est	Rockefeller	149	12.5	–	–	–
	RecR	144	–	73	51	HA
MFO	Rockefeller	115	0.021	–	–	–
	RecR	144	–	35	24.3	A

<sup>a</sup> Number of tested individuals.

<sup>b</sup> 99 percentile for Rockefeller.

<sup>c</sup> Number of RecR individuals with 99 percentile above than the 99 percentile for Rockefeller.

<sup>d</sup> Percentage of individuals with 99 percentile above than the 99 percentile for Rockefeller.

<sup>e</sup> Classification of enzyme activity compared to control (Rockefeller): unaltered (U); altered (A) and highly altered (HA).

threshold of “high alteration”. Esterase activity in adults was slightly higher, being 58% and 51% for  $\alpha$ - and  $\beta$ -esterases, respectively, above the 99 percentile of the Rockefeller, indicating a “highly altered” activity.

As for MFO activity, 11.2% of larvae and 24.3% of adults were above the 99 percentile of Rockefeller, falling under the classification of “unaltered” and “altered”, respectively. The enzymes activity for larvae is presented in Table 2, whereas those for adults are presented in Table 3. Fig. 2 shows graphs of enzymes activity for both larvae and adults.

### 3.3. AChE

In all individuals, a PCR product of 507 bp was amplified (corresponding to nucleotides 1211–1718 of AChE ORF). Sequences were aligned and no mutations were observed within this region of AChE, i.e. resistant (RecR) and susceptible (Rockefeller) individuals presented the same nucleotide and amino acid sequence (data not shown), with 100% homology to the sequence that has been deposited in GenBank.

### 3.4. Cross resistance

At the time point 100% of Rockefeller individuals were dead upon exposure with each insecticide, a small percentage of RecR individuals were alive upon malathion (4.4%), cypermethrin (7.5%), and deltamethrin (15.9%) exposure. However, at later time points, all RecR individuals were dead in the case of malathion and deltamethrin. Interestingly, a knock-down effect was observed in

the case of cypermethrin, since at 30 min after insecticide exposure almost all insects seemed to have died but 24 h later, only 92% were confirmed, i.e. 8% were recovered from insecticide effect, indicating an incipient alteration in susceptibility to this pyrethroid in these mosquitoes (Table 4).

Bioassays with pyriproxyfen technical powder resulted in an  $EL_{50}$  of 0.52  $\mu\text{g/L}$  and  $EL_{90}$  of 0.99  $\mu\text{g/L}$  for Rockefeller, and  $EL_{50}$  of 1.4  $\mu\text{g/L}$  and  $EL_{90}$  of 3.2  $\mu\text{g/L}$  for RecR. A  $ARR_{90}$  of 3.2 to this compound was estimated for RecR individuals.

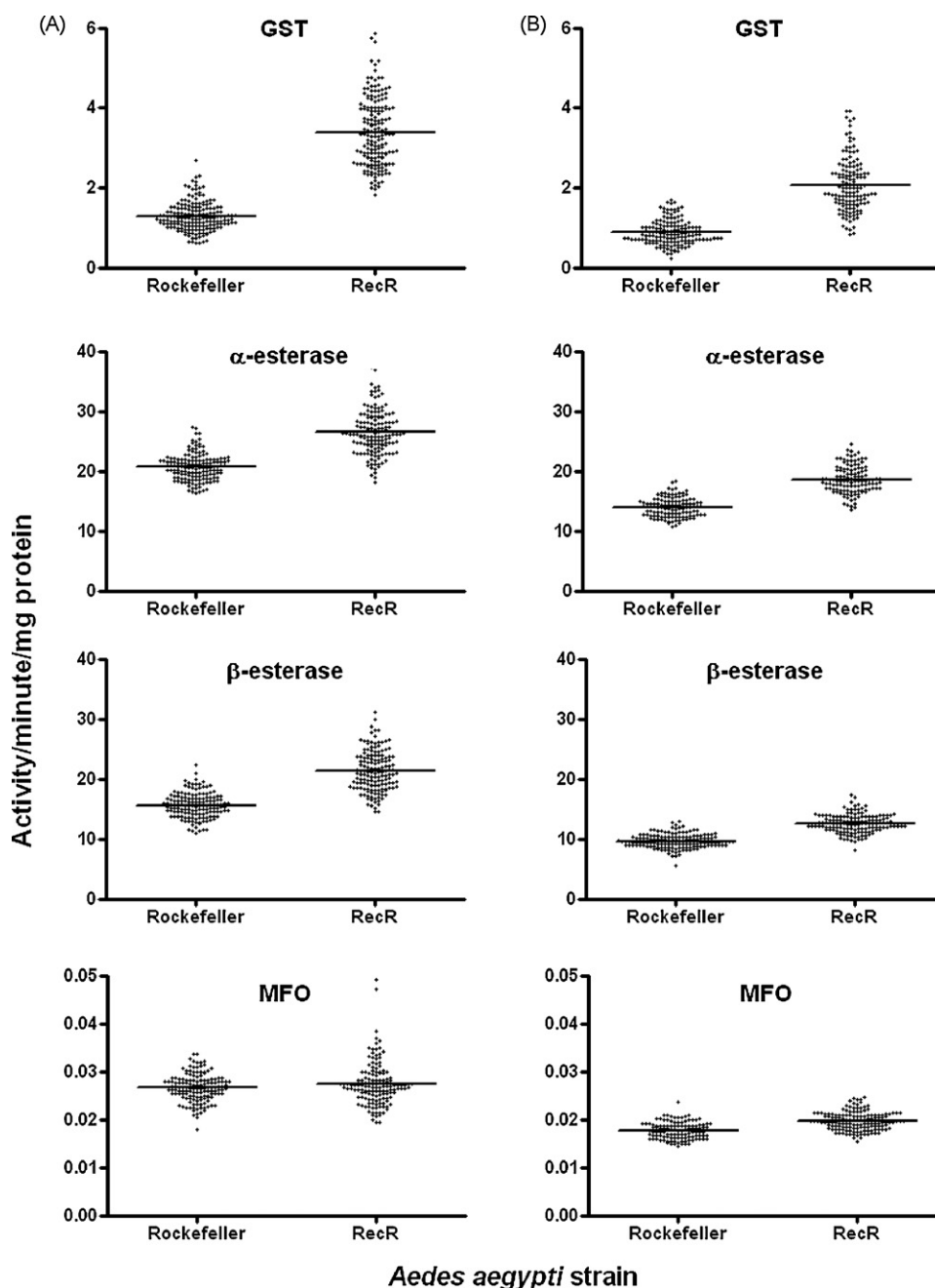
### 3.5. Resistance reversal

After three generations, there was no decrease in the resistance ratio of RecRev1 based on  $LC_{90}$ . On the other hand, F3 individuals from RecRev2 presented an abrupt 16-fold decrease in temephos resistance ( $RR = 7.7$ ). Interestingly, the result obtained for RecRev3, in which 50% of susceptible individuals were introduced at each generation, resistance reversal was complete in F3 ( $RR = 1.0$ ). A decrease in RecRev1  $RR$  was observed at the 6th generation, and in F9 it had decreased by 14-fold.  $RR$  decrease in RecRev2 was gradual and slow starting in F6, being 3.0 in F9. These results are shown in Table 5.

## 4. Discussion

### 4.1. Resistance evolution

Insect colonies resistant to insecticides are a valuable source for studies on resistance mechanisms. However, the selection pro-



**Fig. 2.** Graphs show the activity of GST,  $\alpha$ - and  $\beta$ -esterases and Mixed Function Oxidases (MFO) in larvae (A) and adult (B) *Aedes aegypti* individuals from the Recife-Resistente (RecR) colony. The line represents the median activity for these individuals.

**Table 4**

Average mortality (percentage) of *Aedes aegypti* females from the temphos-resistant colony Recife-Resistente (RecR), to the insecticides deltamethrin, cypermethrin and malathion. Results obtained from assays utilizing impregnated bottles, performed with RecR individuals from the 14<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> generations and concomitantly with individuals from the Rockefeller strain, the standard colony for insecticide susceptibility.

Insecticide (concentration/bottle)	Strain	Generation	N female	Average mortality (%) / time <sup>a</sup>						
				15 min	30 min	45 min	1 h	1.5 h	2 h	24 h
Deltamethrin (5 $\mu$ g)	RecR	F14	163	–	84.1	–	87.0	96.2	95.1	100
	Rockefeller	–	121	–	100	–	100	100	100	100
Cypermethrin (8 $\mu$ g)	RecR	F17	188	92.5	99.4	–	–	–	–	92.0
	Rockefeller	–	100	100	–	–	–	–	–	–
Malathion (12 $\mu$ g)	RecR	F17	143	0	92.9	95.6	100	–	–	–
	Rockefeller	–	103	0	93.5	100	100	–	–	–

<sup>a</sup> Time at which mortality was recorded after introduction of insects in impregnated bottles.

**Table 5**  
Resistance reversal. Parameters utilized to quantify temephos resistance in different *Aedes aegypti* strains/generations. Insecticide lethal concentrations to kill 50 (LC<sub>50</sub>) and 90% (LC<sub>90</sub>) of larvae, and resistance ratio (RR) obtained through bioassays with multiple concentrations of the chemical, performed through December 2007 to July 2009.

Strain	Generation	LC <sub>50</sub> mg/L (fiducial limit <sup>a</sup> )	LC <sub>90</sub> mg/L (fiducial limit <sup>a</sup> )	RR <sub>50</sub>	RR <sub>90</sub>
Rockefeller <sup>b</sup>	–	0.003 <sup>c</sup> (0.0024–0.0026)	0.004 (0.0040–0.0045)	1.0	1.0
	–	0.008 <sup>d</sup> (0.0056–0.0100)	0.010 <sup>d</sup> (0.0082–0.0130)	1.0	1.0
Modified-Rock <sup>e</sup>	–	0.006 (0.0044–0.0071)	0.009 (0.0065–0.011)	2.0	2.3
RecR <sup>f</sup>	F14	0.320 (0.272–0.360)	0.500 (0.480–0.570)	106.0	125.0
	F17	0.500 (0.430–0.650)	0.720 (0.610–0.760)	166.7	180.0
RecRev1 <sup>g</sup>	F3	0.240 (0.190–0.027)	0.500 (0.045–0.060)	80.0	125.0
	F6	0.038 (0.030–0.046)	0.089 (0.080–0.095)	12.6	22.5
	F9	0.008 (0.004–0.010)	0.087 (0.045–0.270)	1.0	8.7
RecRev2 <sup>h</sup>	F3	0.013 (0.012–0.015)	0.031 (0.028–0.032)	4.3	7.7
	F6	0.009 (0.0084–0.015)	0.021 (0.020–0.026)	3.0	5.2
	F9	0.005 (0.001–0.007)	0.030 (0.014–0.052)	1.0	3.0
RecRev3 <sup>i</sup>	F3	0.008 (0.0074–0.015)	0.012 (0.012–0.055)	1.0	1.0

<sup>a</sup> 95% fiducial limit.

<sup>b</sup> Rockefeller, strain susceptible to temephos.

<sup>c</sup> Toxicity observed with temephos Fersol 96.6% (lot no. 041/042-07).

<sup>d</sup> Toxicity observed with temephos standard Pestanal/SIGMA 97.5% (lot no. 6333X).

<sup>e</sup> Modified-Rock, strain with low resistance level.

<sup>f</sup> RecR, Recife-Resistente strain, highly resistant to temephos.

<sup>g</sup> RecRev1, sub-strain originated from RecR F14 individuals that were no longer exposed to temephos.

<sup>h</sup> RecRev2, sub-strain originated RecR individuals that were no longer exposed to temephos and in which 30% of individuals from Modified-Rock were introduced, at each generation.

<sup>i</sup> RecRev3, originated from RecR F17 that were no longer exposed to temephos and in which 50% of individuals from Rockefeller strain were introduced, at each generation.

cess of these insects is extremely laborious. Reports on mosquito colonies resistant to temephos, are scarce. Recently, Tikar et al. (2009) reported temephos-induced resistance in an *A. aegypti* colony in India. Before this, very few reports on selected temephos-resistant mosquitoes were published (Wirth and Georghiou, 1999; Rodriguez et al., 2002). Here, we report an *A. aegypti* colony (RecR) that has been selected upon temephos exposure and is already on its 17th generation (F17). Resistance in RecR evolved gradually and relatively fast, and at the F17 it had increased by 25-fold. Interestingly, the laboratory selected temephos-resistant *A. aegypti* colony reported by Wirth and Georghiou (1999), named Tortola-Sel strain, presented an increase in RR of only 4-fold after 14 generations. Additionally, Tortola-Sel had an initial RR of 46.8, i.e. almost 7-fold higher than the baseline RR of RecR parental colony. The temephos-resistant *A. aegypti* colony selected by Rodriguez et al. (2002) presented a 11-fold-increase in RR after 6 generations, while, Tikar et al. (2009) observed an increase of 20.3-fold in resistance in the selected strain (GA1), after 24 generations. The differences in the evolution of temephos resistance observed in all these colonies may be due, among other factors, to variations in the methodologies used for insecticide exposure, levels of pre-existent resistance to the chemical, frequencies of genes involved in resistance, and to distinct resistance mechanisms with different mode of inheritance. All this emphasizes the importance of resistance characterization in mosquito populations.

Surprisingly, resistance level of natural *A. aegypti* collected recently (2008) in Araripina was higher (RR = 240) than the one obtained for the RecR strain (R = 180) selected in laboratory. This points out to an alarming situation in the field, revealing the inefficiency of the control program that impose a high selective pressure with temephos, without any routine evaluation of field efficacy of commercial products. According to Montella et al. (2007), residual effect of temephos-based larvicides (mortality >70%) in field populations presenting high level resistance (RR > 10) can be shorter (around 3 weeks) than the interval of treatment cycles (8 weeks). It is important to highlight that many of these field populations have been exposed to this OP and other insecticides for at least 13 years.

#### 4.2. Cross resistance

In regard to cross resistance, RecR was susceptible to malathion, another organophosphate which was concomitantly used with temephos by the PNCD in Brazilian municipalities, including Araripina, from 1996 to 2000. The same was observed in the *A. aegypti*-Santiago strain from Cuba, in which the pre-existent resistance level to malathion in this strain did not increase upon temephos exposure (Rodriguez et al., 2002). According to MoReNAa network recommendations, malathion was substituted by cypermethrin in 2000, in order to block a possible stronger selective pressure by the use of insecticides from the same class (Ministério da Saúde, 1999; da-Cunha et al., 2005). In a recent publication, Macoris et al. (2007) revealed that in 1999 some mosquito populations from cities of the Northeast region, such as Recife PE, Aracaju SE and Itabaina BA, were resistant to malathion. It is important to mention that *A. aegypti* RecR parental population was collected in mid 2004, i.e. 3 years after interruption of malathion usage by the program and when, in theory, perifocal and regular applications of ultra low volume (ULV) cypermethrin started. Although results of 24-h post-exposure showed that RecR was not resistant to deltamethrin and cypermethrin, the dose (8 µg of cypermethrin/bottle) seemed to be too high for discriminating differences among RecR and the Rockefeller strain, since 100% of individuals were dead in a maximum of 15 min of exposure, when the expected time is up to 30 min (da-Cunha et al., 2005) and 1 h (Brogdon and McAllister, 1998). Thus, it is possible that if a lower dose of this insecticide was used in these assays, resistance in RecR could be detected, even if in a low level. Studies on field populations performed in 2003 by da-Cunha et al. (2005), showed that a few of them were resistant to cypermethrin. According to the authors, resistance to this pyrethroid seemed to have evolved more rapidly than to temephos.

In the literature, differently than what was observed for the RecR strain, *A. aegypti* populations which served as parental to found temephos-resistant colonies, already presented altered susceptibility levels or cross resistance to other insecticides, e.g. fenthion, fenitrothion, deltamethrin and cypermethrin (Rodriguez et al., 2002; Tikar et al., 2009; Wirth and Georghiou, 1999).



RecR displayed a low level of cross resistance only to pyriproxifen, a chemical that has not been utilized for *A. aegypti* control in Brazil. However, the resistance level to this juvenile hormone analogue was much lower than that to temephos resistance, which differs from what was found by [Andrighetti et al. \(2008\)](#), whom found concomitant resistance to both insecticides in natural mosquito populations from Brazil. [Braga et al. \(2005\)](#) also reported low resistance ( $RR < 3$ ) to methoprene, another juvenile hormone analogue, in wild Brazilian *A. aegypti*, and did not show any relation between the resistance level to temephos and that to methoprene.

#### 4.3. Detoxifying enzymes

Our results showed that altered activity of GSTs and esterases in RecR strain are associated with temephos resistance, and that the first was found in a much higher level. In Brazil, [Montella et al. \(2007\)](#) reported an increase in the number of natural *A. aegypti* populations presenting altered GST activity, from 2001 to 2004. Additionally, higher GST activity has been detected in insects resistant to various types of insecticides, including organophosphates ([Wang et al., 1991](#); [Wei et al., 2001](#); [Yang et al., 2009](#)), DDT ([Clark and Shamaan, 1984](#); [Prapantadara et al., 2000](#)) and pyrethroids ([Fournier et al., 1992](#); [Grant and Hammock, 1992](#); [Vulule et al., 1999](#); [Vontas et al., 2001](#); [Rodriguez et al., 2005](#)). A few studies have suggested that the involvement of GSTs in temephos resistance may be due to a cross resistance to pyrethroids from a previous exposure to this insecticide ([Rodriguez et al., 2002](#); [Braga et al., 2005](#)). However, the results obtained for RecR did not corroborate this hypothesis, since this strain was susceptible to the pyrethroids cypermethrin and deltamethrin, suggesting that an alteration in GSTs activity is linked to temephos exposure. Exposure to xenobiotics may induce the simultaneous expression of various genes, although not all necessarily linked to resistance ([Le Goff et al., 2006](#)). For instance, in *A. aegypti* and *A. gambiae*, DDT resistance has been associated to superexpression of a single GST gene ([Grant and Hammock, 1992](#); [Lumjuan et al., 2007](#)). Given the various situations when higher activities of these enzymes are found, and the fact that each enzyme class comprises innumerable members, it will be important to know the specific molecules involved in resistance against distinct insecticides, especially considering that the functional characterization of each of these enzymes has not been explored. Since the substrates utilized in biochemical assays are not specific to enzyme members, a more detailed study to identify which GST(s) is (are) involved in RecR temephos resistance is currently ongoing in our laboratory.

In general, when alterations in target sites are not observed, resistance in natural mosquito populations or in lab strains likely involves higher activity of a Phase I detoxifying enzyme. The biosynthesis of these enzymes seems to reflect a direct response to xenobiotics ([Frank and Fogleman, 1992](#); [Poupardin et al., 2008](#)), and esterases may act nonspecifically. According to [Boyer et al. \(2007\)](#), this fact may have an important implication when resistance management in the field is considered. Their study with *Ochlerotatus cataphylla* field populations that were under temephos exposure for more than 15 years, induced alterations in esterases activity. The higher activity of esterases was not reduced after Bti was introduced as an alternative insecticide and utilized in a rotation scheme, suggesting a possible cross effect between the two larvicides that could eventually lead to Bti resistance. It is important to mention here that Bti resistance has never been observed in field mosquito populations, even in control programs that have utilized this larvicide for more than 20 years ([Becker et al., 2003](#)).

Results of detoxifying enzymes activity showed that although both larvae and adults from RecR strain presented higher activity of GST and  $\alpha$ - and  $\beta$ -esterases compared to Rockefeller strain, this difference was more accentuated in larvae. In this work, it

was clear that metabolic mechanisms are behind temephos resistance in the studied strain, reinforced by the fact that there was no evidence for target-site alteration. Since temephos acts in larval stages and the selection process for resistance was based on larval exposure to this chemical, it is natural that higher expression of detoxifying enzymes is found at this life stage. Interestingly, adult *A. aegypti* RecR also presented a slight elevated activity for MFO, whereas larvae did not. Thus higher MFO activity in RecR adults possibly reflects natural differences in the expression of detoxifying enzymes in different life stages, as it has been observed in other studies ([Zayed et al., 2006](#)). However, MFO activity has been related to IGR resistance in houseflies ([Cerf and Georghiou, 1972](#); [Cerf and Georghiou, 1974](#)), of which Brazilian *A. aegypti* populations have not been exposed ([Andrighetti et al., 2008](#)).

Recent genomic studies have shown that *A. aegypti* has undergone an expansion of detoxifying enzymes, when compared to other insects ([Strode et al., 2008](#)). For example, 160 cytochrome P450s and 49 esterases have been identified in this species. In the GST family, 26 members have been identified, and at least two genes go through alternative splicing, increasing their transcripts by more than 10-fold ([Lumjuan et al., 2007](#)). Nevertheless, the relationship between this diversity and enzyme function, as well as if newly discovered enzymes use specific substrates, have not been studied.

#### 4.4. Resistance reversal

The three strategies performed with the aim of reversing temephos resistance in RecR showed that, in a short-term, two of them (the simple interruption of insecticide use or its interruption combined with introduction of individuals with low resistance level) were not enough to reverse population to a complete susceptible status, however resistance decreased gradually to a low level in these mosquitoes. In fact, temephos resistance management through the alternative use of Bti to control Brazilian *A. aegypti* populations, have demonstrated a reduction in the resistance level to temephos, however populations are still resistant after more than 4 years of its interruption ([Ministério da Saúde, 2009](#)). Other studies have reached similar results, [Wirth and Georghiou \(1999\)](#) reported a decrease in resistance in the Tortola strain, dropping from 46.8 in 1985 ([Georghiou et al., 1987](#)) to 6.3 1995/6, i.e. 10 years after temephos use interruption ([Rawlins, 1998](#)). In Brazil, persistence of temephos resistance may be due to migration of resistant mosquitoes from neighbor areas, once substitution to Bti was focal, and resistant populations are completely disseminated throughout the country. Thus, the strategies used in RecRev1 and RecRev2 reflect more realistically the situation in the country. The total recovery of a susceptible status was only observed in RecRev3, but this situation is unlikely to happen naturally since few susceptible field populations may exist in the country. In this way, strategies utilizing introduction of susceptible individuals in the field, such as release of sterile males, may be considered as an additional alternative.

