

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES

MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

DIEGO FELIPE ARAUJO DINIZ

CUSTO BIOLÓGICO ASSOCIADO À RESISTÊNCIA AO INSETICIDA  
TEMEPHOS EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)

RECIFE

2014

**DIEGO FELIPE ARAUJO DINIZ**

**CUSTO BIOLÓGICO ASSOCIADO À RESISTÊNCIA AO INSETICIDA TEMEPHOS  
EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Eco-biologia de patógenos, vetores e hospedeiros.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes

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

RECIFE

2014

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

---

- D585c      Diniz, Diego Felipe Araujo.  
Custo biológico associado à resistência ao inseticida temephos em populações de *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) / Diego Felipe Araujo Diniz. - Recife: [s.n.], 2014.  
81 p. : ilus.  
Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.  
Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres Lopes.  
Co-orientadora: Maria Alice Varjal de Melo Santos.
1. *Aedes*. Resistência a inseticidas. 2. Inseticidas Organofosforados. 3. Pleiotropia Genética. 4. Metabolismo. I. Lopes, Constância Flávia Junqueira Ayres. II. Santos, Maria Alice Varjal de Melo. III. Título.

CDU 616.92

---

**DIEGO FELIPE ARAUJO DINIZ**

**CUSTO BIOLÓGICO ASSOCIADO À RESISTÊNCIA AO INSETICIDA TEMEPHOS  
EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data de aprovação: 27/02/2014

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira (Membro interno)  
Departamento de Entomologia/CPqAM/FIOCRUZ

---

Dr. Luiz Carlos Alves (Membro interno)  
Departamento de Entomologia/CPqAM/FIOCRUZ

---

Dr. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque (Membro externo)  
Departamento de Zoologia/UFPE

---

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

*Dedico à minha co-orientadora*

*Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo privilégio de sentir sua presença, não de forma figurativa, mas real e ainda pela saúde, paz, força e perseverança que Ele tem me concedido todos os dias.

A minha mãe (Dilma), todos meus familiares e amigos pelo apoio contínuo e orações em meio a minha jornada em que consegui conquistar mais um objetivo.

A minha orientadora Dra. Constância Ayres, pela oportunidade de desenvolver mais um trabalho científico, suas correções e aperfeiçoamento do meu trabalho.

A minha co-orientadora Dra. Alice Varjal, por todo seu apoio, dedicação, ensinamentos e lapidação das minhas ideias.

À pós-graduação de Biociências e Biotecnologia em saúde, da qual fiz parte da primeira turma de Mestrado Acadêmico e tive um amadurecimento profissional considerável.

Agradeço à Dra. Clarice Moraes, Coordenadora dessa Pós, juntamente com todo Corpo Docente por toda atenção e ajuda naquilo que precisei.

À Dra. Sheila Oliveira e Dra. Regina Bressan que com suas disciplinas, foram peças fundamentais em nossa formação.

Aos amigos Thiago, Camylla Melo, Camila Carvalho e João Ramos da Pós-Graduação que tive grande afinidade e que sempre me incentivaram de forma positiva.

A todos colaboradores do Departamento de Entomologia que contribuíram de forma direta ou indireta em meu estudo.

Ao Hélio, Aires, Tati Alexandre, Danilo e Norma que me encorajaram bastante durante o Congresso de Parasitologia. Valeu pessoal!

Às meninas do Insetário (Ana, Rose, Andréa, Morgana, Elisângela, Mércia, Suzane, Mary, Dani e Tati) por toda ajuda, força e apoio. Obrigado!

À Eli, mais uma vez, pela sua grande ajuda com o manuseio dos camundongos, sem ela, parte dos meus experimentos não teria sido possível. Obrigado!

À Mônica que, burocraticamente, nos ajudou quanto à liberação dos camundongos pelo

Biotério do CPqAM-Fiocruz/PE.

À Elisama Helvecio, pela execução e interpretação dos dados dos testes bioquímicos e por toda ajuda que sempre me ofereceu, obrigado!

À Ana Paula de Araújo, por sempre estar disposta a me ajudar e tirar minhas dúvidas desde a graduação. Paula, muito obrigado!

Ao Danilo Carvalho, por toda sua dedicação, incentivo e atenção que contribuiu bastante em meu estudo, no que diz respeito à parte de morfometria alar.

À Eloína (Elô) por suas críticas, sugestões, paciência, dedicação e grande ajuda na parte dos testes estatísticos.

À Dra. Liliane Amorim (Lili) por suas contribuições em minha qualificação, sem dúvida, foram muito válidas!

Ao Dr. Eduardo Beserra da UEPB por sua constante atenção on-line que nos ajudou bastante na construção dos parâmetros da tabela de vida de fertilidade.

À Dra. Bianka Santos, do Laboratório de Lipídeos do Departamento de Bioquímica da UFPE, coordenado pela Dra. Prof. Vera Menezes, juntamente aos alunos João, Marília, Albérico, Thaise, Tiago e José que me ajudaram grandiosamente quanto à quantificação de reservas energéticas em mosquitos... Sem eles esse objetivo do meu trabalho não teria sido concretizado, muito obrigado!

Ao Dr. Marcelo Paiva que me direcionou ao Departamento de Bioquímica da UFPE.

À Banca Examinadora pelo aceite do meu convite em fazer contribuições para o melhoramento do meu estudo.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pela infra-estrutura e todos os recursos necessários para execução dos nossos testes.

À FACEPE pelo investimento financeiro.

“Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos os meus caminhos, diz o Senhor.

Porque assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos maiores do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos mais elevados do que os vossos pensamentos.

Porque, assim como desce a chuva e a neve dos céus, e para lá não tornam, mas regam a terra, e a fazem produzir, e brotar, e dar semente ao semeador, e pão ao que come, Assim será a minha palavra, que sair da minha boca; ela não voltará para mim vazia, antes fará o que me apraz, e prosperará naquilo para que a enviei”.

DINIZ, D. F. A. **Custo biológico associado à resistência ao inseticida temephos em populações de *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

## RESUMO

Este estudo avaliou o desempenho biológico e reprodutivo de populações de *Aedes aegypti* resistentes ao organofosforado temephos, através da análise dos seguintes parâmetros: dinâmica de desenvolvimento de formas imaturas (larvas, pupas) e adultas; tamanho; fecundidade; tabela de vida de fertilidade; longevidade e reservas energéticas. Os testes foram realizados com uma população de campo (Arcoverde/PE), com elevada razão de resistência ao inseticida (RR=226,6), além de três linhagens isogenéticas, RecR (RR=303,4), RecRNex (RR=250,5) em processo de reversão da resistência e RecRev (RR=2,32), susceptível revertida, usada como controle nos experimentos. Os resultados revelaram que a ausência de exposição ao temephos levou a redução da RR da RecRNex e a recuperação do padrão de normalidade de algumas enzimas, exceto a-esterase e GST, principais responsáveis pela resistência metabólica. Parâmetros biológicos foram comprometidos nas populações resistentes, sobretudo o tempo de desenvolvimento larval, o número de fêmeas reprodutivamente ativas e a fecundidade. A análise da tabela de vida de fertilidade confirmou desvantagens para as populações resistentes ligadas a redução nos valores da taxa líquida de reprodução, tempo geracional, capacidade inata de aumentar em número, razão finita de aumento e tempo necessário para duplicação do número de indivíduos. A longevidade também foi menor para as fêmeas resistentes, variando de 16,5 a 24,5 dias comparada a 38,9 dias para as susceptíveis. O tamanho, inferido pela morfometria alar e pelo peso úmido, bem como as reservas lipídicas, mostraram valores similares entre a RecRev e Arcoverde, e diferentes das linhagens RecRNex e RecR. A interpretação dos 20 parâmetros avaliados revelou que 13 deles estavam alterados para a RecR e a RecRNex e 12 para Arcoverde. Os resultados sugerem a existência de um elevado custo adaptativo associado à manutenção do mecanismo de resistência metabólica ao temephos nas populações investigadas.

**Palavras chave:** Culicidae; resistência; organofosforado; pleiotropia; metabolismo.

DINIZ, D. F. A. **Fitness cost associated with resistance to insecticide temephos in *Aedes aegypti* populations (DIPTERA: CULICIDAE)**. 2014. Dissertation (Masters in Bioscience and Biotechnology in Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014

## ABSTRACT

This work evaluated the biological and reproductive performance of *A. aegypti* populations resistant to temephos, through the analysis of the following parameters: dynamic of development of the immature forms, adult size, fecundity, fertility life table, longevity and energy reserves. Tests were performed with a resistant field population from Arcoverde-PE, with a high resistance ratio (RR) for the insecticide (RR = 226.6) and three isogenic strains, RecR (RR=303.4), RecRNex (RR=250.5) under a reversal process of resistance and RecRev (RR = 2.32), which was reverted to susceptible, used as a control in the tests. The results showed that the absence of exposure to temephos reduced the RR in RecRNex, as well as the activity pattern of some detoxifying enzymes, except  $\alpha$ -esterase and GST, the major responsible for the metabolic resistance. Biological parameters were impaired in resistant populations, especially the time of larval development, the number of reproductively active females and the fecundity. The analysis of fertility life table confirmed that resistant populations showed reproductive disadvantage, with lower values of the reproductive rate, generation time, intrinsic rate of natural increase, finite rate of increase and time to doubling the number of individuals. The longevity was also lower for the resistant females, and varied from 16,5 to 24,5 days, compared to 38,9 for the susceptible females. The size, inferred from wing morphometry and the wet weight, and the content of lipid reserves, showed similar values between RecRev and the resistant population (Arcoverde), and they were different from the values obtained for RecRNex and RecR strains. The analysis of the all 20 parameters revealed that 13 of them showed alterations for RecR and RecRNex and 12 for Arcoverde. The results suggest the existence of a high adaptive reproductive cost associated with the maintenance of the mechanisms of metabolic resistance in the populations investigated.

**Keywords:** Culicidae; resistance; organophosphate; pleiotropy; metabolism.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Distribuição de <i>Aedes aegypti</i> .	19
<b>Figura 2</b> – Fases que compõem o ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> .	20
<b>Figura 3</b> – Fêmea de <i>Aedes</i> sp. realizando alimentação sanguínea.	21
<b>Figura 4</b> – Exemplos de criadouros de <i>Aedes aegypti</i> .	22
<b>Figura 5</b> – Distribuição mundial da dengue.	23
<b>Figura 6</b> – Dengue no Brasil.	24
<b>Figura 7</b> – Inseticida químico organofosforado temephos.	25
<b>Figura 8</b> – Esquema representando a reação de biotransformação de xenobióticos e a participação das enzimas de detoxificação.	28
<b>Figura 9</b> – Esquema representativo da realocação de reservas energéticas - <i>Trade-offs</i> .	30
<b>Figura 10</b> – Instalações do insetário do CPqAM utilizadas para estabelecimento e manutenção das populações de <i>Aedes aegypti</i> .	40
<b>Figura 11</b> – Visualização do instrumento (armadilha de oviposição) utilizado para coleta de amostras de ovos de <i>Aedes aegypti</i> em campo.	41
<b>Figura 12</b> – Visualização do ensaio de exposição de larvas de <i>Aedes aegypti</i> ao inseticida químico temephos.	42
<b>Figura 13</b> – Visualização do esquema de alimentação sanguínea individual das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> em camundongos ( <i>Mus musculus</i> ) anestesiados.	44
<b>Figura 14</b> – Visualização do armazenamento de ovos de <i>Aedes aegypti</i> em placas de Petri para análise de viabilidade embrionária em ovos quiescentes.	44
<b>Figura 15</b> – Visualização de uma asa de <i>Aedes aegypti</i> e seus pontos anatômicos utilizados para análise de morfometria geométrica populacional.	47
<b>Figura 16</b> – Esquema visual da preparação de homogenatos de mosquito para execução de testes bioquímicos.	48
<b>Figura 17</b> – Visualização de microplacas destinadas à avaliação da atividade de enzimas detoxificadoras de xenobióticos em fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> .	49
<b>Figura 18</b> – Classificação do nível de alteração da atividade de enzimas detoxificadoras de xenobióticos em populações de <i>Aedes aegypti</i> , com base no percentil 99 para a linhagem susceptível Rockefeller.	50

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Percentual de larvas, pupas e adultos X tempo (dias) das populações de <i>Aedes aegypti</i> .	55
<b>Gráfico 2</b> – Parâmetros reprodutivos de Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> .	56
<b>Gráfico 3</b> – Inviabilidade reprodutiva de fêmeas das populações de <i>Aedes aegypti</i> com <i>status</i> diferentes de susceptibilidade ao temephos.	57
<b>Gráfico 4</b> – Perfil de eclosão de larvas em diferentes tempos de quiescência das populações de <i>Aedes aegypti</i> RecRev, RecRNEEx, RecR e Arcoverde.	58
<b>Gráfico 5</b> – Agrupamento populacional de <i>Aedes aegypti</i> com diferentes <i>status</i> de resistência ao temephos por morfometria alar, utilizando duas variáveis canônicas (VC), considerando a forma e tamanho.	61
<b>Gráfico 6</b> – Tamanhos isométricos globais (em pixels) das asas de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> das populações RecRev, RecRNEEx, RecR e Arcoverde.	61
<b>Gráfico 7</b> – Padrão individual e coletivo de atividade de enzimas detoxificadoras de inseticidas químicos, observado para diferentes populações de <i>Aedes aegypti</i> resistentes ao organofosforado temephos.	64
<b>Gráfico 8</b> – Valor energético total (J) inferido para fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> das populações de <i>Aedes aegypti</i> RecRev, RecRNEEx, RecR e Arcoverde.	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Perfil de susceptibilidade ao temephos em populações de <i>Aedes aegypti</i> .	53
<b>Tabela 2</b> – Duração do tempo médio das fases de larva, pupa e do período ovo-adulto para populações de <i>Aedes aegypti</i> resistentes ao temephos. Temperatura $26 \pm 1$ °C; fotofase 12h.	56
<b>Tabela 3</b> – Longevidade média e desvio padrão observados para fêmeas das populações de <i>Aedes aegypti</i> com <i>status</i> diferentes de susceptibilidade ao temephos. Temperatura $26 \pm 1$ °C; fotofase 12h.	58
<b>Tabela 4</b> – Tabela de vida de fertilidade de populações de <i>Aedes aegypti</i> com diferentes perfis de susceptibilidade ao inseticida organofosforado temephos. Temperatura ambiente $26 \pm 2$ ; fotofase 12h.	59
<b>Tabela 5</b> – Media e desvio padrão dos pesos de grupos de 50 pupas e 50 adultos (g) das diferentes populações estudadas.	60
<b>Tabela 6</b> – tempo médio de repasto sanguíneo (min) e $\pm$ SD.	62
<b>Tabela 7</b> - Perfil de enzimas ligadas a detoxificação de inseticidas químicos, em populações de <i>A. aegypti</i> .	63
<b>Tabela 8</b> – Médias e Erro Padrão das reservas energéticas, lipídeos e carboidratos, quantificadas para fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> com diferentes <i>status</i> de resistência ao organofosforado temephos.	65
<b>Tabela 9</b> - Custo adaptativo decorrente da resistência ao temephos em populações de <i>Aedes aegypti</i> .	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<b>ACE, AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>CL<sub>50, 90, 95</sub></b>	Concentração letal para 50%, 90% e 95% dos indivíduos expostos
<b>CPqAM</b>	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>DENV</b>	Vírus dengue
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FUNASA</b>	Fundação Nacional de Saúde
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GST</b>	Glutathione S-transferase
<b>J</b>	Joule (unidade de energia)
<b>MFO</b>	Oxidases de Função Múltipla
<b>IC 95%</b>	Intervalo de confiança de 95%
<b>LC</b>	“Lethal concentration” (concentração letal)
<b>lx</b>	Taxa de sobrevivência durante o estágio x
<b>L<sub>1, 2, 3, 4</sub></b>	Larva em 1º, 2º, 3º, 4º estágio de desenvolvimento
<b>MS</b>	Ministério da saúde
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana da Saúde
<b>PACS</b>	Programa de Agentes Comunitários de Saúde
<b>PEAa</b>	Programa de Erradicação de <i>Aedes aegypti</i>
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PIACD</b>	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue
<b>PNCD</b>	Programa Nacional de Controle da Dengue
<b>PNPA</b>	Pnitrofenil acetato
<b>R</b>	Alelo de resistência

<b>RecR</b>	Linhagem Recife-Resistente
<b>RecRev</b>	Linhagem Recife-Resistente revertida
<b>RecRNEx</b>	Linhagem Recife-Resistente Não Exposta
<b>rm</b>	Capacidade inata de aumentar em número
<b>Ro</b>	Taxa líquida de reprodução
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>RR</b>	Razão de resistência
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>SRCCV</b>	Serviço de Referência em Controle de Culicídeos Vetores
<b>T</b>	Duração média de cada geração
<b>TD</b>	Tempo necessário para a população duplicar em número de indivíduos
<b>VC</b>	Variáveis canônicas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL</b> .....	19
<b>2.1 Bioecologia de <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus, 1762</b> .....	19
<b>2.2 Importância epidemiológica de <i>Aedes aegypti</i></b> .....	19
<b>2.3 Controle populacional de <i>Aedes aegypti</i></b> .....	23
<b>2.4 Histórico de Programas de Controle de <i>Aedes aegypti</i> no Brasil</b> .....	24
<b>2.5 Resistência a inseticidas químicos em mosquitos</b> .....	25
<b>2.6 Metabolismo de açúcares e reservas energéticas em mosquitos</b> .....	27
<b>2.7 Custos biológicos associados à resistência a inseticidas químicos em mosquitos</b> ...	29
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	31
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b> .....	35
<b>5 HIPÓTESE</b> .....	36
<b>6 OBJETIVOS</b> .....	37
<b>6.1 Objetivo Geral</b> .....	38
<b>6.2 Objetivos Específicos</b> .....	38
<b>7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	38
<b>7.1 Populações de <i>Aedes aegypti</i></b> .....	39
7.1.1 Linhagem de <i>Aedes aegypti</i> Recife-Resistente (RecR).....	39
7.1.2 Sub-linhagens Rec Reversa (RecRev) e RecR Não Exposta RecRNex.....	39
7.1.3 Linhagem Rockefeller.....	40
7.1.4 População de campo de Arcoverde.....	40
<b>7.2 Quantificação da resistência ao Temephos</b> .....	41
<b>7.3 Parâmetros biológicos relacionados à resistência ao inseticida químico temephos</b> .....	42
7.3.1 Dinâmica do desenvolvimento populacional de <i>Aedes aegypti</i> .....	42
7.3.2 Parâmetros reprodutivos e longevidade das fêmeas das diferentes populações.....	43
7.3.3 Tempo para a realização do repasto sanguíneo.....	43

7.3.4 Viabilidade embrionária em ovos com diferentes tempos de quiescência .....	44
7.3.5 Tabela de vida de fertilidade.....	45
<b>7.4 Parâmetros morfométricos.....</b>	<b>46</b>
7.4.1 Pesagem de pupas e adultos de ambos os sexos.....	46
7.4.2 Morfometria geométrica alar das fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> de laboratório e campo..	46
<b>7.5 Parâmetros Bioquímicos.....</b>	<b>47</b>
7.5.1 Quantificação da atividade de enzimas detoxificantes de inseticidas.....	47
7.5.2 Quantificação de reservas energéticas: lipídeos, glicogênio e outros açúcares.....	50
7.5.2.1 <i>Curva padrão de reservas energéticas.....</i>	51
7.5.2.2 <i>Preparação dos homogenatos, extração e quantificação das reservas.....</i>	51
7.6 Desenho experimental e análise de dados.....	52
<b>8 RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>8.1 Perfil de susceptibilidade das populações de <i>Aedes aegypti</i> ao temephos.....</b>	<b>53</b>
<b>8.2 Dinâmica do desenvolvimento populacional de <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>8.3 Duração dos estágios larva, pupa e intervalo ovo-adulto.....</b>	<b>54</b>
<b>8.4. Fecundidade e fertilidade de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>55</b>
<b>8.5 Longevidade de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>57</b>
<b>8.6 Viabilidade embrionária de ovos com diferentes tempos de quiescência .....</b>	<b>57</b>
<b>8.7 Tabela de vida de fertilidade.....</b>	<b>58</b>
<b>8.8 Pesagem de pupas e adultos machos.....</b>	<b>59</b>
<b>8.9 Morfometria geométrica alar de fêmeas de <i>A. aegypti</i> de laboratório e campo.....</b>	<b>60</b>
<b>8.10 Tempo de repasto sanguíneo.....</b>	<b>62</b>
<b>8.11 Caracterização do mecanismo de resistência ao temephos das linhagens e população de campo de <i>Aedes aegypti</i>.....</b>	<b>62</b>
<b>8.12 Quantificação de reservas energéticas: lipídeos, glicogênio e outros açúcares...</b>	<b>63</b>
<b>8.13 Custo adaptativo ligado a resistência ao temephos em populações de <i>A. aegypti</i></b>	<b>66</b>
<b>9 DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>10 CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Aedes aegypti* é uma espécie da família Culicidae de ampla distribuição geográfica, predominantemente encontrada em regiões tropicais e subtropicais, cuja presença está fortemente associada aos ambientes urbanos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). As fêmeas desta espécie de mosquito apresentam alto grau de antropofilia e podem estar implicadas na transmissão de diversos arbovírus ao homem, entre eles os causadores de doenças como a dengue, febre amarela urbana e chikungunya, revelando, sua grande importância para saúde pública (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; JUPP; MCINTOSH, 1988).

