

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

ANA PAULA DE ARAÚJO

ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS QUÍMICOS EM POPULAÇÕES DE
Aedes aegypti (DIPTERA: CULICIDAE), DE MUNICÍPIOS DO ESTADO DE
PERNAMBUCO

RECIFE

2013

ANA PAULA DE ARAÚJO

ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS QUÍMICOS EM POPULAÇÕES DE
Aedes aegypti (DIPTERA: CULICIDAE), DE MUNICÍPIOS DO ESTADO DE
PERNAMBUCO

Tese apresentada ao curso de Doutorado em
Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz para
obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Co-orientadora: Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos

RECIFE

2013

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- A663a Araújo, Ana Paula de.
Análise da resistência a inseticidas químicos em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), de Municípios do Estado de Pernambuco / Ana Paula de Araújo. - Recife: s. n, 2013.
120 p. : ilus.
Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.
Orientadores: Constância Flávia Junqueira Ayres, Maria Alice Varjal de Melo Santos.
1. *Aedes*. 2. Resistência a Inseticidas. 3. Ensaio enzimático 4. Diflubenzuron. 5. Canal de Sódio Disparado por Voltagem NAV1.1. I. Ayres, Constância Flávia Junqueira. ths. II. Santos, Maria Alice Varjal de Melo. ths. III. Título.

CDU 616.92

ANA PAULA DE ARAÚJO

ANÁLISE DA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS QUÍMICOS EM POPULAÇÕES DE
Aedes aegypti (DIPTERA: CULICIDAE), DE MUNICÍPIOS DO ESTADO DE
PERNAMBUCO

Tese apresentada ao curso de Doutorado em
Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz para
obtenção do grau de Doutor em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Lêda Narcisa Regis (Membro interno)
Departamento de Entomologia/CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha (Membro interno)
Departamento de Entomologia/CPqAM/FIOCRUZ

Dr. Maria de Lourdes da Graça Macoris (Membro externo)
Departamento de Entomologia/SUSCEN

Dr. Eduardo Barbosa Beserra (Membro externo)
Departamento de Biologia/UEPB

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes (Orientadora)
Departamento de Entomologia/CPqAM/FIOCRUZ

Dedico este trabalho
À minha mãe Ana Cristina
Aos meus avós Maria Joselina e Manuel Cabraíba (*In memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus por todas as bênçãos que ele tem dado a minha vida, por me guiar e iluminar minha mente para que eu pudesse trilhar meu caminho.

À Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres por ter aceitado me orientar no Doutorado, pelos ensinamentos durante a execução da tese, pelos constantes encontros no nosso Journal Club, momento de engrandecimento científico com todos os alunos.

À Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos, minha orientadora desde 2003, quando iniciei meu trabalho monográfico. Obrigada pelo apoio, orientação, amizade, por você acreditar em mim, obrigada por me guiar e me contagiar com seu amor pelo que faz e me ajudar a me tornar quem sou hoje.

À Dra. Cláudia Maria Fontes e Dra. Maria Helena Neves pelas contribuições na qualificação desta tese.

À atual banca examinadora da tese.

A todos do Departamento de Entomologia, Dra. Lêda Regis e Dra. Rosângela Barbosa pelo constante apoio desde meu mestrado. À Clarinha, secretária do departamento, por toda ajuda.

A meus amigos do insetário, Rose Barros, Andréa Neves, Ana Lúcia, Elisângela Dias, Mariana, Eliane, Éllyda Vanessa, Mércia Cristine, Morgana, Tatiane Cíbele e Mônica Maria Crespo pela ajuda pessoal ou na execução dos testes e pelos bons momentos de convívio.

A meus amigos e queridos alunos de iniciação científica, Elisama Helvecio, Diego Diniz, Amanda Cabral e Emanuel Holanda, que se dedicaram muito durante os experimentos, foi um momento de troca e aprendizado imprescindíveis para a conclusão desta tese, que gerou parte de seus trabalhos monográficos.

Ao Dr. Marcelo Henrique e à Dra. Norma pela contribuição na execução e na análise molecular dos resultados.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, pelo apoio da bolsa e pela infraestrutura que possibilitaram a realização desta pesquisa.

Ao programa de pós-graduação em Saúde Pública.

Ao George Diniz pela análise estatística dos dados, à Mégine pela correção bibliográfica segundo as normas da ABNT e à Macia pelo envio de artigos científicos.

A Cássia e Viviane, funcionárias do Núcleo de Plataformas Tecnológicas-NPT do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pelo seqüenciamento do DNA das amostras avaliadas neste estudo.

À minha família pelas palavras de amor e apoio. A meus avós, Maria Joselina e Manuel Cabraíba que sempre sonharam com minha entrada na UFPE e FIOCRUZ. Às minhas tias, em especial Maria Aparecida e Maria das Neves, por me terem como filha. A minha sogra Clelma Gomes Silva por me emprestar seus livros de entomologia e sempre apoiar e incentivar minha vida acadêmica. E à minha querida mãe Ana Cristina que sempre lutou por mim, foi minha luz, minha inspiração, presente sempre em todos os momentos difíceis, tristes, alegres e de vitórias em minha vida. Meu anjo da guarda, presente de Deus.

Ao meu marido Ewerton Lamarck que muitas vezes abriu mão de minha companhia para que eu pudesse estudar, fazer cursos em outros estados e me dedicar a minha pesquisa de doutorado. Obrigada pelo companheirismo, atenção, pelos momentos em que soubemos dançar a dança da vida.

A todas as pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente na realização desta pesquisa.

De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!

Fernando Sabino

ARAÚJO, A. P. Análise da resistência a inseticidas químicos em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), de Municípios do Estado de Pernambuco. 2013. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

RESUMO

A resistência de populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos tem representado um desafio nos programas para seu controle. Este projeto teve como objetivos caracterizar o perfil de susceptibilidade de populações de *A. aegypti* de Pernambuco, relacionando-o ao histórico local de uso de tais compostos e aos mecanismos que podem estar associados à resistência. Amostras de *A. aegypti* de 17 municípios foram analisadas através de bioensaios com o temephos (larvicida) e diflubenzuron (regulador de crescimento) e um adalticida, a cipermetrina. Testes bioquímicos foram realizados para quantificar a atividade das enzimas acetilcolinesterase (ACE), glutatona S-transferase (GST), esterases (Alfa, Beta e PNPA) e oxidases de função mista (MFO). Também foram investigadas mutações no gene do canal de sódio: sítios 982, 1011, 1014, e 1016. Os resultados demonstraram que todas as populações estavam resistentes ao temephos, exceto a de Fernando de Noronha. A razão de resistência (RR) foi moderada apenas na população Recife, enquanto $RR > 100$ vezes foram observadas em 10 populações. Houve uma correlação entre o consumo e a RR a este produto. Para o diflubenzuron foi construída uma linha de base dose resposta e as RR foram correlacionadas positivamente com as observadas para o temephos. A análise para a cipermetrina também apontou que todas as populações apresentam resistência a este composto. Os padrões enzimáticos se mostraram alterados para as GST, esterases alfa e PNPA. A análise molecular revelou que a mutação Ile1011Met está disseminada em todas as populações, em heterozigose, mas apenas para duas delas houve associação com a resistência. A mutação Val1016Ile esteve presente em sete populações em heterozigose, e não houve associação com a resistência Estes achados evidenciam uma situação crítica para efetividade de controle do mosquito com inseticidas químicos, visto que a resistência ao temephos e à cipermetrina está disseminada nas populações pernambucanas de *A. aegypti*.

Palavras-chaves: *Aedes*; resistência a inseticidas; ensaios enzimáticos; diflubenzuron; canal de sódio disparado por voltagem NAV1.1.

ARAÚJO, A. P. Analysis of resistance to chemical insecticides in populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in municipalities of Pernambuco State. 2013. Thesis (Doctorate in Public Health)- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

ABSTRACT

Resistance to chemical insecticides represents a challenge for *Aedes aegypti* control programs. This project aimed to characterize the susceptibility status of *A. aegypti* populations from Pernambuco state, associating it to the local use history of such compounds and mechanisms that may be associated with the resistance. *A. aegypti* samples from 17 municipalities were analyzed by bioassays with temephos (larvicide), diflubenzuron (growth regulator) and one adulticide, cypermethrin. Biochemical tests were performed to quantify acetylcholinesterase (ACE), glutathione S- transferase (GST), esterases (Alpha, Beta and PNPA) and mixed function oxidases (MFO) enzyme activity. Also we investigated sodium channel mutations: codons 982, 1011, 1014 and 1016. Results showed that all populations were resistant to temephos except Fernando de Noronha. Moderate value of resistance ratio (RR) was observed only for Recife, whereas $RR > 100$ times were observed in other 10 populations. There was a correlation between the consumption and the RR value for this product. For diflubenzuron was allowed us to come up a baseline dose response and RR were positively correlated with those observed for temephos. The cypermethrin analysis demonstrated that all populations were also resistant to this compound. The enzymatic patterns observed showed a change of GST, alpha and PNPA esterase activity. Molecular analysis revealed that the Ile1011Met mutation is widespread in all populations, in heterozygous form, but only for two of these populations were confirmed their association with resistance. The Val1016Ile mutation was present in seven populations, without association with resistance. These findings suggest a critical situation for effectiveness mosquito control with chemical insecticides, since the resistance to temephos and cypermethrin are widespread in *A. aegypti* populations from Pernambuco.

Key-words: *Aedes*; insecticides resistance; enzyme assays; diflubenzuron; NAV1.1 Voltage-Gated Sodium Channel

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Ciclo evolutivo de <i>Aedes aegypti</i>	25
Figura 2-	Distribuição dos sorotipos do vírus dengue nos estados brasileiros no período de janeiro a agosto de 2011.	27
Figura 3-	Estrutura química de inseticidas organoclorados.	34
Figura 4-	Estrutura química de inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides.	36
Figura 5-	Reação de hidrólise pela enzima acetilcolinesterase que transforma o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético.	37
Figura 6-	Estrutura química de reguladores do crescimento dos insetos.	38
Figura 7-	Ação da carboxiesterase, através da adição de água, que gera a clivagem do carboxiester, resultando em uma molécula de ácido e outra de álcool.	43
Figura 8-	Estrutura química de substratos utilizados por esterases	44
Figura 9-	Conjugação da glutationa (GSH) com o inseticida organoclorado dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), através da glutationa S-transferase (GST) resultando na desidrocloração e consequente formação do dicloro-difenil-dicloroetileno (DDE) composto menos tóxico para insetos.	46
Figura 10-	Canal de sódio regulado por voltagem inserido na membrana celular do axônio neuronal.	50
Figura 11-	Propagação do impulso nervoso através do potencial de ação no axônio neuronal.	51
Figura 12-	Mapa de Pernambuco, com destaque para os municípios onde as amostras de <i>Aedes aegypti</i> foram coletadas nas Meso-regiões do estado.	55

- Figura 13-** Municípios do estado de Pernambuco em destaque, onde foram coletadas amostras de *Aedes aegypti*, para avaliação da resistência a inseticidas químicos. As razões de resistência ao temephos encontradas nos municípios foram indicadas na legenda. 64
- Gráfico 1-** Análise de regressão entre a razão de resistência ao temephos e a razão de resistência ao diflubenzuron encontradas para populações de *Aedes aegypti* de Pernambuco-Brasil. 69
- Gráfico 2-** Análise de regressão entre a razão de resistência ao temephos e o consumo deste produto nas respectivas localidades, onde foram coletadas as populações de *Aedes aegypti* de Pernambuco-Brasil. 69
- Gráfico 3-** Análise de regressão entre a razão de resistência a alfacipermetrina e o consumo deste produto nas respectivas localidades onde foram coletadas as populações de *Aedes aegypti* de Pernambuco-Brasil. 70
- Gráfico 4-** Representação gráfica de cada indivíduo analisado, quanto a suas respectivas atividades enzimáticas para glutathion-S-transferase, alfa esterase e beta esterase em populações de *Aedes aegypti* de municípios do estado de Pernambuco, analisados através de GraphPad Prism 4. 73
- Gráfico 5-** Representação gráfica de cada indivíduo analisado, quanto a suas respectivas atividades enzimáticas para PNPA esterase, oxidases de função mista e acetilcolinesterase em populações de *Aedes aegypti* de municípios do estado de Pernambuco, analisados através de GraphPad Prism 4. 74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Concentração letal para 95% (LC₉₅) dos indivíduos e razão de resistência (RR) ao temephos, estimada para populações de *Aedes aegypti* provenientes de municípios do Estado de Pernambuco. 63
- Tabela 2-** Inibição da emergência de adultos em 50% (EI₅₀) e 95% (EI₉₅) dos indivíduos e Razão de Resistência (RR) ao diflubenzuron, estimado para populações de *Aedes aegypti* provenientes de municípios do Estado de Pernambuco. 65
- Tabela 3-** Taxa de mortalidade e status de susceptibilidade de populações de *Aedes aegypti* provenientes de municípios do Estado de Pernambuco ao piretróide cipermetrina. 66
- Tabela 4-** Registro da quantidade do inseticida temephos empregado para controle de *Aedes aegypti* durante os anos de 2007 a 2011 em municípios do estado de Pernambuco fornecido pelo Sistema de Informações do Programa de Febre Amarela e Dengue (SISFAD). 68
- Tabela 5-** Registro da quantidade do inseticida alfacipermetrina empregado para controle de *Aedes aegypti* durante os anos de 2007 a 2011, em municípios do estado de Pernambuco, fornecido pelo Sistema de Informações do Programa de Febre Amarela e Dengue (SISFAD). 70
- Tabela 6-** Atividade enzimática observada para adultos de *Aedes aegypti* provenientes de populações de Pernambuco e colônia Rockefeller. 71
- Tabela 7-** Frequência genotípica e alélica da mutação Kdr Ile1011Met em

populações de *Aedes aegypti* provenientes de municípios do estado de Pernambuco, susceptíveis e resistentes ao piretróide cipermetrina. 76

Tabela 8- Frequência genotípica e alélica da mutação Kdr Val1016Ile em populações de *Aedes aegypti* provenientes de municípios do estado de Pernambuco susceptíveis e resistentes ao piretróide cipermetrina. 77

Tabela 9- Perfil de susceptibilidade de populações de *Aedes aegypti* de municípios do estado de Pernambuco aos inseticidas químicos temephos, diflubenzuron e cipermetrina, bem como a classificação da atividade enzimática e frequência alélica das mutações kdr Ile1011Met e Val1016Ile, mecanismos de resistência investigados neste trabalho. 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>AaNav</i>	Gene de <i>Aedes aegypti</i> do canal de sódio regulado por voltagem
<i>ace</i>	Gene da enzima Acetilcolinesterase
ACE	Acetilcolinesterase
α -HCH	α -Hexaclorociclohexano
β -HCH	β -Hexaclorociclohexano
γ -HCH	γ -Hexaclorociclohexano
δ -HCH	δ -Hexaclorociclohexano
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> sorovariedade <i>israelensis</i>
BHC	Hexaclorociclobenzeno
BPU _s	Benzoil-feniluréias
Bomba Na ⁺ /K ⁺	Bomba de sódio e potássio
CA	Carbamato
<i>CYP</i>	Gene “Cytochrome P450”
CL	Concentração letal
CL ₉₅	Concentração letal para 95% dos indivíduos testados
CSI	<i>Chitin Synthesis Inhibitors</i> - Inibidor da Síntese de Quitina
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DDE	Dicloro-Difenil-Dicloroetileno
EST _s	Enzimas esterases
GABA	Receptor neuronal do ácido γ -aminobutírico
GST	Enzima Glutathiona-S-transferase
HNE	trans-4-hidroxi-2-nonenal
IE	Inibição da Emergência
IE ₉₅	Inibição da Emergência de 95% dos indivíduos testados
IGR	<i>Insect Grown Regulator</i> - Regulador do Crescimento de Insetos
IRAC	Comitê de Ação da Resistência a Inseticidas
ISQ	Inibidor da Síntese de Quitina
JHA	<i>Juvenile Hormone Analogue</i> -Análogo ao Hormônio Juvenil
Kdr	Resistência <i>Knockdown</i>
LPO	Peroxidação de Lipídeos

MACE	Acetilcolinesterase Modificada
MFOs	Enzimas Oxidases de Função Mista
MS	Ministério da Saúde
Na_v	Gene que codifica o canal de sódio regulado por voltagem
OC	Organoclorado
OP	Organofosforado
OVT	Ovitrapa
PARA	Gene <i>paralytic</i>
PACS	Programa de Agentes Comunitários de Saúde
Phe1534Cys	Fenilalanina em substituição a cisteína no sítio 1534
PEAa	Programa de Erradicação do <i>A. aegypti</i>
PI	Piretróide
PIACD	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
PSF	Programa de Saúde da Família
<i>Rdl</i>	Gene que codifica o receptor do ácido gamaaminobutirico (GABA)
Rede	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de <i>Aedes aegypti</i> a
MoReNAa	inseticidas
Rock	Colônia Rockefeller, referência de susceptibilidade a inseticidas químicos
RR	Razão de Resistência
SISFAD	Sistema de Informação Sobre Febre Amarela e Dengue
SRCCV	Serviço de Referência para Controle de Culicídeos Vetores
SNC	Sistema Nervoso Central
S1-S6	Seis segmentos hidrofóbicos do canal de sódio
UBV	Ultra baixo volume
IIS6	Segmento 6 do domínio II do canal de sódio
IIIS6	Segmento 6 do domínio III do canal de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 JUSTIFICATIVA	21
3 PERGUNTA CONDUTORA	23
4 OBJETIVOS	24
4.1 Geral	24
4.2 Específicos	24
5 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL	25
5.1 O mosquito <i>Aedes aegypti</i> e sua importância epidemiológica	25
5.2 Histórico do controle do <i>Aedes aegypti</i> no Brasil	28
5.3 Histórico do uso de inseticidas químicos no Brasil para o controle de <i>Aedes aegypti</i>	30
5.4 Inseticidas químicos utilizados no controle de <i>Aedes aegypti</i>	33
5.4.1 Organoclorados (OC).....	33
5.4.2 Organofosforados (OF) e Carbamatos (CB).....	34
5.4.3 Piretróides (PI).....	35
5.4.4 Reguladores do Crescimento de Insetos.....	37
5.5 Mecanismos de resistência	39
5.5.1 Resistência por penetração reduzida do inseticida.....	40
5.5.2 Resistência comportamental.....	40
5.5.3 Resistência metabólica.....	41
5.5.3.1 <u>Esterases</u>	42
5.5.3.2 <u>Glutaciona S-transferases</u>	45
5.5.3.3 <u>Oxidases de Função Mista</u>	47
5.5.4 Resistência por alteração do sítio-alvo.....	48
6 METODOLOGIA	54
6.1 Populações e colônia de <i>Aedes aegypti</i>	54
6.2 Diluição dos inseticidas	56
6.2.1 Temephos.....	56
6.2.2 Diflubenzuron.....	56
6.2.3 Cipermetrina.....	56
6.3 Bioensaios de Dose-Resposta	56

6.3.1 Bioensaios com temephos.....	57
6.3.2 Bioensaios com diflubenzuron.....	57
6.4 Bioensaio de dose diagnóstica com cipermetrina.....	58
6.5 Análise do histórico do uso de inseticidas nos municípios.....	58
6.6 Ensaios de atividade enzimática.....	59
6.7 Detecções de mutações no gene do canal de sódio.....	60
7 RESULTADOS.....	62
7.1 Perfil de susceptibilidade ao temephos.....	62
7.2 Perfil de susceptibilidade ao diflubenzuron.....	62
7.3 Perfil de susceptibilidade à cipermetrina.....	62
7.4 Análise do histórico do uso de inseticidas nos municípios.....	67
7.5 Ensaios de atividade enzimática.....	67
7.6 Frequência de mutações no gene do canal de sódio.....	75
8 DISCUSSÃO.....	79
9 CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICE A- ARTIGO PUBLICADO.....	112

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma infecção emergente ou re-emergente em diversos países que vem preocupando as autoridades em saúde em quase todo o mundo, devido à sua ampla distribuição e ao grande potencial para causar casos graves e letais. A doença pode se apresentar sob duas formas clínicas: a febre da dengue ou dengue clássica e a febre hemorrágica da dengue, ambas têm como agente etiológico um arbovírus pertencente à família Flaviviridae e gênero *Flavivirus*, do qual são reconhecidos quatro sorotipos, indistinguíveis clinicamente (GUBLER, 1998; HENCHAL; PUTNAK, 1990).

Aedes (Stegomyia) aegypti Linnaeus, 1762, mosquito predominantemente urbano, de hábito diurno, acentuadamente domiciliado, é considerado a principal espécie responsável pelo ciclo de transmissão do vírus dengue no Brasil. Este mosquito põe seus ovos geralmente nas paredes internas de recipientes, como caixas d'água, tonéis, pneus, vasos de plantas, entre outros, os quais constituem locais que são considerados criadouros importantes do ponto de vista epidemiológico. A grande variedade de criadouros potenciais encontrada no peridomicílio e no intradomicílio garante a manutenção de densidades elevadas de *A. aegypti* no meio urbano, potencializando os riscos de transmissão da doença (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1965).

As estratégias adotadas pelo Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), instituído pelo Ministério da Saúde em 1996, estão centradas no combate ao vetor, considerado um elo vulnerável da cadeia epidemiológica da dengue, diante da inexistência de imunoterápicos específicos para a prevenção da doença (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996). O controle vetorial está baseado no uso de inseticidas químicos de ação larvicida, principalmente o temephos (organofosforado), preconizados para o tratamento de reservatórios de água potável, além da aplicação espacial de adulticidas da classe dos piretróides (deltametrina/cipermetrina), perifocal, em pontos estratégicos, e em Ultra Baixo Volume (UBV) nos demais espaços. As ações consistem também no controle mecânico, através da eliminação de resíduos sólidos inservíveis, capazes de acumular água, que podem se tornar criadouros temporários do mosquito. Atualmente tais resíduos são representados por uma infinidade de descartáveis utilizados de forma intensa nas áreas urbanas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1995b; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Um dos principais problemas associados aos inseticidas químicos é que seu uso exclusivo, por períodos prolongados, pode selecionar indivíduos resistentes a um ou mais compostos (ANDRIGHETTI et al., 2008; BRAGA et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2002).

Os principais mecanismos de resistência descritos na literatura são resistência metabólica, alteração do sítio-alvo, penetração reduzida e a resistência comportamental (FERRARI, 1996). A resistência metabólica está relacionada à elevação dos níveis de enzimas ou a mudanças em suas estruturas que resultam no aumento da sua capacidade de eliminar o inseticida detoxificando o corpo do inseto. As principais enzimas envolvidas neste mecanismo são as monoxigenases, as glutatona S-transferases e as esterases (HEMINGWAY, 2000).

A resistência por alteração do sítio alvo é geralmente ocasionada por mutações que ocorrem na região estrutural dos genes que codificam proteínas alvo dos inseticidas, levando a uma mudança de aminoácido que tende a reduzir a ligação do inseticida, sem causar uma perda da função primária da proteína (HEMINGWAY; RANSON, 2000). Mutações em três moléculas-alvo dos inseticidas já foram descritas e são bem estudadas em várias espécies de insetos: a mutação no sítio-alvo acetilcolinesterase, enzima alvo dos organofosforados e carbamatos; a mutação no receptor GABA, receptor neuronal do ácido γ -aminobutírico, sítio de ação dos inseticidas organoclorados; e mutações no canal de sódio impedindo a ligação do DDT e piretróides (HEMINGWAY; RANSON, 2000).

Os genes associados à resistência são normalmente raros e podem aumentar sua frequência depois de uma seleção, à proporção que os indivíduos com alelos susceptíveis são eliminados da população e os resistentes sobrevivem (BROWN, 1986). O processo de elucidação das bases moleculares relacionadas com a resistência tem contado com informações sobre os genomas de *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* disponíveis em bases de dados, tais como o *GenBank* e o *TIGR* (ADAMS et al., 2000; ARENSBURGER et al., 2010; HEMINGWAY et al., 2004; HOLT et al., 2002; NENE et al., 2007). Estudos envolvendo biologia molecular representam hoje um dos caminhos mais promissores para a caracterização da resistência a inseticidas químicos (BLACK et al., 2008; STRODE et al., 2008).

O monitoramento da susceptibilidade de populações brasileiras de *A. aegypti* aos inseticidas empregados no âmbito do PNCD foi iniciado em 1999 com a formação da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência do *Aedes aegypti* a inseticidas (Rede MoReNAa). Os registros de resistência aos organofosforados (temephos e malathion) iniciaram em 2001 e aos diferentes piretróides (cipermetrina e deltametrina) em 2003, em municípios de todas as

regiões do país (BRAGA et al., 2004; DA-CUNHA et al., 2005; LIMA et al., 2003; MACORIS et al., 1999; MACORIS et al., 2003).

Como alternativa para o manejo da resistência, produtos larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis* sorovariedade *israelensis* (Bti), bactéria patogênica para alguns dípteros aquáticos, entre eles, os culicídeos, foram utilizados a partir de 2001 em algumas localidades do país, em substituição ao temephos (BRAGA; VALLE, 2007b). Mais recentemente, em 2009/2010 inseticidas químicos com ação reguladora do crescimento de insetos (IGR), como os inibidores da síntese de quitina (ISQ), pertencentes ao grupo das benzoil-fenil-uréias (BPU's), foram recomendados pelo PNCD para substituir ambos, temephos e Bti, o primeiro devido à resistência e o segundo devido à redução de custos do programa. Produtos como o diflubenzuron e novaluron estão sendo utilizados em campo, sem a realização prévia de estudos que caracterizem a linha de base da susceptibilidade das populações brasileiras de *A. aegypti*. Além de poucos estudos realizados no Brasil, um número reduzido de municípios são monitorados quanto à resistência a estes compostos pela Rede MoReNAa. Atualmente, apenas 102 municípios sentinelas e estratégicos, entre os 5.560 municípios brasileiros, são monitorados por esta rede (BRAGA; VALLE, 2007b). Este reduzido número de municípios está relacionado à capacidade técnica para execução dos testes de diagnóstico da resistência, realizados na atualidade por apenas três laboratórios de referências no país, o Serviço de Referência para Controle de Culicídeos Vetores (SRCCV) em Recife/PE, o Laboratório de Superintendência de Controle de Endemias (SUSCEN) em Marília/SP e o Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária localizado na Universidade Federal do Paraná.

Com o esforço empreendido para o monitoramento da resistência aos inseticidas químicos no PNCD, até meados de 2007, o desconhecimento sobre aspectos práticos relacionados aos efeitos da resistência sobre a efetividade de controle das populações de *A. aegypti* de campo, retardou a adoção de mudanças operacionais necessárias ao manejo entre os compostos, e favoreceu a disseminação da resistência nas populações de mosquitos do país. Assim, o presente projeto se propôs a avaliar a susceptibilidade de populações naturais de *A. aegypti* do estado de Pernambuco aos inseticidas utilizados em seu controle e avaliar os possíveis mecanismos de resistência a estes inseticidas, para trazer informações úteis ao manejo da resistência a estes compostos e sua utilização efetiva e racional em campo.

2 JUSTIFICATIVA

O uso indiscriminado de inseticidas químicos para o controle de *A. aegypti* tem contribuído para a seleção de indivíduos resistentes, tornando cada vez mais difícil continuar com esta prática, para tentar atingir níveis adequados e sustentáveis de redução populacional do mosquito, sobretudo em áreas onde há transmissão do vírus dengue. O monitoramento da susceptibilidade de *A. aegypti* aos inseticidas químicos empregados no PNCD, realizado no Brasil desde 1999, demonstra resultados preocupantes, pois revelam que em aproximadamente 90% dos municípios sentinelas as populações estão resistentes ao inseticida organofosforado temephos e a maioria também está resistente aos piretróides.

O monitoramento da resistência e seu manejo são estratégias que poderiam ter prevenido a seleção dos indivíduos que portam genes que conferem resistência nas populações alvo, e promovido a substituição em tempo hábil dos produtos usados no programa. Uma das principais razões que justificam a prevenção da resistência ou seu manejo, além da garantia de efetividade de controle, é o custo elevado para o desenvolvimento de uma molécula com propriedades inseticidas. Estima-se que seja necessária a investigação de milhares de substâncias para encontrar uma candidata que apresente os atributos relacionados a eficácia, eficiência, baixo custo e baixa toxicidade para o homem e outros animais.

A detecção/quantificação da resistência aos inseticidas através de ensaios *in vivo* continua sendo a forma mais utilizada para a tomada de decisão quanto à permanência ou não de uso de um composto em campo. Entretanto, tais ensaios não trazem informações sobre os mecanismos potencialmente envolvidos com a resistência, bem como sua base genética. Assim, a análise molecular de genes de resistência representa um campo bastante promissor na busca de métodos mais avançados para compreender, caracterizar e monitorar a resistência em populações naturais de *A. aegypti*.

Atualmente, o PNCD monitora apenas quatro dos 185 municípios pernambucanos quanto à susceptibilidade de suas populações de *A. aegypti*, todas com comprovada resistência ao temephos e à cipermetrina. Em alguns municípios da Região Metropolitana, como Recife, Jaboatão dos Guararapes, Paulista, Abreu e Lima e Moreno, o manejo da resistência ao temephos teve início em 2002/2003, entretanto este composto continuou a ser utilizado nos demais municípios do Estado até meados de 2011. Assim, um estudo abrangendo a investigação da resistência de populações de *A. aegypti* ao temephos em outros municípios pernambucanos seria de grande relevância para o entendimento da distribuição da resistência e sua relação com o tempo e quantidade de produto utilizado em campo. Tais informações

instrumentalizariam com subsídios técnicos, os gestores locais do PNCD, na tomada de decisão quanto ao uso do inseticida mais adequado para o controle do mosquito.

3 PERGUNTA CONDUTORA

As populações de *Aedes aegypti* provenientes de municípios do Estado de Pernambuco estão resistentes aos inseticidas químicos usados para seu controle?

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o nível de susceptibilidade de populações de *Aedes aegypti* aos inseticidas químicos empregados no PNCD, em municípios do estado de Pernambuco, e investigar os possíveis mecanismos envolvidos com a resistência a estes compostos.

4.2 Específicos

- a) Investigar o perfil de susceptibilidade das populações ao larvicida organofosforado temephos e ao adulticida piretróide cipermetrina;
- b) Estabelecer o padrão de distribuição da resistência em municípios pernambucanos associando-o ao histórico de utilização local destes compostos;
- c) Construir uma linha de base dose-resposta para o diflubenzuron a partir das populações estudadas;
- d) Avaliar o perfil de enzimas relacionadas à resistência a inseticidas nas diferentes populações;
- e) Investigar a presença das mutações no gene do canal de sódio, nos sítios 982, 1011, 1014 e 1016 relacionadas com a resistência do tipo *Knockdown* (Kdr) nas populações resistentes à cipermetrina.

5 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

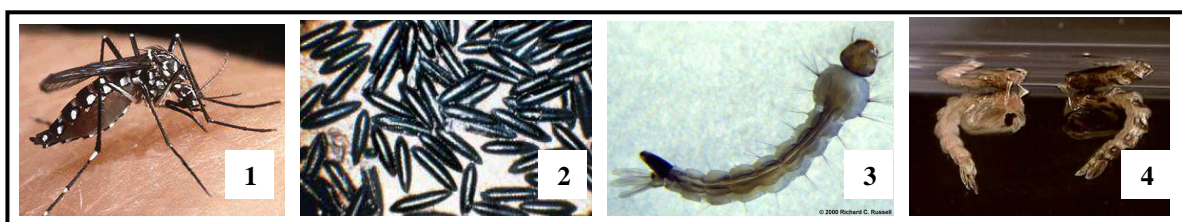
5.1 O mosquito *Aedes aegypti* e sua importância epidemiológica

Aedes aegypti Linnaeus, 1762 é um díptero da família Culicidae, originário da Etiópia na África, que se dispersou para áreas onde a ocupação e organização do espaço geográfico, bem como o clima favoreceram a sua proliferação (FORATTINI, 1962, 1965). Encontra-se distribuído nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo (CLEMENTS, 1992; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 1962, 1965).

Esta espécie está extremamente adaptada ao ambiente urbano, onde utiliza uma variedade de recipientes como caixas d'água, tanques, tonéis, barris e jarras, destinados ao armazenamento permanente ou temporário de água potável, além de outros objetos como garrafas, pneus e vasos de plantas, preenchidos por água como local para o desenvolvimento de suas formas imaturas (FORATTINI, 1965).

O ciclo biológico do mosquito compreende as fases de ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto (Figura 1). As fêmeas são preferencialmente antropofílicas e os picos de atividade hematofágica ocorrem durante o crepúsculo matutino e vespertino (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Após realizarem o repasto sangüíneo necessário à maturação de seus ovos, as fêmeas repousam e ao final da digestão procuram os sítios para oviposição. A maior atividade de oviposição ocorre nas primeiras horas do dia e ao anoitecer (CLEMENTS, 1999).

Figura 1- Ciclo evolutivo de *Aedes aegypti*.



Fonte: (1) Munstermann (1995), (2) Moehlecke (2008), (3) Russell (2000), (4) Vieira (2008).

Legenda: (1) mosquito adulto; (2) ovos; (3) larva; (4) pupas.

Os ovos são depositados isoladamente nas paredes internas dos criadouros. A quantidade de ovos postos por fêmea/ciclo gonadotrófico pode variar bastante, com médias que vão de 30 até 90 ovos (ALMEIDA, 2003; BRIEGEL, 1990; CANYON; HII; MULLER, 1999). Após o período embrionário de aproximadamente três dias, as larvas eclodem e se alimentam continuamente no meio aquático como filtradoras não seletivas de partículas e

raspadoras de superfície. Completam o seu desenvolvimento até a fase de adulta em um período entre 8 e 15 dias, a depender da disponibilidade de alimento no criadouro, dentre outros fatores. Em condições ambientais adversas, como a perda progressiva de água nos criadouros, os ovos podem entrar em quiescência, que consiste em um período de interrupção do processo de eclosão das larvas promovido pela redução drástica da umidade do microambiente, e permanecer viáveis no ambiente por mais de um ano (SILVA; SILVA, 1999; SOTA; MOGI, 1992a, 1992b). A quiescência dos ovos é uma característica biológica que favorece a permanência da espécie no ambiente. Em alguns casos ocorre a dispersão destes ovos de forma passiva em recipientes que são levados de alguns locais para outros, sendo possível sua eclosão quando as condições se tornam favoráveis. (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; SILVA; SILVA, 1999).

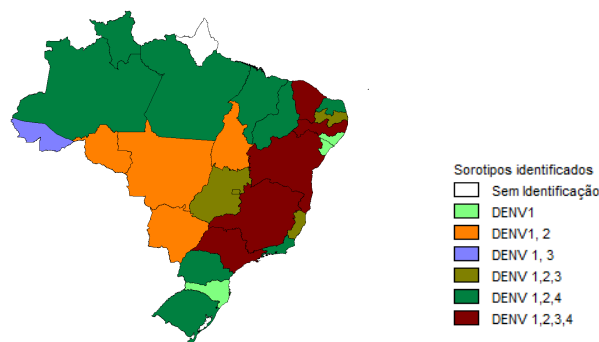
A. aegypti é o principal responsável pela manutenção do ciclo de transmissão da dengue em áreas urbanas na maioria dos países de ocorrência endêmica da doença (HENCHAL; PUTNAK, 1990). As fêmeas, uma vez infectadas, após o período de incubação extrínseco, permanecem transmitindo o vírus para hospedeiros humanos durante a hematofagia. Existe também a ocorrência de transmissão vertical, a um percentual dos seus descendentes. Ao longo de sua vida, a fêmea infectada transmite verticalmente os vírus a uma parcela dos seus descendentes por via transovariana (JOSHI; SINGHI; CHAUDHARY, 1996).

Esta espécie de mosquito havia sido considerada erradicada do território brasileiro na década de 50, no entanto a partir do seu ressurgimento no estado do Pará e disseminação entre 1976-1977 no Rio de Janeiro e Salvador, houve uma dispersão para os demais estados (PONTES; RUFFINO-NETO, 1994). Em 1998 todos os estados brasileiros estavam infestados pelo *A. aegypti* e em 23 deles a transmissão viral já estava estabelecida, com circulação simultânea dos sorotipos 1 e 2 em 19 estados, localizados, sobretudo nas regiões Nordeste e Sudeste do país (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999).

Um fato que agravou a situação epidemiológica da dengue no Brasil foi a re-introdução do sorotipo viral 4 (DENV-4), detectado inicialmente em três pacientes da cidade de Manaus no ano de 2008 (FIGUEIREDO et al., 2008), e em 2010 foi detectado em Boa Vista/Roraima (TEMPORÃO et al., 2011). No Nordeste, nos estados da Bahia, Ceará e Pernambuco e no Sudeste no estado do Rio de Janeiro o DENV-4 foi diagnosticado em 2011 (BRASIL, 2011; NOGUEIRA; EPPINGHAUS, 2011). Segundo dados divulgados em 2013, o número de casos de dengue quase triplicou em relação ao mesmo período de 2012. Em primeiro de Janeiro a dezesseis de fevereiro do ano de 2012 foram registrados 70.489 casos e

neste mesmo período em 2013, 204.650 mil casos, representando um aumento de 190% (BRASIL, 2013). A co-circulação dos quatro sorotipos (Figura 2) caracteriza uma situação de hiperendemicidade que pode aumentar ainda mais o número de casos graves da doença nos próximos anos, no Brasil (BRASIL, 2011).