Another interesting aspect in regard to resistance reversal is that the fact that resistance dropped after only nine generations in the absence of temephos exposure (see [Table 5](#)), suggests a possible fitness cost effect associated to resistance to this OP. Unfortunately, fitness in RecR strain was not analyzed in the current study.

#### 4.5. Concluding remark

Vector control programs have, for a long time, utilized bioassays to monitor insecticide resistance in wild mosquito populations ([WHO, 1981](#)). These assays only inform the susceptibility level of a certain population to a specific insecticide. Recently, biochemical assays have also been included in routine activities of surveillance

programs (Montella et al., 2007; Ministério da Saúde, 2009). These are more informative than the bioassays in that they provide some information on the resistance mechanisms involved. However, as discussed by Montella et al. (2007), biochemical assays are also limited, since the specificity between enzyme family members and their substrates are more complex than what has been considered to design these experiments. Thus, there is an urgent need on improving methodologies to monitor resistance. Molecular studies such as microarrays, and resistant colonies such as RecR will certainly hasten such studies.

## Acknowledgements

We are thankful to the team at the insectary of the Department of Entomology at CPqAM/FIOCRUZ for maintaining the mosquito colonies, and to Diogo Bellinato for assistance with the deltamethrin assays. We are also grateful to Dr. Hilary Ranson, for her comments on this manuscript. This work received financial support from CNPq (grants 501581/2003-0 and 41.0542/2006-7) and FACEPE (APQ-1361-4.00/08).

## References

- Anderson, J.R., Rico-Hesse, R., 2006. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 886–892.
- Andrighetti, M.T.M., Cerone, F., Riguetti, M., Galvani, K.C., Macoris, M.L.G., 2008. Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. *Dengue Bull.* 32, 186–198.
- Becker, N., Petric, D., Boase, C., Zgomba, M., Lane, J., Dahl, C., Kaiser, A., 2003. Mosquitoes and their Control. Academic Publishers, New York, NY, pp. 345–449.
- Boyer, S., Tilquin, M., Ravanel, P., 2007. Differential sensitivity to *Bacillus thuringiensis* var. israelensis and temephos in field mosquito populations of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae): toward resistance? *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 157–162.
- Braga, I.A., Lima, J.B., Soares, S.S., Valle, D., 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99, 199–203.
- Braga, I.A., Mello, C.B., Montella, I.R., Lima, J.B., Martins Ade, J., Medeiros, P.F., Valle, D., 2005. Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. *J. Med. Entomol.* 42, 830–837.
- Braga, I.A., Valle, D., 2007a. *Aedes aegypti*: history of control in Brazil. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 16, 113–118.
- Braga, I.A., Valle, D., 2007b. *Aedes aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 16, 279–293.
- Braga, I.A., Valle, D., 2007c. *Aedes aegypti*: surveillance, resistance monitoring, and control alternatives in Brazil. *Epidemiol. Serv. Saúde.* 16, 295–302.
- Brogdon, W.G., 1989. Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. *Parasitol. Today* 5, 56–60.
- Brogdon, W.G., McAllister, J.C., 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14, 159–164.
- Cerf, D.C., Georghiou, G.P., 1972. Evidence of cross-resistance to a juvenile hormone analogue in some insecticide-resistant houseflies. *Nature* 239, 401–402.
- Cerf, D.C., Georghiou, G.P., 1974. Cross-resistance to an inhibitor of chitin synthesis, TH60-40, in insecticide-resistant strains of the house fly. *J. Agric. Food Chem.* 22, 1145–1146.
- Clark, A.G., Shamaan, N.A., 1984. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione S-transferase. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22, 249–261.
- da-Cunha, M.P., Lima, J.B., Brogdon, W.G., Moya, G.E., Valle, D., 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100, 441–444.
- Finney, D.J., 1971. Probit Analysis—A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve. Cambridge University Press, Oxford, pp. 50–80.
- Flores, A.E., Grajales, J.S., Salas, I.F., Garcia, G.P., Becerra, M.H.L., Lozano, S., Brogdon, W.G., Black IV, W.C., Beaty, B., 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22, 672–677.
- Fournier, D., Bride, J.M., Poirie, M., Berge, J.B., Plapp Jr., F.W., 1992. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem.* 267, 1840–1845.
- Frank, M.R., Fogleman, J.C., 1992. Involvement of cytochrome P450 in host-plant utilization by Sonoran Desert *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 11998–12002.
- Georghiou, G.P., Wirth, M., Tran, H., Saume, F., Knudsen, A.B., 1987. Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Caribbean area and neighboring countries. *J. Med. Entomol.* 24, 290–294.
- Grant, D.F., Hammock, B.D., 1992. Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Mol. Gen. Genet.* 234, 169–176.
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 653–665.
- Hemingway, J., Ranson, H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 371–391.
- Jirakanjanakit, N., Rongnoparut, P., Saengtharapit, S., Chareonviriyaphap, T., Duchon, S., Bellec, C., Yoksan, S., 2007. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003–2005. *J. Econ. Entomol.* 100, 545–550.
- Le Goff, G., Leong Pock Tsy, J.M., Robert, V., 2006. Molecular characterization of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. in Madagascar. *Med. Vet. Entomol.* 20, 259–260.
- Lumjuan, N., Stevenson, B.J., Prapanthadara, L.A., Somboon, P., Brophy, P.M., Loftus, B.J., Severson, D.W., Ranson, H., 2007. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1026–1035.
- Macoris, M.L., Andrighetti, M.T., Otrera, V.C., Carvalho, L.R., Caldas Junior, A.L., Brogdon, W.G., 2007. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102, 895–900.
- Mazzarri, M.B., Georghiou, G.P., 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11, 315–322.
- Ministério da Saúde, 1999. Reunião técnica para discussão do status de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil. Ministério da Saúde. Brasília.
- Ministério da Saúde, 2002. Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Ministério da Saúde, Brasília.
- Ministério da Saúde, 2009. Reunião de avaliação do monitoramento da resistência das populações de *Aedes aegypti* do Brasil. Ministério da Saúde, Brasília.
- Montella, I.R., Martins, A.J., Viana-Medeiros, P.F., Lima, J.B., Braga, I.A., Valle, D., 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 467–477.
- Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J.P., 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 540–551.
- Prapanthadara, L., Koottathep, S., Promtet, N., Suwonkerd, W., Ketterman, A.J., Somboon, P., 2000. Correlation of glutathione S-transferase and DDT dehydrochlorinase activities with DDT susceptibility in *Anopheles* and *Culex* mosquitoes from northern Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 31 (Suppl. 1), 111–118.
- Rawlins, S.C., 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Rev. Panam. Salud Publica* 4, 243–251.
- Regis, L., Monteiro, A.M., Melo-Santos, M.A., Silveira Jr., J.C., Furtado, A.F., Acioli, R.V., Santos, G.M., Nakazawa, M., Carvalho, M.S., Ribeiro Jr., P.J., Souza, W.V., 2008. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks: basis for surveillance, alert and control system. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 103, 50–59.
- Rodriguez, M.M., Bisset, J., Ruiz, M., Soca, A., 2002. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J. Med. Entomol.* 39, 882–888.
- Rodriguez, M.M., Bisset, J.A., Armas, Y., Ramos, F., 2005. Pyrethroid insecticide-resistance strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 21, 437–445.
- Strode, C., Wondji, C.S., David, J.P., Hawkes, N.J., Lumjuan, N., Nelson, D.R., Drane, D.R., Karunaratne, S.H., Hemingway, J., Black, W.C., Ranson, H., 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 113–123.
- Tikar, S.N., Kumar, A., Prasad, G.B., Prakash, S., 2009. Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. *Parasitol. Res.* 105, 57–63.
- Valle, D., Montella, I.R., Ribeiro, R.A., Medeiros, P.F.V., Martins Jr, A.J., Lima, J.B.P., 2006. Quantification Methodology for Enzyme Activity Related to Insecticide Resistance in *Aedes aegypti*. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro and Distrito Federal.
- Vontas, J.G., Small, G.J., Hemingway, J., 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.* 357, 65–72.
- Vulule, J.M., Beach, R.F., Atieli, F.K., McAllister, J.C., Brogdon, W.G., Roberts, J.M., Mwangi, R.W., Hawley, W.A., 1999. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Med. Vet. Entomol.* 13, 239–244.
- Wang, J.Y., McCommas, S., Svanen, M., 1991. Molecular cloning of a glutathione S-transferase overproduced in an insecticide-resistant strain of the housefly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genet.* 227, 260–266.
- Wei, S.H., Clark, A.G., Svanen, M., 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MgGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 1145–1153.
- Weill, M., Berthomieu, A., Berticat, C., Lutfalla, G., Negre, V., Pasteur, N., Philips, A., Leonetti, J.P., Fort, P., Raymond, M., 2004. Insecticide resistance: a silent base prediction. *Curr. Biol.* 14, R552–553.
- WHO, 1981. Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Mosquito Larvae to Insecticides. World Health Organization, Geneva.

- WHO, 2005. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. World Health Organization, Geneva.
- Wirth, M.C., Georghiou, G.P., 1999. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. J. Am. Mosq. Control Assoc. 15, 315–320.
- Yang, M.L., Zhang, J.Z., Zhu, K.Y., Xuan, T., Liu, X.J., Guo, Y.P., Ma, E.B., 2009. Mechanisms of organophosphate resistance in a field population of oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). Arch. Insect Biochem. Physiol. 71, 3–15.
- Zayed, A.B.B., Szumlas, D.E., Hanafi, H.A., Fryauff, D.J., Mostafa, A.A., Allam, K.M., Brogdon, W.G., 2006. Use of bioassay and microplate assay to detect and measure insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from filariasis endemic areas of Egypt. J. Am. Mosq. Control Assoc. 22, 473–482.

**APÊNDICE G:** Artigo – Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil.

RESEARCH

Open Access

# Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil

Estelita Pereira Lima<sup>1</sup>, Marcelo Henrique Santos Paiva<sup>2,3</sup>, Ana Paula de Araújo<sup>2</sup>, Élyda Vanessa Gomes da Silva<sup>2</sup>, Ulisses Mariano da Silva<sup>5</sup>, Lúcia Nogueira de Oliveira<sup>5</sup>, Antonio Euzébio G Santana<sup>4</sup>, Clarisse Nogueira Barbosa<sup>1</sup>, Clovis C de Paiva Neto<sup>1</sup>, Marília OF Goulart<sup>4</sup>, Craig Stephen Wilding<sup>6</sup>, Constância Flávia Junqueira Ayres<sup>2</sup>, Maria Alice V de Melo Santos<sup>2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Organophosphates and pyrethroids are used widely in Brazil to control *Aedes aegypti*, the main vector of dengue viruses, under the auspices of the National Programme for Dengue Control. Resistance to these insecticides is widespread throughout Brazil. In Ceará the vector is present in 98% of districts and resistance to temephos has been reported previously. Here we measure resistance to temephos and the pyrethroid cypermethrin in three populations from Ceará and use biochemical and molecular assays to characterise resistance mechanisms.

**Results:** Resistance to temephos varied widely across the three studied populations, with resistance ratios (RR<sub>95</sub>) of 7.2, 30 and 192.7 in Juazeiro do Norte, Barbalha and Crato respectively. The high levels of resistance detected in Barbalha and Crato (RR<sub>95</sub> ≥ 30) imply a reduction of temephos efficacy, and indeed in simulated field tests reduced effectiveness was observed for the Barbalha population. Two populations (Crato and Barbalha) were also resistant to cypermethrin, whilst Juazeiro do Norte showed only an altered susceptibility. The *1011Met* mutation was detected in all three populations and *Val1016Ile* in Crato and Juazeiro do Norte. *1011Met* was significantly associated with resistance to cypermethrin in the Crato population. Biochemical tests showed that only the activity of esterases and GSTs, among the tested detoxification enzymes, was altered in these populations when compared with the Rockefeller strain.

**Conclusions:** Our results demonstrate that two *A. aegypti* populations from Ceará are under strong selection pressure by temephos, compromising the field effectiveness of this organophosphate. Our results also provide evidence that the process of reducing resistance to this larvicide in the field is difficult and slow and may require more than seven years for reversal. In addition, we show resistance to cypermethrin in two of the three populations studied, and for the first time the presence of the allele *1016Ile* in mosquito populations from northeastern Brazil. A significant association between *1011Met* and resistance was observed in one of the populations. Target-site mechanisms seem not to be implicated in temephos resistance, reinforcing the idea that for the studied populations, detoxification enzymes most likely play a major role in the resistance to this insecticide.

## Background

In Brazil, the wide distribution of *Aedes aegypti* - vector of the three circulating dengue virus serotypes (DENV-1, -2 and -3) - and the lack of a specific treatment or vaccine for dengue, are considered serious public health issues. This situation is exacerbated by the recent

re-introduction of serotype 4 (DENV-4) in the State of Roraima, in the North of Brazil [1].

*Aedes aegypti* is present in all states and in most cities of Brazil. In Ceará State, this mosquito has been detected in approximately 98% of cities [2]. In the last 23 years dengue has been endemic in the state, with four major epidemic periods registered in 1987, 1994, 2001 and 2008. In the latter year, Ceará was the most affected Brazilian state with respect to dengue cases, with 44,244 registered cases - an incidence of 530.77 cases/100,000 inhabitants. In 2009, although case

\* Correspondence: mavarjal@cpqam.fiocruz.br

<sup>2</sup>Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz - Avenida Professor Moraes Rego, s/n, CEP 50670-420, Campus UFPE, Cidade Universitária, Recife/PE, Brasil

Full list of author information is available at the end of the article



numbers were lower than in the previous year, the mortality rate for dengue hemorrhagic fever was 34.6% and among severe dengue cases was 45% [2], significantly higher than the average mortality elsewhere in Brazil [2].

For the past 13 years, insecticides of the organophosphate (OP) and pyrethroid (PY) classes have been utilized intensively as the main strategy to control *A. aegypti*, run by the National Programme for Dengue Control (Programa Nacional de Controle da Dengue - PNCD) [3,4]. Monitoring of the susceptibility status of *A. aegypti* populations to these insecticides has been undertaken through the National Network for Monitoring Resistance to Insecticides in *Aedes aegypti* (Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas - MoReNAa), since 1999 [5]. The first signs of incipient resistance to temephos were registered in 1999 in mosquito populations from the State of São Paulo [6], and in other states since 2001 [4]. Currently, it is known that temephos resistance is widespread in *A. aegypti* populations throughout the country [5,7-12]. Consequently, the MoReNAa network has also been working on assaying the activity of detoxification enzymes in *A. aegypti* populations since 2001, aiming at identifying alterations that may be related to temephos resistance [12,13].

In Ceará, resistance to temephos was detected in surveys conducted from 2000-2002 in *A. aegypti* populations from Fortaleza, Caucaia [14] and Juazeiro do Norte [15]. In an effort to manage resistance in the field, temephos was replaced by the biolarvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in these cities, and others, as a recommendation of the MoReNAa network [5]. However, in most of the municipalities of Ceará (164) temephos continued to be utilized until the beginning of 2010, including Crato and Barbalha, where resistance to this insecticide had been first detected in *A. aegypti* in 2003 [9]. Although the dengue control program at city level prioritizes the use of insecticides, a continuous evaluation of the effectiveness of temephos-based products in the field is not performed in most of them [2], despite PNCD recommendations to do so.

Data released by the MoReNAa network obtained from sentinel cities, revealed that *A. aegypti* populations were also resistant to malathion (another OP used as an adulticide) in 1999/2000, when its use was interrupted and replaced by pyrethroids as a resistance management action [5,10]. However, this change led to cypermethrin/deltamethrin resistance three years later [16]. After detecting resistance to all insecticides used by PNCD, this network carried out studies to characterize resistance mechanisms in Brazilian field populations.

Generally, two main mechanisms are commonly associated with resistance to chemical insecticides:

metabolic, via increased activity of detoxification enzymes such as esterases, mixed function oxidases (cytochrome P450s) and glutathione S-transferases (GSTs); and structural modifications in insecticide binding sites, such as acetylcholinesterase and the voltage-gated sodium ( $\text{Na}_v$ ) channel. Recent studies suggest that in addition to metabolic resistance, mutations in the sodium channel (the target of pyrethroids as well as DDT) may be playing a role in the resistance to cypermethrin and deltamethrin in mosquito populations from Brazil [17].

PY compounds act on the insect nervous system, targeting the  $\text{Na}_v$  channel. This channel is composed of four domains (I-IV) and each domain comprises six transmembrane helices (S1-S6) [18,19]. Pesticides such as PY and DDT retard the activation and inactivation potential of  $\text{Na}_v$  channels, triggering a series of repetitive discharges in motor and sensory axons, and resulting in paralysis ("knock-down") and death [20]. However, several insect species, including *Anopheles gambiae*, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* and *A. aegypti*, may present a resistance phenotype to chemicals which target the  $\text{Na}_v$ , commonly called knock-down resistance [17,21-27]. The genetic basis of knock-down resistance was first elucidated in the housefly *Musca domestica* [28]. The knock-down resistance trait (named *kdr*) and another *kdr*-related trait (super-*kdr*), which confers greatly elevated resistance in combination with *kdr*, were mapped to chromosome 3 [19]. Both traits have been associated with a lower electrophysiological sensitivity of elements from the nervous system and a reduced function of the  $\text{Na}_v$  channel. Many studies have focused on finding mutations in  $\text{Na}_v$  channel sequences from knock-down resistant populations. Characterization of sequences from *A. gambiae* and *C. quinquefasciatus* pyrethroid-resistant strains showed that the most common mutation is a leucine to phenylalanine substitution in the S6 hydrophobic segment of domain II [21,22], although a leucine to serine mutation has also been reported at the same 1014 site [24,29]. Brengues *et al.* [30] have failed to find the same mutation in *A. aegypti*, however, other studies have found different mutations correlated with *kdr* in this vector, such as: *Gly923Val*, *Leu982Trp*, *Ile1011Val*, *Ile1011Met*, *Val1016Ile* and *Val1016Gly* [17,25,30]. A few reports have shown that *kdr* genotyping is a good predictor of susceptibility to pyrethroid and DDT, and, at the moment, it is considered the best tool for predicting the efficacy of these compounds in the field [31].

The aim of this study was to measure resistance levels to two insecticides and to characterize resistance mechanisms at both the molecular and biochemical levels in *A. aegypti* populations from Ceará State.

## Methods

### Characterization of study area

*mosquito populations* - this study was undertaken in three municipalities, Juazeiro do Norte, Crato and Barbalha, located in the south region of Ceará State, Brazil, (Figure 1), 10 Km equidistant from each other. The local climate is tropical semi-arid, with average temperatures of 24-26°C and rainfall of 925 to 1,156 mm per year [32].

Juazeiro do Norte (7° 12' 47" S, 39° 18' 55" W) is 248.55 Km<sup>2</sup> in area, and has a population of 249,831 with 50,000 properties [33]. This city is the main commercial centre of the south region and is also one of the main religious routes of Brazil, attracting thousands of visitors each year from throughout the country, but particularly from the Northeast region. Crato (7° 14' 03" S, 39° 24' 34" W) has an area of 1,009.20 km<sup>2</sup>, 116,759 residents and 20,185 properties. This city is on the slope of the Araripe plateau. Barbalha (7° 18' 40" S, 39° 18' 15" W) has an area of 479.184 km<sup>2</sup>, 52,496 residents and 7,032 properties.

Mosquito samples were collected in the field in November and December 2009 with the use of 100 oviposition traps (ovitrap), adapted from [34], distributed homogeneously in each area, based on the recommendations of the MoReNAa network [12,35]. More than 50% of these ovitraps were positive for *Aedes* spp eggs. Field derived colonies from each selected population were established with approximately 2,000 mosquitoes

(males and females) from these eggs. Populations were kept under controlled conditions in the insectary of the Federal University of Ceará (Cariri Campus), in order to obtain filial generation (F1), which was utilized in the biological, biochemical and molecular experiments described below. The Rockefeller strain, the standard strain for insecticide susceptibility tests, and used in all experiments as a susceptible reference strain, was obtained from a sub-strain kindly provided by Núcleo de Pesquisa/Sucen/Marília-SP (member of the MoReNAa/MS network, and initially provided by CDC, Puerto Rico).

### Insecticides

temephos, an organophosphate larvicide, was used under two formulations: a standard powder (Pestanal, 97.5%, Sigma lot 6333X), used to make a stock solution in ethanol for *in vivo* laboratory bioassays, and as sand granules with 1% active ingredient (Fersol, lot 197), utilized in the simulated field trials. The pyrethroid adulticide cypermethrin, as a standard powder (98%, Sigma lot 127K1099), was dissolved in acetone for the impregnated bottles assay.