Devido à ausência de uma vacina tetravalente voltada à imunização humana aos diferentes sorotipos do vírus Dengue (DENV), o controle vetorial por meio de inseticidas químicos continua sendo a principal estratégia para conter surtos epidêmicos da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1997). Foi descoberto recentemente na Malásia o 5º sorotipo do vírus Dengue, um novo vírus sem dúvida complicará ainda mais os esforços para desenvolver uma vacina contra a dengue (VASILAKIS, 2013).

O uso intensivo e extensivo do organofosforado temphos, como larvicida de primeira escolha para o controle de *A. aegypti*, tem gerado uma alta pressão de seleção por este composto, refletindo em alterações na susceptibilidade das populações naturais desta espécie de mosquito e o surgimento da resistência em campo. Este é um aspecto crítico para a efetividade dos programas de controle em diversos países, inclusive no Brasil (BISSET et al., 2002; BRAGA et al., 2004; DINIZ, 2011; LIMA, J. et al., 2003; LIMA, E. et al., 2006; MELO-SANTOS et al., 2010; MONTELLA et al., 2007; RAWILIS, 1998).

A resistência é um processo pré-adaptativo decorrente de mutações gênicas aleatórias. Essas mutações são selecionadas ao longo do tempo, como consequência do uso continuado de produtos, como compostos químicos, que levam à seleção de indivíduos fenotipicamente capazes de sobreviver a doses que eliminariam os susceptíveis (BRAGA; VALLE, 2007b). Uma das questões mais discutidas em estudos biológicos que envolvem a resistência é o entendimento do processo adaptativo, que apesar de estar frequentemente associado a um custo biológico, leva à sobrevivência e ao sucesso reprodutivo dos indivíduos expostos a uma condição adversa natural ou induzida (OLIVEIRA et al., 2005).

Custo biológico (*fitness cost*) é um investimento energético que leva a perdas elementares do potencial biótico. Exemplos têm sido descritos para populações de *A. aegypti*

como consequência da interação vetor/parasita ou da resistência a inseticidas químicos (RIVERO et al., 2011). Neste sentido, características bióticas das espécies como o tempo gasto com o desenvolvimento, sobrevivência e reprodução são parâmetros que podem sofrer interferências quando os espécimes são portadores de resistência a inseticidas (GEORGHIU, 1972; ROUSH; MCKENZIE, 1987).

Alguns mecanismos específicos de resistência a inseticidas podem gerar custo energético, como uma consequência do investimento de reservas de carboidratos e lipídeos direcionadas à produção de constituintes metabólicos indispensáveis à sobrevivência. Este conceito é definido pelo termo em inglês *trade-offs* (compensação) e consiste na realocação de recursos energéticos de uma função primária para a manutenção de uma função secundária, visando à sobrevivência e reprodução do indivíduo sob condições adversas (RIVERO et al., 2011).

Na ausência da pressão seletiva exercida pelo uso do inseticida, o genótipo que confere resistência ao composto pode ser contra-selecionado, revelando desvantagens adaptativas quando comparado com os susceptíveis em tais condições (CROW, 1957; ROUSH; MCKENZIE, 1987). A resistência, na maioria das vezes, não se comporta de maneira estável e tende a diminuir significativamente ao longo do tempo em campo quando o contato com o inseticida é cessado. Isso sugere a existência de um custo biológico adaptativo relacionado à manutenção de mecanismos que conferem resistência à exposição continuada ao inseticida (MELO-SANTOS et al., 2010).

O monitoramento das ações previstas nos programa de controle de *Aedes aegypti* aponta para a detecção precoce da resistência e a identificação dos mecanismos envolvidos, gerando informações sobre a efetividade das ações para a eliminação da espécie-alvo, bem como para o estabelecimento de estratégias integradas de controle ou mesmo de manejo da resistência (ROUSH; MCKENZIE, 1987).

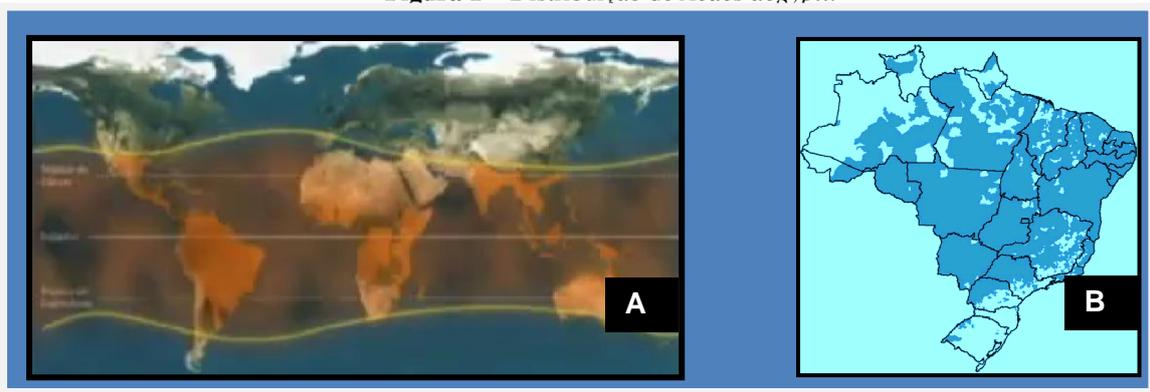
## 2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

### 2.1 Bioecologia de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762

O mosquito *Aedes aegypti* é classificado taxonomicamente no filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera e família Culicidae (FORATTINI, 1962). Essa espécie apresenta hábito diurno, sendo bem adaptada ao ambiente urbano, morfologicamente é caracterizada como um inseto de coloração escura, com listras e manchas formadas por escamas branco-prateadas distribuídas no corpo e nas patas, e no tórax essas escamas formam o desenho de uma lira (CLEMENTS, 1992).

*A. aegypti* é originário da região sub-saariana, na África, contudo dispersou-se para áreas onde a atividade antrópica e o clima favoreceram a sua proliferação (Figura 1A), encontradas principalmente nas zonas tropical e subtropical do globo (CLEMENTS, 1992; CONSOLI; LOURENÇO DE OLIVEIRA, 1994). Aliado ao crescimento e complexidade de ocupação dos espaços urbanos, a globalização e as facilidades de deslocamento de bens e pessoas têm contribuído para a expansão territorial desta espécie e, conseqüentemente, dos agentes etiológicos por ela veiculados, revelando um fluxo contínuo de distribuição em muitos países, inclusive no Brasil (Figura 1B) (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2006).

**Figura 1** – Distribuição de *Aedes aegypti*.



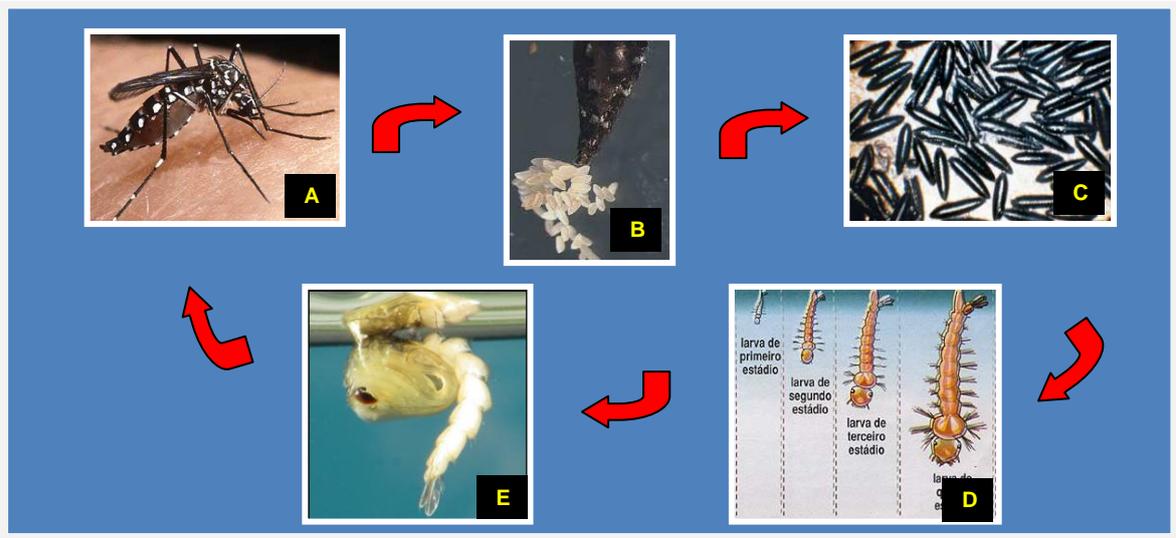
Fonte: Fundação Mundial de Saúde (2006) e Fundação Oswaldo Cruz (2009).

Nota: (A) Distribuição de *Aedes aegypti* a nível global, destacada pelas linhas sinuosas paralelas; (B) e no Brasil, as partes em azul escuro mostram as áreas infestadas pelo mosquito.

Essa espécie se desenvolve por meio da metamorfose completa (holometabolia) apresentando um ciclo de vida curto, formado pelas fases de ovo, larva, compreendido por

quatro estádios larvais ( $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  e  $L_4$ ), pupa e adulto (alado) (Figura 2). Condições ambientais adversas, como a ausência de água, podem levar os ovos à quiescência, um estado de dormência temporária dos embriões, que permite que os mesmos permaneçam viáveis por períodos prolongados de até de um ano (SILVA; SILVA, 1999).

**Figura 2** - Fases que compõem o ciclo biológico de *Aedes aegypti*.



Fonte: Munstermann (1995); Garcia e Aguiar (2008); MOEHLECKE (2008); Andrade et al. (2001); Institute of Clinical Pathology and Medical Research (2002).

Nota: (A) adulto-fêmea; (B) fêmea ovipositando; (C) ovos; (D) quatro estádios larvais; (E) pupa.

A fêmea do mosquito se alimenta preferencialmente de sangue humano e por isso apresenta alto grau de antropofilia (Figura 3). Os picos de atividade hematofágica acontecem durante os crepúsculos matutinos e vespertinos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Depois da alimentação, a fêmea busca lugares escuros e seguros para abrigo e digestão do repasto sanguíneo durante 48 a 72 horas. Este repasto é fundamental para o desenvolvimento e maturação dos ovócitos (CLEMENTS, 1992).

A deposição dos ovos acontece nas paredes internas de diferentes locais/estruturas preenchidas com água, pouco acima da linha de contato com a água. Estes locais onde ocorrem a oviposição e o desenvolvimento das demais fases imaturas (larvas e pupas) são denominados de criadouros (Figura 4). Os criadouros podem ser naturais (bromélias, tronco oco de árvores, bambus, cascas de frutas e axilas das folhas) ou artificiais como pneus abandonados, vasos de plantas, reservatórios de água potável (caixas d'água, tonéis, tanques, cisternas), materiais plásticos descartáveis e outros resíduos sólidos capazes de acumular água parada. Uma característica comum a muitos deles é a transitoriedade de permanência

funcional como área de criação de *Aedes* spp. nos ambientes, denominando-os como criadouros temporários (FORATTINI, 1962).

**Figura 3** - fêmea de *Aedes* sp. realizando alimentação sanguínea



Fonte: Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (2009).

A oviposição tem início quando a fêmea identifica um criadouro propício no ambiente (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O desenvolvimento do embrião dura aproximadamente dois a três dias, dependendo das condições de temperatura. Este aspecto é de considerável importância para o controle desta espécie, uma vez que, representa seu principal mecanismo de permanência e dispersão no ambiente (MELO-SANTOS, 2008). Além disto, as fêmeas tendem a distribuir fracionadamente os ovos, maturados em um mesmo ciclo gonadotrófico, em mais de um criadouro, comportamento este que intensifica sua dispersão e dificulta ainda mais as ações de controle (REITER; GUBLER, 1997).

Quando o nível de água se eleva nos criadouros e atinge os ovos é gerado um estímulo que sinaliza a condição favorável para a eclosão das larvas. Após poucas horas em contato com a água, as larvas ( $L_1$ ) rompem os ovos dando início ao processo de alimentação por filtração da água e a seu desenvolvimento, composto por quatro estádios sucessivos de crescimento, caracterizado pela muda do exoesqueleto (ecdise) (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

**Figura 4** - Exemplos de criadouros de *Aedes aegypti*.



Fonte: Garcia e Aguiar (2008); Associação de pais da Escola EB1 da Glória (2010); Ferreira (2010).

Nota: criadouros naturais: (A) bromélia; (B) tronco de árvores oco ou com frestas que permitem acumular água; (C) internódios ou colmo de bambus. Criadouros artificiais: (D) caixa d'água aberta e exposta ao ambiente; (E) pneus; (F) copo plástico.

O primeiro estágio larval ( $L_1$  com  $\sim 2,5$  mm) dura de 36 a 48 h, o segundo ( $L_2$  com  $\sim 3,9$  mm) de 24 a 36 h, o terceiro ( $L_3$  com  $\sim 5,05$  mm) 36 a 48 h e o quarto e último ( $L_4$  com  $\sim 7,3$  mm) de 48 a 72 h (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2009). Após o quarto estágio, as larvas se transformam em pupas, fase em que ocorre a primeira metamorfose e dura cerca de 72 h, nesta ocasião não mais se alimentam, sendo a nutrição realizada por meio das reservas armazenadas durante o estágio larval. Finalmente, ocorre a segunda metamorfose em que da pupa emerge o mosquito (adulto alado). Este ciclo se completa entre 15 e 30 dias, variando em função das condições de temperatura, densidade de indivíduos/criadouro e a disponibilidade de nutrientes no ambiente (BESERRA, et al., 2009; CLEMENTS, 1992).

Das frutas e do néctar das flores, os mosquitos adultos (machos e fêmeas) retiram os açúcares essenciais ao seu metabolismo energético (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). O adulto tem como função primordial a dispersão e a perpetuação da espécie pelo acasalamento, que para a fêmea acontece geralmente uma única vez, em seu curto período de vida, cuja duração média é de 45 dias (CLEMENTS, 1992).

## 2.2 Importância epidemiológica de *Aedes aegypti*

*A. aegypti* está implicado principalmente no ciclo da transmissão da dengue, arbovirose de grande importância médica, que ainda não possui vacina específica, capaz de imunizar as populações humanas expostas aos diferentes sorotipos virais (DENV-1, 2, 3, 4 e 5). A dengue está amplamente distribuída no mundo e atualmente, mais de um terço da população mundial vive em áreas de risco (Figura 5) para a transmissão do vírus dengue, com estimativa de que cerca de 100 milhões de pessoas estejam infectadas anualmente. No Brasil, circulam atualmente quatro sorotipos de DENV e em algumas áreas pode haver a circulação de dois ou mais sorotipos simultaneamente, aumentando os riscos de transmissão da doença (Figura 6) (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014).

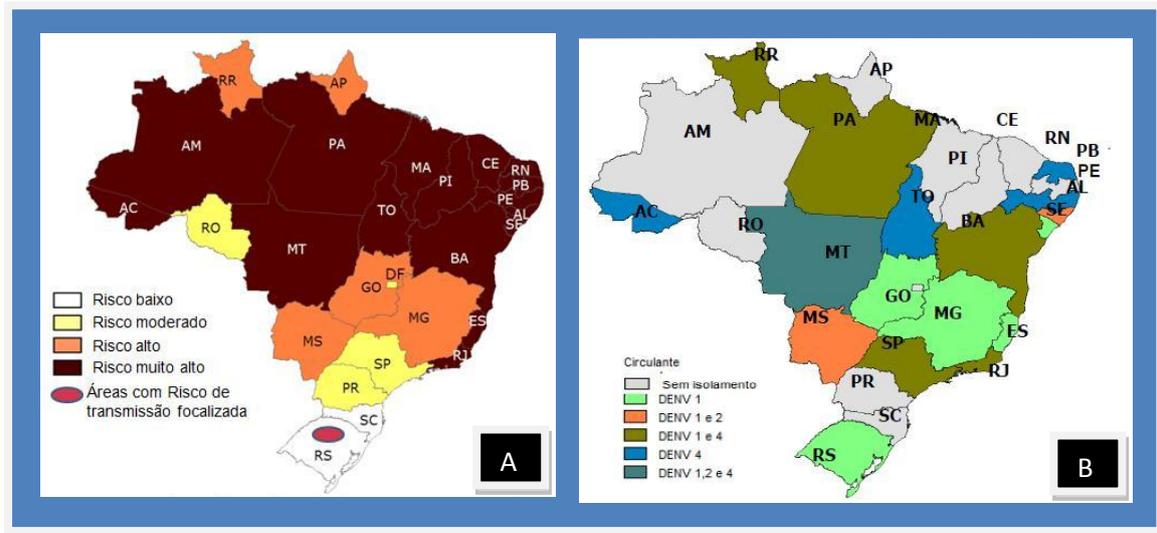
**Figura 5** – Distribuição mundial da dengue.



Fonte Centers for Disease and Prevention (2012). Nota: simbologia vermelha representa os registros de casos de dengue, enquanto que a área hachurada em azul representa regiões de risco para a doença pela presença do seu principal vetor *Aedes aegypti*.

A emergência ou reemergência da dengue em países ocidentais tem ocorrido desde a década de 60, em surtos epidêmicos explosivos com taxas muito altas de morbi-mortalidade (PINHEIRO; CORBER, 1997). Fatores associados à intensa movimentação humana, ocupação desordenada dos grandes centros urbanos, sistemas ineficientes de vigilância epidemiológica de doenças e ampla distribuição vetorial contribuem para a rápida disseminação territorial do vírus (KUNO, 1995).

**Figura 6 – Dengue no Brasil**



Fonte: Site da Dengue (2012).

Nota: diferentes áreas de risco da Dengue no Brasil (A); distribuição dos diferentes sorotipos do vírus Dengue nos estados brasileiros (B).

Uma segunda modalidade de uso de adulticidas é a aplicação espacial em ultra baixo volume (UBV), popularmente conhecido como “fumacê”, indicado para situações epidêmicas para bloqueio de transmissão e não como uma medida regular de controle (DONALÍSIO; GLASSER, 2002).

### 2.3 Controle populacional de *Aedes aegypti*

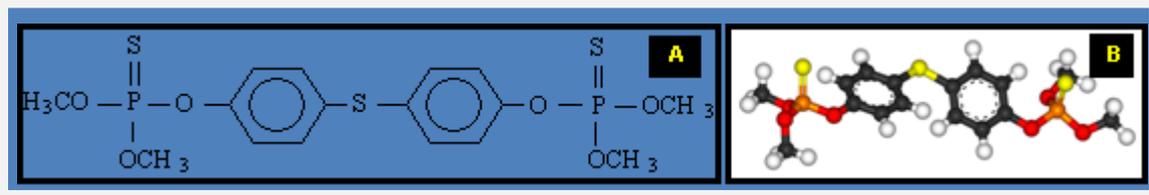
De uma forma ampla, o controle de insetos vetores em saúde pública é realizado com o objetivo de reduzir a densidade populacional de uma espécie-alvo, para minimizar a ocorrência de surtos e epidemias e favorecer o reconhecimento de fatores de risco ambiental para a transmissão de uma dada doença (BRAGA; VALLE, 2007a).

O controle do mosquito *A. aegypti* tem sido a principal estratégia para conter a dengue e isso tem representado um enorme desafio para os serviços de saúde, devido à complexidade e multiplicidade dos fatores envolvidos no processo de transmissão viral e na infestação das áreas por este vetor. As dificuldades parecem ainda maiores nos países em desenvolvimento, os quais acumulam frequentemente problemas de infra-estrutura ligados ao saneamento e ao abastecimento de água, aspectos que propiciam o aparecimento e permanência de criadouros do mosquito (DONALÍSIO; GLASSER, 2002).

Condições abióticas como temperatura, umidade, precipitação pluviométrica e ocupação do espaço geográfico pela população humana podem influenciar na distribuição de

doenças transmitidas por mosquitos, principalmente quando as espécies estão adaptadas aos ambientes urbanos (DONNALÍSIO; GLASSER, 2002). Alguns trabalhos têm demonstrado que o controle efetivo de *A. aegypti* não depende apenas de um método, mas da integração de medidas, adequadas à realidade local, que transcendem muitas vezes o setor saúde (BRAGA, 1999). Em geral, os programas empregam inseticidas químicos dirigidos ao controle de duas fases de vida do mosquito: 1) os larvicidas, como o temephos (Figura 7), aplicados diretamente nos criadouros aquáticos, cuja ação se dá por ingestão e/ou contato e 2) os adulticidas que atuam por contato, podendo ser aplicados por borrifação nas superfícies externas dos criadouros ou em locais de repouso dos mosquitos adultos, essa aplicação é conhecida como tratamento perifocal (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

**Figura 7** - Inseticida químico organofosforado temephos.



Fonte: Gomes (2006); Wikipedia (2011). Nota: (A) estrutura química do temephos e (B) estrutura 3D.