Figura 2- Distribuição dos sorotipos do vírus dengue nos estados brasileiros no período de janeiro a agosto de 2011.



Fonte: Brasil (2011)

O aumento no número de pessoas infectadas evidencia as dificuldades em manter sob controle doenças virais como a dengue, que apresentam alta velocidade de propagação e inexistência de vacina capaz de proteger as populações humanas (GUBLER; CLARK, 1995). Por este motivo, as estratégias de controle estão centradas na eliminação do mosquito vetor, elo considerado vulnerável na cadeia epidemiológica da dengue. Neste contexto, a vigilância entomológica passa a ser um componente essencial nos programas de controle de vetores, pois é responsável pelo monitoramento da distribuição espaço-temporal do mosquito nas áreas, pela identificação/caracterização dos principais criadouros, avaliação da susceptibilidade da espécie-alvo aos agentes químicos ou biológicos usados para seu controle e o acompanhamento da efetividade das ações na redução populacional do mosquito (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1995a).

Apesar de *A. aegypti* ser também a principal espécie de mosquito implicada no ciclo de transmissão da febre amarela urbana no Brasil, desde 1942 não há registro de casos desta doença (VASCONCELOS et al., 2001). No ciclo silvestre, a febre amarela continua sendo transmitida por mosquitos dos gêneros *Haemagogus* (*H. janthinomys* e *H. albomaculatus*) e *Sabethes* (*S. chloropterus*), e a principal fonte de infecção são primatas não humanos (DEGALLIER et al., 1992). Os seres humanos podem infectar-se acidentalmente, ao entrar em áreas enzoóticas. Diferentemente da dengue, existe uma vacina para a febre amarela, que é

produzida pelo Laboratório Bio-Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz (Ministério da Saúde), comprovadamente eficaz e que tem sido utilizada nas campanhas de imunização. Seu efeito protetor inicia-se no décimo dia pós-vacinal e permanece, por no mínimo, dez anos (TAUIL, 2010). O controle de *A. aegypti* também se tornou um dos desafios para manter a ausência de casos do ciclo urbano da febre amarela, prevenindo assim sua reurbanização, visto que não há consenso sobre a necessidade de vacinação de toda população (TAUIL, 2010).

5.2 Histórico do controle do *Aedes aegypti* no Brasil

As primeiras ações para eliminação do mosquito *A. aegypti* no Brasil ocorreram nas décadas de 1930 e 1940, como parte da campanha para erradicação da febre amarela das Américas, incentivada pela Fundação Rockefeller (LOWY, 1990). Esta organização, em acordo com o Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP), executou estratégias para a erradicação de *A. aegypti* atuando principalmente nas regiões Norte e Nordeste, onde a febre amarela havia permanecido endêmica após uma primeira campanha pública contra esta doença, liderada por Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro de 1902 a 1907 (DONALÍSIO, 1999; LOWY, 1990).

O mosquito foi considerado eliminado em quase toda a América até o final da década de 1950, com exceção dos Estados Unidos, Suriname, Venezuela, Cuba, Jamaica, Haiti, República Dominicana e uma pequena parte da Colômbia (SOPER, 1965). Em 1955, o Brasil foi considerado livre desta espécie. Poucos anos depois novos focos do mosquito foram encontrados na zona rural do município de Santa Terezinha na Bahia e em seguida nos Estados do Pará e do Maranhão (FRANCO, 1969). Em 1973, novamente este vetor foi considerado erradicado do território brasileiro (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; NOBRE; ANTEZANA; TAUIL, 1994). Mais uma vez por pouco tempo, pois, três anos depois foram encontrados novos focos no Rio Grande do Norte e no Rio de Janeiro, provavelmente por falhas na vigilância entomológica e pelas mudanças sociais e ambientais ocasionadas pela urbanização acelerada (BRASIL, 2003). A partir deste momento o Ministério da Saúde (MS) implementou campanhas esporádicas para o controle de *A. aegypti*, sem que houvesse ainda registros oficiais de casos de dengue (BRAGA; VALLE, 2007a).

Ações coordenadas de combate a dengue passaram a ser executadas pela então recém-criada FUNASA (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE), em 1990, após esta doença adquirir importância epidemiológica. Em 1996, foi elaborado pelo MS o Plano para

Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa), cuja principal preocupação eram os casos de dengue hemorrágica, que poderiam levar à morte (BRAGA; VALLE, 2007b). Durante os três primeiros anos de implantação do PEAa, 3.701 municípios foram conveniados, o MS investiu mais de um bilhão de reais nessas localidades. Estes recursos foram aplicados, sobretudo na compra de inseticidas, aquisição de veículos e equipamentos para sua aplicação nos ambientes urbanos e contratação e capacitação de recursos humanos para a execução das atividades de controle em campo (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001). Outros componentes também essenciais para o êxito das ações de eliminação do mosquito não receberam igual atenção, entre eles o saneamento básico, o abastecimento de água, o recolhimento de resíduos sólidos, a educação ambiental, a disponibilização de informações para a população e a mobilização social para enfrentamento do problema. Todos estes fatores somados às novas realidades e complexidades de ocupação dos espaços geográficos levaram a um rápido avanço da infestação pelo mosquito e ao aumento do número de casos de dengue, revelando que a implementação do PEAa não havia alcançado o êxito esperado (BARBOSA DA SILVA et al., 2002; BRAGA; VALLE, 2007b; TEIXEIRA; BARRETO; GUERRA, 1999).

O MS modificou a abordagem de erradicação para controle, com o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD), que focalizou as ações em municípios considerados prioritários, selecionados considerando as seguintes características: a) capital de Estado, incluindo sua região metropolitana; b) população igual ou superior a 50.000 habitantes; c) propensão à introdução de novos sorotipos de dengue; e d) concentração de um grande número de casos da doença e elevada infestação por *A. aegypti* nos anos de 2000-2001 (BARBOSA DA SILVA et al., 2002; BRAGA; VALLE, 2007b).

Em 2002, outros aspectos foram modificados e sugerida uma nova versão, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que incluiu algumas propostas do PIACD e planejou melhorias relacionadas à: 1) a elaboração de campanhas informativas com a participação social e responsabilização familiar na manutenção de um ambiente doméstico livre de potenciais criadouros do vetor; 2) inserção de instrumentos na vigilância epidemiológica e entomológica para favorecer a capacidade de predição e detecção precoce dos surtos da doença, bem como a melhoria da qualidade do trabalho de campo no combate ao vetor; 3) legalidade na ação do poder público para eliminação de criadouros em casas abandonadas, imóveis comerciais, etc.; 4) condições sanitárias adequadas à destinação de resíduos sólidos e à utilização de recipientes seguros no armazenamento de água; 5) atuação multissetorial; 6) mobilização de recursos humanos de outros Programas como os de Agentes Comunitários de Saúde (PACS) e do Programa Saúde da Família (PSF) para atuação

integrada tanto no controle da dengue, como na atenção básica; 7) executar de forma permanente ações de controle do mosquito, diante da impossibilidade de erradicação do mesmo; e 8) desenvolver instrumentos capazes de acompanhar e supervisionar as ações desenvolvidas pelo nível federal, estadual e municipal (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Atualmente o MS investe cerca de 900 milhões de dólares por ano no PNCD, voltados principalmente para campanhas publicitárias (produção, veiculação e ações de mobilização), bem como para a aquisição de equipamentos e insumos, visando a aplicação de produtos inseticidas (BARRETO et al., 2011).

5.3 Histórico do uso de inseticidas químicos no Brasil para o controle de *Aedes aegypti*

As primeiras estratégias de controle do *A. aegypti* adotadas no Brasil nas décadas de 30 e 40, estavam essencialmente baseadas no uso de produtos químicos. O composto Verde de Paris, um aceto arsenito de cobre ($\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_{23}\text{Cu}(\text{AsO}_2)_2$), inseticida sintético inorgânico altamente tóxico, foi utilizado em depósitos de água, visando eliminar as larvas deste vetor (SOPER, 1965). Neste período, foi considerado que *A. aegypti* foi erradicado do Brasil. Durante a Segunda Guerra Mundial surgiu a “Era química”, que inovava com o uso de inseticidas sintéticos orgânicos. O principal deles o DDT (1,1,1-tri-cloro-di-(4-clorofenil)etano) foi o primeiro inseticida utilizado com efeito prolongado, apresentando amplo espectro de atividade e baixo custo, favorecendo seu uso por muitos anos (ROZENDAAL, 1997). No Brasil, este inseticida foi usado intensivamente na década de 60, visando além do controle de *Aedes*, outros gêneros de vetores como *Anopheles* e *Lutzomyia* (OLIVEIRA FILHO, 1997). Em 1967, a eliminação do *A. aegypti* com o uso do DDT havia sido considerada um sucesso, até o reaparecimento do mosquito no estado do Pará. Neste mesmo período já se fazia uso, em outros países, do grupo de inseticida organofosforado. Este havia sido desenvolvido na década de 40, e passou a substituir os organoclorados no controle de algumas espécies de insetos que já apresentavam populações resistentes (CRINNION, 2000). Ainda assim, o uso dos organoclorados só foi proibido definitivamente no Brasil apenas em 1985, para uso agrícola, e continuou permitido em campanhas de saúde pública até 1994 (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002).

Desde que o Brasil começou a utilizar os organofosforados, fez seu uso quase que exclusivo por 20 anos. Em 1986, com o surto de casos de dengue, o uso destes produtos foi intensificado e, como consequência, populações de *A. aegypti* resistentes aos compostos, têm

sido detectadas em municípios de todo país. O temephos, utilizado como larvicida, é o principal representante deste grupo, registrado nos EUA em 1965 e aplicado na agricultura e na saúde pública. No controle de adultos estão principalmente representados o malathion e fenitrothion (CHAVASSE; YAP, 1997). Os primeiros casos de alteração na susceptibilidade em populações de *A. aegypti* ao temephos foram detectados em 1999, inicialmente baseados em relatos dos agentes sanitários que observaram, em campo, a perda da atividade residual do produto (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999; MACORIS et al., 1999; MONTELLA et al., 2007).

Ainda em 1999, foi criada a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência do *Aedes aegypti* a Inseticidas (Rede MoReNAa), coordenada pelo MS, responsável pelo monitoramento da susceptibilidade de populações de *A. aegypti* aos inseticidas químicos, larvicidas e adulticidas, empregados em seu controle.

Inicialmente 72 municípios eram monitorados pela Rede, que incluíam as capitais de todos os estados e municípios de importância epidemiológica ou entomológica. As populações do mosquito de cada município eram submetidas a testes qualitativos, utilizando a dose diagnóstica do temephos e de alguns adulticidas (MACORIS et al., 1999; MONTELLA, 2008). As avaliações demonstraram que a maioria das populações foram classificadas como resistentes, de acordo com o critério estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (DAVIDSON; ZAHAR, 1973), e as substituições de produtos começaram a ser sugeridas (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1999; LIMA et al., 2003). O conjunto de dados obtidos pela Rede MoReNAa foi importante para que o MS pudesse definir novas estratégias de controle. Até então, os mecanismos relacionados com a resistência ainda não estavam sendo pesquisados (LIMA et al., 2003). Em 2001, houve uma segunda avaliação do status de susceptibilidade das populações de *A. aegypti* de municípios das regiões Nordeste e Sudeste, confirmando a resistência ao temephos (BRAGA et al., 2004). Uma das estratégias adotadas foi a substituição do temephos pelo larvicida biológico *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), em 2001, mas esta substituição ocorreu apenas em algumas das localidades onde foi detectada resistência. Houve também a substituição de adulticidas organofosforados por piretróides, com exceção do Estado de São Paulo, que já fazia uso de piretróides desde 1989 (MACORIS et al., 2007). O PNCD foi adquirindo, ao longo das reuniões técnicas, conhecimento sobre a dinâmica da resistência e pode aprimorar a implementação de novas metodologias, entre elas a publicação do Manual de Quantificação da Resistência através de ensaios bioquímicos, que foram incorporados na rotina da Rede em 2001, sendo possível

identificar o envolvimento de mecanismos metabólicos com a resistência (MONTELLA, 2008).

A continuidade do monitoramento das alterações de susceptibilidade a novos inseticidas incorporados no PNCD permitiu detectar populações de *A. aegypti* resistentes a alguns piretróides após três anos da sua introdução, de 2001 a 2003 (DA-CUNHA et al., 2005). Este grupo de inseticidas apresenta o mesmo mecanismo de ação do DDT, sugerindo a ocorrência de resistência cruzada, resultante da alteração do mesmo sítio de ação do inseticida (canal de sódio) ou do mecanismo de detoxificação enzimático, visto que as populações vetoras já haviam sido expostas anteriormente a este inseticida (BRAGA; VALLE, 2007b).

Em 2006, na reunião técnica do Ministério da Saúde e a Rede MoReNAa, com a avaliação dos resultados do monitoramento, foram modificados os critérios adotados para a substituição dos inseticidas. As substituições estavam ocorrendo tardiamente, quando a razão de resistência (RR), valor que estima o nível de resistência da população de campo em relação a uma susceptível de laboratório, estava acima de 10 vezes. Montella et al. (2007) confirmaram que a dosagem de inseticida usado em campo poderia estar sendo ineficiente para a eliminação completa das populações com resistência neste nível. Além disso, os dados de monitoramento revelavam que o processo de reversão da resistência pela simples substituição do inseticida poderia levar bastante tempo. Este e outros critérios foram modificados visando detectar a resistência mais precocemente, para evitar o aumento na pressão de seleção e a disseminação em campo (BRASIL, 2006b).

A principal estratégia de manejo da resistência aos inseticidas empregados no PNCD tem sido o uso de compostos com modo da ação distinto, inclusive agentes biológicos de controle. Produtos à base de Bti, bactéria entomopatogênica, foram utilizados como larvicidas para substituir o temephos de 2001 a 2009, em alguns municípios. Apesar de efetivo, hoje, o uso do Bti no Brasil está restrito a duas áreas, como o arquipélago de Fernando de Noronha, por ser área de proteção ambiental e no município de Recife, que utiliza recursos próprios para a compra deste produto. Atualmente o MS recomenda e distribui, para os municípios, produtos com ação reguladora do crescimento de insetos. A introdução destes produtos faz parte do esquema de rotatividade entre inseticidas preconizados pelo PNCD. O primeiro produto utilizado foi o diflubenzuron e mais recentemente o novaluron, compostos pertencentes ao grupo das benzoil-fenil-uréias (BPU) cujo mecanismo de ação afeta a biossíntese de quitina, e conseqüentemente a formação da cutícula do inseto (COHEN, 1987).

Atualmente 102 municípios sentinelas e estratégicos, dos 5.560 municípios brasileiros, são monitorados pela Rede MoReNAa. Este reduzido número de municípios está relacionado

à capacidade técnica para execução dos testes diagnósticos da resistência, realizados na atualidade por três laboratórios de referências no país (BRAGA; VALLE, 2007b). Em Pernambuco, o Serviço de Referência para o Controle de Culicídeos Vetores (SRCCV) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz-PE) é responsável pelo monitoramento das populações de *A. aegypti* a inseticidas químicos de amostras coletadas nos estados de Pernambuco (Recife, Araripina, Caruaru e Petrolina), Paraíba (João Pessoa e Patos), Maranhão (Bacabal) e Amapá (Macapá, Oiapoque).

5.4 Inseticidas químicos utilizados no controle de *Aedes aegypti*

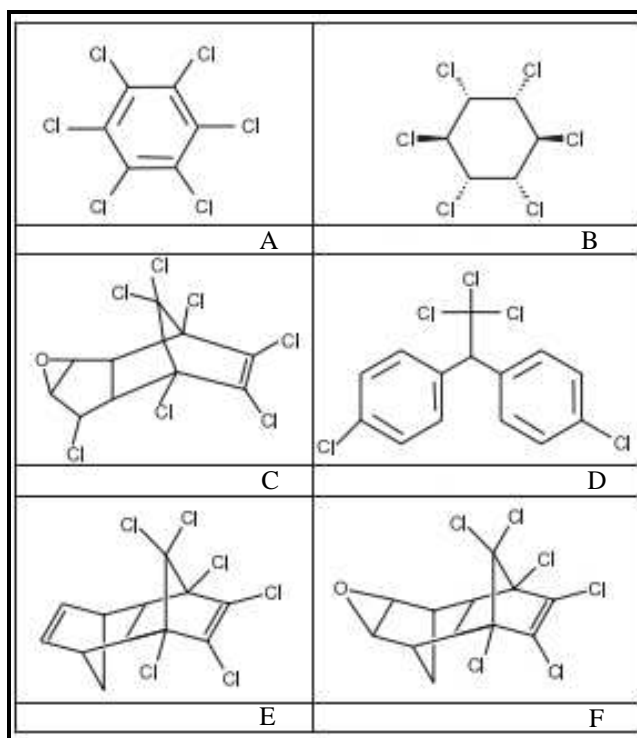
5.4.1 Organoclorados (OC)

Caracterizam-se por possuir em sua estrutura química, carbono, cloro e hidrogênio. Seu principal representante é o DDT (diclorodifeniltricloroetano), pertencente ao grupo derivado clorado difenil-etano, os outros quatro grupos são os hexaclorocicloexano (α -HCH, β -HCH, δ -HCH e γ -HCH ou lindano), os hexaclorobenzenos (HCBs), os ciclodienos (aldrin, dieldrin, heptacloro epoxide), os e os hidrocarbonetos clorados (dodecacloro, toxafeno, e clordecone) (MENONE et al., 2000). A figura 3 demonstra a estrutura química de alguns inseticidas deste grupo.

Este foi o primeiro grupo de inseticidas a ser utilizado, na década de 40, e uma de suas principais características é a alta persistência no ambiente devido a sua estabilidade química. O seu uso provocou a contaminação ambiental a longo prazo, através do acúmulo nas cadeias tróficas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007). Outro aspecto relevante é seu acúmulo nos tecidos dos organismos expostos, incluindo as pessoas que vivem em ambientes tratados com este composto (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2007). Apesar destes aspectos negativos foi sua alta persistência associada ao baixo custo que favoreceram seu uso por mais de 20 anos em programas de controle de insetos (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002). Seu modo de ação está relacionado com a alteração do balanço de íons no axônio dos neurônios. O sítio de ação do DDT e do BHC é o canal de sódio e potássio, agindo no desequilíbrio destes íons e como consequência permite a constante passagem do impulso nervoso (BLOOMQUIST, 2009). A ação dos ciclodienos, outra molécula deste grupo, ocorre nos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) um neurotransmissor inibitório, que permite a entrada de íons cloro na célula nervosa. A ligação deste inseticida no receptor GABA não permite que o cloro entre no neurônio e o impulso nervoso não é paralisado. Em

ambas as situações, os impulsos nervosos repetitivos culminam com a convulsão, paralisia, contrações musculares e morte do inseto (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002; DAVIES et al., 2007).

Figura 3- Estrutura química de inseticidas organoclorados.



Fonte: Rodrigues et al. (2007)

Legenda: Exemplos de estrutura química de inseticidas organoclorados, (A) lindano, (B) hexaclorobenzeno (HBC), (C) heptacloro epoxide, (D) DDT, (E) aldrin, (F) dieldrin.

5.4.2 Organofosforados (OF) e Carbamatos (CB)

Os OFs foram descobertos logo após os organoclorados (CRINNION, 2000). Este grupo age no inseto por contato e ingestão e estão incluídos nele todos os inseticidas que contenham fósforo. Apresentam uma baixa estabilidade e conseqüentemente baixa persistência no ambiente, porém uma maior toxicidade a vertebrados quando comparados aos OCs (BECKER et al., 2003). Os principais inseticidas representantes desta classe, empregados no controle de *A. aegypti*, são o malathion utilizado como adulticida e aplicado em UBV, e o temephos de aplicação focal, utilizado como larvicida (figura 4A). O temephos é o único do grupo aprovado pela Organização Mundial da Saúde para uso em água de

consumo humano, por ser de baixa toxicidade aguda e apresentar pouca persistência no ambiente (CHAVASSE; YAP, 1997).

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico, e os principais representantes são o bendiocarb e o propoxur (figura 4B). Estes compostos foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, a estrutura do princípio ativo foi proveniente de sementes de Calabar (*Physostigma venenosum*) e passaram a ser comercializados na década de 60. O modo de ação dos CBs é semelhante à dos inseticidas organofosforados, possuem um amplo espectro de atividade tóxica, com a vantagem de serem mais rapidamente degradados, o que diminui a toxicidade para mamíferos (BRAGA; VALLE, 2007b; WARE; WHITACRE, 2004). Para ambas as classes, o sítio de ação é a enzima acetilcolinesterase, responsável por hidrolisar acetilcolina, neurotransmissor pertencente às sinapses nervosas, em colina e ácido acético (figura 5), etapa essencial para cessar o impulso nervoso. Quando o inseto é susceptível ao inseticida, este age na acetilcolinesterase impedindo a hidrólise da acetilcolina, que fica então acumulada e permanece gerando o impulso nervoso. Desta forma, o inseto sofre com excitação, tremores e paralisias que culminam com sua morte (ELDEFRAWI et al., 1985). Quando há ação de OFs essa inibição é considerada praticamente irreversível, diferente dos CBs que agem neste mesmo alvo, e com o tempo, a inibição se torna reversível (TAYLOR, 1980).

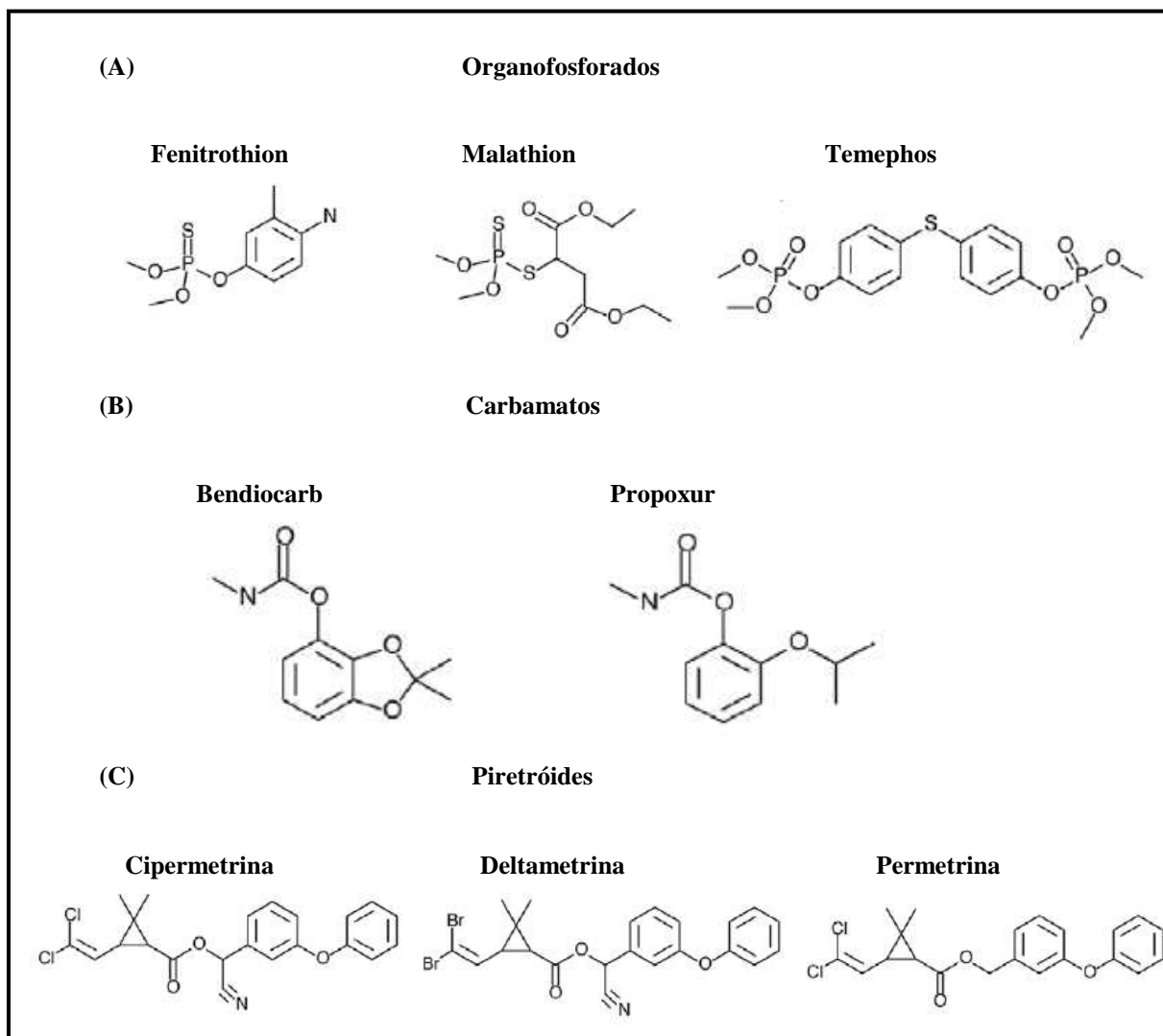
5.4.3 Piretróides (PI)

São compostos ésteres análogos sintéticos do ácido crisantêmico (piretróide tipo I) e do ácido pirétrico (piretróide tipo II) isolados do ápice da flor do *Chrysanthemum cinerariaefolium* e de outras espécies relacionadas (DAVIES et al., 2007; SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

O desenvolvimento de inseticidas deste grupo está representado por quatro gerações. Apenas na terceira geração nos anos de 1972 e 1973 foi produzida a permetrina, inicialmente voltada para aplicação agrícola. A quarta geração engloba os inseticidas mais utilizados e se caracterizam por apresentarem baixa toxicidade para mamíferos e reduzido impacto ambiental, como, por exemplo, a cipermetrina e deltametrina. Este grupo é efetivo em baixas doses e apresenta ação contra um largo espectro de insetos (WARE, 2000). Os Pis, assim como o DDT, atuam no sistema nervoso do inseto, alterando a função normal do canal de sódio (ELLIOTT, 1971; HEMINGWAY et al., 2004; NARAHASHI, 1985; RUIGT et al., 1987; VIJVERBERG; VAN DEN BERCKEN, 1990).

A classificação dos PIs em tipo I ou II está de acordo com sua estrutura química, pela ausência ou presença do grupamento alfa-ciano, respectivamente (NASUTI et al., 2003) (figura 4C).

Figura 4- Estrutura química de inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides.



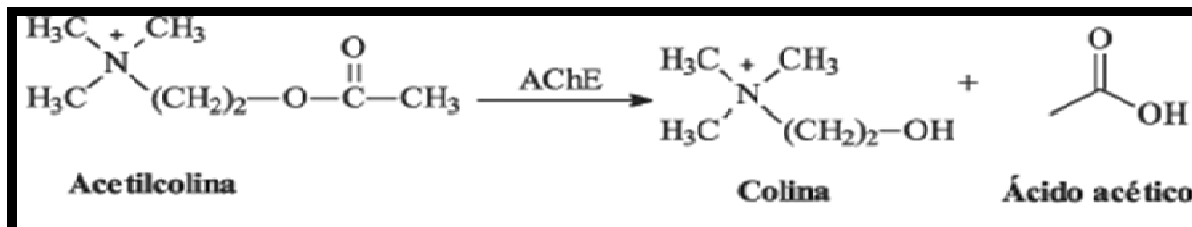
Fonte: Montella, Schama e Valle (2012), com modificações.

Legenda: Estrutura química de organofosforados (A), carbamatos (B), piretróides (C).

Os piretróides do tipo I (permetrina) agem principalmente no sistema nervoso periférico e apresentam maior potencial de efeito “*Knockdown*” (paralisa momentânea seguida de morte nos insetos), por conta dos disparos repetitivos no axônio que geram agitação, falta de coordenação, hiperatividade seguidos de paralisia. Os do tipo II (deltametrina, cipermetrina) causam uma pronunciada fase convulsiva que resulta na despolarização dos axônios de forma irreversível, causando a morte do inseto (BLOOMQUIST, 1996). O tempo de ação destes compostos mantendo o canal de sódio

conduzindo os íons sódio são diferentes, o tipo II apresenta tempo maior de ação favorecendo uma supressão no potencial de ação (DAVIES et al., 2007).

Figura 5- Reação de hidrólise pela enzima acetilcolinesterase que transforma o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético



Fonte: Santos e Donnici (2007).

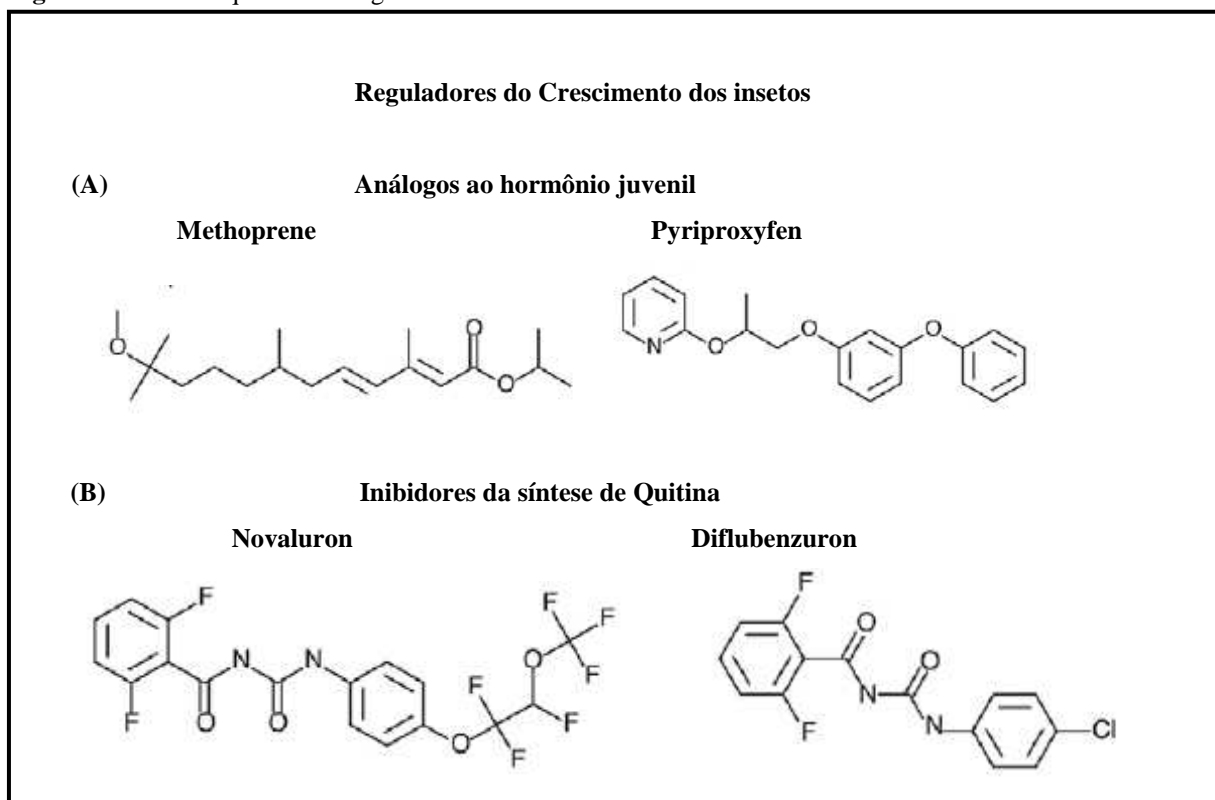
5.4.4 Reguladores do Crescimento de Insetos

Este grupo de inseticidas, diferentemente dos acima citados não agem no sistema nervoso dos insetos, eles são classificados como IGRs, que vem do inglês - *Insect Growth Regulators* e interferem no desenvolvimento e metamorfose dos insetos. Neste grupo se destacam os análogos ao hormônio juvenil (JHA- juvenile hormone analogue) (figura 6A), como o metopreno e o pyriproxyfen; e os inibidores da síntese de quitina (CSIs-chitin synthesis inhibitors), principalmente representados pelo novaluron e diflubenzuron (figura 6B) (GRAF, 1993). Os IGRs foram desenvolvidos na década de 70 e o metopreno, um dos mais antigos JHA, foi registrado em 1975. Dez anos depois, o CSI diflubenzuron, começou a ser testado no controle de mosquitos (ESTRADA; MULLA, 1986). Uma característica comum a estes compostos é o de não provocar mortalidade imediata das larvas, geralmente há mortalidade no estágio de pupa ou durante a emergência do adulto (GORDON; BURFORD, 1984; MULLA, 1995).

Os inibidores da síntese de quitina pertencem à família das BPU, que atuam impedindo a formação da quitina durante a metamorfose dos insetos. A quitina é o principal componente presente no exoesqueleto dos insetos e é formada por polímeros de N-acetilglucosamina (COHEN, 1987). A ação dos BPU evita a polimerização da N-acetilglucosamina, impedindo a estruturação do exoesqueleto, e como consequência ocasiona a morte de pupas, má formação e morte de adultos e, dependendo da concentração, também pode provocar a morte das larvas. As larvas podem não resistir ao aumento da pressão interna durante a metamorfose, pela ausência da quitina estruturada, não conseguindo sustentar os músculos durante a muda. Elas também perdem a capacidade de eliminar sua antiga exúvia,

ocorrendo mortalidade também por inanição (EISLER, 1992; GROSSCURT et al., 1988; MONDAL; PARWEEN, 2000). Outras conseqüências da ação dos BPU's são a diminuição da aptidão física e reprodutiva dos adultos decorrentes das larvas expostas a estes compostos, além de várias limitações fisiológicas (BELINATO et al., 2009; MONDAL; PARWEEN, 2000).

Figura 6- Estrutura química de reguladores do crescimento dos insetos.



Fonte: Montella, Schama e Valle (2012), com modificações.

Legenda: Inseticidas reguladores do crescimento de insetos, subdivididos em análogos ao hormônio juvenil (A) methoprene e pyriproxyfen e em inibidores da síntese de quitina (B) novaluron e diflubenzuron.

Os CSIs apresentam características como baixa toxicidade em mamíferos, bem como ausência de efeitos mutagênicos e teratogênicos (MONDAL; PARWEEN, 2000). No entanto, afetam adversamente um grande número de artrópodes além de fungos, que possuem quitina em sua formação estrutural. Alguns representantes deste grupo de inseticidas são o triflumuron, lufenuron, teflubenzuron, novaluron e diflubenzuron (EISLER, 1992).

O diflubenzuron (1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil)-uréia) foi o primeiro CSIs a ser sintetizado e utilizado no controle de insetos. Seu modo de ação se dá principalmente por ingestão, mas também por contato com o tegumento (GROSSCURT et al., 1988). Após a avaliação de sua toxicidade, este composto foi liberado pela Organização Mundial de Saúde para uso em água de consumo humano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008a).

No Brasil, o diflubenzuron passou a ser utilizado em 2009 para o controle de *A. aegypti* em substituição ao temephos e ao Bti. Desde 2011 seu uso está sendo alternado com o novaluron que também é aprovado junto a Organização Mundial de Saúde para uso em água potável (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008b.). Alguns estudos realizados utilizando o diflubenzuron (FOURNET; SANNIER; MONTENY, 1993; MARTINS; DA SILVA, 2004; SECCACINI et al., 2008; SILVA; MENDES, 2007) novaluron (FARNESI et al., 2012; FONTOURA et al., 2012; MULLA et al., 2003), triflumuron (BELINATO et al., 2013; MARTINS et al., 2008) e confirmam a eficácia destes compostos no controle de *A. aegypti*.

5.5 Mecanismos de resistência

A Organização Mundial de Saúde (1981) define resistência como “o desenvolvimento de uma habilidade em uma linhagem de algum organismo para tolerar doses de um produto tóxico que é letal para a maioria dos indivíduos em uma população normal da mesma espécie”. Segundo o Insecticide Resistance Action Committee (2011) a resistência é definida como a “seleção de uma característica hereditária em uma população de insetos que resulta na falha do produto inseticida repetitivamente, não proporcionando o nível pretendido de controle, mesmo quando usado como recomendado”. A resistência é um termo que relaciona a população resistente a uma população considerada susceptível. Segundo este comitê a detecção da resistência em determinado nível não implica necessariamente na impossibilidade de controlar a população resistente com o inseticida, ou seja, o relato de resistência a um inseticida não significa que este não seja mais útil, mas que uma parcela de indivíduos sobreviverá à exposição ao composto. Desta forma, a detecção precoce da resistência, bem como a identificação dos mecanismos envolvidos evitam as aplicações sucessivas do mesmo produto (SCOTT, 1995).

Os mecanismos de resistência são resultantes de mutações em genes que podem afetar as características fisiológicas ou comportamentais dos insetos. Isto significa que estas mudanças podem modificar o comportamento do inseto, levando-o a evitar o contato com os sítios tratados com o inseticida, podem aumentar também sua capacidade de eliminar o composto de seu organismo, causar alteração do sítio de ligação/ação do inseticida ou reduzir sua penetração por alteração na cutícula.