### In vivo bioassays with larvae

Dose-response bioassays were undertaken according to the methodology proposed by the World Health Organization to evaluate larval susceptibility to temephos [36]. In these experiments, third-instar larvae (L3) were



**Figure 1** Map of Ceará State, Brazil, and in detail the three localities studied.

exposed to 10 different concentrations of the larvicide determined according to previous exploratory bioassays. For each concentration, and for the control, three replicates of 20 larvae were tested. Larval mortality was checked 24 h after exposure. All tests were repeated at least three times. Mortality data were utilized to calculate the lethal concentrations for 95% of exposed individuals ( $LC_{95}$ ) through linear regression log probit analysis, using SPSS software (version 8.0 for Windows). These values were compared to those obtained for the Rockefeller strain in order to estimate the resistance ratio (RR) for each population. The following criteria proposed by Mazzari and Georghiou [37] was adopted to classify the resistance level of populations: low ( $RR < 5$ ), moderate ( $RR > 5 < 10$ ) or high ( $RR > 10$ ).

#### Simulated field trial

the aim of this trial was to verify the effectiveness of temephos in its sand granules formulation to control larvae in the field presenting distinct resistance levels, using the concentration recommended by the PNCD (1 ppm). The trials were performed in the external area of the Department of Entomology of the School of Medicine in Cariri/Barbalha, based on recommendations by the MoReNAa network [12]. Plastic reservoirs filled with 20 L of tap water, treated with 2 g of temephos sand granules and colonized individually with 20 L3 larvae, were placed in a covered area protected from the sun and rain. One third of the water in the containers was renewed three times per week. For the Rockefeller and each field population, one control and three treated replicates were included. Mortality was verified 24 h after insecticide exposure and live larvae were removed before the weekly re-colonization of containers. The evaluation was continued for 60 days, a period of time similar to the interval between insecticide applications in the field performed by the national program. In these tests, only populations from Barbalha and Juazeiro do Norte were used, since samples from Crato were scarce.

#### In vivo bioassays with adults

For each population, three tests were performed using bottles impregnated with insecticides, according to the methodology described by Brogdon and McAllister [38], and Melo-Santos [11]. For these, around 130 unfed one day-old females were utilized. Mosquitoes were exposed to a diagnostic dose of 8  $\mu$ g/bottle of cypermethrin. Mortality was checked every 15 minutes over a period of 2 h, based on a lethal time to kill 100% of the population ( $LT_{100}$ ) of 15 mins at this concentration for the susceptible Rockefeller strain. All live and dead (those that did not move throughout the observation period) mosquitoes were transferred to another container free of insecticides and observed 24 h later, to determine the

final mortality rate and the resistance status of populations. According to [39], populations were classified as susceptible when mortality was  $> 98\%$ , in need of further evaluation when  $> 80\% < 98\%$ , or resistant when  $< 80\%$ . Differences between resistant and susceptible individuals were evaluated among populations through Fisher's exact test. Following bioassays, females were stored according to phenotype, at  $-80^{\circ}\text{C}$  for analysis of *kdr* mutations, which could possibly be associated with pyrethroid resistance.

#### Kdr screening

Individual mosquitoes were separated according to the resistance phenotype, established at the final mortality (24 h) as resistant (survivors) and susceptible (dead mosquitoes) and homogenized in DNAzol<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), for DNA extraction according to the manufacturer's instructions. DNA samples were later processed in order to analyze *Ile1011Met* and *Val1016Ile*  $AaNa_V$  mutations. To detect the  $AaNa_V$  *Ile1011Met* mutation, primers were designed based on the IIS6 region, as described by Saavedra-Rodriguez et al [25] and Martins et al [17,25]. PCR reactions were performed using 0.2 units of *Pfu* polymerase (Promega), 0.5  $\mu$ M dNTPs, 2  $\mu$ M of each primer, 1.5  $\mu$ M  $\text{MgCl}_2$  and 10 ng of DNA. PCR conditions were: 5 min at  $94^{\circ}\text{C}$ , followed by 30 cycles of 1 min at  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 min at  $58^{\circ}\text{C}$  and 2 min at  $72^{\circ}\text{C}$ , with a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 min. PCR products were purified using GFX<sup>™</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) and sequenced (ABI 3000, Applied Biosystems). Sequences were manually edited. Detection of  $AaNa_V$  *Val1016Ile* mutation was carried out using the following allele-specific primers, designed by Saavedra-Rodriguez et al [25]: reverse primer (5'-GGATGAACCGAAATTG GACAAAAGC-3') and allele-specific forward primers (Val 5'-GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCA CAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG-3' and Ile 5'-G CGGGACAATTGTTTCCCACCCGCACTGA-3). PCR reactions and conditions were identical to the ones mentioned above. PCR products were run in 5% high-resolution agarose (Sigma-Aldrich) gels to determine genotypes (Val - 78 bp and Ile - 98 bp). To test for association between *kdr* mutations and resistance we used Haploview v4 [40].

#### Biochemical assays

approximately 100 females, randomly sampled from each field populations, were assayed by biochemical tests in order to verify the activity of the following insecticide detoxification enzymes: esterases (evaluated through the use of  $\alpha$  and  $\beta$  naphthyl for  $\alpha$ -Est and  $\beta$ -Est, respectively, and p-nitrophenyl PNPA), mixed function oxidases (MFO), glutathione S-transferases



(GSTs), and acetylcholinesterase (AChE; the target of temephos). Microplate assays were performed on one-day-old adult females kept at -80°C [12]. The Rockefeller strain was used as the susceptible reference. The proportion of individuals from each population presenting enzyme activity higher than that observed for the 99 percentile of Rockefeller strain was used for status classification as follows: unaltered <15%, altered >15% <50%, and highly altered >50% (for more details see [12,41]).

## Results

### Status of susceptibility to temephos

all tested populations presented some resistance level to temephos, with individuals from Crato and Barbalha presenting the highest levels and Juazeiro do Norte a moderate level ( $LC_{95} = 3.279$  mg/ml, 0.510 mg/ml and 0.123 mg/ml respectively. c.f. 0.017 mg/ml for Rockefeller) (Table 1). Temephos has been used extensively over the period 2002-2009 in both Crato and Barbalha and in these municipalities resistance ratios have increased over this period with, for example, an increase in RR to temephos from 9.0 to 192.7 in Crato (21 fold increase) and from 7.5 to 30 in Barbalha (4 fold increase). In Juazeiro do Norte where temephos was substituted by Bti for larval control the RR to temephos decreased by 30% over this period (10.4 to 7.2) (Table 2).

### Effectiveness of temephos in the field

in the simulated field trial, temephos killed 100% of the larvae in the two tested populations up to the 4<sup>th</sup> week after treatment. The larvicidal effect on the Juazeiro do Norte population varied between 90% and 98% from the 4<sup>th</sup> to the 8<sup>th</sup> week, while the mortality of larvae from the Barbalha population decreased to 66.6% in the 5<sup>th</sup> week, indicating a lower mortality rate than that recommended for validating the residual effect of temephos, according to the MoReNAa network. As expected, the insecticide killed all larvae of the control group (Rockefeller) throughout the experiment.

**Table 1 Lethal concentration for 95% of individuals ( $LC_{95}$ ) and resistance ratio (RR) to temephos, estimated for *Aedes aegypti* populations from Ceará State**

Populations	Number of larvae	$LC_{95}$ (mg/L) (Confidence interval 95%)	Resistance ratio (RR <sub>95</sub> )
Crato	960	3.279 (1.316-11.429)	192.7
Barbalha	1380	0.510 (0.277-0.893)	30.0
Juazeiro do Norte	960	0.123 (0.094-0.177)	7.2
Rockefeller*	1440	0.017 (0.014-0.018)	1.0

\*Control strain.

### Status of susceptibility to cypermethrin

two of the three tested populations, Crato and Barbalha, were resistant to cypermethrin, with both populations presenting average mortality rates lower than 80% after 15 min and 24 h (Table 3). Crato was considered the most resistant population to this insecticide, since 51% of the exposed mosquitoes recovered 24 h after being removed to an insecticide-free recovery bottle. The mortality rate of individuals from Juazeiro do Norte indicated reduced susceptibility to this pyrethroid (Table 3). The differences in phenotypic distribution among populations were significant ( $p = 1.054 \times 10^{-11}$ ).

### Kdr screening

Sequencing results showed that the *Ile1011Met kdr* mutation of the  $Na_v$  channel was found in all three populations. The *1016Ile* allele was detected in Crato and Juazeiro do Norte (in heterozygotes only) but not in Barbalha. Significant differences were observed in genotype frequencies between populations: for *kdr1011*; Crato vs. Barbalha ( $p = 0.0218$ ), and for *kdr1016*; Crato vs. Juazeiro do Norte ( $p = 3.81 \times 10^{-5}$ ) and Crato vs. Barbalha ( $7.0844 \times 10^{-7}$ ). Phenotype frequencies of each population classified by genotype are shown in Figure 2 and Tables 4 and 5.

Barbalha and Juazeiro do Norte populations were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium. However, the Crato population showed a significant deviation from Hardy-Weinberg expectation, due to a heterozygote deficit for *Ile1011Met* ( $p = 0.0197$ ), and heterozygote excess for *Val1016Ile* ( $p = 0.015$ ). The frequency of the *1011Met* allele was higher in resistant individuals from Crato, and significantly associated with resistance to cypermethrin ( $p = 0.0242$ ). In Barbalha and Juazeiro do Norte, the resistance did not show any association with this allele (Table 4). Although the resistant allele *1016Ile* was observed in both resistant and susceptible *A. aegypti* from Crato, no association was found between this allele and the resistance status. For *kdr1016* in samples from Barbalha all individuals were homozygous for the *1011Val* allele, thus, no association test was calculated. Since all individuals from Juazeiro do Norte were all phenotyped as susceptible, no test was performed for either putative *kdr* mutation (Table 5).

### Biochemical assays

these assays showed an alteration in the activity of GST and  $\alpha$ -esterase in all populations, in particular in individuals from Barbalha (Table 6, Figure 3). Esterases that metabolize PNPA were also altered only in the Barbalha and Juazeiro do Norte populations. Activity of other enzymes was not significantly different between populations when compared to the Rockefeller, including acetylcholinesterase (Table 6).

**Table 2 Amount of temephos sand granules (1%) utilized in Ceará for controlling *Aedes aegypti* larvae**

Populations	Number of houses treated with temephos (2002 to 2009)	Use of temephos from 2002 to 2009 (Kg)	Resistance ratio to temephos (RR <sub>95</sub> )	
			(2003)**	(2009)
Crato	1059.507	60352.7	9.0	192.7
Barbalha	447.043	29219.0	7.5	30.0
Juazeiro do Norte	2093.937	0*	10.4	7.2

\* In this period temephos was substituted by *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti).

\*\* Resistance ratio evaluated by Lima *et al.*, (2006).

## Discussion

Over the last 10 years, resistance to organophosphate and pyrethroid insecticides employed for control of the dengue vector *Aedes aegypti* has been detected in all Brazilian regions, including Rio de Janeiro [4,12], Espírito Santo [35] and São Paulo [7,9-12] representing the Southeast, in all states from the Northeast region, in Distrito Federal and Goiás representing the Midwest region, and in Pará and Amazonas representing the North [8]. Here we now show that two populations of *A. aegypti* from Crato and Barbalha (Ceará State, Northeast Brazil) are resistant to both temephos and cypermethrin. The temephos resistance level of the *A. aegypti* population from Crato (RR = 192.7) was the second highest ever recorded in Brazil, surpassed only by Araripina, Pernambuco, Northeast Brazil (RR = 240) [11].

Over recent years resistance to temephos has risen markedly in Crato (2003 RR = 9.0; 2009 RR = 192.7) and Barbalha (2003 RR = 7.5; 2009 RR = 30). In this study the resistance level of a neighbouring population (Juazeiro do Norte) was much lower (RR = 7.2), which is only marginally below the 2003 level (RR = 10.2). Here, temephos has not been used for *Aedes* control for at least seven years, having been substituted by Bti. The increased resistance levels to temephos observed for populations from Crato and Barbalha, compared to Juazeiro do Norte where increase in resistance has been halted, indicate that the resistance management strategy utilized in the field in Juazeiro do Norte should have

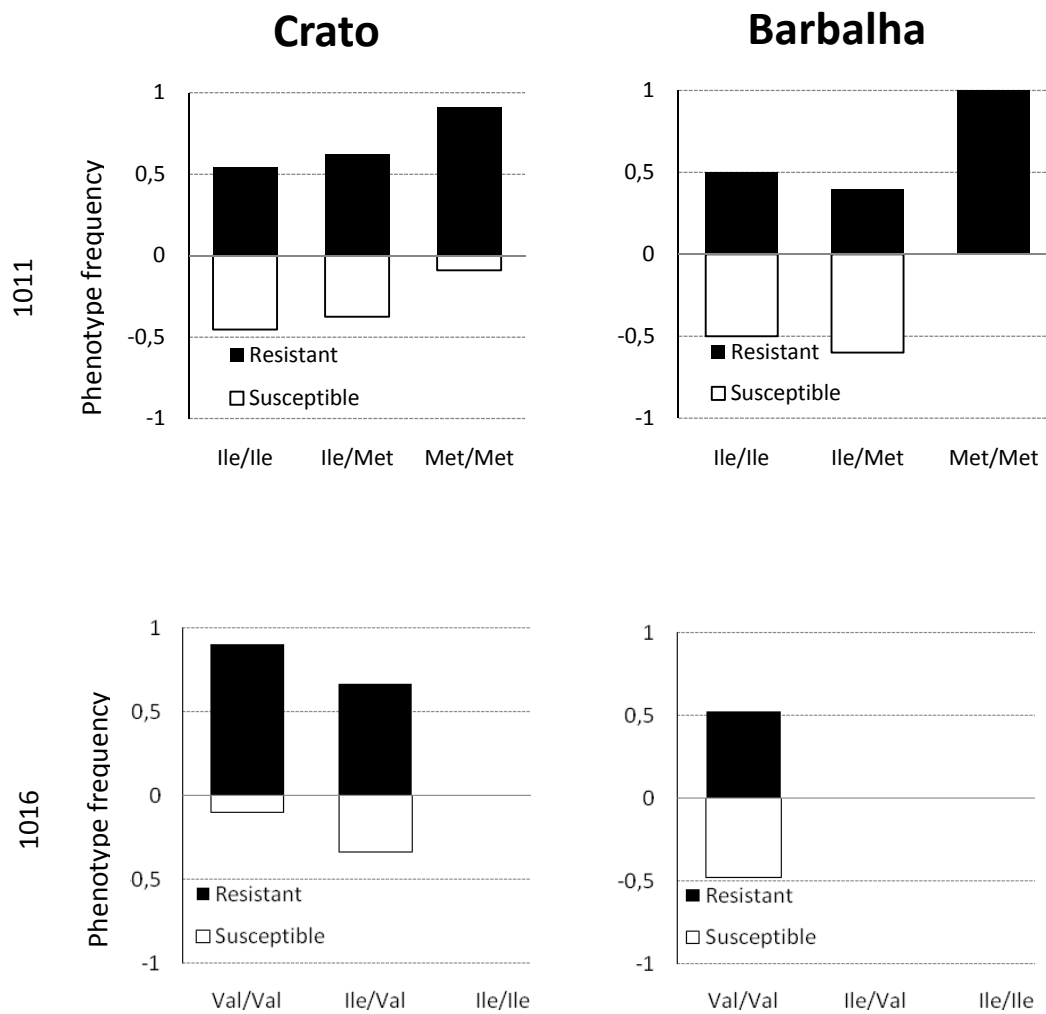
been extended to these neighboring cities. Our results also demonstrate that even though temephos has been substituted in Juazeiro do Norte, recovery of susceptibility has been slow. Melo-Santos *et al.* [11], in a study that simulated different field situations for reversion of temephos resistance in *A. aegypti*, suggested that besides the probable fitness cost associated with resistance, interruption of the selective pressure alone is insufficient to completely revert resistance and may prolong the state of intermediate or low resistance unless susceptible individuals are introduced. However, this species has a low dispersal rate in densely populated environments [42] suggesting gene flow between *A. aegypti* populations is low, despite their close proximity, as demonstrated previously by Ayres *et al.* [43] in their study of genetic variability of populations from Northeast Brazil.

The high resistance levels detected for Crato and Barbalha suggest that temephos will have low efficacy for *Aedes* control. Through simulated field trials we have confirmed the low effectiveness of temephos-based products, used at the field dosage, for the Barbalha population (RR = 30), corroborating Montella *et al.* [12], who showed that an RR > 10 can compromise insecticide effectiveness in control programs. Our results show clearly that the period for temephos larvicidal effectiveness (30 days) was much lower than the interval (60 days) recommended by PNCB between temephos application cycles in *A. aegypti* breeding sites. Consequently, there are serious faults in the vector control activities as currently undertaken

**Table 3 Mortality rate and susceptibility status of *Aedes aegypti* populations from Ceará-Brazil to the pyrethroid cypermethrin**

Populations	Number of females	Mortality rate (%) after cypermethrin exposure (8 µg/bottle)						Susceptibility Status
		Exposure time				Time for recovery		
		15 min	30 min	60 min	90 min	2 hours	24 hours	
Crato	139	70.6	90.3	97.3	99.0	100	49.9	Resistant
Barbalha	148	62.6	87.2	93.3	95.8	99.3	65.8	Resistant
Juazeiro do Norte	163	88.7	92.0	99.0	99.0	100	97.0	Verification required
Rockefeller*	138	100	-	-	-	-	100	Susceptible

\*Control strain.



**Figure 2** *Kdr* genotypes (1011 and 1016) and associated phenotype frequencies in *Aedes aegypti* from Ceará.

in Barbalha and, probably in Crato (where RR = 192.7), although we did not undertake simulated field-trial evaluation of this population. Recent entomological indexes based on larval surveys conducted in these cities provide further evidence that the control program has not been successful in maintaining mosquito populations at low

densities, since *A. aegypti* was detected in over 1% of houses [2]. The continued use of temephos in such areas will certainly decrease the efficacy of the insecticide within the scope of PNCD.

Resistance to temephos can arise through alterations in the target site of the insecticide (the acetylcholinesterase

**Table 4** Genotype and allele frequencies of *Aedes aegypti kdr* mutation 1011 in pyrethroid susceptible and resistant individuals from Ceará

Populations	Phenotype	Genotype			Total	N	Allele frequency	
		Ile/Ile	Ile/Met	Met/Met			Ile	Met
Crato	S	5 (0.56)	3 (0.33)	1 (0.11)	9	30	0.73	0.27
	R	6 (0.29)	5 (0.24)	10 (0.48)	21		0.41	0.59
Barbalha	S	4 (0.40)	6 (0.60)	0 (0.00)	10	21	0.70	0.30
	R	4 (0.36)	4 (0.36)	3 (0.28)	11		0.54	0.46
Juazeiro do Norte	S	20 (0.54)	11 (0.30)	6 (0.16)	37	37	0.69	0.31
	R	0	0	0	0		0	0

N = number of females; S = susceptible; R = resistant; Ile: isoleucine; Met: methionine.

**Table 5 Genotype and allele frequencies of *Aedes aegypti* *kdr* mutation 1016 in pyrethroid susceptible and resistant individuals from Ceará**

Populations	Phenotype	Genotype			Total	N	Allele frequency	
		Val/Val	Val/Ile	Ile/Ile			Val	Ile
Crato	S	1 (0.11)	8 (0.89)	0 (0.0)	9	30	0.56	0.44
	R	9 (0.43)	12 (0.57)	0 (0.0)	21		0.72	0.28
Barbalha	S	10 (1)	0 (0.0)	0 (0.0)	10	21	1	0
	R	11 (1)	0 (0.0)	0 (0.0)	11		1	0
Juazeiro do Norte	S	31 (0.84)	6 (0.16)	0 (0.0)	37	37	0.92	0.08
	R	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0		0	0

N = number of females; S = susceptible; R = resistant; Val: valine; Ile: isoleucine.

gene *ACE-1*) or through elevated levels or differential efficacy of metabolic genes. We utilized biochemical assays to characterize the mechanisms involved in insecticide resistance. No evidence was found for target-site resistance (AChE test). However, increased activity levels of GSTs,  $\alpha$ -esterases and PNPA-esterases were detected indicating that members of these enzyme classes may play roles in detoxification and deserve further attention. Interestingly, *A. aegypti* from Crato, which presented the highest RR to temephos, has the lowest activity profile for these enzyme classes, indicating that the association between the increase of activity and level of temephos resistance is not simple. Thus, metabolic mechanisms do not seem to explain fully the elevated resistance levels to temephos, unless very few genes are involved whose activities could not be detected by our broad biochemical assays or unless other mechanisms, such as reduced insecticide penetration, are involved in temephos resistance. Future studies with synergists are warranted in

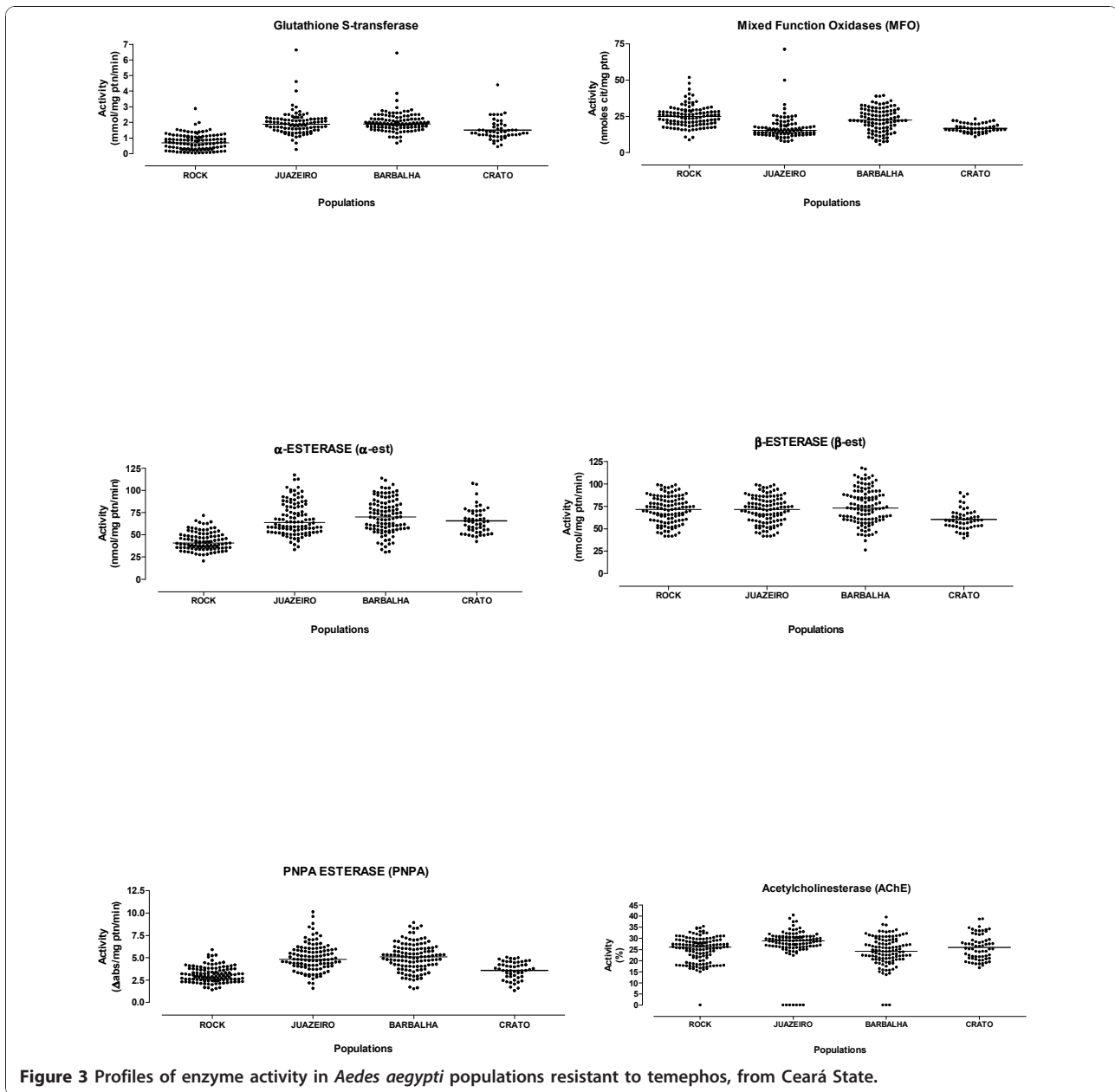
order to provide additional information on metabolic mediated resistance mechanisms.

