

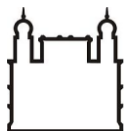
Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Dinâmica da resistência a inseticidas de populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) de quatro regiões do Brasil

Gabriela de Azambuja Garcia

Orientadora: Dr^a Denise Valle (IOC/Laficave)

Rio de Janeiro, maio de 2012



Ministério da Saúde

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**Dinâmica da resistência a inseticidas de populações de *Aedes aegypti*
(Linnaeus, 1762) de quatro regiões do Brasil**

Gabriela de Azambuja Garcia

**Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária,
com área de concentração em Biologia**

Orientadora: Dr^a Denise Valle (IOC/Laficave)

Rio de Janeiro, maio de 2012

Garcia, Gabriela de Azambuja

Dinâmica da resistência a inseticidas de populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) de quatro regiões do Brasil

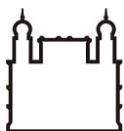
Dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária, área de concentração em Biologia.

Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 2012

Número de páginas: xv + 140

Palavras-chave: 1. *Aedes aegypti*, 2. Inseticidas, 3. Resistência a inseticidas, 4. Mecanismos de Resistência, 5. Resistência metabólica, 6. Mutações no gene do canal de sódio



Ministério da Saúde

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Dinâmica da resistência a inseticidas de populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) de quatro regiões do Brasil

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção de grau de Mestre em Biologia Parasitária, área de concentração: Biologia.

Banca Examinadora

Dr^a Maria de Lourdes da Graça Macoris

Superintendência de Controle de Endemias / Marília

Dra Ima Aparecida Braga

Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde

Dr^a Claudia Torres Codeço

FIOCRUZ / PROCC

Dr^a Ana Maria Jansen

FIOCRUZ / IOC

Dr Moacyr Alvim Horta Barbosa da Silva

Fundação Getúlio Vargas



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, sediado em parte no Laboratório de Entomologia do Exército. Foram utilizados recursos da Fundação Oswaldo Cruz, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (Faperj) e da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS – MS).

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original” - Albert Einstein

Dedico esta dissertação a todos aqueles que me apoiaram ao longo da trajetória da minha vida. Devido às minhas escolhas profissionais, necessitei me ausentar de muitos momentos com pessoas queridas, e esta vitória é minha e de vocês, que sempre estiveram ao meu lado!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Patrícia e Eloi, por desde pequena introduzir a ciência em minha vida de forma leve e instigante. Pela confiança deles em me permitir, mesmo muito jovem, de seguir meu caminho nos estudos, sempre com o apoio incondicional em todos os momentos. Amo muito vocês!

A todos meus familiares, especialmente minha irmã Juliana, que sente muito a minha ausência, e a minha linda avó Thais. Pessoas que sempre estiveram presentes em meu coração.

A minha orientadora, Denise, uma pessoa que admiro e respeito muito. Obrigada por sempre vibrar comigo a cada resultado e conquista, por me estimular ao longo do mestrado e sempre me passando tranquilidade em momentos essenciais. Com você aprendi a ser uma pessoa estritamente profissional e responsável, amar e me dedicar muito ao que faço, enxergar o quanto o nosso trabalho é importante para a sociedade e como devemos lutar para alcançarmos nossos objetivos. Agradeço muito pelas nossas longas horas de conversas, pelos conhecimentos a mim passados e pela confiança depositada neste trabalho.

A Universidade mais linda do mundo, onde passei a melhor fase da minha vida, a minha Rural. Aos professores, colegas de profissão, a minha querida turma Med Vet 2005-I, ao meu antigo laboratório, Laboratório de Quimioterapia experimental em Parasitologia Veterinária – LQEPV, onde começou minha paixão por parasitologia, a todos meus amigos Ruralinos e particularmente as minhas irmãs Ruralinas, que a vida me concedeu o privilégio de viver cinco anos juntas, Aline, Janaína, Kamila, Isabel, Rayana, Suellen e Thais, pelo apoio, amor, força, garra, compreensão, por todos os momentos de felicidades vividos, pelas risadas, enfim, por me tornarem uma pessoa mais feliz, com vocês aprendi que não existe tempo ruim na vida, basta ter as pessoas certas ao lado!

Um agradecimento em especial aos mosquiteiros que foram primordiais para o acontecimento deste trabalho: ao Ademir, que sempre me auxiliou quando precisei, a Jutta, pela paciência, ensinamentos e pela ajuda fornecida nos ensaios moleculares, a Priscila pela dedicação e participação importantíssima na parte bioquímica desta dissertação, ao Diogo, Simone e Bento, que também foram essenciais para este trabalho obter sucesso.

Ao Rafael Guedes e Valdice Paula, os técnicos e amigos, que me ajudaram na criação dos mosquitos em laboratório e na execução dos ensaios biológicos, sempre com muita dedicação e responsabilidade durante o trabalho. Sem eles não teria conseguido realizar tantos experimentos.

Ao Rafael de Freitas e Mariana David, minha parceira de dissertação, que compartilharam as alegrias e angústias deste árduo estudo.

A toda equipe Laficave, os mosquiteiros fiéis, Adriana, Luciana, Ivan, Carina, Gilberto, Maria Ignez, Sandrine, Bianca, Nathália, Thiago, Luana, Luiz Paulo, Renata, André, Gustavo, Helena, Thaiza, Aline, Felipe, Mariana, que tornam o trabalho mais prazeroso a cada dia.

Ao Instituto de Biologia do Exército, o local onde esta dissertação foi realizada, pelo auxílio sempre que necessário em todos os momentos deste trabalho.

A todos meus amigos de Niterói, que sempre me receberam de braços abertos a cada retorno meu a cidade, Julinha, Camille, Bianca, Cristina e a todos outros amigos de anos.

A todos aqueles que sempre acreditaram em mim e me apoiaram profissional e pessoalmente. Dedico esta dissertação a vocês!

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AaNa_v – canal de sódio regulado por voltagem de *Aedes aegypti*

AaNa_v – gene que codifica o canal de sódio regulado por voltagem em *Aedes aegypti*

ace-1 – gene que codifica a Acetilcolinesterase 1 em insetos

ace-2 – gene que codifica a Acetilcolinesterase 2 em insetos

AChE – Acetilcolinesterase

AJH – análogo de hormônio juvenil

ALFA - Esterases com atividade sobre o substrato acetato de α -naftil

BETA – Esterases com atividade sobre o substrato acetato de β -naftil

BHC – hexaclorobenzeno

BPU – benzoil-fenil-uréia

Bs – *Bacillus sphaericus*

Bti- *Bacillus thuringiensis israelensis*

CA – carbamatos

CL- concentração letal

CSI – Inibidor de síntese de quitina (do inglês “chitin synthesis inhibitor”)

DDT – dicloro-difenil-tricloroetano

DE – dose efetiva

DHF – febre hemorrágica de dengue

EST – Esterases

FAU – febre amarela urbana

Funasa – Fundação Nacional de Saúde

GABA – ácido gama-aminobutírico

GST – glutathione S-transferases

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDH – Índice de desenvolvimento humano

IE – inibição da emergência

IGR – Regulador do Desenvolvimento de Insetos (do inglês “*Insect Growth Regulator*”)

JH – hormônio juvenil

Kdr – resistência tipo “*knock-down*”

Laficave – Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores

MFO – Oxidases de Função Múltipla (ou Mista)

MS-SVS – Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde

OC – inseticidas organoclorados

OMS – Organização Mundial da Saúde

OP – inseticidas organofosforados

PCR – reação em cadeia da Polimerase (do inglês “*Polymerase chain reaction*”)

PE – pontos estratégicos

PI – inseticidas piretróides

PNCD – Programa Nacional de Controle da Dengue

PNPA – Esterases com atividade sobre o substrato acetato de p-nitrofenil

PTN – quantificação de proteínas totais em cada indivíduo

p99 – percentil 99

Rede MoReNAa – Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas

RR – Razão de Resistência

SCD – Síndrome de Choque por Dengue

SMS – Secretaria Municipal de Saúde

SNC – Sistema Nervoso Central

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

UBV – ultra baixo volume

RESUMO

A utilização de inseticidas neurotóxicos contra insetos vetores ainda tem um papel crucial nos programas de controle de doenças. No Brasil é uma estratégia importante no controle do vetor da dengue, o *Aedes aegypti*. O principal larvicida utilizado para este fim em campo tem sido o organofosforado (OP) temephos, desde 1967, com utilização intensificada a partir da epidemia de 1986. Em função do diagnóstico de resistência em diversas populações brasileiras a este OP, atualmente se encontra em andamento a substituição pelo inibidor de síntese de quitina (ISQ) diflubenzuron. Para o controle da fase adulta dos mosquitos, os inseticidas mais utilizados atualmente pertencem à classe dos piretróides (PI). Contamos no país com a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas (MoReNAa), com metodologias consolidadas para a avaliação da resistência e de seus mecanismos em populações do vetor de dengue. No presente estudo, essas metodologias foram empregadas para avaliar ao longo de um ano, em quatro localidades do Brasil, de quatro regiões distintas, a resistência aos inseticidas citados anteriormente. Identificamos alterações de susceptibilidade ao larvicida temephos em todas as populações participantes do estudo; entretanto, observamos, em todos os casos, tendência de queda da razão de resistência ao longo do estudo, que atribuímos à interrupção do uso deste composto em campo. Em relação ao outro larvicida investigado, o diflubenzuron, foram constatadas razões de resistência baixas para todas as populações, em todos os momentos, provavelmente em função da sua recente incorporação no âmbito do controle químico no país. Ressaltamos no entanto a importância de avaliações deste ISQ mediante simulados de campo para uma melhor compreensão sobre o significado funcional das razões de resistência encontradas neste estudo, e seu impacto no controle efetuado em campo no país. Já para o adulticida investigado, a deltametrina (PI), observamos uma resistência disseminada no país, sendo extremamente elevada em três das quatro populações estudadas. Os resultados indicam uso público indiscriminado de inseticidas em uma das localidades e sugerem correlação entre a resistência a PI e a utilização doméstica deste inseticida, o que chama atenção para a necessidade de adoção de medidas de conscientização do uso deste tipo de ferramenta pela sociedade. Após a quantificação da resistência a estes três inseticidas, partimos para a investigação dos mecanismos responsáveis, analisando a resistência metabólica – derivada de alterações nas atividades de enzimas que detoxificam estes compostos – por meio de ensaios bioquímicos e a resistência por alteração no sítio alvo – derivada de modificações estruturais nas moléculas alvo dos inseticidas - por meio de ensaios bioquímicos e moleculares. Foram diagnosticadas principalmente alterações na atividade de duas enzimas na fase adulta das quatro populações, GST e PNPA. Estas enzimas já haviam sido relacionadas à resistência a PI anteriormente. Na fase de larvas, não foi possível estabelecer qualquer correlação diagnóstica com a resistência a temephos ou diflubenzuron: alterações na atividade das enzimas variaram entre as populações estudadas. De maneira geral, verificamos tendência de queda na atividade de PNPA em Duque de Caxias, de MFO em Parnamirim e das Esterases ALFA e BETA em Campo Grande. Em relação aos ensaios moleculares, diagnosticamos três diferentes mutações no canal de sódio das populações avaliadas (nas posições 1011, 1016, 1534). Destas, duas mutações (1016 e 1534) foram correlacionadas com a elevada resistência a PIs neste estudo. Este trabalho possibilitou uma melhor compreensão sobre a dinâmica da resistência a inseticidas no país. Esperamos, desta forma, contribuir para o manejo do controle químico de *Ae. aegypti*, auxiliando a recomendação de inseticidas, tanto para larvas quanto para adultos, de uma forma eficiente e racional.

ABSTRACT

The utilization of neurotoxic insecticides against insect vectors has a crucial role in disease control programs. In Brazil it is an important strategy against the dengue vector, *Aedes aegypti*. Since 1967 the main larvicide used in the field has been the organophosphate (OP) temephos, with a strong utilization after the dengue epidemic in 1986. Due to OP resistance of several Brazilian vector populations, nowadays it's substitution by the chitin synthesis inhibitor (CSI) diflubenzuron is in progress. Pyrethroids (PI) are the most widely used insecticides in the control of adult mosquitoes. In Brazil the National Network for *Aedes aegypti* Insecticide Resistance Monitoring (MoReNAa) relies on consolidated methodologies for assessing resistance and the underlying its mechanisms in populations of the dengue vector. In the present study, we employed these methodologies to evaluate resistance to the above mentioned insecticides of four municipalities, belonging to four Brazilian regions, during one year. We identified changes in the susceptibility levels to the larvicide temephos in all populations considered in the study. However, there was a tendency of temephos resistance ratio decrease throughout the period of evaluation, probably due to the interruption of the use of this compound in the field. Diflubenzuron, the other larvicide investigated, elicited low resistance ratios in all populations considered, and this was attributed to its recent incorporation as a chemical control tool in the country. However, we emphasize the importance of field simulated assays with this CSI in order to better understand the significance of the resistance values found and their impact on vector control. For the adulticide investigated, deltamethrin (PI), we observed widespread resistance all over the country. Resistance levels were particularly high in three out of the four investigated populations. Our results point to an indiscriminate public use of PI in one municipality and suggest correlation between PI resistance and the intense domestic use of this class of insecticides. This calls attention to the need of adopting measures to raise society awareness to the limitations of this kind of tools. After resistance quantification to these three insecticides, we investigated the mechanisms potentially involved by analyzing both metabolic resistance - derived from changes in the activity of detoxifying enzymes - and resistance by altered target site - derived from structural modifications in the insecticide target molecules. Biochemical and molecular assays were employed. GST and PNPA were the main enzymes altered, and this was observed in adult specimens of all populations. These enzymes have been previously associated with PI resistance. In the larval stage, no diagnostic correlation between enzymes activity and temephos or diflubenzuron resistance could be established, enzymatic alterations varying among the evaluated populations. In general, we detected tendency of decrease in the PNPA activity at Duque de Caixas, MFO at Parnamirin and ALFA and BETA Esterases at Campo Grande. Regarding the molecular assays, it was possible to identify three different mutations in the sodium channel, the PI target site (at positions 1011, 1016 and 1534). Of these, two mutations (1016 and 1534) were correlated to high resistance levels to PIs. This study contributed to a better understanding of the dynamics of insecticide resistance in Brazil. We expect to have been contributed to the management of *Ae. aegypti* chemical control, supporting the recommendation of efficient and rational usage of insecticides for both larvae and adults.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Dengue	1
1.2. <i>Aedes aegypti</i> e seu papel como transmissor do vírus dengue	2
1.3. Histórico de controle de <i>Aedes aegypti</i> no Brasil	4
1.4. Vigilância da dengue e controle de <i>Aedes aegypti</i>	5
1.4.1) Vigilância epidemiológica.....	6
1.4.2) Vigilância entomológica	6
1.4.3) Controle vetorial	7
1.5) Mecanismo de ação dos inseticidas utilizados para controle do <i>Ae. aegypti</i>	10
1.5.1) Inseticidas neurotóxicos	10
1.5.2) Reguladores do crescimento de insetos (IGRs)	14
1.6. Mecanismos de resistência a inseticidas	16
1.6.1) Resistência metabólica.....	18
1.6.2) Alteração do sítio alvo	21
1.7) Custo evolutivo da resistência a inseticidas	24
1.8) Monitoramento e manejo da resistência	25
1.9) Recomendações do PNCD para o uso de inseticidas em campo	26
1.10) Informações sobre os municípios avaliados	27
1.10.1) Dados gerais e notificações dos casos de dengue para cada município	27
1.10.2) Histórico do controle químico para dengue em campo.....	29
1.10.3) Histórico do controle químico para leishmaniose e malária em campo	30
2. OBJETIVOS	31
2.1.) Objetivo geral	31
2.2.) Objetivos específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Coleta de ovos em campo e criação em laboratório de populações de <i>Aedes aegypti</i>	33

3.2. Insetos utilizados nas análises	35
3.3. Razão de Resistência (RR)	36
3.4. Bioensaios com larvas	36
3.4.1) Bioensaios com temephos.....	37
3.4.2) Bioensaios com diflubenzuron.....	37
3.5. Bioensaios com adultos	38
3.6. Análises enzimáticas	39
3.7. Análise de mutação kdr	41
3.9. Período de realização das atividades	43
4. RESULTADOS	45
4.1. Bioensaios	45
4.1.1) Bioensaios com larvicidas.....	46
4.1.2) Bioensaios de adultos com deltametrina	56
4.2. Mecanismos de resistência	65
4.2.1) Ensaio bioquímicos para avaliação da resistência metabólica e da AChE.....	65
4.2.1.2) Ensaio bioquímicos com adultos	71
4.2.2) Ensaio moleculares para diagnóstico de mutações knockdown resistance (kdr).....	75
5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÕES	93
7. REFERÊNCIAS	94
ANEXO 1 - INTERVALOS DE CONFIANÇA DAS RR₉₅ PARA TEMEPHOS, DIFLUBENZURON E DELTAMETRINA	106
ANEXO 1 - INTERVALOS DE CONFIANÇA DAS RR₉₅ PARA TEMEPHOS, DIFLUBENZURON E DELTAMETRINA	108
FICHA 1	117
FICHA 2	118

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dengue

A dengue é uma das arboviroses reemergentes de maior relevância no mundo, e o Brasil é, na América, o país mais afetado por esta doença (Figura 1.1). Seu agente etiológico é um vírus RNA fita simples positiva, da família Flaviviridae, que apresenta quatro sorotipos, DEN-1, 2, 3 e 4 (OMS 1997, Rigau-Péris et al 1998). A dengue pode se manifestar sob as formas de febre de dengue, dengue com complicações, febre hemorrágica de dengue (DHF) ou síndrome de choque por dengue (SCD), as formas mais agressivas da doença (Martinez-Torres 1998, MS/SVS 2009a). Uma vez recuperado de uma infecção, o indivíduo apresenta imunidade por toda sua vida ao sorotipo com que foi infectado. No entanto, a imunidade cruzada com outros sorotipos do vírus dengue é apenas parcial e temporária (OMS 2012). Esta doença é endêmica em mais de 100 países e ocorre em regiões tropicais e subtropicais. Importantes surtos já foram relatados nas Américas, Sudeste da Ásia e África, afetando aproximadamente 100 milhões de pessoas por ano e causando 250 mil casos de DHF, com taxa de letalidade de até 15% (Klungthong et al 2004).

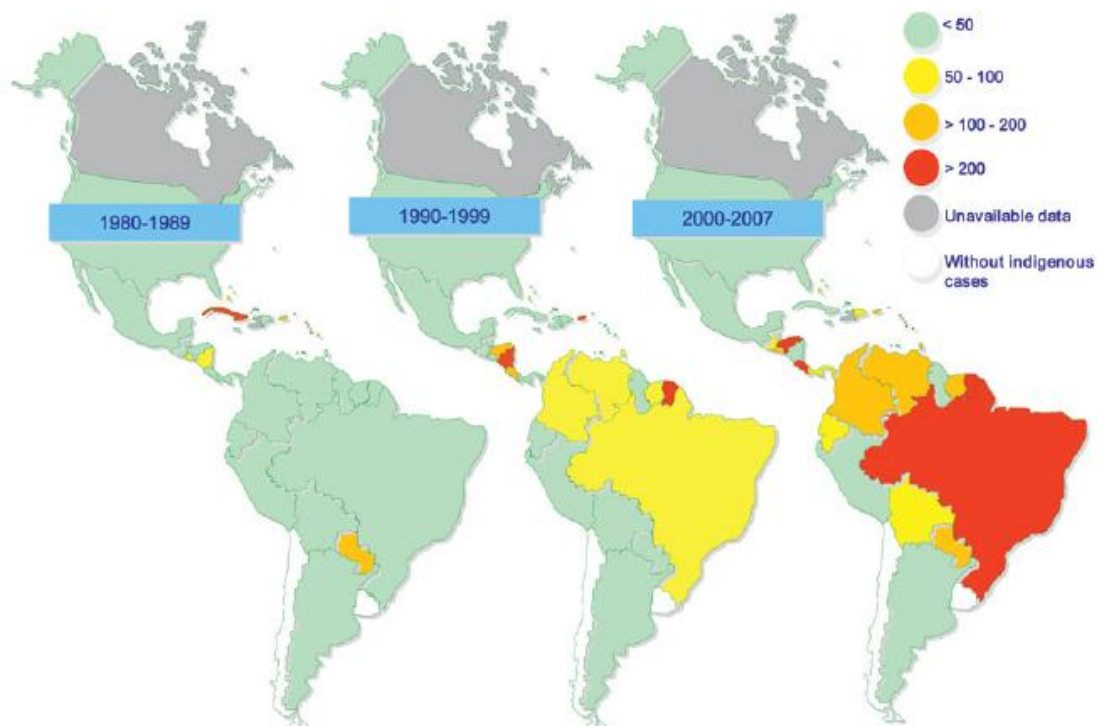


Figura 1.1. Incidência média de dengue por 100.000 habitantes por país, Região das Américas, 1980-2007. Figura retirada de San Martin et al 2010; The Epidemiology of Dengue in the Americas over the Last Three Decades: A Worrysome Reality.

Hales e colaboradores (2002) sugerem que o aquecimento global aumentaria as áreas propícias ao desenvolvimento do vetor da dengue, além de também influenciar diretamente o período de incubação extrínseco do vírus (período compreendido entre a ingestão do vírus pelo vetor até que este se torne infectante), acelerando-o. Outros fatores como crescimento populacional, facilidade no deslocamento, tanto do vetor (ativa ou passivamente) quanto de humanos infectados via transportes modernos, e baixa eficácia das medidas de controle também resultaram em aumento da população sob risco de contrair esta doença (Jasen e Beebe 2010).

No Brasil a dengue apresenta padrão sazonal, com maior ocorrência nos primeiros cinco meses do ano, o período mais quente e úmido típico de países tropicais ao sul do Equador (Funasa 1999a). Embora existam relatos desta doença no país desde 1846, foi a partir da década de 1980 que a dengue adquiriu relevância, em função da epidemia que alcançou o Estado do Rio de Janeiro e a Região Nordeste, com circulação do sorotipo DEN-1 (Teixeira et al 1999, Schatzmayr 2000, Silva et al 2002, Braga e Valle 2007a). Logo em seguida, em 1990, o sorotipo DEN-2 foi introduzido no país, também pelo Estado do Rio de Janeiro. Isto acarretou três ondas epidêmicas de dengue entre os anos de 1986 e 1999. Porém, já a partir do início dos anos 1990, a dengue passou a ser considerada endêmica em nosso país. Em 2001 foi introduzido o sorotipo DEN-3 (Nogueira et al 1990, 2001). Recentemente, em 2010, DEN-4 reemergiu no Brasil (Temporão et al 2011). Este sorotipo até então havia sido constatado apenas em Boa Vista/Roraima, quando houve uma breve circulação em um surto focal no ano de 1982 (Osanai et al 1983), e em Manaus em 2008, com o relato de três casos (Melo et al 2009). A partir de 2010, DEN-4 foi isolado nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste (MS/SVS 2011a). Souza e colaboradores (2011) propõem que o sorotipo DEN-4 recentemente isolado no país esteja passando por uma “evolução local”. Seus resultados, obtidos por meio de análises filogenéticas, indicam que as amostras atuais de DEN-4 estão relacionadas com o genótipo que circulou no primeiro surto de Boa Vista, de 1981, a mesma cepa também encontrada na América do Sul. Os autores sugerem que, por estar associado a uma doença mais branda e ser menos prevalente, o DEN-4 poderia estar presente na região há mais tempo, sendo “mascarado” pelo alto índice de infecção dos outros sorotipos, DEN-1 e 2.

1.2. *Aedes aegypti* e seu papel como transmissor do vírus dengue

O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) é um dos principais problemas de Saúde Pública devido ao seu papel como transmissor da dengue e da febre amarela urbana (FAU). Este mosquito não é originário das Américas e foi introduzido no Brasil pelo processo de colonização no início do século XVI. Como as condições encontradas no continente favoreceram o seu desenvolvimento e

reprodução, ele logo se estabeleceu em todo território (Penna 2003). Esta espécie tem um comportamento estritamente sinantrópico e antropogênico; é considerado o inseto vetor mais dependente do ambiente urbano (Natal 2002). Outro vetor da dengue de importância secundária na Ásia é o *Aedes albopictus*, associado com a transmissão rural e semiurbana (Huber et al 2000, Braga e Valle 2007a).

Aedes aegypti é um inseto holometabólico e possui quatro estádios larvais seguidos pela transformação em pupa e adulto (Figura 1.2). Este vetor apresenta um ciclo aquático na sua fase imatura e se desenvolve em reservatórios de águas limpas. Embora tenha predileção por criadouros artificiais como latas, vasos de cemitérios, caixas d'água, vidros e pneus, essas condições são sensíveis a mudanças por causa das variáveis ambientais e dos perfis socioeconômicos das regiões (Honório e Lourenço-de-Oliveira 2001, Forattini e Brito 2003, Medronho et al 2009). Após a emergência, os adultos podem se alimentar de seiva ou, no caso das fêmeas, procurar um hospedeiro para a realização do repasto sanguíneo, essencial para a maturação de seus ovos (Forattini 1996). Os ovos desta espécie possuem uma peculiaridade: após completarem rapidamente o seu desenvolvimento embrionário, podem se manter viáveis por longos períodos, por serem resistentes à dessecação (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

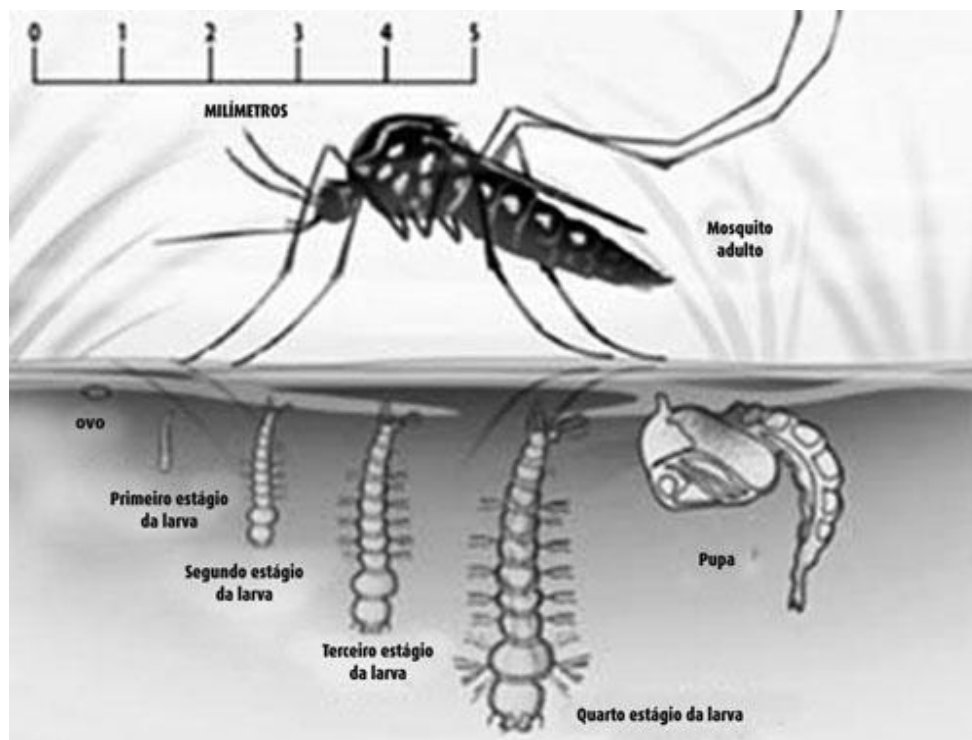


Figura 1.2. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. Figura extraída de <http://www.araraquara.com/noticias/cidade/2010/02/21/testes-mostram-reducao-do-ciclo-evolutivo-do-aedes-aegypti.html>

As fêmeas adquirem o vírus da dengue quando se alimentam de sangue das pessoas infectadas. Depois de um período de incubação de 8-10 dias em média, se tornam infectivas, sendo capazes de, durante a picada e alimentação, transmitir o vírus a indivíduos suscetíveis. Também podem transmitir o vírus para sua prole, por transmissão vertical, ou transovariana. Contudo, a importância, para a epidemiologia da dengue, desta via de transmissão do vírus ainda não foi esclarecida (OMS 1997). Uma característica desta espécie é a habilidade da fêmea de se alimentar em diferentes indivíduos para completar seu ciclo gonadotrófico (tempo que decorre entre a ingestão de sangue e a postura de ovos), aumentando assim o risco de transmissão de patógenos para os seus hospedeiros (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

1.3. Histórico de controle de *Aedes aegypti* no Brasil

A primeira epidemia de febre amarela urbana (FAU) ocorreu no Brasil no século XVII (Funasa 2001). No entanto, a partir da década de 1850 aconteceram diversos focos desta doença, e medidas de combate ao *Ae. aegypti* começaram a ser estabelecidas para o controle de FAU, que no início do século XX já era um grande problema de Saúde Pública. Oswaldo Cruz, em 1902, diante de uma epidemia, iniciou a primeira campanha pública contra este vetor estabelecendo as brigadas sanitárias, que contavam com a participação de 2.500 guardas sanitários, cuja função era detectar casos e eliminar os focos de *Ae. aegypti*. A batalha contra o mosquito não foi eficaz, e em 1928 e 1929, na cidade do Rio de Janeiro, surgiram novos surtos que irradiaram para outros municípios do Estado. Após este episódio, embora não ocorressem mais epidemias relevantes, a doença permaneceu endêmica no Norte e no Nordeste. Acredita-se que o controle da FAU efetuado pelo Serviço de Profilaxia de Febre Amarela, no início do século XX, também tenha impactado na transmissão da dengue, que não existia no Brasil como um problema relevante de Saúde Pública na época (Löwi 1990, Costa 2002, Braga e Valle 2007a, Silva et al 2008).

Nas décadas de 1930 e 1940, entusiasmado com a erradicação do *Anopheles gambiae* no país, o governo brasileiro assinou convênio com a Fundação Rockefeller, e foram realizadas intensas campanhas de eliminação do *Ae. aegypti*, tendo como uma das estratégias a utilização de petróleo contra as larvas do vetor. Em 1955, *Ae. aegypti* foi erradicado do território brasileiro com reconhecimento internacional, em virtude destas campanhas que contaram com a utilização maciça do inseticida organoclorado DDT. Doze anos após, em 1967, o *Ae. aegypti* foi reintroduzido no país, no Estado do Pará, e dois anos depois, no Estado do Maranhão. Novamente, em 1973, a espécie foi considerada erradicada no país. Todavia, depois de apenas três anos, em 1976, o *Ae. aegypti* voltou a ser encontrado no Brasil, colocando em dúvida se realmente sua erradicação havia sido eficiente em

1973. Após estes acontecimentos, o *Ae. aegypti* se disseminou rapidamente pelo território nacional e hoje é encontrado em todos os estados (Funasa 1999b, 2001, Löwi 1999, Braga e Valle 2007a).

Apesar da presença do vetor e de referências ao vírus dengue desde a segunda metade do século XIX no Brasil, foi a partir da década de 1980 que o vírus dengue começou a circular no país de forma mais significativa. Diante do crescente número de casos da doença, o Ministério da Saúde em 1996 novamente iniciou programa de erradicação do *Ae. aegypti*. Porém, esse programa não foi bem sucedido, e tanto o número de casos de dengue quanto a infestação vetorial continuaram em ascensão: em 1998 todos os estados brasileiros se encontravam infestados por este vetor (Funasa 2001). Em 2001, a Funasa passou a recomendar o controle, e não mais a erradicação de *Ae. aegypti* (Braga e Valle 2007a). É importante salientar que o uso de inseticidas tem sido um componente importante no combate ao vetor ao longo dessas décadas, e a centralização nesta ferramenta tem se mostrado uma estratégia ineficaz para solucionar o problema.

Nesse contexto, o Ministério da Saúde em 2002 implantou o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Este programa redireciona a política de controle do *Ae. aegypti*, abordando metodologias mais permanentes, visto que não há perspectivas para erradicação do vetor em curto prazo. As ações do PNCD estão atualmente organizadas em cinco principais componentes, incluindo assistência à saúde, vigilância epidemiológica, comunicação e mobilização, gestão e financiamento e controle vetorial. Apenas este último componente está direcionado ao combate do *Ae. aegypti*, focado principalmente, ao longo da história desta metodologia no país, na utilização de inseticidas químicos. Recentemente o governo tem destacado o importante papel da sociedade neste tipo de controle por meio de eliminação de criadouros, reforçando o caráter complementar dos inseticidas (MS/SVS 2009a).

1.4. Vigilância da dengue e controle de *Aedes aegypti*

A vigilância é um componente essencial em qualquer programa de controle e prevenção de doenças (Gubler e Casta-Valez 1991) e tem como objetivo um conjunto de ações para fiscalizar e traçar os locais de risco de transmissão de doenças no país. A vigilância possui algumas áreas que precisam estar articuladas para a obtenção de um sistema integrado e eficiente. Embora o Brasil tenha avançado muito neste aspecto nos últimos anos, ainda não conseguimos evitar grandes epidemias de dengue no país. A seguir, alguns componentes importantes relacionados com a vigilância de dengue serão abordados brevemente (Funasa 2002).

1.4.1) Vigilância epidemiológica

O objetivo da vigilância epidemiológica é detectar precocemente a circulação viral, aglomerados de casos e focos do vetor e adotar as medidas de prevenção e controle. Desta forma, permite reunir informações indispensáveis para traçar os perfis da doença em território nacional e direcionar modelos eficientes de controle de dengue. Neste contexto, a notificação adequada dos casos é essencial para que a vigilância seja capaz de acompanhar o padrão de transmissão da dengue na área e a curva epidêmica. A dengue é um agravo de notificação compulsória ou, em casos específicos, compulsória e imediata (como diagnóstico de sorotipo DEN-4, óbitos, complicações, entre outros) (MS/SVS 2011b), e, em vista disso, todos os casos suspeitos (sendo ou não confirmados) devem ser obrigatoriamente notificados à Vigilância Epidemiológica do município. A rápida coleta de informações nas unidades de saúde e a qualidade destes dados são essenciais para o desencadeamento oportuno de ações de controle e prevenção no local. Dessa forma, é fundamental a boa comunicação entre as equipes destas unidades e as vigilâncias, epidemiológica e entomológica (MS/SVS 2005, 2009a).

1.4.2) Vigilância entomológica

A meta da vigilância entomológica é vigiar e identificar risco de dengue nas localidades. Por exemplo, monitorar as condições climáticas e ambientais que favoreçam a reprodução do vetor e a dispersão do patógeno, realizar a quantificação do vetor nas regiões e avaliar o impacto das medidas de controle vetorial para orientar novas ações, ou seu redirecionamento (Glasser e Gomes 2002, Gomes 2002). Uma de suas principais estratégias é o levantamento de índices de infestação de *Ae. aegypti* nas regiões. Para isto, atualmente são coletadas amostras de imaturos (larvas e pupas) por meio de vistorias em depósitos de água e outros recipientes encontrados nas residências e demais imóveis como borracharias, ferros-velhos, cemitérios, etc. Estes últimos são considerados pontos estratégicos (PE) porque têm grande potencial de “produzir” mosquitos adultos. Dois índices são os mais utilizados para esta finalidade: Índice de Infestação Predial (IIP) e Índice de Breteau (IB). O primeiro mede o percentual de imóveis “positivos”, ou seja, imóveis que contenham algum criadouro com larvas do vetor; o segundo índice, de Breteau, é o quociente entre o número de criadouros positivos e o número de imóveis avaliados. Ambos consideram a positividade, e não a densidade, ou a produtividade, desses criadouros. A pesquisa larvária é importante para conferir o impacto das estratégias básicas de controle da doença, direcionadas à eliminação do vetor. Contudo, este levantamento possui algumas desvantagens, como a dependência da habilidade do agente de saúde, uma vez que se baseia na busca ativa por focos. Além disto, não é um bom indicador para avaliar a

abundância de adultos (nem toda larva irá sobreviver até a forma adulta) nem eficiente para estimar o risco de transmissão de dengue (Tauil 2002, Braga e Valle 2007c, MS/SVS 2009a).

Outra abordagem, empregada apenas em situações específicas ou em estudos mais aprofundados, utiliza armadilhas que têm como alvo a fase adulta dos mosquitos. Entretanto, para estas armadilhas ainda não existe uma metodologia que associe, de forma diagnóstica e inequívoca, número de mosquitos capturados e taxa de infestação, o que limita também sua utilização para inferir dados para avaliação do risco de transmissão. Existem ainda armadilhas de ovos, chamadas ovitrampas, que também podem refletir, indiretamente, a população de adultos, e armadilhas que “capturam” larvas. É importante ressaltar que as armadilhas hoje utilizadas ou sob avaliação pelo PNCD têm como foco a vigilância do vetor, e não devem ser consideradas como um método de controle.

Atualmente, considerando as fragilidades descritas acima, e tendo em vista a disponibilidade de armadilhas que capturam adultos, com potencial de fornecer indicadores mais precisos sobre a população de *Ae. aegypti* adultos, o PNCD solicitou que a Fiocruz avaliasse as armadilhas existentes no mercado. Neste trabalho estão sendo analisadas a eficácia e o custo-benefício de diversas armadilhas, incluindo diferentes tipos para captura de adultos, além de ovitrampas, como método de quantificação do índice de infestação. Este projeto está sendo realizado em quatro municípios de quatro regiões distintas do país e mensalmente estas armadilhas são testadas em campo (MS/SVS 2009c). Em função disso, coletas ao longo de um ano de ovos de *Ae. aegypti* tornaram viável a avaliação da dinâmica da resistência a inseticidas e dos mecanismos envolvidos, tema abordado nesta dissertação, bem como a capacidade vetorial destas populações. Este último tópico é tema de outra dissertação de Mestrado do Programa de Biologia Parasitária – IOC.

1.4.3) Controle vetorial

Visto que até o presente momento não se encontram disponíveis vacinas e medicamentos eficazes contra dengue, a redução da densidade de vetores continua sendo a principal medida de combate à doença (San Martin et al 2010). O controle vetorial tem como objetivo prevenir a infecção mediante o bloqueio ou redução da transmissão e para isto executa ações que visam diminuir a densidade de *Ae. aegypti*. Essas ações são direcionadas principalmente aos criadouros, contendo as formas imaturas, embora incluam também combate aos adultos. As metodologias disponíveis abrangem medidas de controle mecânico, químico e biológico (Donalísio e Glasser 2002).

A) Controle mecânico

Este tipo de controle consiste na adoção de práticas capazes de impedir a procriação do *Aedes* ou o contato homem-vetor, tendo como principais atividades a eliminação, proteção ou destinação adequada de criadouros. Esse tipo de controle também inclui outras medidas eficazes como utilização de telas em portas e janelas, drenagem de terrenos, retirada de entulhos, coleta adequada de lixo, entre outros (Braga e Valle 2007b, MS/SVS 2009a). É o controle considerado, nos dias de hoje, o mais eficaz contra *Ae. aegypti*, e está sendo alvo de campanha no Estado do Rio de Janeiro “10 minutos contra a dengue”, idealizada por pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz (<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/10minutos.html>).

B) Controle biológico

O controle biológico é uma alternativa ao uso de inseticidas químicos, com menor potencial de gerar danos ao meio ambiente. No controle de mosquitos inclui a utilização de diversos predadores, invertebrados aquáticos (como *Toxorhynchites* e copépodos) ou peixes (*Gambusia* sp e outros) que comem larvas ou pupas, além de patógenos ou parasitas (como fungos, nematóides e bactérias). Contudo, no âmbito do controle de *Ae. aegypti*, essas metodologias não são utilizadas em grande escala (Donalísio e Glasser 2002, Braga e Valle 2007b).

Com a rápida disseminação da resistência em mosquitos aos inseticidas químicos tem sido necessário buscar outras opções de compostos que afetem esses vetores. Neste contexto, as bactérias *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus* (Bs) têm se mostrado potentes biolarvicidas contra dípteros, particularmente o Bti para *Ae. aegypti* (Mittal 2003). Este biolarvicida é recomendado pela OMS para uso em água potável (Chavasse e Yap 1997) e começou a ser utilizado em campo no Brasil a partir de 2001 (Funasa 2001). O Bti é uma bactéria Gram-positiva, cujos esporos apresentam cristais que produzem pró-toxinas. As larvas de mosquitos ingerem os cristais que, ao chegarem ao intestino alcalino dos insetos, são dissolvidos. As proteases digestivas dos mosquitos então clivam as pró-toxinas do Bti, ativando-as. Ocorre diminuição do peristaltismo e, conseqüentemente, interrupção da alimentação e a morte da larva.

Essas pró-toxinas são proteínas que variam de 27 a 138 kDa e podem ser chamadas de delta-endotoxinas e proteínas Cry. Pelo fato do Bti apresentar quatro toxinas (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa e Cyt1Aa), com atividade inseticida, que atuam em conjunto, até o momento não ocorreram registros de resistência a este composto (Becker e Ludwig 1993, Loke et al 2010). No caso do Bs, que é mais utilizado para mosquitos do gênero *Culex*, a resistência já foi diagnosticada em várias populações de campo e estudos em laboratório confirmaram o rápido desenvolvimento de resistência a

este composto, provavelmente porque esta bactéria apresenta apenas duas toxinas com atividade inseticida que agem em conjunto (toxina binária) (Rao et al 1995, Mittal 2003).

Entre as diversas vantagens de Bti estão sua elevada especificidade e, em consequência, o fato de não causar danos ao ambiente. Porém, as formulações atualmente disponíveis apresentam uma persistência em campo muito baixa, acarretando problemas operacionais em sua utilização para o controle de *Ae. aegypti* (Mittal 2003, Braga e Valle 2007b).

Outro organismo muito promissor atualmente em testes de campo para uso no controle biológico de mosquitos é a *Wolbachia*. Esta é uma bactéria intracelular, simbiote, que já foi vista infectando naturalmente muitos invertebrados, incluindo diversos insetos, aranhas, ácaros e também nematóides. Sua transmissão ocorre verticalmente da fêmea infectada para a prole e, dependendo da espécie de invertebrado infectada, esta bactéria pode causar diversas alterações reprodutivas, de modo a garantir a vantagem da transmissão materna, como incompatibilidade citoplasmática, feminização, partenogênese ou mortalidade de machos (Herting e Wolbach 1924, Werren et al 2008). Como o *Ae. aegypti* não foi encontrado infectado por esta bactéria na natureza, infecções artificiais em laboratório têm sido realizadas com algumas cepas da espécie *Wolbachia pipiensis* para estudos da sua utilização no controle deste vetor. A cepa wMelPop, isolada de uma linhagem de laboratório de *Drosophila melanogaster*, é conhecida por reduzir a longevidade destes indivíduos devido a um excesso de replicação que gera rompimento das células do hospedeiro (Min e Benzer 1997, McMeniman et al 2008). Esta cepa, quando transinfectada para *Ae. aegypti*, também é vista causando redução na longevidade, além de incompatibilidade citoplasmática (McMeniman et al 2009, Yeap et al 2011), redução no sucesso de realização do repasto sanguíneo (Moreira et al 2009b, Turley et al 2009) e alteração de diversos parâmetros no *fitness* destes vetores que podem afetar, direta ou indiretamente, sua capacidade de transmitir doenças (Putnam e Scott 1995, Harrington et al 2001). Outra vantagem observada em *Ae. aegypti* infectados por wMelPop foi a redução ou mesmo supressão de infecções por outros parasitas, como o vírus dengue, vírus *Chikungunya*, o protozoário *Plasmodium gallinaceum* e o nematóide *Brugia pahangi* (Kambris et al 2009; Moreira et al 2009a; Bian et al 2010). Popovici e colaboradores (2010) reforçaram a segurança deste método de controle para humanos, animais e ambiente, contribuindo para validar a utilização desta bactéria no controle biológico de *Ae. aegypti* em campo.

