

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Samira Ana Guina Salomão Sibindy

Avaliação da resistência do *Anopheles gambiae* s.l aos insecticidas usados na Saúde Pública, na cidade de Maputo, Moçambique

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador (es): Prof. Dr. Nelson Cuamba
Prof. Dr. Reginaldo Brazil

MAPUTO

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S563 Sibindy, Samira Ana Guina Salomão

Avaliação da resistência do *Anopheles gambiae* s.l. aos inseticidas usados na Saúde Pública, na cidade de Maputo, Moçambique / Samira Ana Guina Salomão Sibindy. – Maputo, 2015.

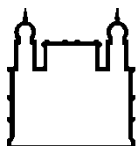
xi, 62 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.

Bibliografia: f. 51-60

1. *Anopheles arabiensis*. 2. Resistência a insecticidas. 3. Piretróides. I. Título.

CDD 614.532



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Samira Ana Guina Salomão Sibindy

Avaliação da resistência do *Anopheles gambiae* s.l aos insecticidas usados na saúde pública, na cidade de Maputo, Moçambique

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Nelson Cuamba
Prof. Dr. Reginaldo Brazil

Aprovada em: 09/03/2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Nélia Manaca - **Presidente**

Prof. Dr. Abuchama Saifodine

Prof. Dr. Wilson Savino

Maputo, Março de 2015

Dedicatória

A minha amada mãe **Ana Maria Sibindy**, essa mulher guerreira, que sempre esteve comigo em todos os pequenos e grandes passos da minha vida. Os meus sonhos se tornaram concretos graças a sua força e coragem. Te amo muito!

A **Deus** por estar sempre comigo em todos os momentos de dificuldades, minha rocha e fortaleza. Muito obrigado por não me deixar desistir e estar sempre comigo, estendendo-me a mão para que eu possa levantar.

Ao meu marido e aos meus filhos, obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz pela oportunidade de obtenção deste título.

A CDC, especialmente aos Professores Adeline Chan e William Brogdom pela formação e reagentes.

Aos meus amados pais Ana Maria Sibindy e Jacob Sibindy pelo esforço contínuo em sempre me oferecer o melhor e pelos seus maravilhosos ensinamentos.

Ao Ibrahim Issufo Ibrahim, meu amado esposo. Sou imensamente grata, privilegiada e feliz pelo seu apoio, carinho, compreensão e amor.

Ao Doutor Nelson Cuamba, meu orientador, pela grande ajuda, pelo muito que me ensinou, pelo rigor do seu trabalho e grande disponibilidade.

Ao Professor Reginaldo Brazil, pela ajuda, interesse e disponibilidade

Aos amigos do laboratório pelos momentos de descontração. Em especial a Jacinta, Ana Paula, Dário, Gastão, Elias, Júlio e Gulamo. Sou eternamente Grata.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o sucesso deste trabalho.

A Deus por renovar as minhas forças a cada manhã.

.

ÍNDICE

ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
RESUMO/ABSTRACT.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.2. A Malária.....	12
1.1. A Biologia da Malária.....	14
1.1.1. O parasita.....	14
1.1.2. O Vector.....	16
1.1.3. Ciclo de vida do mosquito do género <i>Anopheles</i>	16
1.2. O Complexo <i>Anopheles gambiae</i> s.l.....	17
1.3. O Controlo da Malária.....	19
1.3.1. Controlo Vectorial.....	19
1.3.2. Controlo vectorial químico.....	20
1.4. Resistência aos insecticidas.....	21
1.4.1. Resistência Metabólica.....	22
1.5. A Malária em Moçambique.....	25
1.5.1. Espécies edistribuição de Vectores da Malária em Moçambique.....	25
1.5.2. A Epidemiologia da Malária em Moçambique.....	26
1.5.3. História do uso de insecticidas no controlo da Malária em Moçambique.....	26
2. OBJECTIVOS.....	29
2.1. Geral.....	29
2.2. Específicos.....	29
3. METODOLOGIA.....	30
3.1. Área de estudo.....	30
3.2. Colheita das Amostras.....	31
3.3. Identificação Morfológica do Mosquitos.....	31
3.4. Ensaio de susceptibilidade aos insecticidas.....	31
3.4.1. Procedimento dos Testes de Susceptibilidade.....	31
3.4.2. Interpretação dos testes de susceptibilidade.....	32