#### 2.4 Histórico do Controle de *Aedes aegypti* no Brasil

O combate ao *A. aegypti*, considerado vetor primário da febre amarela urbana e da dengue, tem sido um dos maiores desafios direcionados à Saúde Pública no Brasil. Várias campanhas foram realizadas na tentativa de erradicar esta espécie, a primeira iniciada por Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro (1902-1907), que instituiu as brigadas sanitárias e tinha como função detectar e eliminar os focos deste mosquito. Em seguida, outra campanha, realizada entre 1930-1940 e incentivada pela Fundação Rockefeller, atuava sobre as cidades litorâneas entre outras (BRAGA; VALLE, 2007b).

Além de campanhas, programas de controle também foram planejados e construídos. O primeiro foi executado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) junto a Organização Mundial de Saúde (OMS). Estes órgãos entraram em acordo para coordenar a erradicação de *A. aegypti* no continente através do Programa de Erradicação de *Aedes aegypti* no Hemisfério Oeste, em 1947 (SOPER, 1965). O Brasil participou do processo de erradicação continental do vetor e teve êxito na primeira etapa de eliminação dessa espécie em 1955. O último foco do mosquito foi extinto no mesmo ano em um município da zona rural da Bahia (FRANCO, 1969) e no ano de 1958, foi declarado oficialmente que o Brasil

conseguiu erradicar o mosquito *A. aegypti* na XV Conferência Sanitária Pan-Americana, em Porto Rico (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Como consequência de falhas na vigilância epidemiológica e mudanças sociais e ambientais decorrentes da urbanização, houve a reintrodução de *A. aegypti* em 1976 e foram confirmadas reinfestações nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte, desde então o Ministério da Saúde (MS) executava ações esporádicas de controle (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2003).

Em decorrência do agravamento epidemiológico da dengue no Brasil registrado no final da década de 1980, em 1996, foi estruturado o PEAa (Programa de Erradicação do *Aedes aegypti*), pautado em três pilares: controle vetorial, saneamento e educação ambiental (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996). Ao longo do processo de implantação do programa observou-se a inviabilidade técnica da erradicação do mosquito, confirmada tanto pelo aumento do número de casos de dengue como pela expansão da infestação vetorial até meados de 2001 (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001).

A circulação intensa do DENV-1 em quase todos os estados brasileiros, seguida da introdução de novos sorotipos (DENV-2 e DENV-3) denunciavam o elevado risco de epidemias de dengue, e levaram a elaboração do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD). Este plano estava voltado à redução dos níveis de infestação vetorial e a intensificação das medidas de controle nas áreas consideradas mais críticas. A persistência deste cenário epidemiológico culminou em 2002 com a estruturação do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), vigente até o momento (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

O PNCD enfatizou a necessidade de promover mudanças nos modelos anteriores inclusive em alguns pontos essenciais, como:

- 1) elaboração de um programa permanente diante da impossibilidade de erradicação do mosquito;
- 2) desenvolvimento de campanhas de informação e mobilização da população, de maneira a promover maior responsabilidade pela manutenção do ambiente doméstico livre da presença de potenciais criadouros do vetor;
- 3) fortalecimento da vigilância epidemiológica e entomológica, para ampliar a capacidade de predição e detecção precoce de surtos da doença;
- 4) melhoria da qualidade do trabalho de campo no combate ao vetor;
- 5) integração das ações de controle da dengue na atenção básica, com a mobilização do Programa de Agentes Comunitários de Saúde (PACS) e do Programa Saúde da Família (PSF);
- 6) utilização de instrumentos legais que facilitem o trabalho do poder público na eliminação de criadouros em imóveis comerciais, casas abandonadas etc.;
- 7) atuação multissetorial, no fomento à destinação adequada de resíduos sólidos e à utilização

de recipientes seguros para armazenamento de água; e 8) desenvolvimento de instrumentos mais eficazes de acompanhamento e supervisão das ações desenvolvidas nas esferas federal, estadual e municipal” (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

## **2.5 Resistência a inseticidas químicos em mosquitos**

A resistência, de acordo com a Organização Mundial de Saúde é definida pela habilidade de uma população de insetos em tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua morte. Sabidamente, o uso contínuo e exclusivo de inseticidas químicos, ou mesmo biológicos, pode selecionar indivíduos resistentes (BRAGA; VALLE, 2007a).

O fenômeno da resistência em mosquitos tem sido observado para a maioria das classes de inseticidas (BROGDON; MCALLISTER, 1998). A resistência é um processo que não se desenvolve, uniformemente, em todas as espécies ou em populações de uma mesma espécie. Existem diferentes mecanismos que podem mediar o processo de desenvolvimento da resistência a inseticidas químicos, os mais estudados são:

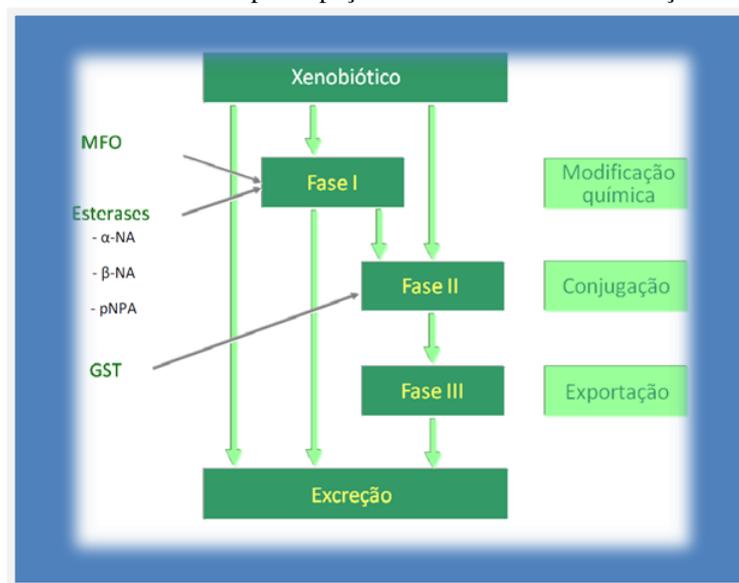
- a) Redução na penetração do inseticida: que decorre de alterações na composição da cutícula do inseto. Quando comparado a outros mecanismos, é considerado de importância secundária por conferir um baixo nível de resistência (OPPENORTH, 1985). A base bioquímica da redução da taxa de penetração de um inseticida não está totalmente esclarecida na literatura, apesar de ter sido proposto que a composição protéica da cutícula possua um papel relevante (WOOD et al. 2010);
- b) Insensibilidade do sítio-alvo: A maioria dos inseticidas químicos descritos até o momento age no sistema nervoso central dos insetos, em sítios-alvos específicos. Alterações nestes sítios podem impedir a ligação com o inseticida e conseqüentemente levar a resistência. A acetilcolinesterase, por exemplo, é o sítio-alvo dos organofosforados e carbamatos, o canal de sódio é o principal alvo dos piretróides e de alguns organoclorados enquanto que os receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) são os alvos dos organoclorados (HEMINGWAY; HANSON, 2000).
- c) Resistência metabólica: se constitui pela capacidade do inseto em detoxificar o inseticida através de enzimas, impedindo que este atinja seu sítio-alvo, seja por uma mudança estrutural que aumenta a capacidade de metabolização da enzima ou por sua

superexpressão (BISSET, 2002). Em geral, as enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos podem ser divididas em enzimas de Fase I, como as monooxigenases e esterases, e enzimas de Fase II, como as glutathione S-transferases. As enzimas de Fase I localizam a molécula do xenobiótico e agem diretamente sobre o composto exógeno, introduzindo um grupamento polar reativo na molécula, originando um substrato para as enzimas de Fase II (Figura 8). Estas por sua vez, conjugam compostos que tornarão o xenobiótico mais solúvel em água e, portanto, mais fácil de ser excretado das células (FASE III) por meio de bomba de efluxo (HEMINGWAY; HANSON, 2000).

O estabelecimento da resistência e o tempo requerido para que com que isso ocorra em campo dependem de diversos fatores, entre eles: a frequência e a dominância dos alelos de resistência (R); o isolamento da população; a endogamia; o potencial reprodutivo e o tamanho populacional. Além de aspectos operacionais, sobretudo àqueles relacionados ao poder residual do composto, número de aplicações, doses e formulações do inseticida (BISSET, 2002; GEORGHIOU; TAYLOR 1977).

Os parâmetros citados acima devem ser considerados no momento da avaliação regular da susceptibilidade das populações aos compostos empregados para seu controle, no intuito de detectar de forma precoce a resistência e se possível os seus mecanismos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1992). Os resultados desta avaliação nortearão a escolha de outro inseticida com diferente mecanismo de ação (MONTELLA, 2007).

**Figura 8** - Esquema representando a reação de biotransformação de xenobióticos e a participação das enzimas de detoxificação.



Fonte: Fundação Nacional de Saúde (2006).

## 2.6 Metabolismo de açúcares e reservas energéticas em mosquitos

O metabolismo basal da maioria dos mosquitos depende da ingestão de carboidratos, usualmente provenientes de seivas, flores e frutos, considerados fontes primárias de energia em mosquitos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). As reservas de glicogênio e triglicérides são determinantes para o potencial de atividade e longevidade dos insetos (NAYAR; SAUERMAN, 1972). O repasto sanguíneo das fêmeas está relacionado primordialmente à produção de ovos e pode também contribuir para aumentar a sua longevidade (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

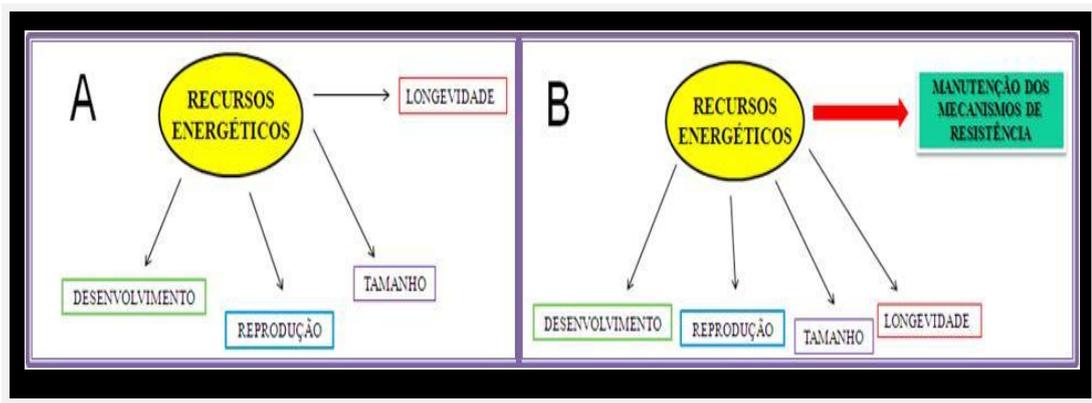
Os açúcares ingeridos são armazenados no divertículo ventral, de onde passam lentamente para o estômago, onde são gradualmente digeridos. Esse mecanismo permite à fêmea manter vazio o estômago, pronto para receber o repasto sanguíneo (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Diversos carboidratos naturais podem participar da dieta dos mosquitos, como por exemplo, a glicose, sacarose, maltose e frutose (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A energia do vôo é inicialmente promovida pelo polissacarídeo glicogênio, armazenado no corpo gorduroso e nos músculos de vôo (HANDEL; DAY, 1988).

Os lipídeos são constituintes de estruturas celulares que atuam como hormônios e formam importantes reservas energéticas, também armazenadas no corpo gorduroso. Durante a digestão, no lúmen intestinal, lipídeos complexos da dieta, como triacilgliceróis e fosfolipídeos, são hidrolisados em ácidos graxos que são liberados e posteriormente absorvidos pelo epitélio intestinal (CANAVOSO, et al. 2001). Após esta absorção, os ácidos graxos são utilizados para a síntese de outros lipídeos, sendo estes esterificados formando especialmente fosfolipídeos, diacilgliceróis e triacilgliceróis (ARRESE et al., 2001). As reservas lipídicas são utilizadas em atividades que exigem grandes demandas metabólicas, tais como uma maior tolerância a temperaturas mais baixas, vôo prolongado, metamorfose, produção de ovos e longevidade (ARRESE et al., 2001).

A quantidade de algumas reservas energéticas em indivíduos resistentes a inseticidas pode ser reduzida em função de uma maior expressão de enzimas, tais como, esterases envolvidas no processo metabólico de detoxificação do inseticida (ARAÚJO, 2006). Esta troca metabólica é definida pela expressão *trade-offs* (Figura 9) que significa compensação, representando uma realocação de recursos energéticos de uma função primária para a manutenção de uma função secundária (RIVERO et al., 2011). Essa realocação de reservas

energéticas pode interferir no tempo gasto para o desenvolvimento das formas jovens, na fecundidade e na taxa de sobrevivência (GEORGHIOU, 1972; ROUSH; MCKENZIE, 1987). Alguns estudos têm reportado o custo energético em resposta à resistência a compostos químicos ou à infecção por patógenos.

**Figura 9** – Esquema representativo da realocação de reservas energéticas - *Trade-offs*.



Fonte: Do autor.

Nota: realocação de reservas de funções basais (A) para uma função secundária (B).

Rivero et al. (2011) avaliaram o custo energético de três linhagens isogenéticas de *Culex Pipens* caracterizadas quanto ao mecanismo de resistência a organofosforados (OP). Utilizou como controle uma linhagem susceptível denominada SLAB, e como grupo tratado: linhagem SB1 – resistente, com superexpressão de esterase B1, linhagem SA4B4 - resistente, com superexpressão de esterases A4 e B4 e linhagem SR – resistente, portadora de mutação no gene que codifica a enzima acetilcolinesterase. Dessa forma, *Culex pipiens* resistentes a organofosforados, apresentando superprodução de enzimas detoxificantes (esterases), ou mutação do gene acetilcolinesterase mostraram uma redução significativa das reservas lipídicas e de outros açúcares (não glicogênio) nos indivíduos resistentes.

Estes mesmos autores acreditam que o custo energético da metamorfose é maior para populações resistentes a inseticidas. De forma mais específica, eles explicam que em relação à linhagem fenotipada quanto ao mecanismo de resistência metabólico, a superexpressão enzimática implica em um maior investimento lipídico para o anabolismo das esterases. Por outro lado, em relação à linhagem portadora de mutação no gene que expressa a enzima Acetilcolinesterase, houve perdas de reservas devido a um aumento significativo da atividade do sistema nervoso do inseto.

Sharma et al. (2011) estudando larvas de *Anopheles stephensis* e de *Culex quinquefasciatus* expostas a fitoextratos, observaram o efeito sobre as reservas energéticas. Neste trabalho, foi observado que para as larvas de *Anopheles* houve um aumento no conteúdo de açúcares do grupo tratado. O comportamento fisiológico de *Anopheles* possivelmente ativa a via de catabolismo do glicogênio, aumentando o nível de açúcares que certamente é utilizado como fonte energética para degradação do princípio ativo do extrato.

Outra abordagem que visa quantificar reservas de mosquitos de importância médica é comparar níveis de recursos energéticos de indivíduos infectados por parasitas. Um exemplo foi demonstrado no estudo de Rivero et al. (2007) que quantificou glicogênio, açúcares e lipídeos de *A. aegypti* infectado com microsporídia *Vavraia culicis*. Foi verificado redução das três reservas dos mosquitos parasitados em relação ao grupo controle. Os autores assumem três possíveis respostas que explicariam a depleção. A primeira é que o parasitismo dificulta a aquisição de alimento, a segunda é que o sistema imune utiliza as reservas para reparar danos causados pelo parasita e a última afirma que o hospedeiro perde reservas para o parasita. Outro trabalho do mesmo grupo (2011) reporta que *Anopheles stephensis* apresentaram menor conteúdo energético quando infectado por *Plasmodium chabaudi*.

## **2.7 Custos biológicos associados à resistência a inseticidas químicos em mosquitos**

O desempenho biológico ou aptidão (*fitness*) de um indivíduo é a capacidade fisiológica de sobrevivência e reprodução no ambiente. Esse conceito está intrínseco em modelos de genética de populações relacionados à teoria da evolução e o *fitness* se manifesta nos sistemas biológicos por meio dos fenótipos (ORR, 2009).

O custo biológico ou adaptativo (*fitness cost*) da resistência consiste em um investimento energético que implica na perda elementar do potencial biótico do indivíduo. Esse custo é necessário para que haja manutenção dos mecanismos de resistência e, por conseguinte, a sobrevivência e reprodução da espécie-alvo (RIVERO et al., 2010).

Sendo assim, insetos resistentes podem apresentar uma grande vantagem adaptativa em um ambiente exposto a uma pressão contínua pelo uso de um inseticida. Entretanto, sua sobrevivência nestas condições pode representar redução no desempenho de alguns processos fisiológicos, como por exemplo, fecundidade e longevidade dos indivíduos/mosquitos em campo (RIVERO et al., 2010). No entanto, genótipos dotados de alelos de resistência aos xenobióticos podem apresentar algumas desvantagens adaptativas em relação aos indivíduos

susceptíveis na ausência da pressão seletiva exercida por tais compostos (ROUSH; MCKENZIE, 1987).

Estudos que envolvem custos biológicos associados à resistência estão inseridos em diferentes abordagens tais como a microbiologia (bactérias resistentes a antibióticos), entomologia agrícola (Hemiptera, Lepidoptera e Coleoptera) e entomologia médico-veterinária (Diptera). Esses custos podem ser uma vantagem na elaboração de um manejo integrado de pragas na estratégia de limitar a propagação de uma determinada população resistente (ROUSH; MCKENZIE, 1987).

O uso contínuo de um mesmo antibiótico pode ser visto como um procedimento que promova evolução em procariotos. Andersson e Levin (1999) estudaram inúmeras bactérias, a saber, *salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a diversas classes de antibióticos e verificaram que em indivíduos dotados de resistência havia mutações gênicas em alelos como *rpsL*, *rpoB*, *gyrA*, *KatG* e *fus*. Neste estudo, os autores verificaram que colônias resistentes, dotadas de mutações cromossômicas, produzem moléculas-alvo para degradar compostos, inativando os antibióticos. No entanto, quando o uso desses produtos é suspenso, as bactérias resistentes ficam em desvantagem competitiva em comparação às sensíveis, pois apresentam uma redução de proteínas expressas, comprometendo seu crescimento, virulência e transmissão. Sendo assim, isso é um aspecto que favorece a reversão de resistência e contribui para que outros fármacos de mesma classe sejam administrados em ocasião futura no paciente.

Em relação a insetos pragas-agrícolas resistentes a pesticidas, alguns estudos demonstraram custos de aptidão aos indivíduos fenotipicamente tolerantes. Konno e Omoto (2006) tiveram como objeto de estudo uma linhagem resistente do Pulgão-do-algodoeiro (*Aphis gossypii*) resistente ao Carbosulfam (carbamato). O estudo demonstrou que a frequência da resistência diminuiu consideravelmente na ausência da pressão seletiva e isso ocorre porque existe uma redução da fecundidade, do período reprodutivo e da longevidade desses indivíduos. A instabilidade da resistência é favorecida de forma significativa pelos parâmetros de tabela de vida de fertilidade e isso pode ser explorado pelos programas de manejo da resistência neste táxon. Foster et al. (2002), trabalhando com a praga da batata (*Myzus persicae*), proveniente da Inglaterra, pôde relacionar a redução populacional desse inseto em função da desvantagem biótica associada à resistência.

Por outro lado, um estudo de abordagem similar realizado por Castañeda et al. (2011) verificou que a população de campo do mesmo inseto *Myzus persicae*, resistente a inseticidas de diferentes classes, através de mecanismos metabólicos e sítio-alvo, não apresentavam

custos energéticos e desvantagens adaptativas em relação aos susceptíveis, pois ambas as populações mostraram desempenho populacional semelhante. Corroborando com esses dados, Oliveira (2005) verificou também que espécimes de campo do coleóptero *Sitophilus zeamais* (praga do milho) resistentes a piretróides não apresentaram desvantagem adaptativa em relação aos susceptíveis, esses indivíduos contribuíram em taxas semelhantes para a construção de gerações sucessoras. Esses achados deixam claro que o custo biológico associado à resistência não é um fenômeno obrigatório e, além disso, nem sempre as desvantagens adaptativas de uma espécie verificada em laboratório podem ser refletidas para campo.