C) Controle químico

O controle químico é efetuado com a utilização de substâncias químicas (inseticidas) e ainda desempenha um importante papel no controle tanto de larvas quanto de adultos de *Ae. aegypti*

(Rose 2001, MS/SVS 2009a). O desenvolvimento de inseticidas que permanecem ativos por períodos longos em campo foi um dos mais importantes avanços no controle de insetos acontecidos no século XX. O primeiro inseticida de efeito prolongado, ou propriedade residual, foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), um organoclorado desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial (Braga e Valle 2007b). Desde então, outros compostos têm sido rotineiramente empregados em campo, assunto a ser discutido no item abaixo.

1. 5) Mecanismo de ação dos inseticidas utilizados para controle do *Ae. aegypti*

Serão abordadas as principais classes de inseticidas utilizados na história do controle de larvas e adultos de *Ae. aegypti*. Para isto, os inseticidas serão divididos em dois grandes grupos: os “clássicos”, ou neurotóxicos, que atuam diretamente no Sistema Nervoso Central (SNC), e os Reguladores do Desenvolvimento de Insetos (IGR, sigla em inglês para “*Insect Growth Regulator*”), que atuam sobre o desenvolvimento ou a reprodução dos insetos. Uma tabela exposta ao final deste item resume a ação dos inseticidas citados abaixo.

1.5.1) Inseticidas neurotóxicos

A) Organoclorados (OC)

Esta classe surgiu na Segunda Guerra Mundial e revolucionou o controle de pragas agrícolas e insetos vetores dando início à “Era Química”. Em 1939, o químico suíço Paul Muller descobriu a propriedade inseticida do DDT, que lhe rendeu o prêmio Nobel de Medicina em 1948, pela ampla utilização deste composto no controle de malária, febre amarela e outras doenças (Ware e Whitacre 2004). A partir de então, outros compostos OCs passaram a ser desenvolvidos, gerando quatro subgrupos nesta classe: difenil-alifáticos, cujo principal representante é o dicloro-difenil-dicloroetano (DDT); hexaclorocicloexanos (BHC), tendo como principal composto o lindano; ciclodienos, como clordano, aldrin e dieldrin; e policloroterpenos, subgrupo que tem apenas dois representantes, o toxaphene e o estrobane (Ware e Whitacre 2004, Bloomquist 2009). Os dois primeiros subgrupos (DDT e BHC) apresentam o mesmo mecanismo de ação, atuam no canal de sódio dependente de voltagem ($AaNa_V$) mudando sua conformação, provavelmente mantendo-os abertos (ação similar aos PIs, ver item D abaixo). Desta forma, o interior celular fica com muitos íons sódio e as membranas dos axônios, despolarizadas, o que estimula a transmissão de impulsos elétricos repetitivos. A ação destes compostos nos insetos é rápida, levando à morte por superexcitação. Os subgrupos dos ciclodienos e dos policloroterpenos agem no receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA). Este

receptor, quando ligado ao GABA, aumenta a permeabilidade aos íons cloreto nos neurônios levando-os ao estado de hiperpolarização, o que impede temporariamente a transmissão de impulsos nervosos. Na presença destes OC, antagonistas de GABA, não ocorre a entrada de íons cloreto na célula nervosa, o que também resulta em descargas elétricas repetitivas e na morte do inseto (Ware 2000).

De todos os inseticidas deste grupo, o DDT tem destaque por ter sido extensivamente utilizado em todo o mundo desde a década de 1940. Este foi o primeiro inseticida de grande efeito residual: quando aplicado em paredes e tetos de casas sua propriedade inseticida permanecia por vários meses. Teve importante destaque na erradicação do *Ae. aegypti* em 1955 no país. A partir da década de 1970 os OCs vêm sendo proibidos em diversos países, inclusive no Brasil, onde a última compra foi efetuada em 1991, para controle da malária na Amazônia. É importante mencionar que no país, até 1994, ocorreu aplicação residual de DDT e BHC para controle de malária e leishmaniose, e, a partir deste ano, seu uso foi proibido (D'Amato et al 2002). Essas proibições e restrições referiram-se inicialmente ao uso agrícola do DDT, e foram justificadas pelos seus danos causados ao meio ambiente, mas têm também relação com pressões internacionais e nacionais contínuas, e a táticas de comercialização agressiva de produtores de outros inseticidas mais caros. Hoje em dia, o DDT ainda é indicado pela OMS para a utilização no combate a vetores, para controle de surtos de malária e leishmanioses (Braga e Valle 2007c, OMS 2007).

B) Organofosforados (OP)

As substâncias químicas desta classe apresentam carbono e fósforo em sua composição. As propriedades tóxicas e inseticidas destes compostos foram descobertas em 1930 por Schrader e colaboradores, abrindo caminho para estudos mais aprofundados sobre os OPs (Stoddart 1979). Desde então, são amplamente utilizados no controle de insetos vetores e pragas agrícolas. Inseticidas desse grupo apresentam vantagens sobre os OCs, por serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos. No entanto, sua relativa instabilidade química torna obrigatória a realização de aplicações periódicas; também são mais tóxicos para os vertebrados que os OCs (Palchick 1996, Ware 2000).

Os OPs, assim como outros inseticidas neurotóxicos clássicos, atuam no Sistema Nervoso Central (SNC) dos insetos; inibem a Acetilcolinesterase (AChE), enzima que degrada o neurotransmissor acetilcolina (mesmo mecanismo que os CA, item C abaixo). Essa importante enzima do SNC é fosforilada pelo inseticida ficando irreversivelmente inativada. Com isso, acetilcolina se acumula nas junções nervosas (ou sinapses), impedindo a interrupção da propagação do impulso

elétrico. Ou seja, o SNC estará sendo continuamente estimulado, levando o inseto à paralisia e culminando com sua morte (Braga e Valle 2007b).

É importante mencionar que existem diversas subclasses de OPs, que resultam de combinações do átomo de fósforo com diferentes elementos químicos. Compostos OPs existem em sua maioria na forma de fosfatos (que possuem um átomo de oxigênio ligado ao fósforo), mas também podem ser encontrados na forma de fosforotionatos ou fosforodionatos (quando ligados com átomos de enxofre), fosforoamidotionatos (ligação com nitrogênio) e fosfonatos (ligação com carbono). Os compostos das subclasses dos fosforotionatos (temephos, fenitrothion, etc) e fosforodionatos (malathion) são administrados sob a forma de pró-inseticidas e necessitam passar por uma etapa de biotransformação, mediada pelas enzimas Oxidases de Função Múltipla (MFO) para serem ativados (Fukuto 1990, Bloomquist 2009).

Com exceção do estado de São Paulo, esta classe de inseticidas foi a única usada no Brasil para o controle de *Ae. aegypti* desde o ano de 1967 até 1999. Depois dos surtos de dengue ocorridos em 1986 (Schatzmayr et al 1986) seu uso foi intensificado no combate às larvas e aos adultos. O larvicida temephos, na época o único produto recomendado pela OMS para uso em água potável, foi o principal composto utilizado (Chavasse e Yap 1997), e é até hoje o larvicida de eleição no país. Apenas para as regiões que apresentam populações de *Ae. aegypti* resistentes a esse composto é indicada a substituição por outro inseticida com mecanismo de ação diferente. Outros exemplos de inseticidas deste grupo utilizados no controle de adultos até 1999 foram o malathion e fenitrothion. Como consequência do excessivo uso de organofosforados em campo, a partir de 1999, foram detectadas diversas populações brasileiras de *Ae. aegypti* resistentes a esta classe de inseticidas (Lima et al 2003, Macoris et al 2003, 2007, Braga et al 2004, Carvalho et al 2004, Montella et al 2007, Lima et al 2011).

C) Carbamatos (CA)

Esta classe de inseticidas tem o mecanismo de ação semelhante aos OPs; atua na AChE embora neste caso a inibição seja reversível. De uma maneira geral, sua ação também acarreta em acúmulo de acetilcolina nas sinapses, o que ocasiona transmissões repetitivas dos impulsos nervosos, culminando com a morte do inseto. Estes compostos são ésteres de ácido carbâmico inicialmente desenvolvidos na Suíça em 1947 (OMS 1997) e têm como seus principais representantes o carbaril e o propoxur. Sua utilização em Saúde Pública tem sido considerada porque apresentam vantagens em relação aos OCs, como persistência no ambiente relativamente baixa, assim como baixa toxicidade para mamíferos e amplo espectro de ação contra insetos (Ware e Whitacre 2004). O propoxur, por

exemplo, foi utilizado para controle de malária em áreas onde há resistência aos OCs e OPs (OMS 1997).

D) Piretróides (PI)

Os PIs são os derivados sintéticos das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e de espécies relacionadas. As piretrinas foram utilizadas como inseticidas durante muitos anos, devido a sua ação sobre uma grande variedade de insetos e à baixa toxicidade para mamíferos, quando em circunstâncias de uso adequado. Entretanto, as piretrinas naturais apresentam grande instabilidade à luz solar e ao ar, o que diminui sua eficácia no controle de insetos (Soderlund et al 2002, Braga e Valle 2007b, Santos et al 2007).

O uso dos piretróides sintéticos na agricultura iniciou-se na década de 1970, depois que mudanças estruturais foram introduzidas nas piretrinas, resultando em substâncias com maior estabilidade e maior potencial inseticida. Atualmente são amplamente utilizados no controle de insetos vetores e são os inseticidas comerciais mais utilizados em domicílio. Possuem como vantagens a baixa toxicidade para mamíferos, e o fato de não se acumularem no organismo, além de serem biodegradáveis. No entanto, em alguns casos, podem causar hipersensibilização e irritação das mucosas de aves e mamíferos e, ocasionalmente, intoxicações agudas. Já para os animais aquáticos, os PIs são muito tóxicos. Outra desvantagem é o custo elevado (Ware 2000, Braga e Valle 2007b, Santos et al 2007).

Os PIs, que também são inseticidas neurotóxicos, atuam no canal de sódio ($AaNa_v$) das membranas dos axônios mudando sua conformação e mantendo-os abertos (ação similar aos OCs do grupo do DDT e BHC). Desta forma, também geram descargas elétricas repetitivas. Sua ação nos insetos é bem rápida, causando paralisia imediata e morte. Tal efeito, característico desta classe, é chamado de “knock down”. Alguns exemplos de compostos desta classe são deltametrina, cipermetrina, permetrina e lambda-cialotrina.

Como mencionado acima, com exceção de São Paulo, que começou a usar piretróides em 1989, o uso desta classe de inseticidas contra as formas adultas de *Ae. aegypti* foi iniciado no Brasil em 2001 (Funasa 1999c). Todavia, após um ano já foram detectadas alterações no status de susceptibilidade dos adultos de várias localidades a esta classe de inseticidas (da-Cunha et al 2005, Martins et al 2009a).

1.5.2) Reguladores do crescimento de insetos (IGRs)

Os reguladores do crescimento de insetos, mais conhecidos pela sigla em inglês IGR (*Insect Growth Regulator*), formam um grupo de inseticidas de nova geração que causam modificações fisiológicas e morfológicas, interferindo com o desenvolvimento e a reprodução dos insetos (Graf 1993, Fournet et al 1997). Estes são considerados como alternativas aos inseticidas neurotóxicos clássicos porque atuam sobre alvos diferentes. O potencial de uso efetivo dos IGR no controle começou a ser considerado na década de 1970, em virtude da sua ação mais específica e de sua menor toxicidade para peixes, pássaros, mamíferos e para a maioria dos organismos não-alvo do que os outros inseticidas (Mian e Mulla 1982, OMS 2006). Em geral, os IGR apresentam altos níveis de atividade e eficácia no controle de várias espécies de insetos, em diferentes *habitat*. Eles são utilizados na agricultura desde a década de 1990, contra pragas das ordens Coleoptera (McCasland et al 1998), Lepidoptera (Villanueva-Jimenez et al 2000) e Ortoptera (Delgado et al 1999). Existem também vários estudos mostrando os efeitos dos IGRs sobre insetos de interesse médico ou veterinário (Chamberlain 1975, Chau-Mei et al 1990). Mais recentemente, os IGRs têm sido utilizados no controle de vetores de doenças de importância em Saúde Pública (OMS 2006) e sua utilização em larga escala é defendida em função de sua baixa toxicidade para os seres humanos.

Com base no mecanismo de ação, os IGRs são divididos em três categorias principais no controle de culicídeos: (A) agonistas de ecdisona, (B) hormônios juvenis e seus análogos (conhecidos como juvenóides ou mímicos) e (C) inibidores de síntese de quitina. As duas primeiras categorias interferem no sistema endócrino e a última, na produção de quitina pelos insetos.

A) Agonistas de ecdisona

Os ecdisteróides, grupo do qual o hormônio ecdisona faz parte, são compostos que apresentam atividade indutora da muda de insetos. Estas moléculas são produzidas em resposta ao hormônio protoracicotrópico (PTTH). Geralmente, a ecdisona é carregada da glândula protorácica até os tecidos periféricos, onde é convertida em 20-hidroxiecdisona. Este composto ativa as células hipodérmicas, induzindo a formação de uma nova cutícula e resultando na liberação da cutícula velha (apólise) (Wigglesworth 1972). Os agonistas de ecdisona exercem sua toxicidade por se ligarem aos receptores de ecdisona (do mesmo modo que a ecdisona endógena), ativando o processo de muda. Desta forma, exposição à agonistas de ecdisona gera uma série de problemas fisiológicos nos insetos, principalmente síntese prematura da cutícula (especialmente ao redor da região cefálica), podendo resultar em oclusão de peças bucais e, conseqüentemente, dificuldade de alimentação. Em mosquitos, os efeitos biológicos de exposição a estes compostos foram semelhantes a outras espécies

de insetos (Beckage et al 2004, Boudjelida et al 2005). O tebufenozide, o holofenozide e o methoxyfenozide são exemplos de compostos desta classe (Ware e Whitacre 2004).

B) Análogos de Hormônio Juvenil (AJH)

Em 1933, Wigglesworth descobriu o papel do Hormônio Juvenil (JH), denominando-o “fator inibidor” da metamorfose. Cerca de trinta anos depois, em 1967, a estrutura do JH I da mariposa *Cecropia* foi determinada. Desde então, outras estruturas de JHs têm sido elucidadas (Wigglesworth 1985). Os JHs são sintetizados pelo *corpus allatum*, um pequeno órgão situado na base do cérebro, e têm como principal função a inibição da metamorfose até que larva esteja em momento fisiológico adequado (Williams 1956, 1958). Outras funções também são atribuídas a esses hormônios, como participação em processos como embriogênese, muda, metamorfose, reprodução e diapausa (Chapman 1998). Os análogos de Hormônio Juvenil (AJH), ou juvenóides, interferem no sistema endócrino dos insetos, e, assim como outros IGRs, não provocam morte rápida nas larvas. Embora os insetos consigam sobreviver a esta fase, a mortalidade ocorre no estágio de pupa ou durante a emergência do adulto (Braga et al 2005). A utilização do AJH methoprene já foi uma das alternativas propostas pelo Ministério da Saúde para o controle de larvas no Brasil (Funasa 2001). Contudo, como seu efeito principal é a inibição de adultos (e não a mortalidade de larvas) (Braga et al 2005) sua utilização em campo caiu em descrédito pelos agentes de saúde e também pela população, que não observaram efeitos imediatos do inseticida, assim, foi necessária sua retirada de campo no país.

C) Inibidores de Síntese de Quitina (CSI)

Os IGRs atualmente mais empregados no controle de *Ae. aegypti* pertencem ao grupo das benzoil-fenil-uréias (BPU), que são inibidores de síntese de quitina (CSI, do inglês *chitin synthesis inhibitor*). A quitina é um polímero de N- acetilglicosamina, encontrada principalmente no exoesqueleto de insetos, paredes celulares de fungos e de nematódeos (Chapman 1998). Em insetos, a quitina está presente, entre outras estruturas, no exoesqueleto, nos ovos e na matriz peritrófica, esta última uma barreira acelular que separa o alimento ingerido do epitélio intestinal. Visto que a quitina é um elemento fundamental no desenvolvimento, crescimento e fisiologia dos insetos, a interferência com sua produção pode ser considerada como uma importante alternativa para o desenvolvimento de inseticidas com novos mecanismos de ação (Belinato 2007). Entre os CSIs mais utilizados encontram-se o triflumuron, novaluron e diflubenzuron.

Do ponto de vista do controle de mosquitos de importância médica, o principal efeito dos CSIs, assim como de outros grupos de IGRs, é a inibição da emergência de adultos. Além disso,

diversos efeitos secundários já foram relatados na literatura, em várias espécies de insetos, como anormalidades morfogênicas (intermediários larva-pupa ou pupa-adulto, tarsos curvados em adultos) e baixa longevidade, entre outros (Vasuki 1992, Vasuki e Rajavel 1992, Wilson e Cryan 1997). Belinato et al 2009 relatam que *Ae. aegypti* adultos, resultantes de larvas expostas a doses subletais de triflumuron, apresentam comprometimento da emergência de fêmeas e redução da longevidade, da atividade locomotora e da capacidade de cópula de adultos. As fêmeas adultas ingerem menor quantidade de sangue, com conseqüente redução do tamanho das posturas; a viabilidade dos ovos também é comprometida. Esses resultados reforçam o uso dos BPU's como uma alternativa promissora no âmbito do controle de *Ae. aegypti*.

A eficácia de BPU's sobre populações de *Ae. aegypti* resistentes ao temephos também foi confirmada (Martins et al 2008, Belinato et al 2009, Fontoura et al 2012). Em 2009, diflubenzuron foi incorporado à rotina de controle de larvas no Brasil como alternativa para as populações de *Ae aegypti* resistentes ao OP temephos (MS/SVS 2009b). Isto foi possível devido a sua recente aprovação para uso em água potável pela OMS (OMS 2009).

Tabela 1.1. Resumo dos principais inseticidas utilizados no controle de *Aedes aegypti* e seus respectivos alvos ou efeitos.

Grupo	Inseticida	Alvo ou efeito
Neurotóxicos	Organoclorados: difenil-alifáticos (ex: DDT) e hexaclorocicloexanos (BHC)	Canal de sódio
	Organoclorados: ciclodienos e policloroterpenos	Receptor de GABA
	Organofosforados	Acetilcolinesterase
	Carbamatos	Acetilcolinesterase
	Piretróides	Canal de sódio
IGRs	Agonista de ecdisona, hormônio da muda	Receptores de ecdisona/ indução de mudas
	Análogo de hormônio juvenil	Inibe muda para estágio adulto
	Inibidor da síntese de quitina, componente do exoesqueleto	Produção da quitina

1.6. Mecanismos de resistência a inseticidas

Embora a resistência a inseticidas seja um dos fatores que contribui para a reemergência de doenças transmitidas por vetores (Brogdon e McAllister 1998), os inseticidas químicos continuam desempenhando um papel chave nos programas de controle (Rose 2001, OMS 2006). A resistência a

inseticidas advém da variabilidade genética que ocorre naturalmente em populações de insetos. Com a intensa pressão de seleção exercida pelos inseticidas, fenótipos específicos são selecionados e, por conseguinte, aumentam a frequência dos indivíduos que os portam. Desta forma, a resistência pode se disseminar nas populações de insetos, que adquirem habilidade de sobreviver a doses de compostos tóxicos que seriam letais para a maioria dos indivíduos normais suscetíveis da mesma espécie (Beaty e Marquardt 1996). Em virtude disso, as opções de compostos químicos disponíveis para controle de doenças ficam limitadas, gerando um desafio para a Saúde Pública (OMS 1998).

Podemos também entender a resistência como um processo de “evolução” acelerada de uma população, em resposta a uma intensa pressão seletiva (Braga e Valle 2007b). Estas mudanças, porém, em geral só são vantajosas na presença do inseticida. Na literatura, os mecanismos conhecidos de resistência são divididos em quatro categorias, podendo um mesmo indivíduo apresentar concomitantemente mais de um mecanismo: A) redução do nível de penetração do inseticida devido a mudanças na cutícula (Ferrari 1996); B) alterações de comportamento, ocasiões em que insetos com habilidade de evitar o contato com o inseticida são selecionados (Hemingway et al 2004); C) resistência metabólica e D) alteração do sítio-alvo dos inseticidas. Os dois últimos mecanismos são os mais estudados em tanto em nível molecular quanto genético (Hemingway e Ranson 2000) e serão aprofundados nos tópicos abaixo. É importante destacar que estes mecanismos não são específicos e geralmente podem resultar em resistência cruzada (um mesmo mecanismo conferindo resistência a mais de um composto químico) ou em resistência múltipla (vários mecanismos atuando, conferindo resistência a mais de um composto químico). Nesse contexto, a compreensão sobre os mecanismos de resistência é de suma importância para auxiliar a identificação de compostos com modo de ação distinto e subsidiar o manejo racional nos programas de controle de vetores (Ferrari 1996).

Modificações nas enzimas ou sítios alvo que participam da resistência podem resultar de algumas alterações genéticas (Hemingway et al 2004, Li et al 2007, Viana-Medeiros 2011), que compreendem:

A) Amplificação gênica: um gene tipicamente de cópia única em um inseto suscetível pode se apresentar em múltiplas cópias no inseto resistente. Isso aumenta a quantidade de moléculas de enzima produzidas e, conseqüentemente, a eficiência no metabolismo do agente tóxico. Este mecanismo já foi detectado em dípteros e hemípteros (é o principal mecanismo responsável por aumento de ESTs).

B) Expressão gênica alterada: alterações na região promotora do gene podem gerar superexpressão no inseto resistente, por exemplo, de enzimas relacionadas com a resistência metabólica. Este

mecanismo já foi relatado nas ordens Hemiptera, Himenoptera, Lepidoptera e Diptera (é descrito como o principal mecanismo que contribui para maior atividade de GST e MFO).

C) Mudança estrutural: altera especificamente a região codificante do gene, acarretando em mudança estrutural de seu produto. Em função disto, o inseticida pode não mais se ligar no seu sítio alvo ou ter sua metabolização alterada (promove insensibilidade do sítio alvo, ver item 1.6.2).

1.6.1) Resistência metabólica

A resistência metabólica ocorre em função do aumento na atividade das enzimas responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos, gerando maior eficiência na detoxificação do inseticida pelo organismo do inseto. Isso assegura a eliminação ou inativação dos compostos tóxicos circulantes, tornando-os menos nocivos e impedindo que alcancem seu sítio final de ação (Brogdon e McAllister 1998, Hemingway e Ranson 2000). As reações de detoxificação geralmente são parte de um sistema multi-enzimático, que pode ser dividido em enzimas de Fases 1 e 2. Enzimas das superfamílias das Oxidases de Função Múltipla (MFO) e das Esterases (ESTs), de Fase 1, reconhecem e atuam diretamente sobre o composto exógeno, oxidando ou hidrolisando o substrato, respectivamente. Os produtos destas reações podem ser excretados diretamente ou seguirem para a Fase 2, quando ocorrem reações de conjugação. As glutathione-S-transferases (GST) são enzimas que participam da Fase 2. O metabolismo de xenobióticos prossegue até que os produtos gerados estejam solúveis e possam ser exportados (Fase 3) e excretados (Braga e Valle 2007b) (Figura 1.3).

Metabolismo dos xenobióticos

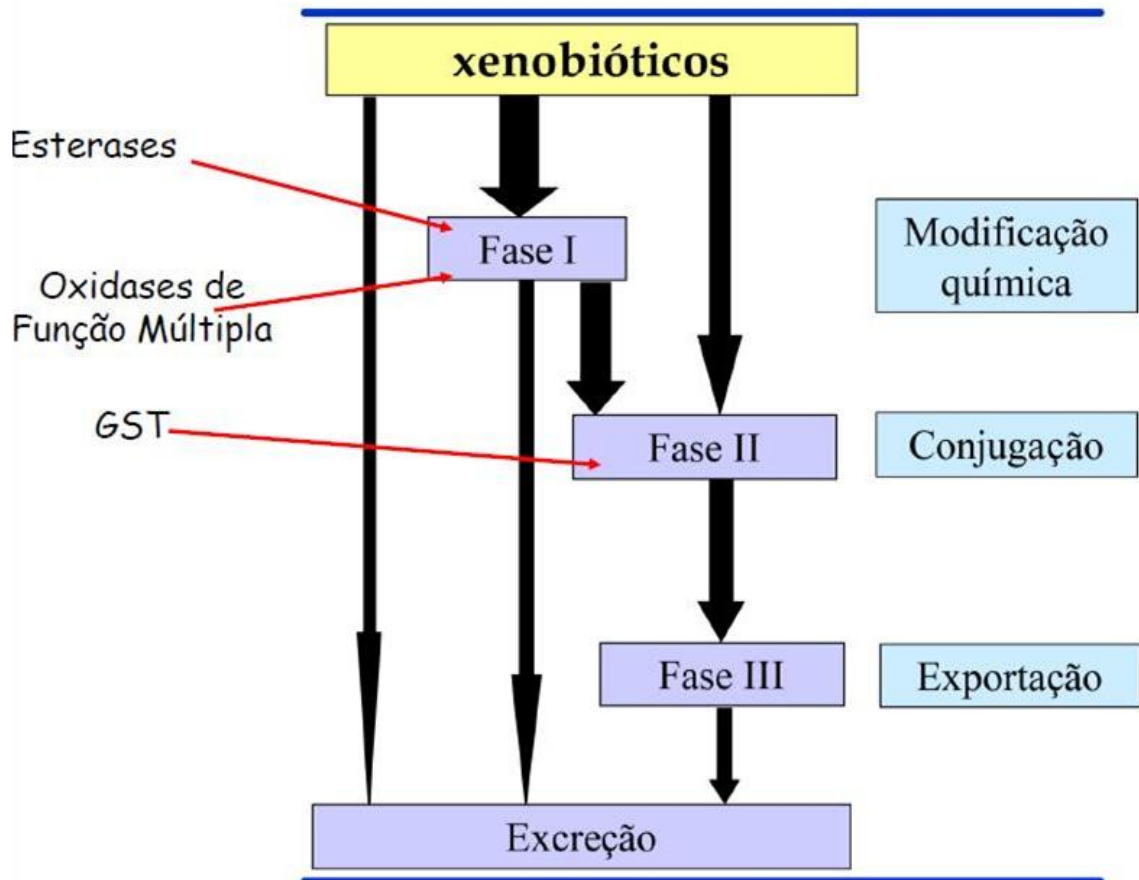


Figura 1.3. Processo de biotransformação. Este pode ocorrer em até três fases. Na Fase 1, participam as Esterases e MFO e ocorre a modificação química da molécula xenobiótica; a GST participa da Fase 2, quando a molécula exógena sofre conjugação; a Fase 3 corresponde ao carreamento da molécula estranha para fora da célula (Montella 2008).

As MFOs, também conhecidas como citocromo P450 ou Monooxigenases, entre outros nomes, formam uma superfamília de enzimas complexas e relacionadas com o metabolismo oxidativo, encontradas desde bactérias até mamíferos. Em *Drosophila melanogaster*, mais de 80 tipos de MFOs são conhecidas e provavelmente este número se assemelhe em outras espécies. MFOs já foram relacionadas à tolerância a praticamente todas as classes de inseticidas, incluindo os IGRs (Bergé et al 1998, Hemingway e Ranson 2000, Daborn et al 2007, Li et al 2007). Contudo, a maioria dos relatos associa alterações nestas enzimas com a resistência a PI, DDT e OP (Hemingway et al 2004, Li et al 2007, Miyo e Oguma 2010). As MFOs também estão envolvidas em diversos processos do metabolismo de compostos endógenos (como hormônios), participam do processamento de sinais relacionados com a recepção e biossíntese de odores, além de estarem envolvidas com a bioativação

de alguns inseticidas OPs (como temephos, malathion e fenitrothion), administrados sob a forma de pró-inseticidas (Bergé et al 1998, Braga e Valle 2007b, Li et al 2007). No Brasil, é recente a detecção de populações de *Ae. aegypti* com MFO alterada (Viana-Medeiros 2011); até então, este mecanismo não parecia ser relevante na detoxificação de inseticidas utilizados em campo.

Compostos, endógenos e exógenos, que apresentam ligações éster em sua estrutura são susceptíveis a reações de hidrólise catalisadas por outro grupo de enzimas, da superfamília das ESTs. Estas desempenham papéis cruciais no desenvolvimento (como as Esterases de Hormônio Juvenil) e mesmo na fisiologia dos insetos, atuando na reprodução e digestão, por exemplo. Sua relação com a resistência de insetos a OP é muito bem documentada na literatura e está relacionada com produção de mais moléculas de enzimas (Macoris et al 2003, Montella et al 2007, Marcombe et al 2009). Há indícios de que estas enzimas também estejam relacionadas com a resistência a CA e, com um pouco menos de relevância, à resistência a PIs (Hemingway e Karunaratne 1998, Li et al 2007, Montella et al 2007). A reação de hidrólise catalisada pelas EST para substratos como PI e CA se processa rapidamente. Entretanto, em relação à maioria dos inseticidas OP, as EST possuem afinidade alta mas capacidade muito baixa de hidrólise. Considera-se mesmo que EST de insetos “sequestram” inseticidas OP (Hemingway e Karunaratne 1998, Hemingway e Ranson 2000).

As GSTs também são enzimas multifuncionais, envolvidas com a detoxificação celular de diversos compostos endógenos e exógenos. Essas enzimas catalisam a conjugação do grupamento –SH da glutatona reduzida (GSH), um tripeptídeo endógeno, ao centro eletrofílico de compostos lipofílicos, formando produtos mais solúveis, em geral reduzindo-lhes a toxicidade e facilitando sua excreção (Clark et al 1984, 1985, Toung et al 1990, Hemingway e Ranson 2000). Em insetos, até o presente momento foram descritas GST de duas subfamílias, as microssomais e as citossólicas, sendo estas últimas as mais relevantes no contexto da resistência, uma vez que apresentam maior número de enzimas capazes de detoxificar inseticidas (Frova 2006, Kasai et al 2009, da-Fonseca et al 2010). Muitos trabalhos relacionam a resistência a PIs a uma maior atividade de GSTs, de forma generalizada ou em função da sua maior atividade peroxidásica, esta última capaz de neutralizar o estresse oxidativo gerado pelo inseticida (Vontas et al 2001, Li et al 2007, Montella et al 2007, Polson et al 2011). GSTs também estão relacionadas com a resistência a outras classes de inseticidas, como OP e OC do tipo DDT (Li et al 2007).

1.6.2) Alteração do sítio alvo

A) Acetilcolinesterase (AChE)

A Acetilcolinesterase (AChE) é a molécula-alvo dos OPs e CAs (ver mecanismo de ação destes inseticidas no item 1.5.1). As reações da AChE com inseticidas CAs são rápidas e seguidas por regeneração da enzima. Por outro lado, as ligações com os OPs são consideradas irreversíveis (Fukuto 1990, Hemingway e Karunaratne 1998). Nesse contexto, a resistência pode estar relacionada com a afinidade reduzida da AChE pelo inseticida ou com um maior número de moléculas da enzima.

Em 1964, Smitsaert descreveu pela primeira vez uma AChE com a sensibilidade alterada para pesticidas em uma espécie de ácaro. Desde então, foram detectadas várias espécies de insetos com AChE alterada (Menozzi et al 2004). A maioria dos insetos apresenta dois genes que codificam a AChE, denominados *ace-1* e *ace-2*. Há indicação de que *ace-1*, relacionado com a resistência a inseticidas na maior parte dos insetos, seja o gene ancestral (Li et al 2010). Em mosquitos, a mutação “clássica” que confere resistência a inseticidas se encontra no gene *ace-1*, na posição 119 (posição correspondente em *Torpedo californiana*, espécie usada como sequência referência), e consiste de substituição de glicina por serina (G119S). Esta mutação foi detectada em pelo menos duas espécies do gênero *Anopheles* e duas do gênero *Culex* (Weil et al 2004, Labbé et al 2007). Outras substituições no gene *ace-1*, também associadas com resistência, foram descritas no gênero *Culex*, F331W e F290V. Em todos esses casos há indícios de que os resíduos substituídos estejam localizados em regiões próximas ao sítio catalítico da enzima (Hemingway et al 2004, Cassanelli et al 2006, Alout et al 2008). Nenhuma das três mutações descritas em mosquitos foi diagnosticada em *Ae. aegypti*, fato justificado por Weill e colaboradores (2004) com o uso diferenciado de códon por esta espécie: a glicina 119 da *ace-1* de *Ae. aegypti* é codificada pelo códon GGA, enquanto apenas o códon GGC foi encontrado nas espécies de *Culex* e *Anopheles* analisadas. Como o códon de serina mais próximo é AGC, seriam necessárias duas mutações, a partir do códon GGA, para substituir glicina por serina nesta espécie. O mesmo tipo de limitação ocorre na mutação F331W, mas não na F290V, que requer apenas um evento de mutação (Mori et al 2007).

Recentemente foi relatada redução na sensibilidade a inseticidas em virtude de um maior número de moléculas de AChE nas membranas celulares de *Bactrocera oleae*, inseto que apresenta apenas o gene *ace-2*. Vale salientar que este fato decorreu de deleção de três glutaminas na região C-terminal da cadeia peptídica da AChE, domínio distante do seu sítio catalítico. Verificou-se ainda que esta deleção resultou em aumento na eficiência das modificações pós-traducionais que possibilitam ancoramento da AChE, via GPI, nas membranas celulares (Kakani et al 2011). Viana-

Medeiros (2011) analisou populações de campo brasileiras de *Ae. aegypti* e não constatou qualquer alteração na sensibilidade da AChE, quando na presença do inibidor CA propoxur. Entretanto, foi encontrada maior atividade total da AChE, sugerindo que esta espécie também possa apresentar maior número de enzimas, e não alteração em suas propriedades catalíticas.

B) Canal de Sódio Regulado por Voltagem (Nav)

Os canais de sódio são proteínas transmembranares responsáveis por gerar o potencial de ação, permitindo o influxo de íons sódio para o interior das células excitáveis (neurônios, miócitos e células endócrinas) possibilitando assim a transmissão do impulso nervoso. Estas são moléculas constituídas por quatro domínios homólogos (I - IV), cada qual com seis segmentos hidrofóbicos (S1 – S6) e com um *loop* adicional entre os segmentos S5 e S6, o *P-loop* (Figura 1.4). Os canais de sódio pertencem à superfamília de proteínas que também inclui os canais de cálcio e potássio voltagem-dependentes (Martins e Valle 2011). O canal de sódio é alvo de uma variedade de neurotoxinas, incluindo as que ocorrem naturalmente em animais e plantas, drogas terapêuticas e inseticidas piretróides, além de OC do tipo DDT (ver mecanismo de ação destes inseticidas no item 1.5.1) (Wing et al 2005).

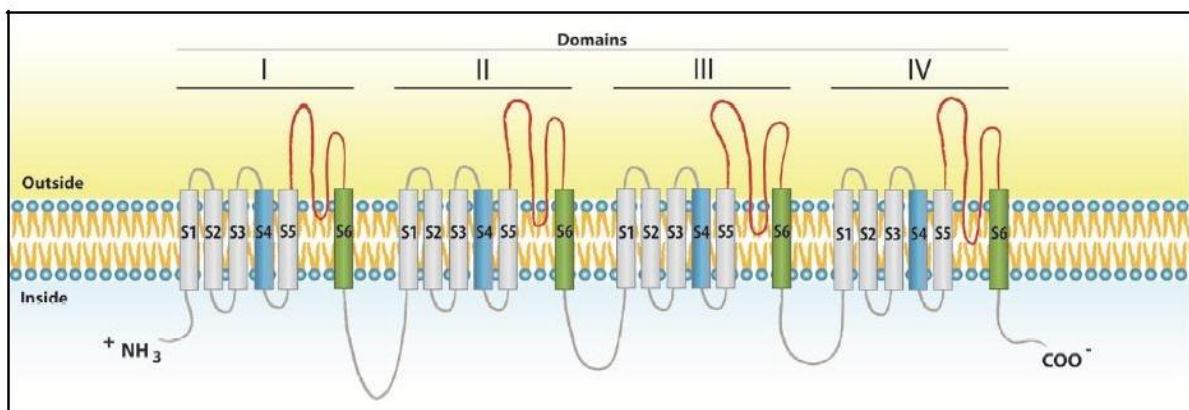


Figura 1.4. Canal de sódio dependente de voltagem (Nav). Esquema representativo do Nav inserido na membrana celular, mostrando seus quatro domínios homólogos (I-IV), cada um com seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6). Figura retirada de Martins e Valle 2011. The Pyrethroid Knockdown Resistance.

Os inseticidas, ao interagirem com este canal, mudam sua conformação, mantendo-o aberto e fazendo com que o influxo de sódio se mantenha. Em consequência, há propagação continuada do impulso, o que provoca paralisia rápida e culmina com a morte do inseto (efeito *knockdown*). Há indícios de que os inseticidas não se ligam quando o canal de sódio está em seu

estado fechado, reforçando a hipótese de que possuem afinidade pelo canal aberto, preservando-o nesta conformação e inibindo o seu retorno para a forma desativada, ou fechada. Alguns modelos propõem que estes inseticidas se ligam especificamente à cavidade delimitada pela sequência que une os segmentos S4-S5 do domínio II e pelas hélices IIS5 e IIS6, acessível a inseticidas lipofílicos. Alguns aminoácidos pertencentes a essas hélices não são conservados entre os artrópodes e os outros animais, o que poderia ser responsável pela seletividade dos efeitos dos piretróides sobre os insetos (O'Reilly et al 2006, Martins e Valle 2011).

Resistência a inseticidas que têm como sítio alvo o canal de sódio foi relatada pela primeira vez em *Musca domestica* logo após o início da utilização do DDT, em 1950. Esses insetos, quando expostos ao DDT, apresentavam paralisia momentânea, seguida por recuperação completa dos movimentos, fenótipo que passou a ser chamado de “knockdown” resistance (*kdr*) (Busvine 1951, Harrison 1951, Milani 1954). Após a introdução dos PIs, outras espécies de insetos foram descritas com o fenótipo *kdr*, o que foi posteriormente relacionado com pressão prévia por DDT, caracterizando resistência cruzada com PI, já que compartilham o sítio alvo (Hemingway e Ranson 2000).

O mecanismo de resistência *kdr* decorre de mutações no gene que codifica o canal de sódio (Na_V), que reduzem sua sensibilidade ao inseticida, em geral da ordem de 10 a 20 vezes; no caso da mutação conhecida como *super kdr* esta redução pode ser de até 100 vezes. Geralmente, essas mutações têm caráter recessivo e podem ser mantidas em níveis baixos nas populações, em espécimes heterozigotos (Davies et al 2007). A mutação mais frequentemente encontrada em insetos, e relacionada com a resistência a PIs, ocorre no segmento IIS6, na posição 1014 (posição referente ao gene Na_V da *M. domestica*) e consiste de substituição de uma leucina por uma fenilalanina. Pelo menos 14 espécies já foram descritas com essa mutação (Soderlund e Bloomquist 1989). Outros estudos identificaram diversas alterações, incluindo a substituição de leucina por outros aminoácidos e mutações em outras posições do Na_V de insetos.

Em *Ae. aegypti*, não há registro de mutações na posição 1014. No entanto, ocorrem outras substituições nesta espécie entre as regiões IIS5 e IIS6 (Gly923Val, Leu982Trp, Ile1011Met, Ile1011Val, Val1016Ile, Val1016Gly) (Bregues et al 2003, Saavedra-Rodriguez et al 2007, 2008, Rajatikela et al 2008). No Brasil, há indícios que a mutação Val1016Ile (substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 1016) seja a principal contribuinte para a resistência a PIs (Martins et al 2009a). Outra mutação, a Ile1011Met, também encontrada em populações brasileiras, parece colaborar para a resistência, em menor grau (Martins et al 2009b).

Recentemente outra mutação foi descrita em populações de *Ae. aegypti* de diversas regiões da Tailândia e também das Ilhas Cayman, ao sul de Cuba (Harris et al 2010, Yanola et al

2011): a mutação Phe1534Cys na região IIS6, que consiste de substituição de fenilalanina por cisteína. Nestes estudos foi relatada correlação entre a mutação e resistência a piretróides e DDT. No entanto, nestas populações as mutações Val1016Ile ou Val1016Gly também estavam presentes, simultaneamente. A mutação Phe1534Cys foi ainda encontrada em *Ae. albopictus* de Cingapura (Kasai et al 2011). Atualmente foi encontrada e está sendo melhor investigada em populações brasileiras de *Ae. aegypti* (Martins, comunicação pessoal).

1.7) Custo evolutivo da resistência a inseticidas

Diversos trabalhos têm demonstrado que populações de insetos resistentes a inseticidas frequentemente diferem de populações sensíveis em relação aos componentes biológicos de aptidão (*fitness*) (Arnaud et al 2002, Martins et al 2012). Esses efeitos podem ocorrer por causa de alterações fisiológicas geradas por mudanças no sítio alvo dos inseticidas, ou em função do desvio energético para produção e/ou conservação dos mecanismos associados com a detoxificação, uma vez que os recursos são limitados. Esse balanço (*trade-off*) é um paradigma muito bem conhecido na biologia evolutiva (Stearns 1992).

Mutações no sítio alvo dos inseticidas, como na AChE ou no canal de sódio, moléculas vitais para os organismos, poderiam influenciar no desenvolvimento (Berticat et al 2008) e alterar a percepção a estímulos ambientais relacionados com a reprodução e sobrevivência. No caso da resistência metabólica, o efeito da superexpressão de enzimas detoxificadoras sobre os custos no *fitness* dos insetos deveria variar de acordo com o papel da enzima no metabolismo. Por exemplo, se as GSTs podem proteger os tecidos contra danos oxidativos, uma maior produção destas enzimas aumentaria a longevidade dos insetos (Ayyadevara et al 2005, McElwee et al 2007, Rivero et al 2010). Por outro lado, a superprodução de MFO e EST poderia gerar efeito contrário, aumentando a quantidade de radicais livres formados no organismo (Ortiz e Voss 2005, Murataliev et al 2008, Rivero et al 2010). Na prática, alterações nos níveis de expressão de enzimas relacionadas à resistência metabólica não são raras. Por exemplo, há registro de aumento de mais de 50 vezes de EST em *Culex* (Raymond et al 2001), sugerindo um desvio energético muito grande para sustentar esta situação (Chevillon et al 2001).