5.5.1 Resistência por penetração reduzida do inseticida

As modificações na cutícula dos insetos ou do epitélio digestivo parecem prevenir ou retardar a absorção e penetração dos inseticidas que agem por contato (INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE, 2011). Este mecanismo contribui para a redução da toxicidade do inseticida, que penetra lentamente no organismo do inseto, de forma que as quantidades absorvidas podem ser insuficientes para causar sua mortalidade ou permitem um tempo maior para a ação das enzimas de detoxificação. Um estudo realizado com *Musca domestica* utilizando o produto diazinon (OF) evidenciou aumento nas taxas de detoxificação deste inseticida em moscas que apresentaram diminuição em sua absorção via tegumento (FARNHAM; LORD; SAWICKI, 1965). Segundo Stone e Brown (1969) larvas de *Cx. pipiens fatigans*, resistentes ao fenthion, absorviam metade da quantidade deste inseticida, via tegumento, e metabolizavam duas vezes mais o inseticida, o convertendo em compostos menos tóxicos e mais solúveis em água, quando comparadas à colônia susceptível. O espessamento da cutícula já foi demonstrado como associado à resistência a piretróides em *An. funestus*, principal vetor da malária na África do Sul, no estudo realizado por Wood et al. (2010). Em *A. aegypti* a diminuição na absorção foi relacionada com a resistência ao malathion (MATSUMURA; BROWN, 1963). Os exemplos de mecanismos de penetração reduzida são limitados e poucos estudos conseguem relacionar esta característica, por exemplo, com a eficácia de detoxificação do mecanismo metabólico (PLAPP, 1976).

5.5.2 Resistência comportamental

Este tipo de resistência é descrito como a modificação no comportamento do inseto que passa a evitar o contato com os inseticidas, através de adaptações relacionadas com a herança genética (SPARKS et al., 1989). Este tipo de comportamento, que minimiza o contato do inseto com o inseticida, pode causar impactos na eficácia do produto, principalmente se o inseto apresenta mecanismos fisiológicos de resistência (RANSON et al., 2011). Com relação aos mosquitos, não há muitos estudos com este tipo de resistência. Roberts e Alecrim (1991) conseguiram demonstrar que *An. darlingi* evitava repousar em paredes, após a aplicação de DDT no interior das habitações. Segundo Mathenge et al. (2001), espécies de *An. funestus* evitam entrar em casas que apresentam mosquiteiros impregnados com piretróides, em contrapartida *An. gambiae* e *An. Arabiensis* já não apresentam este tipo de comportamento, demonstrando que esta característica é bem variável entre as espécies estudadas.

5.5.3 Resistência metabólica

Existem três principais grupos de enzimas que são responsáveis pela resistência metabólica: glutationa-S-transferases (GSTs), esterases (ESTs) e oxidases de função mista (MFOs) (HEMINGWAY; RANSON, 2000). Em geral, estas enzimas estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos e podem ser divididas em enzimas de Fase I, como as oxidases de função mista e esterases, e enzimas de Fase 2, como as glutationa S-transferases. As enzimas de Fase I localizam e agem diretamente sobre o composto exógeno, introduzindo um grupamento polar reativo na molécula, originando um substrato para as enzimas de Fase II atuarem. Estas por sua vez, conjugam compostos que tornarão o produto mais solúvel em água e portanto, mais fácil de ser excretado das células durante a fase III de detoxificação (HEMINGWAY, 2000).

Alguns compostos xenobióticos como o herbicida atrazina, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como o fluoranteno e metais pesados, como o cobre, já foram demonstrados como metabolizados por algumas destas enzimas e sua presença no ambiente de desenvolvimento das larvas pode favorecer também a metabolização de inseticidas químicos. Neste estudo desenvolvido por Poupardin et al. (2008) foi verificado que há uma superexpressão de múltiplos genes *CYP* e de um gene de carboxilesterase na população de *A. aegypti* que foi submetida ao contato com estes xenobióticos, inclusive a mesma se apresentou mais tolerante ao temephos e a permetrina atribuída a indução cruzada do mecanismo metabólico. Estudos realizados com *M. domestica* utilizando os xenobióticos fenobarbital, cafeína e butóxido de piperonilo (PBO) também demonstraram um aumento na expressão de genes de detoxificação, incluindo os envolvidos no metabolismo de inseticidas (WILLOUGHBY; BATTERHAM; DABORN, 2007; WILLOUGHBY et al., 2006).

O aumento na atividade ou na quantidade das enzimas responsáveis pela metabolização de xenobióticos pode eliminar ou inativar o inseticida circulante, impedindo que este alcance o sistema nervoso, seu sítio final de ação (BROGDON; MCALLISTER, 1998b; HEMINGWAY; RANSON, 2000). Dentre os mecanismos de resistência metabólica, além da superexpressão, mutações, resultantes das trocas de aminoácidos, também podem interferir na atividade enzimática quanto sua capacidade de metabolizar xenobióticos.

Muitos genes e mutações diferentes podem estar envolvidos com a resistência metabólica, tais como as que conduzem à maior produção de enzimas, através de eventos de duplicação de genes ou no aumento das taxas de transcrição de genes ou mutações pontuais que conduzem a diferentes funções ou mudanças na especificidade do substrato (FFRENCH-

CONSTANT; DABORN; LE GOFF, 2004; HEMINGWAY et al., 2004; PERRY; BATTERHAM; DABORN, 2011). Há relatos de resistência de *Cx. quinquefasciatus* aos organofosforados devido à amplificação das cópias de um gene que codifica esterases, permitindo-lhes superproduzir este tipo de enzima (HAWKES; HEMINGWAY, 2002; RAYMOND et al., 1998). Em espécies de *Anopheles* resistentes ao malathion, são encontrados níveis elevados de uma forma alterada de esterase cuja capacidade de hidrólise é superior quando comparada a indivíduos susceptíveis (HEMINGWAY, 2000). Para *A. aegypti*, um estudo demonstrou que quando esta espécie não é mais submetida a exposição ao temephos, após 13 gerações, ocorre uma modificação no perfil populacional da atividade das GSTs, ESTs e MFOs que deixa de apresentar atividade metabólica alterada, e passa a apresentar atividade metabólica normal, acompanhado também pela diminuição da expressão de genes relacionados com a resistência (STRODE et al., 2012).

Atualmente, não há marcadores que possibilitem um diagnóstico completo dos mecanismos de resistência metabólica ou que avaliem a sua distribuição (MARTINS; VALLE, 2012). Os estudos atuais são baseados em ensaios bioquímicos (BRASIL, 2006a; MONTELLA et al., 2007) e, em menor extensão, pela análise de *microarrays*, (DAVID et al., 2005; STRODE et al., 2008; VONTAS et al., 2007). Devido a limitações técnicas, os relatos mais comuns são das respostas individuais de genes, como mutações pontuais que aumentam a capacidade de uma enzima específica na desintoxicação de um inseticida (ALON et al., 2008; LUMJUAN et al., 2011).

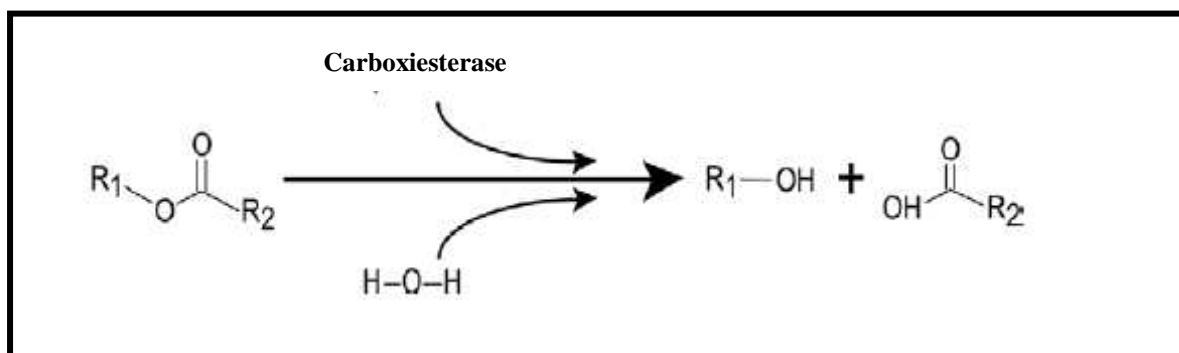
5.5.3.1 Esterases

As esterases são importantes no metabolismo, desenvolvimento e comportamento do inseto, suas funções principais estão relacionadas com a reprodução e digestão. Estas enzimas pertencentes à superfamília de α/β hidrolases que compreendem seis famílias de proteínas, as quais atuam num amplo espectro de inseticidas, por hidrolisarem as ligações ésteres destes compostos (OAKESHOTT et al., 1993). Existem quatro classes que subdividem as esterases: as acetilesterases, arilesterases, carboxilesterases e as colinesterases que incluem as acetilcolinesterases e as pseudocolinesterases (HEALY; DUMANCIC; OAKESHOTT, 1991).

Moléculas importantes, tais como feromônios e outros semioquímicos que apresentam ligação do tipo éster são hidrolisados por esterases gerando um ácido e um álcool como metabólitos (figura 7) (MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012). Na primeira fase da reação liberta-se o álcool como metabólito, neste processo, a enzima pode se tornar acilada, quando o

substrato é um éster carboxílico, carbamilada quando o substrato é um éster butílico ou fosforilada quando o substrato for um éster fosfórico. Na segunda fase, a afinidade do substrato pelas moléculas de água permite que a enzima retorne ao seu estado ativo e ocorra a liberação da molécula de ácido (MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012; RUSSELL et al., 2011; TESTA; KRAMER, 2007). Este passo de hidrólise da reação corresponde a um ataque nucleofílico da água sobre a enzima com a consequente liberação da porção de ácido do éster carboxílico e, da enzima que se tornará novamente livre e ativa (MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012; OLLIS et al., 1992; SOGORB; VILANOVA, 2002).

Figura 7- Ação da carboxiesterase, através da adição de água, que gera a clivagem do carboxiester, resultando em uma molécula de ácido e outra de álcool.

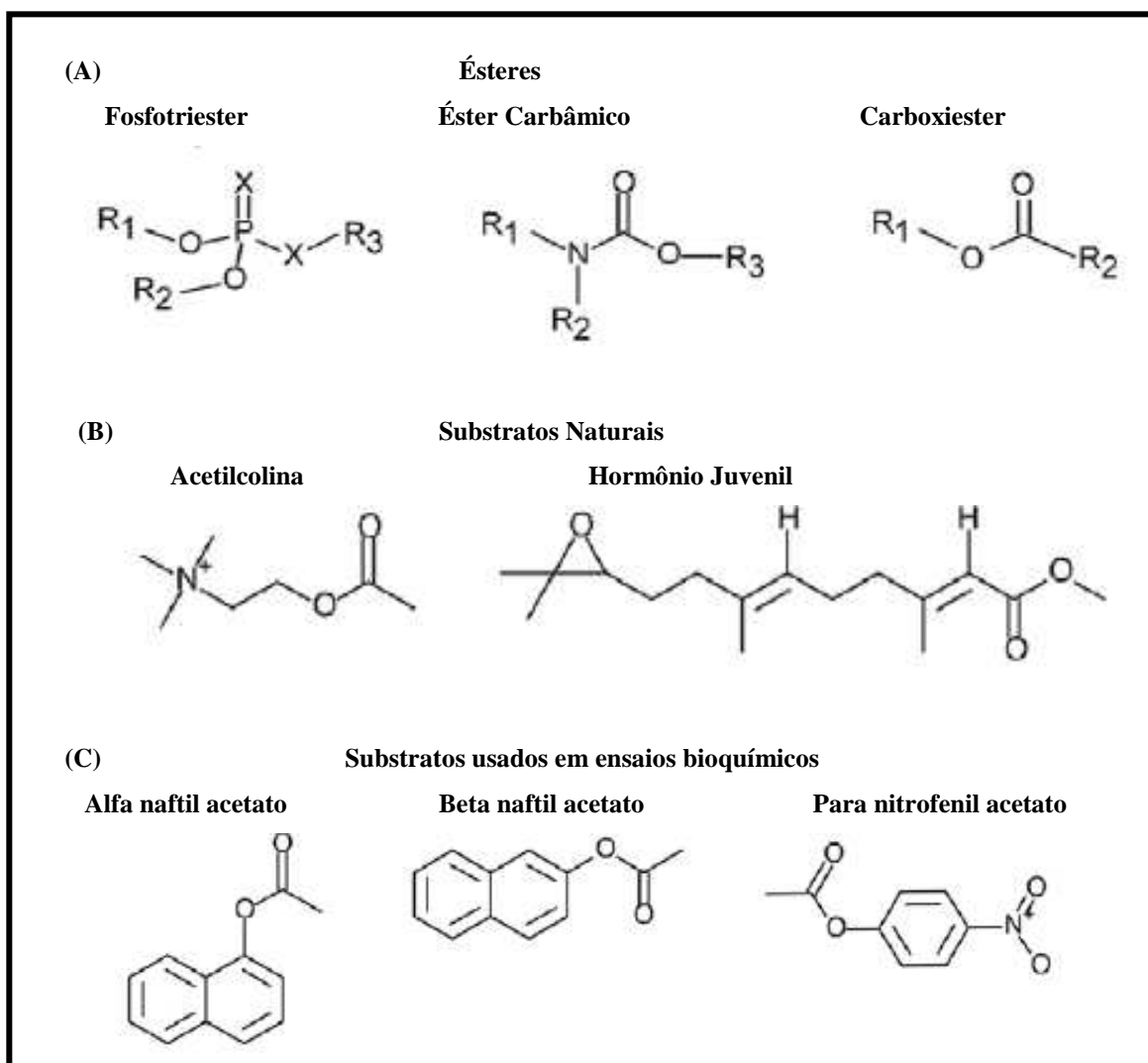


Fonte: Montella, Schama e Valle (2012).

As ESTs agem também sequestrando os inseticidas, dificultando sua chegada ao sítio de ação (HEMINGWAY, 2000). O sequestro do inseticida ocorre quando este serve como bom substrato para a primeira etapa do mecanismo de hidrólise, devido à ocorrência de uma ligação covalente entre a enzima e o substrato. Este mecanismo é comum para organofosforados. A enzima intermediária fosforilada, que se forma por meio da reação com a molécula de organofosforado, é mais estável do que as enzimas aciladas ou carbamilada, sendo assim a reação completa se torna mais lenta (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998; KETTERMAN; JAYAWARDENA; HEMINGWAY, 1992). Com base na sensibilidade aos substratos sintéticos que as esterases hidrolisam *in vitro*, dois grupos podem ser distinguidos nos insetos, as α -esterases que hidrolisam preferencialmente o α -naftil-acetato e as β -esterases que hidrolisam preferencialmente o β -naftil-acetato (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998). PNPA esterases, são esterases que hidrolisam preferencialmente para-nitrofenil acetato. Apesar deste substrato ser mais genérico que aqueles utilizados pelas α e β esterases, estas últimas enzimas parecem não hidrolisá-lo. Segundo Montella et al. (2007) o perfil das PNPA esterases é diferente dos perfis das α e β esterases, segundo estes autores as

PNPA esterases estão mais relacionadas com a metabolização de piretróides do que de organofosforados, sugerindo que estas enzimas pertencem a diferentes grupos moleculares, com diferentes funções fisiológicas. Alguns exemplos de substratos utilizados por esterases estão demonstrados na figura 8.

Figura 8- Estrutura química de substratos utilizados por esterases.



Fonte: Montella, Schama e Valle (2012), com modificações.

Legenda: (A) Exemplo de três substratos contendo ligação Ester; (B) Dois substratos naturais, a acetilcolina, substrato da acetilcolinesterase e o hormônio juvenil, substrato da esterase do hormônio juvenil; (C) Substratos utilizados em ensaios bioquímicos no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) para a detecção de alfa (alfa naftil acetato), beta (beta naftil acetato) e PNPA-esterases (Para nitrofenil acetato).

Várias são as pesquisas que relacionam as esterases com a resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos, e em menor escala, aos piretróides, que já foram relatadas para *A. aegypti* (BISSET et al., 2001; BISSET et al., 2011; FLORES et al., 2006; GEORGHIOU, 1994; HEMINGWAY; RANSON, 2000; LIMA et al., 2011; MONTELLA et

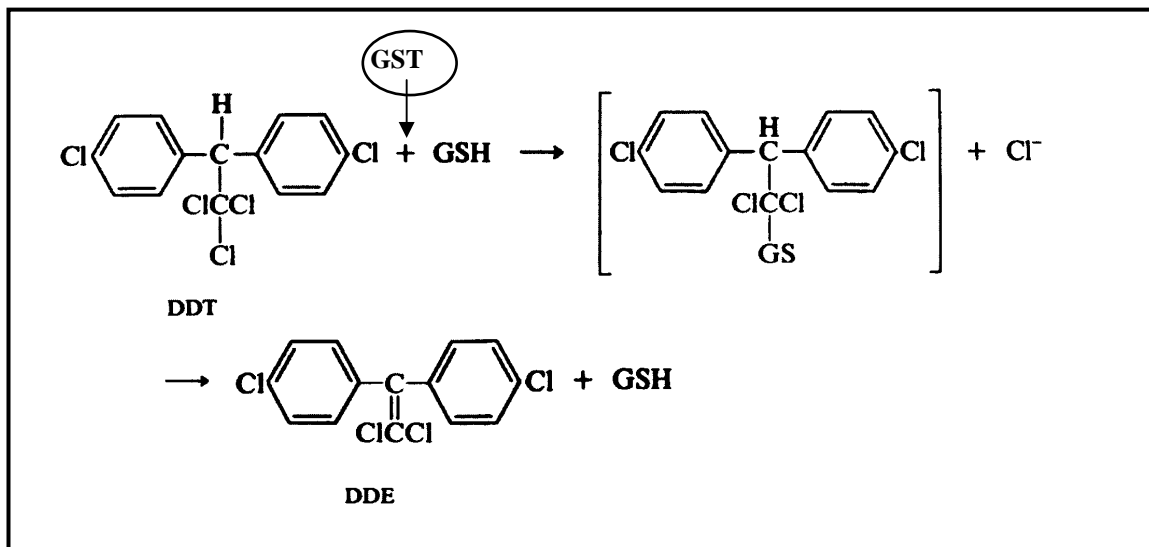
al., 2007). A resistência ao organofosforado temephos em *A. aegypti* associada com a atividade destas enzimas já foi relatada em vários locais como: Venezuela (MAZZARRI; GEORGHIOU, 1995), Tailândia (PAEPORN et al., 2003; SAELIM et al., 2005), Brasil (GAMBARRA et al., 2013; LIMA et al., 2011; MACORIS et al., 2003; MONTELLA et al., 2007), Colômbia (GRISALES et al., 2013; SANTACOLOMA; CHAVES; BROCHERO, 2012), Malásia (DHANG et al., 2008), El Salvador (LAZCANO et al., 2009), Ilhas Martinica (MARCOMBE et al., 2012), Trinidad (POLSON et al., 2011), Costa Rica (BISSET et al., 2013) e Cuba (RODRIGUEZ et al., 2002; RODRIGUEZ; BISSET; FERNANDEZ, 2007).

5.5.3.2 Glutathione S-transferases

As glutathione S-transferases (GSTs) fazem parte de uma família de enzimas da superfamília transferases, amplamente encontrada em eucariontes e procariontes aeróbicos (SHEEHAN et al., 2001). Existem três famílias de GST bastante conhecidas nos eucariotos: microsomais, citosólicas (ocorrem no citoplasma, também conhecidas como GSTs solúveis) e mitocondriais (PEARSON, 2005). Apenas as GSTs citosólicas estão relacionadas com a resistência a inseticidas (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; HEMINGWAY et al., 2004; RANSON; HEMINGWAY, 2005). Há seis classes de GSTs citosólicas identificadas em dípteros: delta, epsilon, omega, sigma, teta e zeta. As maiores e específicas para artrópodes são a delta e a epsilon e esta última é a principal classe relacionada com a resistência a inseticidas químicos (RANSON et al., 2001).

Nas reações catalisadas pelas GSTs, ocorre a conjugação de uma molécula de glutathione (GSH) com o substrato, que formam um tioéster. A reação se processa através da ativação do grupo tiol de GSH pela ligação com o substrato (ATKINS et al., 1993). Esta conjugação torna o substrato mais solúvel em água e, portanto, será mais facilmente excretado da célula. GSH é um tripeptídeo (γ -Glutamato-Cisteína-Glicina) que está presente em altas concentrações intracelulares e ocupam os sítio de ligação da GST (BOARD et al., 1995). A atividade das GSTs relacionada com a resistência tem sido atribuída ao aumento na quantidade destas enzimas, seja como resultado de amplificação gênica ou, mais comumente, por meio de aumentos na taxa de transcrição, em vez de mudanças estruturais nas enzimas (GRANT; HAMMOCK, 1992; RANSON et al., 2001). Um dos mecanismos de detoxificação do inseticida DDT pela atividade de GSTs é a desidrocloração, que resulta na eliminação de cloro para gerar DDE, sendo este menos tóxico para o inseto (figura 9) (CLARK; SHAMAAN, 1984; ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005).

Figura 9- Conjugação da glutatona (GSH) com o inseticida organoclorado dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), através da glutatona S-transferase (GST) resultando na desidrocloração e consequente formação do dicloro-difenil-dicloroetileno (DDE) composto menos tóxico para insetos.



Fonte: Enayati et al. (2005), com modificações

Diversos estudos tem demonstrado a relação da atividade das GSTs com a resistência a piretróides em *A. aegypti* (GRANT; MATSUMURA, 1989), *Tribolium castaneum* (REIDY et al., 1990), *Spodoptera littoralis* (LAGADIC et al., 1993) e *Cx. quinquefasciatus* (XU et al., 2005). Para esta última espécie, este estudo utilizou inibidores de GST (por exemplo, maleato de dietilo) e sugeriu que a atividade destas enzimas contribui na resistência à permetrina (XU et al., 2005). As GSTs podem proteger os insetos contra a toxicidade de piretróides através de um processo de seqüestro passivo (KOSTAROPOULOS et al., 2001). A função das GSTs também está relacionada à sua capacidade de reduzir os produtos de peroxidação lipídica produzidos pelos piretróides (VONTAS et al., 2002). GSTs que utilizam o produto da peroxidação de lipídeos (LPO) como substrato têm sido relatadas em *Drosophila melanogaster* (SAWICKI et al., 2003; SINGH et al., 2001). O estresse oxidativo, induzido pela exposição aos inseticidas, contribui para defesa antioxidante através da prevenção e reparo de danos dos produtos secundários, gerados pelos radicais livres de oxigênio (ROS), pela conjugação direta de trans-4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), um dos principais produtos finais de LPO (DING et al., 2005; PARKES; HILLIKER; PHILLIPS, 1993; SAWICKI et al., 2003; SINGH et al., 2001; VONTAS; SMALL; HEMINGWAY, 2001).

5.5.3.3 Oxidases de Função Mista

As oxidases de função mista (MFOs) são enzimas essenciais na biossíntese e degradação de compostos endógenos como hormônio juvenil, feromônios e ecdisona, desempenhando também uma importante função no crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto (NIWA et al., 2004; REED et al., 1994; SUTHERLAND et al., 1998; YANG; LIU, 2011). São responsáveis também pelo metabolismo de xenobióticos, como aleloquímicos e inseticidas (FEYEREISEN, 1999; HEMINGWAY; RANSON, 2000). Estas enzimas são produzidas pela expressão de genes *CYP* (*Cyp* para ratos), oriundo de “Cytochrome P450”, e existem na literatura várias denominações para ela, que além de oxidases de função mista e MFO, são chamadas também de oxidases de função múltipla, monoxigenases, enzima citocromo P450, citocromo P450 Monoxigenases, entre outras (FEYEREISEN, 1999). Esta variedade de nomenclaturas é dada pela plasticidade destas enzimas com relação aos substratos que podem metabolizar. Um composto xenobiótico pode ser metabolizado por várias MFOs e uma MFO pode metabolizar mais de 20 diferentes substratos, o que evidencia sua falta de especificidade (FEYEREISEN, 1999; SCOTT, 1999).

As MFOs são consideradas hemoproteínas por conterem heme como grupamento prostético (contida por um átomo de ferro) e o termo “P450” se refere ao pico de absorção em 450 nm que sofre o grupo heme, quando é reduzido e saturado com monóxido de carbono (HEMINGWAY et al., 2004; OMURA; SATO, 1964). A nomenclatura dos genes pertencentes as superfamília das MFOs são iniciados com o prefixo *CYP*, seguidos do numeral correspondente a identificação da família, uma letra em maiúsculo para a identificação da subfamília, seguida de um numeral correspondente ao gene individual. Diversos estudos tem tentado relacionar a alteração na atividade destas enzimas e a resistência a piretróides, organofosforados e DDT (HEMINGWAY et al., 2004; LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007; MIYO; OGUMA, 2010) além de IGRs (KOTZE; SALES; BARCHIA, 1997). Outras linhas de pesquisa relacionam a resistência com o aumento na expressão dos genes *CYP*. Para *A. aegypti* as principais famílias relacionadas com a resistência são a *CYP6* e *CYP9*. Segundo Strode et al. (2008) há uma super expressão de genes pertencentes a família *CYP9* em populações de *A. aegypti* selecionadas para resistência aos piretróides. Marcombe et al., (2009), demonstraram para um população de *A. aegypti* resistente a piretróides, oriunda da Martinica, uma superexpressão dos genes *CYP6Z6*, *CYP6M6*, *CYP9J22* e *CYP9J23*. Strode et al. (2012), também demonstraram, através da análise de *microarrays*, uma superexpressão de membros da família *CYP6*, principalmente o gene *CYP6N12* em larvas e adultos, numa

colônia de *A. aegypti* selecionada para a resistência ao temephos. Foi observado neste estudo que quando ocorre a reversão da resistência, ocorre também a diminuição da expressão deste e de outros genes relacionados com a resistência.

5.5.4 Resistência por alteração do sítio-alvo

A ação dos inseticidas químicos tem como sítio-alvo principalmente moléculas do sistema nervoso central (SNC) dos insetos. Modificações de aminoácidos destas moléculas podem comprometer a ligação do inseticida, diminuindo ou até mesmo anulando seus efeitos (BROGDON; MCALLISTER, 1998a). Diferentemente da resistência metabólica, onde muitos genes podem estar envolvidos, na resistência por alteração do sítio-alvo, genes específicos que codificam os sítios-alvo dos inseticidas estão envolvidos.

Um dos principais alvos no SNC dos insetos é a enzima acetilcolinesterase (ACE), alvo dos organofosforados e carbamatos, codificada pelo gene *ace*. Geralmente os insetos apresentam dois genes *ace-1* e *ace-2*, e este primeiro gene é o que está mais relacionado com a resistência (KAKANI et al., 2011; WEILL et al., 2002; WEILL et al., 2004; WU et al., 2010). Mutações deste gene em populações naturais de *A. aegypti* ainda não foram relatadas (GRISALES et al., 2013; HEMINGWAY et al., 2004). Várias formas mutadas desta enzima (também chamado MACE, acetilcolinesterase modificada) foram encontradas em *C. tritaeniorhynchus*, mutação F331W (NABESHIMA et al., 2004), mutação F290V para *C. pipiens* e G119S em *C. vishnui*, *C. pipiens*, *An. gambiae* e *An. albimanus* (WEILL et al., 2003; WEILL et al., 2004). Para esta última mutação, o códon que a codifica a glicina é o GGC e o que codifica a serina é o AGC, por ser apenas uma única substituição de nucleotídeo, esta mutação tem se disseminado nas espécies acima citadas. Para *A. aegypti* seriam necessárias duas substituições, pois o códon que codifica a glicina é o GGA. Esta necessidade de dupla substituição de nucleotídeo só não foi observada para a F290V, que é oriunda da troca de TTT por GTT, também não encontrada para *A. aegypti* (MORI et al., 2007). Mesmo sem o diagnóstico destas mutações, para algumas espécies, esta enzima é tida como insensível ao inseticida, através de ensaios enzimáticos, como já descrito para *C. quinquefasciatus*, *C. pipiens*, *An. gambiae*, *An. nigerimus*, *An. atroparvus*, *An. sacharovi* (BISSET et al., 1990; BOURGUET et al., 1996; HEMINGWAY, 1982a, 1982b; HEMINGWAY et al., 1985; HEMINGWAY et al., 1986; N'GUESSAN et al., 2003; VILLANI; HEMINGWAY, 1987).

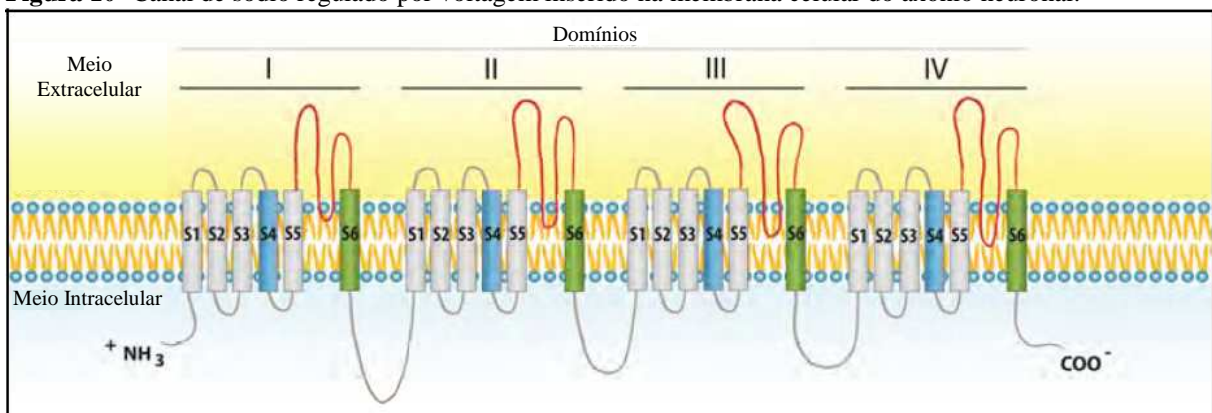
Outro alvo é o receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA), sítio de ação dos inseticidas organoclorados, como o dieldrin, e dos ciclodienos, codificado pelo gene *Rdl*. A ligação do GABA ao seu receptor, resulta na abertura rápida de um canal iônico cloro-seletivo. A insensibilidade deste sítio-alvo já foi bem estudada em várias espécies de insetos (ASIH et al., 2012; HEMINGWAY et al., 2004; HEMINGWAY; RANSON, 2000; WONDJI et al., 2011). Em mosquitos, a mutação A296G neste gene foi observada em *An. gambiae* (DU et al., 2005), e a mutação A296S foi associada com a resistência ao dieldrin em *An. arabiensis*, *An. stephensi*, *An. funestus* e *A. aegypti* (DU et al., 2005; FFRENCH-CONSTANT et al., 1993; WONDJI et al., 2011).

A proteína do canal de sódio é o sítio de ação dos piretróides e DDT. Esta proteína é codificada pelo gene *paralytic (para)* que foi inicialmente clonado e seqüenciado para *Drosophila melanogaster* que está presente nos *locos* relacionados com paralisias e alterações de comportamento dos insetos (LOUGHNEY; KREBER; GANETZKY, 1989). O gene *para* é homólogo a genes codificantes do canal de sódio (Na_v) em vertebrados (LOUGHNEY; GANETZKY, 1989). Para *A. aegypti* este gene é chamado de *AaNa_v*, de acordo com a nomenclatura sugerida por Goldin et al. (2000) que consta das iniciais da espécie (gênero e termo específico) precedido ao símbolo químico, com a inicial do regulador fisiológico (voltagem) (Na_v). Este gene, se distribui em 33 exons, gerando uma proteína, constituída por 2.147 aminoácidos, que apresenta massa molecular de 241 kDa (CHANG et al., 2009).

A estrutura da proteína do canal de sódio é organizada em quatro domínios homólogos (I-IV), cada um contendo seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6) e uma alça *P-loop* entre os segmentos S5 e S6 (figura 10). Os segmentos S4 são responsáveis pela ativação do canal por serem carregados positivamente e em conjunto com os segmentos S1 a S3 formam os domínios sensores de voltagem. Os segmentos S5 e S6 formam o poro por onde passará o sódio, o poro central hidrofílico, e os *P-loops*, regiões de ligação entre S5 e S6, formam um filtro seletivo ao sódio (MARTINS; VALLE, 2012). A função do canal de sódio está relacionada com a propagação dos impulsos nervosos. O potencial de ação se inicia com a despolarização da membrana tornando o lado interno mais positivo, com a entrada de íons sódio (Na^+), este estímulo provoca a ativação de todos os canais de sódio ao longo da membrana, que uma vez iniciado não necessita de novos estímulos para seu progresso (figuras 11A e B). Um milissegundo após a ativação do canal, o poro interrompe a passagem de mais íons para o interior da célula (figura 11C) e retorna à sua forma de repouso (figura 11D) em ação conjunta com as bombas de potássio, que juntas restauram o potencial elétrico original da célula (CATTERALL et al., 2003; MARTINS; VALLE, 2012). Na presença do inseticida,

em indivíduos susceptíveis, a propagação do impulso é alterada e os canais de sódio se mantêm permanentemente abertos impedindo a paralisação deste impulso, com a conseqüente morte do inseto. Quando o inseto apresenta alguma mutação neste canal, a ligação do inseticida pode ficar comprometida inviabilizando seu mecanismo de ação, estes indivíduos então, são considerados resistentes à ação deste inseticida. Insetos resistentes que apresentam um fenótipo denominado resistência do tipo *knockdown* (Kdr), desenvolvem paralisia momentânea seguida da recuperação locomotora quando o contato com o inseticida cessa (BUSVINE, 1951; MILANI, 1954).

Figura 10- Canal de sódio regulado por voltagem inserido na membrana celular do axônio neuronal.



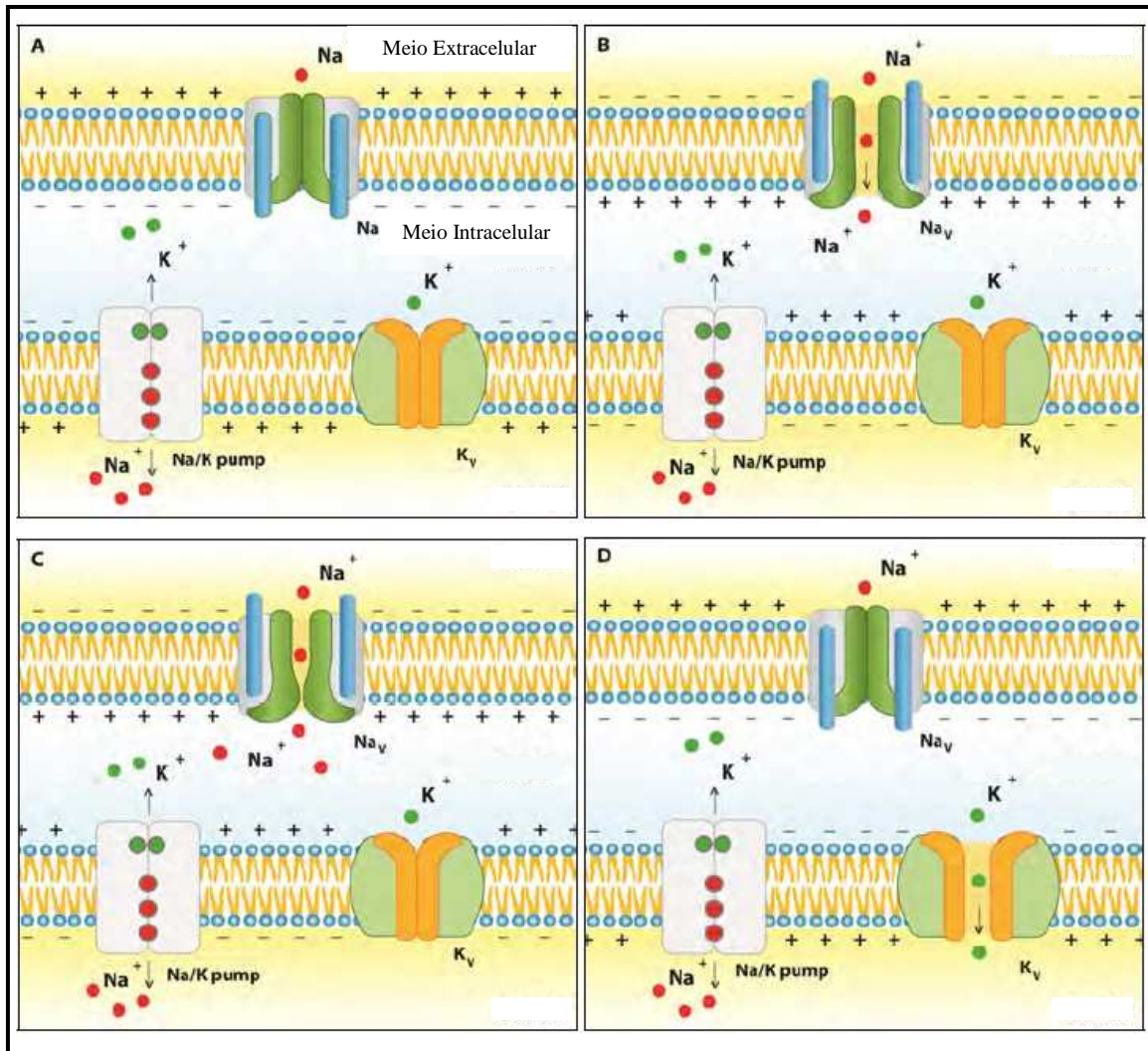
Fonte: Martins e Valle (2012).