3.5.	Identificação específica das espécies do complexo <i>An. gambiae</i> s.l.....	33
3.6.	Análises Bioquímicas.....	34
3.6.1	Preparação das soluções tampão	35
3.6.2.	Análise de Elevada Esterase não Específica	35
3.6.3.	Reacção de Oxidase	36
3.6.4.	Análise de Acetilcolinesterase (AChE).....	36
3.6.5.	Análise de Acetilcolinesterase Insensitivo (IAChE).....	36
4.	RESULTADOS.....	38
4.1.	Colheita de mosquitos	38
4.2.	Testes de susceptibilidade.....	38
4.3.	Identificação específica por PCR.....	39
4.4.	Análises bioquímicas	39
4.4.1.	Análise de elevada Esterase não específica	39
4.4.2.	Análise de oxidase	41
4.4.3.	Análise de Acetilcolinesterase	43
5.	DISCUSSÃO	44
6.	CONCLUSÃO	48
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
	ANEXOS	61

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACHE- Acetil Colinesterase

ATCh- Acetylthiocloline iodide

BHC- Hexaclaro Benzeno

CYPs- Citocromo

P450 monoxigenase

CMCM- Conselho Municipal da cidade de Maputo

DTNB- Dithio-bis-2-nitrobenzoico

DDT Dicloro-difenil-tricloroetano

DNA Ácido desoxirribonucleico

ESTs- Esterases

GSTs- Glutation S-transferase

IGS- Espaçador intergénico

IACHE- Acetil colinesterase Insensitivo

INE- Instituto Nacional de Estatística

ITN- Redes mosquiteiras impregnadas

kdr- Resistência Knockdown

KPO₄- Fosfato de Potássio

NaOAc- Acetato de Potássio

OMS- Organização Mundial da Saúde

PCR- Reacção em cadeia de Polimerase

PNCM- Programa Nacional de Controlo da Malária

PIDOM- Pulverização intradomiciliar

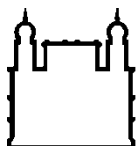
POPs- Poluentes Orgânicos Poluentes

REMILDS- redes mosquiteiras impregnadas com insecticidas de longa duração

s.s.- sensu scrito

s.l.- sensu latius

TMBZ- Tetramethyl-benzidine



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Avaliação da resistência do *Anopheles gambiae* s.l aos insecticidas usados na saúde pública, na cidade de Maputo, Moçambique.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RESUMO/ABSTRACT

Samira Ana Guina Salomão Sibindy

RESUMO

Em Moçambique a malária é considerada como sendo um dos mais importantes problemas de saúde pública, e uma das principais causas de morbidade e mortalidade, especialmente em áreas remotas com pouco ou nenhum acesso a serviços públicos de saúde. O controlo vectorial da malária é feito através da pulverização intradomiciliar com insecticidas residuais e distribuição de redes mosquiteiras impregnadas com piretróides. A susceptibilidade do *Anopheles arabiensis* aos insecticidas piretróides, carbamato e organoclorato, foi determinada através dos testes de susceptibilidade da OMS, no bairro da polana caniço, cidade de Maputo. Análises bioquímicas foram feitas com as mesmas amostras para detectar a actividade da enzima envolvida na detoxificação do insecticida. No total foram colhidos no bairro da polana caniço 1870 larvas nos seus quatro estágios de desenvolvimento. Após os mosquitos atingirem a fase adulta, 675 fêmeas F1 de 2-4 dias foram usadas para os ensaios de susceptibilidade aos insecticidas, identificação específica da espécie por PCR e análise dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência. Os insecticidas testados foram os piretróides Lambdacialotrina, Permetrina e Deltametrina, o carbamato Bendiocarbo e o organoclorato DDT. 100% das amostras analisadas por PCR, pertenciam a espécie *Anopheles arabiensis*. Os ensaios de susceptibilidade mostraram que o *Anopheles arabiensis* foi 100% susceptível ao insecticida DDT, mais apresentou uma mortalidade de 61% ao Lambdacialotrina, e uma mortalidade de 87% e 88% ao deltametrina e permetrina respectivamente. Uma mortalidade de 80.8% foi observada para carbamato bendiocarbo. 120 amostras foram seleccionadas para os ensaios bioquímicos de elevada Esterase não específica, Oxidase e análise da acetilcolinesterase. Nas amostras testadas para o insecticida Lambdacialotrina, Permetrina e Deltametrina, 13.3%, 20% e 13.3% respectivamente, apresentaram uma alteração na actividade da esterase. Nas amostras testadas para o carbamato bendiocarbo, a taxa de inibição de acetilcolinesterase variou de 0 a 84%, sendo que 93% das amostras apresentaram uma alteração na actividade da acetilcolinesterase. Nenhuma alteração nos níveis de oxidase foi observado nas amostras analisadas. As alterações nos níveis das enzimas, sugerem que a esterase e a Acetilcolinesterase estão envolvidas na resistência dos piretróides e carbamatos no bairro da Polana Caniço. Estes dados, devem ser levados em consideração pelo Programa nacional de controlo da malária, nos seus planos de gestão de resistência aos insecticidas.