Estudos com mosquitos de importância para saúde pública têm revelado altas taxas de resistência a diferentes inseticidas químicos e um custo adaptativo associado. Djogbénu et al. (2010) avaliando o custo biológico de uma linhagem de *Anopheles gambiae*, proveniente de Kisumu (oeste do Quênia – África), resistente a organofosforados e carbamatos, verificaram maior mortalidade na fase larvária e menor peso das pupas e adultos resistentes. Em outro estudo, envolvendo duas linhagens de *Anopheles stephensi*, provenientes da Índia, exposta ao temephos e ao propoxur (carbamato) mostrou que os parâmetros mais comprometidos foram: fecundidade, eclodibilidade das larvas, razão sexual e longevidade dos adultos. Além de efeitos pleiotrópicos relacionados ao prolongamento da fase larvária e atrofia dos testículos nas populações expostas aos inseticidas (SANIL; SHETTY, 2012).

Um estudo molecular sobre o custo da resistência a organofosforados em *Culex pipens*, considerado organismo modelo para estudo de *fitness cost*, revelou que os indivíduos dotados de mutações nos alelos *ace-1*, que codifica para a enzima acetilcolinesterase, bem como outras linhagens os alelos *ESTER1* e *ESTER2*, que codificam as esterases, apresentavam menor tamanho e requeriam maior tempo para seu desenvolvimento comparados aos indivíduos susceptíveis (BOURGUET et al., 2004).

Os primeiros registros de efeitos negativos associados à resistência ao temephos e a deltametrina em *A. aegypti*, no Brasil, foram relatados para populações da Paraíba (LEAL, 2008); Goiás e Roraima (BELINATO; MARTINS; VALLE, 2012) Ceará, Alagoas, Minas gerais, Goiás e Mato Grosso (MARTINS et al., 2012). Nestes estudos, diferentes parâmetros biológicos foram observados e apenas alguns deles foram significativamente reduzidos pela resistência, entre eles: tempo de desenvolvimento das formas jovens; quantidade de sangue ingerido, frequência de fêmeas inseminadas, tamanho das fêmeas, fecundidade e longevidade. Martins et al. (2012) discutem a existência da acumulação de efeitos negativos em diversos

parâmetros da história de vida dos indivíduos resistentes devido aos efeitos pleiotrópicos dos genes de resistência.

Mais recentemente, Paris et al. (2011) avaliando o *fitness cost* de uma linhagem francesa de *A. aegypti* resistente a várias toxinas isoladas do *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) identificaram desvantagens adaptativas em todas as fases de vida do mosquito, incluindo a viabilidade de ovos, tempo de desenvolvimento larval, e a fecundidade das fêmeas. Estes autores argumentam que a dinâmica de evolução de resistência no campo é altamente dependente do custo dos alelos de resistência.

Um trabalho de mesmo foco realizado com a mesma espécie por Brito et al. (2013) em uma linhagem resistente a piretróides, apresentando mutação no gene do canal de sódio (kdr), teve o objetivo de investigar a presença de custo no potencial biótico dos indivíduos. Neste estudo foi verificado por meio de testes bioquímicos que a população portadora da mutação também apresentava níveis elevados de enzimas detoxificadoras. Custos associados à manutenção desses mecanismos de resistência foram os seguintes: prolongamento do desenvolvimento larval, aumento da atividade locomotora dos adultos, menor frequência de fêmeas que ovipositaram e redução da sua fecundidade comparada com a linhagem Rockefeller, susceptível a inseticidas químicos.

### 3 JUSTIFICATIVA

O temephos tem sido usado para controle de *A. aegypti* no Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) há mais de 15 anos consecutivos. As populações desta espécie em diversas localidades brasileiras estão resistentes a este organofosforado. De acordo com Diniz (2011), em Pernambuco, 12 das 13 populações analisadas, no período de 2009 a 2011, estavam resistentes ao composto, apresentando razão de resistência (RR) entre 3 a 253 vezes. Corroborando com esses dados, Cabral (2012), ao analisar o perfil de susceptibilidade de populações de mosquito também do estado de Pernambuco, verificou um intervalo 7,1 a 222 da razão de resistência. Estas evidências são alarmantes e apontam para a necessidade de reestruturação das ações de monitoramento da efetividade dos inseticidas empregados no PNCD.

A implantação da estratégia de manejo da resistência preconizada no PNCD tem frequentemente acontecido de forma tardia, sendo restringida à substituição do temephos por inseticidas biológicos ou químicos de outras classes. Poucos estudos têm referido os mecanismos envolvidos com a resistência em populações brasileiras e os custos adaptativos relacionados a este fenômeno, que permitam compreender a sua dinâmica. Neste contexto, o projeto em questão se propôs a avaliar as habilidades competitivas e o *fitness* de populações de *A. aegypti* resistentes ao temephos, com o intuito de contribuir para subsidiar ações de manejo da resistência.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

Existe custo biológico associado à resistência ao larvicida temephos em diferentes linhagens selecionadas em laboratório e população de campo do mosquito *Aedes aegypti*?

## **5 HIPÓTESE**

A resistência ao temephos em populações de *Aedes aegypti* compromete parâmetros relacionados à reserva nutricional, tamanho e capacidade reprodutiva dos mosquitos.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo geral

Investigar a ocorrência de custos biológicos associados à resistência ao inseticida temephos em populações de *Aedes aegypti*.

### 6.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar parâmetros relacionados ao custo energético, o tempo de desenvolvimento e a reprodução em população natural *A. aegypti*, proveniente do município de Arcoverde-PE, e em linhagens dessa espécie com diferentes perfis de susceptibilidade ao temephos;
- b) Caracterizar as desvantagens adaptativas ligadas à resistência ao temephos na ausência da pressão de seleção a este inseticida em uma população de campo e em linhagens de *A. aegypti*;
- c) Caracterizar o perfil das enzimas ligadas à detoxificação de inseticidas nas diferentes populações estudadas.

## 7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 7.1 Populações de *Aedes aegypti*

Três linhagens de *Aedes aegypti*, todas com o mesmo *background* genético, além de uma população de campo proveniente do município de Arcoverde-PE, foram utilizadas no estudo sobre custo biológico ligado à resistência ao temephos. As formas jovens (larvas e pupas) dos mosquitos foram mantidas em bandejas plásticas para criação, contendo água e ração para gatos (Figura 10a).

Na fase de pupas os indivíduos foram transferidos para gaiolas de contenção para emergência dos mosquitos (Figura 10b). Machos e fêmeas foram alimentados com solução de açúcar a 10%, *ad libitum* e, adicionalmente, às fêmeas foi oferecido um repasto sanguíneo em Camundongos Swiss (*Mus musculus*) duas vezes por semana, para obtenção das progênes. O uso desses camundongos para os devidos fins foi devidamente autorizado pela comissão de ética do CPqAM-Fiocruz (CEUA) protocolado sob o n° 27/2011, estando de acordo com a lei 11.794/2008.

Os ovos depositados em papéis de filtro (papelotes), umedecidos, após a embriogênese, foram parcialmente desidratados à temperatura ambiente e armazenados até a sua utilização. Todos os insetos foram mantidos em salas climatizadas a  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de 50% a 60% e fotofase de 12h.

#### 7.1.1 Linhagem de *Aedes aegypti* Recife-Resistente (RecR)

A linhagem Recife-Resistente (RecR) originada da população de campo do município de Araripina, Sertão de Pernambuco, tem sido submetida à alta pressão de seleção com o inseticida organofosforado temephos, por inúmeras gerações consecutivas (MELO-SANTOS et al., 2010). A RecR, atualmente em sua 28ª geração filial tem sido mantida no Insetário do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, desde 2004. Os testes deste estudo foram executados com a 26ª geração desta população, com razão de resistência (RR) maior do que 300 vezes para o temephos. Essa RR mencionada refere-se ao valor da concentração letal para 95% (CL95%) das larvas da população teste dividido pelo valor da CL95% da linhagem padrão de susceptibilidade (Rockfeller).

**Figura 10** - Instalações do insetário do CPqAM utilizadas para o estabelecimento e manutenção das populações de *Aedes aegypti*.



Fonte: Diniz (2011).

Nota: A) recipientes plásticos para a criação das formas aquáticas (larva e pupa) do mosquito; B) gaiolas de contenção onde foram mantidas as formas aladas do mosquito.

#### 7.1.2 Sub-linhagens Rec-Reversa (RecRev) e RecR Não Exposta (RecRNex)

A primeira sub-linhagem submetida ao processo de reversão da resistência ao temephos, RecRev, foi estabelecida a partir da 14<sup>a</sup> geração da RecR, quando apresentava uma RR de 125 vezes (MELO-SANTOS et al., 2010). Hoje, a RecRev, em sua 23<sup>a</sup> geração consecutiva sem exposição ao temephos, é considerada susceptível ao inseticida por apresentar uma RR < 3 vezes e portanto utilizada como controle de todos os testes de desempenho biológico. A segunda sub-linhagem, RecR-Não Exposta (RecRNEx) foi fundada neste estudo a partir da 26<sup>a</sup> geração da RecR. A pressão de seleção com o temephos foi suspensa por cinco gerações consecutivas para avaliação dos parâmetros biológicos que estão descritos no item 7.3.

#### 7.1.3 Linhagem Rockefeller

A linhagem Rockefeller, padrão de suscetibilidade a inseticidas químicos, foi utilizada exclusivamente como controle para os testes de quantificação da resistência e de atividade de enzimas detoxificantes de inseticidas. Esta linhagem foi gentilmente cedida pela Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de Marília-SP.

### 7.1.4 População de campo de Arcoverde

Amostras da população natural de *A. aegypti* proveniente do município de Arcoverde, localizado a uma latitude 08°25'08" Sul e a uma longitude 37°03'14" Oeste, a 252 km do Recife, capital do estado de Pernambuco, foram obtidas previamente através da coleta de ovos por armadilha, ovitrampas, (Figura 11), no período de julho e agosto de 2011. Um estudo prévio realizado por Cabral (2012) caracterizou essa população como resistente ao temephos (RR = 222,6) e à cipermetrina (mortalidade > 80%), apresentando o mecanismo de resistência metabólica ligado a alteração na atividade das seguintes enzimas:  $\alpha$ -Esterase e PNPA-Esterases e GST. Uma amostra desta população foi gentilmente cedida para este estudo pelo Serviço de Referência para Controle de Culicídeos Vetores (SRCCV) do Departamento de Entomologia do CPqAM/FIOCRUZ –PE em 2011. Os testes comparativos com esta população foram realizados através de sua segunda geração filial (F<sub>2</sub>).

### 7.2 Quantificação da resistência ao Temephos

Ensaio *in vivo* foram realizados com o objetivo de mensurar a resistência das larvas das linhagens RecRev e RecRNex descritas no item 7.1. Nos bioensaios (Figura 12) foram utilizadas concentrações variadas [0,30 a 3,50 mg/ml] do temephos em seu grau técnico (Sigma/97,5% - lote n°: 0535/2011). Os testes foram feitos de acordo com a metodologia de Braga et al. (2004) e Montella et al. (2007), adaptada do protocolo descrito pela Organização Mundial de Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1981).

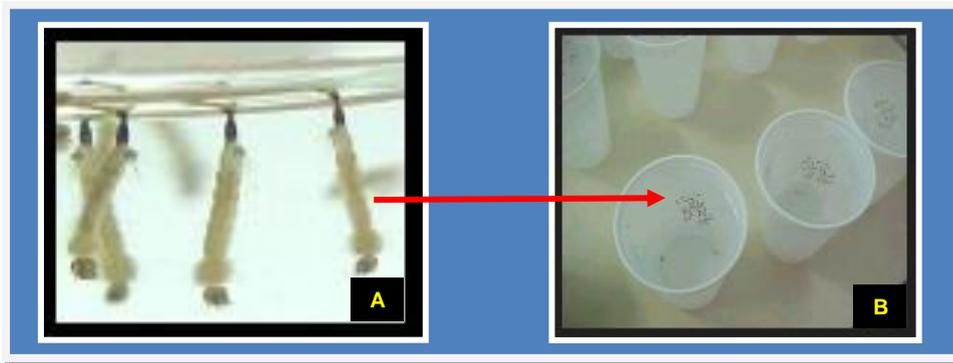
**Figura 11** - Visualização do instrumento (armadilha de oviposição) Utilizado para coleta de amostras de ovos de *Aedes aegypti* em campo.



Fonte: Portal Sul do Piauí (2013); Google Map.

Nota: A) armadilha de oviposição (ovitrampa) utilizada para coletar ovos de *Aedes* spp. no município de Arcoverde, Pernambuco, cuja área está destacada em linha pontilhada na imagem B.

**Figura 12.** Visualização do ensaio de exposição de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida químico temephos.



Fonte: Gomes (2006).

Nota: (A) larvas em início de 4º estágio de desenvolvimento; (B) grupo de larvas mortas após o tratamento com o inseticida temephos.

Para cada concentração do temephos e controle foram tomadas três réplicas e pelo menos três ensaios independentes foram realizados com cada linhagem, com o intuito de estimar as concentrações letais do inseticida. Estas foram calculadas por regressão linear Log-Probit (FINNEY, 1971), a partir da mortalidade larvária observada nos ensaios após 24h de exposição ao inseticida, usando o pacote estatístico SPSS 8.0/Windows. A razão de resistência (RR) foi estimada considerando o valor da  $CL_{95}$  (concentração letal para 95% das larvas) da linhagem-teste dividido pelo valor observado para a Rockefeller ( $CL_{95} = 0,011$  mg/ml). As populações foram classificadas com relação ao grau de resistência, de acordo com os critérios estabelecidos por Mazzarri; Georghiou (1995) e ajustados pela Rede MoReNAa em: baixa ( $3 \leq RR \leq 5$ ), média ( $5 < RR \leq 10$ ) ou alta ( $RR > 10$ ). Portanto, populações com respostas de  $RR < 3$  foram consideradas como susceptíveis (DINIZ, 2011).

### 7.3 Parâmetros biológicos relacionados à resistência ao inseticida químico temephos

#### 7.3.1 Dinâmica do desenvolvimento populacional dos diferentes grupos *Aedes aegypti*

Esse ensaio foi realizado com o intuito de verificar em quanto tempo a maioria dos indivíduos, com perfis distintos de susceptibilidade ao temephos, criados sob as mesmas condições abióticas (densidade, pH, luminosidade, quantidade de alimento e umidade relativa) atingiam a fase adulta. Sendo assim, 200 larvas recém-eclodidas de cada grupo (9 réplicas/população) foram colocadas em recipientes plásticos (Figura 10A) contendo 2 litros de água mineral e 1 mg de alimento por larva. A cada três dias, até o fechamento do ciclo, foram registrados os percentuais de larvas, pupas e adultos sobreviventes, bem como o

quantitativo de machos e fêmeas (razão sexual). No entanto, o primeiro registro foi realizado a partir do 5º dia de desenvolvimento.

### 7.3.2 Parâmetros reprodutivos e longevidade das fêmeas das diferentes populações

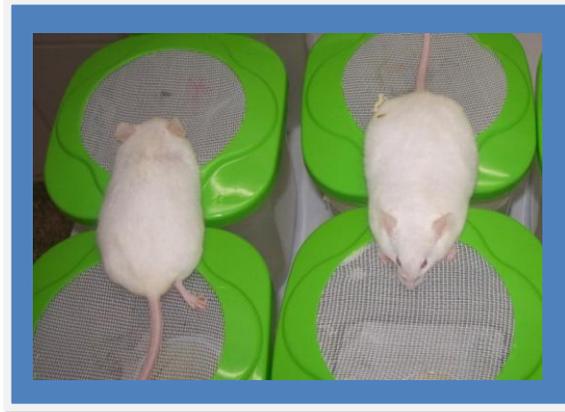
Com o objetivo de estudar individualmente a fecundidade e a fertilidade das populações, 50 fêmeas foram inicialmente reunidas em uma gaiola de contenção, onde permaneceram em contato com os machos por cinco dias, antes de ser ofertado o primeiro repasto sanguíneo em camundongos Swiss (*Mus musculus*) (Figura 13).

No dia seguinte a este procedimento as fêmeas ingurgitadas foram individualizadas em gaiolas menores contendo papelotes para a deposição de seus ovos e, conseqüentemente, para o registro dos dados de fecundidade. Três repastos sanguíneos adicionais foram oferecidos às fêmeas sobreviventes a cada sete dias. Além disso, foi registrado o tempo de sobrevivência individual (em dias) das fêmeas.

### 7.3.3 Tempo para a realização do repasto sanguíneo

O tempo (em minutos) gasto para a localização do hospedeiro e a finalização da alimentação sanguínea foi registrado para um grupo de 20 fêmeas de cada uma das quatro populações estudadas. Para potencializar o processo de alimentação, o acesso das fêmeas a fonte de sucrose foi interrompido 24 horas antes de ser disponibilizado o contato com camundongo (*Mus musculus*), devidamente anestesiado (2:1 – xilazina e quetamina). As fêmeas deste experimento foram as mesmas utilizadas para observar a fecundidade, fertilidade e longevidade.

**Figura 13** - Visualização do esquema de alimentação sanguínea individual das fêmeas de *A. aegypti* em camundongos (*Mus musculus*) anestesiados.

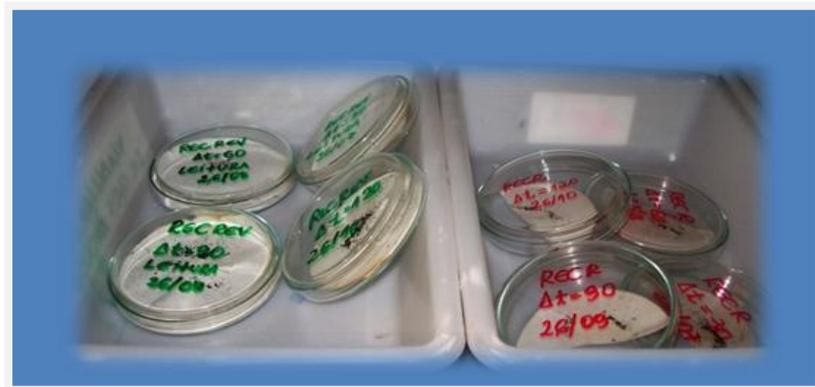


Fonte: Do autor

#### 7.3.4 Viabilidade embrionária em ovos com diferentes tempos de quiescência

As fêmeas resultantes dos experimentos 7.3.1 foram transferidas individualmente para gaiolas de contenção e alimentadas semanalmente com sangue para obtenção dos ovos. Cerca de cinco papelotes contendo ovos de cada população foram divididos em sete partes, com quantitativos similares de ovos, armazenados em placas de petri na ausência de umidade (Figura 14), para a avaliação dos seguintes períodos de quiescência ( $\Delta t$ ) 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

**Figura 14** - Visualização do armazenamento de ovos de *A. aegypti* em placas de Petri para análise de viabilidade embrionária em ovos quiescentes.



Fonte: Do autor.

### 7.3.5 Tabela de vida de fertilidade

Os experimentos para obtenção das variáveis necessárias a construção da tabela de vida foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Leal (2008), baseada na formação de 10 grupos de 10 larvas/população, mantidos em pequenos recipientes plásticos (copos), preenchidos com 100 ml de água e alimento proporcional a este volume. Os indivíduos foram contados diariamente para registrar a duração em dias das fases de larva e pupa e emergência de adultos. A tabela de vida foi construída com base na metodologia descrita por Silvera Neto (1976), e organizada para todos os indivíduos da geração observada considerando as seguintes variáveis:

**x** - intervalo de idade, estimado pelo número de semanas de vida de cada fêmea;

**mx** - fertilidade específica, calculada pelo número total de ovos/fêmea/semana que darão novas fêmeas. Neste cálculo foi considerada a razão sexual (n° de fêmeas/n° de fêmeas + n° de machos);

**I<sub>x</sub>** - taxa de sobrevivência durante o estágio x, dada pela probabilidade do inseto nascido estar vivo na idade x;

**I<sub>x</sub>.m<sub>x</sub>** - número de fêmeas descendentes na idade x de uma fêmea parental;

**R<sub>0</sub>** – taxa líquida de reprodução, dada pelo número médio de fêmeas gerado por cada fêmea ao longo de todo período de oviposição. Essa variável indica quantas vezes a população cresceu no intervalo de uma geração, pela fórmula,  $R_0 = \sum (I_x \cdot m_x)$ ;

**T** – tempo em cada geração, refletido pelo período médio que vai do nascimento dos pais ao nascimento dos descendentes, isto é, a duração média de uma geração, definido pela fórmula:  $T = \sum (I_x \cdot m_x \cdot x) / \sum (I_x \cdot m_x)$ ;

**r<sub>m</sub>** - taxa intrínseca de crescimento, correspondente ao fator relacionado com a velocidade de crescimento da população. Se  $r_m = 1$ , indica que a população não sofreu alteração quanto ao seu crescimento, se  $r_m < 1$ , é porque houve um decréscimo populacional e se  $r_m > 1$ , indica que houve crescimento populacional. Essa variável é calculada pela fórmula:  $r_m = \log R_0 / T \times 0,4343$ ;

$\lambda$  – razão finita de aumento, é o n° de fêmeas adicionadas em um intervalo de tempo ao longo de uma geração, dada pela fórmula,  $\lambda = \text{anti-log}(r_m \times 0,4343)$  ou  $\lambda = e^{rm}$ ;

**TD** – tempo necessário para a população duplicar em número inicial de indivíduos (n). Essa variável é dada pela fórmula:  $TD = 2n / r_m$ .