Em pragas agrícolas, o *trade-off* entre resistência e *fitness* é bastante estudado (Yamamoto et al 1995, Boivin et al 2001, Konno e Omoto 2006). Em mosquitos do gênero *Culex*, já foram encontrados indivíduos resistentes com déficit no *fitness*, como menor sucesso de acasalamento, maior susceptibilidade a predadores e alterações gerais no desenvolvimento (Berticat et al 2002, Agnew et al 2004, Rivero et al 2010). Paralelamente, ganhos no *fitness* também foram

documentados em insetos na ausência de inseticidas, como maior eficiência de cópula em *Tribolium castaneum* resistentes a malathion (Arnaud e Haubruge 2002).

Outro fato relevante é que a resistência muitas vezes tem caráter multifatorial, manifestando-se por meio de diversos mecanismos, cujos efeitos podem ser somados (Berticat et al 2008, Rivero et al 2010). Nesse contexto, se as cepas resistentes exibirem uma desvantagem reprodutiva, em geral, na ausência dos inseticidas a frequência de indivíduos resistentes tenderá a decair ao longo do tempo (Crow 1957, Carrière et al 1994, McKenzie 1996). Embora a maioria dos estudos apresente efeitos negativos da resistência sobre a viabilidade, em certos casos as cepas resistentes podem ter alguma vantagem de *fitness* e sua frequência mantém-se estável (Arnaud et al 2002). Esses fatores afetam diretamente a velocidade com que os alelos de resistência irão se propagar - ou diminuir em frequência - na ausência ou na presença de inseticidas, fato muito importante para o manejo da resistência aos inseticidas.

1.8) Monitoramento e manejo da resistência

No Brasil, as primeiras suspeitas de resistência ao organofosforado temephos, único larvicida disponível para uso em água potável durante muito tempo, foram levantadas por agentes de controle no Rio de Janeiro, em 1998, em função de diminuição da persistência deste inseticida em campo (Braga e Valle 2007c). Estas suspeitas estão na base da criação, em 1999, da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* (MoReNAa), coordenada pelo Ministério da Saúde, e que representa um enorme avanço para o controle racional deste vetor no país. Os dados gerados pela Rede fornecem subsídio às decisões do PNCD para compreensão e manejo da resistência do vetor (Braga e Valle 2007c). A Rede MoReNAa é hoje constituída por quatro laboratórios, dos quais o Laficave, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz é Referência Nacional, contando com toda a infraestrutura necessária e com protocolos validados para a detecção e a quantificação da resistência, assim como para a identificação de uma série de mecanismos envolvidos.

Hoje no Brasil o PNCD adota o uso de PIs para o controle de *Ae. aegypti* adultos e de temephos para larvas. Contudo, em função da disseminação de resistência a estes inseticidas, atualmente se encontra em andamento a substituição para o OP malathion e o CSI diflubenzuron para o controle, respectivamente, de adultos e larvas do vetor da dengue (Figura 1.5).

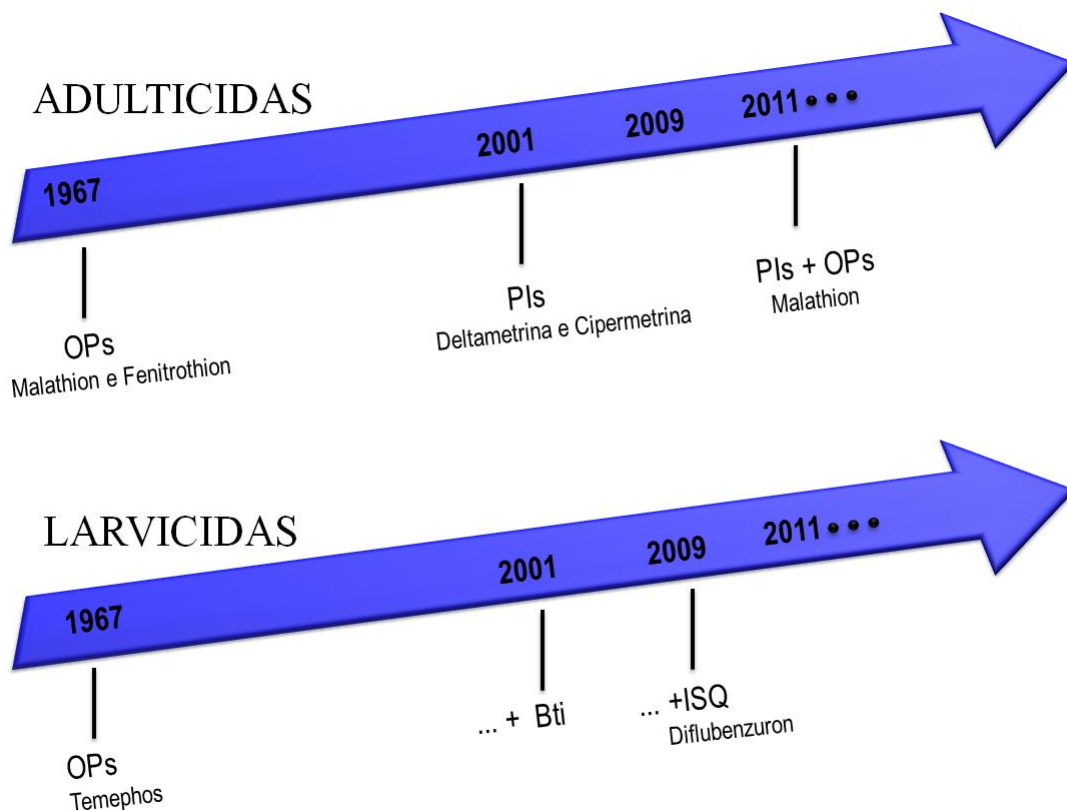


Figura 1.5. Linha do tempo retratando os inseticidas em utilização no Brasil para uso no controle de adultos e larvas de *Aedes aegypti*.

1.9) Recomendações do PNCD para o uso de inseticidas em campo

O uso racional de inseticidas é um ponto fundamental para evitar a disseminação da resistência em populações de *Ae. aegypti*. Para isso, o PNCD preconiza aos municípios metodologias para utilização destes compostos em campo. No caso de larvicidas, o Ministério da Saúde (MS) recomenda o seu uso contra o vetor da dengue em ciclos periódicos, totalizando quatro a seis aplicações durante o ano. Em pontos estratégicos (borracharias, cemitérios, rodoviárias...) sua aplicação deve ser mensal, ou quando detectada a presença de focos (MS/SVS 2009a).

Em 2000-2001 os piretróides começaram a ser utilizados no controle de adultos no país (com exceção do Estado de São Paulo). A aplicação de adulticidas, diferentemente de larvicidas, é indicada apenas em situações de surto ou em “pontos estratégicos” (PE), e pode ser realizada quinzenalmente por aplicação residual ou em ciclos de aplicação espacial a Ultra Baixo Volume (UBV). Em geral, para UBV, são recomendados aplicações de três a cinco dias com quatro a seis repetições. Após a última passagem de UBV, recomenda-se avaliar o impacto das aplicações sobre a transmissão

de dengue e, caso necessário, pode-se realizar mais duas aplicações (Braga comunicação pessoal, MS/SVS 2009a).

1.10) Informações sobre os municípios avaliados

Nesta dissertação, foram avaliadas populações de *Ae. aegypti* de quatro municípios brasileiros, ao longo de um ano. Além das variações do *status* da resistência aos três principais inseticidas utilizados em campo no país, foram quantificadas tanto a atividade das principais enzimas relacionadas com a resistência metabólica e do sítio alvo de OP, quanto a frequência das mutações encontradas no *AaNav*. Dados sobre a população e a área de cada localidade estudada estão apresentados na Tabela 1.1.

Tabela 1.2. Dados demográficos dos municípios participantes do estudo.

Município	População	Índice de Desenvolvimento Humano (IDH)	Área (km²)	Densidade demográfica (hab/km²)
Duque de Caxias/RJ	855.048	0,753	468	1.827,00
Parnamirim/RN	202.456	0,703	124	1.632,70
Campo Grande/MS	786.797	0,814	8.093	97,21
Santarém/PA	294.580	0,746	22.886	12,87

Nota: As informações relativas à população residente e às áreas das localidades foram retiradas das páginas web de cada Prefeitura; os IDHs foram conseguidos junto à página do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD – Brasil). Os endereços eletrônicos se encontram ao final do item Referências.

1.10.1) Dados gerais e notificações dos casos de dengue para cada município

Os dados de incidência de dengue foram levantados junto ao Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. É importante mencionar que as notificações de dengue anteriores ao ano de 2007 não se encontravam disponíveis no banco de dados. Nestes casos, os dados gerais foram obtidos em buscas nas páginas web de cada Prefeitura Municipal.

A) Duque de Caxias/RJ

Terceiro município mais populoso do Estado do Rio de Janeiro, com 855 mil habitantes, pertence à Região Metropolitana do Rio de Janeiro, e está situado na baixada fluminense, em área de 468 km²; apresenta densidade populacional de 1.827 habitantes/m². É uma região de clima tropical, quente e úmido, com chuvas abundantes e temperatura elevada (média anual de 23°C). O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) para este local é de 0,753. Este índice varia de 0 a 1 e mede a qualidade de vida de áreas urbanas. O cálculo do IDH leva em consideração três componentes: longevidade, educação e renda. O IDH de Duque de Caxias é menor que a média do Estado do RJ, de 0,832 (PNUD 2010).

Segundo dados do Sinan Net, esta localidade passou pelo surto mais grave de dengue no ano de 2008, com uma incidência de 1.255 casos / 100 mil habitantes. No ano de 2011 ocorreu mais um surto na região, com 871 casos / 100 mil habitantes. No período avaliado nesta Dissertação, no ano de 2010, a incidência da doença foi de 125 casos / 100 mil habitantes.

B) Parnamirim/RN

Este município está localizado na Região Metropolitana de Natal, precisamente a 12 km ao sul da capital do Estado do Rio Grande do Norte. É o terceiro município mais populoso do Estado, com 202.456 mil habitantes. Espalha-se em uma área de 124 km² e apresenta densidade demográfica de 1.632 habitantes/m². O clima é tropical, chuvoso, com temperatura média anual de 21,1°C. O IDH de Parnamirim é de 0,76, valor acima do seu Estado, que é de 0,637 (PNUD 2010). Dados do Sinan Net para esta localidade indicaram poucos casos de dengue nesta região; a maior incidência encontrada ocorreu no ano de 2008, sendo de 364 casos / 100 mil habitantes. No ano de 2010 ocorreram menos casos, 55 casos / 100 mil habitantes.

C) Campo Grande/MS

O município de Campo Grande, capital e maior cidade do Estado de Mato Grosso do Sul, está situado bem ao centro do Estado, na Região Centro-Oeste do país. Possui atualmente uma população de cerca de 790 mil habitantes, ocupa área de 8.093 km² e sua densidade é de 97 habitantes/m². O IDH desta região é 0,814, acima do calculado para o seu Estado, que é de 0,802.

As temperaturas variam bastante ao longo do ano, e o clima apresenta duas estações bem definidas: inverno seco e verão bastante chuvoso. De maio a agosto de 2010 houve um longo período de seca. Em função disto, o número de ovos de *Ae. aegypti* enviados ao laboratório foi insuficiente para a execução de todas as análises, sendo necessário o agrupamento de várias coletas

(ver Tabela 3.2). Durante o ano de 2010 foi relatada a pior epidemia de dengue da região, com uma incidência de 3.490 casos / 100 mil habitantes, o que corresponde a 3,5% da população local. Surtos mais brandos foram verificados em 2007, 2009 e 2011, com a incidência variando entre 190 e 381 casos / 100 mil habitantes.

D) Santarém/PA

Este município se localiza no Estado do Pará, na Região Norte do Brasil. O IBGE estimou, em 2010, a população de Santarém, terceiro município mais populoso do Pará, em 294.580 mil habitantes. Sua área é de 22.886 km² e sua densidade demográfica, de 12,87 habitantes/m². O clima da localidade é quente e úmido, típico de florestas tropicais, e a temperatura média anual varia de 25 a 28°C.

Surtos de dengue nesta região foram relatados nos anos de 2008 e 2011, com incidência de 339 casos / 100 mil habitantes em cada ano. No ano de 2010, período do projeto, a incidência foi de 146 casos / 100 mil habitantes.

1.10.2) Histórico do controle químico para dengue em campo

Histórico da aplicação de inseticidas foi solicitado a cada Secretaria Municipal de Saúde. Todas enviaram relatórios disponibilizando os dados solicitados, indicando os inseticidas usados no período de coleta de ovos. Estas informações, detalhadas na seção Resultados, juntamente com o item relativo a cada inseticida (ver Resultados item 4.1), estão resumidas na tabela abaixo.

Tabela 1.3. Histórico da utilização de inseticidas para controle de dengue nas localidades estudadas.

Localidade	Larvicidas			Adulticida
	Temephos (OP)	Bti ^{***}	Diflubenzuron (CSI)	Deltametrina (PI)
Duque de Caxias/RJ	1967 até 2001	2001 a 2009	Apartir de 2009	Apartir de 2001
Parnamirim/RN	1967 até 2001	2001 a 2009	Apartir de 2009	Apartir de 2001
Campo Grande/MS ^{***}	1967 até 2001	2001 até 2009	Apartir de 2009	Apartir de 2001 até 2009
Santarém/PA	1967 até 2011	X	Apartir de 2011	Apartir de 2001

^{**} Bti: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

^{***} Apenas na localidade de Campo Grande/MS houve substituição recente de PI por OP no controle de adultos: a partir do ano de 2009 iniciou-se o uso do inseticida OP malathion, em substituição a deltametrina.

1.10.3) Histórico do controle químico para leishmaniose e malária em campo

É importante ressaltar que, paralelamente ao controle químico realizado para controle de *Ae. aegypti* em campo, ocorre também a aplicação de inseticidas para o controle de vetores que transmitem leishmaniose e malária. Em relação à ocorrência destas doenças nas localidades estudadas, no Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, estavam disponíveis apenas os dados de malária para Duque de Caxias/RJ, com duas notificações entre 2008 e 2010, e para Campo Grande/MS, com 107 notificações entre 2007 e 2012. Leishmaniose visceral estava registrada nas localidades de Santarém, com 74 notificações entre os anos de 2005 e 2010; em Parnamirim, com quatro casos entre 2007 e 2001; e em Campo Grande, 691 casos entre 2006 e 2011. Em Duque de Caixas não foram registrados casos desta doença. Já para a leishmaniose tegumentar americana, houve 881 notificações entre os anos de 2007 e 2011 em Santarém; em Campo Grande, 134 casos foram registrados entre 2001 e 2011; para as outras duas localidades as informações não estavam disponíveis no sistema (Sinan 2012).

2. OBJETIVOS

2.1.) Objetivo geral

Avaliar a dinâmica da resistência a inseticidas, e os mecanismos envolvidos, em populações urbanas de *Ae. aegypti* de quatro regiões do Brasil.

2.2.) Objetivos específicos

2.2.1. Quantificar, por meio de bioensaios com larvas e adultos, a cada três meses e durante um ano, a resistência das quatro populações ao OP temephos, ao CSI diflubenzuron e ao PI deltametrina, hoje usados no controle em campo no país.

2.2.2. Detectar, nas mesmas amostras, alterações na atividade de enzimas envolvidas com a resistência metabólica (Oxidases de Função Mista, Esterases e Glutathione-S-transferases) e no sítio-alvo de OP, a Acetilcolinesterase.

2.2.3. Avaliar as frequências de mutações no gene do canal de sódio dependente de voltagem (*AaNav*) recentemente detectadas pelo grupo ("kdr") e relacionadas com a resistência a PI em populações brasileiras do vetor da dengue.

2.3) Hipóteses do estudo

Durante muito tempo, temephos foi o único larvicida usado para o controle do vetor da dengue no país, tendo sido empregado desde 1967, por três a quatro décadas, dependendo do município. A resistência a este organofosforado está instalada no país, que começa a substituí-lo por outros compostos, atualmente disponíveis. Hoje, o larvicida de escolha é um inibidor da síntese de quitina, embora vários municípios já tenham também experimentado a bactéria entomopatogênica, *Bti*, anteriormente (Tabela 1.3). Organofosforados também foram usados durante muito tempo pelo PNCD para o controle de adultos no país, e foram substituídos por piretróides desde 2001. Também neste

caso a resistência tem se disseminado rapidamente, e a volta aos organofosforados para o controle de adultos tem sido a única opção possível em algumas localidades. Uma vez que há um custo, em termos de viabilidade, associado à resistência a inseticidas, é esperado que a interrupção no uso de determinado composto resulte em volta aos níveis de susceptibilidade da população do vetor. No entanto, sabe-se que em várias situações a interrupção 'oficial', pelo PNCD, do uso de uma determinada classe de inseticidas não garante sua interrupção 'real' – seja por falta de integração com os programas de controle de outros agravos transmitidos por insetos, seja pelo uso doméstico de inseticidas, intensificado a cada novo surto epidêmico. A avaliação, em quatro localidades do país, pertencentes às quatro regiões com maior incidência de dengue, da dinâmica e dos mecanismos de resistência ao longo de um ano, e a comparação com o histórico local de uso de inseticidas permitirá elucidar estes fatores e contribuir para o manejo racional de inseticidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta de ovos em campo e criação em laboratório de populações de *Aedes aegypti*

As análises foram realizadas com mosquitos oriundos da geração F1 de ovos coletados no campo com o auxílio de ovitrampas com infusão de feno (Braga et al 2000). Os ovos foram coletados em quatro municípios brasileiros, das quatro principais regiões do país com perfil endêmico-epidêmico para dengue (N, NE, SE, CO). Em cada município foram usadas três áreas fixas de aproximadamente 1 km². Das ovitrampas instaladas em cada área foram obtidas 120 paletas mensais, totalizando 360 paletas por município por mês (Figura 3.1). Essas paletas eram enviadas ao Laficave para posterior criação dos espécimes em laboratório.

Para obtenção de geração F1, ovos das populações de campo foram estimulados a eclodir em bacias com dois litros de água desclorada e ração para gatos (Friskies®, Purina, São Paulo/SP) por cinco dias. Grupos de aproximadamente mil larvas foram então transferidos para bacias retangulares (33 X 24 X 8 cm) contendo um litro de água desclorada e alimento. As pupas foram recolhidas diariamente e transferidas para gaiolas cilíndricas de papelão, de 16,5 cm de diâmetro por 17,5 cm de altura, com aproximadamente mil espécimes por gaiola. Os adultos foram mantidos nestas gaiolas a 26±1°C, umidade relativa de 80±10%, e fornecimento contínuo de solução de sacarose a 10% (POP-LAFICAVE-BIO-001). Os adultos passaram por triagens para seleção e contagem de *Ae. aegypti*, a espécie mantida para avaliação.

Três a cinco dias após as triagens, fêmeas de *Ae. aegypti* foram alimentadas em cobaios anestesiados para a obtenção de ovos, de acordo com procedimento aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-Fiocruz, licença nº L-011/09). Após mais três dias, as fêmeas colocaram seus ovos em recipientes com papel-filtro úmido. Depois de quatro dias, os papéis-filtro foram expostos ao ar para secagem e estocados a 26±1°C e umidade relativa de 80±10% (POP-LAFICAVE-BIO-001) por até cinco meses. Em função dos diferentes números de ovos recebidos das coletas mensais, o número de fundadoras de cada colônia da geração F1 variou nas populações de campo e também entre os meses de coleta (ver Tabela 3.1).

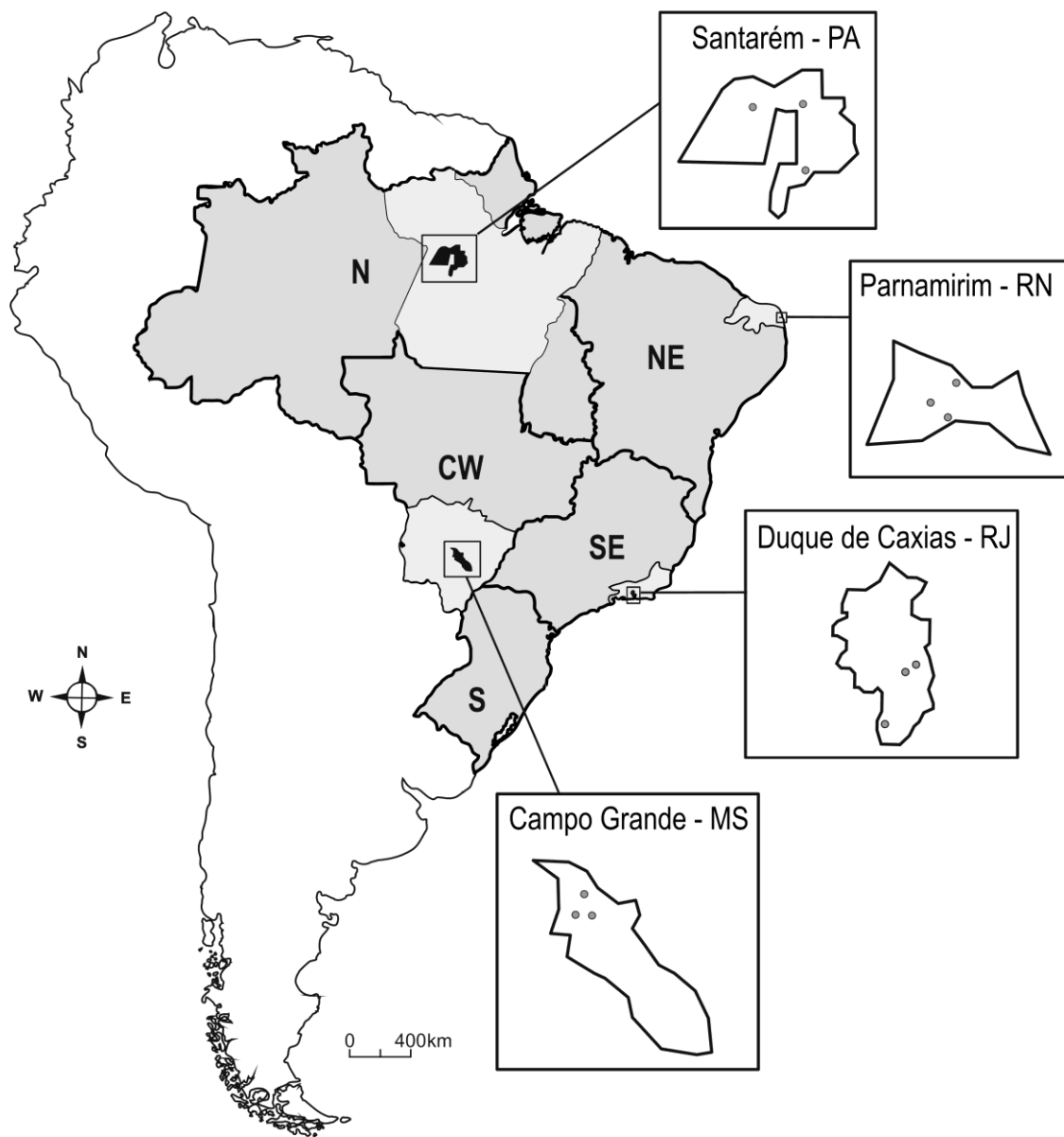


Figura 3.1. Mapa do Brasil com a localização dos municípios onde foram realizadas as coletas de ovos para a avaliação da resistência a inseticidas de populações de campo de *Aedes aegypti*. Em cada município foram instaladas armadilhas (ovitrampas) em três áreas de 1 km² (indicadas por círculos de cor cinza), mensalmente, ao longo de um ano.

Tabela 3.1. Quantitativo de machos e fêmeas adultos de *Aedes aegypti* obtidos da eclosão dos ovos de campo para obtenção de ovos da geração F1 dos meses avaliados. Estes valores também estão informados para *Aedes albopictus*.

Região	Município	total adultos n°	<i>Aedes aegypti</i>				<i>Aedes albopictus</i>			
			fêmeas n°	machos n°	machos / fêmeas	% <i>A. aeg</i> / adultos	fêmeas n°	machos n°	machos / fêmeas	% <i>A. albop</i> / adultos
Duque de Caxias/RJ	dez/09	2.932	1.230	1.461	1,2	91,8	118	123	1,0	8,2
	fev/10	2.831	1.180	1.651	1,4	X			X	
	mai/10	9.178	4.740	3.677	0,8	91,7	516	245	0,5	8,3
	ago/10	2.889	1.472	1.359	0,9	98,0	23	35	1,5	2,0
	nov/10	X			X				X	
Parnamirim/RN	fev/10	1.541	829	680	0,8	97,9	17	15	0,9	2,1
	mai/10	2.228	1.386	826	0,6	99,2	12	4	0,3	0,8
	ago/10	1.987	1.115	816	0,7	97,1	44	12	0,3	2,9
	nov/10	1.510	764	746	1,0	100,0	0	0	0	0
Campo Grande/MS	fev/10	1.399	735	649	0,9	98,9	5	10	2	1,1
	jun/10	933	518	415	0,8	100,0	0	0	0,0	0,0
	out/10	1.511	896	614	0,7	99,9	0	1	1	0,1
	jan/11	1.371	670	696	1,0	99,6	4	1	0,25	0,4
Santarém/PA	abr/10	7.486	3.628	3.858	1,1	100,0	0	0	0,0	0,0
	jul/10	3.708	1.824	1.884	1,0	100,0	0	0	0,0	0,0
	out/10	1.911	1.078	833	0,8	100,0	0	0	0,0	0,0
	jan/11	5.058	2.611	2.447	0,9	100,0	0	0	0,0	0,0

3.2. Insetos utilizados nas análises

Foram utilizados espécimes provenientes de ovos da geração F1, com exceção das análises moleculares, na maior parte das vezes feitas com a geração Parental. Os ovos de *Ae. aegypti* eram induzidos a eclodir por uma hora em um pequeno volume de “água de criação” (água de bacias com larvas já crescidas), em copinhos de café, para obtenção de larvas sincronizadas. Depois deste período as larvas eram transferidas, em grupos de aproximadamente mil, para bacias plásticas contendo água desclorada; um grama de ração triturada era adicionado a cada 3 dias. As larvas eram mantidas em estufas tipo BOD com temperatura controlada ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$) até atingirem o estágio de desenvolvimento adequado para cada ensaio. No caso de ensaios com adultos, as pupas eram transferidas para gaiolas e mantidas até a emergência dos adultos em condições previamente padronizadas pelo Laficave (POP-LAFICAVE-BIO-002). Vale ressaltar que, com exceção dos ensaios moleculares (ver item 4.2.1), todos os outros foram efetuados a cada três meses.

Em paralelo ao estudo, espécimes da cepa Rockefeller foram usados para calibração dos testes e como controle interno de qualidade de todos os ensaios. A linhagem Rockefeller foi provavelmente estabelecida em 1881 no Instituto Carlos Finlay (Havana, Cuba) (Kuno 2010) e desde então é utilizada por laboratórios de todo o mundo como cepa de referência para susceptibilidade a

inseticidas, já que foi retirada do campo e estabelecida em laboratório antes da utilização destes produtos químicos (Hartberg e Craig 1970).

3.3. Razão de Resistência (RR)

A quantificação da resistência de *Ae. aegypti* aos três inseticidas, temephos, diflubenzuron e deltametrina, foi efetuada por meio de bioensaios quantitativos. A princípio foram realizados experimentos com a cepa referência Rockefeller e as doses efetivas que eliminam 50 ou 95% dos indivíduos (DE₅₀, DE₉₅) foram obtidas (Tabela 3.2). As doses efetivas também foram calculadas para as populações, depois dos ensaios. Para obtenção das Razões de Resistência (no caso, RR₉₅) foi feita a divisão da DE₉₅ de cada população avaliada pela DE₉₅ da cepa Rockefeller. As RR obtidas foram utilizadas ao longo de todo estudo, como parâmetro de comparação dos bioensaios. A RR₉₅ foi o principal parâmetro utilizado por ser a mais utilizada na rotina do laboratório e da Rede MoReNAa.

Tabela 3.2. Doses efetivas dos inseticidas utilizados nesta dissertação, calculadas para a cepa referência Rockefeller no início do estudo.

Inseticida	DE₅₀	DE₉₅
Temephos	0,003 mg/L	0,005 mg/L
Diflubenzuron	0,089 ug/L	2,30 ug/L
Deltametrina	0,703 mg/m ²	1,455 mg/m ²

Nota: as DEs para temephos e deltametrina equivalem a concentrações letais (CL); para diflubenzuron a DE representa a inibição da emergência de adultos.

3.4. Bioensaios com larvas

Resistência de larvas ao organofosforado temephos e ao inibidor de síntese de quitina diflubenzuron, ambos empregados atualmente no controle de populações brasileiras de *Ae. aegypti*, foi quantificada por meio de bioensaios do tipo dose-resposta. Estes consistem em exposição de larvas de terceiro instar (L3), criadas sob as condições padrão do Laficave (ver item 3.2), a um espectro de concentrações dos inseticidas avaliados (de 8 a 10 concentrações por teste), com a mortalidade

variando, idealmente, de 10 a 95%. Para cada concentração foram expostos 40 ou 80 espécimes, respectivamente para temephos ou diflubenzuron, a cada teste; cada teste foi repetido no mínimo três vezes, em dias diferentes. Com os resultados dos bioensaios, as doses efetivas foram determinadas: as concentrações letais (CL) para temephos (POP- LAFICAVE-BIO-004) e, no caso do diflubenzuron, as doses que inibem a emergência dos adultos (IE) (POP-LAFICAVE-BIO-008). Para tanto, foi feita análise probit com auxílio do software Polo-PC via (Raymond 1985).

3.4.1) Bioensaios com temephos

Ensaio com temephos (PESTANAL[®], Sigma – Aldrich) foram realizados de acordo com o protocolo da Organização Mundial de Saúde (OMS 1981), detalhado por Braga e colaboradores (2004). As concentrações finais utilizadas nos testes variaram de 0,006 a 0,072 mg/L dependendo da sensibilidade de cada população ao inseticida. Em cada experimento e para cada concentração foram expostas 80 larvas, divididas em 4 réplicas de 20 larvas, em copos plásticos contendo 100 mL de solução. No caso do grupo controle, as larvas foram expostas somente à água filtrada e ao etanol (solvente utilizado para o temephos). A contagem de mortalidade foi realizada 24 horas após a exposição ao inseticida.

3.4.2) Bioensaios com diflubenzuron

Os ensaios com diflubenzuron (PESTANAL[®], Sigma – Aldrich) foram efetuados de acordo com a metodologia definida pelo Laficave (Martins et al 2008, Belinato et al 2009). Para cada concentração foram expostas 40 larvas, em 4 réplicas de 10 larvas, em copos plásticos contendo 150 mL de solução. As doses usadas variaram de 1 a 5,5 ug/L e o grupo controle foi exposto somente à acetona (solvente utilizado para o diflubenzuron). Diflubenzuron é um IGR, apresenta ação lenta sobre a biologia dos mosquitos, e requer avaliação do ensaio até a emergência dos adultos. Em função disto foi adicionado, no início dos experimentos, 1 mL de solução a 1,5% (p/v) de comida em cada copo. A contagem de indivíduos mortos foi realizada a intervalos de dois dias até a emergência total do grupo controle. Durante as leituras foi registrado o estágio em que ocorreu a mortalidade de cada indivíduo.

3.5. Bioensaios com adultos

Quantificação da resistência de adultos ao piretróide deltametrina, atualmente usado no controle de *Ae. aegypti* em praticamente todo o país, foi efetuada com papéis impregnados, com metodologia recentemente adaptada pelo Laficave a partir de ensaio original, qualitativo, recomendado pela OMS (OMS 1998; Fontoura e Lima, comunicação pessoal). Este ensaio é hoje empregado na rotina da Rede MoReNAa.

Nos ensaios foram utilizadas fêmeas não alimentadas de até três dias de idade adulta, criadas sob as condições padrão do laboratório (ver item 3.2). Papéis-filtro 1 MM da Whatman, de 14 X 11,5 cm, foram impregnados com o inseticida deltametrina PESTANAL® (Sigma – Aldrich), utilizando como solvente silicone Dow Corning 556 (OMS 1998). Após secagem, os papéis eram colocados em tubos de acrílico (“kits OMS”) para serem usados nos experimentos (Figura 3.2). Foram expostos 45 a 60 indivíduos por concentração, em um total de três tubos de acrílico. Foram usadas até 10 concentrações por ensaio, variando de 2,1 a 109,6 mg/m² dependendo da população testada. Após uma hora de exposição no compartimento com inseticida, foram quantificados os indivíduos “caídos” para verificação do efeito *knockdown resistance* (*kdr*). Os mosquitos foram então transferidos para o compartimento de recuperação de cada tubo, contendo apenas papel filtro, sem inseticida, onde permaneceram por 24 horas, quando foi feita nova leitura de mortalidade (POP-LAFICAVE-BIO-006). Os papéis neste compartimento foram impregnados apenas com o silicone. Estes bioensaios também foram usados para determinar as doses efetivas, com auxílio do software Polo – PC, via análise probit (Raymond 1985).

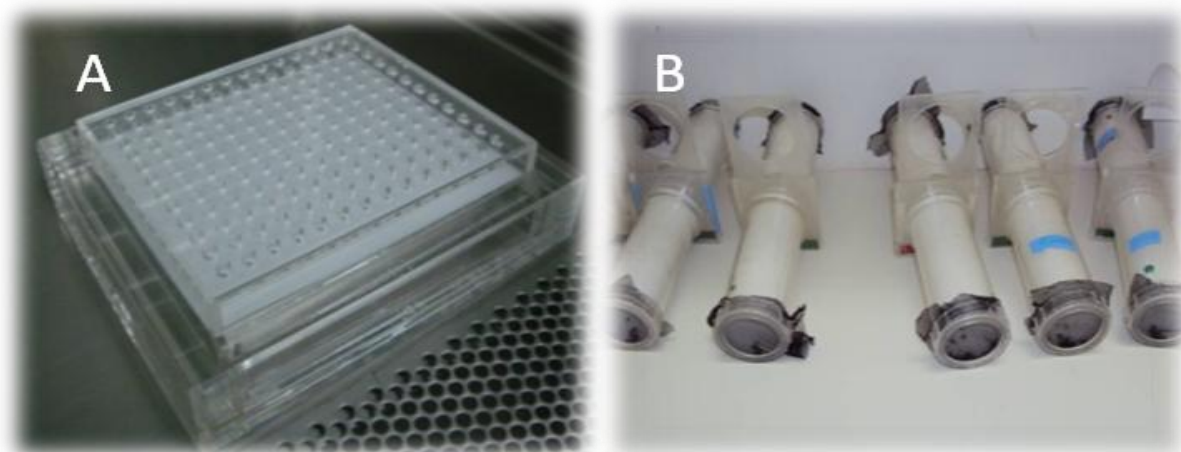


Figura 3.2. Equipamento usado nos ensaios de avaliação da resistência de *Aedes aegypti* adultos a inseticidas com papéis impregnados. A) Aparato para a impregnação de papel com inseticidas; B) tubos acrílicos usados nos ensaios. Cada tubo possui dois compartimentos, um dos quais recebe papel impregnado com inseticida (fase de exposição do bioensaio) e o outro, papel sem inseticida (para a fase de recuperação dos espécimes).

3.6. Análises enzimáticas

Quantificação da atividade de enzimas potencialmente envolvidas com a resistência a inseticidas foi feita com formas larvares e adultas de mosquitos das quatro populações testadas no projeto, de modo a comparar estes perfis com os bioensaios. Para tanto, larvas L3 e fêmeas adultas não alimentadas de um dia de idade foram congeladas a -80°C , e analisadas de acordo com protocolos já padronizados pelo laboratório (Valle et al 2006, Montella et al 2007, Viana-Medeiros 2011). Foram usados, em média, 80 a 120 espécimes para cada ponto de avaliação.

Em cada ensaio bioquímico de adultos são utilizadas 45 fêmeas, em duplicata. Destas, cinco pertencem à cepa Rockefeller, usadas como controle interno dos ensaios e 40 são das populações de campo a serem testadas. Cada ensaio foi realizado sempre com duas populações, com 20 espécimes de cada população. As mesmas duplas eram mantidas sempre ao longo dos ensaios: Duque de Caxias e Parnamirim; Campo Grande e Santarém. Inicialmente, cada indivíduo é triturado separadamente em um tubo Eppendorf contendo 30 μl de água deionizada (Milli-Q); depois da trituração o volume é elevado para 300 μl . Deste homogenato são retiradas as alíquotas para a avaliação de todas as enzimas. É importante mencionar que no teste de adultos (mas não no teste de larvas) a quantificação de cada enzima é sempre realizada em duplicata. As reações são feitas em microplacas modelo VersaMax e/ou Spectramax (molecular Devices). O homogenato de cada fêmea é submetido à quantificação simultânea da atividade das enzimas: Acetilcolinesterase (AChE), Glutathione-S-transferase (GSTs), Esterases (ESTs), Oxidases de Função Mista (MFOs). Com exceção de Acetilcolinesterase (AChE), alvo dos OPs e CAs, todas estas enzimas estão relacionadas com a detoxificação de inseticidas.

No ensaio de AChE, o protocolo original, que procuramos seguir, avalia a sensibilidade da enzima aos inseticidas OP e CA, que sobre ela atuam. Para isto, utiliza-se o substrato Acetilcolina para a quantificação. São feitas duas placas, uma com atividade total da AChE (AChE) e a outra com a atividade da enzima na presença do inibidor, o CA propoxur (AChI). Assim, o resultado é gerado pela diferença entre as duas placas, e pode ser expresso em percentual de inibição da atividade ou em percentual de atividade remanescente. Na prática, não há registro, em *Ae. aegypti*, de inibição de AChE com CA. Em função disto, os resultados "AChI", que não mostram alteração, não serão apresentados. Por outro lado, foram levados em consideração os resultados obtidos na placa onde foi feita a quantificação da atividade total da enzima ("AChE").

A quantificação da atividade das ESTs é feita com três substratos diferentes: acetatos de alfa-naftil (ALFA), beta-naftil (BETA) e para-nitrofenil (PNPA). Na avaliação da enzima GST o substrato utilizado é a L-glutathione reduzida. Já nos ensaios de MFO não se avalia diretamente a

atividade desta enzima; quantifica-se o grupamento heme que, em insetos não alimentados com sangue, está, em sua maioria, associado ao citocromo P450. Nestes ensaios o total de proteínas (PTN) de cada indivíduo também é dosado, para normalização das atividades enzimáticas. Os valores de atividade enzimática das populações em todos os casos são comparados com a cepa Rockefeller.

Os ensaios com larvas apresentam algumas peculiaridades que os diferem daqueles com adultos: como as larvas são pequenas, não há quantidade suficiente de homogenato para fazer testes em duplicata de cada indivíduo. Nestes ensaios, em cada placa são avaliados 90 espécimes simultaneamente, sem réplicas: cinco larvas Rockefeller e 85 espécimes das populações sob teste. Também neste caso, à semelhança dos ensaios com adultos, realizamos os ensaios com duplas de populações. Depois da trituração das larvas, em 30 ul, o volume total do homogenato é elevado para 50 ul; primeiramente retira-se as alíquotas para os ensaios de AChE, MFO, e PNPA; o volume restante de homogenato é então duplicado e são retiradas alíquotas para dosagem de GST e para quantificação de PTN; o volume restante é novamente duplicado e são retiradas alíquotas para dosagem de atividade de a-EST e b-EST. Logo, o volume do homogenato de larvas varia, sendo equivalente a 50, 100 ou 200 ul por indivíduo. Além disso, o ensaio de AChE tem uma duração maior: em adultos é de uma hora, e nas larvas, de três horas.

Antes de todos os ensaios, com larvas ou adultos, foram feitos no mínimo três experimentos com a cepa Rockefeller, em dias diferentes. Os resultados destes experimentos “piloto” foram nomeados “Rock total”. Nos ensaios com as populações de campo, os resultados obtidos com os cinco espécimes da cepa Rockefeller, incluídos como controle interno, foram nomeados “Rock placas”. A verificação inicial dos experimentos foi realizada por comparação visual dos resultados obtidos para cada ensaio de cada trimestre e de cada população, entre si, com os cinco indivíduos da cepa Rockefeller incluídos em cada ensaio (“Rock placas”) e entre os trimestres para cada população. Em qualquer situação, ensaios com valores muito discrepantes eram inteiramente descartados. Esses resultados foram então utilizados para as análises posteriores, por meio do cálculo do percentil 99 (p99) para “Rock total” e “Rock placas”, separadamente, e suas comparações com os valores obtidos para os indivíduos das populações de campo: se até 15% de indivíduos apresentassem atividade acima do p99 de Rockefeller, o perfil daquela atividade enzimática da população era considerado normal; a atividade era considerada alterada se este percentual variasse entre 15 e 50%; valores acima de 50% eram considerados muito alterados. Esta comparação foi utilizada em todas nossas tabelas (Valle et al 2006, Montella et al 2007), com exceção da Tabela 4.6, onde o perfil enzimático das larvas é comparado com o p99 do último momento avaliado de cada população de campo.

3.7. Análise de mutação kdr

As populações avaliadas foram submetidas mensalmente a genotipagem, pela técnica de PCR alelo-específica, para a detecção de alteração em posições específicas do gene que codifica o canal de sódio regulado por voltagem de *Ae. aegypti* (*AaNav*), alvo dos inseticidas da classe dos piretróides. A mutação inicialmente avaliada se localiza na posição 1016, resulta em substituição de um aminoácido valina (Val) por uma isoleucina (Ile) (mutação Val1016Ile) e está relacionada à resistência a piretróides. Atualmente estão sendo ainda investigadas alterações nas posições 1011, substituição de uma isoleucina para uma metionina (Ile1011Met) e 1534, substituição de uma fenilalanina por uma cisteína (Phe1534Cys).