Legenda: Demonstração dos quatro domínios homólogos (I-IV) do canal de sódio, cada um com seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6), entre os segmentos há uma hélice de ligação. Em azul, os segmentos de sensores de tensão (S4), em verde, o segmento S6, que forma o poro do canal em conjunto com os segmentos S5, ligados pelas alças *P-loop*, em vermelho.

Estudos eletrofisiológicos e farmacológicos haviam sugerido que existem diferentes sítios receptores de piretróides no canal de sódio (BLOOMQUIST; SODERLUND, 1988; BROWN; GAUPP; OLSEN, 1988). Em um modelo proposto por O'Reilly et al. (2006), os piretróides se ligam a um lipídio que fica exposto em consequência da ligação da hélice dos segmentos 4 e 5 do segundo domínio (IIL45), com o segmento 5 do segundo domínio (IIS5) e com o segmento 6 do terceiro domínio (IIS6), formando o sítio 1 (IIL45-IIS5-IIS6). Até o momento, doze mutações Kdr têm confirmada implicação na redução da sensibilidade do canal de sódio a piretróides utilizando o sistema de expressão em oócitos de *Xenopus* (DAVIES et al., 2007; DU et al., 2013; RINKEVICH; DU; DONG, 2013). Em função das diferentes substituições de aminoácidos neste sítio, existem variações nas respostas de sensibilidade do canal de sódio à ação dos inseticidas. Algumas mutações podem promover níveis variáveis de proteção aos piretróides tipo I ou tipo II ou DDT (BURTON et al., 2011). Mais recentemente, foi descrito um segundo sítio de ligação utilizado por piretróides. Este

sítio é formado pela ligação da hélice dos segmentos 4 e 5 do primeiro domínio (IL45), com o segmento 5 do primeiro domínio (IS5) e o sexto segmento do segundo domínio (IIS6), este sítio foi descrito como sítio 2 (IL45-IS5-IIS6). Este modelo traz novas propostas da interação dos piretróides, com o canal de sódio, com relação a sua ação e seletividade utilizando as principais mutações descritas para *A. aegypti* na literatura (DU et al., 2013).

Figura 11- Propagação do impulso nervoso através do potencial de ação no axônio neuronal.



Fonte: Martins e Valle (2012).

Legenda: (A) Potencial de repouso, contendo no citoplasma do axônio baixas concentrações de Na^+ e altas concentrações de potássio em comparação com o fluido extracelular. A bomba de Na/K, funciona continuamente retirando mais sódio que permitindo a entrada de potássio na célula. (B) Na ocorrência do estímulo nervoso, o canal de sódio se abre para a sua entrada e ocorre a despolarização da membrana, aumentando o potencial de ação. (C) Desativação do canal de sódio (~ 1 milissegundo) que impede a entrada de Na^+ . (D) Abertura do canal de potássio e conseqüente queda do potencial de ação.

Um dos exemplos de mutação empregada como um diagnóstico de resistência a piretróides em insetos é a mutação Ile1014Phe, localizada na região IIS6 (BASS et al., 2007), esta mutação foi a primeira a ser associada ao fenótipo Kdr e descrita para *Musca domestica*

(INGLES et al., 1996) a partir desta descoberta, estudos já foram descritos para *Cx. pipiens* (MARTINEZ-TORRES et al., 1999), *An. gambiae* (MARTINEZ-TORRES et al., 1998), e *Cx. quinquefasciatus* (XU et al., 2005). Esta mutação não foi observada em *A. aegypti*. Outros estudos foram descritos mostrando a presença da mutação Kdr nesta espécie (BARBOSA; BLACK; HASTINGS, 2011; GARCIA et al., 2009; MARCOMBE et al., 2012; MARCOMBE et al., 2009; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007) inclusive no Brasil (BRENGUES et al., 2003; LIMA et al., 2011; MARTINS et al., 2009a; MARTINS et al., 2009b). Para *A. aegypti* existem outras substituições nas regiões IIS5, mutações Gly923Val e Leu982Trp (BRENGUES et al., 2003) IIS6, mutações Ile1011Met e Val1016Gly (BRENGUES et al., 2003; RAJATILEKA et al., 2008), Ile1011Val e Val1016Ile (SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007) e IIS6, mutação Phe1534Cys (HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010; KAWADA et al., 2009; YANOLA et al., 2011). Na literatura há relatos sobre a presença mutações simultâneas na mesma população, as mutações Ser989Phe e Val1016Gly (SRISAWAT et al., 2010), Val1016Gly e Asp1763Tyr (CHANG et al., 2009) e Gly923Val e Ile1011Met (BRENGUES et al., 2003), os autores sugerem que a presença de mais de uma mutação, diminui ainda mais a sensibilidade aos inseticidas avaliados. As mutações, descritas acima, ocorrem exclusivamente em *A. aegypti* com a exceção da Phe1534Cys que ocorre também em *A. albopictus* (KASAI et al., 2011; RINKEVICH; DU; DONG, 2013). A diversidade de mutações encontradas neste gene envolvidas com a resistência a piretróides, em diversas espécies, estão descritas num estudo recentemente realizado por Rinkevich et al. (2013).

Um dos primeiros estudos que avaliou a presença das mutações no canal de sódio em uma população brasileira de *A. aegypti* (Belém/PA), diagnosticou duas substituições, Ile1011Met e Gly923Val, em homozigose, para ambas as mutações (BRENGUES et al., 2003). Através de ensaios eletrofisiológicos foi demonstrado que esta população apresentava o canal de sódio, aproximadamente, 1.400 vezes menos sensível ao piretróide permetrina quando comparada a população susceptível. Posteriormente populações brasileiras de *A. aegypti*, provenientes de Natal (RN) e Nova Iguaçu (RJ), foram detectadas com a substituição Ile1011Met, com maior frequência, em indivíduos resistentes (MARTINS et al., 2009b). A mutação Val1016Ile também foi diagnosticada em diversos municípios brasileiros e para cinco deles houve associação com a resistência à deltametrina (MARTINS et al., 2009a). Ambas as mutações também foram diagnosticadas em municípios do Ceará, mas apenas para uma população (Crato) houve associação da mutação Ile1011Met com a resistência à cipermetrina (LIMA et al., 2011). Os autores sugerem que estas mutações estão ocorrendo

com frequência em diversos municípios brasileiros e estão associadas com a resistência aos piretróides.

6 METODOLOGIA

6.1 Populações e colônia de *Aedes aegypti*

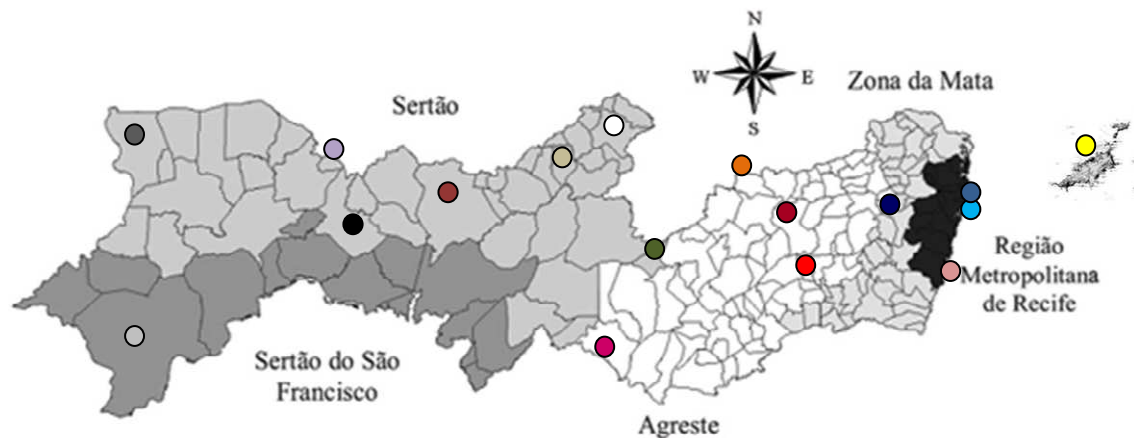
Inicialmente, este projeto para a avaliação da resistência de populações de *A. aegypti* aos inseticidas foi apresentado às Secretarias de Saúde de diversos municípios do Estado de Pernambuco. Aquelas que manifestaram interesse em participar foram convocadas para uma oficina no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ (CPqAM). O estudo incluiu amostras de ovos de *A. aegypti* provenientes de 17 municípios localizados nas cinco mesoregiões existentes no estado de Pernambuco: Recife, Olinda, Ipojuca (Região Metropolitana); Glória do Goitá (Zona da Mata); Agrestina, Santa Cruz do Capibaribe, Itaíba e Caruaru (Agreste); Cedro, Salgueiro, Afogados da Ingazeira, São José do Egito, Araripina, Arcoverde e Serra Talhada (Sertão); Petrolina (Sertão do São Francisco), além do arquipélago de Fernando de Noronha (Figura 12).

Ovos de *A. aegypti* foram coletados através de armadilhas de oviposição (ovitrampas), instaladas pelos agentes de saúde dos municípios de acordo com a metodologia recomendada pela Rede MoReNAa (BRASIL, 2008). A quantidade de ovitrampas instaladas em cada município foi estabelecida de acordo com o número de imóveis. Nos municípios que apresentam: 1) menos de 50.000 imóveis, foram instaladas 100 OVT; 2) entre 50.000 e 200.000 imóveis, 150 OVT; 3) entre 200.000 e 500.000 imóveis, 200 OVT e 4) mais de 500.000 imóveis, 300 OVT. Essas armadilhas foram distribuídas uniformemente na área urbanizada dos municípios, e a coleta dos ovos foi realizada em um único momento, de acordo com cronograma estabelecido localmente pelas equipes de campo.

As amostras de ovos foram encaminhadas ao Serviço de Referência para Controle de Culicídeos Vetores (SRCCV), do Departamento de Entomologia/CPqAM/Fiocruz-PE, para obtenção do material biológico a ser utilizado nos diferentes ensaios. Inicialmente foram obtidas larvas, representativas dos bairros amostrados em cada município. Em seguida foi feita a identificação da espécie-alvo e o estabelecimento das gerações parentais das diferentes sub-colônias representativas de cada população, formada por no mínimo 700 indivíduos, machos e fêmeas, na proporção de 1:2. Quando o número de adultos foi inferior a 700, foi fundada a primeira geração filial (F_1) e os testes foram realizados com a F_2 , constituída de um número maior de mosquitos. Nos ensaios foram utilizadas larvas ou fêmeas adultas provenientes apenas das primeiras três gerações filiais (F_1 ; F_2 e F_3) das populações de campo.

Os adultos foram alimentados com solução de açúcar 10%, *ad libitum* e, adicionalmente, às fêmeas foi oferecido um repasto sanguíneo em galinha (*Gallus* sp.), duas vezes por semana, para obtenção das progêneses. Papéis de filtro embebidos em infusão de gramínea a 20% (um atrativo para deposição de ovos) serviram como substrato para oviposição. Estes foram acondicionados em copos de 50 ml e colocados no interior das gaiolas de manutenção dos mosquitos adultos. Após 48 horas da postura, os papéis foram retirados do contato com a infusão e mantidos à temperatura ambiente para a dessecação dos ovos e seu armazenamento até a utilização. Todas as populações foram mantidas em condições padronizadas de criação (fotoperíodo claro: escuro de 12:12h; 26 ± 2 °C; $60\% \pm 20\%$), para a obtenção das gerações filiais (F₁ a F₃) destinadas aos ensaios biológicos. A população referência de susceptibilidade, Rockefeller (Rock) cedida pela SUCEN de Marília-SP e mantida no Departamento de Entomologia há seis anos, foi utilizada em todas as avaliações deste trabalho, como referência para as padronizações e avaliações realizadas neste estudo.

Figura 12- Mapa de Pernambuco, com destaque para os municípios onde as amostras de *Aedes aegypti* foram coletadas nas Meso-regiões do estado.



Fonte: Dantas Torres e Brandão-Filho (2006) com modificações.

Legenda: ● Arquipélago de Fernando de Noronha (540 Km de Recife). Região Metropolitana do Recife: ● Recife, ● Olinda e ● Ipojuca. Região da Zona da Mata: ● Glória do Goitá. Agreste: ● Agrestina, ● Santa Cruz do Capibaribe, ● Itaíba e ● Caruaru. Sertão: ● Cedro, ● Salgueiro, ● Afogados da Ingazeira, ● São José do Egito, ● Araripina, ● Serra Talhada e ● Arcoverde. Sertão de São Francisco: ● Petrolina.

6.2 Diluição dos inseticidas

6.2.1. Temephos

Uma amostra de 250 mg do temephos pó padrão (Sigma, lotes: 6333X e SZE9105X), contendo respectivamente 97,5% e 95,6% de princípio ativo (P.A) foi inicialmente diluída em 50 µl de acetona e transferida para um microtubo de 1,5 ml, onde foi adicionado mais 1 ml de etanol. Depois de homogeneizada, a solução foi distribuída em alíquotas menores de 61,5 µl, mantidas a -20 °C até sua utilização para o preparo de uma solução estoque em etanol (3 g/L). A partir da solução estoque foram preparadas as soluções de uso, frequentemente utilizadas em testes com a população Rockefeller (3-6 mg/L) e com as populações de campo (14 mg/L-500 mg/L).

6.2.2 Diflubenzuron

Este inibidor da síntese de quitina foi proveniente da Sigma (99,5% de P.A), lote, SZE7200 X. Uma amostra de 10 mg do produto em 50 ml de acetona foi preparada obtendo-se uma solução estoque de 199.000 µg/L. A partir dessa solução estoque foi preparada a solução de uso de 3.000 µg/L em acetona. O intervalo de concentração para os testes variaram de 0,2 a 6 µg/L para obtermos a inibição de aproximadamente 99% dos adultos.

6.2.3 Cipermetrina

Foi utilizado o inseticida proveniente da Sigma (98% de P.A), lote 127K1099. O conteúdo de 10 mg foi diluído em 1 ml de acetona, obtendo-se uma solução estoque de 9,8 µg/µl, do qual foi preparado uma solução de uso de 0,08 µg/µl. Um volume de 100 µl desta solução foi aplicado nas garrafas, obtendo-se uma concentração final de 8 µg/ garrafa (dose diagnóstica). O procedimento de impregnação das garrafas seguiu o protocolo descrito por Brogdon e Mcallister (1998b).

6.3 Bioensaios de Dose-Resposta

Bioensaios dose-resposta foram utilizados para estimar as concentrações letais (CLs) do temephos e as de inibição de emergência (IE) para o diflubenzuron, com o objetivo de

avaliar o status de susceptibilidade de cada população aos inseticidas testados. Os dados de mortalidade obtidos nestes ensaios foram submetidos à análise de regressão linear pelo programa Probit SPSS 8,0 for Windows, para a estimativa dos valores de CL e IE. Este último parâmetro (IE) representa o percentual de indivíduos que não conseguiram realizar metamorfose até atingir a idade adulta devido à ação do produto na inibição de sua síntese de quitina. Ambos os ensaios com cada lote de inseticida foram realizados primeiramente com a população Rockefeller, para estabelecer a referência. Através das CL_{95} ou a IE_{95} obtidas para Rockefeller divididas por estes mesmos parâmetros obtidos para cada população de campo, foi calculada a razão de resistência (RR). De acordo com o valor obtido, a população foi classificada como apresentando resistência alta com $RR > 10$, média com RR entre 5 e 10 ou baixa RR entre 3 e 5, de acordo com os critérios estabelecidos por Mazzarri e Georghiou (1995). Os mesmos critérios também foram utilizados para a avaliação do diflubenzuron, devido à inexistência de critérios exclusivos para a classificação da susceptibilidade de populações de *A. aegypti* a este composto.

6.3.1 Bioensaios com temephos

Os ensaios com o inseticida químico temephos foram conduzidos de acordo com o protocolo específico (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1981), utilizando larvas de terceiro estágio (L3) de *A. aegypti*, expostas entre 5 e 10 concentrações do inseticida (0,014 mg/L a 3,6 mg/L) capazes de promover mortalidade larval entre 10% e 100%. Para cada concentração e para o grupo controle tratado apenas com o solvente foram utilizadas três réplicas com 20 L3. Em cada ensaio foram utilizadas cerca de 300 a 600 larvas, e cada ensaio foi repetido três vezes em datas diferentes. A mortalidade larval foi verificada após 24 horas da exposição ao inseticida.

6.3.2 Bioensaios com diflubenzuron

O inibidor da síntese de quitina, diflubenzuron, foi utilizado em ensaios com L3, de acordo com os protocolos descritos por Martins et al. (2008) e Fontoura et al. (2012). Foram utilizadas de 4 a 10 concentrações (0,2 a 6 µg/L) que promoveram inibição da emergência dos adultos entre 10% e 100%. Para cada concentração e grupo controle tratado apenas com o solvente foram utilizadas 8 réplicas com 10 L3. Em cada ensaio foram usadas de 400 a 900 larvas, e cada ensaio foi repetido três vezes em datas diferentes. A mortalidade foi verificada

em dias alternados até que houvesse mortalidade ou emergência total nas réplicas contendo o produto. Os indivíduos adultos só foram considerados vivos, quando apresentavam a capacidade de voar. O tempo máximo de leitura considerado nesta avaliação foi de 30 dias.

6.4 Bioensaio de dose diagnóstica com a cipermetrina

Para a verificação da susceptibilidade à cipermetrina, aproximadamente 140 fêmeas de cada população foram colocadas em garrafas impregnadas com a dose diagnóstica do inseticida. A dose diagnóstica, 8 µg/garrafa, foi a dose que causou >98% de mortalidade dos indivíduos da colônia Rockefeller, após a última leitura do ensaio. Em cada teste foram usadas três garrafas impregnadas com o inseticida e uma controle (apenas com o solvente), e em cada garrafa foram adicionadas de 15 a 25 fêmeas. Para a verificação do efeito nocaute, ou desmaio temporário dos mosquitos, o número de mosquitos caídos foi registrado a cada 15 minutos até que todos os mosquitos estivessem desmaiados ou transcorridos 120 minutos de exposição. Após este período, foi realizado um último registro da mortalidade com os mosquitos fora da garrafa, após 24 horas, para a definição do status de susceptibilidade da população avaliada. As populações foram classificadas como “resistentes” quando houve mortalidade < 80%, “susceptíveis” com mortalidade > 98% e “sob verificação” com mortalidade intermediária, após o período de 24 horas. Os ensaios para cada inseticida foram repetidos em três momentos distintos seguindo a metodologia de Brogdon e McAllister (1998b) e Da Cunha et al. (2005).

6.5 Análise do histórico do uso de inseticidas nos municípios

Uma análise documental com base no Sistema de Informações do Programa de Febre Amarela e Dengue (SISFAD) foi realizada, com anuência da Secretaria Estadual de Saúde/PE, para avaliar o histórico de uso dos inseticidas nos municípios. As relações entre as informações sobre a utilização de temephos, a razão de resistência, a utilização de aduicidas piretróides e o percentual de mortalidade à cipermetrina foram analisadas através da correlação de Pearson. Nesta análise as populações foram divididas em três grupos, de acordo com o período de coleta em campo (2010, 2011 e 2012) e foi calculada a quantidade de inseticida usado em cada um destes municípios nos anos anteriores ao período de coleta. A correlação de Pearson mediu o grau da correlação entre estas duas variáveis de escala métrica. O coeficiente, normalmente representado por ρ assume valores entre -1 e 1. Para $0 < \rho \leq 1$,

existe uma correlação positiva entre as duas variáveis; para $\rho=0$ as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra; para $\rho<0$ há uma correlação negativa entre as duas variáveis. Em relação à intensidade da correlação, foi assumido que: existe fraca correlação linear quando $0<\rho<0,3$; moderada correlação linear quando $0,3\leq\rho<0,6$; forte correlação linear quando $0,6\leq\rho<0,9$ e por último, quando $0,9\leq\rho\leq 1$, existe uma correlação linear muito forte (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

6.6 Ensaios de atividade enzimática

As enzimas avaliadas foram: acetilcolinesterase (ACE), relacionada com a resistência tipo sítio-alvo e as glutathione S-transferases (GSTs), esterases e oxidases de função mista (MFOs) relacionadas com a resistência metabólica. Os procedimentos foram realizados seguindo o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006a). A análise enzimática foi realizada com fêmeas de um dia de idade até 24 horas após emergência, não alimentadas com sangue, provenientes gerações F₁ ou F₂ de subcolônias estabelecidas a partir de populações de campo. As fêmeas, anestesiadas por resfriamento, foram colocadas em microtubos, em grupos de 40-50 e em seguida foram armazenadas a -70 °C, até o momento do ensaio. Este procedimento se baseou na utilização de substratos específicos que podem ser degradados direta ou indiretamente pelas enzimas dos mosquitos. Amostras individuais de fêmeas foram maceradas e os homogenatos distribuídos em microplacas de 96 poços com os reagentes específicos para a detecção enzimática. As leituras das absorvâncias foram feitas em espectrofotômetro com leitor de microplacas (ELX808/Biosystem), utilizando diferentes comprimentos de onda (340, 405, 570, 620 e 650 nm), de acordo com o ensaio. A atividade das esterases foi avaliada com três diferentes substratos: α -naftil, β -naftil e *p*-nitrofenil acetato, referentes às esterases que apresentam afinidade por estes substratos, respectivamente a α -esterase, β -esterase e PNPA-esterase. A atividade da ACE foi avaliada em duas microplacas, uma contendo o reagente iodeto de acetiltiocolina, para quantificar a atividade total de acetilcolinesterase (AChE) e outra placa contendo este reagente mais o inseticida propoxur, para quantificar a atividade desta enzima na presença deste inibidor (AChI). A atividade das GSTs foi avaliada utilizando os substratos 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) e L-glutathione reduzida (GSH) e para as MFOs foi utilizado o 3,3',5,5'-dihidrocloro de tetrametil benzidina (TMBZ). A quantificação de proteínas totais das amostras foi feita com o reagente Bio-rad protein assay (Biorad) usando uma curva padrão de albumina do soro

bovino. Esta dosagem foi realizada para verificar a atividade específica das enzimas nas amostras avaliadas.

Os ensaios foram realizados inicialmente com a linhagem referência de susceptibilidade, a Rockefeller, utilizados como parâmetro enzimático comparativo (padrão), e para controle interno de qualidade. O controle interno de qualidade estava constituído de cinco fêmeas desta colônia, acrescentadas em cada placa enzimática populacional avaliada. A atividade enzimática só foi validada quando o controle de qualidade se enquadrava no padrão estabelecido. A partir da atividade de cada enzima analisada em amostras da colônia Rockefeller, foi calculado o percentil 99 (baseado na mediana), que representa o nível de atividade enzimática encontrado para 99% dos indivíduos analisados. O perfil enzimático das populações de campo foi classificado de acordo com o percentual de indivíduos que apresentam atividade superior ao percentil 99 da colônia Rockefeller para cada enzima. As enzimas foram classificadas como “inalteradas” (I), se este percentual for inferior a 15%; “alteradas” (A), com taxas entre 15% a 50%; ou “muito alteradas” (MA), quando forem superiores a 50% (BRASIL, 2006a; MONTELLA et al., 2007). Para a visualização das atividades enzimáticas individuais e o perfil populacional foi utilizado o programa GraphPad Prism 4.

6.7 Detecção de mutações no gene do canal de sódio

As fêmeas provenientes da avaliação em garrafas impregnadas com a cipermetrina foram usadas individualmente para os ensaios moleculares para detecção das seguintes mutações do tipo Kdr no gene *Na_v*: Leu982Trp, Ile1011Met, Ile1011Val, Leu1014Fen, Leu1014Ser, Val1016Ile e Val1016Gli (BRENGUES et al., 2003; LIMA et al., 2011; MARTINS et al., 2009a; MARTINS et al., 2009b; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007). A análise foi realizada em aproximadamente 10 fêmeas caracterizadas fenotipicamente como susceptíveis (aquelas que morreram durante a exposição ao inseticida) e 10 fêmeas resistentes (aquelas que sobreviveram à exposição ao inseticida). Amostras de DNA genômico foram obtidas através do método de extração com hidróxido de sódio (RUDBECK; DISSING, 1998) e mantidas a -20°C. As amostras foram submetidas a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase). As reações foram realizadas utilizando 0,4 mM dos primers (*forward* e *reverse*), 2,5 mM de MgCl₂, 12,5 µl (1X PCR) do Master Mix (Promega), 9 µl de água ultra pura e aproximadamente 30 a 80 ng de DNA genômico. As condições de PCR foram: 5 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 67 °C e 1 min a 72 °C, com uma

extensão final a 72 °C durante 10 min. Os primers foram concebidos manualmente com base na sequência dos canais de navegação (AAEL006019 - VectorBase) e sua qualidade foi analisada com Oligo Software Analyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). Os primers *forward*: (5'GACAATGTGGATCGCTTCCCG-3') e *reverse*: (5'-GCACGGACGCAATCTGGC-3') anelaram-se em regiões para amplificar um fragmento do gene *Nav* com 622 pb. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio para sua visualização (Sigma-Aldrich). Os fragmentos amplificados foram purificados com o Kit de Purificação GFXtm PCR DNA e Gel Band® (Amersham Pharmacia Biotech). Posteriormente, as amostras foram diluídas e enviadas ao sequenciamento, que foi feito em sequenciador capilar ABI 3000 (Applied Biosystems) na plataforma tecnológica do CPqAM. A qualidade das sequências foi avaliada através do CodonCode Aligner (3.7.1.1 for Windows), e utilizamos como critério de aceitação das sequências o score >20 para cada base nitrogenada. A associação das mutações encontradas com a resistência foi avaliada através do teste exato de Fisher (F) para pequenas amostras (n<300) e teste qui-quadrado para amostras acima de 300 indivíduos (<http://www.vassarstats.net>).

7 RESULTADOS

7.1 Perfil de susceptibilidade ao temephos

Das 17 populações de *A. aegypti* analisadas apenas a do Arquipélago de Fernando de Noronha se mostrou susceptível ao temephos. Um valor moderado de resistência foi observado para Recife e as demais populações apresentaram um nível elevado de resistência. Cinco populações apresentaram RR superiores a 10 vezes e inferiores a 100, as provenientes de Ipojuca, Olinda, Glória do Goitá, Salgueiro e Petrolina. Dez populações apresentaram RR acima de 100 atingindo até 252,7 vezes. Quatro destas populações são provenientes do Agreste e seis do Sertão (Tabela 1). Os níveis de resistência ao temephos nas populações de *A. aegypti* podem ser visualizados na figura 13.

7.2 Perfil de susceptibilidade ao diflubenzuron

Os perfis de susceptibilidade de oito populações avaliadas neste estudo encontram-se na tabela 2. Houve uma forte correlação positiva entre as razões de resistência ao temephos e as observadas para o diflubenzuron, considerando as populações avaliadas para ambos os produtos, o p-valor foi de 0,017 e ρ foi de 0,80 (Gráfico 1).

7.3 Perfil de susceptibilidade à cipermetrina

As 16 populações de *A. aegypti* de Pernambuco analisadas neste estudo estão resistentes a cipermetrina (Tabela 3), a população proveniente de Araripina, não foi avaliada. A resposta de mortalidade a dose discriminatória foi abaixo de 80%, nos primeiros 15 minutos de exposição ao piretróide e confirmada após 24 horas de avaliação. Os menores percentuais de mortalidade (< 30%), após as 24 h, foram observados nas amostras de Arcoverde, Serra Talhada, Petrolina e Itaíba, municípios representativos de três diferentes mesorregiões em Pernambuco.

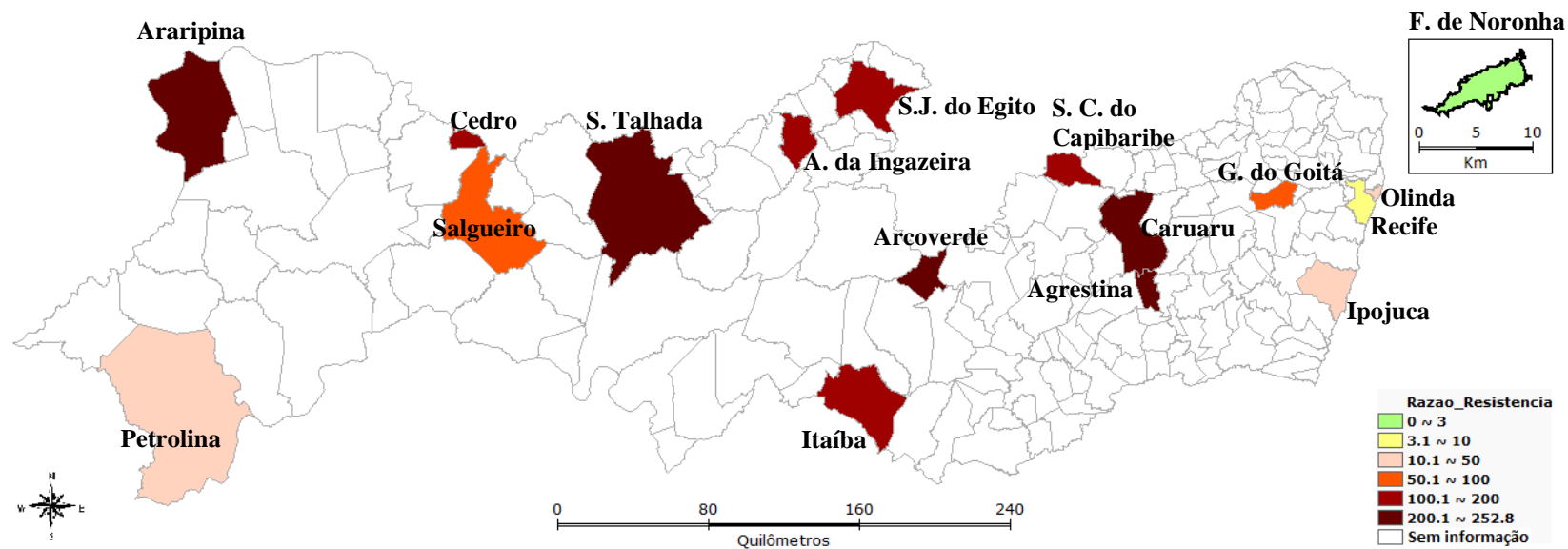
Tabela 1- Concentração letal para 95% (CL₉₅) dos indivíduos e razão de resistência (RR) ao temephos, estimada para populações de *Aedes aegypti* provenientes de municípios do Estado de Pernambuco.

Meso Região de Pernambuco	Ano de Coleta	População	Geração	Número de larvas testadas	CL ₉₅ (mg/L) (Intervalo de Confiança 95%)	Razão de Resistência (RR ₉₅)
Referência		Rockfeller Standard 1 ¹		1.140	0,017 (0,016-0,019)	1,0
Referência		Rockfeller Standard 2 ²		1.200	0,011 (0,010-0,012)	1,0
Referência		Rockfeller Standard 3 ³		1.260	0,014 (0,014-0,016)	1,0
Referência		Rockfeller Standard 4 ⁴		1.440	0,009 (0,008-0,010)	1,0
Arquipélago	2010	F. de Noronha ²	F2	1.740	0,026 (0,024-0,028)	2,4
Metropolitana	2011	Recife ³	F1	1.680	0,100 (0,088-0,119)	7,1
	2012	Olinda ⁴	F1	1.200	0,162 (0,134-0,213)	18,0
	2012	Ipojuca ⁴	F1	1.500	0,193 (0,154-0,265)	21,4
Zona da Mata	2010	G. do Goitá ²	F1	1.560	0,792 (0,607-1,122)	72,0
Agreste	2010	Agrestina ²	F2	1.740	2,339 (1,899-3,051)	212,6
	2011	Itaíba ³	F1	1.320	1,682 (1,215-2,632)	120,2
	2012	Caruaru ⁴	F2	1.360	2,160 (1,944-2,477)	240,1
	2010	S. C. do Capibaribe ¹	F1	1.320	2,421 (2,010-3,086)	142,4
	2010	A. da Ingazeira ¹	F1	1.260	2,051 (1,862-2,449)	120,6
	2010	S. J. do Egito ¹	F1	1.500	2,120 (1,862-2,514)	124,7
Sertão	2010	Cedro ¹	F1	1.320	2,256 (2,043-2,574)	132,7
	2010	Salgueiro ¹	F1	1.500	1,021 (0,757-1,534)	60,0
	2009	Araripina ²	F2	1.920	2,780 (2,600-3,280)	252,7
	2012	S. Talhada ³	F1	1.320	2,803 (2,579-3,098)	200,2
	2012	Arcoverde ³	F2	1.320	3,116 (2,848-3,477)	222,6
Sertão do São Francisco	2011	Petrolina ³	F1	1.760	0,545 (0,436-0,723)	38,9

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: ¹Populações de *Aedes aegypti* submetidas a atividade do temephos lote 6333X padrão 1, ² padrão 2, ³ padrão 3, ⁴Populações de *Aedes aegypti* submetidas a atividade do temephos lote SZE9105X, padrão 4, nas definições das concentrações letais (CL₉₅) e para o cálculo da razão de resistência (RR).

Figura 13- Municípios do estado de Pernambuco em destaque, onde foram coletadas amostras de *Aedes aegypti*, para avaliação da resistência a inseticidas químicos. As razões de resistência ao temephos encontradas nos municípios foram indicadas na legenda.



Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 2- Inibição da emergência de adultos em 50% (IE₅₀) e 95% (IE₉₅) dos indivíduos e Razão de Resistência (RR) ao diflubenzuron, estimado para populações de *Aedes aegypti* provenientes de municípios do Estado de Pernambuco.

Meso Região de Pernambuco	População	Geração	Número de larvas testadas	IE ₅₀ (µg/L) (Intervalo de confiança 50%)	IE ₉₅ (µg/L) (Intervalo de confiança 95%)	RR ₉₅
Referência	Rockefeller		2.000	0,456 (0,351 - 0,549)	1,560 (1,400-2,047)	1,0
Arquipélago	F. de Noronha	F3	480	1,212 (1,102-1,329)	2,640 (2,386- 2,991)	1,7
Metropolitana	Recife	F1	1.600	1,612 (1,465-1,787)	3,687 (3,212-4,435)	2,4
Agreste	Itaíba	F2	1.520	1,511 (1,346-1,684)	3,399 (3,001-4,014)	2,1
	Caruaru	F3	1.200	3,761 (3,243-4,410)	7,293 (6,278-9,098)	4,7
Sertão	Cedro	F3	1.360	1,171 (0,981 - 1,538)	4,224 (3,376 - 6,138)	2,7
	Salgueiro	F3	1.600	0,605 (0,306 - 0,778)	2,094 (1,791 - 2,747)	1,3
	S. Talhada	F3	1.440	2,839 (2,579-3,126)	7,013 (6,088-8,467)	4,5
Sertão do São Francisco	Petrolina	F1	1.520	1,746 (1,495-2,007)	4,845 (4,255-5,733)	3,1

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 3- Taxa de mortalidade e status de susceptibilidade de populações de *Aedes aegypti* provenientes de municípios do Estado de Pernambuco ao piretróide cipermetrina.

Meso Região de Pernambuco	População	Geração	Número de Fêmeas	Efeito nocaute (%) durante a exposição com cipermetrina (8 µg/garrafa)			Mortalidade (%) após a exposição com cipermetrina	Status de Susceptibilidade
				Tempo de Exposição			Última leitura 24 horas	
				15 min	30 min	120 min		
Arquipelago	Rockefeller*		149	94,6	100	100	100	Susceptível
	F. de Noronha	F2	148	83,1	97,9	100	70,2	Resistente
Metropolitana	Recife	F1	160	14,0	52,5	93,7	32,5	Resistente
	Olinda	F1	145	6,90	32,4	93,8	35,2	Resistente
	Ipojuca	F1	134	5,20	35,8	91,0	58,2	Resistente
Mata	G. do Goitá	F1	153	51,6	84,3	100	66,0	Resistente
Agreste	Agrestina	F2	163	13,5	73,6	98,1	43,5	Resistente
	Itaíba	F1	153	1,96	18,9	85,6	27,4	Resistente
	Caruaru	F2	167	4,80	34,7	82,6	31,7	Resistente
	S. C. do Capibaribe	F1	139	64,7	88,5	100	58,9	Resistente
Sertão	A. da Ingazeira	F1	152	54,6	83,5	96,7	36,8	Resistente
	S. J. do Egito	F1	170	42,9	86,5	99,4	64,1	Resistente
	Cedro	F1	158	72,1	90,5	100	70,8	Resistente
	Salgueiro	F1	150	82,0	95,3	100	68,6	Resistente
	S. Talhada	F2	165	0,0	4,84	67,3	18,8	Resistente
	Arcoverde	F2	148	0,0	8,80	66,9	10,8	Resistente
Sertão do São Francisco	Petrolina	F1	158	1,9	29,1	84,8	22,1	Resistente

Fonte: Elaborada pela autora**Legenda:***Colônia referência

7.4 Análise do histórico do uso de inseticidas nos municípios

Estes dados foram fornecidos pelo SISFAD e os registros disponibilizados datam do ano de 2007 a 2011. Os municípios estudados com seus respectivos períodos considerados, baseados na coleta do material em campo e o consumo de temephos, estão dispostos na tabela 4. O cálculo do consumo foi realizado até o ano anterior do período de coleta das amostras em campo e transformado em logaritmo. Nossos resultados com relação ao uso do temephos e RR demonstraram uma correlação positiva forte, com p-valor de 0,004 e ρ de 0,6504 (Gráfico 2). Os únicos municípios que utilizaram diflubenzuron em campo foram: Petrolina (consumo de 26,8 g), Recife (432,13 g) e Serra Talhada (1.323,22 g), não houve correlação entre o consumo e a razão de resistência a este produto para todas as populações avaliadas (p-valor=0,6537 e ρ de 0,1743). Os demais municípios que utilizaram este composto e não foram avaliados por este estudo foram: Ipojuca (14,15 g), Santa Cruz do Capibaribe (24,46 g) e Olinda (811,89 g).