## 7.4 Parâmetros morfométricos

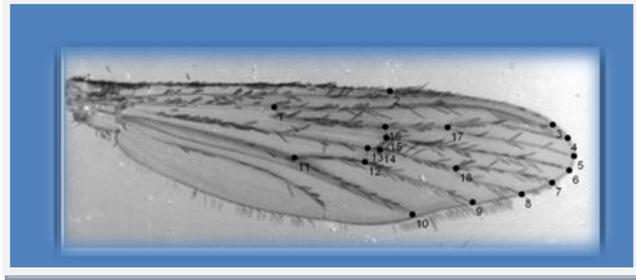
### 7.4.1 Pesagem de pupas e adultos de ambos os sexos

O peso corpóreo úmido foi estimado a partir da pesagem de 10 grupos de 25 indivíduos, pupas e adultos, machos e fêmeas (ambos não alimentados) de cada população, em balança digital analítica de alta precisão (BA-002, BEL - Engineering). Essas amostras foram provenientes do experimento descrito no item 7.3.1.

### 7.4.2 Morfometria geométrica alar das fêmeas de *A. aegypti* de laboratório e campo

O tamanho das fêmeas também foi estimado pela morfometria alar (Figura 15) para 15 indivíduos de cada população. A metodologia de morfometria seguida foi descrita por Moraes et.al (2010). As imagens das asas, montadas entre lâmina e lamínula com Balsamo do Canadá, foram capturadas através de câmera fotográfica acoplada à lupa (Luxeo 4D – Labomed) no aumento de 40x. Sobre as imagens, e com o auxílio de softwares específicos (tpsdig, tpsUtil, Morpho J), foram tomadas as coordenadas posicionais de cada um dos 18 pontos anatômicos sobre um plano cartesiano. Sobre esses dados foram computados os tamanhos de centroides. Testes estatísticos ANOVA e Tukey foram utilizados para análise dos dados (com análises a 99% de significância).

**Figura 15** – Visualização de uma asa de *Aedes aegypti* e seus pontos anatômicos utilizados para análise de morfometria geométrica populacional.



Fonte: Leandro (2011).

## 7.5 Parâmetros Bioquímicos

### 7.5.1 Quantificação da atividade de enzimas detoxificantes de inseticidas

Esses testes têm como finalidade quantificar a atividade de enzimas envolvidas com a detoxificação de xenobióticos nas populações de *Aedes aegypti* de campo, previamente caracterizadas quanto ao perfil de susceptibilidade ao temephos. As enzimas avaliadas foram as seguintes: Oxidases de Função Mista (MFO), Glutathione-S-Transferases (GSTs) e as Esterases (alfa, beta e PNPA). Os ensaios bioquímicos foram executados conforme descrito no Manual do Ministério da Saúde (2006), havendo pequenas modificações metodológicas. Aproximadamente, 120 fêmeas por população, com um dia de emergência e não alimentadas com sangue, foram analisadas por população.

As fêmeas foram aspiradas das gaiolas de contenção por um capturador de castro e transferidas para o freezer, onde permaneceram por 5 minutos em baixa temperatura (-20 °C) até a completa ausência de mobilidade. Em seguida, grupos de 40 a 45 fêmeas/população foram repassados para microtubos (Figura 16 A - B) e congeladas a - 80 °C ainda vivas. No momento da execução dos testes, 40 fêmeas da população alvo e 5 da linhagem padrão de susceptibilidade Rockefeller foram maceradas (Figura 16 C) individualmente, com água mili-Q (deionizada) e homogeneizadas em microtubos. Os homogenatos foram distribuídos nas microplacas (Nunc®) com 96 poços (Fig. 16 D), em duplicatas. Cada microplaca correspondeu a uma enzima.

**Figura 16** – Esquema visual da preparação de homogenatos de mosquito para execução de testes bioquímicos.



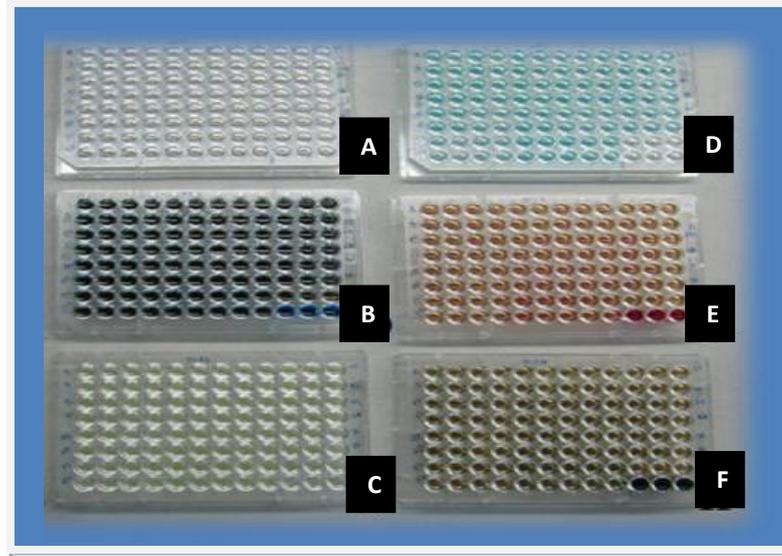
Fonte: Fundação Nacional de Saúde, 2006.

Nota: (A-B) transferência de fêmeas anestesiadas por resfriamento para microtubos; (C) maceração dos mosquitos e preparação dos homogenatos; (D) transferência dos homogenatos para a microplaca.

Antes de passar pela centrifugação, uma parte do homogenato dos mosquitos foi distribuída em uma das placas para a quantificação das Oxidases de Função Mista (MFOs). Após a centrifugação de 6 min a 2000 rpm, o homogenato foi distribuído nas demais placas, para a quantificação das outras enzimas, isto é, das Glutinationas-S-Transferases (GSTs) e Esterases ( $\alpha$ ,  $\beta$  e PNPA).

Os homogenatos foram incubados com substratos e reagentes específicos para revelar a atividade das enzimas (Figura 17). O substrato utilizado para a Glutinationa-S-Transferase foi a L-glutinationa reduzida e 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene, para as Esterases  $\alpha$  e  $\beta$  foram os alfa-nafitil, beta-nafitil, para a Esterase PNPA, o 4-nitrofenil acetato e para a Oxidase de função Múltipla foi utilizado o 3,3,5,5 dihidrocloroeto de tetrametil benzidina.

**Figura 17** – Visualização de microplacas destinadas à avaliação da atividade de enzimas detoxificadoras de xenobióticos em fêmeas de *Aedes aegypti*.



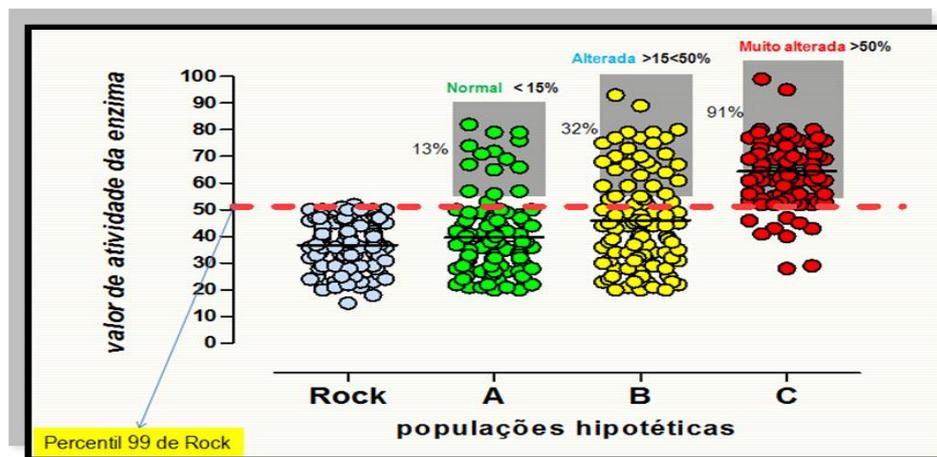
Fonte: Cabral (2012).

Nota: (A) Glutathiona-S-Transferase (GST); (B) Proteínas Totais (PTN); (C) PNPA-Esterase; (F) Oxidases de Função Múltipla (MFO); (G) BETA-Esterase; (H) ALFA-Esterase.

O tempo de incubação e o comprimento de onda utilizado foram específicos para cada tipo de enzima. A enzima MFO foi incubada por 01h30min ao abrigo da luz, e sua leitura foi feita em *end point* (leitura única após a reação na placa) com o comprimento de onda a 650 nm. No caso particular das MFO o teste bioquímico não avalia a atividade enzimática, mas a quantificação do grupamento heme que, em insetos não alimentados com sangue está, em sua maioria, associado ao citocromo P450, permitindo inferir a atividade destas enzimas (HEMINGWAY, 1998). Para as GSTs, a leitura foi feita em 340 nm, em cinética, com duração de 20 minutos, em intervalos de 1 minuto para cada leitura. Para as  $\alpha$  e  $\beta$  esterases, o comprimento de onda foi de 570 nm, com leitura imediata, e para a esterase PNPA o comprimento de onda foi de 405 nm e a leitura cinética teve duração de 2 minutos, com intervalos de 15 segundos. As placas foram lidas em um espectrofotômetro (Biosystem® Elx808) que ao final de cada teste revelou um valor da absorbância das réplicas dos mosquitos. O software *GEN 5* analisou os resultados de absorbância encontrados e as planilhas Excel, padronizadas pelo Ministério da Saúde (FUNDAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006), foram utilizadas para a conversão dos dados de absorbância em atividade enzimática. Para a obtenção da atividade enzimática de cada indivíduo, estas foram corrigidas de acordo com a concentração de proteínas totais de cada mosquito.

A classificação dos perfis enzimáticos das populações testadas foi feita por comparação com o percentil 99 da linhagem Rockefeller (Figura 18), que é a atividade enzimática observada para 99% destes indivíduos. Assim, quando menos que 15% dos mosquitos apresentam atividade enzimática maior do que o percentil 99 de Rockefeller, a população é considerada normal. Quando os valores dos indivíduos alterados se mostravam entre 15% e 50%, o perfil enzimático da população foi classificado como alterado, e, valores acima de 50%, muito alterado, de acordo com os critérios definidos pelo Ministério da Saúde (2006).

**Figura 18** – Classificação do nível de alteração da atividade de enzimas detoxificadoras de xenobióticos em populações de *Aedes aegypti*, com base no percentil 99 para a linhagem susceptível Rockefeller.



Fonte: Helvecio (2011). Nota: (A) população não alterada; (B) população alterada; (C) população muito alterada.

### 7.5.2 Quantificação das reservas energéticas: lipídeos, glicogênio e outros açúcares

Os conteúdos de lipídeos, glicogênio e açúcares foram quantificados individualmente, em 50 fêmeas recém-emergidas, por meio da técnica colorimétrica modificada de Van Handel e Day (1985a, 1985b, 1988) e descrita por Rivero et al. (2007), utilizando o espectrofotômetro Bio Rad-Smartspec 3000 para leitura das absorbâncias, posteriormente convertidas em micrograma de reserva.

### 7.5.2.1 Curva padrão de reservas energéticas

- a) Para a quantificação de açúcares volumes de 25, 50, 100, 150 e 200 µl de uma solução mãe de 1:1 de glicose anídrica e água deionizada foram transferidos para tubos de ensaios contendo 5 ml do reagente antrona. Após aquecimento por 17 minutos (90 - 110 °C) foi realizada a leitura a uma densidade ótica de 625 nm, em espectrofotometro de curveta. A calibração foi feita em triplicata.
- b) Para os lipídeos o procedimento teve início com a preparação de uma solução mãe de 1:1 de óleo vegetal comercial e clorofórmio. Em seguida, volumes de 50, 100, 200 e 400 µl desta solução foram transferidos para tubos de ensaios, submetidos ao aquecimento (90 a 110 °C) até a completa evaporação do solvente. Então foram adicionados à amostra 200 µl de ácido sulfúrico, para mais um período de aquecimento de 10 minutos. Por fim, foi adicionado o reagente vanilina até completar 5 ml do tubo de ensaio ainda no bloco aquecedor, para que em seguida as amostras fossem submetidas a leitura por meio do espectrofotômetro e feita a leitura com a mesma densidade ótica que o procedimento anterior. A calibração também foi feita em triplicata.

### 7.5.2.2 Preparação dos homogenatos, extração e quantificação de reservas

Para a extração de lipídeos, glicogênio e frações de outros açúcares dos mosquitos, estes foram macerados individualmente em 200 µl de sulfato de sódio a 2% para obtenção de homogenatos, lavados duas vezes com 800 µl de metanol-clorofórmio e centrifugados (3000 rpm) por 1 minuto.

O pellet foi utilizado para a quantificação do glicogênio e o sobrenadante para os outros açúcares e lipídeo. Ao sobrenadante adicionou-se 600 µl de água para um novo ciclo de 1 min de centrifugação, para promover a separação da fração superior para análise de açúcares e a inferior para a análise de lipídeos. A amostra para quantificação de lipídeos foi aquecida (90 - 110 °C) até a evaporação do solvente, recebendo em seguida 200 µl de ácido sulfúrico. A amostra foi reaquecida por 10 min e recebeu a adição de vanilina até um volume final de 5 ml. Após ser retirada do bloco de aquecimento a amostra foi analisada por fotolorimetria a

uma densidade ótica de 625 nm. Um procedimento similar também foi adotado para a amostra dos outros açúcares e glicogênio, diferindo apenas quanto ao reagente adicionado após a evaporação (antrona) e ao tempo de aquecimento (17 min) antes da leitura de densidade ótica.

O valor energético de açúcares e glicogênio por indivíduo foi calculado considerando que 1 mg desses carboidratos equivale a 16,74 J e que 1 mg de lipídeo equivale a 37,74 J (CLEMENTS, 1992). Os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e posteriormente por meio do teste de Fisher.

## **7.6 Desenho experimental e análise de Dados**

O delineamento experimental desse estudo foi inteiramente casualizado e a análise comparativa dos resultados referentes aos testes de custo adaptativo (itens 7.3 e 7.4) foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a posteriori. Todas as análises foram realizadas com o software STATISTICA 7.1, a um nível de significância de 5%. Os demais testes foram devidamente especificados quanto à análise estatística dos dados.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Perfil de susceptibilidade das populações de *A. aegypti* ao temephos

Os valores de razão de resistência ao temephos estimados a partir da  $CL_{95}$  de cada população analisada estão dispostos na Tabela 1. A linhagem resistente RecRNEx permaneceu com alto nível de resistência, após cinco gerações consecutivas não expostas ao temephos.

**Tabela 1** - Perfil de susceptibilidade ao temephos para populações de *Aedes aegypti*.

População	$CL_{95}$ mg/L	$IC_{95}$	$RR_{95}$
Rockefeller	0,011	[0,009 - 0,015]	1,0
RecR-Reversa (RecRev)	0,025	[0,018 - 0,039]	2,32
RecR-Não Exposta (RecRNEx)	2,760	[2,31 - 3,24]	250,5
Recife-Resistente (RecR)	3,120	[2,83 - 3,66]	283,6
Arcoverde*	3,150	[2,85 - 3,48]	283,1

Fonte: Do autor. Nota: \* Cabral (2012).

 Susceptível
  Resistência baixa (> 3 e < 5)
  Resistência moderada (> 5 e < 10)
  Resistência alta (> 10)

$RR_{95}$  = Razão de resistência para a concentração letal de 95%;  $CL_{95}$  da linhagem Rockefeller = 0,011 mg/L.  $IC$  = Intervalo de confiança da  $CL_{95}$ .

### 8.2 Dinâmica do desenvolvimento populacional de *A. aegypti*

O acompanhamento do desenvolvimento de 1800 larvas por população revelou que para a linhagem susceptível (RecRev), a maioria atingiu a fase adulta no período de 15 a 18 dias após a eclosão das  $L_1$ , enquanto que nas populações resistentes foi observado um prolongamento do desenvolvimento pré-imaginal de cinco a sete dias (Gráfico 1). Houve diferença significativa relacionada ao número de larvas que atingiram o 3º estágio ( $F=14,609$ ;  $GI=3,34$ ,  $p < 0,000005$ ) e o 4º estágio ( $F=14,609$ ;  $GI=3,34$ ,  $p < 0,000005$ ) no 5º dia de desenvolvimento entre a população susceptível (RecRev) e as populações RecRNEx ( $p = 0,0005$  /  $p = 0,0006$ ), RecR ( $p = 0,0008$  /  $p = 0,002$ ) e Arcoverde ( $p = 0,002$  /  $p = 0,002$ ), ou seja, no primeiro momento de avaliação cerca de 90% dos indivíduos susceptíveis alcançaram a fase de  $L_4$  contra aproximadamente 60% das populações resistentes.

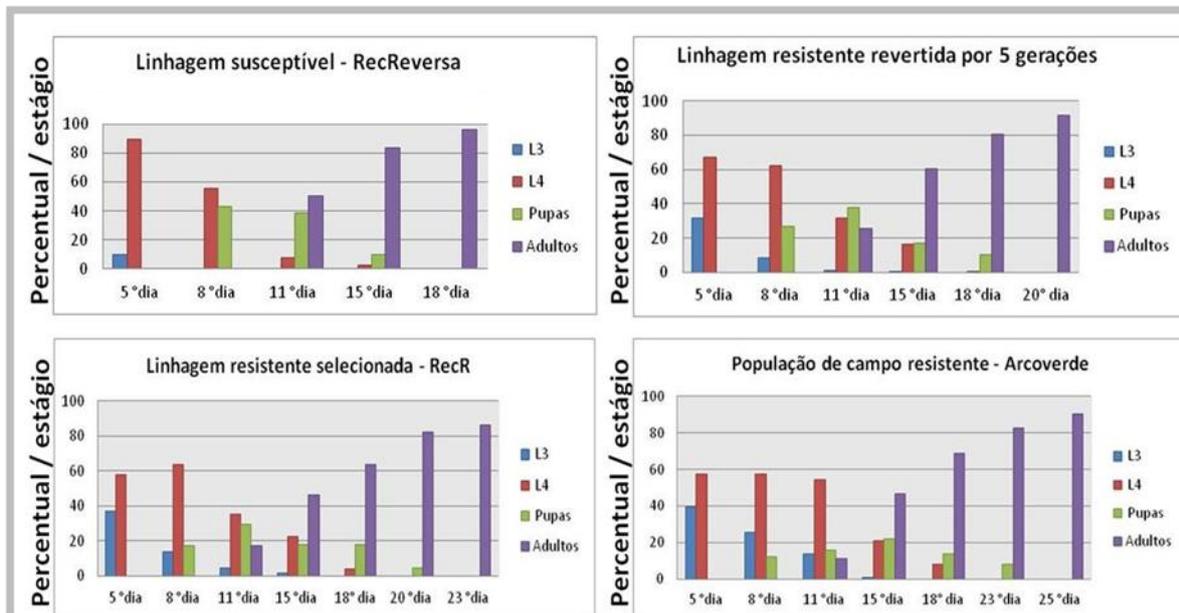
No 15º dia, período em que mais de 80% dos indivíduos da linhagem susceptível chegou à fase adulta, RecRNEx apresentou cerca de 60%, RecR e Arcoverde cerca de 45%. Foram observadas diferenças estatísticas no percentual de adultos entre a população susceptível e as populações RecRNex ( $p = 0,003$ ), RecR ( $p = 0,002$ ) e Arcoverde ( $p = 0,002$ ). Assim como houve diferença significativa entre RecRNex e RecR ( $p = 0,003$ ), entre RecRNex e Arcoverde ( $p = 0,0001$ ) e entre RecR e Arcoverde ( $p = 0,02$ ).

Nesta avaliação também foi verificado que apenas 3,7% dos indivíduos susceptíveis morreram, e que isso ocorreu exclusivamente na fase larvária, enquanto que a perda de indivíduos nas populações resistentes apesar de maior nesta fase também foi detectada na fase de pupa, perfazendo mortalidades acumuladas de 8,3% a 13,5%. Tomando como referencial o 18º dia, em que 100% da população sobrevivente dos susceptíveis chegou a fase adulta de desenvolvimento, houve diferença significativa ( $F = 6,7382$ ;  $Gl=3,32$ ,  $p = 0,001$ ) entre a taxa de mortalidade das populações RecRev e RecR ( $p = 0,0007$ ), RecRev e Arcoverde ( $p = 0,03$ ), e RecR e Arcoverde ( $p = 0,03$ ).

### **8.3 Duração dos estágios larva, pupa e intervalo ovo-adulto**

Os resultados apresentados na Tabela 2 revelaram que a duração da fase larvária e o intervalo ovo-adulto foram menores na população susceptível RecRev, diferindo significativamente apenas da população de Arcoverde ( $F = 6,82$ ;  $Gl:3,196$ ;  $p = 0,00021$  /  $F = 5,9$ ;  $Gl:3,196$ ;  $p = 0,0002$ ). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as populações no tempo de desenvolvimento do estágio pupal.