A genotipagem foi feita com DNA genômico extraído de 30 espécimes individuais de cada população. Caso a mutação no sítio 1016 não fosse detectada, 30 indivíduos adicionais eram avaliados, totalizando 60 indivíduos. Para isto, foram usados mosquitos adultos (machos) ou larvas (L2), preferencialmente da geração Parental. Homogenatos individuais foram feitos com tampão de extração de acordo com Jowett (1986) com pequenas modificações (10 mM Tris-base pH 8,0, EDTA 2 mM e 0,2% Triton-X-100), e a PCR foi realizada com o kit GoTaq (Promega) contendo 0,5 uL do DNA genômico. Para o sítio 1016 foram utilizados 0,3 uL de *primer reverse* e 0,15 uL de cada um dos *primers forward*, específicos para os aminoácidos Val ou Ile, como descrito por Saavedra-Rodriguez et al (2007) e Martins et al (2009a) e apresentado na Figura 3.3. O volume final de reação foi 12,5 uL. As etapas de desnaturação, anelamento e extensão foram efetuadas nas respectivas condições: 94°C/30", 62°C/1' e 72°C/45", em 30 ciclos. Para o sítio 1011, usamos apenas um *primer forward* e dois *primers reverse*, específicos para os aminoácidos Ile, selvagem, ou Met, mutante, nas mesmas concentrações utilizadas para a posição 1016. Neste caso, as condições da reação foram 94°C/30", 60°C/1' e 72°C/45", também em 30 ciclos. Finalmente, para o sítio 1534, usou-se também os mesmos reagentes descritos acima, porém os *primers* foram utilizados em concentrações maiores, 0,8 uL do *primer reverse* e 0,4 uL de cada um dos dois *primers forward*, específicos para os aminoácidos Phe ou Cys. As etapas de desnaturação, anelamento e extensão foram efetuadas nas respectivas condições: 94°C/30", 56°C/1' e 72°C/45" (Figura 3.3).

Para as três posições (1011, 1016 e 1534), cada *primer* específico tem extensão diferente de suas caudas GC. Com isto, no produto da PCR os fragmentos gerados diferem em 20 pb, o que permite visualizar o genótipo individual em eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Nas reações aqui descritas, para a posição 1016 o *primer* 'selvagem' Val, e para as posições 1011 e 1534, os *primers* mutantes Met e Cys, respectivamente, têm as maiores caudas GC.



Figura 3.3. PCR alelo-específica com os *primers* utilizados para cada mutação analisada, Val1016Ile, Ile1011Met e Ph31534Cys. Os *primers* específicos têm a mesma orientação, mas tamanhos que diferem pela cauda adicionada permitindo a diferenciação por peso molecular em gel acrilamida 10%. O painel superior da figura foi extraído de Martins e Valle 2012.

3.9. Período de realização das atividades

A Tabela 3.2 detalha os meses em que as atividades foram realizadas no projeto para cada localidade. No caso de Campo Grande/MS, em função do número reduzido de ovos recebidos do campo, foi necessário agrupar alguns meses para realizar todos os experimentos, como indicado. Ainda assim, no segundo momento de avaliação (meses de maio a agosto) não foi possível realizar os experimentos com o inseticida diflubenzuron.

Em alguns casos, devido a problemas técnicos, o intervalo inicialmente planejado para os ensaios com a geração F1, a cada três meses, precisou ser modificado. Nestas ocasiões foram avaliados meses imediatamente anteriores ou posteriores aos meses alvo.

Tabela 3.2. Coletas utilizadas nos diferentes ensaios, por população avaliada.

População	Atividades	2010												2011				
		Dez	Jan	Fev	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Set	Out	Nov	Dez	Jan			
Duque de Caxias/RJ	Bioens. DFB	-		1			3											
	Bioens. TEM	3		3			4											
	Bioens. DELT	5		4			3											
	Bioquímicos Kdr 1016	-	X	X	X		X	X										
	Kdr 1011	X		X			X											
	Kdr 1534																	
Parnamirim/RN	Bioens. DFB			2			3											
	Bioens. TEM			3			3											
	Bioens. DELT			2			3											
	Bioquímicos Kdr 1016		X	X	X		X	X										
	Kdr 1011			X			X											
	Kdr 1534																	
Campo Grande/MS	Bioens. DFB			2														
	Bioens. TEM			2														
	Bioens. DELT			2														
	Bioquímicos Kdr 1016		X	X	X		X	X										
	Kdr 1011			X			X											
	Kdr 1534																	
Santarém/PA	Bioens. DFB																	
	Bioens. TEM																	
	Bioens. DELT																	
	Bioquímicos Kdr 1016			X			X	X										
	Kdr 1011			X			X											
	Kdr 1534																	

Nota: no caso dos bioensaios, o número de testes realizado com cada inseticida está indicado, para cada população do vetor.

4. RESULTADOS

4.1. Bioensaios

Esta dissertação objetivou principalmente acompanhar o *status* da resistência de populações de *Aedes aegypti* aos três principais inseticidas utilizados no Brasil e sua variação sazonal, ao longo de um ano. Para isto, a primeira atividade efetuada foi a quantificação da resistência das populações de campo mediante bioensaios tipo dose-resposta. O período total do estudo foi de novembro de 2009 a janeiro de 2011, no qual foram realizados ensaios biológicos, na maioria das vezes trimestrais, para os larvicidas temephos e diflubenzuron e para o adulticida deltametrina. Na Tabela 3.2 podemos observar o cronograma de avaliação para cada inseticida por localidade. Em alguns casos foi necessário fazer ajustes: para uma das populações, de Campo Grande, foi necessário fazer “pool” de dois ou mais meses, em função da quantidade insuficiente de material, principalmente no período do inverno; os resultados obtidos em novembro de 2009 para Duque de Caxias e em janeiro de 2010 para Parnamirim foram repetidos nos meses seguintes - neste caso por segurança, uma vez que foram considerados como um treinamento inicial da metodologia. Nesta seção, os resultados serão expostos por inseticida analisado. Para cada item, há tabelas contendo os valores das razões de resistência (RRs), com as concentrações letais e com os *slopes* de cada momento avaliado. Diversos gráficos também são apresentados, notadamente as curvas de regressão linear, elaboradas para todos os compostos investigados. Este tipo de representação permite observar o grau de heterogeneidade das populações em relação ao caráter investigado: quanto maior a inclinação das retas em relação ao eixo-x, maior o valor do *slope* (medida que relaciona $\Delta y/\Delta x$) e mais homogênea a população. Em relação à característica investigada, a resistência a inseticidas, quanto maior a inclinação da reta, menor a faixa de doses necessária para atingir todos os indivíduos da população. Foram também incluídos gráficos que apresentam as RR com os intervalos de confiança (IC), estes calculados pela divisão da maior e da menor concentração letal (CL) de cada população pela CL média de Rockefeller. Ao final desta dissertação, o Anexo 1 apresenta as RR_{95} com seus IC para os inseticidas avaliados para cada população nos diferentes meses estudados.

4.1.1) Bioensaios com larvicidas

Para facilitar a análise comparativa, os resultados dos bioensaios com cada larvicida serão apresentados simultaneamente para as quatro populações avaliadas.

4.1.1.1. Bioensaios com temephos

A Tabela 4.1 e a Figura 4.1 apresentam os resultados obtidos com as curvas dose-resposta para temephos em todas as localidades e para cada período avaliado. As concentrações letais foram comparadas com os valores obtidos para a cepa Rockefeller, referência de susceptibilidade, para obtenção das razões de resistência (RR). Todas as RR encontradas para temephos estão acima de 3,0, indicando alteração de susceptibilidade ao temephos nas localidades, de acordo com critérios adotados no país (MS/SVS 2006). De maneira geral, no entanto, as razões de resistência parecem decair ao longo do tempo, como ilustra a Figura 4.2, que representa as RR_{95} das populações, ao longo de todo o período avaliado. Em paralelo verificou-se tendência ao decaimento também das inclinações das retas obtidas (*slopes*) ao longo dos meses avaliados (Tabela 4.2, Figura 4.1), o que indica recuperação da heterogeneidade das populações, em relação ao *status* de susceptibilidade a temephos durante o período do estudo.

Nossos resultados sugerem que em duas populações (Duque de Caxias/RJ e Campo Grande/MS) houve uma queda mais acentuada da RR_{95} ao longo do tempo. A população de Duque de Caxias, no início dos ensaios, em novembro de 2009, apresentou RR_{95} de 16,3 e em nossa última análise, um ano depois, esta razão caiu para 9,8. Na população de Campo Grande a RR_{95} diminuiu de 7,9, em fevereiro de 2010, para 4,8, em janeiro de 2011. Ou seja, nos dois casos houve uma queda de aproximadamente 40% no período (ver Anexo 1). Para as outras duas populações (Santarém/PA e Parnamirim/RN), essa queda se apresentou bem mais suave, em torno de 15% (ver Anexo 1): em Parnamirim a RR_{95} passou de 7,4 para 6,3 em um ano; e em Santarém diminuiu de 10,2 para 9,0 no mesmo período. Apesar do relato de manutenção do uso de temephos em campo pela SMS desta última localidade, dados anteriores da Rede MoReNAa haviam detectado RR_{95} de 20,9 no ano de 2008 em Santarém (MS/SVS 2009). Isso representa uma queda de mais de 50% nos níveis de resistência ao temephos em dois anos.

Em resumo, embora os resultados dos bioensaios tenham apresentado tendência ao declínio da resistência ao temephos, esta queda apresentou ritmos diferentes entre as localidades. Além disto, em alguns momentos não foi observado decaimento constante ao longo dos trimestres avaliados. Apesar de o *status* de resistência ao organofosforado estar regredindo, nenhuma das

populações apresentou RR_{95} abaixo de 3,0. De acordo com o Ministério da Saúde (2006), este é o ponto de corte acima do qual se recomenda interrupção do uso de temephos, e utilização de inseticidas com modo de ação distinto.

Tabela 4.1. Concentrações letais (CL) para temephos das populações de *Aedes aegypti* avaliadas, de quatro localidades do Brasil. Também estão indicadas as razões de resistência (RR), obtidas após comparação com as concentrações letais obtidas para a cepa Rockefeller, e as inclinações (*slope*) obtidas para cada período avaliado. Os intervalos de confiança das RR_{95} estão disponíveis no Anexo 1, ao final desta dissertação.

População	CL ₅₀ (mg/L)	CL ₉₅ (mg/L)	RR ₅₀	RR ₉₅	"slope"
Rockefeller	0,0028	0,0053	1,0	1,0	6,2
Duque de Caxias/RJ					
Nov/09	0,0245	0,0865	8,7	16,3	3,0
Dez/09	0,0293	0,0781	10,5	14,7	3,8
Fev/10	0,0245	0,0709	8,7	13,3	3,6
Mai/10	0,0236	0,0569	8,4	10,7	4,3
Ago/10	0,0176	0,0580	6,3	10,9	3,2
Nov/10	0,0136	0,0521	4,9	9,8	2,8
Parnamirim/PA					
Jan/10	0,0135	0,0393	4,8	7,4	3,5
Fev/10	0,0159	0,0379	5,7	7,1	4,3
Mai/10	0,0143	0,0342	5,1	6,4	4,3
Ago/10	0,0114	0,0334	4,1	6,3	3,5
Dez/10	0,0113	0,0336	3,9	6,3	3,5
Campo Grande/MS					
Fev/10	0,0183	0,0420	6,5	7,9	4,5
Jun/10	0,0103	0,0308	3,7	5,8	3,4
Out/10	0,0104	0,0245	3,7	4,6	4,4
Jan/11	0,0093	0,0243	3,3	4,6	3,9
Santarém/PA					
Abril/10	0,0200	0,0546	7,1	10,3	5,3
Jul/10	0,0228	0,0548	7,9	10,3	4,3
Out/10	0,0182	0,0457	6,3	8,6	4,1
Jan/11	0,0190	0,0477	6,6	9,0	4,1

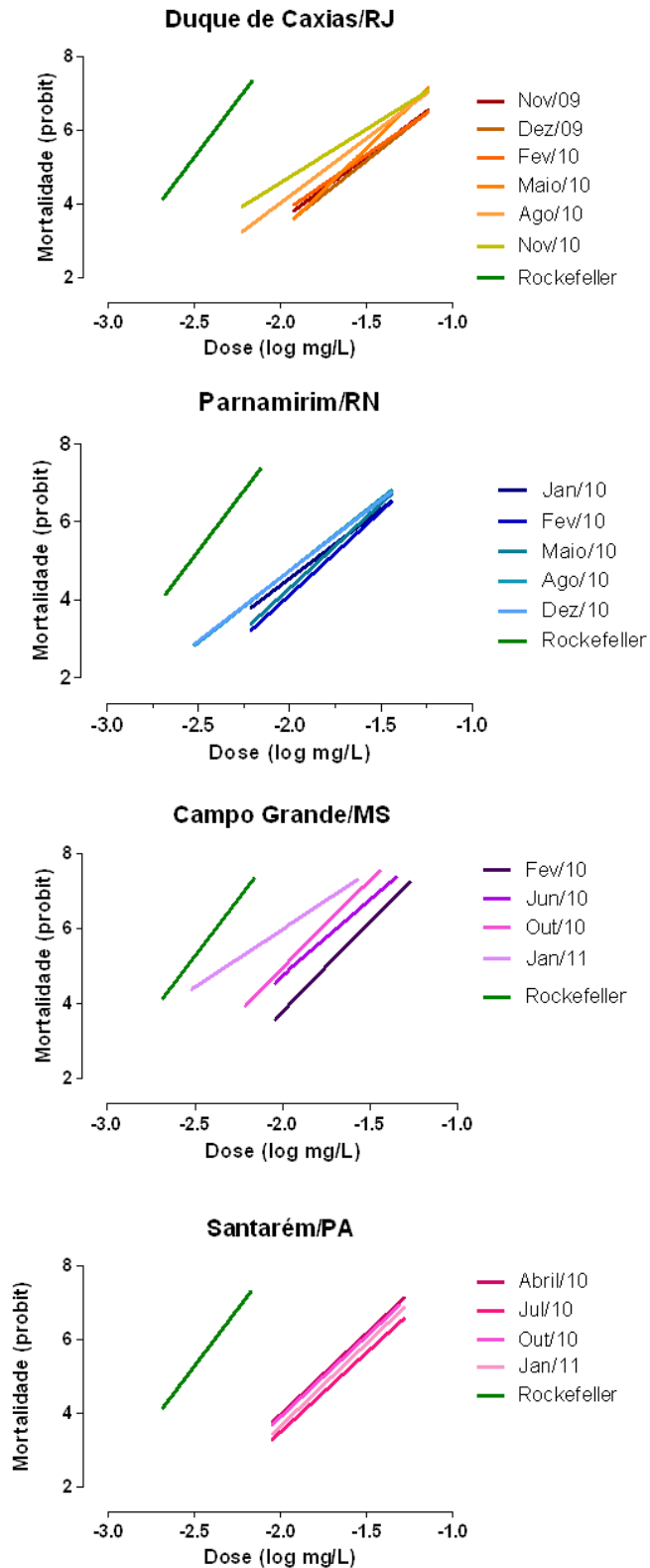


Figura 4.1. Curvas de regressão linear das quatro populações de *Aedes aegypti* avaliadas após 24 horas de exposição ao organofosforado temephos, em bioensaio quantitativo. O eixo y apresenta a mortalidade em escala probit. A cepa Rockefeller, utilizada como referência de susceptibilidade, está representada em todos os gráficos (linha verde).

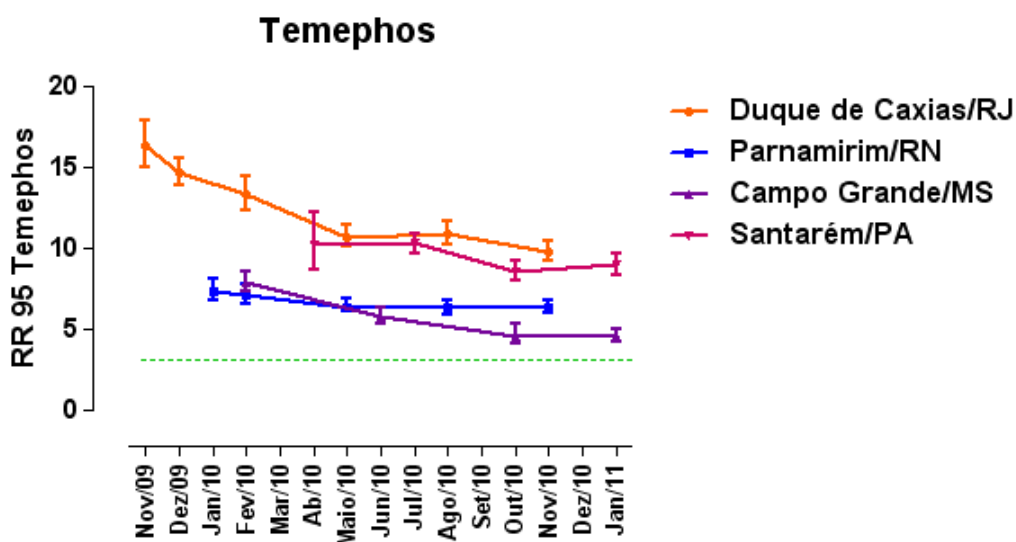


Figura 4.2. Avaliação temporal da resistência ao temephos das quatro populações de *Aedes aegypti* estudadas. A linha pontilhada verde corresponde à $RR_{95} = 3,0$, e indica o ponto de corte acima do qual o MS recomenda substituição de temephos em campo (MS/SVS 2006). Cada ponto representa a RR_{95} e o intervalo de confiança (IC) correspondente.

4.1.1.2. Bioensaios com diflubenzuron

A exemplo dos ensaios acima, foram realizados testes dose-resposta para avaliação da variação do *status* de susceptibilidade de todas as populações a diflubenzuron, inibidor de síntese de quitina recentemente incorporado no controle do vetor da dengue no país (Tabela 4.2, Figura 4.3). Neste caso, quantificou-se a inibição da emergência dos adultos (IE). Observamos sutis variações nas doses efetivas ao longo das análises, sem qualquer tendência ou alteração importante aparente. Nas populações de Duque de Caxias/RJ e Santarém/PA houve, ao longo do período, uma ligeira queda nas RR, em relação ao valor inicial. Em Parnamirim/RN, ao contrário, as maiores RR foram obtidas na última avaliação. Já em Campo Grande/MS não houve qualquer tendência aparente. Estas pequenas variações são melhor observadas na Figura 4.4, que mostra as RR obtidas para todas as populações, simultaneamente, no período avaliado. No entanto, é importante observar que para este IGR todas as RR_{95} sempre se mantiveram abaixo de 3,0 quando comparadas com a cepa Rockefeller. Além dos baixos valores de alteração da susceptibilidade a diflubenzuron (RR), as inclinações das retas (*slopes*) obtidas com as populações de campo foram sempre maiores do que para Rockefeller (Tabela 4.2 e Figura 4.3), sugerindo maior homogeneidade natural das populações avaliadas em relação à susceptibilidade a este IGR quando comparadas com a cepa referência.

Os bioensaios dose-resposta com diflubenzuron permitiram determinar ainda a mortalidade por estágio, para a cepa Rockefeller e para as populações em cada momento avaliado. Os dados estão apresentados na Figura 4.5, que considera a taxa de mortalidade em cada concentração avaliada, e na Figura 4.6, que leva em conta apenas os indivíduos mortos, normalizando o tamanho das barras (para 100%). Em todos os casos, a taxa de mortalidade no estágio de larva se eleva com o aumento das doses, ou seja, quanto maior a dose, mais precoce é a mortalidade. A mortalidade de pupas ocorre em todas as concentrações, e a mortalidade de adultos é menos frequente, sendo detectada, na maioria das vezes, nas doses mais baixas. Podemos verificar, por exemplo, que para a cepa referência a IE_{50} é de aproximadamente 0,8 ug/L, muito abaixo dos valores observados para as populações de campo, entre 1,5 e 3,0 ug/L. Nestas concentrações a mortalidade em Rockefeller já é superior a 80%. Além disso, a proporção de adultos Rockefeller mortos é de 10% a 0,8 ug/L, e muito menor entre 1,5 e 3,0 ug/L, em torno de 1,5-8,0%. Outra observação relevante é que a emergência de adultos ocorre em uma grande faixa de concentrações em Rockefeller, fato não constatado nas populações estudadas de maneira geral, refletindo a sua maior heterogeneidade na resposta a diflubenzuron em relação às populações de campo (Figuras 4.5 e 4.6). Comparação dos vários gráficos gerados para a população de Duque de Caxias (Figura 4.6) sugere que, de maneira geral, há tendência à mortalidade mais precoce no decorrer do período de avaliação. Esta tendência, que também se observa para os gráficos da população de Santarém, pode refletir a ligeira queda das RR observada para estas populações (Tabela 4.3 e Figura 4.4). No entanto, estas variações são apenas sutis, e necessitariam de mais pontos de avaliação para confirmação de qualquer tendência.

Tabela 4.2. Doses efetivas (IE) para diflubenzuron das populações de *Aedes aegypti* avaliadas, de quatro localidades do Brasil. Também estão indicadas as razões de resistência (RR), obtidas após comparação com as IE da cepa Rockefeller, e as inclinações (*slope*) obtidas para cada período avaliado. Os intervalos de confiança das RR₉₅ estão disponíveis no Anexo 1, ao final desta dissertação.

População	IE ₅₀ (ug/L)	IE ₉₅ (ug/L)	RR ₅₀	RR ₉₅	"slope"
Rockefeller	0,89	2,30	1,0	1,0	3,9
Duque de Caxias/RJ					
Fev/10	2,81	5,21	3,2	2,3	6,3
Mai/10	2,19	3,92	2,4	1,7	6,5
Ago/10	1,98	3,77	2,2	1,7	5,8
Nov/10	2,31	3,67	2,6	1,6	8,2
Parnamirim/PA					
Fev/10	1,67	3,07	2,4	1,3	6,2
Mai/10	1,80	3,17	2,0	1,4	6,7
Ago/10	1,57	2,52	1,8	1,1	8,0
Dez/10	2,57	4,19	2,9	1,8	7,7
Campo Grande/MS					
Fev/10	2,44	4,69	2,7	2,0	5,8
Out/10	1,80	3,13	2,0	1,4	6,8
Jan/11	2,56	4,97	2,9	2,2	5,7
Santarém/PA					
Abril/10	2,55	4,66	2,9	2,0	6,3
Jul/10	1,67	3,45	1,8	1,5	5,2
Out/10	1,73	3,19	1,9	1,4	6,2
Jan/11	1,79	3,25	2,0	1,4	6,4

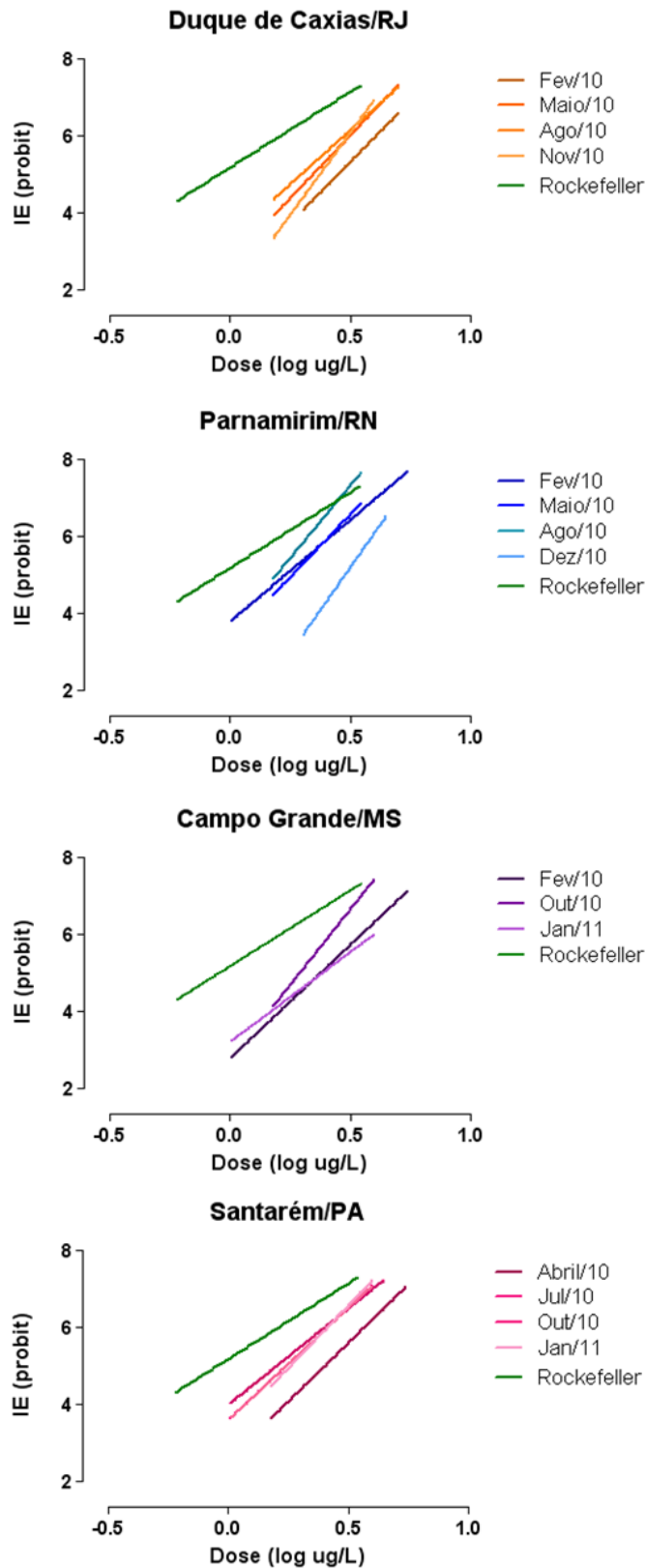


Figura 4.3. Curvas de regressão linear das quatro populações de *Aedes aegypti* avaliadas após exposição ao diflubenzuron. O eixo y indica a inibição da emergência (IE) de adultos, em escala probit. A cepa Rockefeller, utilizada como referência de susceptibilidade, está representada em todos os gráficos (linha verde).

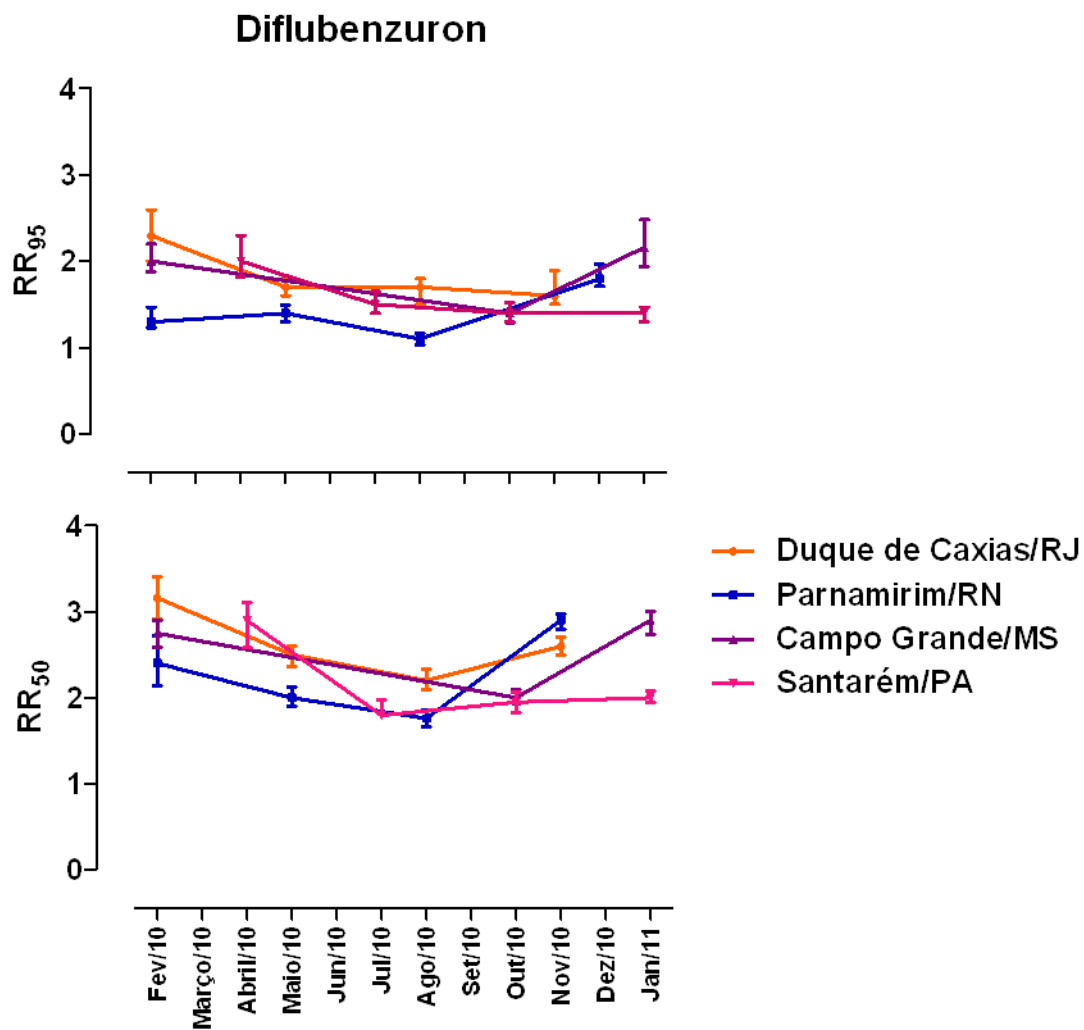


Figura 4.4. Avaliação temporal das razões de resistência (RR₅₀ e RR₉₅) ao diflubenzuron das quatro populações de *Aedes aegypti* estudadas. Cada ponto representa a RR₅₀ ou a RR₉₅ e o intervalo de confiança correspondente.

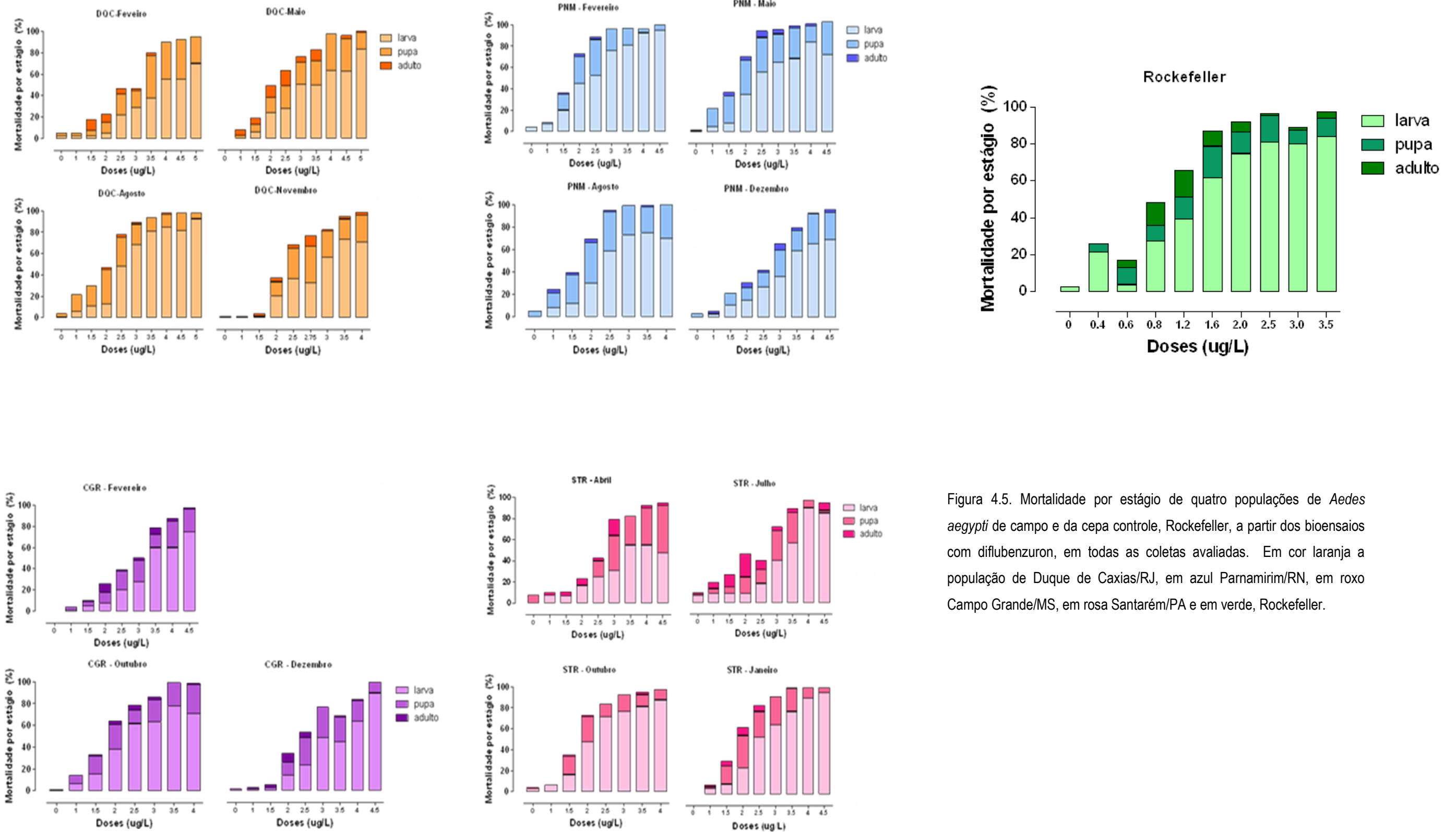


Figura 4.5. Mortalidade por estágio de quatro populações de *Aedes aegypti* de campo e da cepa controle, Rockefeller, a partir dos bioensaios com diflubenzuron, em todas as coletas avaliadas. Em cor laranja a população de Duque de Caxias/RJ, em azul Parnamirim/RN, em roxo Campo Grande/MS, em rosa Santarém/PA e em verde, Rockefeller.

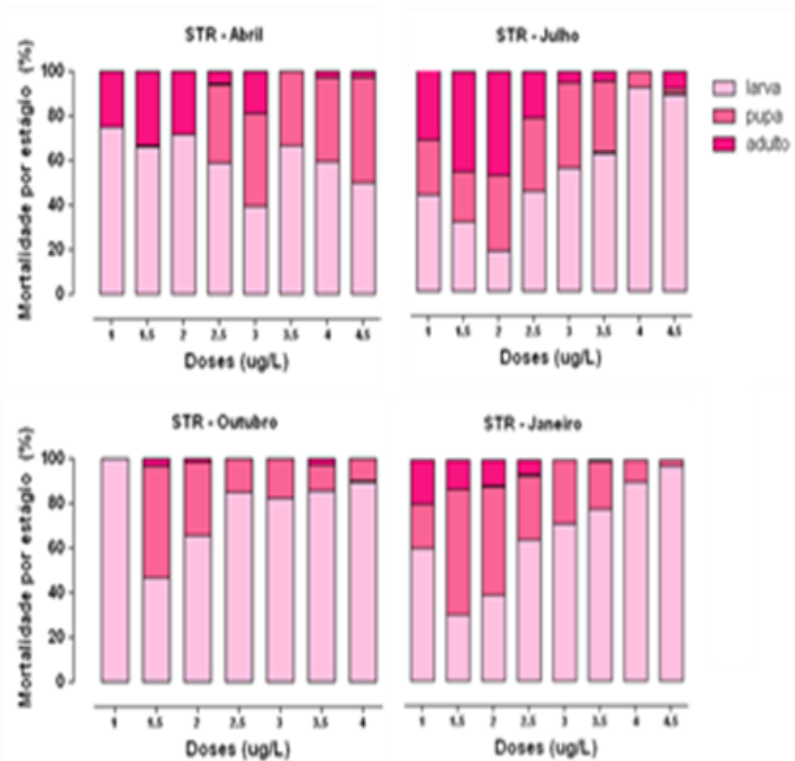
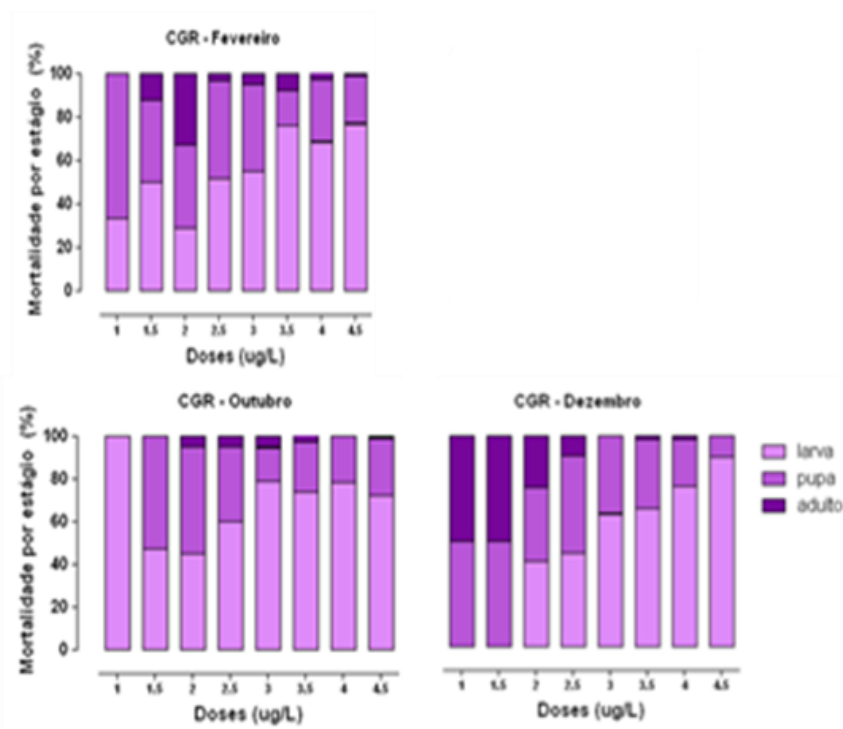
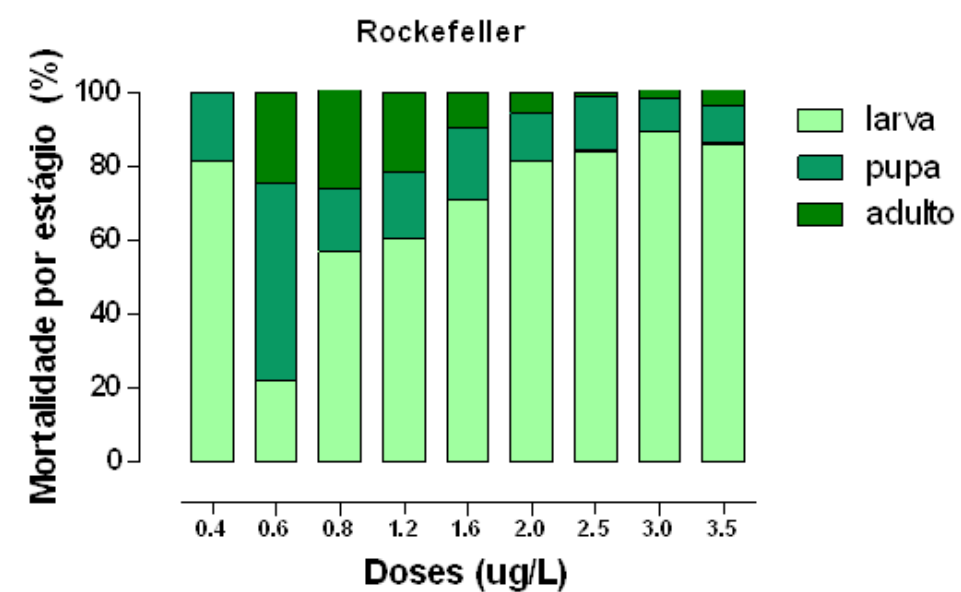
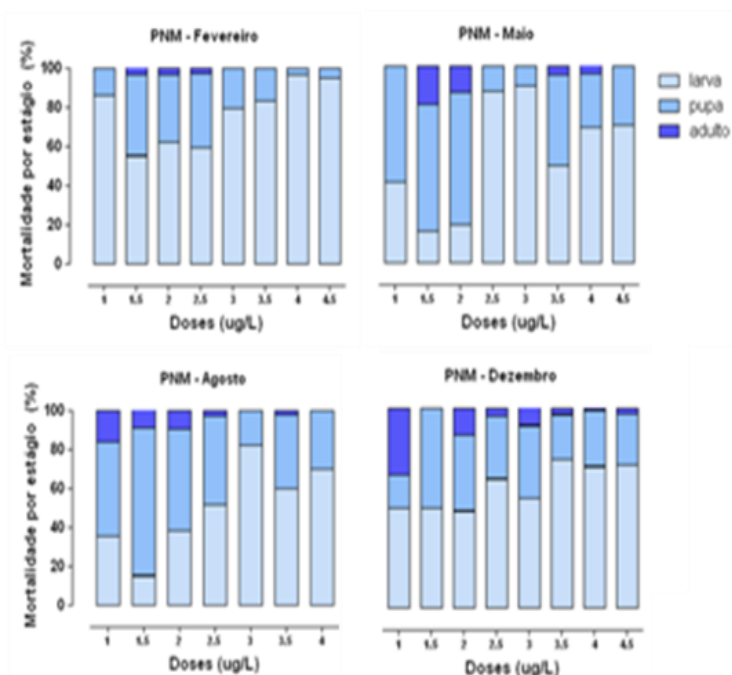
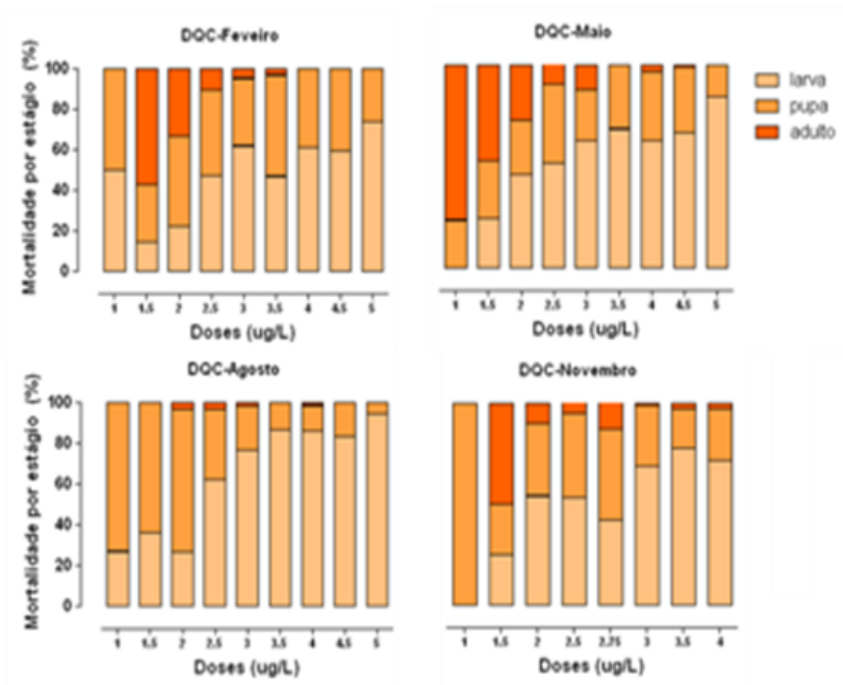


Figura 4.6. Percentual normalizado de mortalidade por estágio de quatro populações de *Aedes aegypti* de campo e da cepa controle, Rockefeller, a partir dos bioensaios com diflubenzuron, em todas as coletas avaliadas. Foram considerados nesta avaliação apenas os indivíduos mortos: para todas as concentrações de diflubenzuron as barras equivalem a 100%. Em cor laranja a população de Duque de Caxias/RJ, em azul Parnamirim/RN, em roxo Campo Grande/MS, em rosa Santarém/PA e em verde, Rockefeller.