In Brazil, pyrethroids were first utilized by PNCD in 2000 [3,17], when resistance to temephos was spreading throughout the country [15]. Surveillance of cypermethrin susceptibility in *A. aegypti* populations from Brazil has been performed since 2001 when da Cunha *et al.* [16] demonstrated that populations from seven out of sixteen Brazilian cities presented an incipient alteration to this insecticide. Resistance increased over the following two years with 80% of the analyzed populations classified as resistant in 2003 [16]. Our results demonstrate that *A. aegypti* populations from Juazeiro do Norte present only a slight alteration in cypermethrin susceptibility, whilst for the Crato and Barbalha populations the mortality rates to PY is among the lowest registered for Brazilian populations [10,16]. Cypermethrin, alpha-cypermethrin or deltamethrin are sprayed monthly for mosquito control in strategic points (tire repair centres, cemeteries and

**Table 6 Enzyme activity observed in *Aedes aegypti* from three insecticide resistant populations and the Rockefeller strain**

Populations/enzyme activity	$\alpha$ -esterase (nmol/mg ptn/min)			$\beta$ -esterase (nmol/mg ptn/min)			Esterases-PNPA ( $\Delta$ abs/mg ptn/min)		
	N	Median	99 <sup>th</sup> Percentile	N	Median	99 <sup>th</sup> Percentile	N	Median	99 <sup>th</sup> Percentile
Rockefeller	104	40.87	65.87	112	71.46	98.83	119	2.96	5.33
Populations/enzyme activity	N	Median	(% > p99)	N	Median	(% > p99)	N	Median	(% > p99)
Crato	51	64.58	43.0	51	59.42	0	51	3.57	0
Barbalha	108	70.03	57.0	116	73.12	13.0	119	5.11	41.0
Juazeiro do Norte <sup>1</sup>	108	63.67	45.0	89	74.72	7.0	108	4.83	39.0
Populations/enzyme activity	Acetylcholinesterase (ACE) (% act) <sup>a</sup>			Glutathione S-transferase (GST) (mmol/mg ptn/min)			Mixed function oxidases (MFO) (nmol/mg ptn/min)		
Populations/enzyme activity	N	Median	(% > p99)	N	Median	(% > p99)	N	Median	(% > p99)
Rockefeller	131	26.06	34.76	114	0.70	1.97	113	24.85	47.35
Crato	65	25.30	6.0	51	1.39	18.0	50	16.23	0
Barbalha	113	24.17	3.0	116	1.90	42.0	101	22.54	0
Juazeiro do Norte <sup>1</sup>	109	28.90	5.0	98	1.89	42.0	92	15.32	2.0

N = number of females; % > p99: rate of the population with activity higher than the Rockefeller; (% > p99) < 15: unaltered enzyme activity; (% > p99) > 15 < 50 altered enzymatic activity; (% > p99) > 50: highly altered; <sup>a</sup> rate of activity in the presence of propoxur; <sup>1</sup> population with reduced susceptibility to cypermethrin.



**Figure 3** Profiles of enzyme activity in *Aedes aegypti* populations resistant to temephos, from Ceará State.

junkyards). Additionally, ultra-low volume (ULV) spraying is recommended by the PNCD to block viral transmission as a complementary strategy when a high number of dengue cases are reported in specific areas [44] or in places with high mosquito infestation levels (>5%) in order to prevent outbreaks. In Juazeiro do Norte, the registered number of dengue cases was lower than Crato and Barbalha in the last year, implying that this population should have been subject to a lower insecticide pressure. In addition, since temephos is no longer used in this location, potential pyrethroid cross-resistance mechanisms would be minimized. As seen in other studies, resistance to PY seems to be

rapidly evolving in populations from Ceará, where this insecticide started being utilized less than 10 years ago [10,16,45]. Additional factors that may have contributed to this rapid rise in resistance are: 1) the mechanisms involved in temephos resistance are also involved in PY resistance [46,47]; 2) a concomitant use of PY insecticides in other control programs, such as those for Leishmaniasis, malaria and Chagas disease; 3) large-scale PY usage to control urban pests (e.g. cockroaches, mites, ants and scorpions), performed by private companies acting independently of, and unsupervised by, the Secretaries of Health and Environment; and 4) domestic use of spray insecticides.



In recent years, various studies have shown an association between mutations in the voltage-gated sodium (Nav) channel and resistance to pyrethroids in various mosquito species [21,24,30,48-51]. In *A. aegypti*, a number of Nav mutations in segment 6 of domain II have been associated with *kdr*-like resistance, such as *Gly923-Val*, *Leu982Trp*, *Ile1011Met*, *Ile1011Val*, *Val1016Ile* and *Val1016Gly* [17,25,30,52], *Asp1794Tyr* between segments 5 and 6 of domain II [53], and, more recently, *Phe1534Cys* in segment 6 of domain III [54]. Brengues *et al.* [30] detected *Ile1011Met* within a population of *A. aegypti* from Belém (North region) resistant to pyrethroids and DDT. In electrophysiological studies, this mutation was associated with significantly different levels of nerve sensitivity to both permethrin and lambda cyhalothrin [30]. However, the first countrywide screening for this mutation and its correlation with resistance did not occur until 2009 [17,23]. Martins *et al.* [17] observed that in *A. aegypti* from Natal (North-east Brazil) the frequency of the resistant allele (*1011Met* = 0.529) was higher in individuals resistant to cypermethrin than in susceptible individuals (0.425), although this difference was not significant. In the present study, we observed a significant association between the *1011Met* frequency and resistance to cypermethrin in the population from Crato ( $p = 0.0242$ ). Martins *et al.* [23] showed that the *1016Ile* allele was found almost exclusively in the Midwest region of Brazil, being absent in the Southeast and Northeast, although no test for association with resistance was performed. In the present study, the *1016Ile* allele was detected for the first time in *A. aegypti* populations from the Northeast of Brazil (Crato and Juazeiro do Norte). We did not detect any association between the *1016Ile* variant and resistance.

The detection of significant association with the resistance phenotype for a *kdr* allele (*1011Met*) shown previously to have a functional effect on nerve response following insecticide exposure [30], and hence with potential importance for the knockdown phenotype, has important implications for control programmes since the continuous use of PY adulticides may promote a drastic increase in frequency in local mosquito populations potentially leading to fixation, as demonstrated by García *et al.* [55] in a study on *A. aegypti* from Mexico. Similarly, Lynd *et al.* [56], observed a rapid increase in *1014Phe* frequency in *An. gambiae* from southern Ghana over a 5-year period. In addition to mutations in the target site of PY, resistance may also have a metabolic basis. Our study detected no significant alterations for MFOs (cytochrome P450s) which have been demonstrated previously to be capable of metabolizing pyrethroids *in vitro* [57]. However, microarray studies of either field

samples or laboratory colonies phenotyped for insecticide resistance have previously implicated particular cytochrome P450s in the resistance phenotype [57-59]. Alterations in activity of one, or a few, P450s may not be detectable by the broad MFO assay. However, we did detect significant increase in GST activity and previous studies have shown an association between an increase of GSTs activity and resistance to PY, although some of the populations studied, including those studied here, have also been exposed to OP [12,17,49,60], complicating interpretation.

The status of temephos and cypermethrin resistance in these *A. aegypti* populations reinforces the need for a constant surveillance of mosquito susceptibility against insecticides used in control programs, as well as their effectiveness in the field. This must begin before, or as soon as the insecticide starts to be utilized, such that initial resistance levels are determined, so facilitating resistance management. In general, resistance to chemical insecticides is a multi-factorial trait that may be affected by environmental (availability and types of breeding sites), operational (insecticide application frequency and amount, period of exposure) and genetic (metabolic genes and target-site alteration) factors. Additionally, *A. aegypti* populations from Brazil possess different genetic backgrounds, especially those from the Northeast region [43], a fact that could be behind the diverse resistance mechanisms to the same insecticide developed in different populations. This reinforces the suggestion of Rawlins *et al.* [61], that control strategies must be adjusted to each place according to local peculiarities. A broad program such as PNCD should take this into consideration.

#### Acknowledgements

We are indebted to all the health staff (health officers and operational vector-control staff) of the Secretaria de Saúde do estado do Ceará and the Núcleo de Entomologia Médica do Cariri, who participated in the mosquito collection in the municipalities of Ceará State. We also thank the Program for Technological development in Tools for Health- PDTIS-FIOCRUZ for providing sequencing assistance.

#### Funding

The work was funded by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Grants ID: 479825/2009-2 and 550116/2010-9), CAPES/PROCAD/NF 23, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Grant ID: APQ 1361-4.00/08).

#### Author details

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará - Avenida da Universidade, 2853, CEP 60020-181, Benfica, Fortaleza/CE, Brasil. <sup>2</sup>Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz - Avenida Professor Moraes Rego, s/n, CEP 50670-420, Campus UFPE, Cidade Universitária, Recife/PE, Brasil. <sup>3</sup>Faculdade ASCES - Avenida Portugal, 584, CEP 5016-400, Bairro Universitário, Caruaru/PE, Brasil. <sup>4</sup>Universidade Federal de Alagoas - Campus A. C. Simões - Avenida Lourival Melo Mota, s/n, CEP: 57072-970, Tabuleiro do Martins, Maceió/AL, Brasil. <sup>5</sup>Núcleo de Entomologia Médica do Cariri - Rua Manoel Couto Soares, 664, CEP 63180-000, Novo Juazeiro, Juazeiro do Norte/CE, Brasil. <sup>6</sup>Vector Group, Liverpool School of Tropical Medicine - Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK.

#### Authors' contributions

EPL and MHSP contributed equally to the study. EPL, AES and MOFG conceived the idea of the study; MAVMS designed and coordinated the bioassays, biochemical and semi field tests; UMS, LNO, CNB and CCPN have collected the samples and performed the field-simulated experiments; EPL, APA and EVGS carried out the bioassay and biochemical tests and its analysis; CFJA designed and coordinated the molecular study; EPL and MHSP carried out the molecular assays; CSW and MHSP performed the sequence alignment and statistical analysis; EPL, MHSP, MOFG, MAVMS, CSW and CFJA helped to draft the manuscript and all authors read and approved the final version. MAVMS is guarantor of the paper.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 21 October 2010 Accepted: 12 January 2011

Published: 12 January 2011

#### References

1. Fundação Nacional de Saúde: *Nota técnica n° 110, de 6 de agosto de 2010* Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
2. Secretaria de Saúde do Ceará: *Informe Semanal Dengue - Semana Epidemiológica 01 a 21* Fortaleza; 2010.
3. Braga IA, Valle D: *Aedes aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 2007, **16**:295-302.
4. Braga IA, Lima JB, Soares SS, Valle D: *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, **99**:199-203.
5. Fundação Nacional de Saúde: *Reunião Técnica Para Discutir Status de Resistência de Aedes aegypti e Definir Estratégias a Serem Implantadas Para Monitoramento da Resistência no Brasil* Brasília: Ministério da Saúde; 1999.
6. Macoris MLG, Andrighetti MT, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VC: *Changes in susceptibility of Aedes aegypti to organophosphates in municipalities in the state of São Paulo, Brazil. Rev Saude Publica* 1999, **33**:521-522.
7. Beserra EB, Fernandes CR, Queiroga MF, de Castro FP Jr: *Resistance of Aedes aegypti (L.) (Diptera: Culicidae) populations to organophosphate temephos in the Paraíba State, Brazil. Neotrop Entomol* 2007, **36**:303-307.
8. Carvalho MS, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos PT, Souza LC, Yoshizawa MA, Knox MB, Oliveira C: *Susceptibility of Aedes aegypti larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. Rev Saude Publica* 2004, **38**:623-629.
9. Lima EP, Filho AMO, Lima JWO, Junior ANR, Cavalcanti LPG, Pontes RJ: *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará State. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006, **39**:259-263.
10. Macoris ML, Andrighetti MT, Otrera VC, Carvalho LR, Caldas Junior AL, Brogdon WG: *Association of insecticide use and alteration on Aedes aegypti susceptibility status. Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, **102**:895-900.
11. Melo-Santos MAV, Varjal-Melo JJ, Araújo AP, Gomes TCS, Paiva MH, Regis LN, Furtado AF, Magalhaes T, Macoris ML, Andrighetti MT, Ayres CFJ: *Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an Aedes aegypti laboratory strain from Brazil. Acta Trop* 2010, **113**:180-189.
12. Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA, Valle D: *Insecticide resistance mechanisms of Brazilian Aedes aegypti populations from 2001 to 2004. Am J Trop Med Hyg* 2007, **77**:467-477.
13. Macoris ML, Andrighetti MT, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE: *Resistance of Aedes aegypti from the state of Sao Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003, **98**:703-708.
14. Filho AMO, Melo MTV, Santos CE, Griffo HG, Lustosa ELB, Ribeiro ZM: *Resistência a Temefós em linhagens de Aedes aegypti provenientes do Ceará. In: Resumos do XXXVII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Salvador* 2001, 291.
15. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde: *Reunião técnica para discutir e avaliar os resultados do monitoramento de resistência do Aedes aegypti a inseticidas* Brasília-DF; 2004.
16. da-Cunha MP, Lima JB, Brogdon WG, Moya GE, Valle D: *Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005, **100**:441-444.
17. Martins AJ, Lins RM, Linss JG, Peixoto AA, Valle D: *Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant Aedes aegypti from Brazil. Am J Trop Med Hyg* 2009, **81**:108-115.
18. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H: *The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol* 2004, **34**:653-665.
19. Soderlund DM, Knipple DC: *The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochem Mol Biol* 2003, **33**:563-577.
20. Vais H, Williamson MS, Devonshire AL, Usherwood PN: *The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. Pest Manag Sci* 2001, **57**:877-888.
21. Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D: *Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector Anopheles gambiae s.s. Insect Mol Biol* 1998, **7**:179-184.
22. Martinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Devonshire AL, Williamson MS: *A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, Myzus persicae (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Insect Mol Biol* 1999, **8**:339-346.
23. Martins AJ, Lima JB, Peixoto AA, Valle D: *Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Aedes aegypti Brazilian populations. Trop Med Int Health* 2009, **14**:1351-1355.
24. Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH: *Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan Anopheles gambiae associated with resistance to DDT and pyrethroids. Insect Mol Biol* 2000, **9**:491-497.
25. Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black 4th WC: *A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American Aedes aegypti. Insect Mol Biol* 2007, **16**:785-798.
26. Wondji CS, Priyanka De Silva WA, Hemingway J, Ranson H, Parakrama Karunaratne SH: *Characterization of knockdown resistance in DDT- and pyrethroid-resistant Culex quinquefasciatus populations from Sri Lanka. Trop Med Int Health* 2008, **13**:548-555.
27. Xu Q, Wang H, Zhang L, Liu N: *Kdr allelic variation in pyrethroid resistant mosquitoes, Culex quinquefasciatus (S.). Biochem Biophys Res Commun* 2006, **345**:774-780.
28. Busvine JR: *Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. Nature* 1951, **168**:193-195.
29. Wondji CS, Hemingway J, Ranson H: *Identification and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the mosquito Anopheles funestus, malaria vector. BMC Genomics* 2007, **8**:5.
30. Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J: *Pyrethroid and DDT cross-resistance in Aedes aegypti is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. Med Vet Entomol* 2003, **17**:87-94.
31. Donnelly MJ, Corbel V, Weetman D, Wilding CS, Williamson MS, Black 4th WC: *Does kdr genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes? Trends Parasitol* 2009, **25**:213-219.
32. Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará: *Perfil básico municipal de Juazeiro do Norte* 2007.
33. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: *Pesquisa de Informações Básicas Municipais* Juazeiro do Norte; 2010.
34. Fay RW, Eliason DA: *A preferred oviposition site as a surveillance method for Aedes aegypti. Mosq News* 1966, **26**:531-535.
35. Lima JB, Da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AK, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D: *Resistance of Aedes aegypti to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. Am J Trop Med Hyg* 2003, **68**:329-333.
36. World Health Organization: *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides* Geneva; 1981.
37. Mazzarri MB, Georgiou GP: *Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of Aedes aegypti from Venezuela. J Am Mosq Control Assoc* 1995, **11**:315-322.
38. Brogdon WG, McAllister JC: *Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. J Am Mosq Control Assoc* 1998, **14**:159-164.

39. World Health Organization: *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces* Geneva, Switzerland; 1998.
40. Barrett JC FB, Maller J, Daly MJ: **Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps.** *Bioinformatics* 2005, **21**:263-265.
41. Ministério da Saúde: *Metodologia para Quantificação de Atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em Aedes aegypti* Brasília-DF; 2006.
42. Harrington LC, Scott TW, Lerdtusnee K, Coleman RC, Costero A, Clark GG, Jones JJ, Kitthawee S, Kittayapong P, Sithiprasasna R, Edman JD: **Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**:209-220.
43. Ayres CFJ, Melo-Santos MAV, Protá JR, Solé-Cava AM, Regis LN, Furtado AF: **Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macrogeographic levels in Brazil.** *J Am Mosq Control Assoc* 2004, **20**:350-356.
44. Fundação Nacional de Saúde: *Dengue - Instruções para pessoal de combate ao vetor* Brasília: Ministério da Saúde; 2001.
45. Luna JE, Martins MF, Anjos AF, Kuwabara EF, Navarro-Silva MA: **Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil.** *Rev Saude Publica* 2004, **38**:842-843.
46. Rodriguez MM, Bisset JA, Mila LH, Calvo E, Diaz C, Soca LA: **Levels of insecticide resistance and its mechanisms in a strain of *Aedes aegypti* of Santiago de Cuba.** *Rev Cubana Med Trop* 1999, **51**:83-88.
47. Wirth MC, Georghiu GP: **Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands.** *J Am Mosq Control Assoc* 1999, **15**:315-320.
48. Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabire KR, Hougard JM, Akogbeto M, Kengne P, Simard F, Guillet P, Hemingway J, Chandre F: **The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena.** *Trop Med Int Health* 2004, **9**:1267-1273.
49. Etang J, Vicente JL, Nwane P, Chouaibou M, Morlais I, Do Rosario VE, Simard F, Awono-Ambene P, Toto JC, Pinto J: **Polymorphism of intron-1 in the voltage-gated sodium channel gene of *Anopheles gambiae* s.s. populations from Cameroon with emphasis on insecticide knockdown resistance mutations.** *Mol Ecol* 2009, **18**:3076-3086.
50. Lynd A, Ranson H, McCall PJ, Randle NP, Black 4th WC, Walker ED, Donnelly MJ: **A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (kdr) detection in *Anopheles gambiae*.** *Malar J* 2005, **4**:16.
51. Morgan JC, Irving H, Okedi LM, Steven A, Wondji CS: **Pyrethroid Resistance in an *Anopheles funestus* Population from Uganda.** *PLoS One* 2010, **5**: e11872.
52. Rajatileka S, Black 4th WC, Saavedra-Rodriguez K, Trongtokit Y, Apiwathnasorn C, McCall PJ, Ranson H: **Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*.** *Acta Trop* 2008, **108**:54-57.
53. Chang C, Shen WK, Wang TT, Lin YH, Hsu EL, Dai SM: **A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2009, **39**:272-278.
54. Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Prapanthadara L: **A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance.** *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2010, **96**:127-131.
55. Garcia GP, Flores AE, Fernandez-Salas I, Saavedra-Rodriguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, Guillermo Bond J, Casas-Martinez M, Ramsey JM, Garcia-Rejon J, Domínguez-Galera M, Ranson H, Hemingway J, Eisen L, Black 4th WC: **Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico.** *PLoS Negl Trop Dis* 2009, **3**:e531.
56. Lynd A, Weetman D, Barbosa S, Egyir Yawson A, Mitchell S, Pinto J, Hastings I, Donnelly MJ: **Field, genetic, and modeling approaches show strong positive selection acting upon an insecticide resistance mutation in *Anopheles gambiae* s.s.** *Mol Biol Evol* 2010, **27**:1117-1125.
57. Muller P, Warr E, Stevenson BJ, Pignatelli PM, Morgan JC, Steven A, Yawson AE, Mitchell SN, Ranson H, Hemingway J, Paine MJ, Donnelly MJ: **Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids.** *PLoS Genet* 2008, **4**:1000286.
58. Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, Hemingway J, Strode C: **Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria.** *BMC Genomics* 2008, **9**:538.
59. Muller P, Donnelly MJ, Ranson H: **Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana.** *BMC Genomics* 2007, **8**:36.
60. Rodriguez MM, Bisset JA, De Armas Y, Ramos F: **Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection.** *J Am Mosq Control Assoc* 2005, **21**:437-445.
61. Rawlins SC: **Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance.** *Rev Panam Salud Publica* 1998, **4**:243-251.

doi:10.1186/1756-3305-4-5

Cite this article as: Lima et al.: Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vectors* 2011 **4**:5.

Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit





**APÊNDICE H:** Artigo – Mapping Quantitative Trait Loci Influencing Resistance to the Organophosphate Temephos in the Dengue vector *Aedes aegypti*.

1 **Mapping Quantitative Trait Loci Influencing Resistance to the Organophosphate**  
2 **Temephos in the Dengue vector *Aedes aegypti***

3  
4 **Paiva, M.H.S<sup>1,2</sup>; Lovin D.D.<sup>2</sup>; Mori, A.<sup>2</sup>; Wilding, C.S.<sup>3</sup>; Melo-Santos, M.A.V. <sup>1</sup>;**  
5 **Ayres, C.F.J.<sup>1</sup>; Severson, D.W<sup>2</sup>.**

6  
7 <sup>1</sup>. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE. Avenida Professor Moraes  
8 Rego, s/n. Cidade Universitária, Recife-PE. 50.670-420. Brazil.

9  
10 <sup>2</sup>. Department of Biological Sciences, Eck Institute for Global Health, University of  
11 Notre Dame, Notre Dame, IN 46556-5645. USA.

12  
13 <sup>3</sup>. Vector Group, Liverpool School of Tropical Medicine – Pembroke Place, Liverpool  
14 L3 5QA, UK

15  
16  
17 **Correspondence:** Dr. David W. Severson, Department of Biological Sciences, Eck  
18 Institute for Global Health, University of Notre Dame, 107 Galvin Life Sciences, Notre  
19 Dame, IN 46556-5645. USA.

20 **Email:** [severson.1@nd.edu](mailto:severson.1@nd.edu)

21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

## ABSTRACT

Organophosphorus insecticides (OP) have been extensively used to control mosquitoes of medical importance, such as the dengue vector *Aedes aegypti*. In the past couple of decades, resistance to OP compound have hampered control programs and contributed to a high prevalence of dengue cases worldwide. The present study mapped a Quantitative Trait Loci (QTL), controlling temephos resistance in two F2 intercross families derived from crosses between a highly resistant *Ae. aegypti* strain (RecR) and two susceptible colonies (MoyoD and Red). A total of 76 microsatellite loci were used for genotyping the parental and F2 generations. As a result, two linkage groups were observed in RecR x MoyoD intercross, while three groups were identified in RecR x Red. A QTL controlling temephos resistance was identified on chromosome 2 in both F2 families. In addition, bioinformatic analyses revealed the presence of a cluster of esterase genes possibly involved in the process of OP resistance in RecR. qPCR assays demonstrated that four esterases genes were up regulated (*CCEae3A*, *CCEae1*, *CCEae5* and *CCEae6*). These results, together with previous microarray findings, confirm the involvement of multiple resistance genes contributing to temephos resistance in the RecR strain.

## 69 INTRODUCTION

70 *Aedes aegypti*, the primary dengue vector, continues to challenge vector control  
71 programs around the world due to its remarkable ability to adapt to urban environments  
72 and to develop resistance to every class of chemical insecticide (Gubler, 2011). Since no  
73 vaccine or specific treatment is available to prevent the disease, the massive use of  
74 chemical insecticides is still a common element in vector control programs.  
75 Unfortunately, as a consequence of continuous selective pressure, *Ae. aegypti*  
76 populations have developed resistance to every insecticide class, including  
77 organochlorines, pyrethroids, carbamates and organophosphates (OPs) (Hemingway and  
78 Ranson, 2000). Reduced target-site sensitivity and enhanced detoxification are the two  
79 most common mechanisms, which lead insects to insecticide resistance. Mutant target-  
80 site molecules, such as voltage-gated sodium channels ( $\text{Na}_v$ ),  $\gamma$ -aminobutyric acid  
81 (GABA) receptors and acetylcholinesterase enzyme have been associated with  
82 resistance to pyrethroids, cyclodienes and OP insecticides (Ffrench-Constant, Steichen  
83 and Shotkoski, 1994; Lima, *et al.*, 2011; Mazzarri and Georghiou, 1995). Three groups  
84 of detoxification enzymes are involved in metabolic resistance: esterases, glutathione S-  
85 transferases (GSTs) and monooxygenases (P450s). These enzymes are capable of rapid  
86 degradation of the insecticide due to either structural mutations or an overexpression  
87 pattern as a result of gene amplification or mutations in the regulatory region  
88 (Hemingway, 2000). In Brazil, the OP temephos has been used as a larvicide in *Ae.*  
89 *aegypti* control since the 1960s (Montella, *et al.*, 2007). As a consequence of such  
90 strong selection pressure, resistance to OPs has been reported throughout the country  
91 since early 1999 (Saúde, 1999). Since then, vector control criteria has changed in the  
92 country, however studies have shown that resistance to temephos is still present, even  
93 years after the interruption of use and replacement by the *Bacillus thuringiensis*  
94 *israelensis* biolarvicide (Bti) (Melo-Santos, *et al.*, 2010; Montella, *et al.*, 2007).  
95 Biological and biochemical surveys conducted from 2007 to 2010 have shown that  
96 different detoxification enzymes are present in resistant Brazilian populations of *Ae.*  
97 *aegypti*, mainly altered esterases and GSTs (Andrighetti, 2008; Lima, *et al.*, 2011;  
98 Melo-Santos, *et al.*, 2010; Montella, *et al.*, 2007). However, none of these studies  
99 reveals the molecular basis underlying this phenomenon in Brazil.

100 In the past decade, advances in genomic technologies have, coupled with  
101 traditional methods, such as bioassays and biochemical tests, allowed the investigation  
102 of resistance mechanisms at a molecular level (Oakeshott, *et al.*, 2003). Targeted

103 microarrays have enabled the screening of various genes involved in metabolic  
104 resistance to chemical insecticides in *Ae. aegypti*. Strode and colleagues (2008)  
105 developed a microchip (*detox-chip*) which contains 204 genes involved in metabolic  
106 resistance to chemical insecticides in the mosquito. This technique has been extensively  
107 used to study differential transcriptional profiles of detoxification genes in resistant  
108 populations of *Ae. aegypti* and has pointed to the difficulty in identifying individual  
109 genes involved in metabolic resistance (Marcombe, *et al.*, 2009; Poupardin, *et al.*, 2008;  
110 Saavedra-Rodriguez, *et al.*, 2008; Saavedra-Rodriguez, *et al.*, 2012; Strode, *et al.*,  
111 2012). Studies involving complex traits such as metabolic resistance have proven to be  
112 a laborious task due to the number of genomic regions likely controlling this trait. With  
113 the establishment of a broad collection of molecular markers in *Ae. aegypti*, the  
114 identification of new alleles associated with complex traits has been empowered by  
115 genetic maps and quantitative trait loci (QTL) studies (Antolin, *et al.*, 1996; Beerntsen,  
116 *et al.*, 1995; Black, 2002; Chambers, *et al.*, 2007; Fulton, *et al.*, 2001; Mori, Severson  
117 and Christensen, 1999; Mori, *et al.*, 2001; Munstermann, 1979; Saavedra-Rodriguez, *et*  
118 *al.*, 2008; Severson, 1994; Severson, *et al.*, 1997; Severson, *et al.*, 2002; Severson, *et*  
119 *al.*, 1995; Shin, Mori and Severson, 2012; Zhong, *et al.*, 2006). QTL mapping is a  
120 forward approach that enables the identification of genomic regions associated with the  
121 phenotype, without any initial knowledge of the resistance mechanism (Ranson, *et al.*,  
122 2004). Many complex traits have been dissected by QTL mapping, such as autogeny  
123 and body size in *Ae. albopictus* (Mori, *et al.*, 2008), susceptibility to *Plasmodium*  
124 *gallinaceum* and *Brugia malayi* in *Ae. aegypti* (Beerntsen, *et al.*, 1995; Severson, *et al.*,  
125 1994; Severson, *et al.*, 1995; Severson, Zaitlin and Kassner, 1999; Zhong, *et al.*, 2006),  
126 vector competence for dengue-2 virus in *Ae. aegypti* (Bosio, *et al.*, 2000) and  
127 refractoriness to *P. cynomolgi* in *An. gambiae* (Collins, *et al.*, 1997). QTL regions  
128 influencing resistance to insecticides have also been successfully studied in mosquitoes.  
129 By QTL mapping, two regions were found to be associated with permethrin and DDT  
130 resistance in *Anopheles gambiae* mosquitos (Ranson, *et al.*, 2000; Ranson, *et al.*, 2004).  
131 In *An. funestus*, QTL mapping revealed that a metabolic mechanism was associated  
132 with pyrethroid resistance, since no mutations were found in target-site genes (Wondji,  
133 *et al.*, 2007). A similar study associated two QTL of major effects, both present on  
134 chromosome III conferring permethrin resistance in *Ae. aegypti* mosquitoes (Saavedra-  
135 Rodriguez, *et al.*, 2008).

136           Herein, we propose to identify genes involved in resistance to temephos in a  
137 laboratory strain of *Ae. aegypti* highly resistant to this compound using microsatellite  
138 markers to map QTL regions associated to this process. We also report the genetic  
139 mapping of a new subset of microsatellite markers found in supercontigs containing  
140 esterase genes.

141

## 142 **MATERIALS AND METHODS**

143

### 144 **Mosquito strains and susceptibility tests:**

145           The present study was conducted with three *Ae. aegypti* strains: Recife-Resistant  
146 (RecR), Moyo-In-Dry (MoyoD) and Red-eye (Red). RecR individuals are highly  
147 resistant to the organophosphate temephos and are maintained under continuous  
148 selective pressure to this compound for 27 generations (Melo-Santos, *et al.*, 2010). The  
149 MoyoD strain, originated from Mombasa, Kenya, has been colonized in laboratory  
150 conditions since 1974 (Thathy, Severson and Christensen, 1994). The Red colony,  
151 originated from a laboratory colony from Liverpool, has been used extensively in  
152 mapping studies because of the presence of a visible marker on each chromosome  
153 (Antolin *et al.*, 1996). Both MoyoD and Red strains were investigated regarding their  
154 susceptibility to temephos. Approximately 1.200 L3/L4 individuals were submitted to  
155 multiple concentration bioassays in order to calculate the lethal concentrations to kill  
156 99% (LC<sub>99</sub>) of the population (WHO, 1981). The LC<sub>99</sub> concentration obtained in each  
157 colony was used to estimate the diagnosis-dose (DD) to phenotype susceptible and  
158 resistant larvae in further intercross families. The temephos DD used in F2 larvae was  
159 twice the LC<sub>99</sub> of the larval population (WHO, 1981).

160

### 161 **Intercross mapping families and phenotype analysis:**

162           Reciprocal crosses were created using temephos resistant RecR and temephos  
163 susceptible MoyoD and Red strains. Pupae from each strain were separated and set up  
164 as two independent groups (♂RecR x ♀MoyoD and ♂RecR x ♀Red), constituting  
165 several parental mapping families. The pairwise mating scheme consisted of a single  
166 ♂RecR pupa and either five ♀MoyoD or five ♀Red pupae, placed in a 500 ml covered  
167 plastic container. Adults from each parental cross were allowed to mate for 3 days, and  
168 then each male was frozen at -80 °C. Females were blood fed on anaesthetized mice and  
169 individually transferred to a 10 ml cylindrical vial with a strip of paper towel. After

170 oviposition, each female was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .  $F_1$  individuals from each reciprocal  
171 family were crossed, using the same protocol described above, to generate the  $F_2$   
172 progeny. Bioassays were carried out on  $F_2$  L3/L4 larvae, using twice the  $\text{LC}_{99}$  obtained  
173 from MoyoD and Red, prior to intercross procedure. This test was monitored for 24h in  
174 order to separate dead (susceptible) larvae from those living (resistant) individuals. Each  
175 phenotyped specimen was collected and kept in separated 1.5 ml tubes and frozen at  
176  $-80^{\circ}\text{C}$  for later DNA extraction.

177

### 178 **Microsatellite amplification:**

179 DNA from parental and  $F_2$  individuals was extracted using a rapid alkaline  
180 method (Rudbeck and Dissing, 1998). DNA from adults and larvae were suspended in a  
181 final volume of 1000  $\mu\text{l}$ /200  $\mu\text{l}$  (0.01 M NaOH and 0.018 M Tris, pH 8.0), respectively,  
182 and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Several different parental crosses were screened for polymorphic  
183 microsatellites loci. A total of 76 microsatellite markers were tested in the parental  
184 mosquitoes, covering  $\sim 6,5$  cM intervals across all three *Ae. aegypti* chromosomes. Of  
185 the 76 microsatellite markers used, 52 were previously described (Lovin, *et al.*, 2009),  
186 while 24 others were designed from supercontigs containing carboxylesterase genes  
187 (Table 1). Identification and development of the new markers followed the protocol  
188 described by Lovin *et al.* (2009). Microsatellite primers were assembled into multiplex  
189 groups and reactions were performed in a final volume of 25  $\mu\text{l}$  containing: 2 units of  
190 Taq DNA polymerase, 1X Taq buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 9.0, 0.1% Triton  
191 X), 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 5 pmoles of each primer and 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ . Reactions were  
192 carried out in a Mastercycler thermocycler (Eppendorf) under the following conditions:  
193 1 cycle of 5 minutes at  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 cycles of 1 minute at  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 minute at  $60^{\circ}\text{C}$ , 2  
194 minutes at  $72^{\circ}\text{C}$ , followed by a 10 minute final extension at  $72^{\circ}\text{C}$ . Amplification was  
195 confirmed by electrophoresis in 2% agarose gels stained with 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ethidium  
196 bromide and visualized under UV light. In order to identify polymorphic markers from  
197 each multiplex, PCR products were fractionated in 6% denaturing polyacrylamide gels  
198 using the *GenePrint*<sup>®</sup> STR System (Promega). All polymorphic markers identified  
199 among each parental mosquito were then fluorochrome-labeled (6-FAM<sup>®</sup>, HEX<sup>®</sup> or  
200 NED<sup>®</sup>) and subjected to fragment analysis. Briefly, labeled primers were assembled into  
201 multiplex groups and PCRs were performed using the same conditions as described  
202 above. PCR products were diluted in ddH<sub>2</sub>O, according to product intensity visualized in

203 2% agarose gels. One  $\mu$ l of the dilution was added to 9  $\mu$ l of a mixture of Rox 400HD<sup>®</sup>  
204 standard and HiDi Formamide<sup>®</sup> (Applied Biosystems). Samples were denatured at 95<sup>o</sup>  
205 C for 2 minutes and subjected to fragment analysis using an ABI 3730 Genetic  
206 Analyzer (Applied Biosystems). Results were analyzed with the GeneMapper<sup>®</sup> v4.0  
207 software. All phenotyped F<sub>2</sub> individuals were genotyped through fragment analysis  
208 following this protocol.

209

#### 210 **Linkage maps:**

211 Exact tests of Hardy-Weinberg (HW) equilibrium were performed with Arlequin  
212 v3.5 software for every microsatellite marker genotyped in the F<sub>2</sub> progenies (Excoffier  
213 and Lischer, 2010). Only those loci in agreement with HW equilibrium (1:2:1) were  
214 used in the linkage and QTL analysis. A multipoint linkage analysis was used to  
215 develop a linkage map for each intercross family with MAPMAKER v3.0 (Lander, *et*  
216 *al.*, 1987), with a LOD threshold of 3.0 for significance. Pairwise recombination  
217 distances were transformed into Kosambi centiMorgan units (Lander, *et al.*, 1987) and  
218 Fisher's exact test was used to identify association between loci and resistance  
219 phenotype.

220

#### 221 **QTL analysis:**

222 QTL mapping was estimated by interval mapping (IM) (Soller, 1979) using the  
223 software R/qtl (Broman, *et al.*, 2003). Single-QTL genome scan, using maximum  
224 likelihood via the expectation-maximization algorithm was used to identify genome-  
225 wide LOD significance threshold ( $\alpha = 0.05$ ) by a permutation test ( $n = 1000$ ) (Churchill  
226 and Doerge, 1994). R/qtl was also used to plot LOD scores.

227

#### 228 **Complementary sequencing and qRT-PCR**

229 The complete genome sequences for five candidate carboxylesterase genes  
230 (AAEL005112, AAEL003195, AAEL003187, AAEL003201 and AAEL003198) were  
231 obtained from the Vectorbase database (vectorbase.org) and sequencing primers were  
232 designed for each gene, using Primer3 v.4.0 (Rozen and Skaletsky, 2000). The  
233 sequencing strategy targeted all three exons from the esterase *CCEae3A* and two exons  
234 from esterases *CCEae1C*, *CCEae4C*, *CCEae5C* and *CCEae6C*, in both directions.  
235 Primers details are described in table 2. PCR amplification was performed in parental  
236 individuals and F<sub>2</sub> progenies. Reactions were conducted in a 50  $\mu$ l final volume,



237 containing 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each primer, 1 unit of  
238 Platinum Taq DNA polymerase<sup>®</sup> (Invitrogen) and 50 ng of DNA template.  
239 Thermocycler conditions were: denaturation at 94 °C for 1 minute, followed by 30  
240 cycles of 94 °C for 30 seconds, 55 °C for 30 seconds and 72 °C for 2-3 minutes  
241 (depending on amplicon size), followed by a final extension of 10 minutes at 72 °C.  
242 PCR products were confirmed on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide.  
243 PCR products were purified with QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and  
244 sequencing reactions were performed with the BigDye Terminator Cycle Sequencing  
245 Kit v3.1 (Applied Biosystems), according to the manufacturer's protocol. Samples were  
246 run on an ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 sequence analyzer (Applied Biosystems). Chromatograms  
247 were analyzed with Chromas Lite v2.01 (Technelysium Pty Ltd) and sequences edited  
248 with DNASTAR software package (Lasergene). DNA sequences were aligned using  
249 BioEdit v7.1.3 (Hall, 1999).

250 For the five carboxylesterases above, quantitative reverse transcription PCR  
251 (qRT-PCR) was also performed in five resistant and five susceptible individuals from  
252 F<sub>2</sub>. Primers were designed as described above and primer sequence and amplicon sizes  
253 are listed in table 3. RNA was obtained using the RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen),  
254 according to the manufacturer's protocol. 200 ng of total RNA from each sample served  
255 as template to cDNA synthesis using Cloned AMV Reverse-Transcriptase (Invitrogen),  
256 with oligo-dT<sub>20</sub> (Invitrogen). Reactions were performed with QuantiTect SYBR Green  
257 PCR Master Mix (Qiagen), 0.3 μM of each primer and 250 ng of cDNA. PCR  
258 efficiency was determined by amplifying a series of cDNA dilutions to acquire standard  
259 curves for each gene. The threshold cycle (C<sub>T</sub>) value obtained from each esterase gene  
260 was normalized to the 40S ribosomal protein S17 gene (AAEL009496), and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup>  
261 method was used to compare gene expression between resistant and susceptible  
262 individuals (Livak and Schmittgen, 2001). P-values between susceptible and resistant  
263 individuals were obtained using the non-parametric Wilcoxon two-group tests, with the  
264 null hypothesis assumption that ΔΔC<sub>T</sub> was equal to 0 (p-values <0.005 were considered  
265 significant) (Yuan et al., 2006).

266

267

268

269

270

Table 1: List of microsatellite primers organized by genetic locus, genome location, supercontig, marker name, repeat, primer sequences and expected amplicon size.