**Gráfico 1** - Percentual de larvas, pupas e adultos X tempo (dias) das populações de *Aedes aegypti*



Fonte: Do autor.

#### 8.4. Fecundidade e fertilidade de fêmeas de *Aedes aegypti*

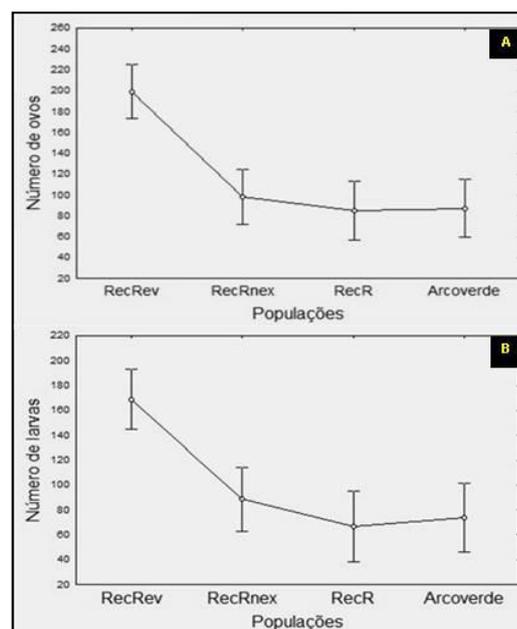
Essa análise revelou que o potencial reprodutivo das fêmeas foi reduzido na ordem de duas vezes para as populações resistentes ao temephos em relação à linhagem susceptível. No gráfico 2, estão descritos os resultados sobre a fecundidade (nº de ovos / fêmea) e a fertilidade (nº de L<sub>1</sub>/nº de ovos/ fêmea) das diferentes populações estudadas. O número de ovos postos e nº de indivíduos viáveis por fêmea foram significativamente maiores na população susceptível (RecRev) comparado as resistentes ( $F = 17$ ;  $Gl:3,164$ ;  $p = 0,0000008$  /  $F = 13,9$ ;  $Gl:3,14 4$ ;  $p = 0,0000$ ). De um modo geral, em todos os grupos estudados foram detectadas fêmeas não fecundas ou inférteis, sendo os percentuais mais elevados observados nas populações resistentes (Gráfico 3). Os valores cumulativos destas duas variáveis totalizaram reduções de 22%, 30% e 40% das fêmeas reprodutivamente ativas nas populações RecRNex, Arcoverde e RecR, respectivamente, comparado a 12% da linhagem susceptível. A taxa de eclosão entre as populações foi de 85% (7722 L<sub>1</sub>/9039 ovos) para RecRev, 83% (3480 L<sub>1</sub>/4184 ovos) para RecRNEx, 70% (2069 L<sub>1</sub>/2974 ovos) para RecR e 78% (7722 L<sub>1</sub>/9039 ovos) para Arcoverde, havendo diferença significativa ( $F=3,1$ ;  $Gl=5,03$ ) as populações RecRev e RecR ( $p = 0,03$ ) e RecRNEx e RecR ( $p = 0,01$ ).

**Tabela 2** – Duração do tempo médio das fases de larva, pupa e do período ovo-adulto para populações de *Aedes aegypti* resistentes ao temephos. Temperatura  $26 \pm 1$  °C; fotofase 12h.

População/status para o temephos	Duração do estágio de desenvolvimento (dias)		
	(número médio $\pm$ SD) <sup>1</sup>		
	Larva	Pupa	Ovo – Adulto
RecReversa - Susceptível	$7,5 \pm 2,4$ <sup>A</sup>	$3,5 \pm 0,7$ <sup>A</sup>	$11,2 \pm 2,3$ <sup>A</sup>
RecRNex - Resistente sel/lab. (não exposta)	$9,0 \pm 4,0$ <sup>A</sup>	$3,5 \pm 0,8$ <sup>A</sup>	$12,6 \pm 4,1$ <sup>A</sup>
RecR - Resistente Sel/lab. (exposta)	$9,5 \pm 3,9$ <sup>A</sup>	$3,3 \pm 0,7$ <sup>A</sup>	$13,0 \pm 3,8$ <sup>A</sup>
Arcoverde – Resistente de campo	$11,1 \pm 5,2$ <sup>B</sup>	$3,3 \pm 0,6$ <sup>A</sup>	$14,5 \pm 5,1$ <sup>B</sup>
C.V	45,1	20,6	31,9

Nota: 1 Médias originais; Para efeito da análise estatística os dados foram transformados em Log x. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). CV- coeficiente de variação das populações.

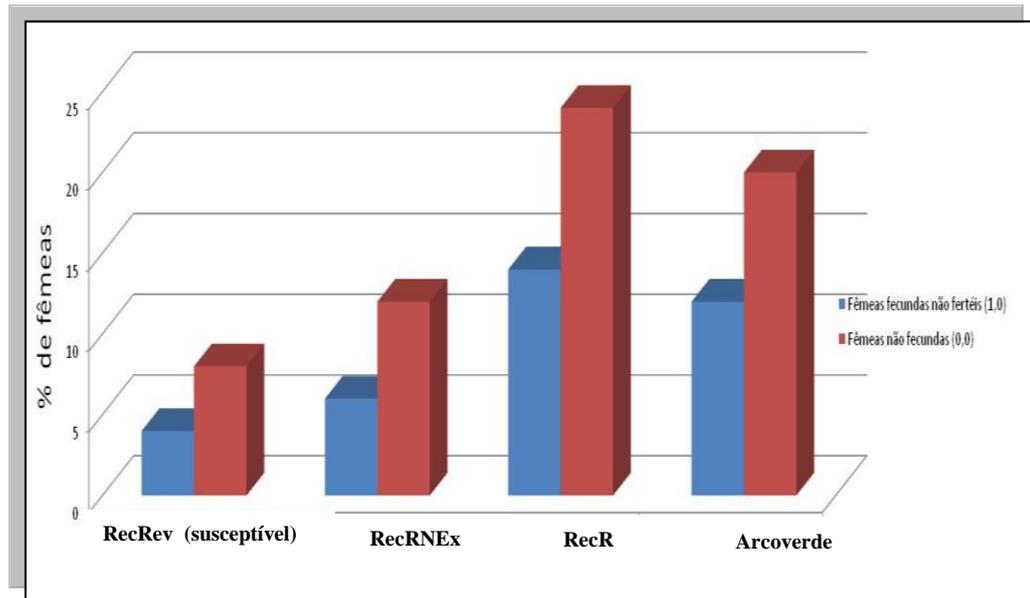
**Gráfico 2** – Parâmetros reprodutivos de Fêmeas de *Aedes aegypti*



Fonte: Do autor.

Nota: A) Fecundidade e B) fertilidade das Fêmeas de *Aedes aegypti*

**Gráfico 3** - Inviabilidade reprodutiva de fêmeas das populações de *Aedes aegypti* com *status* diferentes de susceptibilidade ao temephos.



Fonte: Do autor.

### 8.5 Longevidade de fêmeas de *Aedes aegypti*

Quanto à longevidade das fêmeas, foi observado que as susceptíveis sobreviveram em média 39 dias, com uma variação intragrupo de 11 a 64 dias, enquanto que as resistentes sobreviveram por um tempo significativamente menor ( $F= 31,51$ ;  $Gl=3,191$ ;  $p = 0,00008$ ) (Tabela 4). A linhagem resistente (RecR) também diferiu significativamente da população de Arcoverde ( $F= 31,51$ ;  $Gl=3,191$ ;  $p = 0,009$ ).

### 8.6 Viabilidade de ovos com diferentes tempos de quiescência

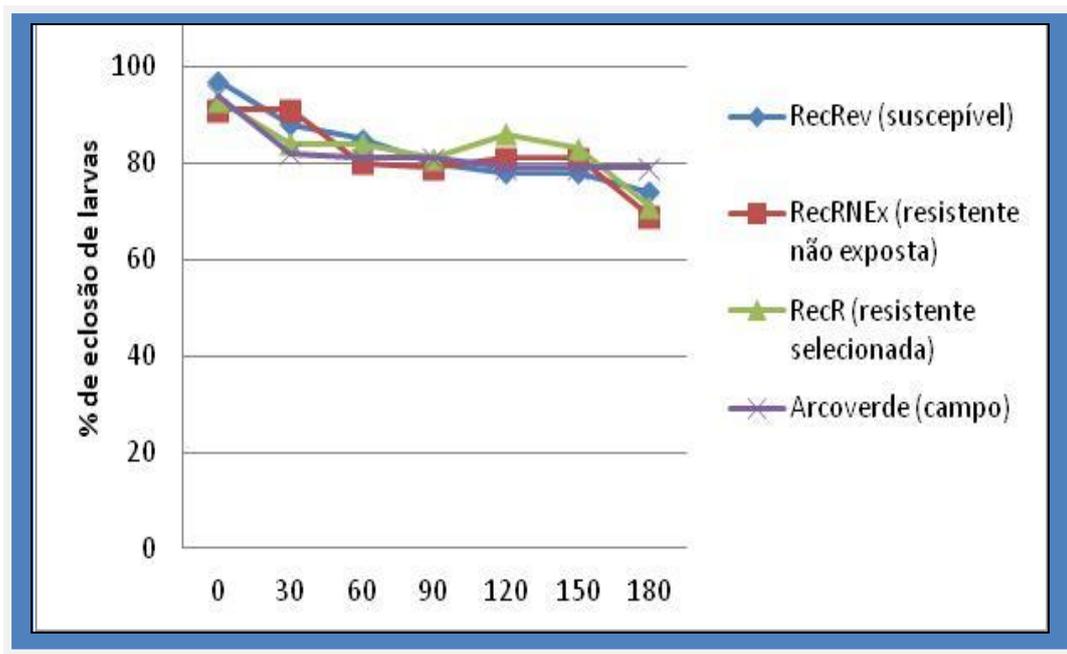
O percentual de viabilidade dos ovos embrionados no  $\Delta t = 0$  foi cerca de 90% para todas as populações estudadas. Após 150 dias, o percentual de viabilidade ainda se mostrou em torno de 80%. No ultimo momento de avaliação (180 dias) observou-se que a taxa de eclosão foi maior do que 70% (Gráfico 4), não havendo, portanto, diferenças no padrão de eclodibilidade larval entre as populações analisadas.

**Tabela 3** – Longevidade média em dias ( $\pm$  SD) observados para fêmeas das populações de *Aedes aegypti* com status diferentes de susceptibilidade ao temephos. Temperatura  $26 \pm 1$  °C; fotofase 12h.

População/status para o temephos	Longevidade (em dias) <sup>1</sup> de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>
RecReversa – Susceptível (lab.)	$38,9 \pm 18,0^A$
Arcoverde – Resistente de campo	$24,4 \pm 12,0^B$
RecRNex - Resistente sel/lab. (não exposta)	$19,4 \pm 8,0^{BC}$
RecR - Resistente Sel/lab. (exposta)	$16,5 \pm 9,6^C$
CV	60,8

Nota: 1 Médias originais. Para efeito da análise estatística os dados foram transformados em Log x. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). CV- coeficiente de variação entre as populações.

**Gráfico 4** - Perfil de eclosão de larvas em diferentes tempos de quiescência das populações estudadas



Fonte: Do autor

### 8.7 Tabela de vida de fertilidade

Quanto os dados referentes a tabela de vida de fertilidade (Tabela 5), a taxa líquida de reprodução, que corresponde ao número de fêmeas geradas a partir de cada fêmea inicial, foi mais que o dobro na população susceptível – RecRev. A duração média de uma geração (T)

foi similar entre as populações RecRev, RecRNex e Arcoverde. A capacidade inata de aumentar em número (rm), isto é, a faixa ótima de desenvolvimento do inseto mostrou que a linhagem RecRev (susceptível) apresentou um crescimento estável, enquanto que para as populações resistentes há uma taxa mais lenta de crescimento. A razão finita de aumento ( $\lambda$ ), que consiste no número de vezes que a população se multiplica por unidade de tempo, foi maior também para a população susceptível. O tempo de duplicação geracional (TD) foi maior para as populações RecR e Arcoverde.

**Tabela 4** – Tabela de vida de fertilidade de populações de *A. aegypti* com diferentes perfis de susceptibilidade ao inseticida organofosforado temephos. Temperatura ambiente  $26 \pm 2$ .

População/status para o temephos	Parâmetros de crescimento populacional					
	lx	Ro	T (semanas)	rm	TD (semanas)	$\lambda$
RecReversa - Susceptível	0,82	45,8	3,5	1,1	0,63	3,0
RecRNex - Resistente sel/lab. (não exposta)	0,54	21,9	3,1	0,99	0,69	2,7
RecR - Resistente Sel/lab. (exposta)	0,38	15,8	2,9	0,95	0,72	2,6
Arcoverde – Resistente de campo	0,65	17,4	3,2	0,89	0,77	2,4

Nota: lx = taxa de sobrevivência durante o estágio x; Ro = taxa líquida de reprodução; T= duração média de cada geração; rm= capacidade inata de aumentar em número;TD= tempo necessário para a população duplicar em número de indivíduos.;  $\lambda$ = razão finita de aumento.

### 8.8 Pesagem de pupas e adultos machos

O tamanho das pupas e dos adultos foi inferido indiretamente pelo peso corpóreo. A análise demonstrou que houve diferença significativa entre as pupas machos ( $F = 12,35$ ; Gl: 3,3;  $p = 0,0001$ ) da população susceptível (RecRev) e das populações resistentes de laboratório RecRNEx ( $p = 0,0009$ ) e RecR ( $p = 0,0002$ ), assim como entre as resistentes de laboratório (RecRNEx e RecR ) e a população resistente de Arcoverde ( $p = 0,00001 / p = 0,0001$  ). Em relação às pupas fêmeas os testes não evidenciaram diferenças estatísticas entre os grupos estudados (tabela 6).

No entanto, os adultos machos da população susceptível diferiram ( $F = 76,3$ ; Gl: 3,36;  $p = 0,0015$ ) em relação à população resistente selecionada – RecR ( $p = 0,004$ ) assim como, a população de campo diferiu das resistentes de laboratório ( $p = 0,005$ ). Quanto à pesagem das

fêmeas adultas também houve diferenças significativas ( $F = 76,30$ ;  $Gl: 3,36$ ;  $p = 0,00000$ ) entre a população susceptível RecRev as resistentes e laboratório, assim como as resistentes de laboratório e a resistente de campo ( $p = 0,00001$ ).

**Tabela 5** – Média e desvio padrão dos pesos de grupos de 50 pupas e 50 adultos (g) das diferentes populações

Populações	Pupas machos <sup>1</sup>	Pupas fêmeas <sup>1</sup>	Adultos machos <sup>1</sup>	Adultos fêmeas <sup>1</sup>
RecRev (susceptível)	0,057 ± 0,004 <sup>A</sup>	0,08 ± 0,02 <sup>A</sup>	0,023 ± 0,001 <sup>A</sup>	0,053 ± 0,004 <sup>A</sup>
RecRNEx (Resistente não exposta)	0,049 ± 0,002 <sup>B</sup>	0,068 ± 0,006 <sup>A</sup>	0,02 ± 0,004 <sup>B</sup>	0,03 ± 0,005 <sup>B</sup>
RecR (Resistente exposta)	0,048 ± 0,005 <sup>B</sup>	0,065 ± 0,006 <sup>A</sup>	0,018 ± 0,004 <sup>B</sup>	0,026 ± 0,005 <sup>B</sup>
Arcoverde (Resistente de campo)	0,056 ± 0,004 <sup>A</sup>	0,076 ± 0,03 <sup>A</sup>	0,024 ± 0,004 <sup>A</sup>	0,053 ± 0,006 <sup>A</sup>
CV	18,1	20,1	18,7	33,4

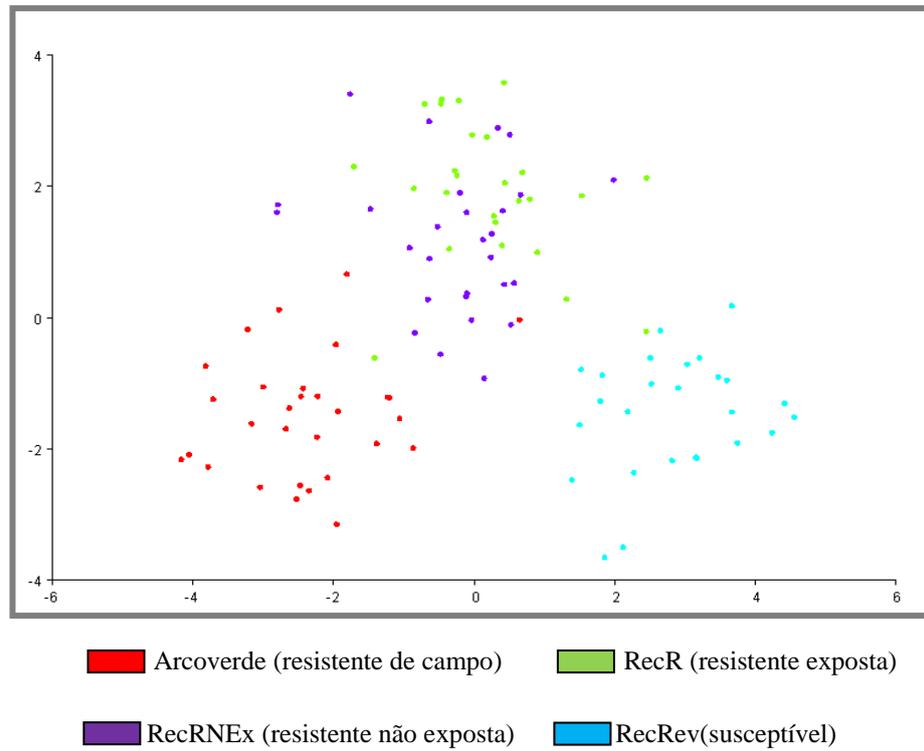
Nota: 1 Médias originais. Para efeito da análise estatística os dados foram transformados em raiz de x. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). CV- coeficiente de variação entre as populações.

### 8.9 Morfometria geométrica alar de fêmeas de *A. aegypti* de laboratório e campo

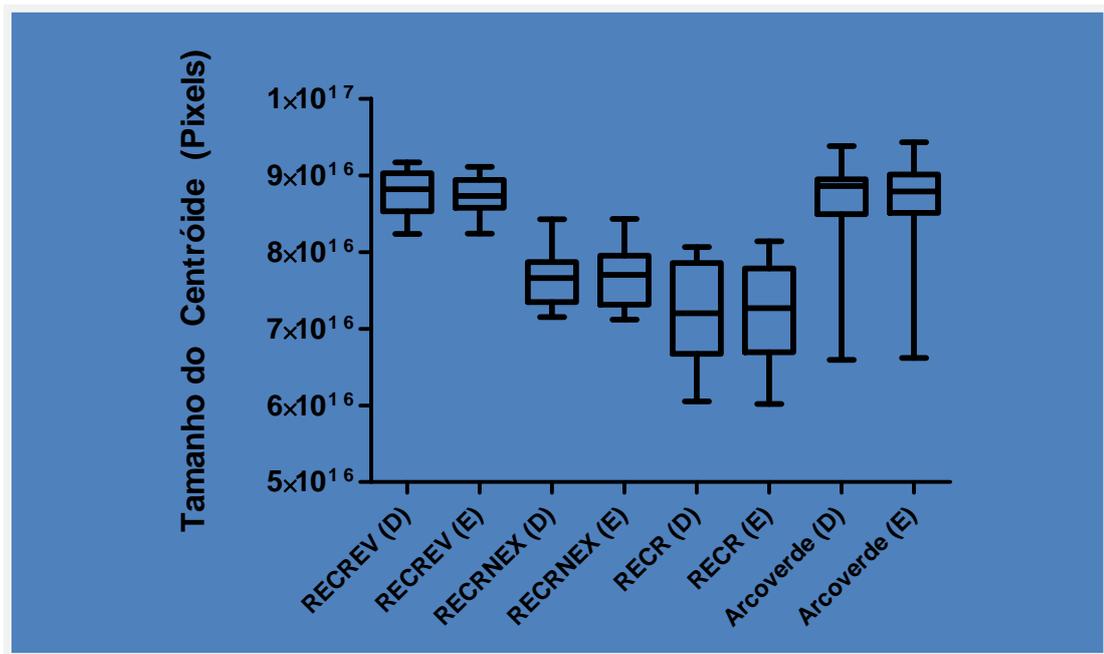
Na análise de variável canônica (VC), em que foi considerado o tamanho e a forma das asas das quatro populações, foi observado a formação de grupos distintos, apesar de RecR e RecRNEx comportaram-se como grupos próximos com tendência a dispersão (Gráfico 5).