4.1.2) Bioensaios de adultos com deltametrina

A Tabela 4.3 e a Figura 4.7 mostram os resultados gerais obtidos com os bioensaios dose-resposta de deltametrina para cada população. De maneira geral, as inclinações das retas parecem se comportar ao contrário do que ocorre com temephos: há uma tendência ao aumento do coeficiente angular (*slope*) e da RR. Os resultados também estão apresentados separadamente por população, comparados com os índices de casos de dengue e com a dinâmica de aplicação de deltametrina nas diferentes localidades (Figuras 4.8 a 4.11), uma vez que a aplicação de adulticidas é recomendada apenas em situações particulares, como pontos estratégicos ou surtos epidêmicos. Vale notar que estão apresentadas apenas as aplicações que ocorreram nas áreas de estudo, e não na totalidade de cada município. Tanto a intensidade quanto a frequência de aplicação pelas Secretarias Municipais de Saúde (SMS) no período estudado variaram muito. O final deste item contém um resumo dos números de casos de dengue e das RR₉₅ encontradas para deltametrina em todas as localidades (Figura 4.12).

Tabela 4.3. Concentrações letais (CL) para deltametrina das populações de *Aedes aegypti* avaliadas, de quatro localidades do Brasil. Também estão indicadas as razões de resistência (RR), obtidas após comparação com as concentrações letais da cepa Rockefeller, e as inclinações (*slope*) obtidas para cada período avaliado. Os intervalos de confiança das RR₉₅ estão disponíveis no Anexo 1, ao final desta dissertação.

População	CL ₅₀ (mg/m ²)	CL ₉₅ (mg/m ²)	RR ₅₀	RR ₉₅	"slope"
Rockefeller	0,70	1,45	1,0	1,0	5,0
Duque de Caxias/RJ					
Dez/09	12,17	82,43	17,3	56,7	2,0
Fev/10	21,14	89,14	30,2	61,3	2,6
Mai/10	22,07	115,7	31,5	79,4	2,3
Ago/10	19,60	93,53	28,0	64,4	2,4
Nov/10	23,45	64,87	33,5	44,5	3,7
Parnamirim/PA					
Fev/10	5,04	17,01	7,2	11,6	3,1
Mai/10	4,41	14,75	6,3	10,1	3,1
Ago/10	6,21	18,13	8,8	12,4	3,5
Dez/10	8,83	20,7	12,6	14,3	4,4
Campo Grande/MS					
Fev/10	49,66	142,21	70,9	97,8	3,5
Jun/10	40,86	84,34	58,3	58,2	5,2
Out/10	45,12	128,17	64,4	88,3	3,6
Jan/11	42,91	124,19	61,3	85,5	3,5
Santarém/PA					
Abril/10	20,00	84,17	28,5	57,8	2,6
Jul/10	19,74	51,01	28,2	35,1	3,9
Out/10	33,26	80,29	47,5	55,1	4,2
Jan/11	25,81	71,73	36,8	49,3	3,7

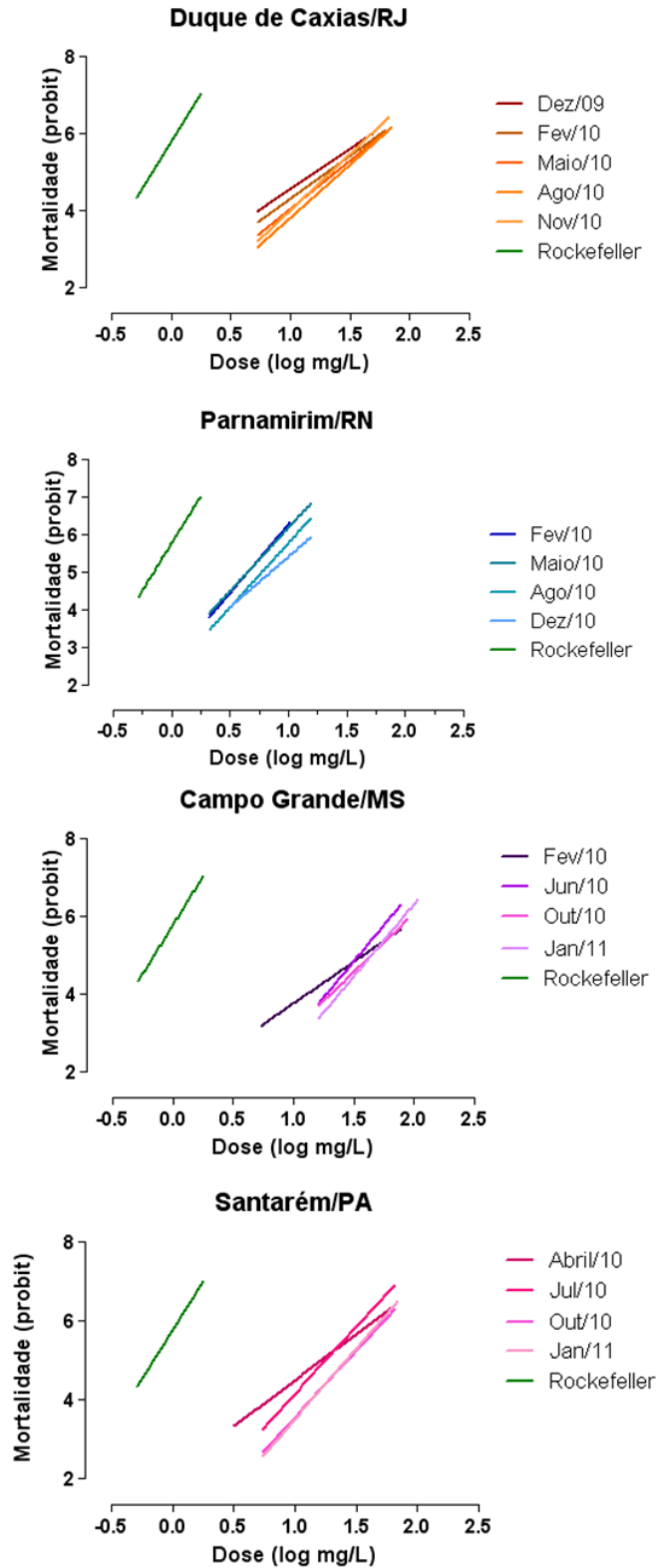


Figura 4.7. Curvas de regressão linear obtidas por exposição ao piretróide deltametrina de adultos das quatro populações de *Aedes aegypti*. A cepa Rockefeller, utilizada como referência de susceptibilidade, está representada em cada gráfico (linha verde). O ensaio consiste de exposição por 1 hora ao inseticida seguida de recuperação por 24 horas.

A) Duque de Caxias/RJ

Neste município do Rio de Janeiro durante o período do estudo os casos de dengue se concentraram nos meses de março a junho. Em maio, ocorreu o maior número de notificações, com 330 casos registrados na localidade. Levantamento da aplicação de inseticidas revelou uso público indiscriminado de piretróides, com diversas aplicações de UBV, inclusive fora de períodos epidêmicos, variando de uma a nove mensais (Figura 4.8).

Os bioensaios com adultos desta população detectaram resistência extremamente elevada ao piretróide deltametrina. As RR_{95} se mantiveram sempre acima de 40,0. A RR_{95} no mês de dezembro de 2009 foi 56,7 e apresentou no mês de maio de 2010 seu maior valor, de aproximadamente 80,0, coincidido com o pico de casos de dengue na região. A menor RR_{95} , 44,5, foi vista no último mês analisado, novembro de 2010 (Figura 4.8). Podemos verificar também tendência ao aumento dos valores das inclinações das retas (*slopes*) ao longo do estudo (Tabela 4.3 e Figura 4.7), sugerindo uma maior homogeneidade da população à medida em que a pressão de seleção ocorreu em campo.

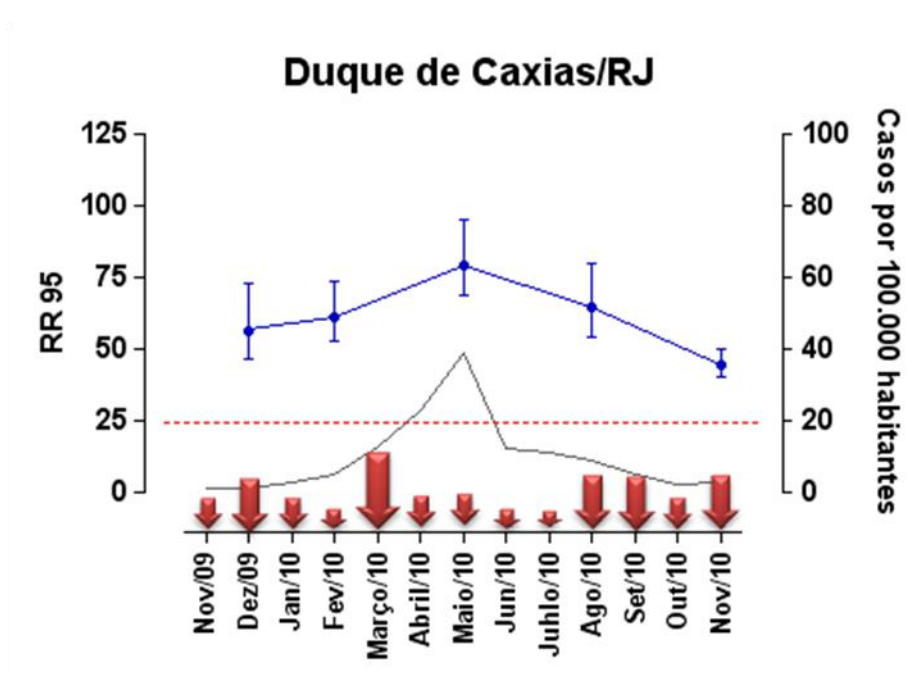


Figura 4.8. Avaliação temporal da RR_{95} para deltametrina de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* da população de Duque de Caxias/RJ. Setas vermelhas indicam o número de aplicações mensais de piretróides; o tamanho das setas varia de uma a nove aplicações. Para cada RR_{95} , em azul, estão indicados também os intervalos de confiança. A linha pontilhada vermelha é arbitrária e indica a RR_{95} 25,0; valores acima desta linha foram considerados extremamente elevados. A linha cinza indica a incidência de dengue na localidade, no período.

B) Parnamirim/RN

Nesta localidade encontramos a menor incidência de dengue durante o estudo. As notificações da doença variaram de 0 a 35 casos, com pico nos meses de maio a junho de 2010. A Secretaria Municipal de Saúde de Parnamirim informou apenas dois meses onde ocorreram aplicações em campo de deltametrina, provavelmente em virtude do aumento dos casos notificados de dengue. As aplicações a UBV ocorreram em junho e julho, com quatro e duas respectivamente. A população de *Ae. aegypti* desta localidade apresentou resistência menor que das outras populações analisadas (Figura 4.9; ver também Figura 4.12). A RR_{95} , inicialmente 11,6, alcançou 14,2 ao final do período de avaliação. Foi também observada nesta população uma tendência ao aumento dos coeficientes angulares ao longo do estudo, atingindo seu maior valor no último mês analisado, dezembro de 2010 (Tabela 4.3 e Figura 4.7).

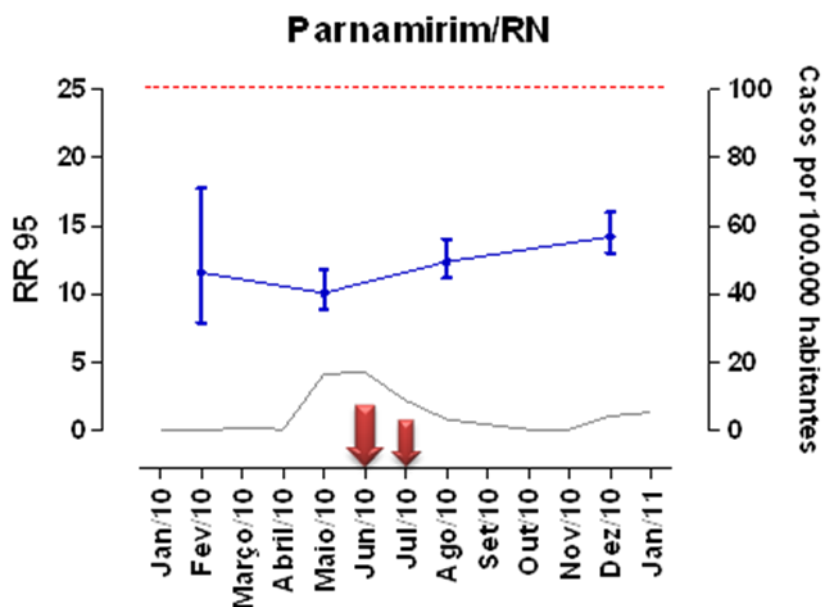


Figura 4.9. Avaliação temporal da RR_{95} para deltametrina de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* da população de Parnamirim/RN. Setas vermelhas indicam o número de aplicações em campo (quatro em julho e duas em agosto). Para cada RR_{95} estão indicados também os intervalos de confiança. A linha pontilhada vermelha é arbitrária e indica a RR_{95} 25,0; valores superiores foram considerados extremamente elevados. A linha cinza mostra a incidência de dengue na localidade, no período.

C) Campo Grande/MS

Ocorreu em Campo Grande, no ano de 2010, a maior epidemia de dengue vista na história da região, com 27.471 notificações totalizando 3,5% da população local. A fase de mais notificações foi de dezembro de 2009 a maio de 2010, com pico em fevereiro, com 8.200 casos (aproximadamente 1% do número de habitantes da região). A doença continuou a ser notificada até o final do estudo, com valores inferiores aos do início do ano, porém não menos relevantes, variando de 150 a 400 casos mensais até pelo menos o mês de janeiro de 2011 (Figura 4.10).

A Secretaria Municipal de Saúde relatou, durante o período de estudo, apenas o uso do adulticida organofosforado (OP) malathion, que tem modo de ação distinto dos piretróides. Ocorreram duas aplicações mensais em campo nos meses de fevereiro e março de 2010, provavelmente em função da epidemia de dengue na região (Figura 4.10). Contudo, em anos anteriores a 2010, piretróides haviam sido utilizados em campo (SMS de Campo Grande/MS).

Para esta população os níveis de resistência a deltametrina foram muito elevados durante todas as análises. A maior RR_{95} , de 97,8, foi encontrada em fevereiro de 2010, justamente na época de surto de dengue na região. A segunda avaliação, em junho de 2010, constatou queda nos níveis de resistência à deltametrina, que ficaram em torno de 60,0. A RR_{95} voltou a subir nas duas últimas análises, em outubro de 2010 e janeiro de 2011, permanecendo em torno de 80,0 (Figura 4.10). Em relação às inclinações das retas (*slopes*), observamos um aumento do seu valor do mês de fevereiro para junho de 2010, porém seus valores voltam a decair nos meses avaliados posteriormente (Tabela 4.3 e Figura 4.7).

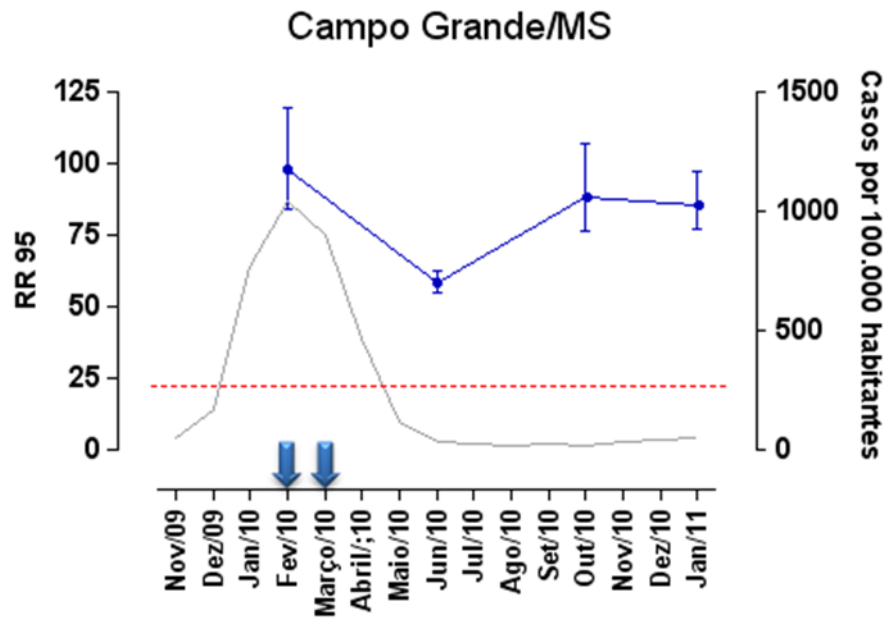


Figura 4.10. Avaliação temporal da RR₉₅ para deltametrina de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* da população de Campo Grande /MS. Setas verticais azuis indicam duas aplicações de malathion (OP) em campo em cada mês. Para cada RR₉₅ estão indicados também os intervalos de confiança. A linha pontilhada vermelha é arbitrária e indica a RR₉₅ 25,0; valores superiores são considerados extremamente elevados. A linha cinza mostra a incidência de dengue na localidade, no período, que correspondeu à maior epidemia de dengue da história deste município até então (observar a escala do eixo-y à direita, que difere dos gráficos das outras populações - Figuras 4.7, 4.8 e 4.10).

D) Santarém/PA

A incidência de dengue foi constante nesta localidade no ano de 2010, variando de 20 a 60 notificações mensais. Apenas no início de 2011, em janeiro, ocorreu um aumento no número de casos, chegando a 288 notificações. De acordo com informação obtida pela Secretaria Municipal de Saúde, houve aplicação de cipermetrina em campo diversas vezes, variando de uma a quatro passagens de UBV em cada mês (Figura 4.11).

A resistência a piretróides nesta população também alcançou níveis muito elevados. A RR_{95} variou entre 35,0 e 60,0 no decorrer das análises. A maior RR_{95} foi observada em abril de 2010 e a menor foi vista no mês de julho (Figura 4.11). As inclinações das retas (*slopes*) encontradas para esta população não apresentaram nenhuma tendência aparente, o pico do seu valor ocorreu no mês de outubro de 2010 diminuindo na última análise, em janeiro de 2011 (Tabela 4.3 e Figura 4.7).

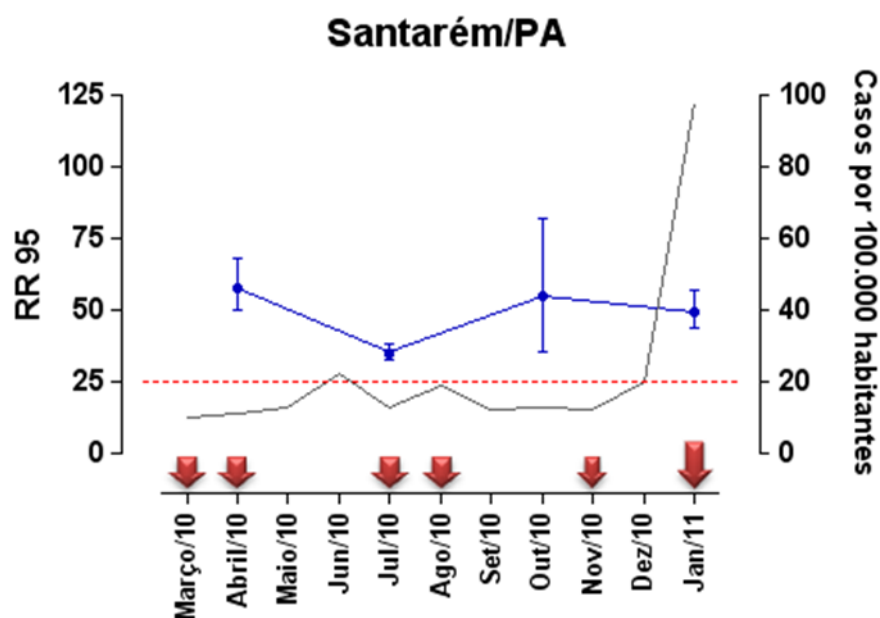


Figura 4.11. Avaliação temporal da RR_{95} para deltametrina de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* da população de Santarém/PA. Setas vermelhas indicam o número de aplicações mensais de piretróides; o tamanho das setas representa uma, duas ou quatro aplicações. Para cada RR_{95} estão indicados também os intervalos de confiança. A linha pontilhada vermelha é arbitrária e indica a RR_{95} 25,0; RRs acima desta linha foram consideradas extremamente elevadas. A linha cinza mostra a incidência de dengue na localidade, no período.

E) Casos de dengue e resistência a deltametrina

A Figura 4.12 resume os casos de dengue e as RR_{95} de cada população, em todo o período. Para a região de Campo Grande, a doença se apresentou como um grave problema de Saúde Pública, mantendo-se em níveis muito elevados durante o período estudado, quando comparados com as outras localidades. Em relação às RR s, verificamos de uma maneira geral que a população de Parnamirim apresentou níveis mais baixos quando comparada às outras populações analisadas.

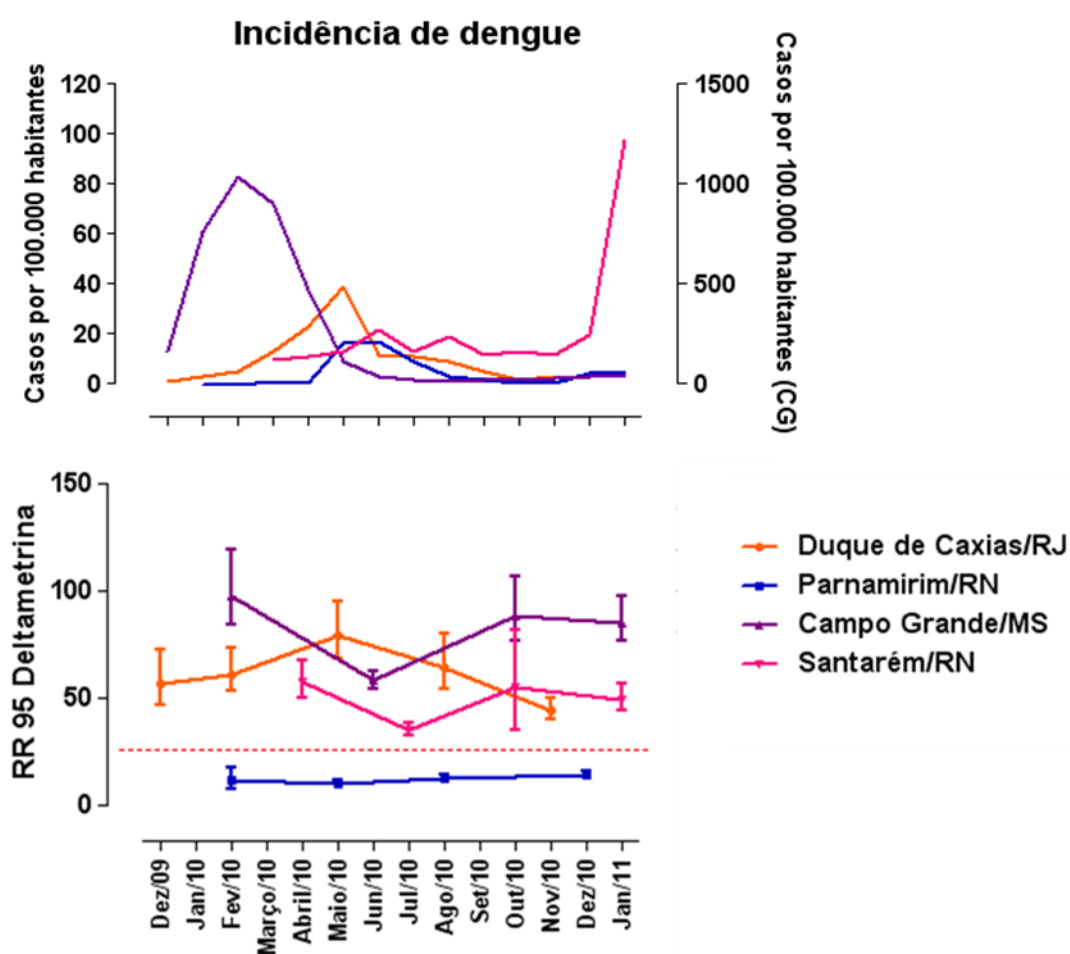


Figura 4.12. Comparação entre o perfil de ocorrência de dengue (gráfico superior) e o *status* de resistência a deltametrina (gráfico inferior) nas localidades avaliadas. Note que, no gráfico superior, para Campo Grande/MS os valores estão representados no eixo-y à direita (grande surto epidêmico durante o período de estudo). A reta tracejada, arbitrária, posiciona a $RR_{95}=25,0$. Para cada RR_{95} estão indicados também os intervalos de confiança.

4.2. Mecanismos de resistência

4.2.1) Ensaios bioquímicos para avaliação da resistência metabólica e da AChE

Ensaios bioquímicos foram realizados para avaliar as principais enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Ae. aegypti*, de acordo com protocolo de rotina do Laficave, detalhado na seção Materiais e Métodos da dissertação. Foram quantificadas as atividades das enzimas que participam do processo de detoxificação de xenobióticos, que pertencem às famílias das Esterases (analisadas com três diferentes substratos, denominadas aqui “ALFA”, “BETA” e “PNPA”), Oxidases de Função Mista (MFO) e glutathione-S-Transferases (GST), e também a enzima Acetilcolinesterase (AChE), sítio alvo dos OP e CA. Estes ensaios foram efetuados para as quatro populações participantes do projeto (Duque de Caxias/RJ, Parnamirim/RN, Campo Grande/MS e Santarém/PA) ao longo de um ano, a cada três meses, ou seja, em quatro momentos distintos. As fases do ciclo de vida investigadas foram: larvas de 3º estágio e fêmeas adultas de um dia pós-emergência.

Para facilitar a comparação, além de tabelas com os resultados dos ensaios bioquímicos de cada população, estão também disponíveis em fichas separadas (Fichas 1 e 2), os bioensaios realizados e os resultados dos ensaios moleculares de frequência das mutações no *AaNav*. Ao final da dissertação, no Anexo 2, estão expostos os gráficos de pontos utilizados para a comparação visual em nossas análises.

4.2.1.1) Ensaios bioquímicos com larvas

Foi possível identificar, desde o início das análises, diferenças nos perfis de “Rock total” e “Rock placas” (ver Anexo 2), o que gerou discrepâncias nas comparações posteriores com as populações de campo. Atribuímos estas diferenças a potenciais variações na criação das larvas ao longo do estudo, como a temperatura ou a mudança da marca da ração utilizada como alimento, entre outros. Em função destas diferenças nos resultados de Rockefeller, os ensaios bioquímicos de larvas foram avaliados de várias formas tentativas. Em todos os casos calculou-se o percentual de indivíduos das populações de campo com valores de atividade acima do percentil 99 (p99) de um grupo específico, definido como ponto de corte. As Tabelas 4.4 e 4.5 apresentam, respectivamente, a comparação com “Rock total” (os ensaios com a cepa padrão realizados antes dos ensaios com as populações) e com “Rock placas” (o compilado dos controles internos, nas placas com as populações de campo). Adicionalmente, levamos em conta que em todas as populações foi detectada tendência à

diminuição dos níveis de resistência das larvas a temephos ao longo do período de estudo. Em função disto, incluímos uma terceira avaliação, que foi a comparação com o último momento avaliado de cada população de campo, para cada enzima (Tabela 4.6). É importante destacar que procuramos associar os resultados dos ensaios bioquímicos de larvas apenas com os bioensaios para o inseticida OP temephos. Não buscamos correlações com o larvicida diflubenzuron pois, para este larvicida não detectamos nem RRs altas nem tendências ao longo do tempo.

4.2.1.1.1) larvas x “Rock total”

A comparação das atividades enzimáticas das populações com os ensaios com Rockefeller realizados anteriormente (Tabela 4.4) revelou poucas alterações nas populações de campo. De maneira geral, como evidenciado nas Figuras A1-A8 (Anexo 2), as atividades de Rockefeller nestes ensaios prévios (“Rock total”) foram superiores aos controles internos com Rockefeller (“Rock placas”), realizados simultaneamente às populações. Em função disto, o valor de p99 relativamente elevado de Rockefeller, usado como ponto de corte, pode ter mascarado as alterações de atividade enzimática das populações, subestimando-as. Nesta análise não foi detectada em nenhuma população, e em nenhum momento, alteração de atividade das Esterases “ALFA” e “BETA”, mais comumente relacionadas à resistência a organofosforados nas populações brasileiras de *Ae. aegypti*. Para todas as outras enzimas as alterações foram, em geral, discretas.

Esta análise não permitiu detectar alterações nas atividades das enzimas que justificassem a resistência encontrada nas populações ao larvicida OP temephos, nem identificar tendências que pudessem ser correlacionadas à queda na resistência ao temephos.

Tabela 4.4. Comparação das atividades enzimáticas de larvas das populações de campo com a cepa Rockefeller, “Rock total” (ensaios com Rock realizados previamente aos ensaios com as populações; ver Materiais e Métodos, item 3.6, para detalhes). Em cada caso foi quantificado o percentual da população com atividade acima do percentil 99 (p99) de Rockefeller. Em verde estão indicados os valores de atividade considerados normais (até 15% dos indivíduos), em amarelo, atividade considerada alterada (entre 15 – 50%) e em laranja, muito alterada (acima de 50%).

Larvas - População de campo x Rock total
(taxa>perc 99)

Período	População	AChE	MFO	α NA - Est	β NA - Est	<i>pnpa</i> - Est	GST
fev/10	Duque de Caxias	0	8	0	0	0	0
mai/10	Duque de Caxias	3	7	4	1	39	0
ago/10	Duque de Caxias	0	0	1	0	6	0
nov/10	Duque de Caxias	12	0	0	2	0	0
fev/10	Parnamirim		57	0	0	0	0
mai/10	Parnamirim		23	0	0	22	0
ago/10	Parnamirim		6	0	0	5	0
dez/10	Parnamirim		0	3	0	5	0
fev/10	Campo Grande	0		3	0	9	5
jun/10	Campo Grande	4	16	0	1	11	16
out/10	Campo Grande	18	19	0	0	9	5
jan/11	Campo Grande	12			0		0
abr/10	Santarém	6		2	0	5	3
jul/10	Santarém	0	3	0	0	0	1
out/10	Santarém	40	10	1	0	6	5
jan/11	Santarém	0		0	0		3

4.2.1.1.2) larvas x “Rock placas”

A Tabela 4.5, que compara as populações com os ensaios do controle interno realizados com Rockefeller (“Rock placas”), revelou maiores alterações na atividade das enzimas quando comparada à tabela anterior. Neste caso, com o menor valor de p99 de Rockefeller, as alterações enzimáticas das populações de campo puderam ser ressaltadas (comparar com o Anexo 2). Com relação às Esterases, comumente associadas à resistência a OP, de maneira geral, verificamos alterações na atividade com pelo menos um dos substratos utilizados (ALFA, BETA e PNPA), na maioria dos momentos, em todas as populações. Alteração na atividade de GST, enzima de fase 2, também foi diagnosticada em todas as populações participantes do estudo. No entanto, é provável que esta alteração esteja relacionada com a atividade de GST na fase adulta (ver item 4.2.1.2). Também confirmamos poucas alterações de outras duas enzimas, AChE e MFO, fato já observado em populações brasileiras de *Ae. aegypti* (com exceção de Parnamirim e Santarém que apresentaram alteração de MFO e de AChE, respectivamente). As particularidades para cada população se encontram abaixo:

- A) Duque de Caxias/RJ: Esta população apresentou a maior RR para temephos e também uma queda acentuada da RR durante o período de estudo (a RR_{95} decaiu em aproximadamente 40%, de 16,3 até 10,0). A elevada resistência pode justificar o fato de apenas esta população apresentar alteração na atividade das Esterases com os três substratos utilizados (ALFA, BETA e PNPA). Alterações em GST também foram vistas em dois momentos. Entretanto, apenas PNPA apresentou tendência de queda da atividade ao longo do tempo.
- B) Parnamirim/RN: Para esta população os ensaios biológicos evidenciaram RR_{95} moderadas para temephos, entre 7,4 e 6,3, e que portanto, não variaram muito ao longo do tempo (em torno de 15%). A atividade de diversas enzimas estava alterada. A exemplo de Duque de Caxias, as atividades ALFA, BETA e GST estavam elevadas em diversos os momentos. Além disso, foi a única população com MFO alterada, e com tendência de queda desta atividade ao longo do tempo. Para as outras atividades alteradas não foi detectada qualquer tendência no período avaliado.
- C) Campo Grande/MS: Em comparação com Duque de Caxias, Campo Grande apresentou níveis de resistência a temephos mais discretos (RR_{95} entre 7,9 e 4,6), embora tenha registrado queda equivalente ao longo do tempo (em torno de 40%). Para esta população observamos alterações em três famílias de enzimas, em todos os casos com tendência na queda de atividade: PNPA, GST e ALFA, esta última com atividade alterada apenas no primeiro mês analisado. Embora a atividade de BETA tenha se mantido nos padrões 'normais', houve, aparentemente, uma ligeira redução ao longo do período. Vale ressaltar que para as duas populações com queda mais acentuada da RR_{95} para temephos (Duque de Caxias e Campo Grande) observamos queda acentuada da PNPA.
- D) Santarém/PA: A RR_{95} para temephos foi alta (entre 10,3 e 9,0), embora não tenha variado muito ao longo do estudo (em torno de 15%). Nesta análise observamos, em três dos quatro momentos avaliados, alterações de atividade da AChE (única população com alteração detectável desta enzima). Por outro lado, poucas alterações foram encontradas nas outras enzimas (apenas GST e BETA, e somente em alguns pontos avaliados).

Tabela 4.5. Comparação das atividades enzimáticas de larvas das populações de campo com a cepa Rockefeller, “Rock placas” (ensaios com Rock realizados simultaneamente aos ensaios com as populações, nas mesmas placas; ver Materiais e Métodos, item 3.6, para detalhes). Em cada caso foi quantificado o percentual da população com atividade acima do p99 de Rockefeller. Em verde, os valores de atividade considerados normais (até 15% dos indivíduos), em amarelo, alterados (entre 15 – 50%), e em laranja, muito alterados (acima de 50%).

Larvas - População de campo x Rock placas
(taxa > perc 99)

Período	População	ACHe	MFO	α NA-Est	β NA-Est	pnpa-Est	GST
fev/10	Duque de Caxias	0	7	20	7		13
mai/10	Duque de Caxias	3	5	28	28	74	51
ago/10	Duque de Caxias	0	0	7	0	31	1
nov/10	Duque de Caxias	12	0	22	20	16	46
fev/10	Parnamirim		51	25	15	0	31
mai/10	Parnamirim		19	19	28	0	38
ago/10	Parnamirim		4	21	2	0	17
dez/10	Parnamirim		0	30	32	0	22
fev/10	Campo Grande	0		56	10	55	87
jun/10	Campo Grande	0	2	9	8	39	63
out/10	Campo Grande	0	4	5	4	18	27
jan/11	Campo Grande	0			3		5
abr/10	Santarém	17		2	2	0	62
jul/10	Santarém	14	3	0	2	0	13
out/10	Santarém	40	10	1	17	0	18
jan/11	Santarém	17		2	0		12

4.2.1.1.3) larvas x último momento avaliado

Como mencionado anteriormente, consideramos também como ponto de corte o p99 do último momento avaliado, para cada população e cada enzima. Esperávamos desta forma confirmar algumas tendências de queda na atividade das enzimas ao longo do tempo, verificadas na Tabela 4.5.

. Os detalhes observados para cada população são ressaltados abaixo:

- A) Duque de Caxias/RJ: Esta foi uma das populações com queda da resistência ao temephos bastante acentuada ao longo do projeto. Nesta análise, alterações em MFO e PNPA foram observadas e a tendência de queda na atividade de PNPA verificada anteriormente (Tabela 4.5) foi confirmada.
- B) Parnamirim/RN: Nesta população, que apresentou queda apenas discreta nos níveis de resistência (~15%), confirmamos a tendência de queda na atividade de MFO ao longo dos meses.

- C) Campo Grande/MS: Uma acentuada queda na resistência ao temephos também foi observada nesta população, acompanhada por redução da atividade de ALFA e, mais discretamente, de BETA. Não foi possível, porém, confirmar tendência de redução da alteração de PNPA e GST.
- D) Santarém/PA: Esta população, cuja RR₉₅ para temephos não variou muito durante o período estudado, não exibiu qualquer tendência nas atividades enzimáticas.

Tabela 4.6. Comparação das atividades enzimáticas de larvas das populações de campo com o último momento avaliado para cada enzima e para cada população (ver Materiais e Métodos, item 3.6, para detalhes). Em cada caso foi quantificado o percentual da população com atividade acima do percentil 99 (p99) do último mês analisado. Em verde estão indicados os valores de atividade considerados normais (até 15% dos indivíduos), em amarelo, atividade considerada alterada (entre 15 – 50%) e em laranja, muito alterada (acima de 50%).

Larvas populações x último momento avaliado
(taxa > perc 99)

Período	População	AChE	MFO	αNA - Est	βNA - Est	mpa - Est	GST
fev/10	Duque de Caxias	0	27	1	0		0
mai/10	Duque de Caxias	0	36	5	2	68	2
ago/10	Duque de Caxias	0	18	1	0	24	0
fev/10	Parnamirim		68	0	0	5	6
mai/10	Parnamirim		40	0	0	24	11
ago/10	Parnamirim		21	0	0	10	0
fev/10	Campo Grande	0	0	28	10	0	27
jun/10	Campo Grande	4	2	2	8	8	30
out/10	Campo Grande				4		11
abr/10	Santarém	6		2	35	0	34
jul/10	Santarém	0	0	0	12	0	6
out/10	Santarém	40		1	36	0	5

4.2.1.2) Ensaio bioquímico com adultos

As Tabelas 4.7 e 4.8 apresentam os resultados dos ensaios bioquímicos realizados com adultos. Também neste caso foram observadas divergências quando os dois grupos, “Rock total” e “Rock placas”, foram escolhidos como ponto de corte. A comparação das populações de campo com “Rock placas”, em função de seus menores valores de atividade, ressaltou mais alterações nas enzimas que “Rock total”. Buscamos correlacionar estes resultados dos ensaios bioquímicos efetuados com adultos com os ensaios biológicos realizados com o adulticida PI deltametrina (que ressaltaram três populações com resistência extremamente alta e apenas uma, Parnamirim, com resistência menos elevada). Também buscamos interpretar os resultados levando em conta o outro mecanismo de resistência a PI investigado, a frequência de mutações em seu alvo, o canal de sódio (AaNa_v), detalhado no item 4.3.

4.2.1.2.1) adultos x “Rock total”

A Tabela 4.7 evidencia que, com exceção de Campo Grande, atividades mais elevadas só foram encontradas de forma consistente para as enzimas PNPA e GST, em todas as populações e na maioria dos meses avaliados. Atividade alterada destas famílias de enzimas já havia sido relatada anteriormente em populações brasileiras de *Ae. aegypti*, logo após a introdução de piretróides no controle de adultos em nosso país (Montella et al 2007).

Tabela 4.7. Comparação das atividades enzimáticas de adultos das populações de campo com a cepa Rockefeller, “Rock total” (ensaios com Rock realizados previamente aos ensaios com as populações; ver Materiais e Métodos, item 3.6, para detalhes). Em cada caso foi quantificado o percentual da população com atividade acima do percentil 99 (p99) de Rockefeller. Em verde estão indicados os valores de atividade considerados normais (até 15% dos indivíduos), em amarelo, atividade considerada alterada (entre 15 – 50%) e em laranja, muito alterada (acima de 50%).

Adultos- População de campo x Rock total (taxa>perc 99)							
Período	População	AChE	MFO	α NA- Est	β NA- Est	PNPA- Est	GST
fev/10	Duque de Caxias	0		11	3	65	70
mai/10	Duque de Caxias	3	3			60	31
ago/10	Duque de Caxias	0	3	6	10	23	36
nov/10	Duque de Caxias	0	1	2	3	28	23
fev/10	Parnamirim	1		0	1	39	63
mai/10	Parnamirim	0	2			48	36
ago/10	Parnamirim	0	0	1	13	7	13
dez/10	Parnamirim	0	1	4	7	24	52
fev/10	Campo Grande	2	0	2	3	67	69
jun/10	Campo Grande	0	0			55	31
out/10	Campo Grande	0	0	17	18	28	26
jan/11	Campo Grande	0	0	6	18	41	11
fev/10	Santarém	0	2	0	5	67	43
jul/10	Santarém	0	0			74	11
out/10	Santarém	0	0	3	5	45	11
jan/11	Santarém	0	1	0	1	37	3

4.2.1.2.2) adultos x “Rock placas”

Os perfis obtidos na comparação com os espécimes Rockefeller usados como controle interno (“Rock placas”, Tabela 4.8) revelaram alterações mais generalizadas nas populações que a avaliação anterior (Tabela 4.7). Por outro lado, houve menor registro de alterações na atividade de PNPA. Abaixo, cada população está sendo comentada separadamente:

A) Duque de Caxias/RJ: Os ensaios biológicos evidenciaram elevada resistência desta população ao PI deltametrina: a RR₉₅ variou entre 44,5 e 79,4 com pico no mês de maio/2010. Também identificamos duas mutações no AaNa_v associadas à resistência a PI (ver item 4.2.2). Embora alterações em todas as enzimas avaliadas tenham sido observadas em pelo menos um momento estudado, PNPA e GST foram as únicas enzimas alteradas em todos os momentos avaliados, em consonância com sua associação com resistência a PI, já relatada. Foi ainda observada, para estas enzimas, sutil tendência de queda de atividade durante o período estudado, o que não tem correlação com os ensaios biológicos.

- B) Parnamirim/RN: Esta população apresentou os menores níveis de resistência a PIs do estudo (RR_{95} a deltametrina entre 10,0 e 15,0), resultado compatível com as baixas frequências de mutação no AaNav (ver item 4.2.2). Também para esta população, as alterações mais consistentes foram detectadas em GST e PNPA. Diferente das outras populações avaliadas, Parnamirim não exibiu alteração de MFO em nenhum momento.
- C) Campo Grande/MS: Esta foi a população que apresentou os maiores valores de RR_{95} a deltametrina em todo o estudo (entre 58,2 e 97,8), com pico na primeira análise, em fevereiro. Assim como em Duque de Caxias, a frequência das mutações no sítio alvo de PI também foi muito alta (ver item 4.2.2). Embora alteração consistente, ao longo de todo o estudo, tenha sido detectada apenas para GST, todas as enzimas avaliadas exibiram alteração em pelo menos um dos momentos avaliados. A exceção foi PNPA que, surpreendentemente, apresentou níveis de atividade compatíveis com a 'normalidade' em todas as avaliações.
- D) Santarém/PA: A RR_{95} de adultos a deltametrina variou entre 35,1 e 57,8, com pico na primeira análise, em abril. Apenas uma das duas substituições no AaNav foi detectada, o que pode estar associado aos níveis de resistência a PI um pouco menores quando comparados com Duque de Caxias e Campo Grande (ver item 4.2.2). Esta foi a população que, no estudo, apresentou menos alterações enzimáticas. De todas, foi, por exemplo, a única que não exibiu GST alterada em todos os momentos avaliados. Isto foi, em parte, consequência da tendência de queda de atividade desta enzima ao longo do período.