Os municípios com seus respectivos consumos do piretróide alfacipermetrina estão apresentados na tabela 5. Com relação ao uso do piretróide, apesar de haver uma correlação negativa entre a quantidade de alfacipermetrina usada e o percentual de mortalidade dos adultos ρ de -0,4656 (Gráfico 3) o p-valor não foi significativo, sendo igual a 0,069.

7.5 Ensaio de atividade enzimática

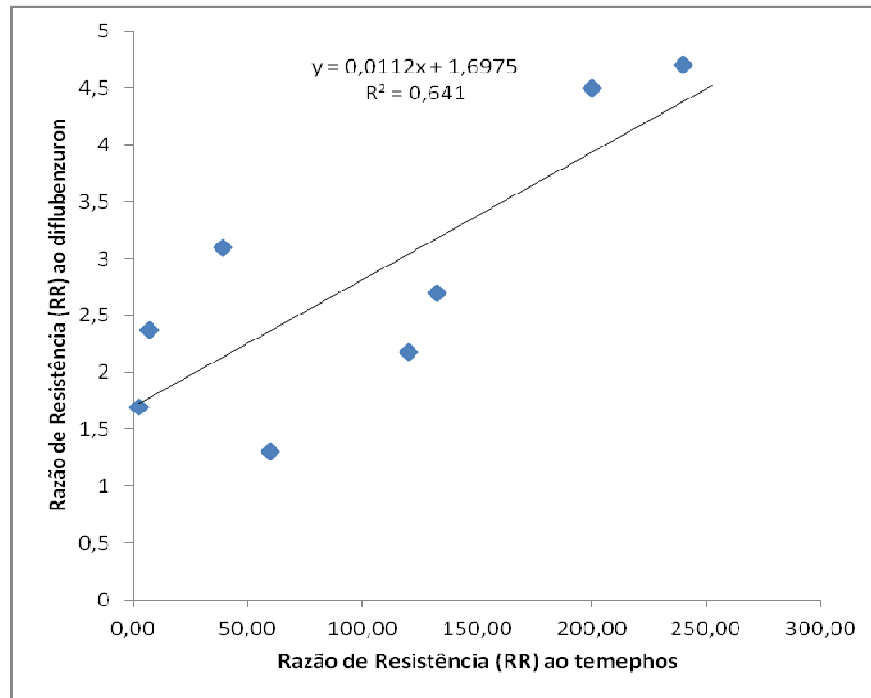
Das cinco enzimas ligadas a detoxificação de inseticidas avaliadas neste estudo, a β -esterase foi a única cuja atividade permaneceu inalterada na maioria das populações, exceto para Afogados da Ingazeira/PE (Tabela 6). Entre as mais alteradas estão as GSTs, cujo aumento de atividade foi detectado em todas as populações avaliadas, e esterases PNPA e alfa, cuja modificação foi detectada em 16 e 11 populações analisadas, respectivamente. Na maioria dos casos mais de 60% dos indivíduos analisados mostraram alterações enzimáticas elevadas. As oxidases de função mista apresentaram uma atividade elevada para quatro populações, destas, apenas a de Cedro mostrou um perfil muito alterado desta enzima. Apenas uma população revelou alterações na acetilcolinesterase, a oriunda de São José do Egito/PE. Os perfis enzimáticos individuais e populacionais podem ser observados nos gráficos 4 e 5.

Tabela 4- Registro da quantidade do inseticida temephos empregado para controle de *Aedes aegypti* durante os anos de 2007 a 2011 em municípios do estado de Pernambuco fornecido pelo Sistema de Informações do Programa de Febre Amarela e Dengue (SISFAD).

População	Período considerado	Temephos (Kg)	Log Temephos	Razão de resistência (RR)
Araripina	2007 a 2009	26.719,55	4,43	252,7
Cedro	2007 a 2009	1.713,39	3,23	132,7
Salgueiro	2007 a 2009	8.779,50	3,94	60,0
S. C. do Capibaribe	2007 a 2009	179.478,88	5,25	142,4
S. J. do Egito	2007 a 2009	26.390,66	4,42	124,7
A. da Ingazeira	2007 a 2010	28.380,26	4,45	120,6
Agrestina	2007 a 2010	16.718,39	4,22	212,6
G. do Goitá	2007 a 2010	4.157,44	3,62	72,0
F. de Noronha	2007 a 2010	0	0	2,4
Arcoverde	2007 a 2011	91.632,46	4,96	222,6
Caruaru	2007 a 2011	404.243,62	5,61	240,1
Ipojuca	2007 a 2011	3087,40	3,49	21,4
Itaíba	2007 a 2011	7.039,50	3,85	120,2
Olinda	2007 a 2011	32.992,78	4,52	18,0
Petrolina	2007 a 2011	10849,89	4,04	38,9
S. Talhada	2007 a 2011	96.985,09	4,99	200,20
Recife	2007 a 2011	1,09	0,04	7,10

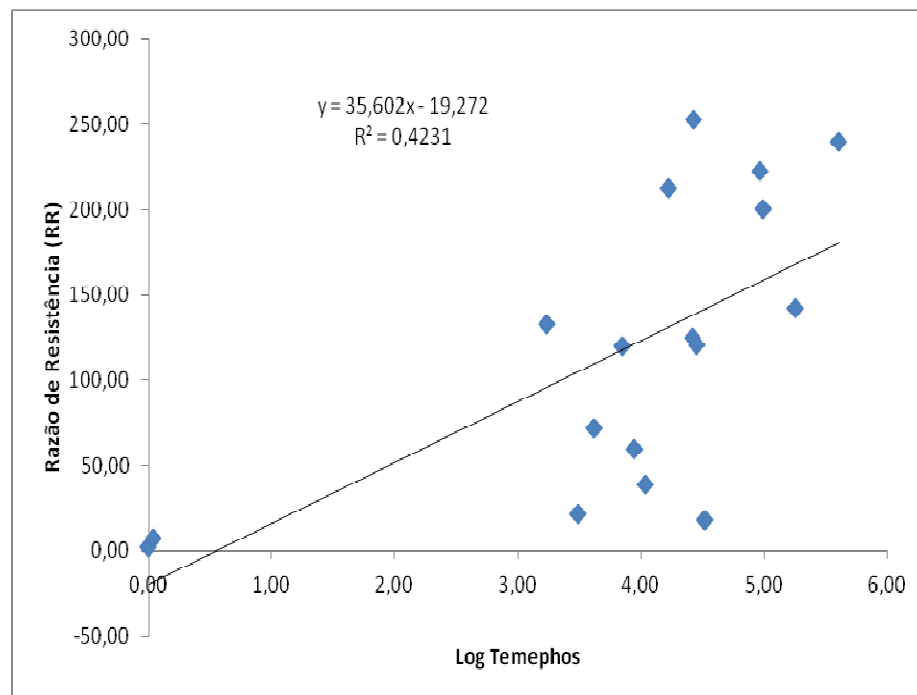
Fonte: Elaborada pela autora

Gráfico 1- Análise de regressão entre a razão de resistência ao temephos e a razão de resistência ao diflubenzuron encontradas para populações de *Aedes aegypti* de Pernambuco-Brasil



Fonte: Elaborado pela autora

Gráfico 2- Análise de regressão entre a razão de resistência ao temephos e o consumo deste produto nas respectivas localidades, onde foram coletadas as populações de *Aedes aegypti* de Pernambuco-Brasil.



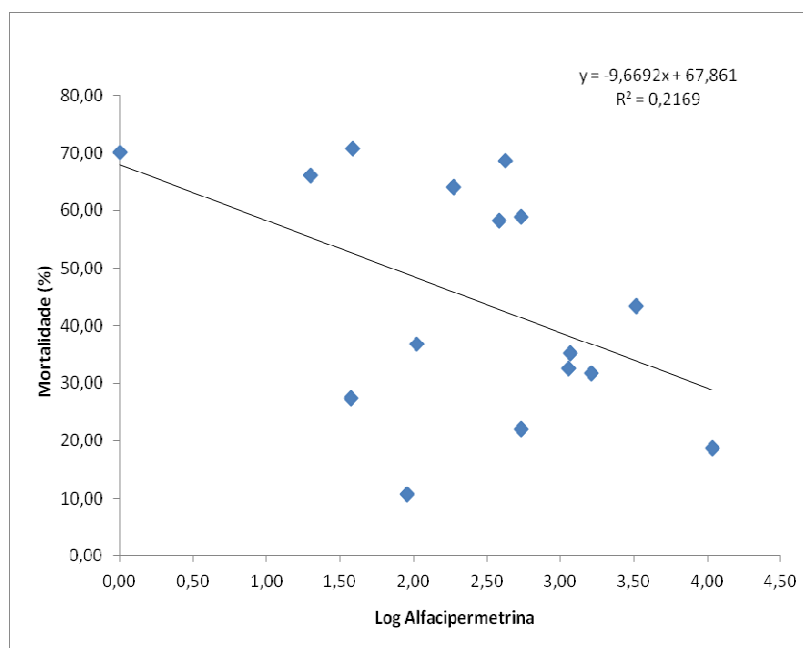
Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 5- Registro da quantidade do inseticida alfacipermetrina empregada para controle de *Aedes aegypti* durante os anos de 2007 a 2011, em municípios do estado de Pernambuco, fornecido pelo Sistema de Informações do Programa de Febre Amarela e Dengue (SISFAD).

População	Período considerado	Alfacipermetrina (L)	Log Alfacipermetrina	Mortalidade (%) após 24 h
Cedro	2007 a 2009	37,8	1,59	70,8
Salgueiro	2007 a 2009	423,0	2,63	68,6
S. C. do Capibaribe	2007 a 2009	543,0	2,74	58,9
S. J. do Egito	2007 a 2009	186,5	2,27	64,1
A. da Ingazeira	2007 a 2010	104,0	2,02	36,8
Agrestina	2007 a 2010	3.268,0	3,51	43,5
G. do Goitá	2007 a 2010	19,0	1,30	66,0
F. de Noronha	2007 a 2010	0	0	70,2
Arcoverde	2007 a 2011	90,0	1,96	10,8
Caruaru	2007 a 2011	1.632,10	3,21	31,7
Ipojuca	2007 a 2011	382,0	2,58	58,2
Itaíba	2007 a 2011	36,5	1,57	27,4
Olinda	2007 a 2011	1.166,0	3,07	35,2
Petrolina	2007 a 2011	539,0	2,73	22,1
S. Talhada	2007 a 2011	10.851,0	4,04	18,8
Recife	2007 a 2011	1.141,70	3,06	32,5

Fonte: Elaborado pela autora

Gráfico 3- Análise de regressão entre a razão de resistência a alfacipermetrina e o consumo deste produto nas respectivas localidades onde foram coletadas as populações de *Aedes aegypti* de Pernambuco-Brasil.



Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 6- Atividade enzimática observada em adultos de *Aedes aegypti* provenientes de populações de Pernambuco e colônia Rockefeller.

(Continua)

População ¹	Glutathione S-transferase (GST) (mmol/mg ptn/min)				Classificação ⁶	α -esterase (nmol/mg ptn/min)			Classificação	β -esterase (nmol/mg ptn/min)			Classificação
	Ger ²	N. de adultos ³	p99 ⁴	% >p99 ⁵		N. de adultos	p99	% >p99		N. de adultos	p99	% >p99	
Rockefeller		123	1,41	-	-	120	49,30	-	-	113	73,58	-	-
F. Noronha	F ₂	115	2,97	69	MA	83	96,34	17	A	99	166,33	12	I
Recife	F ₁	151	2,58	33	A	192	56,52	9	I	186	70,54	1	I
Olinda	F ₁	157	3,40	89	MA	149	58,67	10	I	109	87,81	3	I
Ipojuca	F ₁	120	3,23	77	MA	197	54,98	7	I	198	78,81	3	I
G. do Goitá	F ₁	112	3,66	42	A	99	64,59	19	A	103	95,30	4	I
Agrestina	F ₂	76	3,68	61	MA	145	63,35	25	A	151	73,93	1	I
Itafba	F ₁	99	2,26	32	A	118	61,38	18	A	117	66,95	0	I
Caruaru	F ₂	199	4,00	98	MA	161	98,17	50	MA	185	89,03	6	I
S. C. do Capibaribe	F ₁	115	2,81	86	MA	118	69,56	31	A	111	76,71	3	I
A. da Ingazeira	F ₂	150	2,65	55	MA	117	105,53	68	MA	118	94,67	27	A
S. J. do Egito	F ₁	118	2,79	75	MA	110	62,10	11	I	116	82,60	3	I
Cedro	F ₁	114	5,07	87	MA	116	80,44	41	A	116	91,99	6	I
Salgueiro	F ₁	115	2,53	83	MA	115	67,97	11	I	112	71,08	2	I
Araripina	F ₂	80	2,22	29	A	115	100,17	59	MA	116	93,38	14	I
S. Talhada	F ₁	118	2,62	81	MA	143	86,02	50	MA	156	83,23	9	I
Arcoverde	F ₂	89	2,28	48	A	155	80,03	53	MA	157	84,64	4	I
Petrolina	F ₁	152	3,35	63	MA	114	54,94	11	I	108	71,95	1	I

Fonte: Elaborada pela autora**Legenda:**¹Populações de *Aedes aegypti* coletadas em municípios do Estado de Pernambuco;²Geração usada nos testes bioquímicos;³N: número de indivíduos testados;⁴Percentil 99 das populações;⁵Percentual de indivíduos da população com atividade maior que o percentil 99 de Rockefeller;⁶Classificação da atividade enzimática comparada ao controle (Rockefeller): inalterado (I); alterado (A) e muito alterado (MA).

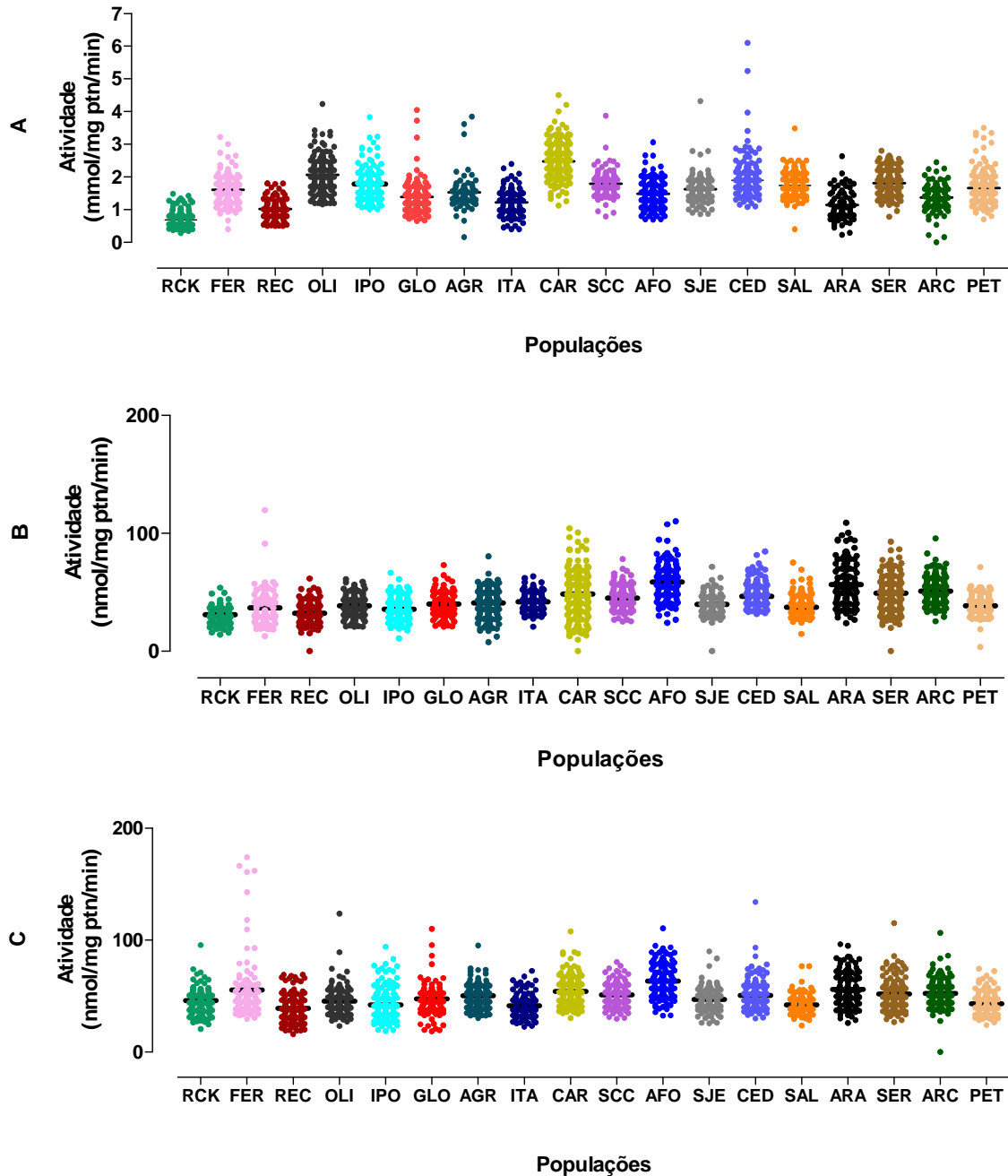
Tabela 6- Atividade enzimática observada em adultos de *Aedes aegypti* provenientes de populações de Pernambuco e colônia Rockefeller.

População ¹	Ger ²	Esterases-PNPA (Δ abs/mg ptn/min)				Monoxigenases (MFO) (nmol/mg ptn/min)				Acetilcolinesterase (ACE) (% act) ⁷			
		N.de adultos ³	p99 ⁴	% >p99 ⁵	Classificação ⁶	N. de adultos	p99	% >p99	Classificação	N. de adultos	p99	% >p99	Classificação
Rockefeller		116	3,69	-	-	119	66,12	-	-	105	26	-	-
F. Noronha	F2	108	6,54	71	MA	118	70,52	3	I	108	21,16	0	I
Recife	F1	151	5,14	13	I	189	73,05	4	I	137	21,16	1	I
Olinda	F1	113	8,10	69	MA	159	87,94	9	I	147	16,36	0	I
Ipojuca	F1	134	5,32	20	A	159	65,66	1	I	107	16,31	0	I
G. do Goitá	F1	113	5,57	31	A	77	73,63	9	I	114	31,02	15	I
Agrestina	F2	94	7,20	37	A	138	85,48	20	A	92	30,78	4	I
Itaíba	F1	114	4,91	22	A	104	72,29	3	I	118	18,81	1	I
Caruaru	F2	111	7,81	48	A	160	64,93	1	I	80	23,55	0	I
S. C. do Capibaribe	F1	114	9,12	87	MA	116	71,79	6	I	109	31,96	11	I
A. da Ingazeira	F2	154	7,34	62	MA	152	78,66	5	I	158	26,25	1	I
S.J. do Egito	F1	105	5,26	21	A	107	199,73	22	A	98	33,19	23	A
Cedro	F1	114	7,43	48	A	117	111,01	54	MA	112	19,38	0	I
Salgueiro	F1	114	8,81	82	MA	106	118,09	38	A	74	32,05	12	I
Araripina	F2	39	5,43	31	A	72	44,59	0	I	88	25,67	1	I
S. Talhada	F1	117	6,84	26	A	155	35,63	0	I	153	16,69	0	I
Arcoverde	F2	112	4,93	18	A	159	57,17	0	I	157	18,79	0	I
Petrolina	F1	109	5,25	32	A	155	90,92	6	I	116	17,77	0	I

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda:¹Populações de *Aedes aegypti* coletadas em municípios do Estado de Pernambuco; ²Geração usada nos testes bioquímicos; ³N: número de indivíduos testados; ⁴Percentil 99 das populações; ⁵Percentual de indivíduos da população com atividade maior que o percentil 99 de Rockefeller; ⁶Classificação da atividade enzimática comparada ao controle (Rockefeller): inalterado (I); alterado (A) e muito alterado (MA). ⁷Taxa de atividade na presença do propoxur.

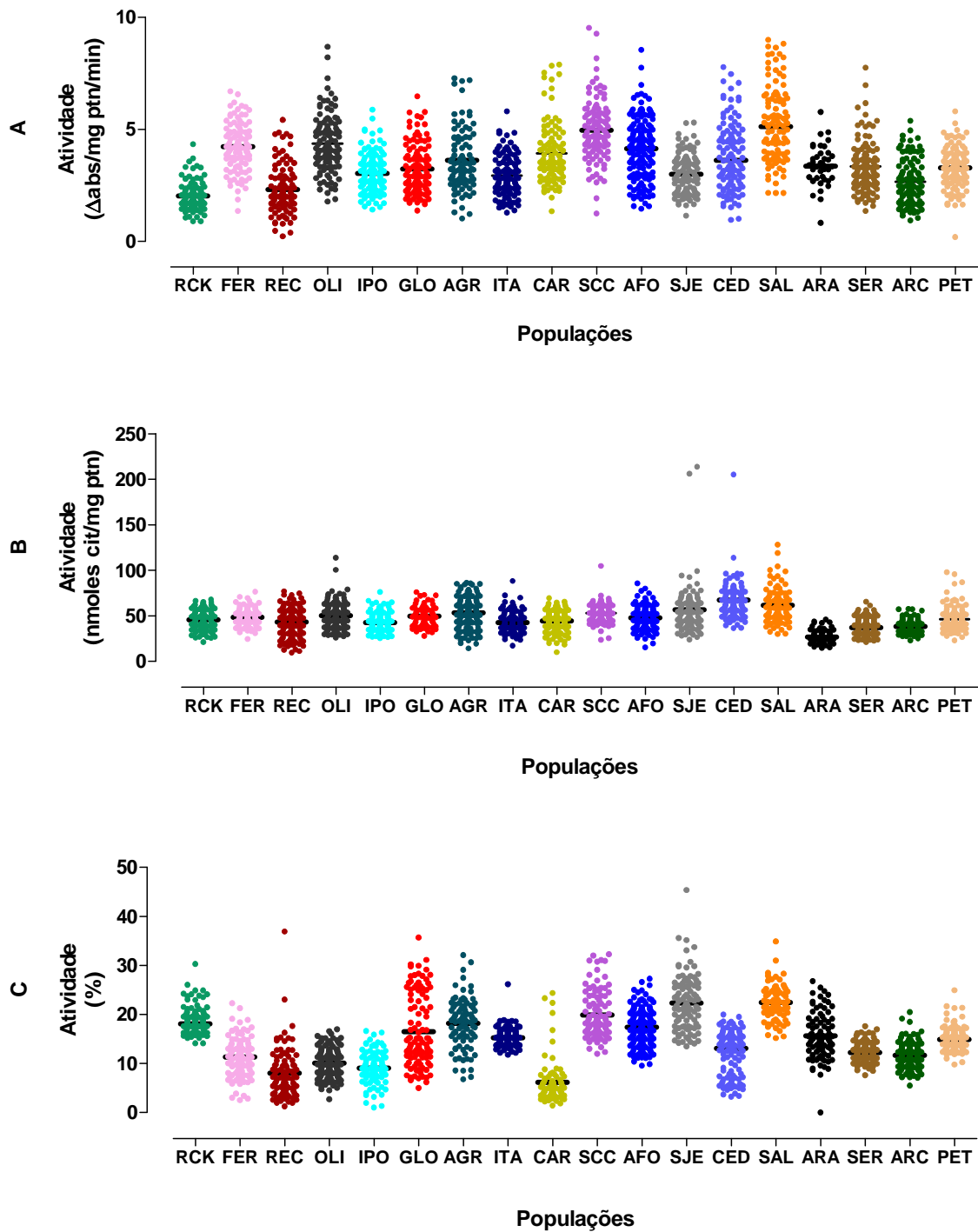
Gráfico 4- Representação gráfica de cada indivíduo analisado, quanto a suas respectivas atividades enzimáticas para glutathiona-S-transferase, alfa esterase e beta esterase em populações de *Aedes aegypti* de municípios do estado de Pernambuco, analisados através de GraphPad Prism 4.



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: (A) glutathiona-S-transferase, (B) alfa esterase, (C) beta esterase; RCK (Rockefeller), FER (Fernando de Noronha), REC (Recife), OLI (Olinda), IPO (Ipojuca), GLO (Glória do Goitá), AGR (Agrestina), ITA (Itaíba), CAR (Caruaru), SCC (Santa Cruz do Capibaribe), AFO (Afogados), SJE (São José do Egito), CED (Cedro), SAL (Salgueiro), ARA (Araripina), SER (Serra Talhada), ARC (Arcoverde), PET (Petrolina).

Gráfico 5- Representação gráfica de cada indivíduo analisado, quanto a suas respectivas atividades enzimáticas para PNPA esterase, oxidases de função mista e acetilcolinesterase em populações de *Aedes aegypti* de municípios do estado de Pernambuco, analisados através de GraphPad Prism 4.



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: (A) PNPA esterase, (B) oxidases de função mista, (C) acetilcolinesterase; RCK (Rockefeller), FER (Fernando de Noronha), REC (Recife), OLI (Olinda), IPO (Ipojuca), GLO (Glória do Goitá), AGR (Agrestina), ITA (Itaíba), CAR (Caruaru), SCC (Santa Cruz do Capibaribe), AFO (Afogados), SJE (São José do Egito), CED (Cedro), SAL (Salgueiro), ARA (Araripina), SER (Serra Talhada), ARC (Arcoverde), PET (Petrolina).

7.6 Frequência de mutações no gene canal de sódio

As frequências dos diferentes genótipos para as mutações Ile1011Met e Val1016Ile podem ser observadas nas tabelas 7 e 8, respectivamente. A mutação Ile1011Met está presente em todas as populações analisadas, em heterozigose, cuja frequência genotípica em indivíduos resistentes variou de 0,12 (Olinda) a 1,00 (Salgueiro) e em susceptíveis de 0,20 (Glória do Goitá) a 0,90 (Agrestina) (Tabela 7). Para duas populações, Petrolina e Salgueiro, esta mutação estava associada com a resistência ($p < 0,05$), através do teste de Fisher.

A mutação Val1016Ile foi detectada em sete das 16 populações testadas: Fernando de Noronha, Recife, Olinda, Itaíba, Caruaru, Arcoverde e Petrolina, distribuídas em todas as Mesorregiões de PE, exceto a Zona da Mata. Mais uma vez os indivíduos heterozigotos para esta mutação foram os mais frequentes, tanto nos susceptíveis (0,20 a 0,50) quanto nos resistentes (0,10 a 0,40) e, em apenas duas das sete populações (Fernando de Noronha e Itaíba) a mutação foi detectada apenas nos mosquitos resistentes (Tabela 8). Arcoverde foi a única população que apresentou homozigotos para a mutação Val1016Ile, com uma frequência de 0,30 em 20 indivíduos fenotipicamente resistentes (Tabela 8), apesar de não terem sido avaliados mosquitos susceptíveis em função da elevada sobrevivência observada no bioensaio para esta população. Esta foi a população que apresentou menor percentual de mortalidade nos bioensaios com cipermetrina. A análise destas frequências para o Estado de Pernambuco, como um todo, demonstrou que houve uma associação da mutação Ile1011Met com a resistência ($p = 0,032$), porém não houve esta associação com mutação Val1016Ile ($p = 2,943$), com a análise realizada através do teste qui-quadrado.

As mutações Ile1011Val e Val1016Gli não foram observadas. A análise do sítio 982 revelou a presença de uma substituição sinônima (ATA/ATG) em 13 localidades, enquanto que para o sítio 1014 não foi observada qualquer modificação, portanto as populações se apresentaram monomórficas para estes sítios. Estes resultados demonstram que estas mutações não estão associadas com a resistência ao piretróide nas populações investigadas.

Os resultados obtidos com a realização deste trabalho, com relação ao perfil de susceptibilidade das populações de *A. aegypti* e os mecanismos metabólicos e moleculares observados podem ser visualizados em conjunto na tabela 9.

Tabela 7- Frequência genotípica e alélica da mutação Kdr Ile1011Met em populações de *Aedes aegypti* provenientes de municípios do estado de Pernambuco, susceptíveis e resistentes ao piretróide cipermetrina.

Município/PE	Fenótipo	Genótipo			Total	N	Frequência Alélica	
		Ile/Ile	Ile/Met	Met/Met			Ile	Met
F. de Noronha	Susceptível	7 (0,70)	3 (0,30)	0 (0,0)	10	20	0,85	0,15
	Resistente	3 (0,30)	7 (0,70)	0 (0,0)	10		0,65	0,35
Recife	Susceptível	6 (0,66)	3 (0,34)	0 (0,0)	9	18	0,84	0,16
	Resistente	4 (0,44)	5 (0,56)	0 (0,0)	9		0,72	0,28
Ipojuca	Susceptível	3 (0,38)	5 (0,62)	0 (0,0)	8	17	0,69	0,31
	Resistente	6 (0,66)	3 (0,34)	0 (0,0)	9		0,84	0,16
Olinda	Susceptível	9 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	9	18	1,0	0,0
	Resistente	8 (0,88)	1 (0,12)	0 (0,0)	9		0,95	0,05
G. do Goitá	Susceptível	8 (0,80)	2 (0,20)	0 (0,0)	10	20	0,90	0,10
	Resistente	5 (0,50)	5 (0,50)	0 (0,0)	10		0,75	0,25
S. C. do Capibaribe	Susceptível	4 (0,40)	6 (0,60)	0 (0,0)	10	17	0,70	0,30
	Resistente	4 (0,57)	3 (0,43)	0 (0,0)	7		0,78	0,22
Agrestina	Susceptível	1 (0,10)	9 (0,90)	0 (0,0)	10	18	0,55	0,45
	Resistente	3 (0,37)	5 (0,63)	0 (0,0)	8		0,68	0,32
Itaíba	Susceptível	6 (0,60)	4 (0,40)	0 (0,0)	10	20	0,80	0,20
	Resistente	2 (0,20)	8 (0,80)	0 (0,0)	10		0,60	0,40
Caruaru	Susceptível	6 (0,60)	4 (0,40)	0 (0,0)	10	20	0,80	0,20
	Resistente	7 (0,70)	3 (0,30)	0 (0,0)	10		0,85	0,15
Cedro	Susceptível	3 (0,30)	7 (0,70)	0 (0,0)	10	20	0,65	0,35
	Resistente	4 (0,40)	6 (0,60)	0 (0,0)	10		0,70	0,30
Salgueiro	Susceptível	4 (0,40)	6 (0,60)	0 (0,0)	10	20	0,70	0,30
	Resistente	0 (0,0)	10 (1,0)	0 (0,0)	10		0,50	0,50
A. da Ingazeira	Susceptível	7 (0,70)	3 (0,30)	0 (0,0)	10	16	0,85	0,15
	Resistente	1 (0,16)	5 (0,84)	0 (0,0)	6		0,60	0,40
S. J. do Egito	Susceptível	3 (0,30)	7 (0,70)	0 (0,0)	10	20	0,65	0,35
	Resistente	2 (0,20)	8 (0,80)	0 (0,0)	10		0,60	0,40
S. Talhada	Susceptível	2 (0,20)	8 (0,80)	0 (0,0)	10	20	0,60	0,40
	Resistente	1 (0,10)	9 (0,90)	0 (0,0)	10		0,55	0,45
Arcoverde	Susceptível	4 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4	24	1,0	0,0
	Resistente	13 (0,65)	7 (0,35)	0 (0,0)	20		0,82	0,18
Petrolina	Susceptível	7 (0,70)	3 (0,30)	0 (0,0)	10	20	0,85	0,15
	Resistente	1 (0,10)	9 (0,90)	0 (0,0)	10		0,55	0,45
Total	Susceptível	80 (0,53)	70 (0,47)	0 (0,0)	150	308	0,77	0,23
	Resistente	64 (0,40)	94 (0,60)	0 (0,0)	158		0,70	0,30

Fonte: Elaborada pela autora**Legenda:** N=Número de fêmeas; S= Susceptível; R=Resistente; Ile=isoleucina; Met=Metionina

Tabela 8- Frequência genotípica e alélica da mutação Kdr Val1016Ile em populações de *Aedes aegypti* provenientes de municípios do estado de Pernambuco susceptíveis e resistentes ao piretróide cipermetrina.

Municípios/PE	Fenótipo	Genótipo			Total	N	Frequência Alélica	
		Val/Val	Val/Ile	Ile/Ile			Val	Ile
F. de Noronha	Susceptível	9 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	9	19	1,0	0,0
	Resistente	9 (0,90)	1 (0,10)	0 (0,0)	10		0,95	0,05
Recife	Susceptível	6 (0,67)	3 (0,33)	0 (0,0)	9	20	0,84	0,16
	Resistente	11 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	11		1,0	0,0
Ipojuca	Susceptível	8 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	8	18	1,0	0,0
	Resistente	10 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10		1,0	0,0
Olinda	Susceptível	8 (0,88)	1 (0,12)	0 (0,0)	9	19	0,95	0,05
	Resistente	7 (0,70)	3 (0,30)	0 (0,0)	10		0,85	0,15
G. do Goitá	Susceptível	9 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	9	19	1,0	0,0
	Resistente	10 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10		1,0	0,0
S. C. do Capibaribe	Susceptível	10 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10	16	1,0	0,0
	Resistente	6 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	6		1,0	0,0
Agrestina	Susceptível	10 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10	18	1,0	0,0
	Resistente	8 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	8		1,0	0,0
Itaíba	Susceptível	10 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10	20	1,0	0,0
	Resistente	8 (0,80)	2 (0,20)	0 (0,0)	10		0,90	0,10
Caruaru	Susceptível	8 (0,80)	2 (0,20)	0 (0,0)	10	20	0,80	0,20
	Resistente	7 (0,70)	3 (0,30)	0 (0,0)	10		0,85	0,15
Cedro	Susceptível	10 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10	20	1,0	0,0
	Resistente	10 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10		1,0	0,0
Salgueiro	Susceptível	9 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	9	17	1,0	0,0
	Resistente	8 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	8		1,0	0,0
A. da Ingazeira	Susceptível	10 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10	16	1,0	0,0
	Resistente	6 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	6		1,0	0,0
S. J. do Egito	Susceptível	10 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10	20	1,0	0,0
	Resistente	10 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10		1,0	0,0
S. Talhada	Susceptível	10 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10	20	1,0	0,0
	Resistente	10 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	10		1,0	0,0
Arcoverde	Susceptível	1 (0,50)	1 (0,50)	0 (0,0)	2	22	0,75	0,25
	Resistente	10 (0,50)	4 (0,20)	6 (0,30)	20		0,60	0,40
Petrolina	Susceptível	7 (0,70)	3 (0,30)	0 (0,0)	10	20	0,85	0,15
	Resistente	6 (0,60)	4 (0,40)	0 (0,0)	10		0,80	0,20
Total	Susceptível	135 (0,93)	10 (0,07)	0 (0,0)	145	304	0,96	0,04
	Resistente	136 (0,85)	17 (0,11)	6 (0,04)	159		0,91	0,09

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: N=Número de fêmeas; S= Susceptível; R=Resistente; Val= Valina; Ile=isoleucina

Tabela 9- Perfil de susceptibilidade de populações de *Aedes aegypti* de municípios do estado de Pernambuco aos inseticidas químicos temephos, diflubenzuron e cipermetrina, bem como a classificação da atividade enzimática e frequências alélicas das mutações Kdr Ile1011Met e Val1016Ile, mecanismos de resistência investigados neste trabalho.