<b>Genetic Locus</b>	<b>Location</b>		<b>Supercontig</b>	<b>Marker</b>	<b>Repeat</b>	<b>Forward (5'-3)'</b>	<b>Reverse (5'-3)'</b>	<b>Size (bp)</b>
LF90	1	0.00	SC 1.148	148 AAT1	AAT/TTA	TCCAGTTGAATTGACAAATTGC	AAATTTGCTGGTTCGCCTTA	286
Tsf	1	10.2	SC 1.176	176 TG1	TG/AC	CGATCGTTGAAGGCATTTTT	GAGGAACGAAACGCCAATTA	166
AEG130	1	19.6	SC 1.12	12 ACG1	ACG/TGC	GTCACCCCAAGTAGCTTTGC	GAGGCTTTACTGCTGGTTCG	177
	1	19.6	SC 1.12	12 ATG1	ATG/TAC	TCTGCGCAACACTAAGCATC	AAAAAGCACACCGTTCTCGT	231
AeW	1	29.7	SC 1.71	71 AT1	AT/TA	GCACTGCTCAAAATCACCAC	CAACACGCTCCATCCAGTTA	191
	1	29.7	SC 1.71	71 CGT1	CGT/GCA	CACCCATTACTTGCCGTTCT	CTCCCCAAACTCTTTAGCC	387
LF159	1	34.3	SC 1.388	388 GT1	GT/CA	ATTCGGCCTACATGTGCTTC	ACAGGCCGTATTTGGTATGC	245
	1	34.3	SC 1.388	388 GT2	GT/CA	AGGCCATTCTTAGGGCATT	GGCAACGGCTGAGATAATTG	273
LF314	1	34.5	SC 1.123	123 CTG1	CTG/GAC	GTCCCCGTTTTCCGTTTTAT	AGGTTTTCGTGGTGTTCG	391
LAP	1	36.6	SC 1.192	192 CAG1	CAG/GTC	CTTCCACCGCATCGTTTAT	CGTGTCGGTGAAGAAAAAT	499
	1	36.6	SC 1.192	192 CAG2	CAG/GTC	AGTTTCGCCTTCTCTACCA	CGTAGGCAGAAGAGGTCCAG	486
	1	36.6	SC 1.192	192 CTT1	CTT/GAA	TTCCGGTATCTAGCGAAAGG	AAACGAGGGCTTAATCGTGA	400
LF284	1	38.0	SC 1.446	446 AAG1	AAG/TTC	TAATCGCAAATTGGGTGTCA	GAGCTTTGCATCATGAGGTG	285
	1	38.0	SC 1.446	446 CAC1	CAC/GTG	ATCAGTCCC GCCATCTACAC	CGGACGATCACGTCTCAGTA	427
	1	38.0	SC 1.446	446 TG1	TG/AC	AGCCTCCCAAATTACGACCT	TGGTGGTACTGCAATCCAGA	300
Dce1	1	42.2	SC 1.1	1 AAG1	AAG/TTC	GTCAAGATGCACCACACCAG	TGCACAAGTCGGTCATGATT	322
AG3	1	44.6	SC 1.73	73 AG1	AG/TC	CGCCAAAAC TGA AAC TGA A	AAGGGCGGTGATGACTTTCT	154
FerH	1	44.6	SC 1.252	252 AAG1	AAG/TTC	CTTCCAGATCGGACGTAA	ATCGGGAAAAGCGTTATTTT	225
AT1	2	29.4	SC 1.88	88 AT1	AT/TA	CGTCGACGTTATCTCCTTGTT	CCAACGCAAGATGCAAGATA	221
TY7	1	44.9	SC 1.88	88 CTA1	CTA/GAT	CGAAGTTCCCAACGTTAAA	AGCACGATAAGCATGGTGTG	383
	1	44.9	SC 1.88	88 CTC1	CTA/GAT	ATTTCCAACGACGAAACCTG	GAGAATTCGGGGAAAAGAC	308
slo	1	48.3	SC 1.96	96 TCT1	TCT/AGA	GGCTAGTTGCGGGATGATTA	TGTAAACTTGTGGGGCCTTC	411
AC2	1	49.1	SC 1.650	650 AC1	AC/TG	AATACAACGCGATCGACTCC	AACGATTAGCTGCTCCGAAA	171

AEGBS11	1	56.4	SC 1.68	68 ATT1	ATT/TAA	TGTGCACCAAGAAAAATCGT	ATCTTCCACGAACGAAATGC	276
	1	56.4	SC 1.68	68 GAC1	GAC/CTG	CGTGTCCGGTGGACTATTCT	AACTTTTCGGTGAACCATCG	386
AEG122	1	59.0	SC 1.438	438 A1	A/T	ACCGACATTGTCAAACGAAA	GTTTCGTGAGATCCCCTTGAA	102
RT6	1	65.5	SC 1.440	440 TGTA1	TGTA/ACAT	GGTCGTCTGGGGTGAAATAA	GCGCATTTAAACGTGACAAG	294
LF115	2	7.3	SC 1.328	328 CTT1	CTT/GAA	ATCCGCTGGATTTACAATGG	CTGTCCAAGTGCGAACGTAA	229
AG5	2	23.7	SC 1.210	210 AG1	AG/TC	TGATCTTGAGAAGGCATCCA	CGTTATCCTTTCATCACTTGTTTG	162
B07	2	35.8	SC 1.462	462 GA1	GA/CT	CAAACAACGAACTGCTCACG	GAATAAGTCACACGCGTCCA	343
CT2	2	36.7	SC 1.109	109 CT1	CT/GA	ACTGAACGCCAACCAAGC	AACACCATTCTTCAGCAGAT	355
LF138	2	47.9	SC 1.25	25 AAG1	AAG/TTC	CTTGCCACACGATGCTAAAA	TGAATTCAAACCCATACGTGA	214
AG7	2	48.3	SC 1.48	48 AG1	AG/TC	CGTGCGAGTGAATGAGAGAC	CATCCTCTCATCAGCTTCTAATAAA	142
BA67	2	70.2	SC 1.1132	1132 CT1	CT/GA	TGACGCGTTTGACGTAGTTT	TCCGCAATTACGCTAACAAA	171
	3	0.0	SC 1.301	301 ACG1	ACG/TGC	TTTCCGCGATGGAGAAATAC	CAACCGGAAGACAGAAAAGG	287
LF347	3	0.0	SC 1.301	301 CT1	CT/GA	CTGAACGCGCCATAAAATTCT	AGGAGTTCGTCCAAGACAA	267
B19	3	13.6	SC 1.30	30 CAT1	CAT/GTA	ATTGGCGTGAGAACATTTTG	GAGGAGTGAGCAGATAGGAGTG	177
AEG128	3	14.6	SC 1.288	288 CTA1	CTA/GAT	AGGGAATGACGTCCTCACAG	TTGGTTCTATTGGGCTTTGC	321
LF103	3	23.5	SC 1.766	766 ATT1	ATT/TAA	TGCAAAGTCGAAGCAACAAG	GAATGCCATTTGCCTTCA	301
LF168	3	32.1	SC 1.69	69 TGA1	TGA/ACT	CACCTCCGCTAGAGAACTGG	CGAATAGGGCAATCCTGAAA	214
AC4	3	43.7	SC 1.86	86 AC1	AC/TG	GCGAATCGGTTCCCATAGTA	ACCCATCGAATTTCCATTCA	257
Rpl31	3	50.0	SC 1.217	217 CTT1	CTT/GAA	TGGACTTCCCCAGATGCAATGA	CAACACGGAAGCAAAGTTGA	257
Apy1	3	57.1	SC 1.201	201 AAT1	AAT/TTA	GATCGTTCGACAGCATCTGA	GGAAAGCTCATCGCCTACTG	336
	3	64.2	SC 1.470	470 AG1	AG/TC	CGGGAGGACACACTGACTTT	GTGGCAAGTAACCCCAAAGA	252
PABP	3	64.2	SC 1.470	470 CT2	CT/GA	GTTGGGAGTGTCCGCATAGT	GCTCCGGTCATCTTGAATGT	315

272

273

<i>CCEae1o</i>	unknown	SC 1.115	115 ATG1	ATG/TAC	TGGAAGTCACGTGTTGGGTA	TGTGAAATGCGTAGCCTCAG	378
	unknown	SC 1.115	115 GTC1	ATG/TAC	ACCTCGCGAGTTTAGCAGAA	GGTCCTACGCGTTTGGTTTA	252
<i>CCEae1A_a, CCEae1A_b, CCEae3A,</i>	unknown	SC 1.142	142 AG1	AG/TC	TGAGCTTCCCCGTATTTTAC	AACTAGCGGATGGCTCTCAA	252
<i>CCEae4A, CCEae5A, CCEae6A</i>	unknown	SC 1.142	142 AG2	AG/TC	AACGAGATCCGCAAAGAGAA	TGATTGTTGAAGCGTCTTGC	449
<i>CCEae2o</i>	unknown	SC 1.258	258 CTT1	CTT/GAA	TTCAACTCATGGCGGATTTT	CACTTTCCTTGCCAAACGAT	227
<i>CCEae1B, CCEae2B, CCEae3B,</i>	unknown	SC 1.55	55 TC1	TC/AG	TTTGCTCGCTCATCACAAAC	TCATGCGCAAGACAAGTAGG	359
<i>CCEae4B, CCEae5B, CCEae6B</i>	unknown	SC 1.55	55 TC1	TC/AG	CCTTGCTCAAAACGTCCAAT	GGCTTGGCACTTTTTCGTTTA	168
<i>CCEae1C, CCEae2C, CCEae3C,</i>	unknown	SC 1.81	81 CGT1	CGT/GCA	TGTTACCGACGAGTCTGACG	ATGCATTCCGCTCTCTGAGT	454
<i>CCEae4C, CCEae5C, CCEae6C</i>	unknown	SC 1.81	81 AGA1	AGA/TCT	CCAGGGTTGAAGTTCGAAAA	CAGAAAAATCCAACGGCAAAT	469
<i>CCEae1D, CCEae2D</i>	unknown	SC 1.474	474 CTA1	CTA/GAT	TGACCACGCATAGCAGAGAG	TGCAGTTGGCTATTGGATCA	260
<i>CCEunk1o, CCEunk5o, CCEunk6o</i>	unknown	SC 1.1	1 GTT1	GTT/CAA	ATAGGTCGGCCTGATTGTTG	AAGGATCCAACCTGGATGTGCG	349
	unknown	SC 1.1	1 GT1	GT/CA	CACTAGCTCTTCGGGACCAC	CCGTGCGCATACCAAGTTTTT	214
<i>CCEbe1o</i>	unknown	SC 1.754	754 TCT1	TCT/AGA	CTGATGTCGCCATAGGGATT	GGGCGTTAATGTCAAGAGGA	216
<i>CCEjhe2o</i>	unknown	SC 1.114	114 AC1	AC/TG	TATGAGTGC GGTTT GACTCG	ATCACCCCTTTGGAAAATCC	274
	unknown	SC 1.114	114 AC2	AG/TC	CAAAATCGAACCCATCAACC	CAGCATTTGTCCACTGTGCT	388
	unknown	SC 1.114	114 AG1	AC/TG	TGACGTCCACAGCTCAACAT	GAAGGTGCGATGCAACAGGAT	161
	unknown	SC 1.114	114 AG2	AG/TC	GGTCCTCAATTGCCTTTTCA	ACCGGTCACGTTAGTGTGGT	390
<i>CCEjhe1F, CCEjhe2F, CCEjhe3F,</i> <i>CCEjhe4F</i>	unknown	SC 1.145	145 TAG1	TAG/ATC	ACACCGCACCCCTCTAGTTA	AACTATCGTGCCACTGCAAA	294
<i>CCEunk2o</i>	unknown	SC 1.128	128 ATAG1	ATAG/TATC	CGTCGCATCCCTTATCAAAT	TGCCACCTGTCACTAAGCTG	180
	unknown	SC 1.128	128 AAG1	AAG/TTC	TGTTTCAATCACCGCATCAT	GTCCCCGTGTTTGA AAAAAGA	307
<i>CCEunk3o</i>	unknown	SC 1.331	331 CCGA1	CCGA/GGCT	AGATGCGCCTACATTTGGTC	AAATCGAAACTCGCATCGTT	228
	unknown	SC 1.331	331 GGA1	GGA/CCT	CTGAAAGTGGAGCCCTTGAC	TTCGTTACAATCCTCGCACA	333
<i>CCEunk4o</i>	unknown	SC 1.35	35 TGA1	TGA/ACT	CATTTTGGAGCTGTGGCTTT	TCAACATCCAATCGGCATAA	272

<i>CCEglt1G, CCEglt2G, CCEglt1H, CCEglt2H, CCEglt3H, CCEglt4H</i>	unknown	SC 1.18	18 TTC1	TTC/AAG	CGATGCAAGTATCCGAGACA	TACTGCGCTGACTTTTGTTC	218
	unknown	SC 1.18	18 AAG1	AAG/TTC	CATGGTGCACAAGGACATTC	AGGCTCCCGAAAATTTGTTT	461
	unknown	SC 1.18	18 GAT1	GAT/CTA	TGAAGAGCGAGAGGTGTGAA	CACGCTAATAGTGGCATGGA	375
<i>CCEglt1J</i>	unknown	SC 1.89	89 TGA1	TGA/ACT	AACCAGCGAGCAAGATGAGT	AAGTGGCATTGGAATAATCG	329
	unknown	SC 1.89	89 TGA2	TGA/ACT	CCTGTCTCAGCAACAAGCAA	TCTGCTTCCCGGTATGATTC	268
	unknown	SC 1.89	89 TGA3	TGA/ACT	TTTTTCGTCGGAATCCTCAAC	CCTTTAACGCGGTCAACAAT	308

275

Table 2: Sequencing primers for amplification of carboxylesterase genes in *Aedes aegypti*.

Supercontig	ID Vectorbase	Carboxylesterase	Forward (5'-3')		Reverse (5'-3')		Size (bp)
1.142	AAEL005112	<i>CCEae3A</i>	142EX1_FW: CTGCACAGAGGCAACAACAT		142EX1_REV: CTGCAAAATGTGGTGTTCAGG		945
			142EX2_FW: TCCTTCCATCCATCCTAGCTT		142EX2_REV: TTCGCCGAAATATAACCATT		789
			142EX3_FW: GCTTTTCATTTGAAGGTAAATCG		142EX3_REV: CAAAGGGCATTTTTATGATTGA		521
AAEL003195	<i>CCEae1C</i>	3195_FW1: TAAAACCCGCTGCGTTTAAAG		3195_REV1: CGAAGGGTTTAAATCCACGA		1176	
		3195_FW2: CAATCTGGTACCGCTTTGGT		3195_REV2: GCTCATGCTATGCCAAGCTA		1134	
AAEL003187	<i>CCEae4C</i>	3187_FW1: TGTGACATCCAGCTGTGGTT		3187_REV1: TTATGCTGCGCTGTTAATCG		1176	
		3187_FW2: GCTTTCGGTGGTGATCCTAA		3187_REV2: TGCAAATGTCATCCACGGTA		1196	
1.81	AAEL003201	<i>CCEae5C</i>	3201_FW1: GGCCTGTTTTGCAGCTACTT		3201_REV1: GGACGGTCTTGCCAATAGAA		1061
			3201_FW2: ATAACCCACGGGAAATGTCA		3201_REV2: GGGCAGTCATCGAGAAAGAG		1058
AAEL003198	<i>CCEae6C</i>	3198_FW1: TCGCATGCTTAGTGTTACCG		3198_REV1: CAGTAGGCGCAAAATCCAAT		958	
		3198_FW2: AAACCTGGGGCCTCAAAGATT		3198_REV2: TAATCGAAATGCCATCGTCA		1122	

Table 3: qRT-PCR primers for carboxylesterase quantification in *Aedes aegypti*.

Supercontig	ID Vectorbase	Carboxylesterase	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Size (bp)
1.142	AAEL005112	<i>CCEae3A</i>	q5112_FW: CATTCAAAACCTCTCGGTTGA	q5112_REV: GAAGCAATCGGTCTTCTGGA	89
1.81	AAEL003195	<i>CCEae1C</i>	q3195_FW: TCTTCGTCCCTCACTTTTGG	q3193_REV: AGAGCGATCCTGCCAGTAGA	95
	AAEL003196	<i>CCEae2C</i>	q3196_FW: TCAAAGAACCATCACCGACA	q3196_REV: GGCTCTGGAGAGTTGACTGG	90
	AAEL003181	<i>CCEae3C</i>	q3181_FW: AATCCAGCAAACCTTGTTTCG	q3181_REV: GTAGGGCCGTATCGGAATTT	94
	AAEL003187	<i>CCEae4C</i>	q3187_FW: GGATGGACTGGAGTGAAGGA	q3187_REV: AGTCTTCGTCCCCGGAGTAT	91
	AAEL003201	<i>CCEae5C</i>	q3201_FW: GCGATGGTTATGACGGAGAT	q3201_REV: ACACCATGACTGGTCGTGAA	84
	AAEL003198	<i>CCEae6C</i>	q3198_FW: ATTACGGGAATATCCGCACA	q3198_REV: AATAATCCGCACGATTCGAC	86

277 **RESULTS**

278

279 **Bioassay tests**

280 From the colonies used in this study, only RecR has already been characterized  
281 as highly resistant to temephos (Melo-Santos, *et al.*, 2010), and is under continuing  
282 selective pressure to maintain resistance. The F<sub>26</sub> from RecR presented a resistance  
283 ratio (RR) of 200. Therefore, prior to establishing both intercross families, 1200 larvae  
284 from MoyoD and Red strains were submitted to a wide range of temephos doses, in  
285 order to estimate the 99% lethal concentration (LC<sub>99</sub>). This dose was then used to  
286 discriminate susceptible and resistant individuals in a bioassay carried out in the F<sub>2</sub> of  
287 each reciprocal crosses, using twice the LC<sub>99</sub>, following protocol established by WHO  
288 (1981). Temephos concentrations of 0.068 mg/L and 0.078 mg/L were used in the RecR  
289 X MoyoD F<sub>2</sub> and RecR X Red F<sub>2</sub> bioassay, respectively. 50% and 99% lethal  
290 concentrations of temephos estimated for MoyoD and Red are presented in table 4.  
291 After a 24 hr bioassay, 87 individuals were classified as susceptible and 95 as resistant  
292 in the F<sub>2</sub> RecR X MoyoD. In the RecR x Red F<sub>2</sub> family 95 individuals were found  
293 susceptible and 95 were resistant. All individuals were separately placed in 1.5 ml  
294 tubes, stored at -80° C and DNA extractions were performed the following day.

295

296 **Table 4:** Lethal doses of organophosphate temephos to kill 50% (LC<sub>50</sub>) and 90% (LC<sub>90</sub>) for Moyo-in-Dry  
297 (MoyoD) and Red-Eye (Red) individuals, according to multiple dose bioassays. Total number of larvae  
298 exposed in assays is shown.

Strain	LC <sub>50</sub> (mg/L) (95% confidence limits)	LC <sub>99</sub> (mg/L) (95% confidence limits)	No. larvae
MoyoD	0.02069 (0.01978-0.02154)	0.03417 (0.02673-0.03027)	1200
Red	0.02184 (0.02101-0.02275)	0.03934 (0.02988-0.03311)	1200

299

300

301 **Microsatellite genotyping and Linkage analysis**

302 From the preliminary screening of 76 microsatellite (SSR) markers,  
303 compromising 51 loci of the *Ae. aegypti* genome, 26 markers were polymorphic in two  
304 parental reciprocal crosses. All markers screened by denaturing PAGE gel were later  
305 confirmed by fluorescent fragment analysis. These markers were then amplified in F<sub>2</sub>  
306 individuals, genotypes were scored and each locus tested for HW deviations. Nine and



307 eight microsatellite loci were within HW expectations in the RecR x MoyoD and RecR  
 308 x Red progeny, respectively. Five new markers used in the RecR x MoyoD, and 3 in the  
 309 RecR x Red, were mapped for the first time in the *Ae. aegypti* genome. The remaining  
 310 loci were previously mapped by Severson *et al.* (1997).

311 Data from F<sub>2</sub> progeny of each intercross family was treated separately due to  
 312 possible differences in the genetic background from MoyoD and Red strains. We used  
 313 the  $\chi^2$  goodness-of-fit test with the null hypothesis being that resistance or susceptibility  
 314 to temephos is equal in every genotype scored. Five loci were significantly associated  
 315 with resistance (P <0.001) in RecR X MoyoD, while one (P < 0.05) and four (P <  
 316 0.001) other loci were found in RecR X Red (Table 5).

317

318 **Table 5:** Segregation and  $\chi^2$  test results from markers genotyped in F<sub>2</sub> intercrossed families RecR X  
 319 MoyoD and RecR X Red. Markers significantly associated to temephos resistance are displayed with an  
 320 asterisk(s). The segregation ratios for all markers were 1:2:1.

RecR x MoyoD		RecR x Red	
Marker	$\chi^2$	Marker	$\chi^2$
81CGT1	5.32	176TG1	6.7*
388GT1	2.57	68GAC1	5.29
192CAG2	2.49	81AGA1	59.34**
331GGA1	2.21	148TCT1	71.48**
145TAG1	90.22**	88AT1	75.3**
88AT1	84.93**	142AG1	94.53**
142AG1	145.42**	86AC1	0.34
128ATAG1	82.89**	201AAT1	1.54
1132CT1	21.68**		

321

322

RecR = Recife Resistente; MoyoD = Moyo-in-Dry; Red = Red-Eye.  
 \*P < 0,05; \*\*P < 0,01.