Não houve diferença significativa para as quatro populações na análise de assimetria bilateral ( $p > 0,001$ ). Dessa forma, em todos os grupos, as asas esquerdas e direitas mostraram-se simétricas. No entanto, em relação às análises de tamanho do centróide (TC), foi observado uma diferença significativa no tamanho dos centróides (Gráfico 6) das populações RecRev e Arcoverde em relação às populações RecRNex e RecR, apresentando valor de  $p < 0,001$  em todas as análises. Não houve diferença significativa do TC entre as populações RecRNex e RecR, bem como em RecRev e Arcoverde ( $p > 0,001$ ).

**Gráfico 5** – Agrupamento populacional de *Aedes aegypti* com diferentes *status* de resistência ao temephos por morfometria alar, utilizando duas variáveis canônicas (VC), considerando a forma e tamanho.



**Gráfico 6** - Tamanhos isométricos globais (em pixels) das asas de mosquitos *Aedes aegypti* de populações com diferentes *status* de resistência ao temephos, RecRev, RecRNEx, RecR e Arcoverde.



Fonte: Do autor. Nota: D: asa direita. E: asa esquerda.

### 8.10 Tempo de repasto sanguíneo

Esse teste revelou que as fêmeas da população de campo de Arcoverde levaram significativamente mais tempo ( $F = 4,742$ ;  $GI:3,76$ ;  $p = 0,004$ ) em contato com o hospedeiro, uma média 13,35 minutos (Tabela 7), para realização do repasto sanguíneo do que as demais populações (7,1 a 7,8 min).

**Tabela 6** – tempo médio de repasto sanguíneo (min) e  $\pm$  SD

Tempo de aceitação sanguínea (min)	
<b>RecRev</b>	$7,5 \pm 5^A$
<b>RecRNEx</b>	$7,85 \pm 5^A$
<b>RecR</b>	$7,1 \pm 5^A$
<b>Arcoverde</b>	$13,35 \pm 13^B$
<b>CV</b>	71.8

Nota: 1 Médias originais. Para efeito da análise estatística os dados foram transformados em raiz de x. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). CV- coeficiente de variação entre as populações.

### 8.11 Caracterização do mecanismo de resistência ao temephos das linhagens e população de campo de *Aedes aegypti*

Após a realização dos bioensaios para verificar o perfil de susceptibilidade das diferentes populações ao temephos, testes bioquímicos foram realizados com o intuito de quantificar a cinética de enzimas associadas à detoxificação de inseticidas e caracterizar o mecanismo de resistência (Tabela 8). Os ensaios revelaram que o mecanismo de resistência das populações resistentes é do tipo metabólico (Gráfico 7) e todas as amostras apresentaram alteração na atividade de pelo menos duas das enzimas analisadas, com exceção da linhagem susceptível (RecRev), como esperado, mostrou um padrão de normalidade similar à população de referência Rockefeller. As Oxidases de Função Mista (MFO) se mostraram inalteradas para todas as populações analisadas. Para a enzima Alfa-esterase e GST, todas as populações mostraram-se alteradas, havendo elevado nível de alteração. A enzima PNPA-esterase se mostrou muito alterada e alterada para as populações de RecR e Arcoverde respectivamente. A enzima Beta-esterase se revelou alterada apenas para a população RecR.

**Tabela 7** - Perfil de enzimas ligadas a detoxificação de inseticidas químicos, em populações de *A. aegypti* em comparação ao Percentil 99º de Rockefeller, linhagem referência de susceptibilidade ao temephos.

População	$\alpha$ -Est	$\beta$ -Est	PNPA	MFO	GST
RecRev	2%	1%	0%	0%	9%
RecRNEx	49%	9%	0%	1%	85%
RecR	87%	37%	57%	5%	84%
Arcoverde	53%	4%	18%	0%	48%

Fonte: Do autor.

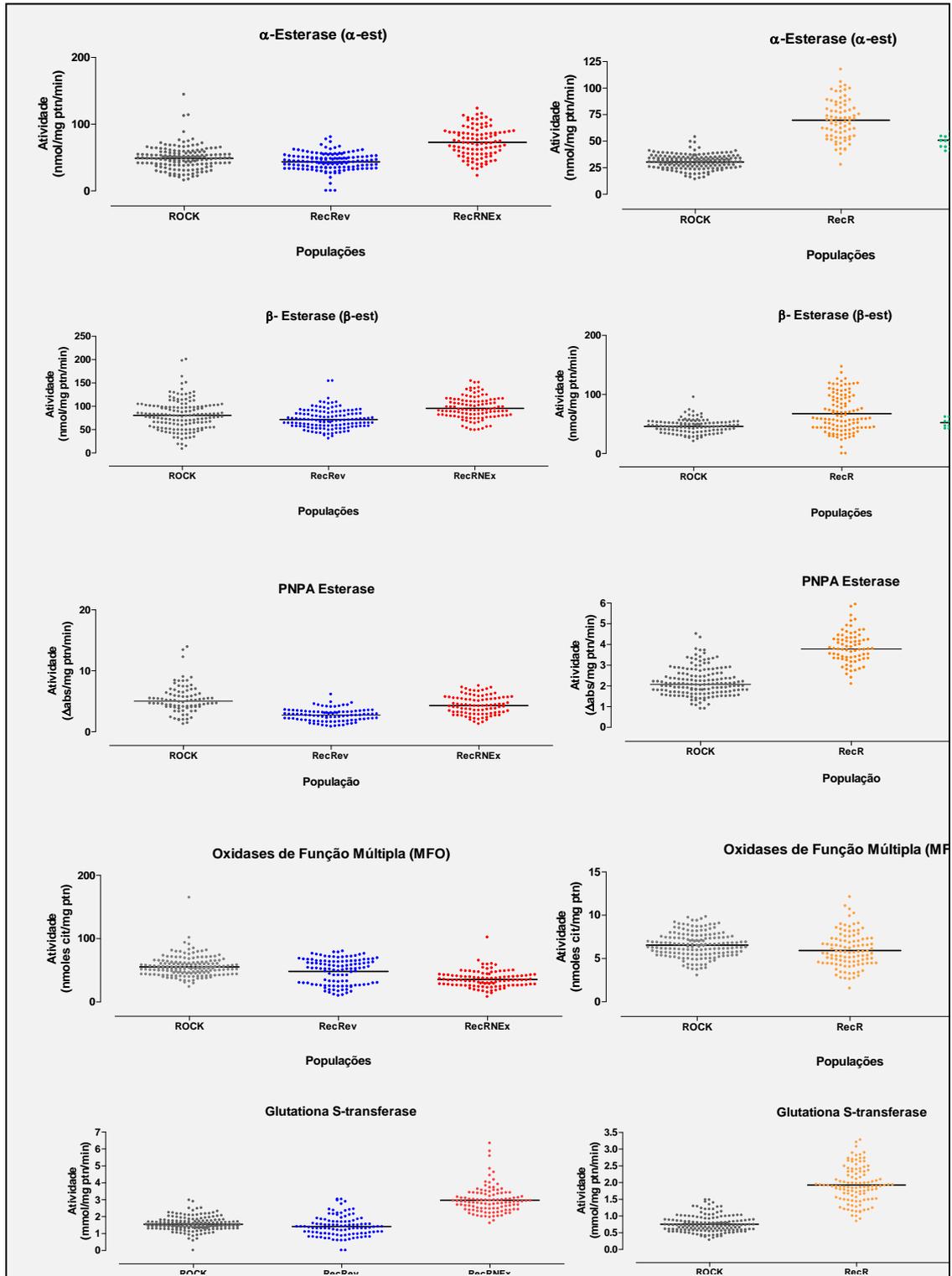
Normal (< 15%)
  Alterada (>15% e <50%)
  Muito alterada (>50%)

### 8.12 Quantificação de reservas energéticas: lipídeos, glicogênio e açúcares

A determinação bioquímica revelou maiores concentrações lipídicas para a população susceptível (RecRev) e para Arcoverde (resistente de campo) em comparação às obtidas para as linhagens resistentes RecRNEx e RecR, conforme demonstrado na tabela 9. Quanto aos valores de glicogênio foi observada uma maior concentração desta reserva energética na população susceptível (RecRev), entretanto diferenças significativas em termos reducionais só foram detectadas entre esta e a RecR. Um comportamento diferente foi observado quanto à concentração de outros açúcares que não o glicogênio. Para esta situação os maiores valores foram registrados para Arcoverde e RecR, respectivamente, cujas concentrações desses carboidratos foram similares. RecRNEx foi a população que apresentou significativamente a menor reserva de outros açúcares.

O gráfico 8 mostra o valor energético total (lipídeos + carboidratos) estimado para todas as populações analisadas, onde os valores mais elevados foram observados para a linhagem susceptível (RecRev) e a resistente de campo (Arcoverde). O cálculo da diferença entre a taxa de concentração de glicogênio e de outros açúcares para cada população foi nulo que a RecRev e a RecRNEx, entretanto para as populações de Arcoverde e RecR, a diferença foi de 7 e 8  $\mu$ g, respectivamente.

**Gráfico 7** – Padrão individual e coletivo de atividade de enzimas detoxificadoras de inseticidas químicos, observado para diferentes populações de *Aedes aegypti* resistentes ao organofosforado temephos.



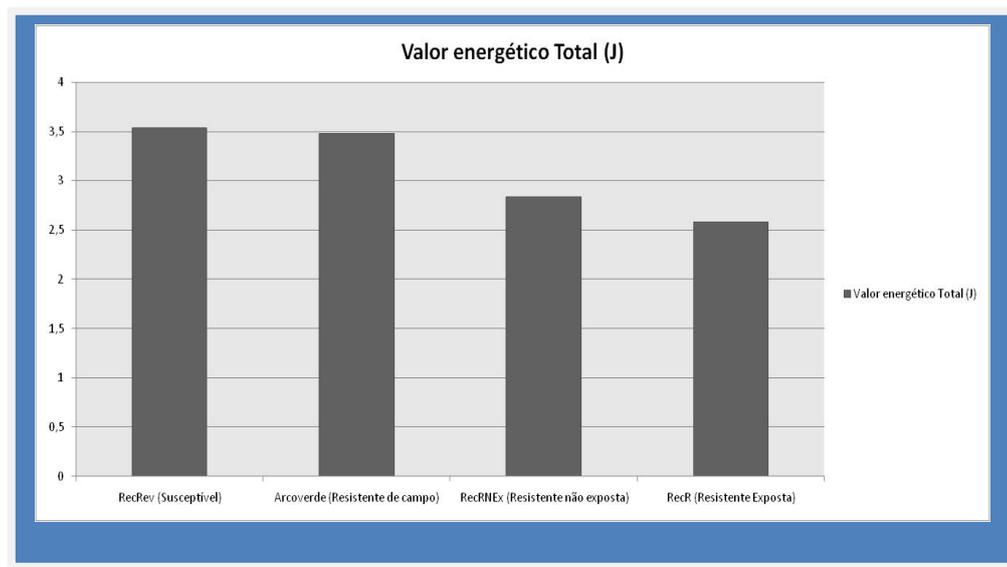
Fonte: Do autor.

**Tabela 8** – Média e Erro Padrão das reservas energéticas, lipídeos e carboidratos, quantificadas para fêmeas de *Aedes aegypti* com diferentes *status* de resistência ao organofosforado temephos.

Populações	Reservas energéticas ( $\mu\text{g}$ )		
	Lipídeos	Glicogênio	Outros açúcares
RecRev – Laboratório/susceptível	71,66 $\pm$ 4,94 <sup>A</sup>	29,53 $\pm$ 2,00 <sup>A</sup>	20,25 $\pm$ 1,03 <sup>C</sup>
Arcoverde – Campo/resistente exposta	70,27 $\pm$ 5,39 <sup>A</sup>	25,05 $\pm$ 1,88 <sup>A</sup>	24,60 $\pm$ 1,45 <sup>AB</sup>
RecRNEEx – Laboratório/resistente não exposta	56,77 $\pm$ 4,28 <sup>B</sup>	24,63 $\pm$ 2,46 <sup>A</sup>	16,99 $\pm$ 1,54 <sup>D</sup>
RecR – Laboratório/resistente Exposta	49,05 $\pm$ 3,67 <sup>B</sup>	21,88 $\pm$ 2,03 <sup>B</sup>	21,56 $\pm$ 2,42 <sup>BC</sup>

Nota: Valores na mesma coluna seguidos da mesma letra não apresentam diferenças estatísticas entre si pelo teste de Fisher ( $P < 0,05$ ). Fonte: Do autor.

**Gráfico 8** – Valor energético total (J) das fêmeas de *Aedes aegypti*



Fonte: Do autor

### 8.13 Custo adaptativo ligado a resistência ao temephos em populações de *Aedes aegypti*

Os resultados desse estudo demonstraram que dos 20 parâmetros avaliados 13 apresentaram modificações significativas nas linhagens resistentes RecR e RecRNEx e 12 na população de Arcoverde (resistente de campo), quando comparados com a linhagem susceptível (RecRev) (Tabela 10). A análise interpopulacional revelou que a maioria dos parâmetros identificados foi atingida negativamente e eram os mesmos para as duas primeiras populações e apenas nove deles coincidiam com a de Arcoverde.

**Tabela 9** - Custo adaptativo decorrente da resistência ao temephos em populações de *Aedes aegypti*.

Parâmetros analisados	Populações de <i>Aedes aegypti</i>			
	RecRev*	RecRNEX	RecR	Arcoverde
Tempo médio de desenvolvimento larvário (dias)	7,5 ± 2,4	=	=	>
Tempo médio de desenvolvimento ovo-adulto (dias)	11,2 ± 5,2	=	=	>
Tempo (min – Max) para obtenção de adultos (dias)	11 a 18	>	>	>
Mortalidade na fase jovem (larvas e pupas)	3,7%	>	>	>
Tamanho das fêmeas - morfometria alar (pixels)	9,0 x 10 <sup>16</sup>	<	<	=
Valor energético total/fêmeas (lipídeos e carboidratos) (J)	3,5	<	<	=
Reserva lipídica (µg)	71,66 ± 4,94	<	<	=
Fecundidade (ovos/fêmea)	205,4 ± 120	<	<	<
Fertilidade (L <sub>1</sub> /ovos/fêmea)	175,5 ± 120	<	<	<
Ro (Taxa líquida de reprodução)	45,8	<	<	<
T (Tempo geracional)	3,5	<	<	<
rm (Capacidade inata de aumento em número)	1,1	=	<	<
λ (Razão finita de aumento)	3,0	<	<	<
TD (tempo de duplicação de indivíduos)	0,63	>	>	>
Viabilidade de ovos (180 dias de quiescência)	>70%	=	=	=
Razão sexual (macho/fêmea)	1/1	=	=	=
Inviabilidade reprodutiva (grupo de 50 fêmeas)	12,0%	>	>	>
Longevidade de fêmeas (dias)	39 ± 18,0	<	<	=
Tempo de repasto sanguíneo (min)	7,5 ± 3,0	=	=	>
Atividade das enzimas metabólicas	Normal	Alterada	Alterada	Alterada
<b>Número de parâmetros ≠ da RecRev</b>	NA	14	15	14

Valores médios foram representados para cada variável estudada; NA – não se aplica. Fonte: Do autor.

## 9 DISCUSSÃO

O presente estudo traz como particularidade a avaliação de 20 parâmetros biológicos em populações com razões de resistência extremamente elevadas ( $RR > 250$ ) ao temephos, fenômeno verificado nos últimos anos em populações naturais de *A. aegypti* de Pernambuco, e outros estados do Nordeste brasileiro, mas raramente referido na literatura (ARAÚJO, 2013; LIMA et al., 2011; MELO-SANTOS et al., 2010). Sabe-se que os genes que conferem resistência aos inseticidas químicos trazem normalmente, uma série de custos biológicos associados, como por exemplo, vulnerabilidade à predação (BERTICAT et al., 2004), diminuição do potencial na competição entre machos (BERTICAT et al., 2002), ampliação do tempo de desenvolvimento, diminuição do tamanho do indivíduo (BOURGUET et al., 2004) e redução das taxas de sobrevivência (CHEVILLON et al., 1997), entre outros.

No presente trabalho, descreve-se o efeito da resistência ao temephos sobre diferentes parâmetros biológicos de populações de *Aedes aegypti* coletadas em campo e em linhagens selecionadas em laboratório. Os resultados revelaram que há um comprometimento significativo do potencial reprodutivo e da sobrevivência dos indivíduos resistentes. Os parâmetros que sofreram maior influência foram: tempo de desenvolvimento larval, fecundidade, taxa líquida de reprodução e o tempo necessário à duplicação do tamanho populacional.

Outros estudos com populações de campo de *A. aegypti* dotadas de razões de resistência menores também evidenciam custos associados à resistência ao temephos (LEAL, 2008; BELINATO, et al., 2012). Leal (2008) observou que o tempo de desenvolvimento larval variou de 7 a 9 dias e a viabilidade dos indivíduos nesta fase variou de 36% a 86%. A extensão no tempo de desenvolvimento para as populações analisadas em nosso estudo foi ainda maior, 9 a 11 dias, do que a referida por Leal (2008), sobretudo para a população de campo (Arcoverde). Entretanto, não foi observada uma redução importante sobre a viabilidade dos indivíduos resistente, cujos percentuais de sobrevivência variaram de 88% a 91%. Beserra et al. (2006; 2008) estudando populações de *A. aegypti*, não caracterizadas quanto ao *status* de susceptibilidade aos inseticidas, provenientes de diferentes regiões bioclimáticas do estado da Paraíba, observaram variações naturais para os mesmos parâmetros, com duração média de 6,3 a 8,3 dias e uma viabilidade de 92% a 100%. De acordo com tais autores, as diferenças encontradas estão associadas às características inatas de cada população analisada e sua história de vida.

Quanto à dinâmica de desenvolvimento populacional, é consenso na maioria dos estudos que o prolongamento da fase larvária nas populações resistentes representa sempre uma desvantagem adaptativa, uma vez que, essas populações ficam expostas a fatores de riscos extrínsecos e isso implica, sobretudo na redução do número de gerações em campo. Estudos com *Culex quinquefasciatus* resistentes ao *Bacillus sphaericus* (AMORIM, 2009) e *Cx. pipens* portadoras de mutações nos genes *Ester* e *ace* ligadas à resistência aos organofosforados (BOURGUET et al., 2004), destacam não apenas este aspecto, mas também, as possíveis perdas associadas à vulnerabilidade à predação e a competição interespecífica, características dos criadouros como rios, riachos, córregos, áreas de inundação e outros.

Para outras espécies de mosquitos como *A. aegypti*, cujos criadouros mais frequentes em campo são reservatórios de água potável (tonéis, tanques e caixas d'água) (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994), não são registradas densidades elevadas de larvas/pupas, logo, as perdas associadas à predação e a competição são menores. Assim, a extensão no tempo de desenvolvimento larvário de *A. aegypti* resistentes apesar de ser uma desvantagem adaptativa, poderi contribuir para que os indivíduos aproveitem melhor os nutrientes disponíveis nestes tipos de criadouros, compensando parte das perdas energéticas associadas à resistência, minimizando as perdas sobre outros parâmetros biológicos. Esta suposição foi comprovada em nosso estudo, visto que parâmetros como tamanho, quantificação de reservas energéticas de (lipídeo e glicogênio), bem como a longevidade, foram similares entre as fêmeas susceptíveis (RecRev) e a população resistente de campo (Arcoverde) que apresentou uma extensão média no tempo de desenvolvimento larvário de 6,4 dias. O mesmo comportamento relacionado à longevidade foi observado para outras populações brasileiras de *Ae. aegypti* por Leal (2008), para populações resistentes oriundas de Campina Grande/Paraíba e por Belinato et al. (2012), para populações de Boa vista/Roraima e Aparecida de Goiânia/Goiás.

Belinato et al. (2012) referem diferenças em outros parâmetros como a fecundidade das fêmeas resistentes, que em média produziram menos ovos, cerca de 20% menos, comparado às susceptíveis (Rockefeller). Resultados similares foram encontrados em nosso estudo para as fêmeas da RecR, RecRNEx e Arcoverde, cuja redução foi ainda maior (48% a 55%). Este grande déficit sobre a fecundidade e a extensão no tempo de desenvolvimento desencadeou eventos que atingiram de forma relevante o potencial reprodutivo das populações resistentes, especialmente a taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ), duas vezes menor do que a observada para a susceptível, seguida da menor capacidade inata de aumentar em

número em função do tempo. Leal (2008) também relatou as perdas na taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ) e outras variáveis da tabela de vida de fertilidade, como o tempo geracional ( $T$ ) para algumas populações de *A. aegypti*. Mesmo assim, os valores de  $R_0$ , por exemplo, variaram de 35,5 a 130,7, foram maiores do que os encontrados em nosso estudo, sugerindo que o potencial reprodutivo das fêmeas resistentes de Campina Grande seja superior ao observado para as resistentes do nosso estudo. Essas perdas maiores no potencial reprodutivo podem ser justificadas pelos níveis muito elevados de resistência ( $RR > 200$ ) e a presença do mecanismo metabólico mediando este processo. Essas variáveis também se mostraram superiores no estudo de Campos e Omoto (2007) para populações resistentes e suscetíveis de *Brevipalpus phoenicis* (ácaro) ao praguicida hexythiazox. Paris et al. (2011) avaliando uma linhagem de *A. aegypti* resistente as toxinas isoladas do *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), demonstraram que houve custo biológico em todas as fases de vida do mosquito, inclusive na viabilidade de ovos.