Tabela 4.8. Comparação das atividades enzimáticas de adultos das populações de campo com a cepa Rockefeller, “Rock placas” (ensaios com Rock realizados simultaneamente aos ensaios com as populações, nas mesmas placas; ver Materiais e Métodos, item 3.6, para detalhes). Em cada caso foi quantificado o percentual da população com atividade acima do p99 de Rockefeller. Em verde, os valores de atividade considerados normais (até 15% dos indivíduos), em amarelo, alterados (entre 15 – 50%), e em laranja, muito alterados (acima de 50%).

Adultos - População de campo x Rock placas
(taxa>perc 99)

Período	População	AChE	MFO	α NA - Est	β NA - Est	ρ mpa - Est	GST
fev/10	Duque de Caxias	11		38	17	62	81
mai/10	Duque de Caxias	19	10			57	33
ago/10	Duque de Caxias	3	21	45	24	22	46
nov/10	Duque de Caxias	1	15	24	7	26	34
fev/10	Parnamirim	11		12	6	34	80
mai/10	Parnamirim	2	14			43	44
ago/10	Parnamirim	4	14	39	36	7	27
dez/10	Parnamirim	8	5	31	13	23	70
fev/10	Campo Grande	30	3	5	14	14	76
jun/10	Campo Grande	8	18			7	35
out/10	Campo Grande	3	3	27	44	1	30
jan/11	Campo Grande	10	30	8	34	4	16
fev/10	Santarém	3	7	0	11	11	48
jul/10	Santarém	0	31			20	16
out/10	Santarém	0	2	3	15	9	16
jan/11	Santarém	8	14	3	9	3	3

As duas análises (Tabelas 4.7 e 4.8) sugerem forte participação de GST e PNPA na resistência a PI na fase adulta de *Ae. aegypti* de populações brasileiras. Entretanto, não foi possível identificar perfis enzimáticos que pudessem ser diagnósticos das razões de resistência das populações, ao longo do período avaliado. Por outro lado, as razões de resistência extremamente altas de adultos ao piretróide deltametrina encontradas para Duque de Caxias, Campo Grande e Santarém puderam ser relacionadas a alterações no AaNav, alvo de piretróides (ver item 4.2.2). É importante ressaltar que para Parnamirim, a população que exibiu a menor razão de resistência ao piretróide e menores frequências alélicas para as mutações no AaNav, sugerimos que as enzimas detoxificantes tenham participação decisiva na resistência a PI.

4.2.2) Ensaio moleculares para diagnóstico de mutações knockdown resistance (kdr)

Foram realizados, para as quatro populações sob estudo, ensaios moleculares para o diagnóstico de três mutações. Duas delas estão localizadas no domínio II-S6 do gene do canal de sódio regulado por voltagem de *Ae. aegypti* (*AaNav*), nas posições 1016 e 1011, e já foram previamente encontradas em populações brasileiras de *Ae. aegypti* (Martins et al 2009 a, b). A mutação na posição 1016 ocorre pela substituição de uma valina por uma isoleucina (mutação Val1016Ile), e já foi previamente relacionada com a resistência a inseticidas piretróides (Martins et al 2009a). A mutação na posição 1011 ocorre por substituição de uma isoleucina por uma metionina (Ile1011Met). Ao contrário do que foi observado para a mutação 1016, sua contribuição para a resistência a piretróides ainda não está muito bem esclarecida (Martins et al 2009b). A terceira mutação estudada, Phe1534Cys, está localizada no domínio III-S6 do gene *AaNav*, e seu papel na contribuição da resistência também necessita de maiores investigações.

4.2.2.1) Mutação na posição 1016 (Val1016Ile)

Visto que esta mutação apresenta caráter recessivo, ou seja, para expressar o fenótipo de resistência a piretróides necessita estar em homozigose, os resultados abaixo serão representados em frequência do alelo mutante 1016Ile e em frequência genotípica dos indivíduos homozigotos mutantes 1016Ile/Ile. As análises foram feitas para as coletas mensais ao longo do estudo e os resultados estão apresentados por população. Observamos de maneira geral, para duas populações avaliadas, Duque de Caxias/RJ e Campo Grande/MS, frequências alélicas para 1016Ile (alelo mutante) muito elevadas, se mantendo ao longo das análises acima de 70% (Figura 4.13). Além disso, a maioria dos indivíduos destas populações se apresentou homozigota mutante (genótipo Ile/Ile), indicando que esta mutação já está amplamente disseminada nestes municípios. Estes resultados ajudam a compreender os elevados níveis de resistência a deltametrina encontrados (compare com a Figura 4.12). Para a população de Parnamirim/RN, não se detectou indivíduos homozigotos mutantes (Ile/Ile). Apenas indivíduos heterozigotos (Val/Ile) foram vistos, em baixa frequência. A frequência alélica 1016Ile se manteve abaixo de 10% ao longo de todo o período (Figura 4.13), o que corrobora os níveis de resistência mais baixos encontrados nesta localidade (compare com a Figura 4.9). Na população de Santarém/PA, em contraste com os altos níveis de resistência encontrados, a mutação Val1016Ile não foi diagnosticada em nenhum momento do estudo; todos os indivíduos apresentaram o genótipo selvagem (Val/Val) (Figura 4.13).

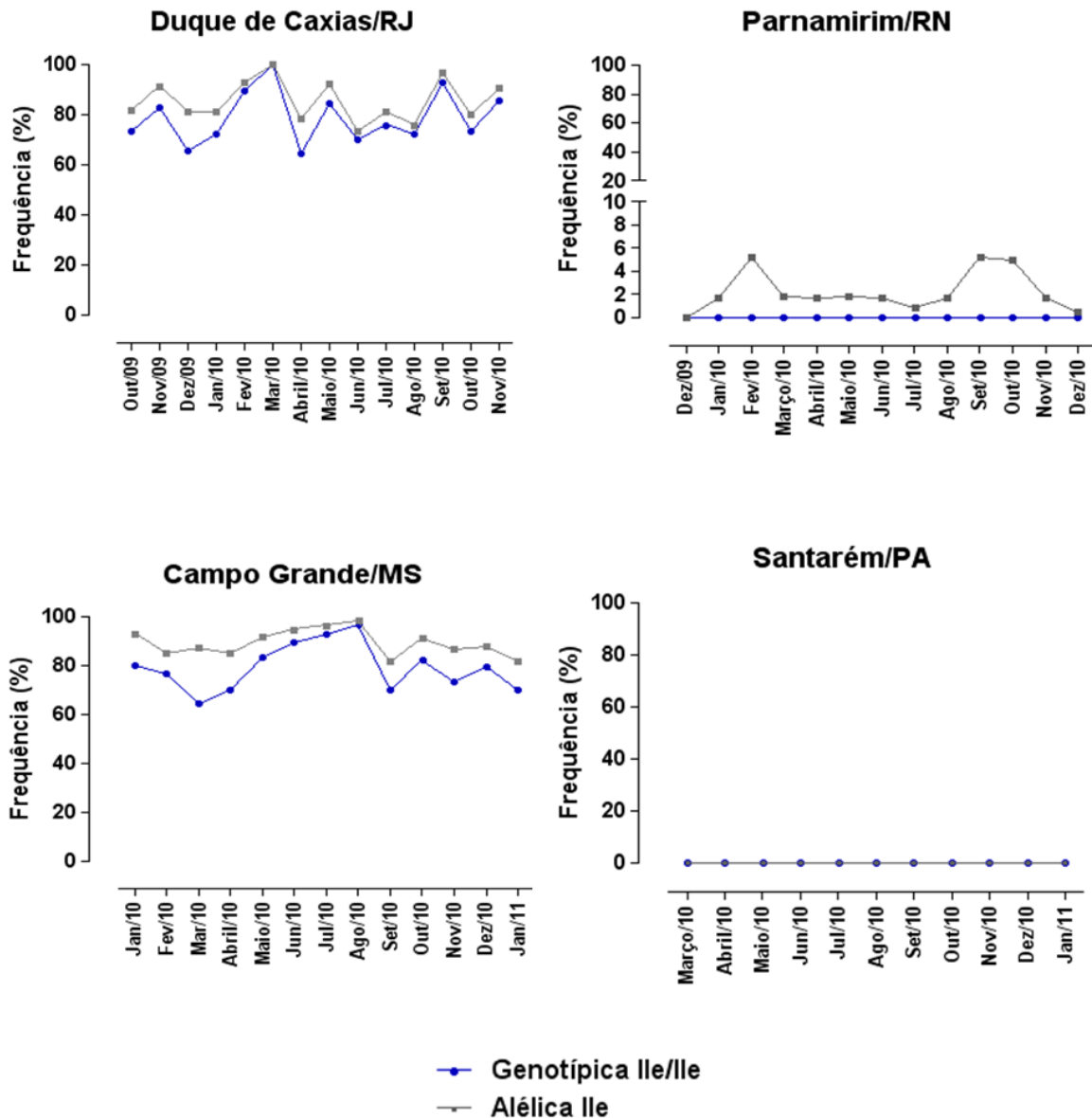


Figura 4.13. Frequências alélica Ile e genotípica Ile/Ile na posição 1016 do gene *AaNav* da população de *Ae. aegypti*. Note que a escala do eixo-y da população de Parnamirim foi alterada para permitir melhor visualização de suas variações de frequência.

4.2.2.2) Mutação na posição 1011 (Ile1011Met)

Esta mutação foi avaliada em apenas dois momentos do estudo, nos meses inicial e final, para cada população. Os resultados para a mutação Ile1011Met estão expressos na Tabela 4.9, em frequência de alelos mutantes (1011Met) e frequência genotípica de indivíduos homocigotos selvagens e heterocigotos, visto que em nenhuma das quatro populações avaliadas foram encontrados indivíduos

homozigotos mutantes. De uma maneira geral, verificamos uma baixa frequência alélica 1011Met e genotípica Ile/Met para as populações de Duque de Caxias/RJ, Campo Grande/MS e Santarém/PA. Para a população de Parnamirim/RN, nas duas análises realizadas, a maioria dos indivíduos foi detectada como heterozigota para a mutação, e, conseqüentemente, as frequências alélicas 1011Met foram constatadas acima de 40%.

Tabela 4.9. Frequência alélica de 1011Met (o alelo mutante) do gene Nav, e frequência genotípica Ile/Ile e Ile/Met nesta posição para as quatro populações de campo de *Ae. aegypti* participantes do estudo. em cada análise.

População - Mês (n)	Frequência alélica 1011Met (%)	Frequência genotípica Ile/Ile (%)	Frequência genotípica Ile/Met (%)
DCQ/RJ - Fev/2010 (30)	3,3	93,3	6,7
DCQ/RJ - Nov/2010 (29)	1,7	96,6	3,4
PNMRN - Março/2010 (30)	41,7	16,7	83,3
PNM/RN - Dez/2010 (30)	43,3	13,3	86,7
CGR/MS - Fev/2010 (26)	13,5	73,1	26,9
CGR/MS - Nov/2010 (28)	1,8	96,4	3,6
STR/PA - Março/2010 (29)	5,2	89,7	10,3
STR/PA - Jan/2011 (29)	0,0	100,0	0,0

Nota: Foram analisadas amostras derivadas apenas dos meses inicial e final de coleta. (n) = número de espécimes avaliados

4.2.2.3) Mutação na posição 1534 (Phe1534Cys)

Para a mutação Phe1534Cys, avaliou-se apenas um mês de cada população em função desta ter sido recentemente detectada no país. Os resultados das análises estão expostos na Tabela 4.10, em frequência de alelos mutantes (1534Cys) e frequência genotípica de indivíduos homozigotos selvagens (Cys/Cys) e heterozigotos (Phe/Cys). Verificamos frequências alélicas 1534Cys muito altas

para as três populações (Duque de Caxias/RJ, Campo Grande/MS e Santarém/PA) que apresentaram uma alta RR_{95} ao longo do estudo. Duque de Caxias e Campo Grande apresentaram frequências genotípicas de homozigotos mutantes (Cys/Cys) em torno de 97% e Santarém uma frequência de 100%. Na população de Parnamirim/RN, observamos uma frequência alélica 1534Cys de 35%, com 13% dos indivíduos homozigotos mutantes, sugerindo uma pequena participação no nível de resistência desta população.

Tabela 4.10. Frequência alélica de 1534Cys (o alelo mutante) do gene Nav, e frequência genotípica Cys/Cys e Phe/Cys para as quatro populações de campo de *Ae. aegypti* participantes do estudo.

População	Frequência alélica 1534 Cys (%)	Frequência genotípica Cys/Cys (%)	Frequência genotípica Phe/Cys (%)
Duque de Caxias/RJ – Nov/2010	98,2	96,4	3,6
Parnamirim/RN - Dez/2010	35,0	13,0	43,3
Campo Grande/MS - Nov/2010	98,3	96,7	3,3
Santarém/PA – Jan/2011	100,0	100,0	0,0

Nota: Foram analisadas amostras derivadas apenas de um mês em cada população.

5. DISCUSSÃO

No Brasil, o monitoramento da resistência a inseticidas em populações *Ae. aegypti* tem sido de suma importância para o manejo racional do controle químico efetuado em campo. Visto que a partir do final da década de 1990 diversas populações foram detectadas com resistência a inseticidas utilizados no país, tornou-se necessária, rotineiramente, a quantificação da resistência aos principais inseticidas em populações brasileiras do vetor da dengue. Este acompanhamento vem sendo realizado por laboratórios, principalmente os pertencentes à Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes Aegypti*, a Rede MoReNAa, e os resultados obtidos subsidiam as decisões do Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD) perante o controle químico efetuado em campo.

Esta dissertação objetivou acompanhar a dinâmica do *status* de resistência, ao longo de um ano, de populações de quatro regiões do país (Duque de Caxias/RJ, Parnamirim/RN, Campo Grande/MS, Santarém/PA) aos três principais inseticidas utilizados em campo para controle de *Ae. aegypti*. Para isto, as populações estudadas foram submetidas a bioensaios empregados na rotina da Rede MoReNAa para quantificar a resistência aos larvicidas temephos (OPs) e diflubenzuron (CSI) e ao adulticida deltametrina (PI), procurando ainda correlacionar estes resultados com o histórico de utilização de inseticidas nas regiões. Também foram investigados os mecanismos responsáveis pela resistência, considerados fundamentais para o manejo, em função de sua potencial contribuição para a resistência cruzada com inseticidas de classes diferentes. Os mecanismos avaliados foram: resistência metabólica e a resistência por alteração do sítio alvo.

Vale ressaltar que o levantamento do histórico de uso público de inseticidas nas regiões estudadas foi feito somente para o controle de dengue. É possível que ocorram aplicações de inseticidas em campo para controle de outras doenças transmitidas por vetores, e que isso afete diretamente a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*, sem que tenha sido contemplado aqui. Alguns exemplos são o controle químico de leishmanioses - doença com histórico de notificações em Santarém/PA - e de malária - com histórico de notificações em Campo Grande e Duque de Caxias - (Fonte: Sinan-Net 2012). Além disso, ocorrem aplicações de inseticidas por iniciativa privada, principalmente UBV com piretróides, notadamente em empresas, condomínios e vilas.

Confirmamos, por meio de bioensaios, alteração na susceptibilidade das populações avaliadas ao temephos (principal larvicida utilizado em campo desde 1967), corroborando não só estudos anteriores que mostram resistência disseminada em populações brasileiras de *Ae. aegypti* a este OP (Macoris et al 1999, Lima et al 2003, 2006, Braga et al 2004, Carvalho et al 2004, Beserra et al 2007, Montella et al 2007, Melo-Santos et al 2010, Lima et al 2011, Prophiro et al 2011) como

também dados do Ministério da Saúde que apontam para alteração de susceptibilidade ao temephos em 90% das populações brasileiras, de acordo com avaliação da Rede MoReNAa (MS/SVS 2009d). Na América Latina esse quadro de resistência a OPs também é observado, com relatos em países como Colômbia, México, Cuba, Caribe e Argentina (Mazzari 1995, Suarez et al 1998, Rodríguez et al 2002, Biber et al 2006, Flores et al 2006, Ocampo et al 2011, Marcombe et al 2011, 2012). Detectamos as maiores RR_{95} para temephos nas localidades de Duque de Caxias/RJ e Santarém/PA. Apesar disto, observamos tendência à diminuição do *status* de resistência a temephos em todas as populações avaliadas. Esta queda porém foi lenta e em alguns casos inconstante, variou entre as populações e, ao final das análises, não houve redução para RR_{95} abaixo do valor 3,0 em nenhuma das localidades, indicando impossibilidade da volta do uso de temephos, de acordo com os critérios estabelecidos no país (MS/SVS 2006).

Comparação dos coeficientes angulares (*slopes*) nos diferentes meses avaliados possibilitou ainda avaliar a heterogeneidade genética das populações em relação ao *status* de susceptibilidade ao temephos. Ao longo do estudo observamos, em paralelo com a diminuição das RRs , tendência à recuperação da heterogeneidade das populações, traduzida por diminuição dos valores dos *slopes*. Com exceção de Santarém/PA, cuja SMS relatou manutenção do uso de temephos, a interrupção da utilização deste OP justifica os resultados encontrados. Visto que a pressão exercida pelo inseticida em campo seleciona os indivíduos resistentes, a frequência dos suscetíveis diminui, o que torna a população mais homogênea. Assim, se a resistência compromete o desenvolvimento e a viabilidade dos indivíduos, e considerando que a vantagem dos resistentes só se manifesta na presença de inseticida, então, quando ocorre a interrupção no uso destes compostos em campo, os suscetíveis, com *fitness* maior, passam a aumentar em frequência, tendendo a recuperar a susceptibilidade ao inseticida ao longo do tempo.

Lima e colaboradores (2011) estudando populações de *Ae. aegypti* do Ceará/NE, também observaram uma queda da resistência ao temephos após interrupção de uso em campo na população de Juazeiro do Norte. A RR_{95} caiu em torno de 30% em seis anos, de 10,4 em 2003 para 7,4 em 2009. Neste mesmo trabalho, foi observado em populações do vetor de outras duas localidades, Crato e Barbalha, que mantiveram temephos durante o período, de 2003 a 2009, aumento da RR_{95} , de 7,5 para 30,0 em Barbalha e de 9,0 para 192,7 em Crato. Wirth e Georghiou (1999) obtiveram resultados semelhantes, de queda na resistência após 10 anos de interrupção do uso do temephos em campo, na população de Tortola, uma pequena ilha do Caribe. A RR_{90} , de 46,8 em 1985 (Georghiou et al 1987) decresceu para 6,3 em 1995/6 (Rawlins 1998). Dados da Rede MoReNAa também apontam, por exemplo, queda na resistência ao temephos em *Ae. aegypti* de Natal/RN (em cuja região metropolitana

se localiza Parnamirim, um dos municípios aqui avaliados), após sua substituição por *Bti* em 2005: a RR_{95} em 2004 de 18,6 (Montella 2007) foi reduzida para 8,2 em 2007 (MS/SVS 2006).

Recentemente, Melo-Santos e colaboradores (2010) simularam diferentes estratégias para estudar a reversão da resistência ao temephos em uma população de *Ae. aegypti* pressionada em laboratório com este OP. Duas estratégias testadas - apenas a interrupção do uso do temephos ou sua interrupção combinada com a introdução de 30% indivíduos com baixos níveis de resistência - embora tenham resultado em reduções significativas da resistência, não foram suficientes para retorno ao *status* de susceptibilidade. Para a terceira estratégia, de introdução de 50% de indivíduos susceptíveis, ocorreu recuperação total de susceptibilidade. Os autores, no entanto, admitem a improbabilidade de repetição deste evento em condições naturais: se, por um lado, a resistência está associada a um provável custo no *fitness*, por outro, a migração de indivíduos resistentes de ambientes próximos contribuiria para manutenção da resistência das populações ao temephos.

Embora existam alguns relatos de aumento da viabilidade em insetos resistentes (Rivero et al 2010), em *Ae. aegypti* são escassos os trabalhos associando estes dois aspectos, e nestes, não foram observados ainda ganhos na aptidão. Belinato e colaboradores (2012) avaliaram duas populações brasileiras de *Ae. aegypti*, ambas classificadas como resistentes a deltametrina por meio de ensaios tipo dose-diagnóstica, e com diferentes níveis de resistência a temephos. As populações estudadas foram Aparecida de Goiânia/GO, cuja RR_{95} para temephos era de 19,2 e Boa Vista/RR, com RR_{95} de 7,4. O estudo revelou maior comprometimento na viabilidade da população com maior nível de resistência a temephos. Foi observada interferência em quatro parâmetros: taxa de aceitação do repasto sanguíneo, quantidade de sangue ingerido, número de ovos e taxa de fêmeas inseminadas. Para a população de Boa Vista, com menor RR_{95} , detectou-se alterações em apenas dois parâmetros, as taxas de aceitação do repasto sanguíneo e de fêmeas inseminadas. Em relação a este último parâmetro, frequência de fêmeas inseminadas, foi observada uma clara relação com o nível de resistência ao temephos: enquanto a cepa suscetível Rockefeller apresentou 100% de sucesso de cópula entre os machos, Boa Vista teve um sucesso de 93% e Aparecida de Goiânia apenas 32%, nas condições do ensaio. Embora os resultados indiquem, de forma geral, relação entre alteração no *fitness* de *Ae. aegypti* e nível de resistência ao temephos, não é possível atribuir apenas ao *status* de susceptibilidade a este inseticida as alterações encontradas, uma vez que ambas populações também são resistentes ao PI deltametrina.

Martins e colaboradores (2012) recentemente também investigaram a dinâmica da resistência a inseticidas e o seu custo no *fitness* de cinco populações de campo e de uma linhagem de *Ae. aegypti*, esta última selecionada em laboratório com deltametrina por nove gerações. Foram

avaliados parâmetros como desenvolvimento larval, razão sexual, longevidade dos adultos, quantidade de sangue ingerida, taxa de ovoposição, tamanho da postura e a viabilidade dos ovos. Nas populações de campo esses parâmetros apresentaram apenas discretas alterações, porém diretamente proporcionais ao nível de resistência. Já na linhagem selecionada em laboratório, diversos parâmetros da viabilidade foram fortemente afetados. Esse trabalho também relaciona a resistência a inseticidas com custo no *fitness* e chama atenção para uma questão importante: linhagens selecionadas artificialmente em laboratório podem acumular efeitos deletérios bem mais expressivos do que aqueles observados em populações naturalmente selecionadas, em situação de campo.

Rivero e colaboradores (2011) quantificaram os custos energéticos (lipídeos, glicogênio e glicose), sobre larvas e fêmeas adultas de *Culex pipiens*, da resistência a inseticidas OP por meio de dois mecanismos diferentes: superprodução de Esterases, enzimas que participam da resistência metabólica, e modificação na Acetilcolinesterase. Com relação à superprodução de Esterases, como esperado a partir da teoria do *trade-off*, houve desvio de 30% de recursos energéticos. No entanto, no caso da resistência por alteração de Acetilcolinesterase, alvo de OP, também observou-se redução de pelo menos 20% de reservas, que os autores atribuíram ser consequência de uma hiperativação do sistema nervoso. De fato, apesar deste déficit não ter sido descrito em *Ae. aegypti*, reduções de recursos energéticos podem ser responsáveis pelas desvantagens apresentadas por insetos resistentes em relação aos sensíveis na ausência de inseticida em campo causando, ao longo do tempo, queda da resistência.

Nesta dissertação também quantificamos o *status* da resistência a um outro larvicida utilizado em campo no país, o diflubenzuron. Em relação a este IGR, que é um Inibidor de Síntese de Quitina (CSI), diferente do que observamos para temephos, as populações se encontram naturalmente mais homogêneas que a cepa referência Rockefeller (*slopes* com valores maiores do que para Rockefeller). Em consequência, as RR_{50} , foram maiores que as RR_{95} em todos os casos. Este fato indica que os indivíduos potencialmente resistentes a diflubenzuron se encontram em frequência muito baixa nas populações, o que pode ser visto como uma característica vantajosa em termos de controle em campo.

Os bioensaios do tipo dose-resposta com diflubenzuron efetuados neste estudo confirmaram a eficácia de CSIs sobre *Ae. aegypti*, já descrita previamente (Baruah e Das 1996, Ansari et al 2005, Arredondo-Jiménez e Valdez-Delgado 2006, Martins et al 2008, Belinato et al 2009, Fontoura et al 2012). O efeito primário, e dose-dependente, destes compostos é a inibição da emergência (IE). Também foi observado que a mortalidade no estágio de larva se eleva com o

aumento das doses, ou seja, quanto maior a dose, mais precoce; por outro lado a mortalidade de adultos ocorre principalmente nas doses menores. Tais efeitos também foram relatados anteriormente em outros estudos (Mulla et al 2003, Martins et al 2008, Belinato et al 2009, Fontoura et al 2012).

Em todas as análises ao longo do estudo as RR_{95} para o diflubenzuron se mantiveram abaixo de 3,0, e aparentemente não apresentaram variações significativas. Este IGR foi recentemente incorporado na rotina do controle no país como inseticida alternativo para as populações de *Ae. aegypti* resistentes ao temephos (MS/SVS 2009b). Ao contrário daquele OP, ainda não se conhece o nível de resistência a diflubenzuron acima do qual o controle pode estar comprometido e, em consequência, o ponto de corte (valor da RR_{95}) acima do qual o Ministério da Saúde recomendaria substituição. Fontoura e colaboradores (2012) realizaram simulados de campo para avaliar a eficácia do novaluron (outro composto CSI) sobre populações com diferentes níveis de resistência ao temephos. Destas, novaluron foi efetivo sobre a população com maior RR_{90} testada, de 1,7. Uma vez que as RR s obtidas em nosso estudo foram um pouco maiores que aquelas até então observadas, seria necessário realizar novos ensaios simulados campo, para avaliar o impacto dos níveis de alteração hoje encontrados sobre a eficácia deste IGR. De toda forma, a recente introdução de diflubenzuron em campo no país e seu mecanismo de ação distinto dos inseticidas convencionais, provavelmente elicitando também mecanismos de resistência diferentes, podem ser a justificativa para os baixos índices de resistência encontrados nas populações estudadas.

Braga e colaboradores (2005) avaliaram o efeito de methoprene, um IGR de outro grupo, um Análogo do Hormônio Juvenil (AHJ), sobre *Ae. aegypti* da cepa Rockefeller. Estes compostos, que já foram propostos como alternativas para controle de larvas pelo PNCD no país, também têm como efeito a inibição da emergência. Entretanto, diferentemente dos CSIs, provocam maior mortalidade na fase de pupas. A eficácia de methoprene sobre populações resistentes a temephos também foi confirmada (Braga et al 2005), sustentando que a utilização dos IGRs em campo, como alternativa de larvicidas para populações de *Ae. aegypti* resistentes a OP, em princípio se revela promissora no escopo do controle deste vetor no país.

No Brasil, com exceção do estado de São Paulo, os piretróides foram primeiramente usados como adulticidas a partir do ano 2000-2001, depois da confirmação de disseminação da resistência aos organofosforados em populações brasileiras (Funasa 1999c). Esta decisão foi tomada como estratégia de manejo para expor as fases de larvas e adultos de *Ae. aegypti* a compostos com diferentes mecanismos de ação. O monitoramento da resistência das populações brasileiras a piretróides tem sido realizado desde 2000, quando ocorreu o primeiro relato no país de alteração de susceptibilidade a piretróides em *Ae. aegypti*, por Macoris (2000), em populações de São Paulo. Logo

em seguida, da-Cunha e colaboradores (2005) verificaram outras populações brasileiras que se enquadravam no critério de resistentes. Desde então, a resistência a PIs foi detectada em diversas regiões do país (Luna et al 2004, Macoris et al 2007, Martins et al 2009a, Lima et al 2011).

Nesta dissertação também foi quantificado o *status* de resistência das quatro populações de *Ae. aegypti* ao adúltida deltametrina (PI). Vale salientar que, em adição ao uso público de piretróides, avaliado em nossas análises, ocorre intensa utilização doméstica, que atualmente não há como estimar. Três das quatro populações estudadas, Duque de Caxias/RJ, Campo Grande/MS e Santarém/PA, apresentaram resistência extremamente alta a deltametrina, com RR_{95} acima de 35,0 ao longo de todo o estudo. A única população que apresentou *status* de resistência mais baixo, porém não menos relevante, foi Parnamirim/RN, cujos valores de RR_{95} variaram entre 10,0 e 14,0, aproximadamente.

Ensaio moleculares no gene do canal de sódio regulado por voltagem (*AaNav*), para diagnosticar mutações relacionadas com a resistência a PI, foram efetuados de modo a correlacionar com os bioensaios com adultos. As posições investigadas foram 1016 e 1011 no domínio II segmento 6 (IIS6) e a posição 1534 no IIS6. A posição 1016, onde ocorre a substituição de uma valina por uma isoleucina (Val1016Ile), foi investigada mensalmente. Esta mutação já foi relacionada com a resistência a piretróides em populações de *Ae. aegypti* brasileiras (Martins et al 2009a) e de outros países da América Latina (Saavedra-Rodriguez et al 2007, Marcombe et al 2009). A mutação Ile1011Met, cuja contribuição para a resistência a PI ainda não está completamente elucidada (Martins et al 2009b), foi analisada nos meses inicial e final para cada população. A terceira mutação, Phe1534Cys, de detecção muito recente no país, até o momento foi avaliada em apenas um mês. Esta mutação já foi relacionada à resistência a PI em *Ae. aegypti* da ilha Grand Cayman e da Tailândia. Contudo, nestes trabalhos, e também nas populações de Duque de Caxias/RJ e Campo Grande/MS (ver abaixo) a mutação Phe1534Cys está associada a mutações na posição 1016, Val1016Ile ou Val1016Gly, com frequências alélicas mutantes altas (Harrys et al 2010, Yanola et al 2011), o que interfere com tentativas de correlacionar a mutação '1534' aos altos níveis de resistência a PI encontrados.

Com exceção de Parnamirim/RN, todas as outras populações avaliadas neste estudo apresentaram resistência extremamente alta a deltametrina, Duque de Caxias/RJ e Campo Grande/MS, as frequências alélica e genotípica da mutação Val1016Ile foram muito elevadas e a maioria dos indivíduos avaliados era homocigota mutante. Martins e colaboradores (2009a, b) já haviam verificado, em Nova Iguaçu/RJ, município muito próximo de Duque de Caxias/RJ, que até o ano de 2003 a mutação Val1016Ile não estava presente na região. No entanto, em 2008, a frequência

alélica de 1016Ile foi 62,5%. Dois anos depois, já no período do nosso estudo, a frequência foi de 70%, chegando a 95% em alguns meses. Aumento rápido também foi verificado em Campo Grande/MS: Martins e colaboradores (2009a) detectaram frequência alélica de 31,8% para 1016Ile nesta população em 2008. Em nosso estudo, em 2010, encontramos valores acima de 80%, sugestivos de rápida disseminação desta mutação na região.

Com relação à posição 1011, onde é encontrada mutação cuja relação com a resistência não está esclarecida, observamos, para as duas populações, Duque de Caxias/RJ e Campo Grande/MS, baixa frequência do alelo mutante 1011Met. Por outro lado, a mutação Phe1534Cys, assim como a Val1016Ile, está disseminada em ambas as populações, com a maioria dos indivíduos homozigotos mutantes (frequência alélica mutante 1534Cys acima de 95%). Esses resultados sugerem que os níveis extremamente altos de resistência a PI encontrados em Duque de Caxias/RJ e Campo Grande/MS resultam de efeito “somado” das duas mutações, Val1016Ile e Phe1534Cys, assim como descrito recentemente em outro estudo (Harrys et al 2010). Uma peculiaridade observada nestas duas populações foi que as maiores RR_{95} para deltametrina ocorreram justamente no pico de casos de dengue nas regiões, embora nestes períodos não houvesse registro de intensificação da utilização pública de adulticidas PI, de acordo com relatos das SMS. É provável que a participação do uso doméstico de PI durante os períodos de maior incidência de dengue tenha grande impacto sobre o *status* de resistência das populações do vetor.

A população de Santarém/PA, apesar da elevada resistência identificada pelos bioensaios (RR_{95} entre 30,0 e 50,0) e de diversas aplicações em campo de piretróides (dados da SMS de Santarém/PA), não apresentou a mutação Val1016Ile em nenhum dos meses analisados, além apresentar uma baixa frequência da mutação Ile1011Met. Contudo, a análise desta população para a mutação Phe1534Cys, revelou 100% dos indivíduos homozigotos mutantes (genótipo Cys/Cys). Este é o primeiro relato de uma população de *Ae. aegypti* com a mutação Phe1534Cys, não associada com a mutação na posição 1016. Os resultados sugerem uma possível correlação entre a resistência a deltametrina e a mutação Phe1534Cys.

A localidade com menor resistência a PI encontrada neste estudo foi Parnamirim/RN. Neste município, a mutação 1016Ile foi observada em baixa frequência, permanecendo abaixo de 10% ao longo de todo o estudo. Vale ressaltar que mutação nesta posição não havia sido detectada no Nordeste do Brasil em pesquisas anteriores ao ano de 2010 (Martins et al 2008, 2009a); recentemente foi descrita nas populações de Crato e Juazeiro do Norte, ambas no Estado do Ceará (Lima et al 2011). Isto indica que esta mutação está apenas começando a se estabelecer na Região Nordeste, explicando as ainda baixas frequências de 1016Ile encontradas em nosso estudo. As RR_{95} a

deltametrina baixas em comparação com os outros municípios avaliados, assim como sua pouca variação ao longo do estudo e a reduzida frequência alélica de 1016Ile (alelo mutante) podem ser função do baixo uso de PI em campo pela SMS e também da ausência de surtos de dengue no período, o que sugere pouca utilização doméstica de inseticidas. Em relação à mutação 1011Met, a maioria dos indivíduos analisada foi heterozigota, acontecimento exclusivo para esta população. É importante mencionar que até o presente momento nosso grupo não detectou indivíduos homozigotos mutantes para a mutação 1011Met; ressalte-se ainda que as outras três populações avaliadas neste estudo apresentaram baixa frequência desta mutação. Nossos resultados sugerem que a participação da mutação Ile1011Met na resistência a PI, caso ocorra, seria conferindo baixos índices. Por outro lado, a frequência alélica da mutação 1534Cys em Parnamirim foi de 35%, a mais baixa entre todas as populações avaliadas, corroborando a hipótese de que esta mutação esteja relacionada com altos níveis de resistência a PI.

O aumento rápido na frequência do alelo recessivo mutante 1016Ile nas populações de Duque de Caxias/RJ e Campo Grande/MS em um curto espaço de tempo é indicativo de uma pressão seletiva muito forte neste período (Saavedra-Rodrigues et al 2007, Martins et al 2009a). Ensaio em laboratório, de pressão de seis populações de *Ae. aegypti* do México com PI por cinco gerações, resultaram em aumento das frequências alélicas 1016Ile em todas as populações: por exemplo, a frequência aumentou de 36% para 72% em Calderitas, de 60% para 100% em Lázaro Cárdenas e de 32% para 94% em Solidaredad (Saavedra-Rodriguez et al 2011). Fato semelhante foi descrito por García e colaboradores (2009) em campo, também no México: a mutação 1016Ile, até 1999 não era encontrada na região, em 2008 já se encontrava com frequência bastante alta. Como exemplo, nas cidades de Monterrey e Mérida Norte/Sul, o alelo 1016Ile não foi detectado em 1998/99, enquanto sua frequência foi de até 50% em 2008. Recentemente, em 2011, frequências alélicas de mais de 90% para 1016Ile foram detectadas em três regiões do país, indicando que esta mutação já se encontra quase fixada em algumas localidades (Siller et al 2011).

As mutações Ile1011Met e Val1016Ile também foram investigadas por Lima e colaboradores (2011) em três localidades do Ceará, no Nordeste do Brasil. Em Barbalha a mutação Val1016Ile não foi detectada. Para as outras duas populações, não foram verificados indivíduos homozigotos mutantes (Ile/Ile); destas, a localidade de Juazeiro do Norte apresentou baixa frequência alélica da mutação Val1016Ile (10%), e a população de Crato destoou das populações do Nordeste em geral, apresentando a maioria dos indivíduos heterozigota para esta mutação (frequência alélica mutante de 44%). Para a mutação Ile1011Met, diferente do observado por nosso grupo, foram detectados indivíduos homozigotos mutantes (Met/Met) nas três localidades. Este trabalho relata

associação significativa da resistência com a mutação na posição 1011 apenas na população de Crato, onde não foram encontrados indivíduos homozigotos mutantes na posição 1016. No entanto, mutação na posição 1534 não foi estudada nestas localidades.

Marcombe e colaboradores (2011) avaliaram o impacto da resistência diagnosticada em laboratório sobre o controle efetuado em campo com piretróides, utilizando UBV e forneceram, pela primeira vez, evidências de que a resistência pode reduzir seriamente a eficácia da utilização destes compostos. A avaliação das aplicações em campo foi feita com a instalação de gaiolas sentinela contendo populações locais resistentes a PIs e uma cepa sensível, em casas de nove regiões da Martinica. A mortalidade das populações resistentes foi muito baixa (em torno de 10%) quando comparada à cepa sensível (mortalidade entre 47-63%). A ineficácia da aplicação de UBV foi confirmada com os dados obtidos de armadilhas para adultos instaladas por três rodadas, antes e depois do UBV em campo: não houve uma diminuição do número de fêmeas adultas capturadas em armadilhas durante o período. Além disso, também não foi observada qualquer redução nos índices de larvas nas localidades tratadas. Os autores concluem que o tratamento com PIs é ineficaz para reduzir a densidade de mosquitos e a transmissão do vírus em áreas onde a resistência a piretróides já esteja presente.

Paralelamente à quantificação da resistência e à detecção de mutações no alvo de PI, ensaios bioquímicos foram realizados para investigar alterações no alvo de OP e em enzimas responsáveis pela detoxificação de xenobióticos. Procurou-se correlacionar os resultados principalmente com a resistência aos inseticidas temephos e deltametrina, uma vez que não foram detectadas alterações significativas da susceptibilidade a diflubenzuron.

Apesar das quatro populações estudadas estarem com susceptibilidade alterada ao larvicida temephos – a menor RR_{95} encontrada foi 4,6 - não observamos, na atividade das enzimas detoxificantes durante o 3º estadio larval, nenhum aumento ‘diagnóstico’ de resistência a OP no conjunto das populações. Dependendo do grupo de Rockefeller (“Rock total” ou “Rock placas”) utilizado como ponto de corte para as populações de campo, os resultados divergiram. As análises utilizando “Rock total” não revelaram muitas alterações, e estes resultados foram atribuídos a variações na criação das larvas. Por outro lado, consideramos que os resultados obtidos utilizando “Rock placas” foram mais rigorosos: além deste grupo controle ter sido criado em paralelo com as populações de campo, os ensaios foram realizados simultaneamente, nas mesmas placas. Comparação com estes controles identificaram alterações em todas as famílias de enzimas avaliadas, em diferentes populações e momentos. Foi observada ainda maior atividade da acetilcolinesterase, alvo de OP, na população de Santarém.

Correlação entre os resultados obtidos com os ensaios bioquímicos e a tendência de queda do *status* de resistência para temephos, verificada nos ensaios biológicos para todas as populações avaliadas, não revelou um perfil único para as populações. Os perfis foram distintos mesmo quando apenas as populações que mais apresentaram queda na resistência a este composto, Duque de Caxias/RJ e Campo Grande/MS, foram consideradas: enquanto Campo Grande apresentou tendência de queda na atividade das esterases e da GST, em Duque de Caxias apenas a esterase PNPA acompanhou a tendência de queda na resistência a temephos. Com relação às outras duas populações, Parnamirim e Santarém, cujo decréscimo na resistência ao OP foi mais discreto, em torno de 15%, também houve diversidade de resultados: em Parnamirim apenas a atividade de MFO decaiu, enquanto Santarém não revelou qualquer tendência. Comparação, para cada população, com os resultados obtidos no último momento avaliado, objetivaram confirmar tendências observadas de queda na alteração de algumas famílias enzimáticas. Com esta ferramenta foi possível confirmar a queda na atividade de PNPA em Duque de Caxias, de MFO em Parnamirim e das Esterases ALFA e BETA em Campo Grande. Em função destes diferentes resultados exibidos pelas populações avaliadas, não foi possível estabelecer uma correlação diagnóstica de uma atividade que esteja contribuindo preferencialmente para a resistência a OPs. Vale ainda ressaltar que as alterações de PNPA e, principalmente, de GST observadas podem ser reflexo, nas larvas, de resistência a deltametrina, o que necessitaria de investigações posteriores.

Por outro lado, os ensaios bioquímicos com adultos detectaram alterações em GST e PNPA nas quatro populações, em vários momentos, usando os dois pontos de corte, baseados em “Rock total” e “Rock placas”. Estes resultados corroboram trabalhos anteriores do laboratório que relacionaram a resistência a piretróides em populações de campo brasileiras com aumento de atividades GST e PNPA (Montella et al 2007, Viana-Medeiros 2011). Em adição, estas enzimas exibiram maior heterogeneidade nas populações de campo em relação à linhagem Rockefeller. Em adultos, além destas, outras atividades enzimáticas foram detectadas, com moderadas alterações em alguns momentos, nas quatro populações. Neste caso, resta definir se as alterações observadas são relacionadas à resistência de larvas destas mesmas populações a temephos ou se correspondem de fato à resistência dos adultos à deltametrina.

Não foi possível estabelecer, em adultos, correlação direta entre perfis de resistência metabólica e a presença de mutações no $AaNa_v$. Há evidências de que a contribuição das alterações no $AaNa_v$ para a resistência a PI é muito mais significativa e tem menor custo do que as enzimas detoxificantes. Em função disto, admite-se que, quando o $AaNa_v$ está alterado, há tendência de que a resistência metabólica seja menos afetada (Saavedra-Rodriguez et al 2011, Brito et al 2012). Das

populações aqui avaliadas, apenas uma, Parnamirim, apresentou baixas frequências de alteração no AaNav. Contudo, as alterações enzimáticas exibidas por esta população foram semelhantes às outras populações.