323

324

325

326

327

328

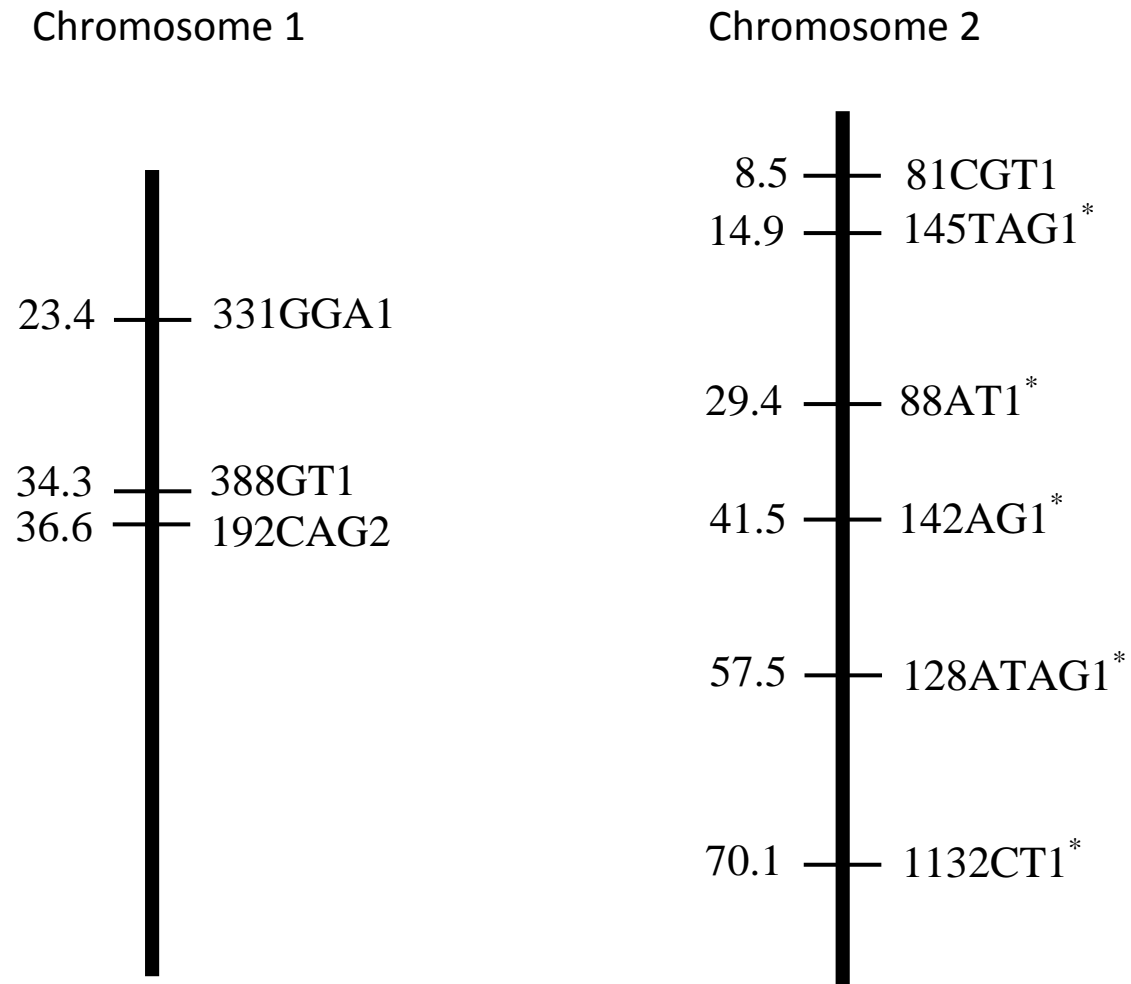
329

330

Two linkage groups were found in RecR x MoyoD, corresponding to  
 chromosomes 1 and 2. Two new microsatellite markers were mapped on chromosome 1  
 and three on chromosome 2. Theses markers are located in supercontigs encompassing  
 esterase genes. Linkage position of each marker is consistent with previous mapping  
 data(Severson, *et al.*, 1997). The linkage map for this family is shown in figure 1.

331  
332  
333

**Figure 1:** Genetic linkage map obtained from the F<sub>2</sub> intercross ♂Recife-Resistant x ♀Moyo-in-Dry (n=182). Linkage positions of novel resistance markers are shown with asterisks (\*).



334

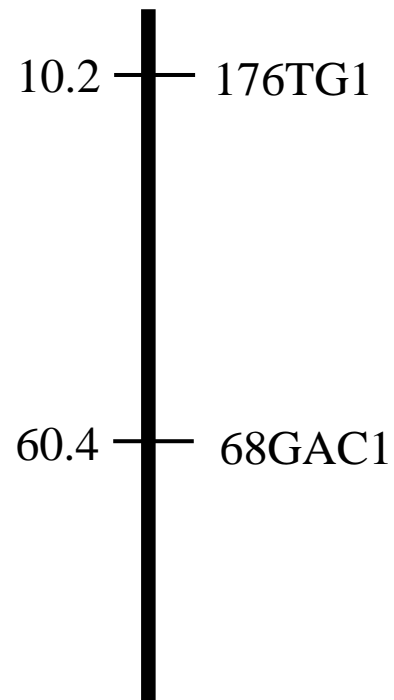
335 RecR X Red displayed three linkage groups, distributed along the three chromosomes (Figure 2). Two of these markers, which are  
336 located on chromosome 2, are new microsatellite markers. Linkage position of most markers is in agreement with previous studies.

337

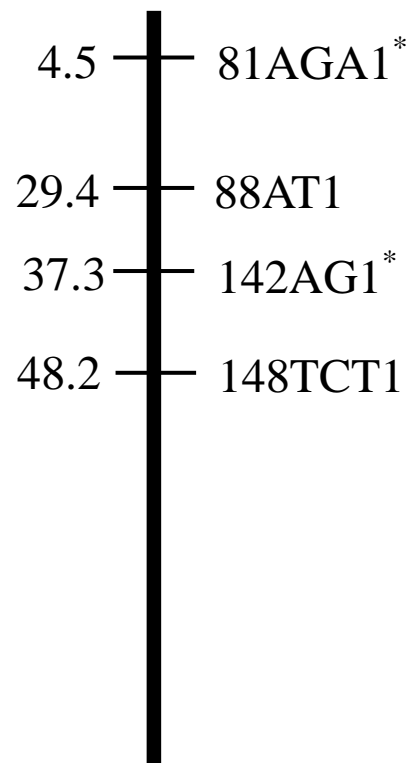
338 **Figure 2:** Genetic linkage map obtained from the F2 intercross ♂Recife-Resistant x ♀Red-Eye (n=190). Linkage positions of novel resistance markers are shown with  
339 asterisks (\*).

340

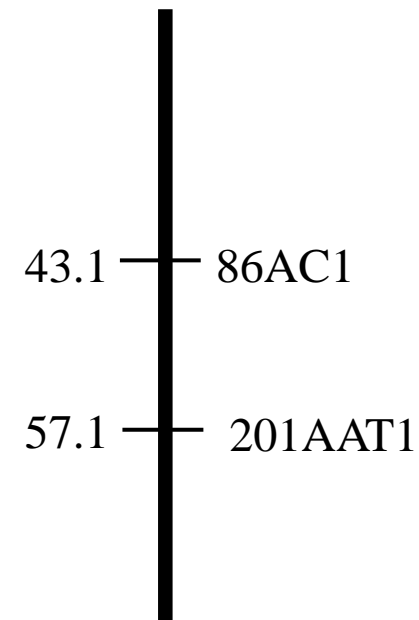
### Chromosome 1



### Chromosome 2



### Chromosome 3



341

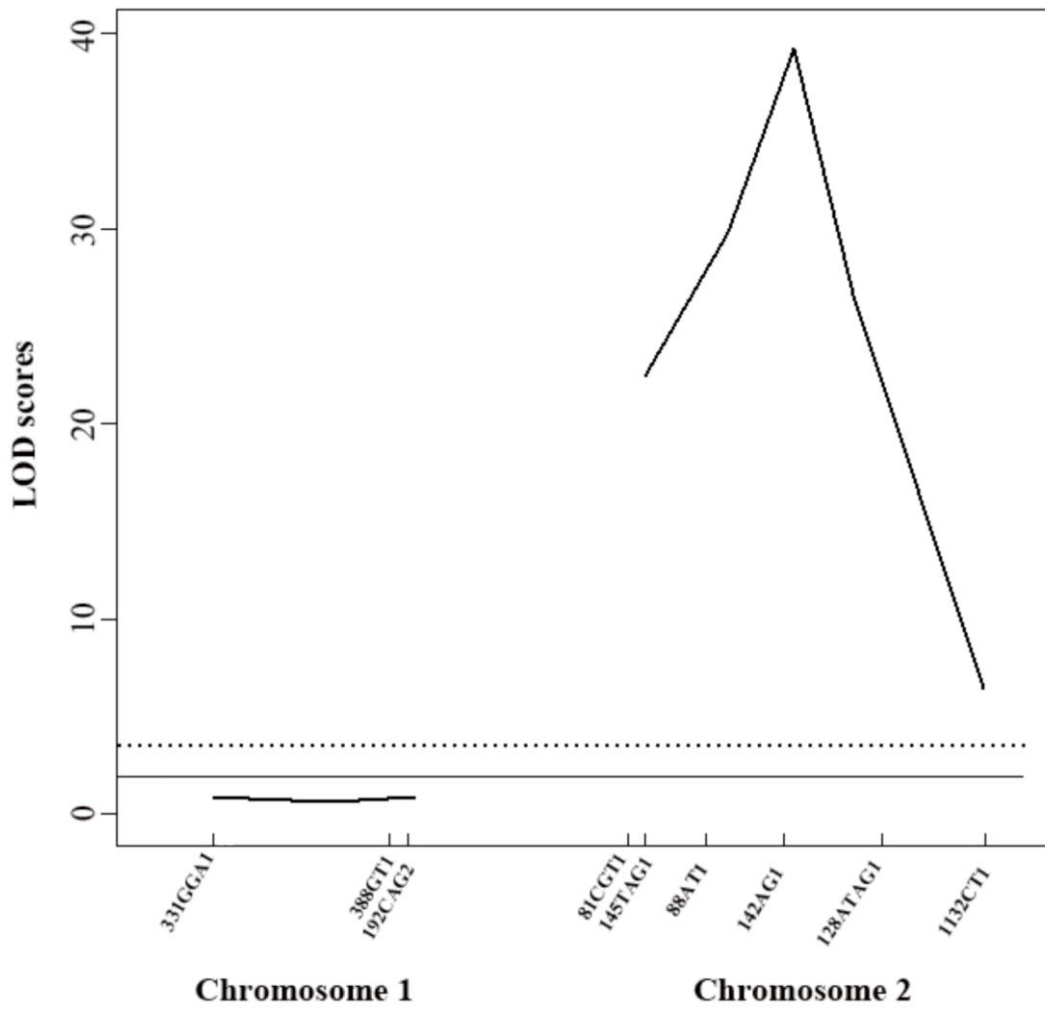
342 **QTL mapping**

343       Using the interval mapping (IM) method, with expectation–maximization (EM)  
344 algorithm, we independently scanned for QTL in both progenies. A QTL, present on  
345 chromosome 2 was detected in both intercrosses. On RecR x Moyo, this QTL was  
346 flanked by markers 88 AT1 and 142 AG1, which were also associated with temephos  
347 resistance by  $\chi^2$  goodness-of-fit tests. This QTL, inferred at the 142 AG1 position, had a  
348 LOD value that exceeded the 95% experimentwise threshold (LOD = 2.26) over 17  
349 times (LOD = 39.6,  $P < 0.001$ ) (Figure 3). As for RecR x Red, the same QTL was  
350 found, with a slight difference in LOD scores. While the 95% threshold found was 2.12,  
351 the LOD score obtained at the same marker was 25.2 ( $P < 0.001$ ). Although the LOD  
352 score obtained was slightly higher than the threshold on chromosome 1 (at marker 176  
353 TG1), no significant difference was found (Figure 4). The IM method projected that the  
354 QTL found in both families accounted for 99.6% of the phenotypic variance for  
355 temephos resistance. Most of the genetic variance was explained by dominant effects  
356 (Table 6).

357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387

388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397

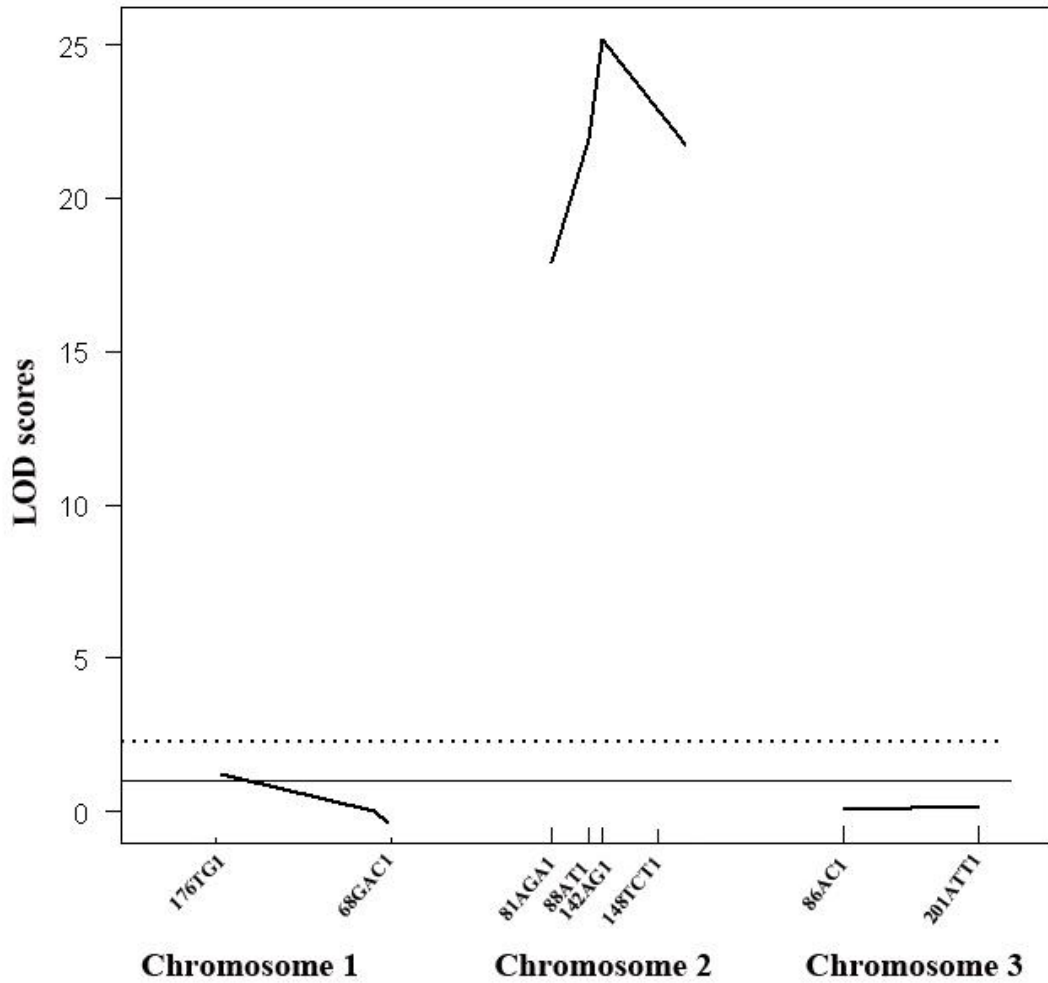
**Figure 3:** Plot of LOD values associated with temephos resistance on chromosome 1 and 2 in intercross Recife-Resistant x Moyo-in-Dry. LOD calculated in the F<sub>2</sub> by interval mapping, using expectation-maximization (EM) algorithm, is shown as solid line. 95% and 99.9% LOD thresholds are represented as solid and dotted straight lines, respectively.



398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407

408  
409  
410  
411  
412  
413  
414

**Figure 4:** Plot of LOD values associated with temephos resistance on chromosome 1, 2 and 3 in intercross Recife-Resistente x Red-Eye. LOD calculated in the F<sub>2</sub> by interval mapping, using expectation-maximization (EM) algorithm, is shown as solid line. 95% and 99.9% LOD thresholds are represented as solid and dotted straight lines, respectively.



415  
416  
417  
418  
419  
420

421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450

**Table 6:** QTL affecting resistance to temephos in *Aedes aegypti*.

<b>Family</b>	<b>Nearest marker</b>	<b>Genetic Distance (cM)</b>	<b>LOD</b>	<b>Effect</b>	<b>Log-Likelihood</b>	<b>% variance explained</b>
RecR x MoyoD	142AG1	41.5	39.3	A: 0.0	43.61	70.2
				D: 0.50	231.83	99.6
				R: -0.2882	7.85	19.6
RecR x Red	142AG1	37.3	25.2	A: 0.0	23.26	51.3
				D: 0.5005	205.94	99.6
				R: -0.2837	6.02	17.2

451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471

### **Sequencing candidate carboxylesterases**

Seven carboxylesterases, placed in two different supercontigs, were sequenced from temephos susceptible and resistant individuals. All esterases displayed synonymous mutations, however, only *CCEae4C*, *CCEae1C* and *CCEae6C* presented non-synonymous SNPs (Table 7). Various positions revealed mutations leading to an amino acid shift, however, none of these was associated with a certain phenotype. According to these results, no mutation could be exclusively linked to the resistance status and, therefore, further analysis focused on the investigation of expression of the carboxylesterases.



472

473 Table 7: Sequencing results from carboxylesterases *CCEae4C*, *CCEae1C* and *CCEae6C* obtained from F<sub>0</sub> and F<sub>2</sub> from the reciprocal cross Recife-Resistant x Red-Eye

<i>CCEae4C</i> (AAEL003187*)												
Pos**	Lvp	F <sub>0</sub>		F <sub>2</sub>								
		♂ <sub>R</sub>	♀ <sub>S</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
940	AGT (Ser)	Ser	Ser/Thr	Ser	Ser/Thr	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
967	TCC (Ser)	Ser	Ser/Phe	Ser	Phe	Phe	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
981	CCG (Pro)	Pro	Pro/Ser	Pro	Pro/Ser	Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
1112	CGG (Arg)	Arg	Arg/Pro	Arg	Arg/Pro	Arg/Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
1158	AGT (Ser)	Ser	Ser/Gly	Ser	Ser	Ser/Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
1168	TCG (Ser)	Ser	Ser/Leu	Ser	Ser	Ser/Leu	Ser/Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
1243	TCC (Ser)	Cys	Ser/Tyr	Ser/Cys	Tyr/Cys	Ser	Cys	Ser	Cys	Ser/Cys	Ser/Cys	Cys
1366	CTC (Leu)	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu

474

<i>CCEae1C</i> (AAEL003195*)												
Pos**	Lvp	F <sub>0</sub>		F <sub>2</sub>								
		♂ <sub>R</sub>	♀ <sub>S</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
1260	CAA (Gln)	Gln	Gln/Lys	Gln/Lys	Gln/Lys	Gln	Gln/Lys	Gln/Lys	Gln/Lys	Gln/Lys	Gln/Lys	Gln

475

<i>CCEae6C</i> (AAEL003198*)												
Pos**	Lvp	F <sub>0</sub>		F <sub>2</sub>								
		♂ <sub>R</sub>	♀ <sub>S</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
322	GAA (Glu)	Glu/Lys	Glu	Glu/Lys	Glu	Glu/Lys	Glu	Glu/Lys	Glu/Lys	Glu/Lys	Glu/Lys	Glu/Lys
349	GTC (Val)	Val/Phe	Val	Val/Phe	Val	Val/Phe	Val	Val/Phe	Val/Phe	Val/Phe	Val/Phe	Val/Phe
368	GGT (Gly)	Gly/Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly/Ala	Gly/Ala	Gly/Ala	Gly/Ala	Gly/Ala
436	ATT (Ile)	Ile/Val	Ile	Ile/Val	Ile	Ile/Val	Ile	Ile/Val	Ile/Val	Ile/Val	Ile/Val	Ile/Val
753	TTC (Phe)	Ile	Phe	Ile	Phe	Ile	Phe	Ile	Ile	Ile	Ile	Ile

476 Pos: position; Lvp: Liverpool strain; ♂<sub>R</sub>: Male resistant; ♀<sub>S</sub>: Female susceptible; S1-S4: susceptible individuals; R1-R4: resistant individuals.

477 \*Vectorbase ID

478 \*\*Position in ORF

479

480

481

482

483

484 **Gene expression of esterase genes**

485

486

487

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

Quantitative Real-Time reverse-transcription PCR (qRT-PCR) analyses showed that levels of esterase *CCEae3A* expression were increased in resistant F2 individuals from RecR x MoyoD, when compared to susceptible individuals. As for the RecR x Red intercross, three esterases displayed an elevated gene expression (*CCEae1*, *CCEae5* and *CCEae6*) in resistant individuals from the F<sub>2</sub>. Non-parametric Wilcoxon two-group test indicated that the increment observed in *CCEae5* and *CCEae6* ( $p = 0.0013$  and  $p = 0.019$ , respectively) was significant, although none of the genes exceeded the 2-fold change in expression (Table 8, Figure 5).

**Table 8:** Quantitative PCR analysis of selected carboxylesterase genes. Relative fold-change in transcript expression compared between resistant and susceptible individuals from both intercross families.