População	Exp. em campo	Temephos CL ₉₅	Diflubenzuron IE ₉₅	Cipermetrina Status	Enzimas de detoxificação					F. alélica ¹		F. alélica ²	
					GST	α-est	P-est	β-est	MFO	Ile	Met	Val	Ile
Rockefeller	RF	1,0	1,0	S	RF	RF	RF	RF	RF	RF	RF	RF	RF
F. Noronha	Bti	2,4	1,7	R	MA	A	MA	I	I	0,65	0,35	0,95	0,05
Recife	Temephos/Bti	7,1	2,4	R	A	I	I	I	I	0,72	0,28	1,0	0,0
Olinda	Temephos	18,0	NA	R	MA	I	MA	I	I	0,95	0,05	0,85	0,15
Ipojuca	Temephos	21,4	NA	R	MA	I	A	I	I	0,84	0,16	1,0	0,0
G. do Goitá	Temephos	72,0	NA	R	A	A	A	I	I	0,75	0,25	1,0	0,0
Agrestina	Temephos	212,6	NA	R	MA	A	A	I	A	0,68	0,32	1,0	0,0
S. C. do Capibaribe	Temephos	142,4	NA	R	MA	A	MA	I	I	0,78	0,22	1,0	0,0
Itaíba	Temephos	120,2	2,2	R	A	A	A	I	I	0,60	0,40	0,90	0,10
Caruaru	Temephos	240,1	4,7	R	MA	MA	A	I	I	0,85	0,15	0,85	0,15
Salgueiro	Temephos	60,0	1,3	R	MA	I	MA	I	A	0,50	0,50	1,0	0,0
Cedro	Temephos	132,7	2,7	R	MA	A	A	I	MA	0,70	0,30	1,0	0,0
A. da Ingazeira	Temephos	120,6	NA	R	MA	MA	MA	A	I	0,60	0,40	1,0	0,0
S. J. do Egito	Temephos	124,7	NA	R	MA	I	A	I	A	0,60	0,40	1,0	0,0
Araripina	Temephos	252,7	NA	NA	A	MA	A	I	I	NA	NA	NA	NA
S. Talhada	Temephos	200,2	4,5	R	MA	MA	A	I	I	0,55	0,45	1,0	0,0
Arcoverde	Temephos	222,6	NA	R	A	MA	A	I	I	0,82	0,18	0,60	0,40
Petrolina	Temephos	38,9	3,1	R	MA	I	A	I	I	0,55	0,45	0,80	0,20

Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: Exp. em campo= inseticidas as quais as populações foram expostas em campo; RF= colônia de referência; CL₉₅ = concentração letal para 95% das larvas; IE₉₅= inibição de emergência para 95% dos adultos; R= resistente; S= susceptível; GST=glutathiona-S-transferase; α-est= alfa esterase; P-est= PNPA esterase; β-est= beta esterase; MFO=oxidases de função mista; MA= muito alterada; A= alterada; I= inalterada; F. alélica¹= Frequência alélica da mutação Kdr Ile1011Met em indivíduos resistentes; F. alélica²= Frequência alélica da mutação Kdr Val1016Ile em indivíduos resistentes; Ile=isoleucina; Met=Metionina; Val= Valina; NA= não avaliado.

8 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram estudadas dezessete populações de *A. aegypti* do estado de Pernambuco quanto ao perfil de susceptibilidade a diferentes inseticidas químicos. Destas, dezesseis populações estão resistentes ao temephos com apenas uma exceção, a população de Fernando de Noronha. Porém é importante ressaltar que em cumprimento a legislação prevista para Área de Proteção Ambiental (APA) como é o caso do arquipélago de Fernando de Noronha não é permitido uso de inseticidas químicos. Sendo assim o controle larvário de *A. aegypti* nesta localidade é feito, desde 2003, com o biolarvicida Bti. Dentre as populações resistentes, apenas a de Recife/PE apresentou moderado nível de resistência ao temephos, e as demais mostraram níveis altos, na maioria das vezes com $RR > 100$. O resultado observado para a população de Recife de certa forma era esperado, uma vez que, desde o biênio 2002/2003 a pressão de seleção exercida pelo uso contínuo do temephos foi retirada devido a sua substituição pelo larvicida biológico Bti (BRASIL, 2006b).

A redução nos níveis de resistência ao temephos em outras localidades brasileiras onde houve a substituição pelo Bti, tem se dado de forma lenta (BRAGA et al., 2004; LIMA et al., 2011). Estudos que mostram o acompanhamento da redução da resistência em populações naturais de *A. aegypti* em outros países são escassos. Wirth e Georghiou (1999) mostraram que em uma população desta espécie na ilha de Tortola no Caribe, a reversibilidade da resistência, mediada apenas pela ausência da pressão de seleção a este organofosforado, se deu em longo prazo, pois a razão de resistência caiu de 46,8 para 8,5 vezes, 10 anos após a primeira análise. Estudos recentes sugerem que para a completa e rápida reversibilidade da resistência ao temephos, além da supressão do uso do composto, uma alternativa é o cruzamento com indivíduos susceptíveis (MELO-SANTOS et al., 2010).

As populações que se destacaram por apresentar níveis muito elevados de resistência ao temephos foram: Caruaru, Serra Talhada, Araripina, Agrestina e Arcoverde apresentando RR acima de 200 vezes. Em outras localidades no Brasil, a resistência ao temephos está amplamente disseminada e os níveis registrados até 2012 são variáveis, e mesmo aqueles classificados como altos (> 10 vezes) são inferiores aos observados nas populações avaliadas no presente estudo (BESERRA et al., 2007; BRAGA et al., 2004; FONTOURA et al., 2012; LIMA et al., 2006; LIMA et al., 2011; LIMA et al., 2003; MELO-SANTOS et al., 2010; MONTELLA et al., 2007). A dinâmica do estabelecimento da resistência pode estar ligada a vários fatores, entre eles, o histórico do uso do inseticida, o nível preexistente de sensibilidade

ao composto, a frequência e herança dos genes ligados a resistência e a co-seleção de distintos mecanismos de resistência na mesma população (HEMINGWAY et al., 2004).

O histórico de uso do temephos relatado para as populações pernambucanas nos permitiu verificar que existem diferenças deste consumo nos diferentes municípios. A quantidade de produto utilizada pode variar em função do número de imóveis de cada localidade, número de criadouros que necessitam de tratamento, bem como o volume de cada criadouro. Apesar de não termos acesso a estas informações, bem como a quantidade utilizada destes produtos nos anos anteriores a 2007, com os dados disponíveis foi possível verificar uma associação entre o consumo do produto de cada localidade e o nível de resistência de cada população. As alterações de susceptibilidade mais importantes foram as observadas nas localidades com mais de 15 anos de uso consecutivo do produto, levando em consideração que este produto tem sido usado rotineiramente desde 1996. Nestes casos, é recomendada a interrupção do uso do composto e a introdução de um produto com modo de ação distinto para a redução de genótipos resistentes.

Estes resultados sugerem que a ineficiência no controle populacional de *A. aegypti* pode estar ocorrendo nestas, e em outras localidades de Pernambuco, que continuam com o uso do temephos. Esta possibilidade também encontra respaldo técnico na avaliação de Montella et al. (2007), no qual é sugerida uma relação de baixa eficiência dos produtos à base de temephos e a resistência elevada (> 10 vezes) a este inseticida. Lima et al. (2011) demonstraram que para a população de Barbalha/CE, com RR = 30, a dosagem da formulação do temephos, em grânulos de areia, recomendada pelo PNCD, eliminava as larvas por apenas 20 dias consecutivos, um período muito inferior ao estabelecido para o ciclo de reaplicação do produto (60 dias). Assim, é relevante discutir a validade do uso de inseticidas sem avaliações periódicas de sua efetividade em campo e sua repercussão sobre os esforços e o desperdício de recursos públicos, humanos e financeiros, empregados para o controle do mosquito da dengue. Atualmente, por exemplo, o governo brasileiro gasta mais de um bilhão de reais com o controle do vetor no país anualmente, e nem sempre são avaliados se os resultados esperados estão sendo alcançados (BARRETO et al., 2011).

Melo-Santos et al. (2010) afirmaram que níveis alarmantes de resistência poderiam ser uma consequência da estruturação técnico-científica equivocada do Programa, o qual impôs uma alta pressão de seleção de resistência ao temephos por seu uso extensivo e intensivo, sem uma avaliação de rotina da eficácia dos produtos comerciais em campo, ou mesmo um esquema de rotatividade com inseticidas de outras classes químicas ou outros agentes de controle. Neste contexto, é importante lembrar que a resistência a inseticidas químicos é um

problema que tem atingindo de forma importante os programas de controle de *A. aegypti* no mundo e está bem documentado para países da região do Caribe, desde o final da década de 1980 (GEORGHIOU et al., 1987; RAWLINS, 1998; RAWLINS; RAGOONANSINGH, 1990). Outro exemplo de elevados níveis de resistência ao temephos foi descrito por Marcombe et al. (2012) em nove populações de *A. aegypti* das ilhas Martinica, com RR_{95} variando entre 26,27 e 152,88, locais onde o temephos foi utilizado por décadas até sua substituição em 2009 pelo *Bacillus thuringiensis israelensis*. Rodriguez et al. (2007), demonstraram que seis de oito populações latino-americanas estudadas apresentaram alta resistência ao temephos, com exceção das populações provenientes da Nicarágua e Venezuela que apresentaram resistência moderada. Populações de *A. aegypti* resistentes ao temephos também foram descritas recentemente no Brasil (GAMBARRA et al., 2013) e em Costa Rica (BISSET et al., 2013), Cuba (BISSET et al., 2004), Bolívia (BIBER et al., 2006), Colômbia (GRISALES et al., 2013; OCAMPO et al., 2011; SANTACOLOMA; CHAVES; BROCHERO, 2012), Argentina (LLINAS et al., 2010), El Salvador (LAZCANO et al., 2009), Índia (SHETTY; SANIL; SHETTY, 2013; TIKAR et al., 2009), Malásia (LOKE et al., 2010), Trinidad (POLSON et al., 2011) e Tailândia (KOMALAMISRA et al., 2011).

Os testes utilizando a cipermetrina, um dos adulticidas aplicados comumente para o controle de *A. aegypti* no Brasil, demonstraram que todas as populações dos municípios do estado de Pernambuco estão resistentes a este composto. A última leitura do ensaio (24 h), quando o inseto não está mais em contato com o inseticida, foi a leitura escolhida para o diagnóstico da resistência, por conta do efeito de desmaio temporário dos mosquitos, que poderia ser confundido com a mortalidade. Se observarmos, após trinta minutos de exposição (tempo letal para Rockefeller), apenas nove das dezesseis populações seriam classificadas como resistentes, e após 120 minutos apenas duas entrariam nesta classificação. Observando a mortalidade apenas nestes tempos poderíamos inferir um diagnóstico errado sobre o perfil de susceptibilidade destas populações. Após 24 horas, as populações que apresentaram os menores percentuais de mortalidade, inferiores a 30%, foram as dos municípios de Petrolina (Sertão do São Francisco), Itaíba (Agreste), Arcoverde e Serra Talhada (Sertão). A aplicação mensal de inseticidas piretróides em pontos estratégicos, como cemitérios, borracharias, ferros-velho e outros, o uso em Ultra Baixo Volume (UBV), como estratégia para interrupção de transmissão viral, bem como a utilização livre de sprays pela população podem ter contribuído para a seleção da resistência à cipermetrina. Este último fator pode estar relacionado com a resistência a este composto encontrada na população de *A. aegypti* de Fernando de Noronha, visto que a população tem acesso ao uso de inseticidas químicos sob a

forma de sprays para uso doméstico. Neste arquipélago também pode ocorrer a entrada de mosquitos resistentes de outras localidades, como por exemplo, de Recife/PE, através dos meios de transporte à ilha, favorecendo o fluxo gênico entre estas populações de *A. aegypti*. Fatores diversos como o uso de piretróides em programas de controle de outros insetos vetores (anofelinos e triatomíneos) e pragas urbanas, além da resistência cruzada com o DDT, organoclorado que apresenta o mesmo sítio de ação dos piretróides, intensamente utilizado na década de 60, podem ter contribuído no processo de seleção da resistência nas demais localidades.

Apesar da detecção da resistência à cipermetrina em todas as populações avaliadas, não foi possível correlacioná-la com o volume aplicado deste inseticida em cada localidade. Vale ressaltar que a definição do perfil de susceptibilidade destas populações foi feita por um teste diagnóstico, logo não quantifica a resistência, e possivelmente o cálculo apenas do percentual de mortalidade não seja o parâmetro ideal para verificar esta correlação.

A resistência de populações de *A. aegypti* a outros piretróides como a deltametrina têm sido demonstrada em outras pesquisas. Marcombe et al. (2011) detectaram resistência a este piretróide nas nove populações estudadas das Ilhas Martinica. Segundo estes autores o uso de piretróides deve ser reconsiderado como estratégia de controle de adultos nesta ilha. Uma avaliação realizada na Costa Rica demonstrou que as duas populações estudadas estavam resistentes à deltametrina apesar de estarem susceptíveis à cipermetrina (BISSET et al., 2013). Segundo Polson et al. (2011) cinco populações de *A. aegypti* de oito avaliadas estavam resistentes a permetrina. Outros pesquisadores evidenciaram que a resistência compromete o sucesso das intervenções de controle, impactando-as negativamente, como foi descrito em campanhas adulticidas no Caribe (HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010; POLSON et al., 2011).

No Brasil, nossos resultados se assemelham aos encontrados por Lima et al. (2011), cujas populações de Crato e Barbalha, municípios do estado do Ceará, também estão resistentes à cipermetrina. Alteração na susceptibilidade de populações de *A. aegypti* a este inseticida em outros municípios brasileiros já foram descritas desde 2001 (DA-CUNHA et al., 2005). Segundo estes autores, de quinze populações avaliadas de diferentes municípios brasileiros, treze estavam resistentes e eles afirmam que este tipo de resistência se desenvolve de forma rápida. Estes resultados alertam também que poderá haver uma resistência cruzada a outros compostos da classe dos piretróides nestas populações, como a deltametrina e a α -cipermetrina, cujos mecanismos de ação são os mesmos da cipermetrina e, portanto a substituição do adulticida no âmbito do PNCD deve ser feita com muita cautela.

A resistência encontrada em nosso trabalho para temephos e cipermetrina parece estar relacionada com o mecanismo de resistência metabólica devido a ação enzimática, visto que a maioria das populações investigadas apresentam de duas a três enzimas com perfis alterados ou muito alterados. Diversos estudos demonstram que mecanismos de resistência metabólica foram identificados em populações de vetores, para as principais classes de inseticidas utilizados em seus programas de controle, incluindo organofosforados, piretróides, carbamatos e DDT (HEMINGWAY, 2000; HEMINGWAY; RANSON, 2000; LIMA et al., 2011; MONTELLA et al., 2007).

Nesta avaliação todas as populações apresentaram perfis de GSTs alterados ou muito alterados. As GSTs frequentemente estão relacionadas com a resistência aos piretróides, como a cipermetrina (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005), e todas as populações avaliadas apresentaram-se resistentes a este composto. Estas enzimas também estão envolvidas na detoxificação de organofosforados (VONTAS et al., 2002) e no metabolismo do DDT (LUMJUAN et al., 2005). No Brasil, organoclorados estavam sendo utilizados desde 1940 no controle esporádico de *A. aegypti* durante as campanhas contra a febre amarela (LOWY, 1998). O uso de piretróides no controle desta espécie foi iniciado em 2001, e neste mesmo ano, com a primeira avaliação realizada pela Rede MoReNAa, já foi detectada resistência a este grupo, e também alterações na atividade metabólica das GSTs (DA-CUNHA et al., 2005). Estas alterações podem ser atribuídas à manutenção, nas populações, dos alelos de resistência que foram selecionados através do uso intensivo do DDT, bem como à migração de indivíduos portadores de genes da resistência de outras localidades, para o Brasil (MONTELLA et al., 2007). Outra enzima que pode estar relacionada com a resistência aos piretróides é a PNPA esterase. Segundo Montella et al. (2007), durante três avaliações realizadas, em diferentes anos, da atividade desta enzima em populações brasileiras de *A. aegypti*, foi observado um aumento na atividade enzimática da PNPA esterase e, ao mesmo tempo, uma redução das atividades das outras esterases, no período após a introdução dos piretróides, em substituição aos organofosforados, como adulticidas em 2001. Segundo estes autores, nestas populações, a presença simultânea de diferentes esterases, e a dinâmica da atividade da PNPA-esterases é distinta dos padrões de α -EST e β -EST, sendo observado inclusive um aumento na atividade da PNPA-esterase ao longo do monitoramento, que pode estar mais relacionado à resistência a piretróides do que aos organofosforados. Estudos mais detalhados sobre a ação desta enzima sobre a metabolização de inseticidas são necessários para o melhor esclarecimento destas questões.

Apenas uma das populações estudadas em Pernambuco apresentou alteração para β -esterase, a de Afogados da Ingazeira. Esta população, como a maioria das outras foi classificada como altamente resistente ao temephos. As enzimas α -esterases foram as que se apresentaram atividade elevada ou muito elevada. Estas enzimas podem estar mais relacionadas com a resistência ao temephos, visto que na maioria das populações com alta resistência a este inseticida a atividade destas enzimas se apresentou elevada. De acordo com a literatura, alterações nas esterases estão relacionadas com a resistência a organofosforados (FIELD; HITCHEN; REES, 1984; MAZZARRI; GEORGHIOU, 1995; RODRIGUEZ et al., 2002).

As populações de Salgueiro e de São José do Egito, apesar de não apresentarem alteração em α -EST e β -EST, foram duas entre as quatro populações que apresentaram alteração das monoxigenases. As enzimas monoxigenases são enzimas que podem metabolizar todos os tipos de xenobióticos. Trabalhos de Bisset et al. (2001) e Rodriguez et al. (1999) não relacionaram a resistência aos organofosforados com alterações nas monoxigenases. No entanto, Braga et al. (2005) e Andriguetti et al. (2008) detectaram alterações da MFO em populações brasileiras resistentes ao temephos e à cipermetrina. Segundo estes últimos autores, alterações nesta classe de enzima sugerem cautela no uso de inseticidas alternativos como reguladores do crescimento de insetos (IGRs), devido a possível ocorrência de resistência cruzada. Como enzimas detoxificantes pertencem a superfamílias de numerosos genes e frequentemente diferentes enzimas produzem os mesmos metabólitos, muitas vezes o aumento da atividade de um tipo de enzima pode conduzir a uma resistência cruzada entre diferentes classes de inseticidas (RANSON et al., 2002; RANSON et al., 2011).

Verificamos em nossos ensaios que uma população de *A. aegypti* apresentou alteração na sensibilidade da acetilcolinesterase, quando comparada à Rockefeller, segundo o critério definido pelo Ministério da Saúde em 2006. No entanto, o critério definido pela Organização Mundial de Saúde indica que as populações de *A. aegypti* só devem ser classificadas como apresentando acetilcolinesterase insensível, quando mais de 30% de seus indivíduos apresentarem inibição da atividade desta enzima na presença do propoxur (HEMINGWAY, 1998). Seguindo este critério, a população de São José do Egito não apresenta acetilcolinesterase insensível. Uma pesquisa que detectou insensibilidade nesta enzima em quatro populações de *A. aegypti* utilizou os mesmos critérios utilizados pela rede MoReNAa (POLSON et al., 2011). Esta classificação não foi adequada para esta enzima. As diferenças de respostas, observadas em função dos diferentes critérios disponíveis, são comuns e foram

discutidas em Medeiros (2011). Sugerimos que a classificação utilizada pela Organização Mundial de Saúde também seja utilizada em casos de dúvida a respeito da sensibilidade desta enzima, para que tenhamos uma real associação desta característica com a resistência. Outra investigação importante é a análise da presença de mutações em ensaios moleculares no gene *ace*. A presença de mutações neste gene ainda não foi detectada em populações de *A. aegypti*.

Utilizamos nesta avaliação populações com diferentes razões de resistência ao temephos e diferentes perfis enzimáticos, para a verificação da susceptibilidade ao diflubenzuron. Este estudo trouxe pela primeira vez uma avaliação de linha de base dose-resposta para populações de *A. aegypti*, e estas respostas podem contribuir na elaboração de um critério de classificação da resistência para este composto, visto que atualmente o único critério utilizado é o do temephos, elaborado por Mazzari e Georghiou (1995). Além disto, estes dados servem de base para monitoramentos futuros nas localidades onde o uso já está fazendo parte da rotina e em outras localidades que ainda irão utilizá-lo.

Resistência a compostos ISQs são mais frequentes na literatura em lepidópteros pragas da agricultura, para *Musca domestica* e *Lucilia cuprina* (CERF; GEORGHIOU, 1974; ISHAAYA; KONTSEDALOV; HOROWITZ, 2003; KOTZE; SALES; BARCHIA, 1997; PIMPRIKAR; GEORGHIOU, 1979; SAUPHANOR et al., 2000). Em um experimento realizado por Ishaaya et al. (2003), utilizando lagartas de *Spodoptera littoralis*, foi evidenciada resistência ao teflubenzuron, quatro vezes maior na população de campo, quando comparada à população de laboratório, porém esta mesma população se apresentou susceptível ao novaluron. Outro trabalho, utilizando a espécie de mosca *Lucilia cuprina*, demonstrou resistência cruzada ao diflubenzuron e ao organofosforado diazinon, com razões de resistência de 16 e 25 vezes, respectivamente. Estes autores correlacionaram a resistência com a atividade enzimática das monoxigenases (KOTZE; SALES; BARCHIA, 1997). Segundo Sauphanor et al. (2000) o aumento na frequência de tratamentos com o diflubenzuron é um fator preponderante para o aumento da resistência. Os autores observaram que 36 populações de *Cydia pomonella*, lagarta praga do cultivo de maçãs, estavam resistentes ao diflubenzuron e o uso intenso do produto estava correlacionado com esta resistência.

Uma pesquisa realizada por Fontoura et al. (2012) com populações de *A. aegypti* no Brasil, demonstrou que quatro populações que apresentavam níveis moderados a altos de resistência ao temephos, foram consideradas susceptíveis ao novaluron, com RR_{90} , variando entre 0,83 a 1,71. Segundo estes autores não houve correlação entre resistência ao temephos e ao novaluron. No nosso estudo, observamos que os valores de RR_{95} variaram de 1,3 a 4,7,

estas variações podem ser consideradas como naturais de cada população, visto que a utilização do diflubenzuron ainda está no início e a quantidade usada pode ainda não ter ocasionado forte pressão de seleção nas populações de campo. O município de Serra Talhada foi o único dos municípios avaliados que estava fazendo o uso deste produto há dois anos do período de coleta destas amostras em campo, e foi o município que usou a maior quantidade deste produto neste período. Apesar desta observação ficou evidenciado que, neste momento da avaliação, não houve correlação entre a quantidade deste produto e a razão de resistência ao mesmo. A ausência desta correlação também pode ter sido influenciada pelo fato de que a coleta da maioria das amostras foi feita nos municípios antes do uso deste produto.

No entanto observamos que houve correlação positiva entre as RRs do temephos e do diflubenzuron. O uso de um composto químico pode induzir a resistência a outro composto, caso os mesmos mecanismos de resistência estejam envolvidos, caracterizando uma resistência cruzada. As populações de Caruaru e Serra Talhada foram as que apresentaram maiores razões de resistência ao diflubenzuron e estas duas populações apresentam características similares como, razões de resistência ao temephos acima de 200 vezes, e o mesmo perfil enzimático para GSTs (muito alteradas), alfa esterases (muito alteradas) e PNPA esterases (alteradas). Sugerimos que estas enzimas podem estar envolvidas na metabolização destes compostos.

Atualmente o Ministério da Saúde recomenda o uso do novaluron no PNCD. Este produto foi também liberado pela Organização Mundial de Saúde para uso em água potável (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2008b.). Com o uso, mais frequente dos ISQs, a rede MoReNAa recomenda que os perfis de susceptibilidade das populações a estes compostos sejam monitorados. No entanto, ainda são desconhecidos quais valores de RRs representariam algum indício de resistência, pois não existe no Brasil uma avaliação abrangente sobre a atividade dose-resposta desses ISQs para populações de *A. aegypti*. Ainda assim, ISQs são recomendados como primários na substituição ao temephos nos municípios estratégicos ou naqueles onde o temephos não se apresenta mais eficaz. No nosso estado, apenas quatro municípios são monitorados pela rede MoReNAa e nos anos de 2009 a 2011, oito municípios passaram a utilizar estes ISQs, além dos descritos nesta avaliação, os municípios de Jaboatão dos Guararapes e Moreno também fizeram o uso destes compostos sem nenhum estudo prévio sobre o perfil de susceptibilidade populacional. Esta substituição está ocorrendo de forma lenta, e muitos municípios continuam com o uso do organofosforado e ao mesmo tempo não se conhece a real efetividade do diflubenzuron/novaluron, tomados agora como produto primário no controle de *A. aegypti*. Um experimento realizado no Brasil,

para avaliar a atividade residual do diflubenzuron, em testes simulados de campo, com renovação diária de 20% do volume de água, demonstrou que a inibição de 100% da emergência dos adultos aconteceu por apenas 19 dias. Com 30 dias, a taxa de inibição foi de 98,2%, com 46 dias, 86% e com 71 dias este percentual caiu para 66% (GARCIA NETO et al., 2013). Segundo os autores, esta foi uma atividade satisfatória para o diflubenzuron, mas devemos levar em conta que o período de re-aplicação do produto em campo é de dois meses e durante este período os depósitos tratados podem ficar com uma baixa cobertura residual deste produto. Além deste aspecto, existem diferenças tanto relacionadas ao clima de cada localidade, como variações no nível de susceptibilidade de cada população, fatores que podem interferir ainda mais em sua persistência em campo. Nas populações avaliadas neste estudo, por exemplo, fica clara a diversidade de respostas, tanto aos inseticidas, quanto aos mecanismos metabólicos envolvidos na resistência, demonstrando que as heterogeneidades populacionais podem ter conseqüências em um programa de controle.

A avaliação da frequência de mutações relacionadas às alterações do sítio-alvo no canal de sódio demonstrou que a mutação Ile1011Met é a mais relevante por estar disseminada em todas as populações estudadas. Esta mutação está associada com a resistência à cipermetrina nas populações de Petrolina e Salgueiro e com os municípios avaliados do estado de Pernambuco que, em conjunto, também demonstraram esta associação. Existem pesquisas que mostram que a substituição de uma isoleucina por uma metionina ou valina no sítio 1011 (domínio IIS6) ainda não está claramente relacionada com a resistência a piretróides (BRENGUES et al., 2003; MARTINS et al., 2009b), sugerindo que outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos como, por exemplo, o metabólico, mecanismo também investigado neste trabalho. No entanto, num trabalho mais recente, utilizando a expressão do canal de sódio Na_v de *A. aegypti* em oócitos de *Xenopus*, mostrou que a presença desta mutação reduz significativamente a sensibilidade do canal de sódio à permetrina, bem como a presença de outras mutações isoladas, Val1016Gly e Phe1534Cys e em conjunto, Ser989Phe com Val1016Gly, Val1016Gly com Asp1763Tyr, re-afirmando a importância da presença destas mutações na resistência a este composto (DU et al., 2013).

A mutação Val1016Ile apesar de não estar presente em todas as populações, esteve presente em homozigose na população de Arcoverde, população em que houve maior número de fêmeas sobreviventes à ação do adulticida. Apesar desta mutação ter sido associada com a resistência em estudos anteriores, Du et al. (2013) demonstraram que sua presença permite a ligação tanto de permetrina como de deltametrina no canal de sódio.

Estas duas mutações foram descritas por Saavedra-Rodriguez et al. (2007) em populações latino americanas de *A. aegypti* e no Brasil foram descritas por Martins et al. (2009a, 2009b) e Lima et al. (2011). Algumas destas avaliações também demonstraram a associação destas mutações com a resistência. No presente estudo também foi observada a presença das mutações Val1016Ile e Ile1011Met, em indivíduos que apresentaram fenótipos susceptíveis e resistentes, o que dificultou a associação destas mutações com a resistência encontrada nas populações avaliadas. Talvez a co-dominância, que ocorre quando ambos os alelos estão se expressando, possa estar envolvida nos fenótipos encontrados. Ramphul et al. (2009) demonstrou que populações de *An. gambiae* que apresentavam a mutação Leu1014Ser eram resistentes ao DDT. Segundo estes autores a presença desta mutação está relacionada a um efeito co-dominante, em indivíduos heterozigotos, que resultavam num fenótipo intermediário. Além deste fator o aumento do número amostral e o background haplotípico poderiam trazer mais associações entre estas mutações e a resistência.

Nesta avaliação não observamos a presença das mutações Leu1014Fen e Leu1014Ser. Estudos anteriores esclarecem que *A. aegypti* não apresenta substituições de aminoácidos no sítio clássico KDR 1014, ao contrário de muitos outros insetos ou mesmo mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Culex* (WEETMAN et al., 2010). Isto ocorre provavelmente porque o sítio 1014 do canal de sódio de *A. aegypti* é codificado por um CTA, no lugar do códon ATT descrito na maioria dos outros insetos. Por esta razão, duas substituições simultâneas de nucleotídeos, mais difíceis de ocorrer, seriam necessárias para mudar de Leucina (CTA) para Fenilalanina (TTT) ou Serina (TCA) (MARTINS et al., 2009a; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007). A mutação no sítio 982, apesar de ter sido descrita para uma população de *A. aegypti*, proveniente do Vietnã e de estar associada com a resistência à permetrina e lambda cialotrina nesta localidade (BRENGUES et al., 2003), também não foi encontrada nas populações investigadas neste trabalho. As mutações Ile1011Val e Val1016Gli apesar de serem descritas para *A. aegypti* (BRENGUES et al., 2003; RAJATILEKA et al., 2008; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007) também não foram encontradas e não há relatos da presença destas mutações em populações de *A. aegypti* no Brasil.

A mutação Phe1534Cys, com a substituição de uma fenilalanina por uma cisteína, não foi avaliada neste trabalho. No entanto, não podemos esquecer que outras pesquisas destacam esta mutação como importante na resistência a piretróides e ao DDT (DU et al., 2013; HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010; YANOLA et al., 2011). A presença destas mutações pode comprometer o uso de piretróides no controle vetorial, sendo recomendada a contínua investigação de sua presença, bem como o cálculo de suas frequências para o

monitoramento da resistência (MARTINS et al., 2009a; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007; SODERLUND; KNIPPLE, 2003).

Diante da diversidade de respostas de cada população avaliada neste estudo, fica evidente que cada uma delas apresenta características peculiares relacionadas com uma série de fatores, tanto biológicos, quanto aqueles relacionados à pressão de seleção ocasionada pelo uso do inseticida, que não ocorre da mesma forma em todas localidades. Esta variedade de respostas nem sempre fáceis de interpretar, mostra quão diferentes são estas populações e que diferentes também devem ser as estratégias utilizadas em seu controle, sendo inviável o uso de uma forma padrão de controle para todas estas populações. O investimento no uso de inseticidas no PNCD eleva os custos e ao mesmo tempo não é avaliado o impacto destas ações dentro do programa. Como consequências ocorrem as falhas das medidas utilizadas e as substituições de produtos, devido a uma rápida resposta do mosquito, que tem uma ampla diversidade genética. O genoma do *A. aegypti* está constituído por 15.419 genes (NENE et al., 2007) e 235 são genes envolvidos com no metabolismo de compostos tóxicos (STRODE et al., 2008). Esta quantidade de genes exclusiva para o metabolismo mostra que esta espécie está preparada geneticamente para lidar com as adversidades ambientais e para responder rapidamente à pressão imposta pelo uso de inseticidas. Para continuar com o uso destes compostos deve-se constantemente monitorar a suscetibilidade de *A. aegypti* aos inseticidas empregados no PNCD, bem como, as mutações ligadas à resistência e os genes expressos após a exposição aos compostos inseticidas, para que possa ser avaliada a efetividade do uso destes produtos e para a tomada de decisão dos gestores de saúde quanto ao seu manejo.

Desta forma, para elaborar um programa inovador e eficaz, faz-se necessário adotar ações que reduzam significativamente, ou idealmente que superem a longa dependência do uso de qualquer agente inseticida, visto que as fontes de proliferação do mosquito devem ser o principal alvo para o controle de *A. aegypti*. Ao mesmo tempo deve ser potencializada a integração de tecnologias ecologicamente viáveis voltadas ao melhoramento do saneamento básico e da ocupação dos espaços urbanos, a participação comunitária/social efetiva e a utilização de métodos de controle biológico e mecânico dirigidos à eliminação de ovos, larvas e adultos, garantindo assim, a sustentabilidade dos programas.

9 CONCLUSÕES

- a) Populações de *Aedes aegypti*, provenientes de dezessete municípios do Estado de Pernambuco, apresentam resistência aos inseticidas temephos e cipermetrina, ambos empregados no PNCD. Apenas a população de Fernando de Noronha foi susceptível ao larvicida temephos;
- b) Os altos níveis de resistência das populações de *A. aegypti* ao temephos estão correlacionados com a quantidade deste produto utilizado pelos municípios. Esta situação se encontra mais crítica nas meso-regiões do sertão e agreste pernambucano;
- c) E este estudo trouxe uma avaliação de linha de base dose-resposta ao diflubenzuron para populações de *A. aegypti* em Pernambuco, demonstrando que as populações analisadas apresentam perfis variáveis de susceptíveis ao diflubenzuron entendidos como naturais, devido a baixa pressão de seleção a este agente em campo;
- d) Foi observada uma correlação positiva entre as razões resistência ao diflubenzuron e ao temephos;
- e) O mecanismo metabólico está envolvido com a resistência aos inseticidas avaliados nas populações de *A. aegypti*, provenientes de municípios do Estado de Pernambuco e insensibilidade na acetilcolinesterase não foi detectada;
- f) A resistência ao piretróide também estava associada à mutação Ile1011Met em duas populações de *A. aegypti*;
- g) Dentre as mutações no gene *Na_v*, a Ile1011Met foi a mais relevante, por ser encontrada em todas as populações avaliadas, em heterorigoze, e por ter sido associada com a resistência;
- h) Estes achados evidenciam uma situação crítica para a efetividade de controle do mosquito com o uso de inseticidas químicos, visto que a resistência ao temephos e a cipermetrina está disseminada nas populações pernambucanas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science, Washington, v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000.
- ALMEIDA, E. A. P. Padrão de oviposição e ciclos gonotróficos de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 e *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) em Laboratório. 2003. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- ALON, M. et al. Organophosphates' resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 38, n. 10, p. 940-949, 2008.
- ANDRIGHETTI, M. T. M. et al. Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. Dengue Bulletin, Geneva, v. 32, p. 186-198, 2008.
- ARENSBURGER, P. et al. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. Science, Washington, v. 330, n. 6000, p. 86-88, 2010.
- ASIH, P. B. et al. Existence of the rdl mutant alleles among the *Anopheles malaria* vector in Indonesia. Malaria Journal, London, v. 11, p. 57, 2012.
- ATKINS, W. M. et al. The catalytic mechanism of glutathione S-transferase (GST). Spectroscopic determination of the pKa of Tyr-9 in rat alpha 1-1 GST. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 268, n. 26, p. 19188-19191, 1993.
- BARBOSA DA SILVA, J. et al. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. Epidemiol Bulletin, Washington, v. 23, n. 1, p. 3-6, 2002.
- BARBOSA, S.; BLACK, W. C. T.; HASTINGS, I. Challenges in estimating insecticide selection pressures from mosquito field data. PloS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 5, n. 11, p. e1387, 2011.
- BARRETO, M. L. et al. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. Lancet, London, v. 377, n. 9780, p. 1877-1889, 2011.
- BASS, C. et al. Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. Malaria Journal, London, v. 6, p. 1-14, 2007.
- BECKER, N. et al. Mosquitoes and their control. New York: Kluwer Academic, 2003.
- BELINATO, T. A. et al. Effect of triflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* under laboratory conditions. Parasites & Vectors, London, v. 6, n. 83, p. 1-7, 2013.

_____. Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 43-47, 2009.

BESERRA, E. B. et al. Resistência de Populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) ao Organofosforado Temefós na Paraíba, Brasil. Neotropical Entomology, Londrina, v. 36, n. 2, p. 303-307, 2007.

BIBER, P. A. et al. Laboratory evaluation of susceptibility of natural subpopulations of *Aedes aegypti* larvae to temephos. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 22, n. 3, p. 408-411, 2006.

BISSET, J. et al. The mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Cuba. Bulletin of Entomological Research, London, v. 80, p. 245-250, 1990.

BISSET, J. A. et al. Status of resistance to insecticides and resistance mechanisms in larvae from Playa municipality collected during the intensive campaign against *Aedes aegypti* in Havana City, 2001-2002. Revista Cubana de Medicina Tropical, Habana, v. 56, n. 1, p. 61-66, 2004.

_____. Insecticide Resistance in Two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Strains From Costa Rica. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 50, n. 2, p. 352-361, 2013.

_____. High esterases as mechanism of resistance to organophosphate insecticides in *Aedes aegypti* strains. Revista Cubana de Medicina Tropical, Habana, v. 53, n. 1, p. 37-43, 2001.

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

BLACK, W. C. T. et al. The Yin and Yang of linkage disequilibrium: mapping of genes and nucleotides conferring insecticide resistance in insect disease vectors. Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, v. 627, p. 71-83, 2008.

BLOOMQUIST, J. R. Ion channels as targets for insecticides. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 41, p. 163-190, 1996.

_____. Insecticides: Chemistries and Characteristics. 2009. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>>. Acesso em: 11 abr. 2013.