Assim como Viana-Medeiros (2011), nossos resultados demonstraram maiores atividades da enzima AChE no estágio adulto do que no estágio larval (observar as escalas dos gráficos de AChE para adultos e larvas). A autora justifica esta ocorrência simplesmente em função do maior tamanho, relativo ao corpo, do sistema nervoso dos adultos em comparação ao de larva. Em função disto, sugere que os inseticidas OPs teriam potencial maior de agir sobre a fase de larvas do vetor, fato relevante no âmbito do controle de *Ae. aegypti*, que durante muito tempo no país utilizou exclusivamente o larvicida OP temephos. De fato, apesar de maior atividade relativa de AChE em adultos, Viana-Medeiros (2011) constatou, avaliando ao longo do ciclo de vida de *Ae. aegypti*, modulação desta atividade, ou seja, diferenças de AChE entre Rockefeller e populações de campo, apenas durante o estágio de larvas. Em nosso estudo, à exceção de algumas alterações pontuais de AChE em adultos de Duque de Caxias e Campo Grande, alterações mais consistentes no perfil de AChE foram identificadas apenas em larvas de Santarém (análise “Rock placas”). Assim como alterações na molécula alvo de PI podem colaborar com níveis de resistência mais elevados e acarretar em menores contribuições da resistência metabólica nas populações afetadas (Saavedra-Rodriguez et al 2011, Brito et al 2012), é possível que as alterações em AChE, detectadas em Santarém, possam estar relacionadas às menores alterações metabólicas documentadas nesta população.

Viana-Medeiros (2011), analisando larvas de sete populações naturais de *Ae. aegypti* do Brasil com diferentes níveis de resistência a temephos, identificou alteração principalmente nas atividades ALFA e BETA, ambas já previamente relacionadas à resistência a OPs (Hemingway e Ranson 2000, Montella et al 2007, Molina e Figueiroa 2009, Miyo e Oguma 2010). Todavia, no presente trabalho não foi possível traçar qualquer correlação entre a atividade destas enzimas e o *status* de resistência a OPs. Comparação das atividades enzimáticas entre os estágios de larva e adulto permitiu confirmar maior atividade de ALFA e BETA na fase larval (note, no Anexo 2, que as escalas são distintas para os dois estágios), em consonância com observações anteriores de Lima-Castelani e colaboradores (2004), Souza-Polezzi e Bicudo (2008) e Viana-Medeiros (2011).

Como comentado anteriormente, as populações de campo avaliadas no presente estudo revelaram, por meio de ensaios biológicos do tipo dose-resposta, elevados níveis de resistência a PIs na fase adulta. Nossos resultados dos ensaios moleculares apontam que, das três mutações no gene do canal de sódio investigadas, esta resistência esteja fortemente relacionada com uma, ou duas,

Val1016Ile e/ou Phe1534Cys. Em três das quatro populações avaliadas encontramos pelo menos uma destas mutações, com frequências elevadas de indivíduos homozigotos mutantes. Entretanto, os ensaios bioquímicos detectaram também alteração nas enzimas GST e PNPA na fase adulta, para todas as populações. Vale ressaltar que estas enzimas já foram previamente correlacionadas com a resistência a PIs em outros estudos (Hemingway e Ranson 2000, Li et al 2007, Montella et al 2007, Cuamba et al 2010, Viana-Medeiros 2011). Sugerimos que, nas populações aqui estudadas, múltiplos mecanismos contribuam para a resistência a PI: alterações do sítio alvo e alterações nas enzimas detoxificantes, principalmente GST e PNPA. Foi relevante a observação de que nas três populações que apresentaram as mutações 1016Ile e/ou 1534Cys no sítio alvo, a resistência a deltametrina tenha sido extremamente alta, comparada com Parnamirim/RN, com frequência genotípica apenas moderada de um dos mutantes.

Nosso grupo já havia mostrado que a dinâmica da atividade destas classes enzimáticas, observadas em três rodadas de monitoramento, refletem mudanças dos produtos usados para o controle químico do vetor da dengue no Brasil (Montella et al 2007). Foi assim que a ligeira redução na atividade de ALFA e BETA e, por outro lado, o rápido aumento de PNPA e GST foram interpretados, respectivamente, como resultado da interrupção no uso de temephos para o controle de larvas e da introdução de piretróides no controle de adultos em todo o país. Apesar de ser possível delinear tendências gerais com os ensaios bioquímicos, tentativas de correlacioná-los, localmente, com os bioensaios, principalmente de larvas com OP, não eram bem sucedidas (Montella et al 2007). Mais recentemente, ensaios bioquímicos realizados por Lima e colaboradores (2011) com fêmeas adultas de três populações do Estado do Ceará, sendo duas delas diagnosticadas como resistentes ao PI cipermetrina e uma apresentando resistência incipiente, exibiram alterações nas atividades de GST, ALFA e PNPA. Neste estudo, apesar de uma população (Crato) ter apresentado resistência extremamente elevada para temephos (RR_{95} acima de 190), não foram encontradas alterações expressivas destas classes de atividade quando comparadas às outras populações de campo avaliadas (Juazeiro do Norte e Barbalha), estas com níveis menores de resistência ao temephos. Este é mais um exemplo da dificuldade de correlacionar localmente os resultados deste tipo de ensaio com a resistência a OP. Entretanto, também neste caso, correlação das alterações encontradas com a resistência a PI em adultos, foi possível. Há também o trabalho de Melo-Santos e colaboradores (2010), que analisaram uma população brasileira de *Ae. aegypti* de Recife/PE, pressionada em laboratório com temephos por 17 gerações; em consequência, a RR_{90} inicial, 7,0, chegou a 180,0. Foram identificadas alterações em GST, ALFA E BETA, principalmente no estágio larvar, sendo a primeira atividade bastante proeminente. Os mesmos insetos se mostravam suscetíveis a PIs na fase

adulta. Em nosso estudo, observamos alteração em GST na fase de larva em pelo menos dois dos quatro momentos analisados nas quatro populações estudadas (“Rock placas”). Contudo, não é possível afirmar se estas alterações refletem contribuição de GST para a resistência ao temephos ou se são reflexo das alterações da fase adulta, como já citado anteriormente.

As fortes evidências da contribuição das GSTs na resistência a PIs registradas em populações de *Ae. aegypti* brasileiras não foram observadas em populações da Tailândia também resistentes a este composto. Aumento da MFO na fase adulta foi a principal justificativa para a resistência a PIs encontrada na maioria das populações estudadas naquele trabalho, embora em associação com alterações menos expressivas de Esterases não específicas (Pethuan et al 2007). Esses são alguns resultados que apontam para a variação local do metabolismo que contribui para a resistência.

Saavedra-Rodriguez e colaboradores (2011) acompanharam mudanças na expressão gênica antes, durante e depois de cinco gerações de seleção de seis cepas de *Ae. aegypti* com permetrina (PI) em laboratório. Bioensaios e ensaios moleculares revelaram que a pressão de seleção resultou em aumento simultaneamente das concentrações letais (CL₅₀) para o piretróide e da frequência da mutação Val1016Ile no gene que codifica o canal de sódio. Mudanças na expressão de 290 genes relacionados com a resistência, também foram mensuradas, pela técnica do microarray ‘*Aedes detox*’. Notadamente, houve relação inversa entre o aumento na frequência de 1016Ile e o número de genes diferencialmente transcritos, nas populações. A cepa Iquitos do Peru, que não apresentava o alelo 1016Ile, expressou 51 genes diferencialmente transcritos após a seleção; já as populações do México, que apresentavam a mutação Val1016Ile, obtiveram apenas 10-18 genes transcritos. Nossos resultados não demonstraram, para a população de Parnamirim/RN, na qual as mutações Val1016Ile e Phe1534Cys se encontraram em baixas frequências, alterações mais expressivas nas atividades de enzimas detoxificantes em relação às outras populações, com mutações no canal de sódio. Contudo, é importante ressaltar que o método que utilizamos não permite discriminar espécies moleculares, apenas categorias mais gerais de atividade.

Em resumo, vale destacar que os resultados obtidos a partir dos ensaios bioquímicos de adultos se revelaram mais consistentes do que aqueles do estágio larval, sendo evidenciadas alterações de GST e PNPA nas populações avaliadas no estudo resistentes a PIs (nas duas análises “Rock total” e “Rock placas” na maioria dos momentos investigados). Já para os ensaios de larvas, verificamos algumas limitações em correlacioná-los com os perfis de resistência a OPs.

A avaliação da dinâmica da resistência ao longo de um ano em quatro populações brasileiras de *Ae. aegypti* de quatro regiões distintas do país para os três principais inseticidas

utilizados em campo possibilitou traçar um breve perfil da resistência no território nacional. Em relação ao organofosforado temephos embora tenhamos diagnosticado resistência em todas as populações avaliadas, houve redução deste perfil durante o período avaliado - com ritmo lento, porém consistente. Este fato foi correlacionado com a interrupção de uso deste composto em campo nas regiões, corroborando a hipótese de que a resistência tem um custo no *fitness*. No entanto, a queda observada foi muito suave, e em nenhum caso o *status* das populações retornou a níveis de susceptibilidade. Já para o outro larvicida testado, o inibidor de síntese de quitina diflubenzuron, não foi observada qualquer tendência, e as razões de resistência encontradas ao longo do estudo se mantiveram baixas, provavelmente em função de sua recente introdução no controle no país. Entretanto, apesar de baixas, em alguns casos foram as maiores razões de resistência já vistas por nós em populações de campo; isso ressalta a importância de se conhecer o significado funcional destas RRs e a necessidade de maiores investigações mediante simulados de campo. Para o piretróide deltametrina, utilizado desde 2001 em todo o país no controle de adultos, identificamos um cenário de resistência extremamente alta em populações brasileiras. Em duas localidades, Campo Grande/MS e Duque de Caxias/RJ, correlacionamos as maiores taxas de resistência com os picos de casos de dengue, sendo que em Campo Grande a SMS não utilizou piretróides no período, nas aplicações de UBV para controle de *Aedes aegypti*. O conjunto destas observações sugere forte contribuição do uso doméstico de inseticidas para o agravamento agudo da resistência a piretróides no país. Com relação aos mecanismos envolvidos, foi possível correlacionar mutações em duas posições no sítio alvo de piretróides, o canal de sódio regulado por voltagem (Val1016Ile e Phe1534Cys), a elevados níveis de resistência, de forma disseminada, na maior parte das populações estudadas; foi possível também identificar contribuição das enzimas detoxificantes GST e PNPA-Est na resistência de adultos a deltametrina.

Os resultados obtidos ao longo do projeto apontam para limitações do controle químico, principalmente se usado de forma indiscriminada, ou como principal metodologia de controle de larvas e adultos de *Ae. aegypti*. São crescentes as evidências da necessidade de ações conjuntas com outros tipos de metodologias, como controle mecânico, com a participação popular, e o controle biológico. Acreditamos que a utilização de inseticidas de forma racional seja uma estratégia a ser “somada” aos outros tipos de controle.

6. CONCLUSÕES

- Identificamos uma tendência à queda na razão de resistência a temephos nas populações estudadas após a interrupção da utilização deste composto em campo, em ritmos diferentes entre as localidades. No entanto, nenhuma população apresentou RR_{95} abaixo de 3,0, o ponto de corte adotado pelo Ministério da Saúde para recomendação de interrupção ou permanência do uso de temephos, indicando que as populações estudadas ainda suscitam de utilização de compostos com mecanismos de ação diferentes do OP.
- Não foi possível detectar qualquer tendência nos perfis de susceptibilidade das populações ao CSI diflubenzuron (larvicida utilizado em campo, atualmente, sobre populações do vetor resistentes a temephos). As RR_{95} se mantiveram abaixo de 3,0 ao longo de todo estudo, sugerindo pouca alteração no *status* de susceptibilidade a estes compostos.
- O *status* de resistência ao piretróide deltametrina de todas as localidades estudadas se apresentou alto, sendo que em três das quatro populações estudadas, foram encontradas RR_{95} extemamente elevadas (acima de 35). Observamos, em duas localidades, Duque de Caxias/RJ e Campo Grande/MS, tendência de elevação da resistência durante o pico de casos de dengue, mesmo sem intensificação da aplicação do composto nas localidades, o que sugerimos ser reflexo do uso doméstico de inseticidas.
- Os ensaios bioquímicos com adultos apresentaram resultados mais consistentes do que aqueles do estágio larval, sendo claramente evidenciadas alterações de GST e PNPA em todas as populações avaliadas no estudo, resistentes a PIs. Já para os ensaios de larvas, não foram detectadas alterações diagnósticas de resistência a OP; as populações exibiram perfis distintos de alteração das atividades enzimáticas.
- Observamos forte correlação entre altos níveis de resistência a deltametrina e a frequência de duas mutações no canal de sódio regulado por voltagem, ambas já previamente relacionadas a resistência a piretróides: as mutações Val1016Ile, já descrita anteriormente (Martins et al 2009a) e Phe1534Cys, esta recentemente diagnosticada no país.

7. REFERÊNCIAS

- Agnew P, Berticat C, Bedhomme S, Sidobre C, Michalakakis Y 2004. Parasitism increases and decreases the costs of insecticide resistance in mosquitoes. *Evolution* 58: 579–586.
- Alout H, Djogbénu L, Berticat C, Chandre F, Weill M 2008. Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* Acetylcholinesterase 1 biochemical properties. *Comp Bioch Physiol B Biochem Mol Biol Part B* 150: 271- 277.
- Ansari MA, Razdan RK, Sreehari U 2005. Laboratory and field evaluation of Hilmilin against mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* 21: 432-436.
- Arnaud L, Brostaux Y, Assie LK, Gaspar C, Haubruge E 2002. Increased fecundity of malathion-specific resistant beetles in absence of insecticide pressure. *Heredity* 89: 425-429.
- Arnaud L, Haubruge E 2002. Insecticide resistance enhances male reproductive success in a beetle. *Evolution* 56: 2435-2444.
- Arredondo-Jiménez JI, Valdez-Delgado KM 2006. Effect of Novaluron (Rimon 10 EC) on the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Chiapas, Mexico 2006. *Med Vet Entomol* 20: 377-387.
- Ayyadevara S, Engle MR, Singh SP, Dandapat A, Lichti CF, Benes H, Shmookler Reis TJ, Liebau E, Zimniak P 2005. Lifespan and stress resistance of *Caenorhabditis elegans* are increased by expression of glutathione transferases capable of metabolizing the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Aging Cell* 4: 257–271.
- Baruah I, Das SC 1996. Evaluation of Methoprene (Altosid) and Diflubenzuron (Dimilin) for control of mosquito breeding in Tezpur (Assam). *Indian J Malariol* 33: 61-66.
- Beauty BJ, Marquardt WC 1996. *The biology of disease vectors*. Colorado: University Press of Colorado, 632p.
- Beckage_NE, Marion KM, Walton WE, Wirth MC, Tan FF 2004. Comparative larvicidal toxicities of three ecdysone agonists on the mosquitoes *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles gambiae*. *Arch Insect Biochem Physiol* 57: 111-122.
- Becker N, Ludwig M 1993. Investigation on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *J Amer Mosq Control Assoc* 9: 221–224.
- Belinato TA, Martins AJ, Valle D 2012. Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, no prelo.
- Belinato TA 2007. Efeito de triflumuron – Um inibidor de síntese de quitina – sobre o desenvolvimento e a reprodução de culicídeos vetores de doenças. *Dissertação de Mestrado*. Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz 92pp.
- Belinato TA, Martins AJ, Lima JBP, Lima-Camara TN, Peixoto AA, Valle D 2009. Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 43-47.
- Bergé J, Feyerensen R, Amichot M 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 1701-1705.
- Berticat C, Rousset F, Raymond M, Berthomieu A, Weill M 2002. High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 269: 1413–1416.
- Berticat C, Bonnet J, Duchon S, Agnew P, Weill M, Corbel V 2008. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC Evol Biol* 8: 104.

- Beserra EB, Fernandes CR, de Queiroga M de F, de Castro FP Jr 2007. Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) populations to organophosphates temephosin the Paraíba State, Brazil 2007. *Neotrop Entomol* 36: 303-307.
- Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z 2010. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* 6: e1000833. Disponível em doi:10.1371/journal.ppat.1000833.
- Biber PA, Duenas JR, Almeida FL, Gardenal CN, Almirón WR 2006. Laboratory evaluation of susceptibility of natural subpopulations of *Aedes aegypti* larvae to temephos. *J Am Mosq Control Assoc.* 22: 408–411.
- Bloomquist JR 2009. Insecticides: Chemistries and characteristics. Em “University of Minnesota’s electronic textbook of Integrated Pest Management”. Disponível em <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>.
- Boivin T, D’Hières CC, Bouvier JC, Beslay D, Sauphanor B 2001. Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Ent Exp Appl* 99: 381-386.
- Boudjelida H, Bouaziz A, Soin T, Smagghe G, Soltani N 2005. Effects of ecdysone agonist halofenozide against *Culex pipiens*. *Pestic Biochem Physiol* 83: 115–123.
- Braga IA, Gomes AD, Nelson M, Mello RD, Bergamaschi DP, JM De Sousa 2000. Comparative study between larval surveys and ovitraps to monitor population of *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 347-53.
- Braga IA, Lima JBP, Soares SS, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 199-203.
- Braga IA, Mello CB, Peixoto AA, Valle D 2005. Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) development in laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 435-440.
- Braga IA, Valle D 2007a. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 113-118.
- Braga IA, Valle D 2007b. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 279-293.
- Braga IA, Valle D 2007c. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 295-302.
- Bregues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* 17: 87-94.
- Brito LP, Linss JGB, Lima-Camara TN, Belinato TA, Peixoto AA, Lima JBP, Valle D, Martins AM 2012. Assessing the effects of the *Aedes aegypti* kdr mutation Val1016Ile on pyrethroid resistance and its fitness cost. Submetido.
- Brogdon WG, McAllister JC 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis* 4: 605-613.
- Busvine JR 1951. Mechanism of resistance to insecticides in housefly. *Nature* 168: 193-195.
- Carrière Y, Deland JP, Roff DA, Vincent C 1994. Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. *Proc R Soc Lond B* 258: 35–40.
- Carvalho MSL, Caldas ED, Degallier N, Vilarinhos PTR, Souza LCK, Yoshizawa MAC, Knox MB, Oliveira C 2004. Susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal. *Rev Saúde Públ* 38: 623-629.
- Cassanelli S, Reyes M, Rault M, Carlo Manicardi G, Sauphanor B 2006. Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistance population of the coding moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochem Mol Biol* 36: 642-653.
- Chamberlain WF 1975. Insect growth regulating agents for control of arthropods of medical and veterinary importance. Review. *J Med Entomol* 12: 395-400.
- Chapman RF 1998. The insects: structure and functions. 4th Ed, Cambridge University Press.

- Chau-Mei HO, Shy-Huey WU, Chin-Chen WU 1990. Evaluation of the control of mosquitoes with insect growth regulators. *Kaohsiung J Med Sci* 6: 366-374.
- Chavasse DC, Yap HH 1997. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: WHO. WHO/CTD/WHOPES/97.2.
- Chevillon C, Bernard C, Marquine M, Pasteur N 2001. Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) interaction between recessive mutants and evolution in southern France. *J Med Entomol* 38: 657–664.
- Clark AG, Dick GL, Martindale SM, Smith JN 1985. Glutathione S-transferases from the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*. *Insect Biochem* 15: 35-44.
- Clark AG, Shamaan NA, Dauterman WC, Hayaoka T 1984. Characterization of multiple glutathione transferases from the house fly, *Musca domestica* (L.). *Pestic Biochem Physiol* 22: 51-59.
- Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R 1994. Principais mosquitos de importância sanitária do Brasil. Ed Fiocruz, Rio de Janeiro, 228 p.
- Costa EA 2002. 100 anos depois. Fiocruz. Disponível em: www.fiocruz.br/ccs/especiais/dengue/dengue_artigo.htm.
- Crow JF 1957. Genetics of insect resistance to chemicals. *Annu Rev Entomol* 2: 227-246.
- Cuamba N, Morgan JC, Irving H, Steven A, Wondji CS 2010. High level of pyrethroid resistance in an *Anopheles funesrus* population of the Chokwe District in Mozambique. *PLoS One* 5: e11010.
- D'Amato C, Torres JPM, Malm O 2002. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. *Quim Nova* 25: 995-1002.
- Daborn PJ, Lumb C, Boey A, Wong W, Ffrench-Constant RH, Batterham P 2007. Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 512-519.
- da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444.
- da-Fosencá RR, Johnson WE, O'Brian SJ, Vasconcelos V, Antunes A 2010. Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases. *BMC Evol Biol* 10: 281.
- Davies TG, Field LM, Usherwood PN, Williamson MS 2007. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Mol Biol* 16: 361-375.
- Delgado FX, Britton JH, Onsager JA, Swearingen W 1999. Field assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin and potential synergism with diflubenzuron for control of savanna grasshopper complex (Orthoptera) in Mali. *J Invertebr Pathol* 73: 34-39.
- Donalísio MR, Glasser CM 2002. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. *Rev Bras Epidemiol* 5: 259-272.
- Ferrari JA 2006. Insecticide resistance. The biology of disease vectors. Colorado: University Press of Colorado.
- ffrench-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan, Anthony N 1998. Why there so few resistance-associated mutation target genes? Review. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 1685-1693.
- Flores AE, Grajales JS, Salas IF, Garcia GP, Becerra MH, Lozano S, Brogdon WG, Black WC, Beaty 4th B, 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 22: 672–677.
- Fontoura NG, Bellinato DF, Valle D, Lima JBP 2012. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 387-395.

- Forattini OP 1996. Culicidologia Médica: princípios gerais, morfologia, glossário taxonômico. Ed USP, São Paulo, v1, 548p.
- Forattini OP, Brito M 2003. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. Rev Saúde Públ 37: 676-676.
- Fournier D, Mutero A, Pralavorio M, Bride JM 1993. *Drosophila* Acetylcholinesterase: mechanism of resistance to insecticide. J Biol Chem Interact 87: 233-238.
- Fournet F, Sannier C, Monteny N 1997. Effects of two insect growth regulators on the susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to *Molinema dessetae* (Nematoda: Filarioidea). J Am Mosq Control 13: 40-42.
- Frova C 2006. Glutathione transferase in the genomics era: new insights and perspectives. Biomol Eng 23: 149-169.
- Fukuto TR 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. Environ Health Perspect 87: 245-254.
- Funasa 1999a. Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil 1980-1998. Boletim Eletrônico Epidemiológico Edição Especial. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- Funasa 1999b. Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- Funasa 1999c. Reunião técnica para discutir *status* de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- Funasa 2001. Dengue: Instruções para pessoal de combate ao vetor - Manual de normas técnicas. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- Funasa 2002. Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- García GP, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, Guillermo Bond J, Casas-Martínez M, Ramsey JM, García-Rejón J, Domínguez-Galera M, Ranson H, Hemingway J, Eisen L, Black IV WC 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. PLoS Negl Trop Dis 3: e531.
- Georghiou GP, Wirth M, Tran H, Saume F, Knudsen AB 1987. Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Caribbean area and neighboring countries. J Med Entomol 24: 290-294.
- Glasser CM, Gomes AC 2002. Clima e sobreposição da distribuição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na infestação do Estado de São Paulo. Rev Saúde Públ 36: 166-172.
- Gomes 2002. Vigilância entomológica. Inf epid SUS 11: 79-90.
- Graf JF 1993. The role of insect growth regulators in arthropod control. Parasitol Today 9: 471-474.
- Gubler DJ, Casta-Valez A 1991. A program for prevention and control of epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico and the U.S. Virgin Islands. Bulletin of Pan American Health Organization 25: 237-247.
- Hales S, de Wet N, Maindonald J, Woodward A 2002. Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: An empirical model. Lancet 360: 830-834.
- Harrington LC, Edman JD, Scott TW 2001. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? J Med Entomol 38: 411-422.
- Harris AF, Rajatileka S, Ranson H 2010. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman 2010. Am J Trop Med Hyg 83: 277-284. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0623.
- Harrison CM 1951. Inheritance of resistance of DDT in the housefly, *Musca domestica* (L). Nature 167: 855-856.

- Hartberg WK, Craig GB Jr 1970. Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitoes. II. Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. *Evol* 24: 692-703.
- Hemingway J, Ranson H 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 45: 371-391.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 34: 653-665.
- Hemingway J, Karunaratne SH 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12: 1-12.
- Hertig M, Wolbach SB 1924. Studies on rickettsia-like micro-organisms in insects. *J Med Res* 44: 329-374.
- Honório NA, Lourenço-de-Oliveira R 2001. Frequências de larvas e pupas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em armadilhas, Brasil. *Rev Saúde Públ* 35: 385-391.
- Huber K, Luu Le L, Tran Huu H, Tran Khan T, Rodhain F, Failloux AB 2000. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L., 1762) (Diptera: Culicidae) le principal vecteur des virus de la dengue au Vietnam: écologie, structure génétique, compétence vectorielle et résistance aux insecticides. *Ann Soc Entomol Fr* 36: 109-120.
- Jasen CC, Beebe NW 2010. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. Review. *Microbes Infect* 12: 272-279.
- Jowett T 1986. Preparation of nucleic acids. In: *Drosophila: A Practical Approach*. Ed Roberts DB, Oxford, 275-286
- Kakani EG, Bon S, Massouilié J, Mathiopoulos KD 2011. Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 41: 150-158.
- Kambris Z, Cook PE, Phuc HK, Sinkins SP 2009. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science* 326: 134-136.
- Kasai S, Komagata O, Okamura Y, Tomita T 2009. Alternative splicing and developmental regulation of glutathione transferases in *Culex quinquefasciatus* Say. *Pest Biochem Physiol* 94: 21-29.
- Kasai S, Ng LC, Lam-Phua SG, Tang CS, Itokawa K, Komagata O, Kobayashi M, Tomita T 2011. First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus*. *Jpn J Infect Dis* 64: 217-21.
- Klungthong C, Zhang C, Mammem MP, Ubol S, Holmes EC 2004. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology* 329: 168-179.
- Konno RH, Omoto C 2006. Fitness cost associated with carbosulfan resistance in *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera : aphididae). *Neotrop Entomol* 35: 246-250.
- Kuno G 2010. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. Review. *J Med Entomol* 47: 957-971.
- Labbé P, Berthomieu A, Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T, Weill M 2007. Independent duplications of the Acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol* 24: 1056-1067.
- Li B, Wang YH, Liu HT, Xu YX, Wei ZG, Chen YH, Shen WD 2010. Genotyping of Acetylcholinesterase in insects. *Pest Biochem Physiol* 98: 19-25.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR 2007. Molecular mechanism of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52: 231-253.
- Lima JBP, da-Cunha M, Silva-Jr RCS, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the States of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68: 329-333.

- Lima EP, de Oliveira Filho AM, de Oliveira Lima JW, Ramos Júnior AN, de Góes Cavalcanti LP, Pontes RJ 2006. *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará State. Rev Soc Bras Med Trop 39: 259-263.
- Lima EP, Paiva MH, De Araújo AP, Da Silva EV, Da Silva UM, De Oliveira LN, Santana AE, Barbosa CN, De Paiva Neto CC, Goulart MO, Wilding CS, Ayres CF, De Melo Santos MA 2011. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. Parasit Vectors 12: 5-16.
- Lima-Castelani AR, Ceron CR, Bicuda HE 2004. Variation of genetic expression during development, revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Biochem Genet 42: 69-84.
- Loke SR, Andy-Tan WA, Benjamin S, Lee HL, Sofian-Azirum M 2010. Susceptibility of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and temephos. Trop Biomed 27: 493-503.
- Löwy I 1990. Yellow fever in Rio de Janeiro and the Pasteur Institute Mission (1901-1905): the transfer of science to periphery. Hist Med 34: 144-163.
- Löwy I 1999. Representing and intervening in public health: viruses, mosquitoes and Rockefeller Foundation experts in Brazil. História, Ciências, Saúde Manguinhos 5: 647-677.
- Luna JED, Martins MF, Anjos AF, Kuwabara EF, Navarro-Silva MA 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil. Rev Saúde Pública 38: 842-843.
- Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Flasser C, Garbeloto VC, Cirino CB 1999. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saúde Pública 33: 521-522.
- Macoris MLG, Andrighetti MT, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from State of Sao Paulo, Brazil, to organophosphate insecticides. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 703-708.
- Macoris ML, Andrighetti MT, Otrera VC, Carvalho LR, Caldas Júnior AL, Brogdon WG 2007. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. Mem Inst Oswaldo Cruz 102: 895-900.
- Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, Brengues C, Yébakima A, Ranson H, Corbel V, David JP 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). BMC Genomics 10: 494.
- Marcombe S, Darriet F, Tolosa M, Agnew P, Duchon S, Etienne M, Yp Tcha MM, Chandre F, Corbel V, Yébakima A 2011. Pyrethroid resistance reduces the efficacy of space sprays for dengue control on the island of Martinique (Caribbean). PLoS Negl Trop Dis 5: e1202.
- Marcombe S, Mathieu RB, Pocquet N, Riaz M-A, Poupardin R, Sélior S, Darriet F, Raynaud S, Yébakima A, Corbel V, David JP, Chandre F 2012. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. PLoS ONE 7: e30989. doi:10.1371/journal.pone.0030989.
- Martinez-Torres E 1998. Dengue y dengue hemorrágico. Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes. Habana, 296 p.
- Martins AJ, Belinato TA, Lima JB, Valle D 2008. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. Pest Manag Sci 64: 676-680.
- Martins AJ, Lima JB, Peixoto AA, Valle D 2009a. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. Trop Med Int Health 14: 1351-1355.
- Martins AJ, Lins RM, Linss JG, Peixoto AA, Valle D 2009b. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. Am J Trop Med Hyg 81: 108-115.
- Martins AJ, Valle D 2011. The pyrethroid knockdown resistance. Insecticides. Basic and Other Applications 2: 17-38 298 p. Disponível em <http://www.intechopen.com/books/insecticides-basic-and-other-applications>

- Martins AJ, Ribeiro CD, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D, Lima JB 2012. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. PLoS One 7: e31889.
- Mazzari MB, 1995. Revisión del estado actual de la resistencia en *Aedes aegypti* a insecticidas utilizados en salud pública. Boletín de la dirección de malariología y saneamiento ambiental – Colombia 35: 90–95.
- McCasland CS, Cooper RJ, Barnum DA 1998. Implications for the use of diflubenzuron to reduce arthropod populations inhabiting evaporation ponds of the San Joaquin Valley, California. Bull Environ Contam Toxicol 60: 702-708.
- McElwee JJ, Schuster E, Blanc E, Piper MD, Thomas JH et al 2007. Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. Genome Biol 8: R132.
- McKenzie JA 1996. Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance. RG Landes Company, Austin and Academic Press: San Diego, 185p.
- McMeniman CJ, Lane AM, Fong AWC, Voronin DA, Iturbe-Ormaetxe, Yamada R, McGraw EA, O'Neill SL 2008. Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in mosquito cell lines. Appl Environ Microbiol 74: 6963–6969.
- McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AW, Sidhu M, Wang YF, O'Neill SL 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. Science 323: 141–144.
- Medronho RA, Macrini L, Novellino DM, Lagrotta MT, Câmara VM, Pedreira CE 2009. *Aedes aegypti* immature forms distribution according to type of breeding site. Am J Trop Med Hyg 80: 401–404.
- Melo FL, Romano CM, Zanotto PMA 2009. Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? Plos Negl Trop Dis 3: e390. doi: 10.1371/journal.pntd.0000390.
- Melo-Santos MA, Varjal-Melo JJ, Araújo AP, Gomes TC, Paiva MH, Regis LN, Furtado AF, Magalhaes T, Macoris ML, Andrighetti MT, Ayres CF 2010. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. Acta Trop 113: 180-189.
- Menzio P, Shi MA, Lougarre A, Tang ZH, Fournier D 2004. Mutations of Acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. BCM Evol Biol 4: 4.
- Mian LS, Mulla MS 2002. Biological and environmental dynamics of insect growth regulators (IGRs) as used against Diptera of public health importance. Res Rev 84: 27-112.
- Milani R 1954. Comportamento Mendeliano della resistenza alla azione del DDT e correlazione tra abbattimento e mortalità in *Musca domestica* L. Revista di Parassitologia 15: 513-542.
- Min KT, Benzer S 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. Proc Natl Acad Sci USA 94: 10792–10796.
- Mittal PK 2003. Biolarvicides in vector control: challenges and prospects. J Vect Born Dis 40: 20–32.
- Miyo T, Oguma Y 2010. Contribution of three-site mutations in Acetylcholinesterase and cytochrome P450 to genetic variation in susceptibility to organophosphate insecticide within a natural population of *Drosophila melanogaster*. Pop Ecol 52: 159-169.
- Molina D, Figueiroa LE 2009. Resistencia metabólica a inseticidas organofosforados en *Anopheles aquasalis* Curry 1932, municipio Libertador, Estado Sucre, Venezuela. Biomédica 29: 604-615.
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA, Valle D 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. Am J Trop Med Hyg 77: 467-477.
- Montella IR 2008. Estudos dos mecanismos bioquímicos da resistência a inseticidas em diferentes populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) do Brasil. PhD Thesis, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, 92p.
- Moreira LA, Ormaetxe II, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Mendelin SH, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, Van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL 2009a. A *Wolbachia*

- symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and *Plasmodium*. Cell 139: 1268-1278.
- Moreira LA, Saig E, Turley AP, Ribeiro JMC, O'Neill LS et al 2009b. Human probing behavior of *Aedes aegypti* when infected with a life-shortening strain of *Wolbachia*. PLoS Negl Trop Dis 3: e568.
- Mori A, Lobo NF, Bruyn B, Severson DW 2007. Molecular cloning and characterization of the complete Acetylcholinesterase gene (*ace-1*) from the mosquito *Aedes aegypti* with implications for comparative genome analyses. Insect Biochem Mol Biol 39: 667-674.
- MS/SVS 2005. Guia de vigilância epidemiológica, 6ª Ed, 253 pp. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- MS/SVS 2006. Reunião técnica para discutir *status* de resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas. Rio de Janeiro: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- MS/SVS 2009a. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue, 1ª Ed, 157 pp. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- MS/SVS 2009b. Uso do larvicida diflubenzuron (PM25%) para controle de *Aedes aegypti*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília. Nota técnica nº 015/2009 CGPNCD/DIGES/SVS/MS.
- MS/SVS 2009c. Estudo multicêntrico para avaliação de armadilhas de oviposição e captura de adultos de *Aedes aegypti*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília. Nota técnica nº 0155/2009 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS.
- MS/SVS 2009d. Reunião para discutir e avaliar os resultados do monitoramento do *Aedes aegypti* a inseticidas do período 2008 a 2009. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Fortaleza/CE. 28 a 30 de julho de 2009.
- MS/SVS 2011a. Balanço dengue. Informe técnico. 1: 1–12. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- MS/SVS 2011b. Portaria nº 104, de 25 de janeiro de 2011. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt0104_25_01_2011.html.
- Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, Chomposri J, Zaim M, Su T 2003. Laboratory and field evaluation of novaluron, a new acylurea insect growth regulator, against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Vector Ecol 28: 241-254.
- Murataliev MB, Guzov VM, Walker FA, Feyereisen R 2008. P450 reductase and cytochrome b(5) interactions with cytochrome P450: effects on house fly CYP6A1 catalysis. Insect Biochem Mol Biol 38: 1008–1015.
- Natal D 2002. Bioecologia do *Aedes aegypti*. Biológico 64: 205-207.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG 1990. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz 85: 253.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG 2001. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 96: 925-926.
- Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J, Brogdon W 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colômbia. Acta Tropica 118: 37–44.
- OMS 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807. Genebra, Organização Mundial de Saúde.
- OMS 1997. Executive committee of the directing council the regional committee Pan American World Health 120th Meeting CE120/21. Genebra, Organização Mundial de Saúde.
- OMS 1998. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors; bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. WHO/CDS/CPC/MAL/9812. Genebra, Organização Mundial de Saúde.

- OMS 1999. Chemical hazards in drinking-water – diflubenzuron. Genebra, Organização Mundial de Saúde. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/diflubenzuron/en/index.html.
- OMS 2006. Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance. 6th Ed WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.1. Genebra, Organização Mundial de Saúde.
- OMS 2007. The use of DDT in malaria vector. WHO position statement. WHO/HTM/GMP/2007. Genebra, Organização Mundial de Saúde.
- OMS 2012. Dengue and severe dengue. Fact sheet N° 177, January 2012. Genebra, Organização Mundial de Saúde. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
- Osanaí CH, Travassos-da-Rosa APA, Amaral S, Passos ACD, Tauil PL 1983. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Rev Inst Med Trop São Paulo 1: 53-54.
- Ortiz MPR, Voss JJ 2005. Substrate oxidation by cytochrome p450 enzymes. Cytochrome p450: structure, mechanism and biochemistry. Ed Ortiz de Montellano PR. New York: Kluwer Academic. pp 183–245.
- O'Reilly AO, Khambay BP, Williamson MS, Field LM, Wallace BA, Davies TG 2006. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. Biochem J 396: 255-263.
- Palchick S 1996. Chemical control of vectors. In Beaty JB & Marquardt WC (eds), Biol Dis Vectors, University Press Colorado, Colorado, pp. 502-511.
- Penna MLF 2003. Um desafio para saúde pública brasileira: o controle do dengue. Cad Saúde Pública 19: 305-309.
- Pethuan S, Jirakanjanakit N, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Kaewpa D, Rongnoparut P 2007. Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. Trop Biomed 24: 7-15.
- Polson KA, Brogdon WG, Rawlins SC, Chades DD 2011. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. Acta Trop 117: 31-38.
- POP-LAFICAVE-BIO-001- Recebimento e triagem de amostras do campo para atividades do MoReNAa – rev 00.
- POP-LAFICAVE-BIO-002- Manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório – rev 00.
- POP-LAFICAVE-BIO-004- Bioensaios dose-resposta de temephos sobre larvas de *Aedes aegypti* – rev 00.
- POP-LAFICAVE-BIO-006 – Bioensaios utilizando papéis impregnados com inseticida – rev 00.
- POP-LAFICAVE-BIO-008 – Bioensaios com inibidores de síntese de quitina – rev 01 – julho/2009.
- Popovici J, Moreira LA, Poinsignon A, Iturbe-Ormaetxe I, McNaughton D, O'Neill SL 2010. Assessing key safety concerns of a *Wolbachia*-based strategy to control dengue transmission by *Aedes* mosquitoes. Mem Inst Oswaldo Cruz 105: 957-964.
- Prophiro JS, Silva OS, Luna JE, Piccoli CF, Kanis LA, Silva MA 2011. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. Rev Soc Bras Med Trop 44: 300-305.
- Putnam JL, Scott TW 1995. The effect of multiple host contacts on the infectivity of dengue-2 virus-infected *Aedes aegypti*. J Parasitol 81: 170–174.
- Rajatileka S, Black WC 4th, Saavedra-Rodriguez K, Trongtokit Y, Apiwathnasorn C, McCall PJ, Ranson H 2008. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. Acta Trop 108: 54-57.
- Rao DR, Mani RR, Rajendran R, Joseph AS, Gajanana A, Ruben R 1995. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. J Amer Mosq Contr Assoc 11: 1-5.

- Rawlins SC, 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Rev Panam Salud Publica* 4: 243–251.
- Raymond M 1985. Presentation d'une programme d'analyse logprobit pour microordinateur. *Cahiers Sér Ent Parasitol* 22: 117-121.
- Raymond M, Berticat C, Weill M, Pasteur N, Chevillon C 2001. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica* 112–113: 287–296.
- Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndan AV 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Lancet* 352: 971-977.
- Rivero A, Vézilier J, Weill M, Reas AF, Gandon S 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: When is insecticide resistance a problem? *Plos Pathogens* 6: e1001000. doi: 10.1371/journal.ppat.1001000.
- Rivero A, Magaud A, Nicot A, Vézilier J 2011. Energetic cost of insecticide resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *J Med Entomol* 48: 694-700.
- Rodríguez MM, Bisset J, Ruiz M, Soca A 2002. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J Med Entomol* 39: 882–888.
- Rose RI 2001. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerg Infect Dis* 7: 17-23.
- Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black WC 4th 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 16: 785-798.
- Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Flores Suarez A, Fernandez Salas I, Ranson H, Hemingway J, Black WC 4th 2008. Quantitative trait loci mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 180: 1137-1152.
- Saavedra-Rodriguez K, Suarez AF, Salas IF, Strodes C, Ranson H, Hemingay J, Black IV WC 2011. Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 21: 61-77.
- San Martin JR, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckenoghe A, Dayan GH, Guzmán MG 2010. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg* 82: 128–135.
- Santos MAT, Areas MA, Reyes FGR 2007. Piretróides – uma visão geral. *Alim Nutr Araraquara* 18: 339-349.
- Schatzmayr HG 2000. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 179-181.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Rosa APAT 1986. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 245–246.
- Siller Q, Ponce G, Lozano S, Flores AE 2011. Update on the frequency of Ile1016 mutation in voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 27: 357-362.
- Silva Jr JB, Siqueira Jr JB, Coelho GE, Vilarinhos PT, Pimenta Jr FG 2002. Dengue in Brazil: current situation and control activities. *Epidemiol Bull* 23: 3-6.
- Silva SS, Mariano ZF, Scopel I 2008. A dengue no Brasil e as políticas de combate ao *Aedes aegypti*. Da tentativa de erradicação às políticas de controle. *Hygeia* 3: 163-175.
- Sinan 2012. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/> Acessado dia 31 de julho de 2012.
- Smissaert HR 1964. Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. *Science* 143: 129-131.
- Soderlund DM, Bloomquist JR 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annu Rev Entomol* 34: 77-96.

- Soderlund MD, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicol* 171: 3–59.
- Souza RP, Rocco IM, Maeda AY, Spenassatto C, Bisordi I, et al 2011. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: Looking beyond the veil. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1439.
- Souza-Polezzi RC, Bicudo HEMC 2005. Genetic variation along time in a Brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), detected by changes in the esterases patterns. *Genetica* 125: 43-53.
- Stearns SC 1992. The evolution of life histories. Oxford: Oxford University Press 249 p.
- Stoddart JF 1979. *Comprehensive Organic Chemistry: The synthesis and reaction of organic compounds*. 6th Ed, Oxford.
- Suarez MF, Gonzales R, Morales CA 1998. Temephos resistance to *Aedes aegypti* in Cali, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 55: 257.
- Tauil PL 2002. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad Saúde Pública RJ* 18: 867-871.
- Teixeira MG, Barreto LM, Guerra Z 1999. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. *Informe Epidemiológico do Sistema Único de Saúde* 8: 5-33.
- Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, Socorro R et al 2011. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 17: 938–940.
- Toung YP, Hsieh TS, Tu CP 1990. *Drosophila* glutathione S-transferase 1-1 shares a region of sequence homology with the maize glutathione S-transferase III. *Proc Nat Acad Sci USA* 87: 31-35.
- Turley AP, Moreira LA, O'Neill SL, McGraw EA 2009. Wolbachia infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 15: e516.
- Valle D, Montella IR, Ribeiro RA, Viana-Medeiros PF, Martins AJ, Lima JBP 2006. Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* / Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Publicação em parceria entre Fundação Oswaldo Cruz e Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro e Distrito Federal, Brasil, 128pp, ISBN 853341291-6.
- Vasuki V, Rajavel R 1992. Influence of short time exposure to an insect growth regulator, hexaflumuron, on mortality and adult emergence of vector mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 275-283.
- Vasuki V 1992. Adult longevity of certain mosquito species after larval and pupal exposure to sublethal concentration of an insect growth regulator hexaflumuron. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 23: 121-124.
- Viana-Medeiros PF 2011. Investigação sobre mecanismos de resistência em larvas e adultos de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762. Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, 140p.
- Villanueva-Jimenez JA, Hoy MA, Davies FS 2000. Field evaluation of integrated pest management-compatible pesticides for the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) and its parasitoid *Ageniaspis citricola* (Hymenoptera: Encyrtidae). *J Econ Entomol* 93: 347-367.
- Vontas JG, Small GJ, Hemingway J 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J* 357: 65-72.
- Ware, GW 2000. *The Pesticide Book*, 5th Ed, Thomson Publications, Fresno, California, 418p.
- Ware GW, Whitacre DM 2004. *The Pesticide Book*, 6th Ed, Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio, 496p.
- Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chabdre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M 2004. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423: 136-137.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Rev Micro* 6: 741–751.
- Wigglesworth VB 1972. *The principles of insect physiology*. Ed. Chapman & Hall, 7th Ed, London, 827p.