Outros estudos avaliando linhagens de *A. aegypti* dotadas de dois diferentes mecanismos de resistência ligados a mutação *kdr* e alteração nas enzimas de detoxificação de inseticida,  $\alpha$ -EST, PNPA-EST e GST (BRITO et al., 2013), e *Anopheles stephensi* resistente ao temephos e ao propoxur (SANIL et al., 2012), revelaram comprometimentos similares no potencial reprodutivo das espécies aos descritos em nosso estudo.

Efeitos pleiotrópicos negativos da resistência ao temephos foram mais evidentes em nosso estudo para as linhagens isogenéticas, RecR e RecRNex, do que para a população de campo de Arcoverde, embora esta última tenha a mesma origem biogeográfica das demais linhagens, o Sertão do estado de Pernambuco, e um nível similar e também muito elevado de resistência ao temephos ( $RR > 200$ ) (ARAÚJO et al., 2013; MELO-SANTOS et al., 2010). Este comportamento confirma a importância do contexto ambiental, sobretudo da exposição das populações a condições adversas que tendem a influenciar as respostas de sobrevivência. Martins et al. (2012) discutem a existência da acumulação de efeitos negativos em diversos parâmetros da história de vida dos indivíduos resistentes, devido aos efeitos pleiotrópicos dos genes de resistência e ressaltam ainda o possível envolvimento de efeitos associados a genes deletérios.

Um dos aspectos importantes do nosso estudo foi verificar a repercussão da retirada da pressão de seleção/exposição ao temephos, sobre o nível de resistência, na atividade das enzimas de detoxificação e o *fitness* das populações. Dessa forma, foi observado uma redução de 300 para 250 vezes na razão de resistência da linhagem RecRNex, isso ocorreu como resposta à ausência da exposição ao organofosforado por cinco gerações consecutivas. Além

disso, ocorreu a recuperação do padrão de normalidade da  $\beta$ -esterase e esterases-PNPA, duas das quatro enzimas cuja atividade se mostrava alterada na RecR, linhagem precursora da RecRNex. Este resultado também pode reforçar a ideia de que as GSTs e  $\alpha$ -esterases sejam as enzimas mais importantes e responsáveis pelo fenótipo de resistência e que sua manutenção implica em perdas biológicas associadas a diversos parâmetros, uma vez que situações intermediárias entre a RecRNex e as linhagens RecRev (susceptível) e RecR (resistente) foram observadas.

Os experimentos de quantificação de reservas energéticas revelaram que as fêmeas de *A. aegypti* das linhagens resistentes (RecR e RecRNEx) apresentaram menor concentração lipídica em comparação com a susceptível e a resistente de campo. De certa forma, este comportamento pode estar relacionado à produção de quantidades maiores de algumas enzimas metabolizadoras de xenobióticos, especialmente a alfa-esterase e as GSTs, mediada pelo aumento na frequência de indivíduos que apresentam alteração nesta última classe de enzimas, cujos percentuais foram superiores a 85% nas linhagens referidas, comparada a cerca de 50% na população de campo.

Estudos realizados por Rivero et al. (2011) com *Cx. pipiens*, também resistente a organofosforados, demonstraram uma redução de reservas lipídicas ligada à resistência metabólica quando esta foi mediada pela superexpressão das esterases A4 e B4 ou pelo mecanismo sítio-alvo de insensibilidade da acetilcolinesterase. Estes mesmos autores também verificaram que fêmeas susceptíveis e resistentes apresentaram níveis similares de glicogênio e diferentes de outros carboidratos. Este comportamento também foi observado em nosso estudo, embora uma situação de desequilíbrio entre a taxa de glicogênio e outros açúcares tenha sido caracterizada apenas para a RecR e Arcoverde. Tal resposta pode estar relacionada ao stress de contato contínuo de exposição ao inseticida comparado às outras populações. Segundo Sharma et al. (2011), este stress funciona como um estímulo para a via de catabolismo do glicogênio e a liberação de outros açúcares utilizados como fonte energética do processo de degradação de xenobiótico.

A população de Arcoverde apesar de não apresentar perdas significativas na concentração de lipídeos e carboidratos, possivelmente devido à compensação nutricional pelo prolongamento da fase larvária, não acumulou muitos ganhos ao seu potencial biológico, exceto um aumento na longevidade comparada às demais linhagens resistentes. Custos foram detectados em diversos parâmetros reprodutivos comparados com a susceptível (RecRev), entre eles, um maior percentual de fêmeas que se alimentaram de sangue e não produziram

ovos ou os produziram em baixa quantidade, ou seja, aquelas que utilizaram os nutrientes da alimentação sanguínea para a manutenção de outros processos ligados a sua sobrevivência. Esse comprometimento foi confirmado quando às variáveis da tabela de vida de fertilidade ( $R_0$ ,  $r_m$  e  $\lambda$ ) revelaram perdas no potencial reprodutivo desta população, bem como da  $RecR$ .

Por outro lado, parâmetros como a razão sexual e a viabilidade embrionária não sofreram modificações reducionistas nas populações avaliadas em nosso estudo, independente do seu *status* de susceptibilidade ou resistência ao temephos. Este aspecto se reveste de grande relevância, uma vez que, os ovos das fêmeas resistentes, quiescentes até 180 dias, estavam tão viáveis quanto os das susceptíveis. Isso sem dúvida contribui para a manutenção de frequências elevadas dos genótipos de resistência em campo e de certa forma nos ajuda a entender porque o nível de resistência ao temephos em localidades onde seu uso foi suspenso a mais de cinco anos persiste alterado (ARAÚJO, 2013). De acordo com Paris et al. (2011), a dinâmica da resistência no campo é altamente dependente da pressão de exposição ao inseticida e do custo biológico associado à manutenção do mecanismo que a confere.

As informações geradas em nosso estudo revelam a existência de custos adaptativos para as populações resistentes, mas demonstram ao mesmo tempo a plasticidade de sobrevivência de *A. aegypti*, aspectos que devem ser considerados na construção de modelos preditivos da dinâmica populacional desta espécie de mosquito e na elaboração das estratégias dirigidas ao seu controle.

## 10 CONCLUSÕES

- a) Ocorrem custos biológicos associados à resistência de *Aedes aegypti* ao inseticida químico temephos;
- b) As desvantagens adaptativas nas populações resistentes ao temephos, causadas pelo acúmulo de efeitos pleiotrópicos negativos, foram especialmente refletidas nos parâmetros reprodutivos, sobretudo, quando os indivíduos foram selecionados em laboratório;
- c) A resistência ao temephos pode promover perdas elementares de reservas energéticas, sobretudo de lipídeos;
- d) O prolongamento do tempo de desenvolvimento larvário nas populações resistentes ao temephos pode ter funcionado como uma estratégia, para acumular reservas energéticas e minimizar os déficits relacionados à sobrevivência e a reprodução das fêmeas;
- e) A resistência ao temephos em populações de *A. aegypti* pode ser reduzida ou mesmo revertida, na ausência de exposição ao inseticida por 20 ou mais gerações consecutivas;
- f) A recuperação do *status* de susceptibilidade das populações de *A. aegypti* estudadas ao temephos também promoveu a normalidade no padrão de atividade das enzimas detoxificadoras de xenobióticos, confirmando o envolvimento do mecanismo metabólico na resistência a este composto;
- g) Parâmetros como razão sexual e viabilidade embrionária parecem não ser comprometidos em função da resistência ao temephos nas populações estudadas.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, L. B. **Análise da recuperação da susceptibilidade de uma colônia de *Culex quinquefasciatus* resistente ao *Bacillus sphaericus*.** 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.
- ANDERSON, D. I.; LEVIN, B. R. The biological cost of antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, Londres, v. 2, p. 489–493, 1999.
- ANDRADE, V. C. F. S. Dengue: a batalha contra os pernilongos. **Ciência hoje das crianças**. Campinas, 15 maio 2001. Disponível em <<http://chc.cienciahoje.uol.com.br/noticias/corpo-humano-e-saude/dengue-a-batalha-contra-os-pernilongos>>. Acesso em: 15 jan. 2013.
- ARAÚJO, A. P. **Análise da resistência a inseticidas químicos em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), de Municípios do Estado de Pernambuco.** 2013. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.
- ARAÚJO, R. A. **Enzimas de metabolismo energético e digestivo em populações de caruncho-do-milho resistentes e susceptível a piretróides.** 2006. Tese (Doutorado em Entomologia) Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2006.
- ARRESE, E. L. et al. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 31, p. 7-17, 2001.
- ASSOCIAÇÃO DE PAIS DA ESCOLA EB1 DA GLÓRIA. **Obras na EB1 da Glória.** Aveiro, 2010. Disponível: <<http://assocpais-eb1-gloria.blogspot.com/>>. Acesso em: 9 fev. 2011.
- ATELLA, G. A. et al. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular.** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012, v. 1.
- BELINATO, T. A.; MARTINS, A. J.; VALLE, D., Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 7, p. 916-22, 2012.
- BERTICAT, C. et al. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. **Genetical Research**, Londres, v.79, n.1, p. 41 – 47, 2002.
- \_\_\_\_\_. Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*. **Genetical Research**, Londres, v.8, p. 189-196, 2004.

BESERRA, E. B. et al. Biologia e exigências térmicas de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, Londrina v. 35, n. 6, p. 853-860, 2006.

\_\_\_\_\_. Efeitos da temperatura no ciclo de vida, exigências térmicas e estimativas do número de gerações anuais de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Iheringia Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 99, n. 2, p. 142-148, 2009.

BESERRA, E. B.; CASTRO Jr., F. P. Biologia Comparada de Populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) da Paraíba. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 81-85, 2008.

BISSET, J. A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Habana, v. 54, n. 3, p. 202-219, 2002.

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

BRAGA I. A. et al. **Controle seletivo de vetores da Malária**: Guia para o nível municipal. Brasília: Ministério da Saúde, 1999.

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

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

\_\_\_\_\_. *Aedes aegypti*: histórico de controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, p. 113-118, 2007b.

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

\_\_\_\_\_. **Dengue**: Instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. Brasília, 2001.

\_\_\_\_\_. **Programa Nacional de Controle da Dengue**. Brasília, 2002.

\_\_\_\_\_. **Dados e indicadores selecionados**. Brasília, 2003.

\_\_\_\_\_. **Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti***. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2006.

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

BRITO, L. P. et al. Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. **PlosOne**, São Francisco, v. 8 n. 4 p. 1-10, 2013.

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

CABRAL, A. M. **Resistência a Inseticidas Químicos Em Populações de *Aedes aegypti* do estado de Pernambuco**: diagnósticos, distribuição e caracterização de mecanismos. 2012. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Faculdade Frassinetti do Recife, Recife, 2012.

CAMPOS, F. J.; OMOTO, C. Estabilidade da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) a hexythiazox em pomares de citros. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 6, p. 840-848, 2006.

CANAVOSO, L. E. et al. Fat metabolism in insects. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 21, p. 23-46, 2001.

CASTAÑEDA, L. E. et al. Evaluating reproductive fitness and metabolic costs for insecticide resistance in *Myzus persicae* from Chile. **Physiological Entomology**, Londres, v. 36, n. 3, p. 253-260, 2011.

CENTERS FOR DISEASE AND PREVENTION. (Estados Unidos). **DengueMap**. Disponível em: <<http://www.healthmap.org/dengue/pt/>>. Acesso em: 20 mar. 2012.

\_\_\_\_\_. **Dengue**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dengue/>>. Acesso: 2 jan. 2014.

CHEVILLON, C. et al. Pleiotropy of adaptive changes in populations: comparisons among insecticide resistance genes in *Culex pipiens*. **Genetical Research**, Londres, v. 70, n. 3, p. 195-203, 1997.

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

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

DAVIES, A.G. et. al. Scalloped wings is the *Lucilia cuprina* Notch homologue and a candidate for the modifier of fitness and asymmetry of diazinon resistance. **Genetics**, Austin, v. 143, p. 1321-1337, 1996.

AMAPÁ. DEFESA. **Defesa Civil divulga informações sobre a Dengue**. Disponível em: <<http://www.defesacivil-ap.com.br/portal/noticias/16-defesadivulgainformacaodengue.html>>. Acesso em: 2 Jan. 2014.

DINIZ, D. F. A. **Perfil de susceptibilidade de populações de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762, do estado de Pernambuco ao inseticida químico temephos**. 2011. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

DJOGBÉNOU, L.; NOEL, V.; AGNEW, P. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. **Malaria Journal**, Londres, v. 9, n.12, p. 1-9, 2010.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores da Dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 259-272, 2002.

FERREIRA, L. **Operação de Combate à Dengue encerra, apontando redução de 88,8% nos casos da doença, em Manaus**. Manaus, 16 abr. 2010. Disponível em: <<http://semsa.manaus.am.gov.br/category/noticias/page/12/>>. Acesso em: 18 fev. 2012.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3rd ed. London: Cambridge University Press, 1971.

FISHER, R. A. **The Genetical Theory of Natural Selection**. New York: Dover Publications, 1958, 291 p.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1962, v. 1, 662 p.

FOSTER, S. P. et al. Temporal and spatial dynamics of insecticide resistance in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **Pest Management Science**, West Sussex, v. 58, p. 895-907, 2002.

FRANCO, O. **História da Febre Amarela no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, DNERU, 1969.

GARCIA, M.; AGUIAR, R. **Saiba como eliminar focos e evitar a picada do *Aedes aegypti***. **Agência Fiocruz de notícias**. Rio de Janeiro, 30 abr. 2008. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1751&sid=9&tpl=printerview>>. Acesso em: 3 abr. 2012.

GEORGHIOU, G. P. The evolution of resistance to pesticide. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 3, p. 133-168, 1972.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, College Park MD, v. 70, p. 319-323, 1977.

GOMES, T. C. S. **Reavaliação do status de susceptibilidade ao temephos em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) do município de Recife – PE**. 2006. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

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

HANDEL, V. E. Rapid determination of glycogen and sugar in mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v.1, p. 299-304, 1985a.

HANDEL, V. E. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 1, 302-304, 1985b

HANDEL, V. E.; DAY, J. F. Assay of lipids, glycogen and sugars in individual mosquitoes: correlations with wing length in field-collected *Aedes vexans*. **Jornal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 4, p. 549-550, 1988.

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

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

INSTITUTE OF CLINICAL PATHOLOGY AND MEDICAL RESEARCH.  
Departamento de Entomologia Médica. **Mosquito Photos**. 2002. Disponível em: <[http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/mosquit/photos/aedeomyia\\_venustipes\\_pupa.jpg](http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/mosquit/photos/aedeomyia_venustipes_pupa.jpg)>. Acesso em: 20 abr. 2011.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*: uma ameaça aos trópicos. Produção áudio visual e tratamento de imagem do IOC / FIOCRUZ. Produzido por Genilton José Vieira e Autoração de Leonardo Perím. 2009. 1 DVD (21 min.).

JUPP, P. G; MCINTOSH, B. M. Chikungunya disease. In: MONATH, T. P. (Ed.). The arboviruses: epidemiology and ecology. **Chemical Rubber Company Press**, Florida, p. 137–157, 1988.

KONNO, R. H.; OMOTO, C. Custo adaptativo associado à resistência de *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) ao inseticida carbosulfam. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 246 – 250, 2006.

KUNO, G. Review of the factors modulating dengue transmission. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v. 17, p.321-335, 1995.

LEAL, M. M. C. S. **Custo adaptativo associado à resistência de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós**. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba.

LEANDRO, D. C. **Análise da imunidade do *Aedes aegypti* ao vírus dengue em populações de campo com competência vetorial diferenciada**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

LIMA, J. B. P. et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 68, n. 3, p. 329-333, 2003.

LIMA, E. P. et al. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 259-263, 2006.

\_\_\_\_\_. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara, Brazil. **Parasites e Vectors**, Londres, v. 4, n. 5, 2011. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/>>. Acesso em: 5 abr. 2011.

MARTINS, A. J. et al., 2012. Effect of Insecticide Resistance on Development, Longevity and Reproduction of Field or Laboratory Selected *Aedes aegypti* Populations. **Plos one**, São Francisco, v. 7, n. 3, p. 1-9, 2012.

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

MOEHLECKE, R. Novo método de detecção e vigilância de vetores do vírus da dengue é testado. **Agência Fiocruz de notícias**, Rio de Janeiro, 19 mar. 2008. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1654&sid=9&tpl=printerview>>. Acesso em: 5 mar. 2012.

MONTELLA, I. R. et al. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Population from 2001 to 2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Brasília, v. 77, p. 467-477, 2007.

MORAIS, S. A. et al. Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 5, p. 672-676, 2010.

MUNSTERMANN, L. E. **The yellow fever mosquito**. 1995. 1 Fotografia. Disponível em: <<http://www.novomilenio.inf.br/ano97/9704ccha.jpg>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

NAYAR, J. K; SAUERMAN, D. M. Flight performance and fuel utilization as a function of age in female *Aedes taeniorhynchus*. **Entomological Research Center**, Florida, v. 7, p. 27-35, 1972.

OLIVEIRA, E. E. et al. Resistência vs Susceptibilidade a Piretróides em *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): Há Vencedor? **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 981-990, 2005.

OPPENORTH, F. J. Biochemical and genetic in insecticide resistance. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. Editors. **Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology**, Oxford, p. 731-773, 1985.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Vector resistance to insecticides. In: WHO EXPERT COMMITTEE ON VECTOR BIOLOGY AND CONTROL, 15., 1992, Geneve. **Report...** Geneve, 1992. p. 1-62. (World Health Organization technical report series, n. 818).

\_\_\_\_\_. **Implementação do controle seletivo de vetores da malária na Região Amazônica.** Brasília: OPAS; 1997.

ORR, H. A. Fitness and its role in evolutionary genetics. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 10, n.8, p. 531-539, 2009.

PARIS, M.; DAVID, J. P.; DESPRES, L. Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology**, Londres, v. 20, n. 6, p. 1184-1194, 2011.

PINHEIRO, F. P.; CORBER, S. J. Global Situation of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever, and its Emergence in the Americas. **World Health Statistics Quarterly Rapport Trimestriel de statistique sanitaires Mondiales**, Geneva, v. 50, n. 3/4, p. 161-169, 1997.

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

REITER, P.; GUBLER, D. J. Surveillance and control of urban dengue vectors. In: GUBLER D.J.; KUNO, G., editors. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Nova York: **CAB International**, Oxford, p. 425-462, 1997.

RIVERO, A.; FERGUSON, H. M. The energetic budget of *Anopheles stephensi* infected with *Plasmodium chabaudi*: is energy depletion a mechanism for virulence? **Proceedings the Royal Society**, Londres, v. 270, n. 1365-1371, 2003.

RIVERO, A. et al. Resource depletion in *Aedes aegypti* mosquitoes infected by the microsporidia *Vavraia culicis*. **Parasitology**, Londres, v. 134, p. 1355-1362, 2007.

\_\_\_\_\_. Insecticide control of vector borne diseases: when is insecticide resistance a problem? **Plos pathogens**, São Francisco, v. 5, p. 6-8, 2010.

RIVERO, A. et al. Energetic cost of insecticide resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 3, p. 694-700, 2011.

ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 32, p. 361-380, 1987.

SHARMA, P. et al. Status of carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Dayalbagh, v. 11, p. 301-304, 2011.

SITE DA DENGUE. **Mapas da Dengue**. Disponível em: <[http://www.dengue.org.br/dengue\\_mapas.html](http://www.dengue.org.br/dengue_mapas.html)>. Acesso em Mar. 2012.

SANIL, D.; SHETTY, N. J. The effect of sublethal exposure to temephos and propoxur on reproductive fitness and its influence on circadian rhythms of pupation and adult emergence in *Anopheles stephensi* Liston-a malaria vector. **Parasitol research**, Berlin, v. 111, n. 1, p. 423-432, 2012.

SOPER, F. L. The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Baltimore, v. 14, n. 6, p. 887-891, 1965.

SUL DO PIAUÍ – Portal de notícias. **Floriano ganha mais um aliado no combate a dengue**. Disponível: <<http://www.suldopiaui.com.br/noticias/floriano/8,5279,floriano-ganha-mais-um-aliado-no-combate-a-dengue.html>>. Acesso em: 19 mar. 2013.

WIKIPEDIA. **Estrutura do Temefos**. Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Temefos\\_3D.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Temefos_3D.png)>. Acesso em: 19 fev. 2012.

WOOD, O. R. et al. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. **Parasites e Vectors**, Londres, v. 3, n. 67, 2010.

VASILAKIS, N. The Daemon in the Forest: The Emergence of a New Dengue Serotype in Southeast Asia. **Third International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic (Dengue 2013)**, The University of Texas Medical Branch, Galveston, 2013.