BLOOMQUIST, J. R.; SODERLUND, D. M. Pyrethroid insecticides and DDT modify alkaloid-dependent sodium channel activation and its enhancement by sea anemone toxin. Molecular Pharmacology, New York, v. 33, n. 5, p. 543-550, 1988.

BOARD, P. G. et al. Evidence for an Essential Serine Residue in the Active-Site of the Theta-Class Glutathione Transferases. Biochemical Journal, London, v. 311, p. 247-250, 1995.

BOURGUET, D. et al. Determination of Ace.1 Genotypes in Single Mosquitoes: Toward an Ecumenical Biochemical Test. Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, v. 55, n. 2, p. 122-128, 1996.

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.

_____. Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 42, n. 5, p. 830-837, 2005.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 2, n. 16, p. 113-118, 2007a.

_____. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 16, p. 279-293, 2007b.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Dados e indicadores selecionados. Brasília, 2003.

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

_____. Reunião Técnica Para Discutir Status de Resistência de *Aedes aegypti*. Rio de Janeiro, 2006b.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas (Rede MoReNAa): metodologia de amostragem. Brasília, 2008.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue. Balanço Dengue Semana Epidemiológica 1 a 39 de 2011. 2011. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_37_39.pdf>. Acesso em: 09 Abr 2012.

_____. Balanço Dengue Semana Epidemiológica 1 a 10 de 2013. 2013. Disponível em:<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Fev/25/ppt_final_dengue_25fev14h.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2013.

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.

BRIEGEL, H. Metabolic relationship between femal body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. Journal of Insect Physiology, Oxford, v. 36, p. 165-172, 1990.

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

_____. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 14, n. 2, p. 159-164, 1998b.

BROWN, A. W. A. Inseticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 2, p. 23-140;123-140, 1986.

BROWN, G. B.; GAUPP, J. E.; OLSEN, R. W. Pyrethroid insecticides: stereospecific allosteric interaction with the batrachotoxinin-A benzoate binding site of mammalian voltage-sensitive sodium channels. Molecular Pharmacology, New York, v. 34, n. 1, p. 54-59, 1988.

BURTON, M. J. et al. Differential resistance of insect sodium channels with kdr mutations to deltamethrin, permethrin and DDT. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 41, n. 9, p. 723-732, 2011.

BUSVINE, J. R. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. Nature, London, v. 168, n. 4266, p. 193-195, 1951.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artemed: 2003. Disponível em: <http://www.kilibro.com/book/preview/22079_bioestatistica-principios-e-aplicacoes>. Acesso em: 24 maio 2013.

CANYON, D. V.; HII, J. L.; MULLER, R. Adaptation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) oviposition behavior in response to humidity and diet. Journal of Insect Physiology, Oxford, v. 45, n. 10, p. 959-964, 1999.

CATTERALL, W. A. et al. International Union of Pharmacology: Approaches to the nomenclature of voltage-gated ion channels. Pharmacological Reviews, Baltimore, v. 55, p. 573-574, 2003.

CERF, D. C.; GEORGHIOU, G. P. Cross-resistance to an inhibitor of chitin synthesis, TH60-40, in insecticide-resistant strains of the house fly. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 22, n. 6, p. 1145-1146, 1974.

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: WHO, 1997. (WHO/CTD/WHOPES/97.2.).

CLARK, A. G.; SHAMAAN, N. A. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the housefly is a glutathione S-transferase. Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, v. 22, n. 3, p. 249-261, 1984.

CLEMENTS, A. N. The biology of mosquitoes. v.1. London: Chapman & Hall, 1992.

_____. The biology of mosquitoes. v.2. London: Chapman & Hall, 1999.

COHEN, E. Chitin Biochemistry - Synthesis and Inhibition. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 32, p. 71-93, 1987.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

CRINNION, W. J. Environmental Medicine, Part 4: Pesticides – Biologically Persistent and Ubiquitous Toxins. Alternative Medicine Review, Saindpoint, v. 5, p. 432- 447, 2000.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental- Uma Revisão. Química Nova, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 995-1002, 2002.

DA-CUNHA, M. P. et al. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, p. 441-444, 2005.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 39, n. 4, p. 353, 2006.

DAVID, J. P. et al. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 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, Geneve, v. 49, n. 5, p. 475-483, 1973.

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

DEGALLIER, N. et al. New entomological and virological data on the vectors of sylvatic yellow fever in Brazil. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 44, n. (2/3), p. 136-142, 1992.

DHANG, C. C. et al. Biochemical detection of temephos resistance in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) from dengue-endemic areas of Selangor State, Malaysia. Proceedings ASEAN Congress Tropical Medicine Parasitology, Bangkok, v. 3, p. 6-20, 2008.

DING, Y. et al. Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress. Biochemical Journal, London, v. 387, n. Pt 3, p. 879-888, 2005.

DONALÍSIO, M. R. O dengue no espaço habitado. São Paulo: Hucitec, 1999.

DU, W. et al. Independent mutations in the Rdl locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 14, n. 2, p. 179-183, 2005.

DU, Y. et al. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 110, n. 29, p. 11785-11790, 2013.

EISLER, R. Diflubenzuron hazards to fish, wildlife, and Invertebrates: A synoptic review. Biological Report- Contaminant Hazard Reviews- Report 25, Laurel, v. 1, n. 4, p. 2-48, 1992.

ELDEFRAWI, M. E. et al. Interactions of pyrethroid and cyclodiene insecticides with nicotinic acetylcholine and GABA receptors. Neurotoxicology, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 47-62, 1985.

ELLIOTT, M. The relationship between the structure and the activity of pyrethroids. Bulletin of the World Health Organization, Geneve, v. 44, n. 1-3, p. 315-324, 1971.

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

ESTRADA, J. G.; MULLA, M. S. Evaluation of two new insect growth regulators against mosquitoes in the laboratory. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 2, n. 1, p. 57-60, 1986.

FARNESI, L. C. et al. Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: effects of the chitin synthesis inhibitor novaluron. PLoS ONE, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e30363, 2012.

FARNHAM, A. W.; LORD, K. A.; SAWICKI, R. M. Study of some of the mechanisms connected with resistance to diazinon and diazoxon in a diazinon-resistant strain of houseflies. Journal of Insect Physiology, Oxford, v. 11, n. 11, p. 1475-1488, 1965.

FERRARI, J. A. Population genetics in vector biology. In: MARQUARDT, W. C.; BEATY, B. J. (Ed.). The Biology of Disease Vectors. Colorado: Niwot, 1996. p. 512-525.

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

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; DABORN, P. J.; LE GOFF, G. The genetics and genomics of insecticide resistance. Trends in Genetics, Cambridge, v. 20, n. 3, p. 163-170, 2004.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. et al. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. Nature, London, v. 363, n. 6428, p. 449-451, 1993.

FIELD, W. N.; HITCHEN, J. M.; REES, A. T. Esterase activity in strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) tolerant and susceptible to the organophosphate insecticide malathion. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 21, n. 4, p. 412-418, 1984.

FIGUEIREDO, R. M. et al. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 14, n. 4, p. 667-669, 2008.

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.

FONTOURA, N. G. et al. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 107, n. 3, p. 387-395, 2012.

FORATTINI, O. P. Entomologia Médica. São Paulo: EdUSP, 1962.

_____. Entomologia Médica. São Paulo: EdUSP, 1965.

FOURNET, F.; SANNIER, C.; MONTENY, N. Effects of the insect growth regulators OMS 2017 and diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 9, n. 4, p. 426-430, 1993.

FRANCO, O. Reinfestação do Pará por *Aedes aegypti*. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais, Rio de Janeiro, v. 4, n. 21, p. 729-731, 1969.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Plano diretor de erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil. Brasília, 1996.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil 1980-1998. Boletim Eletrônico Epidemiológico Edição Especial. Brasília: Funasa, 1999.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Vigilância epidemiológica: Programa Nacional de Controle da Dengue. Brasília, 2002.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Plano de Intensificação das ações de Controle da Dengue (PIACD). Brasília, 2001.

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

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.

GARCIA NETO, L. J. et al. Influence of water replacement on Diflubenzuron duration effect in the control of *Aedes aegypti* in simulated field conditions, in Northeastern Brazil. Journal of Health & Biological Sciences, Pakistan, v. 1, n. 1, p. 21, 2013.

GEORGHIOU, G. P. Principles of insecticide resistance management. Phytoprotection, Québec, v. 75, p. 51-59, 1994.

GEORGHIOU, G. P. et al. Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in the Caribbean area and neighboring Countries. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 24, n. 3, p. 290-294, 1987.

GOLDIN, A. L. et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. Neuron, Cambridge, v. 28, n. 2, p. 365-368, 2000.

GORDON, R.; BURFORD, I. R. Effects of Methoprene, a Juvenile-Hormone Analog, on the Larval and Pupal Stages of the Yellow-Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. Journal of Insect Physiology, Oxford, v. 30, n. 4, p. 279-286, 1984.

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

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

GRANT, D. F.; MATSUMURA, F. Glutathione S-Transferase 1 and 2 in Susceptible and Insecticide Resistant *Aedes aegypti*. Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, Calif., v. 33, n. 2, p. 132-143, 1989.

GRISALES, N. et al. Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control. PloS Neglected Tropical Diseases, v. 7, n. 9, p. e2438, 2013.

GROSSCURT, A. C. et al. Ph-70-23 - a new acaricide and insecticide interfering with chitin deposition. Pesticide Science, London, v. 22, n. 1, p. 51-59, 1988.

GUBLER, D. J. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. Annals of the Academy of Medicine Singapore, Singapore, v. 27, n. 2, p. 227-234, 1998.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 1, n. 2, p. 55-57, 1995.

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.

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 - Gene Structure and Expression, Amsterdam, v. 1574, n. 1, p. 51-62, 2002.

HEALY, M. J.; DUMANCIC, M. M.; OAKESHOTT, J. G. Biochemical and Physiological-Studies of Soluble Esterases from *Drosophila melanogaster*. Biochemical Genetics, New York, v. 29, n. 7-8, p. 365-388, 1991.

HEMINGWAY, J. The Biochemical Nature of Malathion Resistance in *Anopheles stephensi* from Pakistan. Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, Calif., v. 17, n. 2, p. 149-155, 1982a.

_____. Genetics of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles atroparvus* (Diptera: Culicidae). Journal of Economic Entomology, College Park, v. 75, n. 6, p. 1055-1058, 1982b.

_____. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). Geneva: World Health Organization 1998. (WHO/CDC/CPC/MAL/98.6).

_____. 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 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. et al. The biochemistry of insecticide resistance in *Anopheles sacharovi*: comparative studies with a range of insecticide susceptible and resistant *Anopheles* and *Culex* species. Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, v. 24, p. 68-76, 1985.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 45, p. 371-391, 2000.

HEMINGWAY, J. et al. Field and laboratory detection of the altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitos (Diptera, Culicidae). Bulletin of Entomological Research, London, v. 76, n. 4, p. 559-565, 1986.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

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

INGLES, P. J. et al. Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant house fly strains. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 26, n. 4, p. 319-326, 1996.

INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. Prevention and Management of Insecticide Resistance in Vectors of Public Health Importance. Designed and produced by the IRAC Public Health Team, 2 nd ed.: 2011. Disponível em: <http://www.irc-online.org/content/uploads/VM-Layout-v2.6_LR.pdf>. Acesso em: 6 nov. 2013.

ISHAAYA, I.; KONTSEDALOV, S.; HOROWITZ, A. R. Novaluron (Rimon), a novel IGR: potency and cross-resistance. Archives of Insect Biochemistry and Phisiology, New York, v. 54, n. 4, p. 157-164, 2003.

JOSHI, V.; SINGHI, M.; CHAUDHARY, R. C. Transovarial transmission of dengue 3 virus by *Aedes aegypti*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 90, n. 6, p. 643-644, 1996.

- KAKANI, E. G. et al. Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 41, n. 3, p. 150-158, 2011.
- KASAI, S. et al. First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus*. Japanese Journal of Infectious Diseases, Tokyo, v. 64, n. 3, p. 217-221, 2011.
- KAWADA, H. et al. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 3, n. 10, p. e527, 2009.
- KETTERMAN, A. J.; JAYAWARDENA, K. G.; HEMINGWAY, J. Purification and characterization of a carboxylesterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. Biochemical Journal, London, v. 287, pt. 2, p. 355-360, 1992.
- KOMALAMISRA, N. et al. Insecticide susceptibility of the dengue vector, *Aedes aegypti* (L.) in Metropolitan Bangkok. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, Bangkok, v. 42, n. 4, p. 814-823, 2011.
- KOSTAROPOULOS, I. et al. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 31, n. 4-5, p. 313-319, 2001.
- KOTZE, A. C.; SALES, N.; BARCHIA, I. M. Diflubenzuron tolerance associated with monooxygenase activity in field strain larvae of the Australian sheep blowfly (Diptera: Calliphoridae). Journal of Economic Entomology, College Park, v. 90, n. 1, p. 15-20, 1997.
- LAGADIC, L. et al. Purification and partial characterization of glutathione S-transferases from insecticide-resistant and lindane-induced susceptible *Spodoptera littoralis* (Boisd) Larvae. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 23, n. 4, p. 467-474, 1993.
- LAZCANO, J. A. et al. Assessing the insecticide resistance of an *Aedes aegypti* strain in El Salvador. Revista Panamericana de Salud Pública, Washington, v. 26, n. 3, p. 229-234, 2009.
- LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 52, p. 231-253, 2007.
- LIMA, E. P. et al. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do Estado do Ceará. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 39, n. 3, p. 259-263, 2006.
- _____. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara, Brazil. Parasites & Vectors, London, v. 4, p. 1-12, 2011.
- LIMA, J. B. et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 68, n. 3, p. 329-333, 2003.

LLINAS, G. A. et al. Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 1, p. 113-116, 2010.

LOKE, S. R. et al. Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and temephos. Tropical Biomedicine, Putrajaya, v. 27, n. 3, p. 493-503, 2010.

LOUGHNEY, K.; GANETZKY, B. The para locus encodes a protein homologous to the vertebrate sodium-channel. Journal of Neurogenetics, New York, v. 5, p. 262-262, 1989.

LOUGHNEY, K.; KREBER, R.; GANETZKY, B. Molecular analysis of the para locus, a sodium-channel gene in *Drosophila*. Cell, Cambridge, v. 58, n. 6, p. 1143-1154, 1989.

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

_____. Representing and intervening in public health: viruses, mosquitoes and Rockefeller Foundation experts in Brazil. História, ciências, saúde- Manguinhos, Rio de Janeiro, v. 5, n. 3, p. 647-677, 1998.

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

MACORIS, M. L. G. et al. Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the state of Sao Paulo, Brazil. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.

_____. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 102, n. 8, p. 895-900, 2007.

_____. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of Sao Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 703-708, 2003.

MARCOMBE, S. et al. Pyrethroid resistance reduces the efficacy of space sprays for dengue control on the island of Martinique (Caribbean). PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1-9, 2011.

_____. 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. 1-14, 2009.

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.

_____. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. Pesticide Science, London, v. 55, n. 10, p. 1012-1020, 1999.

MARTINS, A. J. et al. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. Pest Management Science, West Sussex, v. 64, n. 6, p. 676-680, 2008.

_____. 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.

MARTINS, A. J.; VALLE, D. The pyrethroid knockdown resistance. In: LARRAMENDY, M.; SOLONESKI, S. (Ed.). Insecticides. La Plata: Intech, 2012. p. 17-38.

MARTINS, F.; DA SILVA, I. G. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 37, n. 2, p. 135-138, 2004.

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.

MATSUMURA, F.; BROWN, A. W. A. Studies on organophosphorus-tolerance in *Aedes aegypti*. Mosquito News, New York, v. 23, n. 1, p. 26-31, 1963.

MAZZARRI, M. B.; GEORGHIOU, G. P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 11, n. 3, p. 315-322, 1995.

MEDEIROS, P. F. V. Investigações sobre os mecanismos de resistência em larvas e adultos de *Aedes aegypti*, Linnaeus, 1762. 2011. Dissertação (Mestrado em biologia parasitária)- Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2011.

MELO-SANTOS, M. A. V. 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.

- MENONE, M. L. et al. PCBs and organochlorines in tissues of silverside (*Odontesthes bonariensis*) from a coastal lagoon in Argentina. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, New York, v. 38, n. 2, p. 202-208, 2000.
- MILANI, R. Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbatante del DDT: correlazione tran abbattimento e mortalità in *Musca domestica* Rivista di Parassitologia Roma, v. 15, p. 513-542, 1954.
- MIYO, T.; OGUMA, Y. Contributions of three-site mutations in acetylcholinesterase and cytochrome P450 to genetic variation in susceptibility to organophosphate insecticides within a natural population of *Drosophila melanogaster*. Researches on Population Ecology, Tokyo, v. 52, n. 1, p. 159-169, 2010.
- MOEHLECKE, R. Ovos de *Aedes aegypti*: viáveis mesmo após meses sem contato com água. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1654&sid=9&tpl=printerview>>. Acesso em: 11 abr. 2013.
- MONDAL, K. A. M. S. H.; PARWEEN, S. Insect growth regulators and their potential in the management of stored-product insect pests. Integrated Pest Management Reviews, London, v. 5, p. 255-295, 2000.
- MONTELLA, I. R. Estudo dos mecanismos bioquímicos de resistência a inseticidas em diferentes populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) do Brasil. 2008. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)-Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2008.
- MONTELLA, I. R. et al. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.
- 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.
- MORI, A. et al. Molecular cloning and characterization of the complete acetylcholinesterase gene (*Ace1*) from the mosquito *Aedes aegypti* with implications for comparative genome analysis. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 37, n. 7, p. 667-674, 2007.
- MULLA, M. S. The future of insect growth regulators in vector control. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 11, n. 2 pt. 2, p. 269-273, 1995.
- MULLA, M. S. et al. Laboratory and field evaluation of novaluron, a new acylurea insect growth regulator, against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Journal of Vector Ecology, Santa Ana, v. 28, n. 2, p. 241-254, 2003.
- MUNSTERMANN, L. E. The yellow fever mosquito. 1995. Disponível em: <<http://www.novomilenio.inf.br/ano97/9704cchaa.jpg>>. Acesso em: 11 abr. 2013.
- N'GUESSAN, R. et al. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 17, n. 1, p. 19-25, 2003.

- NABESHIMA, T. et al. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, v. 313, n. 3, p. 794-801, 2004.
- NARAHASHI, T. Nerve membrane ionic channels as the primary target of pyrethroids. Neurotoxicology, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 3-22, 1985.
- NASUTI, C. et al. Different effects of Type I and Type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. Toxicology, Amsterdam, v. 191, n. 2-3, p. 233-244, 2003.
- NENE, V. et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. Science, Washington, v. 316, n. 5832, p. 1718-1723, 2007.
- NIWA, R. et al. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 279, n. 34, p. 35942-35949, 2004.
- NOBRE, A.; ANTEZANA, D.; TAUIL, P. L. Febre Amarela e Dengue no Brasil: epidemiologia e controle. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 27, supl. 3, p. 59-66, 1994.
- NOGUEIRA, R. M. R.; EPPINGHAUS, A. L. F. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 106, n. 3, p. 255-256, 2011.
- O'REILLY, A. O. et al. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. Biochemical Journal, London, v. 396, n. 2, p. 255-263, 2006.
- OAKESHOTT, J. G. et al. Evolutionary Genetics of *Drosophila* Esterases. Genetica, The Hague, v. 90, n. 2-3, p. 239-268, 1993.
- OCAMPO, C. B. et al. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. Acta Tropica, Basel, v. 118, n. 1, p. 37-44, 2011.
- OLIVEIRA FILHO, A. M. *General overview on vector control in relation to the organic insecticides pollution in Brazil*. In: International Workshop on Organic Micropollutants in the Environment, Proceedings, pp. 1-3, Rio de Janeiro: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1997.
- OLLIS, D. L. et al. The alpha/beta hydrolase fold. Protein Engineering, Oxford, v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.
- OMURA, T.; SATO, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: I evidence for its hemoprotein nature. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 239, p. 2370-2378, 1964.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Geneva, 1995a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control, Washington DC, 1995b.

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

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Diflubenzuron in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, Geneva, 2008a. (WHO/HSE/AMR/08.03/6).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Novaluron in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, 2008b. (WHO/HSE/AMR/08.03/11).

PAEPORN, P. et al. Temephos resistance in two forms of *Aedes aegypti* and its significance for the resistance mechanism. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, Bangkok, v. 34, n. 4, p. 786-792, 2003.

PARKES, T. L.; HILLIKER, A. J.; PHILLIPS, J. P. Genetic and biochemical analysis of glutathione-S-transferase in the oxygen defense system of *Drosophila melanogaster*. Genome, Ottawa, v. 36, n. 6, p. 1007-1014, 1993.

PEARSON, W. R. Phylogenies of glutathione transferase families. Methods in Enzymology, New York, v. 401, p. 186-204, 2005.

PERRY, T.; BATTERHAM, P.; DABORN, P. J. The biology of insecticidal activity and resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 41, n. 7, p. 411-422, 2011.

PIMPRIKAR, G. D.; GEORGHIU, G. P. Mechanisms of resistance to diflubenzuron in the house-fly, *Musca-Domestica* (L). Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, v. 12, n. 1, p. 10-22, 1979.

PLAPP, F. W. Biochemical genetics of insecticide resistance. Annual Review of Entomology, Palo Alto, v. 21, p. 179-197, 1976.

POLSON, K. A. et al. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. Acta Tropica, Basel, v. 117, n. 1, p. 31-38, 2011.

PONTES, R. J. S.; RUFFINO-NETO, A. Dengue em localidade urbana da Região Sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 218-227, 1994.

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.

RAJATILEKA, S. et al. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. Acta Tropica, Basel, v. 108, n. 1, p. 54-57, 2008.

RAMPHUL, U. et al. Insecticide resistance and its association with target-site mutations in natural populations of *Anopheles gambiae* from eastern Uganda. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 103, n. 11, p. 1121-1126, 2009.

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

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

RANSON, H. et al. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? Trends in Parasitology, Oxford, v. 27, n. 2, p. 91-98, 2011.

_____. 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, p. 295-304, 2001.

RAWLINS, S. C. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. Revista Panamericana de Salud Pública, Washington, v. 4, n. 4, p. 243-251, 1998.

RAWLINS, S. C.; RAGOONANSINGH, R. Comparative organophosphorus insecticide susceptibility in caribbean populations of *Aedes aegypti* and *Toxorhynchites moctezuma*. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 6, n. 2, p. 315-317, 1990.

RAYMOND, M. et al. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. Proceedings of the Royal Society of London - Series B - Biological sciences, London, v. 353, n. 1376, p. 1707-1711, 1998.

REED, J. R. et al. Unusual Mechanism of Hydrocarbon Formation in the Housefly - Cytochrome-P450 Converts Aldehyde to the Sex-Pheromone Component (Z)-9-Tricosene and Co2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 91, n. 21, p. 10000-10004, 1994.

REIDY, G. F. et al. Increased glutathione S-transferase activity and glutathione content in an insecticide-resistant strain of *Tribolium castaneum* (Herbst). Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, v. 36, n. 3, p. 269-276, 1990.

RINKEVICH, F. D.; DU, Y.; DONG, K. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, v. 106, n. 3, p. 93-100, 2013.

ROBERTS, D. R.; ALECRIM, W. D. Behavioral response of *Anopheles darlingi* to DDT-sprayed house walls in Amazonia. Bulletin of the Pan American Health Organization, Washington, v. 25, n. 3, p. 210-217, 1991.

RODRIGUES, M. V. N. et al. GC-MS determination of organochlorine pesticides in medicinal plants harvested in Brazil. Journal of the Brazilian Chemical Society, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 135-142, 2007.

RODRIGUEZ, M. M. et al. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. Journal of Medical Entomology, Honolulu, v. 39, n. 6, p. 882-888, 2002.

RODRIGUEZ, M. M.; BISSET, J. A.; FERNANDEZ, D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 23, n. 4, p. 420-429, 2007.

RODRIGUEZ, M. M. et al. Levels of insecticide resistance and its mechanisms in a strain of *Aedes aegypti* of Santiago de Cuba. Revista Cubana de Medicina Tropical, Habana, v. 51, n. 2, p. 83-88, 1999.

ROZENDAAL, J. A. Vector control: methods for use by individuals and communities. Geneva: World Health Organization, 1997.

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. et al. Increase of sodium current after pyrethroid insecticides in mouse neuroblastoma cells. Brain Research, Amsterdam, v. 437, n. 2, p. 309-322, 1987.

RUSSELL, R. C. Larva de Aedes. 2000. Disponível em: <http://www.bioqmed.ufrj.br/ciencia/Bromelias/aedes_aegypti_larvae.jpg>. Acesso em: 11 abr. 2013.

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

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. et al. 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.

SAELIM, V. et al. Bottle and biochemical assays on temephos resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, Bangkok, v. 36, n. 2, p. 417-425, 2005.

SANTACOLOMA, L.; CHAVES, B.; BROCHERO, H. L. Susceptibility of natural populations of dengue vector to insecticides in Colombia. Biomedica, Bogotá, v. 32, n. 3, p. 333-343, 2012.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides - Uma Visão Geral. Alimentos e Nutrição, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. Química Nova, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007.

SAUPHANOR, B. et al. Monitoring resistance to diflubenzuron and deltamethrin in French codling moth populations (*Cydia pomonella*). Pest Management Science, West Sussex, v. 56, n. 1, p. 74-82, 2000.

SAWICKI, R. et al. Cloning, expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Delta-class (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila melanogaster*, and identification of additional nine members of the Epsilon class. Biochemical Journal, London, v. 370, p. 661-669, 2003.

SCOTT, J. A. The Molecular-Genetics of Resistance - Resistance as a Response to Stress. Florida Entomologist, Gainesville, v. 78, n. 3, p. 399-414, 1995.

SCOTT, J. G. Cytochromes P450 and insecticide resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 29, n. 9, p. 757-777, 1999.

SECCACINI, E. et al. Effectiveness of pyriproxyfen and diflubenzuron formulations as larvicides against *Aedes aegypti*. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 24, n. 3, p. 398-403, 2008.

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, 2013.

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

SILVA, J. J.; MENDES, J. Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlandia, State of Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 40, n. 6, p. 612-616, 2007.

SINGH, S. P. et al. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. European Journal of Biochemistry, Berlin, v. 268, n. 10, p. 2912-2923, 2001.

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.

SOGORB, M. A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. Toxicology Letters, Amsterdam, v. 128, n. 1-3, p. 215-228, 2002.

SOPER, F. L. Rehabilitation of the Eradication Concept in Prevention of Communicable Diseases. Public Health Reports, Boston, v. 80, n. 10, p. 855-869, 1965.

SOTA, T.; MOGI, M. Interspecific Variation in Desiccation Survival-Time of *Aedes* (*Stegomyia*) Mosquito Eggs Is Correlated with Habitat and Egg Size. Oecologia, Berlin, v. 90, n. 3, p. 353-358, 1992a.

_____. Survival-Time and Resistance to Desiccation of Diapause and Nondiapause Eggs of Temperature *Aedes* (*Stegomyia*) Mosquitos. Entomologia Experimentalis et Applicata, Amsterdam, v. 63, n. 2, p. 155-161, 1992b.

SPARKS, T. C. et al. The Role of Behavior in Insecticide Resistance. Pesticide Science, London, v. 26, n. 4, p. 383-399, 1989.

SRISAWAT, R. et al. Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Applied Entomology and Zoology, Tokyo, v. 45, n. 2, p. 275-282, 2010.

STONE, B. F.; BROWN, A. W. Mechanisms of resistance to fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied. Bulletin of the World Health Organization, Geneve, v. 40, n. 3, p. 401-408, 1969.

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.

_____. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 38, n. 1, p. 113-123, 2008.

SUTHERLAND, T. D. et al. A cytochrome P450 terpenoid hydroxylase linked to the suppression of insect juvenile hormone synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 95, n. 22, p. 12884-12889, 1998.

TAUIL, P. L. Critical aspects of yellow fever control in Brazil. Revista de Saúde Pública, v. 44, n. 3, p. 555-558, 2010.

TAYLOR, P. Anticholinesterase agents. In: GILMAN, A. G. et al (Ed.). The pharmacological basis of therapeutics. 6 th ed. Macmillan: New York, 1980. p. 100-119.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. Informe Epidemiológico do SUS, Brasília, v. 4, n. 8, p. 5-33, 1999.

TEMPORÃO, J. G. et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 17, n. 5, p. 938-940, 2011.

- TESTA, B.; KRAMER, S. D. The biochemistry of drug metabolism - An introduction Part 3. Reactions of hydrolysis and their enzymes. Chemistry & Biodiversity, Zürich, v. 4, n. 9, p. 2031-2122, 2007.
- TIKAR, S. N. et al. Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. Parasitology Research, Berlin, v. 105, n. 1, p. 57-63, 2009.
- VASCONCELOS, P. F. et al. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. Lancet, v. 358, n. 9276, p. 91-97, 2001.
- VIEIRA, G. J. Pupa de Aedes. 2008. Disponível em:<http://www.fiocruz.br/ioc/media/pupa1_genilton_280308.jpg>. Acesso em: 11 abr. 2013.
- VIJVERBERG, H. P.; VAN DEN BERCKEN, J. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. Critical Reviews in Toxicology, Boca Raton, v. 21, n. 2, p. 105-126, 1990.
- VILLANI, F.; HEMINGWAY, J. The detection and interaction of multiple organophosphorus and carbamate insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* from Italy. Pesticides Biochemistry and Physiology, New York, v. 27, p. 218-228, 1987.
- VONTAS, J. et al. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. Insect Molecular Biology, Oxford, v. 16, n. 3, p. 315-324, 2007.
- VONTAS, J. G.; SMALL, G. J.; HEMINGWAY, J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. Biochemical Journal, London, v. 357, n. Pt 1, p. 65-72, 2001.
- VONTAS, J. G. et al. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Biochemical Journal, London, v. 362, n. Pt 2, p. 329-337, 2002.
- WARE, G. W. An introduction to insecticides. Monografia. University of Minnesota. 2000. Disponível em:<<http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>>. Acesso em: 26 mar. 2013.
- WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. An introduction to insecticides. 2004. Disponível em:<<http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>>. Acesso em: 21 maio 2013.
- 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. La résistance du moustique *Culex pipiens* aux insecticides. Médecine Sciences, Paris, v. 19, n. 12, p. 1190-1192, 2003.
- _____. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. Proceedings Biological Sciences, London, v. 269, n. 1504, p. 2007-2016, 2002.

_____. 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, 2004.

WILLOUGHBY, L.; BATTERHAM, P.; DABORN, P. J. Piperonyl butoxide induces the expression of cytochrome P450 and glutathione S-transferase genes in *Drosophila melanogaster*. Pest Management Science, West Sussex, v. 63, n. 8, p. 803-808, 2007.

WILLOUGHBY, L. et al. A comparison of *Drosophila melanogaster* detoxification gene induction responses for six insecticides, caffeine and phenobarbital. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 36, n. 12, p. 934-942, 2006.

WIRTH, M. C.; GEORGHIOU, G. P. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. Journal of the American Mosquito Control Association, Fresno, v. 15, n. 3, p. 315-320, 1999.

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.

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

WU, S. et al. Cloning and characterization of acetylcholinesterase 1 genes from insecticide-resistant field populations of *Liposcelis paeta* Pearman (Psocoptera: Liposcelididae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, Oxford, v. 40, n. 5, p. 415-424, 2010.

XU, Q. et al. Resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, and possible mechanisms for resistance. Pest Management Science, West Sussex, v. 61, n. 11, p. 1096-1102, 2005.

YANG, T.; LIU, N. Genome analysis of cytochrome P450s and their expression profiles in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. PLoS ONE, San Francisco, v. 6, n. 12, p. e29418, 2011.

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.

APÊNDICE A- ARTIGO PUBLICADO

Araújo et al. *Parasites & Vectors* 2013, **6**:297
<http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/297>



RESEARCH

Open Access

The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management

Ana Paula Araújo, Diego Felipe Araujo Diniz, Elisama Helvecio, Rosineide Arruda de Barros, Cláudia Maria Fontes de Oliveira, Constância Flávia Junqueira Ayres, Maria Alice Varjal de Melo-Santos, Lêda Narcisa Regis and Maria Helena Neves Lobo Silva-Filha*

Abstract

Background: *Aedes aegypti* is the vector of dengue virus, and its control is essential to prevent disease transmission. Among the agents available to control this species, biolarvicides based on *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) are an effective alternative to replace the organophosphate temephos for controlling populations that display resistance to this insecticide. The major goal of this study was to determine the baseline susceptibility of Brazilian *Ae. aegypti* populations to Bti, taking into account their background in terms of larvicide exposure, status of temephos resistance and the level of activity of detoxifying enzymes involved in metabolic resistance to insecticides.

Methods: Population samples were established under insectarium conditions. Larval susceptibility to temephos and Bti was evaluated through bioassays and lethal concentrations of these compounds were determined. Biochemical assays were performed to determine the specific activity of five detoxifying enzymes in these samples.

Results: Fourteen populations were characterized and, except for one case, all displayed resistance to temephos. Most populations were classified as highly resistant. The populations also showed increased activity of one or more detoxifying enzymes (glutathione-S-transferases, esterases and mixed function oxidases), regardless of their temephos resistance status. All populations analyzed were susceptible to Bti, and the lethal concentrations were similar to those detected in two laboratory susceptible colonies. The response to Bti showed little variation. A maximum resistance ratio of 2.1 was observed in two untreated populations, while in two Bti-treated populations, the maximum resistance ratio was 1.9. No positive correlation was found between temephos resistance, increased activity of detoxifying enzymes, and susceptibility to Bti.

Conclusions: Data from this study show that all populations were susceptible to Bti, including twelve untreated and two treated populations that had been exposed to this agent for more than ten years. The temephos resistance and increased activity of detoxifying enzymes observed in thirteen populations was not correlated with changes in susceptibility to Bti. Our data show a lack of cross-resistance between these two compounds; thus, Bti can be used in an integrated control program to fight *Ae. aegypti* and counteract the temephos resistance that was found among all populations analyzed.

Keywords: Vector control, Bti, Susceptibility, Temephos, Metabolic resistance, Cross-resistance

* Correspondence: mhneves@cpqam.fiocruz.br
Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães-FIOCRUZ, Recife, PE 50670-420, Brazil



© 2013 Araújo et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background

Aedes aegypti is the major vector of dengue virus (DENV) and has been responsible for an important disease burden in human populations worldwide in the last few decades [1,2]. This species has spread over most municipalities in Brazil, where it is the main DENV vector and has provoked frequent epidemics since 1986 [3]. Vector control remains the sole action to control dengue because vaccines and other prophylactic measures are not currently available. In this context, a National Program for *Aedes aegypti* Eradication (PEAa) was created in 1996 in Brazil and was replaced by the National Program for Dengue Control (PNCD) in 2002. The main goal of the PNCD is to fight this disease through integrated control actions, including the utilization of chemical larvicides and adulticides [4]. The organophosphate (OP) temephos has been the major larvicide used by the PNCD, and one of the most used compounds to control mosquitoes globally, despite its negative effects on non-target organisms and reports of resistance. In mosquito, temephos resistance has been associated with the alteration of its target site in acetylcholinesterase and also with metabolic mechanisms associated with enzymes involved in the detoxification of xenobiotic compounds [5-7].

Bioinsecticides based on the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) have been successfully used for dipteran control [8]. Bti was first introduced for controlling *Simulium*, and its utilization was later extended to *Aedes* species. Long-term programs carried out in many countries have demonstrated its effectiveness under field conditions [9-11]. Its larvicidal action is based on crystals produced upon bacterial sporulation, mainly composed of the four protoxins Cry11Aa, Cry4Aa, Cry4Ba and Cyt1Aa. Bti's mode of action depends on the ingestion of these crystals by larvae. Crystal solubilization occurs at the alkaline pH of the midgut, and the protoxins released into the lumen are converted into active toxins by proteases [12]. The whole crystal displays optimal toxicity, whereas individual toxins, or their combinations, do not show comparable levels of activity [13]. Once activated, the Cry toxins bind to specific midgut receptors from *Ae. aegypti* larvae: cadherins, aminopeptidases and alkaline phosphatases have been identified as binding molecules [14]. Studies to elucidate the synergy among Bti toxins have demonstrated that Cyt1Aa can act as a surrogate receptor for Cry11Aa and Cry4Ba. Furthermore, binding between Cyt1Aa and Cry toxins induces conformational changes that improve the capacity of Cry to bind to the other receptors available in the midgut [15-17]. This complex action based on four toxins with the capacity to bind to different target molecules does not favor the selection of resistance. Previous reports have failed to demonstrate the development of resistance to whole Bti

crystal after continuous exposure for resistance selection under laboratory conditions [18-21], and resistance to Bti-based larvicides in field populations has not been reported to date [22,23].