- Wigglesworth VB 1985. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol 7; Kerkut GA, Gilbert LI, Ed Pergamon Press: Oxford; pp 1-24.
- Williams CM 1956. The juvenile hormone of insects. *Nature* 178: 212-213.
- Williams CM 1958. The juvenile hormone. *Sci Am* 198: 67-73.
- Wilson TG, Cryan JR 1997. Lufenuron, a chitin-synthesis inhibitor, interrupts development of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Zool* 278: 37-44.
- Wing KD, Andaloro JT, McCann SF, Salgado VL 2005. Indoxacarb and the sodium channel blocker insecticides: chemistry, physiology, and biology in insects. Comprehensive Molecular Insect Science. Ed. Elsevier, New York. pp 30–53.
- Wirth MC, Georghiou GP 1999: Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *J Am Mosq Control Assoc* 15: 315-320.
- Yamamoto A, Yoneda H, Hatano R, Asada M 1995. Influence of hexythiazox resistance on life history parameters in the citrus red mite *Panonychus citri* (McGregor). *J Pesticide Science* 20: 521–527.
- Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang P, Prapanthadara LA 2011. 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. *Trop Med Int Health* 16: 501-509.
- Yeap HL, Mee P, Walker Y, Weeks AR, O'Neill SL, Johnson P, Ritchie SA, Richardson KM, Doig C, Endersby NM, Hoffmann AA 2011. Dynamics of the “Popcorn” *Wolbachia* infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control. *Genetics* 187: 583–595.

<http://www.pnud.org.br/idh/>

http://www.duquedecaxias.rj.gov.br/index.php/conheca_caxias/dados_cidade

<http://www.parnamirim.rn.gov.br/estatisticasemapas>

<http://www.capital.ms.gov.br/egov/imti/perfil-pageflip/index.html>

<http://www.santarem.pa.gov.br/conteudo/?item=875&fa=292>

Dinâmica da resistência a
inseticidas de populações de
Aedes aegypti de quatro
regiões do Brasil

Gabriela de Azambuja Garcia

Anexo 1

Intervalos de confiança das RR_{95}

Temephos, Diflubenzuron e Deltametrina

Anexo 1. Intervalos de confiança das RR₉₅ (valores máximo e mínimo) obtidas para os inseticidas temephos (OP), diflubenzuron (IGR) e deltametrina (PI) para as quatro populações de *Aedes aegypti*. Letras iguais indicam sobreposição entre os valores obtidos para cada mês.

RR ₉₅ - Intervalos de Confiança						
População	Temephos (OP)		Diflubenzuron (IGR)		Deltametrina (PI)	
Duque de Caxias/RJ						
nov/09	15,0-17,9	a	X		X	
dez/09	13,9-15,6	a,b	X		46,6-72,7	b
fev/10	12,4-14,5	b	2,0-2,6	a	53,1-73,3	a,b
mai/10	10,1-11,4	c	1,6-1,8	b	68,7-95,2	a,b
ago/10	10,2-11,7	c	1,5-1,8	b,c	54,1-80,1	b
nov/10	9,2-10,5	c	1,5-1,9	b,c	40,1-50,0	b
Parnamirim/PA						
jan/10	6,8-8,1	d	X		X	
fev/10	6,6-7,8	d	1,2-1,5	c	7,9-17,8	d
mai/10	6,1-6,9	d,e	1,3-1,5	c	8,9-11,8	d
ago/10	5,9-6,8	d,e	1,0-1,2	d	11,2-14,1	d
dez/10	6,0-6,7	d,e	1,7-2,0	a,b	13,0-16,1	d
Campo Grande/MS						
fev/10	7,3-8,6	d	1,9-2,2	a	83,9-119,6	a
jun/10	5,3-6,4	e,f		X	54,6-62,7	b
out/10	4,1-5,3	f,g	1,3-1,4	c	76,5-106,7	a
jan/11	4,2-5,0	g	1,9-2,5	a	76,8-97,3	a
Santarém/PA						
abr/10	8,7-12,2	c	1,8-2,3	a,b	50,3-67,9	b
jul/10	9,7-10,9	c	1,4-1,6	b,c	32,6-38,3	c
out/10	8,0-9,2	d	1,3-1,5	c	35,5-82,1	b,c
jan/11	8,4-9,6	d	1,3-1,5	c	43,9-56,8	b

Dinâmica da resistência a
inseticidas de populações de
Aedes aegypti de quatro
regiões do Brasil

Gabriela de Azambuja Garcia

Anexo 2

Ensaio bioquímico

Figuras A1 a A8

Duque de Caxias, RJ - larvas

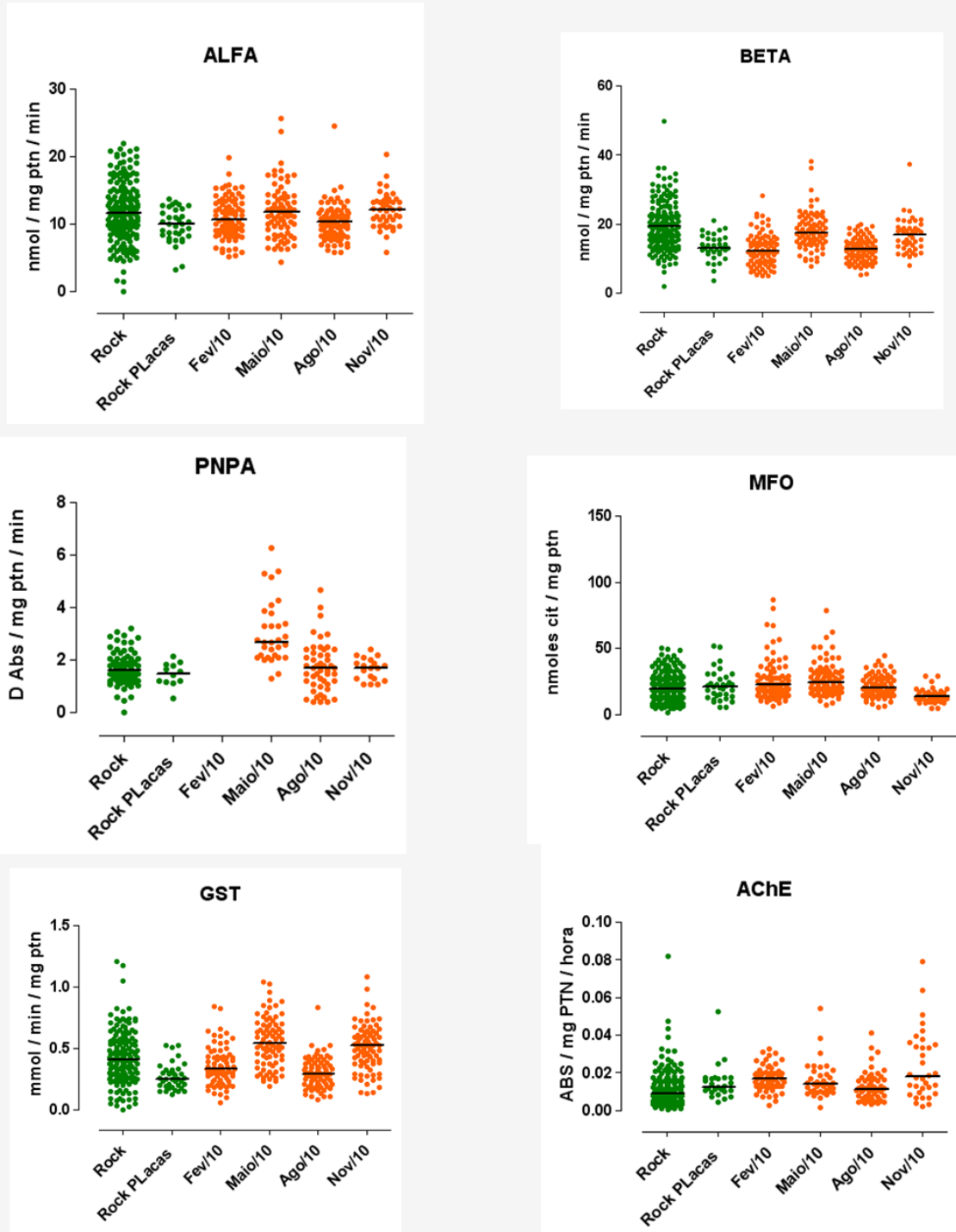


Figura A1

Duque de Caxias, RJ - adultos

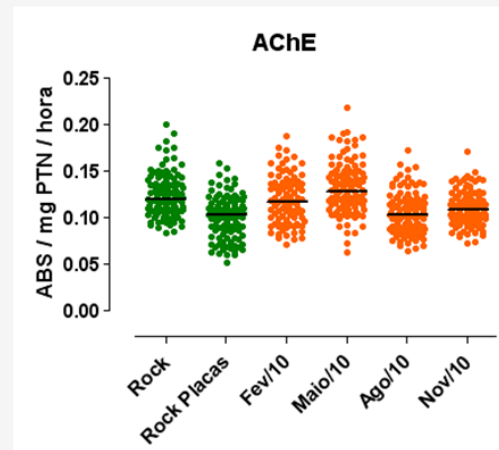
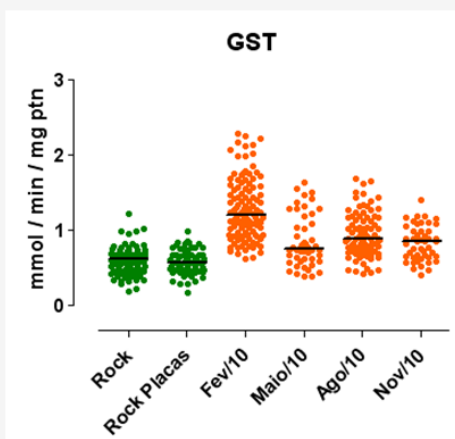
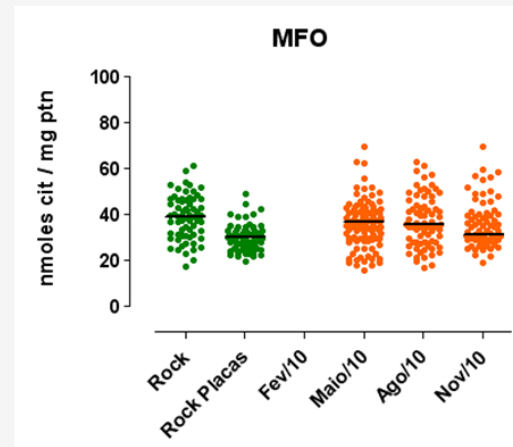
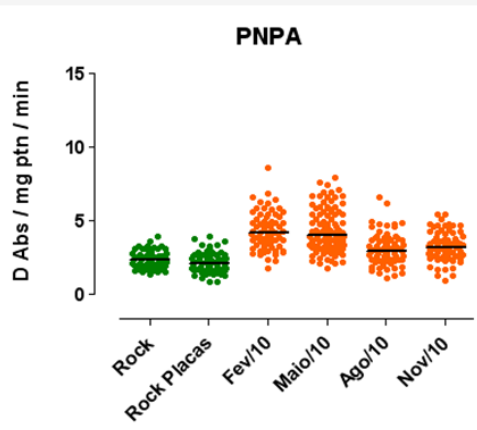
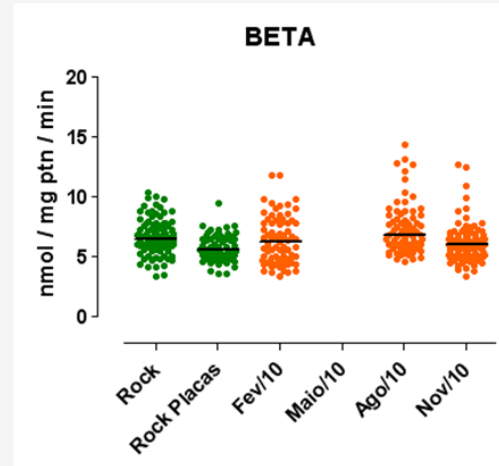
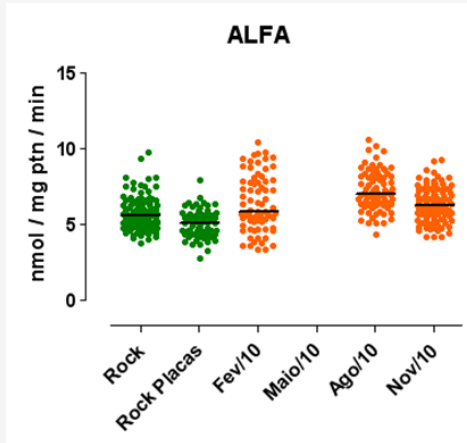


Figura A2

Parnamirim, RN - larvas

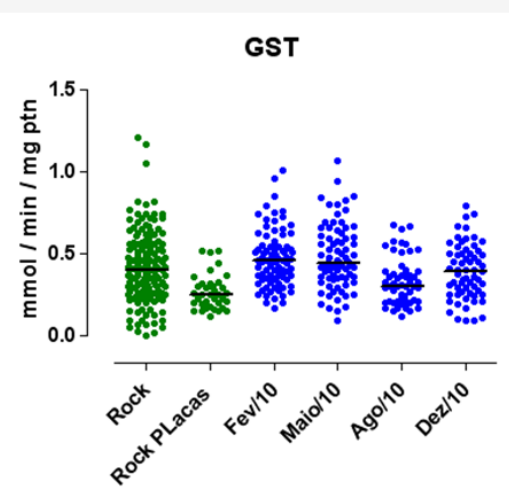
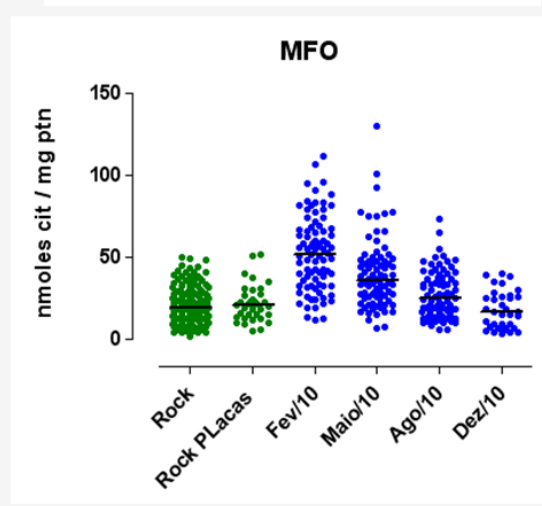
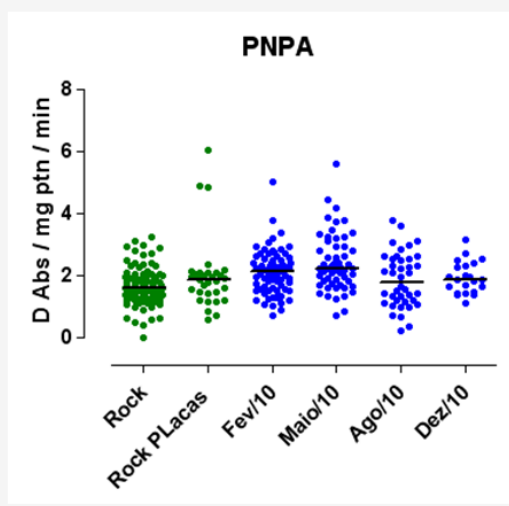
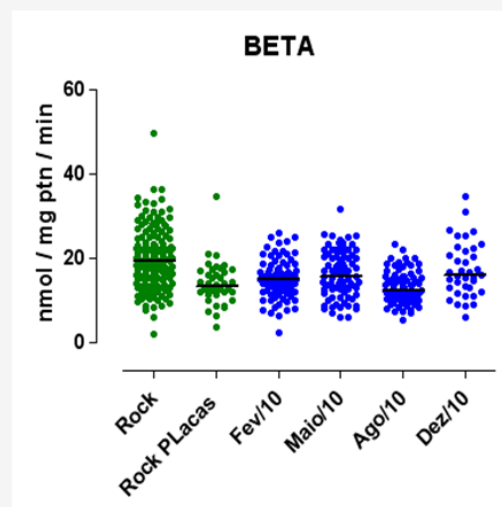
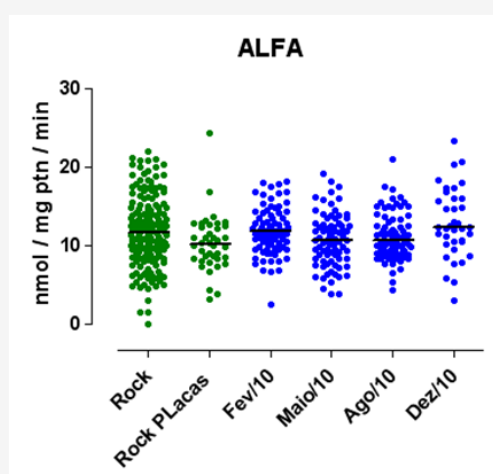


Figura A3

Parnamirim, RN - adultos

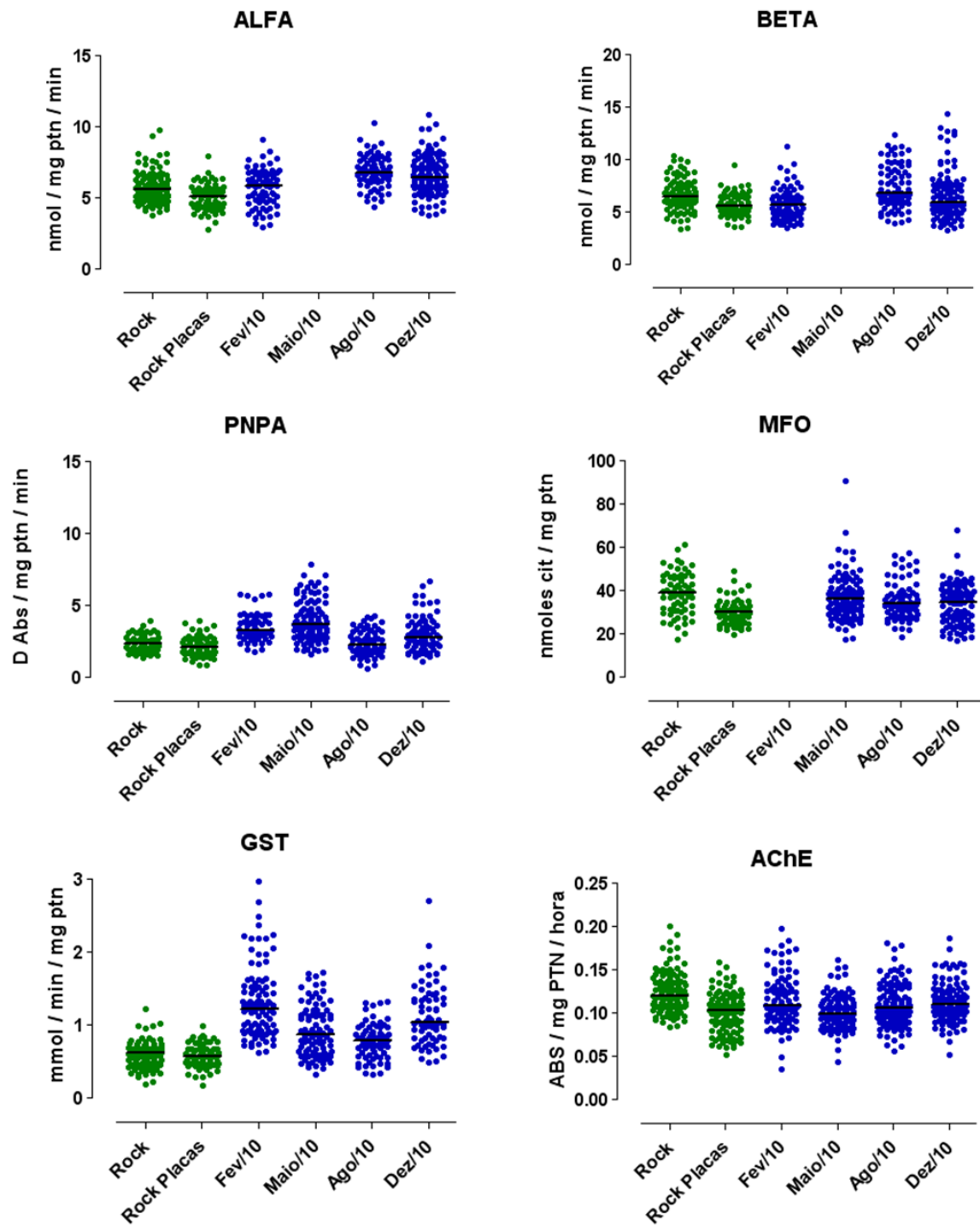


Figura A4

Campo Grande, MS - larvas

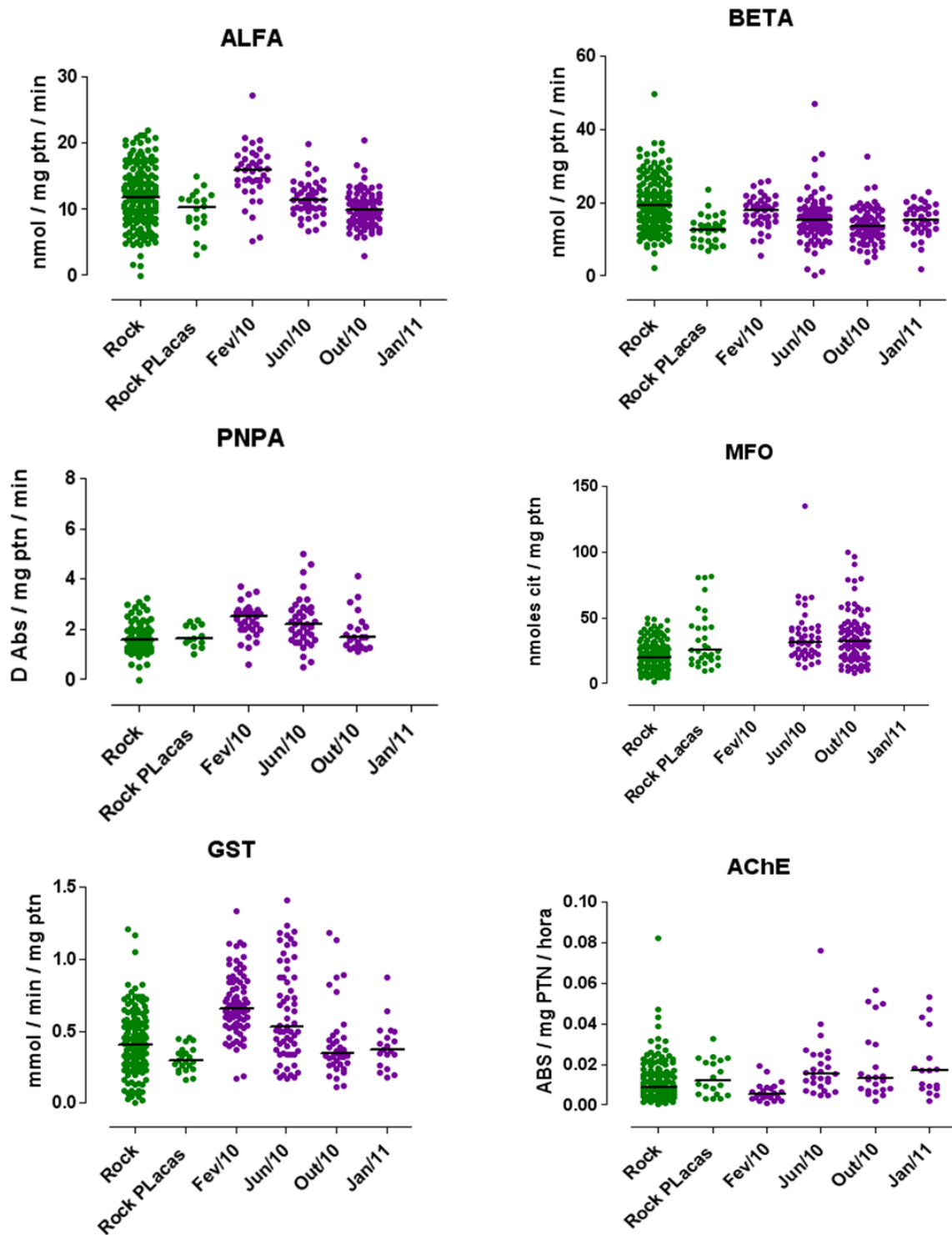


Figura A5

Campo Grande, MS - adultos

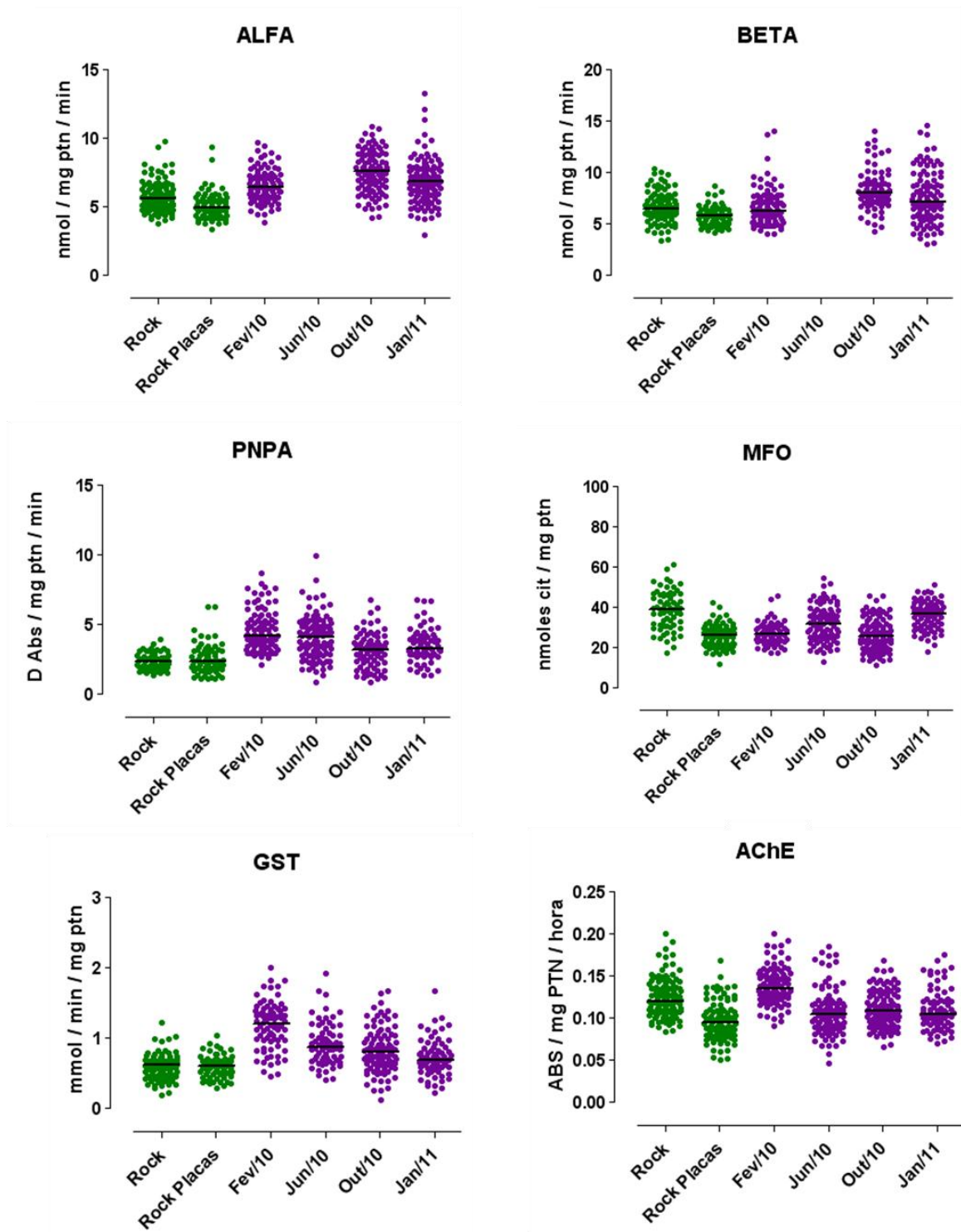


Figura A6

Santarém, PA - larvas

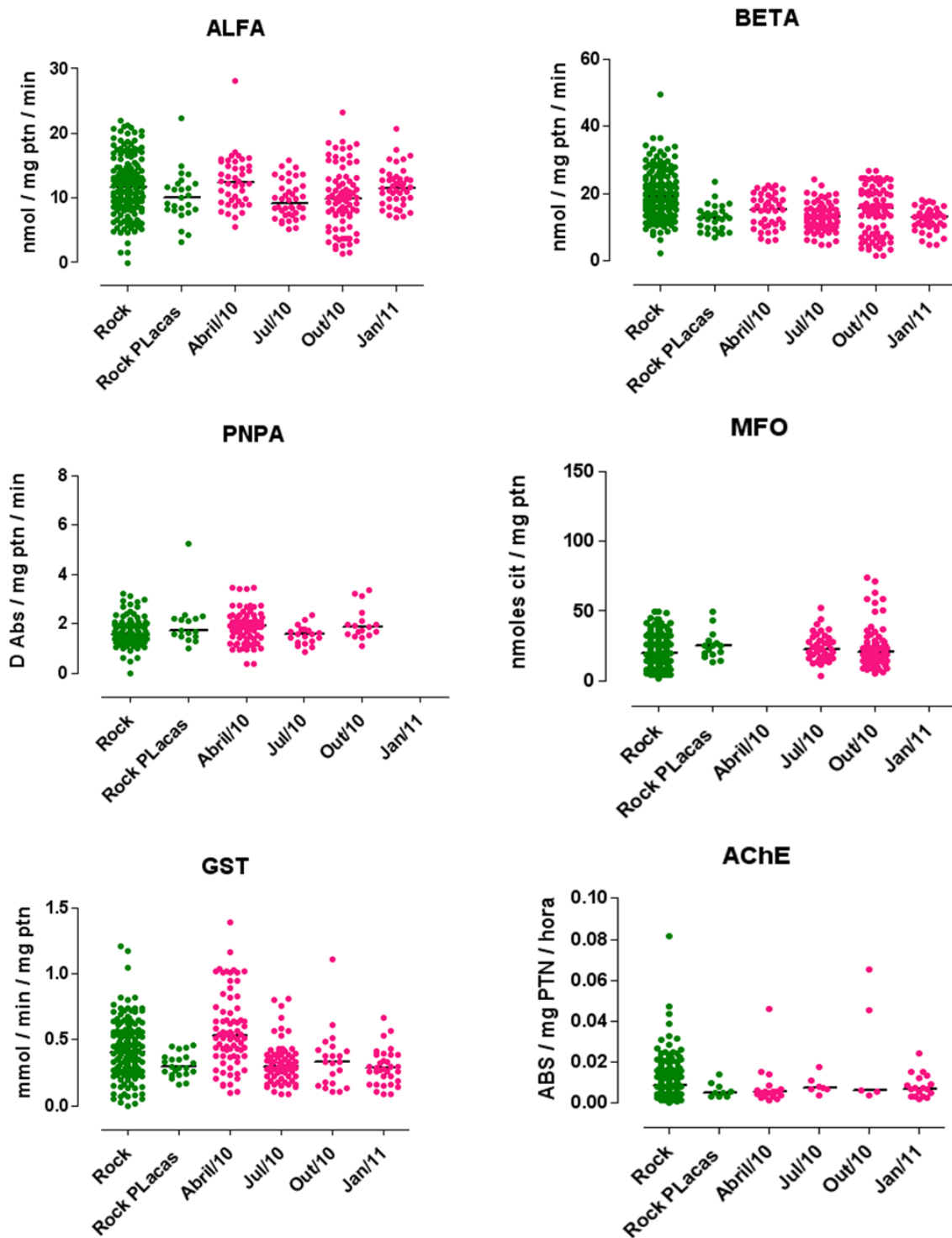


Figura A7

Santarém, PA - adultos

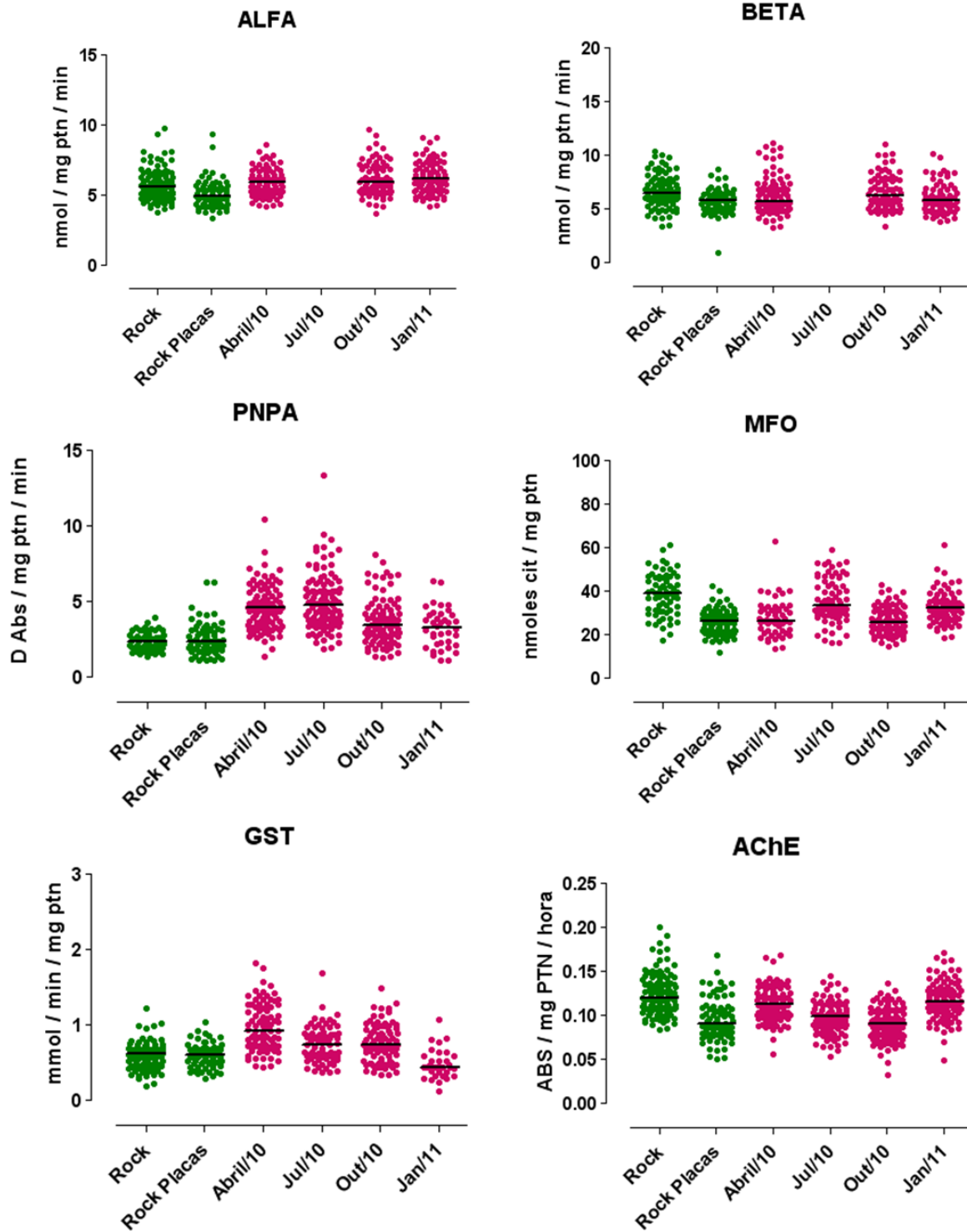
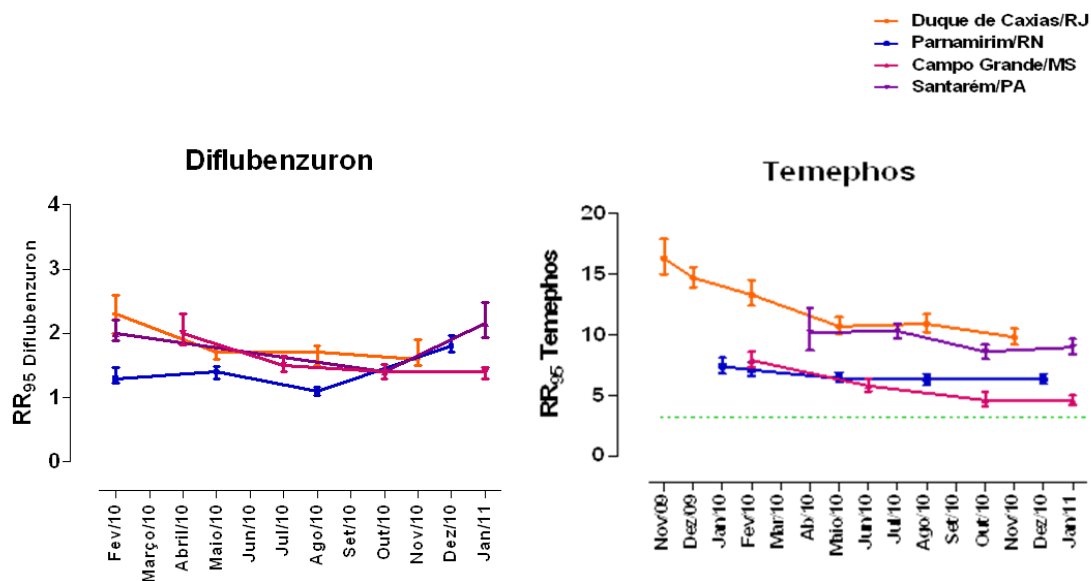


Figura A8

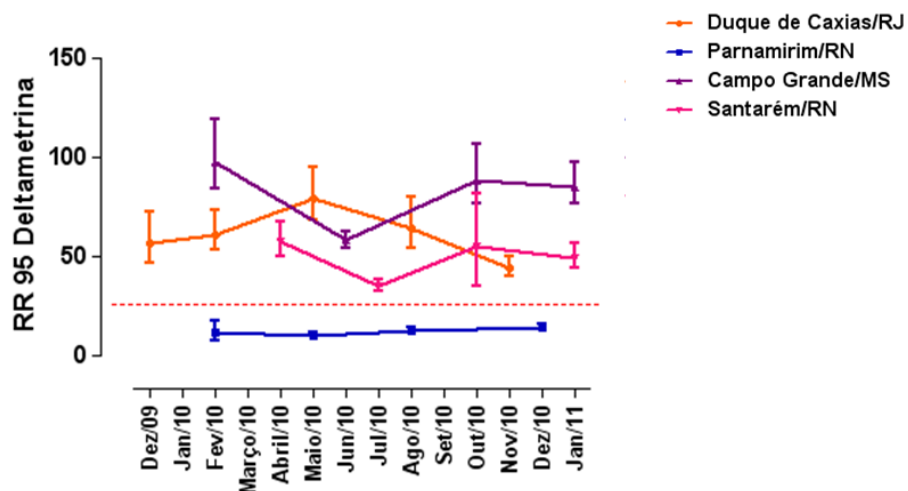
FICHA 1



População	RR ₉₅ Diflubenzuron	RR ₉₅ Temephos
Rockefeller	1,0	1,0
Duque de Caxias/RJ		
nov/09	-	16,3
dez/09	-	14,7
fev/10	2,3	13,3
mai/10	1,7	10,7
ago/10	1,7	10,9
nov/10	1,6	9,8
Parnamirim/PA		
jan/10		7,4
fev/10	1,3	7,1
mai/10	1,4	6,4
ago/10	1,1	6,3
dez/10	1,8	6,3
Campo Grande/MS		
fev/10	2,0	7,9
jun/10	-	5,8
out/10	1,4	4,6
jan/11	2,2	4,6
Santarém/PA		
abr/10	2,0	10,3
jul/10	1,5	10,3
out/10	1,4	8,6
jan/11	1,4	9,0

Resultados dos bioensaios com os larvicidas diflubenzuron (CSI) e temephos (OP) para as quatro populações de *Aedes aegypti* participantes do estudo. Os gráficos representam a avaliação temporal da resistência a estes dois compostos indicando as RR₉₅ ao longo do tempo. A tabela apresenta os valores absolutos das RR₉₅ obtidos pelos bioensaios do tipo dose-resposta para cada inseticida.

FICHA 2



População	RR95	Frequência alélica (%)		
		1011Met	1016 Ile	1534 Cys
Rockefeller	1,0	-	-	-
Duque de Caxias/RJ				
dez/09	56,7	-	81,0	-
fev/10	61,3	3,3	92,9	-
mai/10	79,4	-	92,3	-
ago/10	64,4	-	75,9	-
nov/10	44,5	1,7	90,7	98,2
Parnamirim/PA				
fev/10	11,6	41,7 (*)	1,7	-
mai/10	10,1	-	1,8	-
ago/10	12,4	-	1,7	-
dez/10	14,3	43,3	0,5	35,0
Campo Grande/MS				
fev/10	97,8	13,5	85,0	-
jun/10	58,2	-	94,8	-
out/10	88,3	1,8 (**)	81,7	98,3 (**)
jan/11	85,5	-	81,7	-
Santarém/PA				
abr/10	57,8	5,2 (***)	0,0	-
jul/10	35,1	-	0,0	-
out/10	55,1	-	0,0	-
jan/11	49,3	0,0	0,0	100,0

* março/2010

** novembro/2010

*** março/2010

Resultados dos bioensaios com o adjuvante deltametrina (PI) para as quatro populações de *Aedes aegypti* participantes do estudo. O gráfico representa a avaliação temporal da resistência ao composto indicando a RR₉₅ ao longo do tempo. A tabela apresenta os valores absolutos das RR₉₅ obtidos pelos bioensaios do tipo dose-resposta e as frequências alélicas de substituições nas três posições do AaN_{av} investigadas.