	Supercontig	Vectorbase entry	Carboxylesterase	Transcript fold-change
RecR x MoyoD	1.142	AAEL005112	<i>CCEae3A</i>	1.2 (sd = 0.4)
		AAEL003195	<i>CCEae1C</i>	1.7 (sd = 0.3)
		AAEL003196	<i>CCEae2C</i>	-0.7 (sd = 0.3)
RecR x Red	1.81	AAEL003181	<i>CCEae3C</i>	-0.2 (sd = 0.5)
		AAEL003187	<i>CCEae4C</i>	-0.5 (sd = 0.2)
		AAEL003201	<i>CCEae5C</i>	1.2 (sd = 0.2)
		AAEL003198	<i>CCEae6C</i>	1.1 (sd = 0.2)

499

500

501

502

503

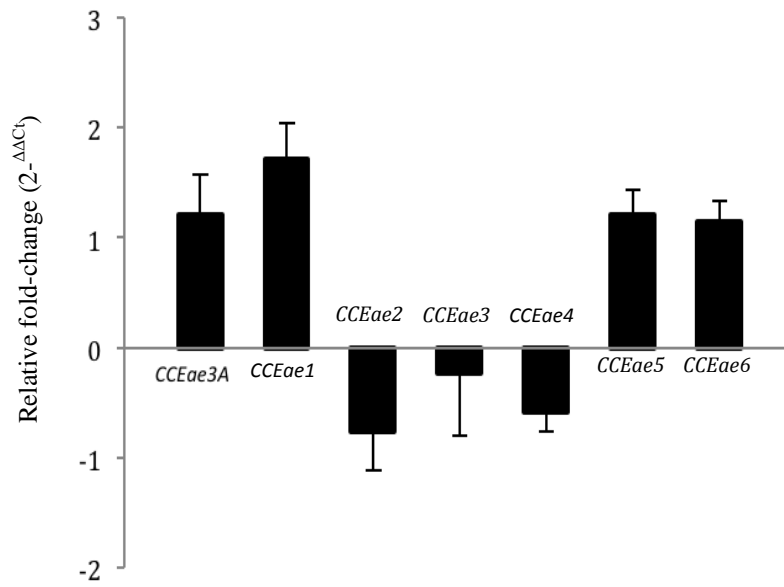
504

505

506

507

508



**Figure 5:** Results of expression analyses for the candidate carboxylesterase genes. *CCEae3A* expression measured in RecR x MoyD family. *CCEae1*, *CCEae2*, *CCEae3*, *CCEae4*, *CCEae5* and *CCEae6* were quantified in the RecR x Red intercross.

509  
 510  
 511  
 512  
 513  
 514  
 515  
 516  
 517  
 518  
 519  
 520  
 521  
 522  
 523  
 524  
 525  
 526  
 527  
 528  
 529  
 530  
 531  
 532  
 533  
 534

535 **DISCUSSION**

536

537 In the last decade, the discovery of several molecular markers and the  
538 development of refined statistical methods of analysis have enabled the elucidation of  
539 the molecular basis underlying mechanisms of resistance to chemical insecticides. In  
540 order to investigate the genetic basis of temephos resistance in *Aedes aegypti*, we  
541 established reciprocal crosses between a resistant strain, RecR, and two susceptible  
542 colonies, MoyoD and Red, to construct a linkage map and detect QTL among 372 F2  
543 progeny. All markers were placed and ordered in linkage groups as in previous linkage  
544 maps obtained for *Ae. aegypti* (Severson *et al.*, 1995; 2002; Black and Severson, 2004;  
545 Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2008, Mori *et al.*, 1999). In the intercross RecR x MoyoD,  
546 five new markers were mapped to the *Ae. aegypti* chromosomes for the first time:  
547 331GGA1 (23.4 cM) on chromosome 1; 81CGT1 (8.5 cM), 145TAG1 (14.0 cM),  
548 142AG1 (41.5 cM) and 128 ATAG1 (57.5 cM) on chromosome 2. In reciprocal cross  
549 RecR x Red, two new markers were mapped to chromosome 2: 81AGA1 (4.5 cM) and  
550 142AG1 (37.3 cM). The colinear loci order obtained in both intercross progenies from  
551 the present study suggests that gene order is conserved among *Ae. aegypti* strains from  
552 different countries, such as Germany, Trinidad and Tobago and Mexico (Severson *et*  
553 *al.*, 1995; Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2008; Chambers *et al.*, 2007).

554 Interval mapping revealed a QTL affecting resistance to temephos consistently  
555 present on chromosome 2 from both reciprocal crosses. This QTL was closely  
556 associated with markers 88 AT1 and 128 ATAG1 in the RecR x MoyoD intercross, and  
557 with 88 AT1 and 148 TCT1 in the RecR x Red. Noteworthy, both progenies displayed  
558 LOD scores of a large effect QTL (LOD = 39.6 and 25.2). The consistent finding of the  
559 same large effect QTL, controlling 99.6% of the phenotypic variance in both progenies,  
560 demonstrates that this chromosome region is strongly controlling temephos resistance.  
561 Previous studies with *Ae. aegypti* have demonstrated the association between QTL  
562 present on chromosome 2 and susceptibility to different pathogens, such as *Brugia*  
563 *malayi*, *Plasmodium gallinaceum* and to the yellow fever virus (Zhong *et al.*, 2006;  
564 Severson *et al.*, 1994; 1995; Tabachnick *et al.*, 1995; Beerstein *et al.*, 1995). The  
565 detection of quantitative trait loci affecting chemical insecticide resistance has been  
566 widely addressed in mosquitoes of the genus *Anopheles*. The molecular basis of DDT  
567 resistance in *An. gambiae* was characterized by QTL mapping of two regions, present  
568 on chromosome 2 and 3. Interestingly, no resistance gene was found flanking or within

569 these QTL regions (Ranson *et al.*, 1997; 2000). Similar results were found by mapping  
570 QTL controlling permethrin resistance in the same mosquito. The first QTL found on  
571 chromosome 2 is colocalized with the Na<sub>v</sub> channel gene, while one of the two QTL  
572 found on chromosome 3 is flanked by a large cluster of cytochrome P450 genes  
573 (Ranson *et al.*, 2004). Wondji *et al.* (2007) revealed the molecular mechanism  
574 underlying the PYR permethrin resistance in *An. funestus*. These authors mapped a  
575 QTL, called *rp1*, also on chromosome 2, close to two cytochrome genes from the CYP6  
576 family (Wondji *et al.*, 2007). Saavedra-Rodriguez *et al.* (2008) unveiled the molecular  
577 mechanism of permethrin resistance in a Mexican strain of *Ae. aegypti*. Two QTL of  
578 major effect were identified on chromosome 3, one corresponding to the Na<sub>v</sub> channel  
579 gene and the other to the *CCEunk7o* marker (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2008).

580 In our study, in order to identify specific alleles influencing the QTL region,  
581 bioinformatic analyses revealed the presence of a carboxylesterase cluster within the  
582 QTL region on chromosome 2. Elevated activity of esterase enzymes is the main  
583 mechanism responsible for OP resistance in mosquitoes (Hemingway, 2000; 2006;  
584 Montella *et al.*, 2012). Seven of these clustered esterase genes (*CCEae3A*, *CCEae1C*,  
585 *CCEae2C*, *CCEae3C*, *CCEae4C*, *CCEae5C* and *CCEae6C*) were prioritized as  
586 candidate genes, sequenced and their transcripts were quantified by Real-Time qPCR.  
587 Synonymous mutations were found in all seven esterase genes, but only *CCEae1C*,  
588 *CCEae4c* e *CCEae6C* displayed non-synonymous SNPs, however no association was  
589 observed between specific SNPs and temephos resistance. qPCR showed that the  
590 expression of the esterase *CCEae3A* in the RecR x MoyodD progeny, and *CCEae1C*,  
591 *CCEae5c* and *CCEae6C* in the RecR x Red F2, were slightly elevated in resistant  
592 individuals. These results are complementary to a microarray screening of  
593 detoxification genes performed with the RecR strain. Six genes were overexpressed in  
594 resistant larvae and adults: *CYP6N12*, *Aldehyde oxidase 10382*, *GSTi1*, *GSTo1*, *GSTx2* e  
595 *CCEae3A* (Strode *et al.*, 2012). The power of QTL mapping was confirmed in the  
596 present study, as no candidate genes were used in the prior genotype screening. From  
597 those genes pointed out by microarray data in the RecR, only *CCEae3A* was identified  
598 within the QTL region and with a similar over expression pattern as previously pointed  
599 out by Strode *et al.* (2012). Moreover, it is possible that other elements may be  
600 contributing to the major effect QTL found in the RecR, such as regulatory elements  
601 and transcription factors regulating the expression of detoxification enzymes.

602 Different from the target-site insensitivity mechanism, resistance to chemical  
603 insecticides based on metabolic detoxification has proven to be a more challenging  
604 mechanism.to study. Previous studies have shown the involvement of multiple genomic  
605 regions associated to DDT, PYR and OP resistance in different mosquito species  
606 (Ranson et al., 2000; 2004; Wondji et al., 2007; Saavedra-Rodriguez et al., 2008).  
607 Similar to those studies, our results showed the polygenic background underlying the  
608 metabolic resistance to the OP temephos in the RecR strain. The QTL mapping of a  
609 chromosome 2 region controlling temephos resistance here reported, together with the  
610 previous microarray data, may lead to the development of new tools for the diagnosis  
611 and management of resistance in *Ae. aegypti* responding to temephos selection.

612

613

614

615

616

617

618

## 619 **ACKNOWLEDGMENTS**

620

621 We thank Brent Harker for his valuable contribution into research. This work was  
622 funded by FULBRIGHT-Brasil.

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636 **BIBLIOGRAPHY**

637

638 ANDRIGHETTI MTMC, F.; RIGUETI, M.; GALVANI, K.C.; MACORIS, M.L.G.  
639 2008 Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of  
640 susceptibility to the organophosphate temephos. *Dengue Bull.* 32:186-198.

641

642 ANTOLIN MF, BOSIO CF, COTTON J, SWEENEY W, STRAND MR, BLACK  
643 WCT. 1996 Intensive linkage mapping in a wasp (*Bracon hebetor*) and a mosquito  
644 (*Aedes aegypti*) with single-strand conformation polymorphism analysis of random  
645 amplified polymorphic DNA markers. *Genetics.* 143(4):1727-1738.

646

647 BEERNTSEN BT, SEVERSON DW, KLINKHAMMER JA, KASSNER VA,  
648 CHRISTENSEN BM. 1995 *Aedes aegypti*: a quantitative trait locus (QTL) influencing  
649 filarial worm intensity is linked to QTL for susceptibility to other mosquito-borne  
650 pathogens. *Exp Parasitol.* 81(3):355-362.

651

652 BLACK WCS, D. W. 2002 Genetics of vector competence. In: *Biology of disease*  
653 *vectors*, Vol. 2nd: (WC M, ed), pp. 415-448. Harcourt Academic Press, Amsterdam.

654

655 BOSIO CF, FULTON RE, SALASEK ML, BEATY BJ, BLACK WCT. 2000  
656 Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito  
657 *Aedes aegypti*. *Genetics.* 156(2):687-698.

658

659 BROMAN KW, WU H, SEN S, CHURCHILL GA. 2003 R/qtl: QTL mapping in  
660 experimental crosses. *Bioinformatics.* 19(7):889-890.

661

662 CHAMBERS EW, MEECE JK, MCGOWAN JA, LOVIN DD, HEMME RR,  
663 CHADEE DD, MCABEE K, BROWN SE, KNUDSON DL, SEVERSON DW. 2007  
664 Microsatellite isolation and linkage group identification in the yellow fever mosquito  
665 *Aedes aegypti*. *J Hered.* 98(3):202-210.

666

667 CHURCHILL GA, DOERGE RW. 1994 Empirical threshold values for quantitative  
668 trait mapping. *Genetics.* 138(3):963-971.

669

670 COLLINS FH, ZHENG L, PASKEWITZ SM, KAFATOS FC. 1997 Progress in the  
671 map-based cloning of the *Anopheles gambiae* genes responsible for the encapsulation of  
672 malarial parasites. *Ann Trop Med Parasitol.* 91(5):517-521.

673

674 EXCOFFIER L, LISCHER HE. 2010 Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs  
675 to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.*  
676 10(3):564-567.

677

678 FFRENCH-CONSTANT RH, STEICHEN JC, SHOTKOSKI F. 1994 Polymerase chain  
679 reaction diagnostic for cyclodiene insecticide resistance in the mosquito *Aedes aegypti*.  
680 *Med Vet Entomol.* 8(1):99-100.

681

682 FULTON RE, SALASEK ML, DUTEAU NM, BLACK WCT. 2001 SSCP analysis of  
683 cDNA markers provides a dense linkage map of the *Aedes aegypti* genome. *Genetics.*  
684 158(2):715-726.

685 GUBLER DJ. 2011 Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the  
686 21(st) Century. Trop Med Health. 39(4 Suppl):3-11.  
687  
688 HALL TA. 1999 BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and  
689 analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser. 41:95-98.  
690  
691 HEMINGWAY J. 2000 The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms  
692 of insecticide resistance. Insect Biochem Mol Biol. 30(11):1009-1015.  
693  
694 HEMINGWAY J, RANSON H. 2000 Insecticide resistance in insect vectors of human  
695 disease. Annu Rev Entomol. 45:371-391.  
696  
697 LANDER ES, GREEN P, ABRAHAMSON J, BARLOW A, DALY MJ, LINCOLN  
698 SE, NEWBERG LA. 1987 MAPMAKER: an interactive computer package for  
699 constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations.  
700 Genomics. 1(2):174-181.  
701  
702 LIMA EP, PAIVA MH, DE ARAUJO AP, DA SILVA EV, DA SILVA UM, DE  
703 OLIVEIRA LN, SANTANA AE, BARBOSA CN, DE PAIVA NETO CC, GOULART  
704 MO, WILDING CS, AYRES CF, DE MELO SANTOS MA. 2011 Insecticide resistance  
705 in *Aedes aegypti* populations from Ceara, Brazil. Parasit Vectors. 4:5.  
706  
707 LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. 2001 Analysis of relative gene expression data using  
708 real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 25(4):402-  
709 408.  
710  
711 LOVIN DD, WASHINGTON KO, DEBRUYN B, HEMME RR, MORI A, EPSTEIN  
712 SR, HARKER BW, STREIT TG, SEVERSON DW. 2009 Genome-based polymorphic  
713 microsatellite development and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and  
714 application to population genetics in Haiti. BMC Genomics. 10:590.  
715  
716 MARCOMBE S, POUPARDIN R, DARRIET F, REYNAUD S, BONNET J, STRODE  
717 C, BRENGUES C, YEBAKIMA A, RANSON H, CORBEL V, DAVID JP. 2009  
718 Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes*  
719 *aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). BMC Genomics.  
720 10:494.  
721  
722 MAZZARRI MB, GEORGHIOU GP. 1995 Characterization of resistance to  
723 organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes*  
724 *aegypti* from Venezuela. J Am Mosq Control Assoc. 11(3):315-322.  
725  
726 MELO-SANTOS MA, VARJAL-MELO JJ, ARAUJO AP, GOMES TC, PAIVA MH,  
727 REGIS LN, FURTADO AF, MAGALHAES T, MACORIS ML, ANDRIGHETTI MT,  
728 AYRES CF. 2010 Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution  
729 and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. Acta Trop. 113(2):180-  
730 189.  
731  
732 MONTELLA IR, MARTINS AJ, VIANA-MEDEIROS PF, LIMA JB, BRAGA IA,  
733 VALLE D. 2007 Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti*  
734 populations from 2001 to 2004. Am J Trop Med Hyg. 77(3):467-477.



735 MORI A, ROMERO-SEVERSON J, BLACK WCT, SEVERSON DW. 2008  
736 Quantitative trait loci determining autogeny and body size in the Asian tiger mosquito  
737 (*Aedes albopictus*). *Heredity* (Edinb). 101(1):75-82.  
738  
739 MORI A, SEVERSON DW, CHRISTENSEN BM. 1999 Comparative linkage maps for  
740 the mosquitoes (*Culex pipiens* and *Aedes aegypti*) based on common RFLP loci. *J*  
741 *Hered.* 90(1):160-164.  
742  
743 MORI A, TOMITA T, HIDOH O, KONO Y, SEVERSON DW. 2001 Comparative  
744 linkage map development and identification of an autosomal locus for insensitive  
745 acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex tritaeniorhynchus*. *Insect*  
746 *Mol Biol.* 10(3):197-203.  
747  
748 MUNSTERMANN LEC, G. B. J. 1979 Genetics of *Aedes aegypti*: updating the linkage  
749 map. *J. Hered.* 70:291-296.  
750  
751 OAKESHOTT JG, HOME I, SUTHERLAND TD, RUSSELL RJ. 2003 The genomics  
752 of insecticide resistance. *Genome Biol.* 4(1):202.  
753  
754 POUPARDIN R, REYNAUD S, STRODE C, RANSON H, VONTAS J, DAVID JP.  
755 2008 Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and  
756 insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical  
757 insecticides. *Insect Biochem Mol Biol.* 38(5):540-551.  
758  
759 RANSON H, JENSEN B, WANG X, PRAPANTHADARA L, HEMINGWAY J,  
760 COLLINS FH. 2000 Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the  
761 malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol.* 9(5):499-507.  
762  
763 RANSON H, PATON MG, JENSEN B, MCCARROLL L, VAUGHAN A, HOGAN  
764 JR, HEMINGWAY J, COLLINS FH. 2004 Genetic mapping of genes conferring  
765 permethrin resistance in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol.*  
766 13(4):379-386.  
767  
768 ROZEN S, SKALETSKY H. 2000 Primer3 on the WWW for general users and for  
769 biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 132:365-386.  
770  
771 RUDBECK L, DISSING J. 1998 Rapid, simple alkaline extraction of human genomic  
772 DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR.  
773 *Biotechniques.* 25(4):588-590, 592.  
774  
775 SAAVEDRA-RODRIGUEZ K, STRODE C, FLORES SUAREZ A, FERNANDEZ  
776 SALAS I, RANSON H, HEMINGWAY J, BLACK WCT. 2008 Quantitative trait loci  
777 mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes*  
778 *aegypti*. *Genetics.* 180(2):1137-1152.  
779  
780 SAAVEDRA-RODRIGUEZ K, SUAREZ AF, SALAS IF, STRODE C, RANSON H,  
781 HEMINGWAY J, BLACK WCT. 2012 Transcription of detoxification genes after  
782 permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 21(1):61-77.

783 SAÚDE MD. 1999. Reunião técnica para discussão do status de resistência de *Aedes*  
784 *aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no  
785 Brasil. Brasília.  
786  
787 SEVERSON DW. 1994 Applications of molecular marker analysis to mosquito vector  
788 competence. *Parasitol Today*. 10(9):336-340.  
789  
790 SEVERSON DW, ANTHONY NM, ANDREEV O, FFRENCH-CONSTANT RH.  
791 1997 Molecular mapping of insecticide resistance genes in the yellow fever mosquito  
792 (*Aedes aegypti*). *J Hered*. 88(6):520-524.  
793  
794 SEVERSON DW, MEECE JK, LOVIN DD, SAHA G, MORLAIS I. 2002 Linkage map  
795 organization of expressed sequence tags and sequence tagged sites in the mosquito,  
796 *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*. 11(4):371-378.  
797  
798 SEVERSON DW, MORI A, KASSNER VA, CHRISTENSEN BM. 1995 Comparative  
799 linkage maps for the mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti*, based on common  
800 RFLP loci. *Insect Mol Biol*. 4(1):41-45.  
801  
802 SEVERSON DW, MORI A, ZHANG Y, CHRISTENSEN BM. 1994 Chromosomal  
803 mapping of two loci affecting filarial worm susceptibility in *Aedes aegypti*. *Insect Mol*  
804 *Biol*. 3(2):67-72.  
805  
806 SEVERSON DW, THATHY V, MORI A, ZHANG Y, CHRISTENSEN BM. 1995  
807 Restriction fragment length polymorphism mapping of quantitative trait loci for malaria  
808 parasite susceptibility in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*. 139(4):1711-1717.  
809  
810 SEVERSON DW, ZAITLIN D, KASSNER VA. 1999 Targeted identification of  
811 markers linked to malaria and filarioid nematode parasite resistance genes in the  
812 mosquito *Aedes aegypti*. *Genet Res*. 73(3):217-224.  
813  
814 SHIN D, MORI A, SEVERSON DW. 2012 Genetic Mapping a Meiotic Driver That  
815 Causes Sex Ratio Distortion in the Mosquito *Aedes aegypti*. *J Hered*. 103(2):303-307.  
816  
817 SOLLER MB, T; GENIZI, A. . 1979 On the power of experimental designs for the  
818 detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred  
819 lines. *Theor. Appl. Genet*. 47:35-39.  
820  
821 STRODE C, DE MELO-SANTOS M, MAGALHAES T, ARAUJO A, AYRES C. 2012  
822 Expression Profile of Genes during Resistance Reversal in a Temephos Selected Strain  
823 of the Dengue Vector, *Aedes aegypti*. *PLoS One*. 7(8):e39439.  
824  
825 STRODE C, WONDJI CS, DAVID JP, HAWKES NJ, LUMJUAN N, NELSON DR,  
826 DRANE DR, KARUNARATNE SH, HEMINGWAY J, BLACK WCT, RANSON H.  
827 2008 Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect*  
828 *Biochem Mol Biol*. 38(1):113-123.  
829  
830 THATHY V, SEVERSON DW, CHRISTENSEN BM. 1994 Reinterpretation of the  
831 genetics of susceptibility of *Aedes aegypti* to *Plasmodium gallinaceum*. *J Parasitol*.  
832 80(5):705-712.

833 WHO. 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult  
834 mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides - Diagnostic  
835 test. Geneva.  
836  
837 WONDJI CS, MORGAN J, COETZEE M, HUNT RH, STEEN K, BLACK WCT,  
838 HEMINGWAY J, RANSON H. 2007 Mapping a quantitative trait locus (QTL)  
839 conferring pyrethroid resistance in the African malaria vector *Anopheles funestus*. BMC  
840 Genomics. 8:34.  
841  
842 ZHONG D, MENGE DM, TEMU EA, CHEN H, YAN G. 2006 Amplified fragment  
843 length polymorphism mapping of quantitative trait loci for malaria parasite  
844 susceptibility in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Genetics. 173(3):1337-1345.  
845  
846