In light of the effectiveness of Bti to control *Aedes* species and the lack of resistance, its utilization is under expansion in control programs for the treatment of breeding sites. Bti has also been used in oviposition and adult traps to prevent the development of larvae in these devices when they are used for monitoring, or on a massive scale, to reduce mosquito populations [24-26]. Another factor that supports the increasing use of Bti is the worldwide *Ae. aegypti* resistance to temephos, as has frequently been reported. In Brazil, there is a serious resistance problem that compromises the effects expected from use of temephos by the PNCD [27-33]. Thus, Bti is a candidate to manage resistance to temephos; however, some reports have recently suggested a potential cross-resistance between temephos and Bti [34-36]. These studies found a positive correlation between temephos resistance and increased activity of the detoxifying enzymes involved in the metabolism of xenobiotics along with a pattern of decreased response to Bti. This association was also reported for pyriproxyfen, suggesting that the increased activity of mixed function oxidases and previous temephos resistance could play a role in the reduced efficacy of pyriproxyfen against some species, including *Ae. aegypti* [37,38]. This issue requires investigation in view of the strategic role that Bti can play for the management of temephos resistance.

The major goal of the present study is to establish a baseline of Bti susceptibility in *Ae. aegypti* populations from Brazil, taking into account their background in terms of previous larvicide exposure, status of temephos resistance, and activity of detoxifying enzymes. Baseline data are necessary to evaluate the significance of alterations that can be found among populations exposed to control pressure and to provide guidelines for the use of control agents to be employed in mosquito control.

Methods

Colonies

Three *Aedes aegypti* colonies were used in this study and were maintained in the insectarium of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ) under controlled conditions at $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 70% humidity, and 12:12 h L:D photoperiod. Larvae were reared in dechlorinated tap water and fed with cat food. Adults were fed on a 10% sucrose solution, and females were also fed on chicken blood. The colonies used were: 1) Rockefeller, a susceptible colony used as an international reference for larvicides; 2) ReL, a susceptible colony established from a large egg sampling from the Recife Metropolitan Region (RMR) that has been maintained

since 1996 in the insectarium of CPqAM-FIOCRUZ [39]; and 3) RecR, a temephos-resistant colony established from egg samples collected in Araripina city (Pernambuco State, Brazil). This sample showed an initial temephos resistance ratio (RR) of 7-fold, and further laboratory selection resulted in a RR at LC_{95} of 181-fold after 20 generations of temephos exposure [40,41].

Populations

Mosquito samples from fourteen municipalities in Brazil collected between 2009 and 2011 were investigated in this study. Six were analyzed in the scope of the Brazilian *Aedes aegypti* Resistance Monitoring Network (MoReNAa), established by the PEAa in 2000. Ten samples were from different municipalities of Pernambuco State, while four (João Pessoa, Bacabal, Oiapoque and Macapá) were collected from other Brazilian States. All populations have been exposed to temephos except for the population from Fernando de Noronha, which is an oceanic island situated 354 km offshore of the Brazilian coast (Natal city). As this island is an Environmentally Protected Area, Bti-based products have been the sole larvicide used for *Aedes* control since 2002. In the other municipalities, the history of exposure to temephos, in the context of PEAa-PNCD actions, began in 1996. Recife city has the lowest level of exposure to temephos because this product was replaced by Bti in 2002. Insect growth regulators (IGR) acting as chitin synthesis inhibitors (Diflubenzuron or Novaluron) were introduced as a third control agent in two municipalities, Macapá and João Pessoa.

Establishment of sub-colonies in the laboratory

Eggs from the municipalities analyzed were collected using oviposition traps set up in a representative number of sites according to the recommendations of the MoReNAa network [42]. Each population sample was established in the insectarium as a sub-colony composed of at least 1,000 adults obtained from the egg samples using a 2:1 female/male ratio. After hatching, larvae were reared until adulthood under the laboratory conditions previously described. Bioassays were carried out using larvae from the first (F_1) or second (F_2) generations obtained from these samples.

Characterization of *Aedes aegypti* samples

Samples were analyzed according to the following parameters: 1) previous exposure to either the OP temephos, to the microbial agent Bti or to an IGR (Diflubenzuron or Novaluron); 2) status of temephos susceptibility; and 3) activity of detoxifying enzymes. The record of exposure to control agents was considered since 1996, when PEAa was implemented in Brazil. This information was provided by the Secretary of Health of the various municipalities.

Temephos bioassays

Bioassays to evaluate temephos toxicity against larvae were performed according to a standard protocol [43]. Briefly, groups of 20 late 3rd instar larvae in 100 mL of tap water in disposable cups were treated with a series of temephos concentrations that provide between 10 and 100% mortality after 24 h. Each bioassay was performed using six to ten concentrations and three replicates of 20 larvae per concentration, in addition to an untreated group. Mortality rates were recorded after 24 h to determine the lethal concentration for 50% (LC_{50}) and 95% (LC_{95}) of larvae using Probit analysis in the program SPSS 10.0 for Windows. The LCs established for each population were the average of at least three bioassays. The resistance ratios (RR) between the LC for the sample tested and the LC for the reference colony were used to classify the populations [44] into the following categories: low resistance ($3 < RR < 5$), moderate resistance ($5 < RR < 10$) and high resistance ($RR > 10$).

Bti bioassays

Susceptibility to *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (Bti) was also analyzed through a similar protocol of multiple concentration bioassays using late 3rd instar larvae, according to standard methods [45]. Lethal concentrations of the standard lyophilized powder of Bti strain H-14 (IPS82, Institut Pasteur) for 50% (LC_{50}) and 90% (LC_{90}) of exposed larvae after 24 h were determined. Briefly, groups of 20 larvae were exposed to serial dilutions of lyophilized spore-crystal standard powder in cups with 100 mL of bacterial suspensions in tap water. Three replicates were performed for each of six concentrations tested per bioassay. A control group was tested using water only. Each bioassay was repeated at least three times. The mean lethal concentrations and the resistance ratios (RR) were obtained for each sample, as described above.

Enzymatic assays

The specific activity of detoxifying enzymes (DE), potentially associated with metabolic resistance to chemical insecticides, was evaluated. Three major classes of enzymes were assayed: glutathione-S-transferases (GST), esterases (α -est, β -est, PNPA-est) and mixed function oxidases (MFO). For each population, approximately 100 one-day-old females, non-blood fed, previously stored at -70°C , were individually tested using a standard protocol described by Montella *et al.* (2007). The catalytic activity detected in the individuals from the Rockefeller colony was used as a reference to classify the tested samples according to the frequency of individuals that display an activity higher than the 99th percentile of the Rockefeller population [46]. The samples were classified as unaltered (U <15%), altered (A 15-50%) and highly altered (HA >50%).

Results

The study was performed based on sub-colonies of each population and three laboratory colonies, two used as references for susceptibility (Rockefeller and RecL) and one for temephos resistance (RecR), which was artificially selected in the laboratory. The evaluation of temephos toxicity to larvae from the sub-colonies showed that all populations analyzed were classified as resistant, except for the F. de Noronha population, which is from an area where temephos has not been used by the PEAA-PNCD (Table 1). Two populations (Bacabal and Recife) were classified as displaying moderate resistance (MR), while the remaining populations showed high resistance levels (HR) with a wide range of RR values, from 11-fold found in Macapá to 252.7 in Araripina. Among these HR populations, it was possible to distinguish two that displayed an RR of approximately 11-fold, where temephos was replaced by other control agents (Bti and IGR). A second group of nine populations that have been exposed exclusively to temephos since the beginning of the control program (Table 2), showed higher RR (60.0-252.7). Bacabal was the only population exposed exclusively to temephos that displayed a moderate level of resistance (RR 6.6-fold), rather than the high

level of resistance that was observed for the other samples under this condition (Table 2). RR values for temephos resistance in half of the populations studied were over 100-fold.

Individuals were then evaluated for the activity of DE. Thirteen populations showed increased or highly increased activity of at least three of the five enzymes investigated compared to the Rockefeller colony (Table 2, Additional file 1). The Recife population displayed an increase only in the activity of GSTs. In fact, GST activity was increased in all populations, followed by PNPA-esterases (93% of populations), α -esterases (79%), mixed function oxidases (36%) and finally β -esterases, whose alterations were less frequent amongst the populations (14%). Evaluation of laboratory colonies showed that RecL did not display any alterations, while RecR showed increased GST, α -esterases and MFO activities.

These analyses, summarized in Table 2, provide quantitative data on temephos resistance and DE activity in these populations as a basis for evaluating their susceptibility to Bti. The RecL reference colony and the temephos-resistant RecR colony were both susceptible to Bti, indicated by an RR that was equal or less than 2-fold at LC₅₀ and LC₉₀, compared to the Rockefeller colony

Table 1 Toxicity of temephos to 3rd instar *Aedes aegypti* larvae from colonies and sampled populations

Sample	No. larvae	LC ₅₀ ^a		RR ^b	LC ₉₅ ^a		RR ^b
		Mean (95% fiducial limits)			Mean (95% fiducial limits)		
Rockefeller ^c	1200	0.007 (0.006-0.008)		1.0	0.011 (0.011-0.012)		1.0
RecL	1500	0.010 (0.009-0.010)		1.4	0.017 (0.016-0.019)		1.5
RecR (F ₂₀) ^d	1380	1.230 (1.168-1.305)		175.7	1.978 (1.840-2.180)		179.8
F. de Noronha	1740	0.017 (0.016-0.018)		2.4	0.026 (0.024-0.028)		2.4
Bacabal	2560	0.039 (0.037-0.043)		5.6	0.073 (0.069-0.079)		6.6
Macapá	1760	0.064 (0.057-0.070)		9.1	0.121 (0.103-0.137)		11.0
João Pessoa	1840	0.041 (0.033-0.043)		5.8	0.129 (0.103-0.173)		11.7
G. do Goitá	1560	0.135 (0.113-0.159)		19.3	0.792 (0.607-1.122)		72.0
Oiapoque	2240	0.295 (0.247-0.337)		42.1	1.127 (0.872-2.495)		102.5
Agrestina	1740	0.483 (0.421-0.548)		69.0	2.339 (1.899-3.051)		212.6
Araripina	1920	1.570 (1.420-1.750)		224.3	2.780 (2.600-3.280)		252.7
Rockefeller ^c	1140	0.012 (0.011-0.013)		1.0	0.017 (0.016-0.019)		1.0
Salgueiro	1500	0.154 (0.130-0.181)		12.8	1.021 (0.757-1.534)		60.0
S. C. Capibaribe	1320	0.675 (0.585-0.767)		56.2	2.421 (2.010-3.086)		142.4
S. J. Egito	1500	0.900 (0.818-0.986)		75.0	2.120 (1.862-2.514)		124.7
A. da Ingazeira	1260	1.013 (0.987-1.147)		84.4	2.051 (1.806-2.449)		120.6
Cedro	1320	1.063 (0.959-1.162)		88.6	2.256 (2.043-2.574)		132.7
Rockefeller ^c	1260	0.009 (0.009-0.010)		1.0	0.014 (0.014-0.016)		1.0
Recife	1680	0.042 (0.039-0.046)		4.7	0.100 (0.088-0.119)		7.1

^aLethal Concentrations (mg/L) for 50% (LC₅₀) or for 95% (LC₉₅) of exposed larvae after 24 h.

^bResistance Ratio (LC for population tested/LC for the Rockefeller reference colony).

^cData in this line are the reference (Rockefeller colony) for the samples below.

^dData from Strode et al. (2012).

Table 2 Characterization of *Aedes aegypti* from laboratory colonies and sampled populations

Sample	Origin	Exposure ^b	Temephos		Detoxifying enzymes ^a				
			RR ₉₅ ^c	Status ^d	GST	α-est	P-est	β-est	MFO
Rockefeller	Laboratory	N	1.0	S	RF	RF	RF	RF	RF
RecL	Laboratory	N	1.0	S	U	U	U	U	U
RecR (F ₂₀) ^e	Laboratory	Temephos	179.8	HR	A	A	U	U	A
F. de Noronha	Field	Bti	2.4	S	HA	A	HA	U	U
Bacabal	Field	Temephos	6.6	MR	HA	A	A	U	A
Recife	Field	Temephos/Bti	7.1	MR	A	U	U	U	U
Macapá	Field	Temephos/Bti/IGR	11.0	HR	A	HA	HA	A	U
João Pessoa	Field	Temephos/Bti/IGR	11.7	HR	HA	A	HA	U	U
Salgueiro	Field	Temephos	60.0	HR	HA	U	HA	U	A
G. do Góitá	Field	Temephos	72.0	HR	A	A	A	U	U
Oiapoque	Field	Temephos	102.5	HR	A	HA	HA	U	U
Cedro	Field	Temephos	132.7	HR	HA	A	A	U	HA
A. da Ingazeira	Field	Temephos	120.6	HR	HA	HA	HA	A	U
S. J. do Egito	Field	Temephos	124.7	HR	HA	U	A	U	A
S. C. do Capibaribe	Field	Temephos	142.4	HR	HA	A	HA	U	U
Agrestina	Field	Temephos	212.6	HR	HA	A	A	U	A
Araripina	Field	Temephos	252.7	HR	A	HA	A	U	U

^aGST (glutathione-S-transferases), α-est (α-esterases), P-est (PNPA esterases), β-est (β-esterases) and MFO (mixed-function oxidases) were classified according to Brasil (2006): RF-reference, U-unaltered, A-altered, HA-highly altered.

^bExposure records until 2010 for temephos, Bti-*Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*, IGR (Diflubenzuron or Novaluron).

^cResistance Ratio at Lethal Concentrations (mg/L) for 95% of exposed larvae after 24 h: LC for sample tested/LC for the Rockefeller colony.

^dClassification adapted from Mazzari and Georghiou (1995): S-Susceptible (RR < 3), LR-Low Resistance (3 < RR < 5), MR-Moderate Resistance (5 < RR < 10), HR-High Resistance (>10).

^eData from Strode et al. (2012).

(Table 3). The high level of temephos resistance and the increased activity of three groups of DE detected in the RecR colony were not correlated with a decrease in the susceptibility to Bti.

The populations displaying different levels of temephos resistance were evaluated to provide a realistic measure of susceptibility to Bti. It should be noted that the F. de Noronha and Recife populations have been exposed to Bti, in particular the former, because this is the sole larvicide that has been used for mosquito control in that area. Toxicity assays showed that both were susceptible to Bti, with the RRs at LC₉₀ similar to the reference colony (Table 4). The second group, Bacabal, Macapá and João Pessoa, which had temephos RRs between 6.6 and 11.7, was susceptible to Bti. The Bti RR's were between 1.2 and 1.7

(Table 4). The last group analyzed, including populations characterized as highly resistant to temephos, presented RR values of between 60 and 252.7 (Table 1). However, all samples from this group were fully susceptible to Bti, with RR values at LC₉₀ between 1.0- and 1.3-fold compared with the Rockefeller colony.

Analysis of Bti susceptibility in all samples showed a slight variation in the lethal concentrations, regardless of the other characteristics revealed by this study. Lethal concentrations at LC₅₀ (mg/L) varied from 0.009 (S. C. do Capibaribe) to 0.017 (e.g., A. da Ingazeira), while at LC₉₀, the values were between 0.025 (e.g., Salgueiro) and 0.043 (Bacabal). The slope of the dose-response curve for Bti assays performed in this study showed a homogenous response in the samples analyzed (data not

Table 3 Toxicity of *Bacillus thuringiensis israelensis* (IP582) to 3rd instar *Aedes aegypti* larvae from laboratory colonies

Samples	Origin	Temephos status	DE ^c	No. larvae	LC ₅₀ ^a		LC ₉₀ ^a	
					Mean (95% fiducial limits)	RR ^b	Mean (95% fiducial limits)	RR ^b
Rockefeller	USA	Susceptible	RF	1620	0.008 (0.007-0.009)	1.0	0.026 (0.021-0.036)	1.0
RecL	Recife-PE	Susceptible	No	1020	0.016 (0.012-0.020)	2.0	0.030 (0.026-0.039)	1.2
RecR	Araripina-PE	Highly resistant	Yes	1620	0.010 (0.009-0.012)	1.3	0.030 (0.025-0.040)	1.2

^aLethal Concentrations (mg/L) for 50% (LC₅₀) or 90% (LC₉₀) of larvae after 24 h.

^bResistance Ratio: LC for sample tested/LC for the Rockefeller reference (RF) colony.

^cIncrease of the activity of detoxifying enzymes (DE).

Table 4 Toxicity of *Bacillus thuringiensis israelensis* (IP582) to 3rd instar *Aedes aegypti* larvae from sampled populations

Samples	Origin	Temephos status ^b	No. larvae	LC ₅₀ ^a		LC ₉₀ ^a	
				Mean (95% fiducial limits)	RR ^c	Mean (95% fiducial limits)	RR ^c
Rockefeller	Laboratory	S	1620	0.008 (0.007-0.009)	1.0	0.026 (0.021-0.036)	1.0
F. de Noronha	Field	S	1140	0.013 (0.011-0.015)	1.6	0.030 (0.024-0.042)	1.2
Bacabal	Field	MR	1140	0.014 (0.012-0.016)	1.8	0.043 (0.035-0.058)	1.7
Recife	Field	MR	1440	0.015 (0.014-0.018)	1.9	0.027 (0.024-0.031)	1.0
Macapá	Field	HR	1380	0.012 (0.011-0.014)	1.5	0.031 (0.027-0.038)	1.2
João Pessoa	Field	HR	1380	0.011 (0.009-0.012)	1.4	0.035 (0.027-0.049)	1.3
Salgueiro	Field	HR	1080	0.015 (0.012-0.018)	1.9	0.025 (0.021-0.031)	1.0
G. do Goitá	Field	HR	1080	0.015 (0.013-0.018)	1.9	0.025 (0.022-0.033)	1.0
Oiapoque	Field	HR	1440	0.011 (0.004-0.012)	1.4	0.026 (0.021-0.030)	1.0
Cedro	Field	HR	1200	0.012 (0.010-0.015)	1.5	0.031 (0.024-0.068)	1.2
A. da Ingazeira	Field	HR	1260	0.017 (0.016-0.020)	2.1	0.030 (0.026-0.035)	1.2
S. J. do Egito	Field	HR	1200	0.011 (0.010-0.013)	1.4	0.030 (0.024-0.038)	1.2
S. C. do Capibaribe	Field	HR	1260	0.009 (0.008-0.010)	1.1	0.025 (0.018-0.051)	1.0
Agrestina	Field	HR	1320	0.017 (0.016-0.019)	2.1	0.028 (0.026-0.032)	1.1
Araripina	Field	HR	1440	0.013 (0.012-0.015)	1.6	0.035 (0.029-0.045)	1.3

^aLethal Concentrations (mg/L) for 50% (LC₅₀) or 90% (LC₉₀) of larvae after 24 h. ^bClassification adapted from Mazzari and Georghiou (1995): S-Susceptible (RR < 3), LR-Low Resistance (3 < RR < 5), MR-Moderate Resistance (5 < RR < 10), HR-High Resistance (>10).

^cResistance Ratio: LC for sample tested/LC for the Rockefeller reference colony.

shown). All populations, including the RecR colony exposed to temephos, displayed increased or highly increased DE activity. However, this parameter was not associated with the different levels of temephos resistance among populations. For instance, the Bti susceptibility of larvae from F. de Noronha and Araripina was similar, but they presented marked differences for temephos susceptibility (susceptible and HR, respectively). However, both populations showed similar profiles of increased DE (GST, α -esterases and PNPA-esterases). The only sample that showed unaltered levels of DE, similar to the Rockefeller colony, was the ReL colony, whose contact with xenobiotic compounds has been very limited, or absent, due to its maintenance under laboratory conditions.

Discussion

The lack of data on mosquito susceptibility to candidate insecticides is a limiting factor for the success of control programs. These programs have often been implemented without information on the resistance selection risk posed by a given control agent in the field. For this reason, evaluations are often performed using the susceptibility of laboratory colonies as a reference, which do not necessarily reflect the natural variations that can be found among field populations, which has been demonstrated in other studies [47].

The results of this study provided a baseline dataset on the susceptibility of field populations of *Ae. aegypti*

from Brazil to Bti. We also documented pre-existing exposure of the populations to control agents, in particular, to temephos, which has been largely used by the PNCD [4]. Indeed, thirteen of fourteen populations investigated displayed high resistance to temephos, and all displayed high activity of detoxifying enzymes, including GST and esterases, which could be a consequence of prolonged and intensive use of temephos. The resistance ratios (RR) found for these samples were much higher than those observed in previous surveys from Brazil, in which RRs were lower than 20 in several populations, except for two populations from Ceará and Pernambuco States with RRs > 100 [27-33,40,48].

All *Ae. aegypti* populations in our study, regardless of their resistance to temephos and increased activity of DEs, displayed a level of susceptibility to Bti similar to two reference colonies. RR values at LC₅₀ or LC₉₀ were equal to or lower than 2, which is not considered biologically significant for resistance. These RRs are likely due to natural variations in toxicity ratios rather than to resistance selection, as observed in the studies described below. For instance, surveys carried out on around fifty *Culex pipiens* populations with no history of Bti exposure showed that variation in the susceptibility to Bti ranged from RRs of 2 to 12.5 [49,50], while populations from three Bti-treated areas displayed RRs < 1 [51]. In China, five populations of *Anopheles sinensis* that were exposed to chemical and microbial larvicides showed RRs to Bti between 1.7 and 5.9, although pre-treatment

data were not available and it was not possible to estimate pre existing variation [52]. Surveys based on thirty untreated and treated *Aedes* spp. populations showed a narrow range of RRs [35,53-58]. Among these cases, the maximum recorded RR value at LC₉₅ was 4, detected in a Bti-treated population of *Ae. rusticus* from France, a Bti-treated population of *Ae. aegypti* from Malaysia [35,58], and an untreated population of *Aedes albopictus* from Malaysia [56]. These data suggest that the RR values were not related to previous Bti exposure. The present study showed discrete variations in Bti RR values in *Ae. aegypti* populations, including two Bti-treated populations whose RRs were similar to the untreated populations. The data suggest that the variation of *Ae. aegypti* susceptibility to Bti could be lower than that detected for *C. pipiens*. To date, the only report of a high RR described in a field population previously exposed to Bti was in two *C. pipiens* populations from New York State (USA) that displayed RRs of 14 and 41 [59]. However, data on the susceptibility of these populations before Bti treatment were not available, so there is no evidence that these high RRs were associated with exposure to Bti or if they were simply natural variations.

The analysis of Bti susceptibility in the populations in our study was performed in light of the disseminated temephos resistance reported for many areas of Brazil, which was confirmed by our data. In fact, Bti and temephos have distinct active principles, modes of action and target sites in insects, leading to the hypothesis that no cross-resistance is expected to occur. Data from the present study support this assertion since all populations showed a pattern of Bti susceptibility similar to the reference colonies, regardless of temephos resistance. Likewise, the RecR resistant colony, whose high resistance level (RR ≈ 180) was achieved under laboratory conditions [40], was still susceptible to Bti. As a consequence, the results from this work are not in agreement with previous reports whose findings suggest cross-effects of temephos and Bti, linked to DE alterations [34-36]. Boyer et al. (2007) observed an association between the exposure of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae) populations to Bti and temephos with a decrease in the sensitivity to these compounds and with an increase in the activity of GSTs and α-esterases. Those authors suggested that DEs may be involved in Bti detoxification [36]. Another report showed that *Ae. rusticus* populations from a Bti-treated area in France had Bti RRs (LC₅₀) of 7, which correlated with a 3-fold increase in GST activity. However, biochemical evidence that Bti toxins could be detoxified by these enzymes was not provided [35]. In a general view, the association of DE in the resistance to insecticidal toxins from bacterial larvicides has not been related, while the alteration of target sites seems to play a major role in this process, besides

others as the failure of protoxin processing and innate immune responses [12,60-62]. The only report concerning the role of esterases in the metabolism of insecticidal bacterial toxins involved the resistance of the lepidopteran *Helicoverpa armigera* to Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* [63]. In this case, esterases from a resistant strain were able to bind the Cry1Ac toxin, which could be the basis of resistance, although further investigation on this mechanism is needed [64]. Our study showed that all *Ae. aegypti* populations exhibited increased or highly increased DE activity for at least three groups of enzymes that we investigated. In particular, esterases can be responsible for the detoxification of a wide range of xenobiotics, including insecticidal compounds. Nevertheless, the susceptibility of our sampled larvae to Bti was similar to the reference colonies (Rockefeller and Recl.), which did not display alterations in any of the five enzymes investigated. We did not find an association between the increased activity of detoxifying enzymes and a decrease in susceptibility to Bti.

Conclusions

Fourteen *Ae. aegypti* samples from Brazilian populations were susceptible to Bti. Most populations analysed displayed high resistance to temephos, as well as increased levels of some detoxifying enzymes. However, these features were not associated with a decrease in their susceptibility to Bti. These findings strongly reinforce the importance of Bti as an effective tool for *Ae. aegypti* control, considering the increasing environmental concerns of people living in urban and rural environments, as well as the urgent need for larvicides able to overcome previous resistance to temephos. The insecticidal crystal of Bti has a unique composition of protoxins whose mode of action is distinct from neurotoxic or growth-regulating compounds used for mosquito control and thus has a low potential to display cross-resistance.

Additional file

Additional file 1: Activity of detoxifying enzymes in *Aedes aegypti* adults from sampled populations compared to the Rockefeller colony.

Competing interests

The authors declare that they do not have competing interests.

Authors' contributions

APA, LNR, CFJA, CMFO, MAVMS and MHNSLF conceived the study, designed and analyzed the experimental data; APA, DFD, EH RAB performed the experiments; MHNSLF wrote the manuscript. All authors reviewed the paper and agreed with the final version.

Acknowledgements

The authors thank the team of the insectarium at CPqAM-FIOCRUZ for technical support; the National Program of Dengue Control from Brazil/

Secretary of Health Surveillance/Ministry of Health (PNCD/SVS/MS); and the field teams from the municipalities for the *Ae. aegypti* egg sampling.

Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq PRONEX-Rede Dengue: 550116/2010-9, CNPq 590154/2011-7, CNPq 472491/2012-1), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE-PPSUS grant APQ 1361-4.00/08), and Fundação Oswaldo Cruz/Vice-Presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência/Serviço de Referência para Controle de Culicídeos Vetores/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-PE (FIOCRUZ/VPPLR/SRCCV/CPAM-PE).

Received: 13 August 2013 Accepted: 8 October 2013

Published: 13 October 2013

References

- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh Q, Myers MF, George DB, Jansen T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI: The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013, **496**:504-507.
- Guzman MG, Halstead SB, Arsoob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martinez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW: Dengue: a continuing global threat. *Nature Rev Microbiol* 2010, **8**:57-516.
- Teixeira MG, Barreto ML: Diagnosis and management of dengue. *BMJ* 2009, **339**:b4338.
- Braga IA, Valle D: *Aedes aegypti*: history of control in Brazil. *Epidemiol Serv Saude* 2007, **16**:113-118.
- Brogdon WG, McAllister JC: Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis* 1998, **4**:605-613.
- Casida JE, Durkin KA: Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu Rev Entomol* 2013, **58**:99-117.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCamoll L, Ranson H: The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 2004, **34**:553-665.
- Lacey LA: *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* 2007, **23**:133-163.
- Becker N: Microbial control of mosquitoes: management of the Upper Rhine mosquito population as a model programme. *Parasitol Today* 1997, **13**:485-487.
- Guidi V, Patocchi N, Luthy P, Tonolla M: Distribution of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in soil of a Swiss wetland reserve after 22 years of mosquito control. *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:3663-3668.
- Guillet P, Kurtak DC, Phillipon B, Meyer R: Use of *Bacillus thuringiensis* for onchocercosis control in West Africa. In *Bacterial control of mosquitoes and black-flies*. Edited by Barjac H, Sutherland. New Brunswick: Rutgers University Press; 1990:187-201.
- Soberón M, Fernández LE, Pérez C, Gill SS, Bravo A: Mode of action of mosquitoicidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicol* 2007, **49**:597-600.
- Crickmore N, Bone EJ, Williams JA, Ellar DJ: Contribution of the individual components of the delta-endotoxin crystal to the mosquitoicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis*. *FEMS Microbiol Lett* 1995, **131**:249-254.
- Likitvatanavong S, Chen J, Evans AM, Bravo A, Soberón M, Gill SS: Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. *J Agric Food Chem* 2011, **59**:2829-2838.
- Cantón PE, Zanich Reyes EZ, De Ruiz Escudero I, Bravo A, Soberón M: Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides* 2011, **32**:595-600.
- Pérez C, Fernandez LE, Sun J, Folch JL, Gill SS, Soberón M, Bravo A: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *PNAS (USA)* 2005, **102**:18303-18308.
- Pérez C, Muñoz-Garay C, Portugal LC, Sánchez J, Gill SS, Soberón M, Bravo A: *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cell Microbiol* 2007, **9**:2931-2937.
- Georghiou GP, Wirth MC: Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**:1095-1101.
- Mittal P: Laboratory selection to investigate the development of resistance to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-14 in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Nat Acad Sci Lett India* 2005, **28**:281-283.
- Paris M, Tetreau G, Laurent F, Lelu M, Després L, David JP: Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. *Pest Manag Sci* 2011, **67**:122-128.
- Saleh MS, El-Meniawi FA, Kelada NL, Zahran HM: Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J Appl Entomol* 2003, **127**:29-32.
- Ferreira LM, Silva-Filha MHNL: Bacterial larvicides for vector control: mode of action of toxins and implications for resistance. *Biocontrol Sci Technol* 2013, **23**:1137-1168.
- Wirth MC: Mosquito resistance to bacterial larvicidal proteins. *The Open Toxicol J* 2010, **3**:101-115.
- Carrieri M, Angelini P, Venturelli C, Maccagnani B, Bellini R: *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) population size survey in the 2007 chikungunya outbreak area in Italy. I. Characterization of breeding sites and evaluation of sampling methodologies. *J Med Entomol* 2011, **48**:1214-1225.
- Regis L, Souza WV, Furtado AF, Fonseca CD, Silveira JC Jr, Ribeiro PJ Jr, Melo-Santos MA, Carvalho MS, Monteiro AM: An entomological surveillance system based on open spatial information for participative dengue control. *An Acad Bras Cienc* 2009, **81**:555-562.
- Regis LN, Acidi RV, Silveira JC Jr, Melo-Santos MA, Souza WV, Ribeiro CM, Da Silva JC, Monteiro AM, Oliveira CM, Barbosa RM, Braga C, Rodrigues MA, Silva MG, Ribeiro PJ Jr, Bonat WH, de Castro Medeiros LC, Carvalho MS, Furtado AF, Da Silva JC, Monteiro AM, Oliveira CM, Barbosa RM, Braga C, Rodrigues MA, Silva MG, Ribeiro PJ Jr, Bonat WH, de Castro Medeiros LC, Carvalho MS, Furtado AF: Sustained reduction of the dengue vector population resulting from an integrated control strategy applied in two Brazilian cities. *PLoS One* 2013, **8**:e7682.
- Beserra EB, Fernandes CR, de Queiroga F, de Castro FPJ: Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) populations to organophosphates temphos in the Paraíba State, Brazil. *Neotrop Entomol* 2007, **36**:303-307.
- Braga IA, Lima JB, Soares Sda S, Valle D: *Aedes aegypti* resistance to temphos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, **99**:199-203.
- Lima EP, Paiva MH, De Araujo AP, Da Silva EV, Da Silva UM, De Oliveira LN, Santana AE, Barbosa CN, De Paiva Neto CC, Goulart MQ, Wilding CS, Ayres CF, De Melo Santos MA: Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara, Brazil. *Parasit Vectors* 2011, **4**:5.
- Lima JB, Da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AK, Soares Sda S, 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.
- 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.
- Macoris MLG, Andrighetti MT, Takaku I, Glasser CN, Garbeloto VC, Bracco JE: Resistance of *Aedes aegypti* populations from the State of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003, **93**:703-708.
- 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.
- Boyer S, David JP, Rey D, Lempeniere G, Ravanel P: Response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae to three xenobiotic exposures: larval tolerance and detoxifying enzyme activities. *Environ Toxicol Chem* 2006, **25**:470-476.
- Boyer S, Paris M, Jegou S, Lempeniere G, Ravanel P: Influence of insecticide *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* treatments on resistance and enzyme activities in *Aedes rusticus* larvae (Diptera: Culicidae). *Biol Control* 2012, **62**:75-81.
- Boyer S, Tilquin M, Ravanel P: Differential sensitivity to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and temphos in field mosquito populations of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae): toward resistance? *Environ Toxicol Chem* 2007, **26**:157-162.
- Andrighetti MT, Cerone F, Riqueti M, Galvani KC, Macoris M: Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temphos. *Dengue Bulletin* 2008, **32**:187-198.

38. Cerf DC, Georgioliou GP: Evidence of cross-resistance to a juvenile hormone analogue in some insecticide-resistant houseflies. *Nature* 1972, **239**:401–402.
39. Melo-Santos MA, Araújo AP, Rios EM, Regis L: Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling. *Biol Control* 2009, **49**:186–191.
40. Melo-Santos MA, Varjal-Melo JJ, Araújo AP, Gomes TC, Paiva MH, Regis LN, Furtado AF, Magalhães T, Macoris ML, Andrighetti MT, Ayres CF: Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Trop* 2010, **113**:180–189.
41. Strode C, de Melo-Santos M, Magalhães T, Araújo A, Ayres C: Expression profile of genes during resistance reversal in a temephos selected strain of the dengue vector. *Aedes aegypti*. *PLoS One* 2012, **7**:e39439.
42. Brasil. Rede nacional de monitoramento da resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas (rede MoReNAa): metodologia de amostragem. Brasília (Brazil): Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde; 2008.
43. WHO: Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva: World Health Organization; 1981.
44. Mazzari MB, Georgioliou 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.
45. De Barjac H, Larget-Thiéry I: Characteristics of IPS82 as standard for biological assay of *Bacillus thuringiensis* H-14 preparations. Geneva: World Health Organization; 1984. Mimeographed document WHO/VCB/84.892.
46. Brasil. Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília (Brazil): Ministério da Saúde; 2006.
47. Robertson JL, Preisler HK, Ng SS, Hinkle LA, Gelemer WD: Natural variations: a complicating factor in bioassays with chemical and microbial pesticides. *J Econ Entomol* 1995, **88**:1–10.
48. Lima EP, de Oliveira Filho AM, de Oliveira Lima JW, Ramos Junior AN, de Goes Cavalcanti LP, Pontes RI: *Aedes aegypti* resistance to temephos in counties of Ceara State. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006, **39**:259–263.
49. Vasquez MI, Violaris M, Hadjivassilis A, Wirth MC: Susceptibility of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) field populations in Cyprus to conventional organic insecticides, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and methoprene. *J Med Entomol* 2009, **46**:881–887.
50. Wirth MC, Ferrari JA, Georgioliou GP: Baseline susceptibility to bacterial insecticides in populations of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from the mediterranean island of Cyprus. *J Econ Entomol* 2001, **94**:920–928.
51. Liu H, Cupp EW, Midher KM, Guo A, Liu N: Insecticide resistance and cross-resistance in Alabama and Florida strains of *Culex quinquefasciatus*. *J Med Entomol* 2004, **41**:408–413.
52. Lin L, Jingye H, Changju Y, Hongyu Z: Susceptibility of field populations of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biocontrol Sci Technol* 2004, **14**:321–325.
53. Aziz AT, Dieng H, Hassan AA, Satho T, Make F, Salmah MRC, AbuBakar S: Insecticide susceptibility of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Makkah City, Saudi Arabia. *Asian Pac J Trop Dis* 2011, **1**:94–99.
54. Becker N, Ludwig M: Investigation on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *J Am Mosq Control Assoc* 1993, **9**:221–224.
55. Kamgang B, Marcombe S, Chandre F, Nchoutpouen E, Nwane P, Etang J, Corbel V, Paupy C: Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasit Vectors* 2011, **4**:79.
56. Lee YW, Zairi J: Susceptibility of laboratory and field-collected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to *Bacillus thuringiensis israelensis* H-14. *J Am Mosq Control Assoc* 2006, **22**:97–101.
57. Liu H, Cupp EW, Guo A, Liu N: Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus*. *J Med Entomol* 2004, **41**:946–952.
58. Loke SR, Andy-Tan WA, Benjamin S, Lee HL, Sofian-Azirun M: Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and temephos. *Trop Biomed* 2010, **27**:493–503.
59. Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG: Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *J Am Mosq Control Assoc* 2005, **21**:305–309.
60. Cancino-Rodezno A, Alexander C, Villaseñor R, Pacheco S, Porta H, Pauchet Y, Soberon M, Gill SS, Bravo A: The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol* 2010, **40**:58–63.
61. Ferré J, Van Rie J: Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol* 2002, **47**:501–533.
62. Gómez I, Pardo-López L, Muñoz-Garay C, Fernandez LE, Pérez C, Sánchez J, Soberón M, Bravo A: Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 2007, **28**:169–173.
63. Gunning FM, Dang HT, Kemp FC, Nicholson IC, Moores GD: New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:2558–2563.
64. Teese MG, Farnsworth CA, Li Y, Coppin CW, Devonshire AL, Scott C, East P, Russell RJ, Oakshott JG: Heterologous expression and biochemical characterisation of fourteen esterases from *Helicoverpa armigera*. *PLoS One* 2013, **8**:e65951.

doi:10.1186/1756-3305-6-297

Cite this article as: Araújo et al.: The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. *Parasites & Vectors* 2013, **6**:297.

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