ABSTRACT

In Mozambique malaria is considered one of the most important public health problems, and is a major cause of morbidity and mortality, especially in remote areas with little or no access to public health services. The control of malaria is currently by indoor residual spray with insecticides and pyrethroid-treated bed nets. The susceptibility of *Anopheles arabiensis* to pyrethroid, carbamate and organochlorine was determined by World Health Organization adult mosquito susceptibility tests in Polana Caniço location, Maputo city. Biochemical analyzes were carried out in same mosquitoes to detect shifts in activity of enzyme involved in insecticide detoxification. In total were collected in Polana caniço 1870 larvae in their four stages of development. After that, 675 F1 females 2-4 days were used for susceptibility testing of insecticides, specific species identification by PCR and analysis of the biochemical mechanisms involved in resistance. The insecticides tested were Lambda cyhalothrin, Deltamethrin and Permethrin pyrethroids; the carbamate bendiocarb and DDT organochlorine. 100% of the samples analyzed by PCR, belong to *Anopheles arabiensis* species. Susceptibility tests showed that 100% *Anopheles arabiensis* was susceptible to insecticide DDT, but presented susceptibility of 61% for Lambda cyhalothrin, and a mortality of 87% and 88% to Deltamethrin and Permethrin respectively. A mortality rate of 80.8% was observed for carbamate Bendiocarb. 120 samples were selected for high biochemical assays nonspecific Esterase, Oxidase and Acetylcholine esterase analysis. All samples tested for insecticidal Lambda cyhalothrin, Permethrin and Deltamethrin, 13.3%, 20% and 13.3%, respectively, of mosquitoes showed a change in esterase activity. All samples tested for carbamate Bendiocarb, the rate Acetylcholinesterase inhibition ranged from 0 to 84%, and 93% of the samples showed a change in the activity of acetylcholinesterase. No change in oxidase levels was observed in the samples. Changes in enzyme levels, suggest that the Esterase and Acetylcholine esterase are involved in the resistance of the pyrethroids and carbamates in Polana Caniço. These data should be considered for the National Malaria Control Program in their resistance management plans to insecticides.

1. INTRODUÇÃO

1.2. A Malária

A malária continua a ser uma das principais causas de doenças em todo o mundo, com mais de 207 milhões de casos e 627 000 mortes estimadas em 2012, principalmente em crianças menores de 5 anos de idade e, predominantemente, na África (WHO, 2013). Os últimos anos têm mostrado um declínio na prevalência da malária, atribuído a eficientes estratégias de controlo de vectores implementadas em áreas endêmicas (WHO, 2011).

Em Moçambique, a malária é ainda um problema de saúde pública, causando uma alta mortalidade e morbidade e reivindicando cerca de 46% de todas as consultas externas, 33 % de todos os internamentos e 11% de óbitos nas enfermarias de pediatria (INE, 2013). Dados do Inquérito Demográfico e de Saúde de 2011 mostram que a prevalência da malária em crianças menores de 5 anos diminuiu de 38,5% em 2007 para 35,1% em 2011 diagnosticado por microscopia óptica, e de 51.5% para 38,3% diagnosticado por testes de diagnóstico rápido (PNM, 2014).

Em África, as espécies de mosquitos dominantes responsáveis pela transmissão dos parasitas da malária pertencem ao complexo *Anopheles gambiae* e ao grupo *Anopheles. funestus* (Coetze *et al.*, 2013). Em Moçambique, os principais vectores da malária são *An. gambiae* s.s., *An. arabiensis* e *An. funestus* s.s.. Entre as principais subespécies do complexo *An. gambiae*, o *An. arabiensis* é a mais frequente nas regiões sul e centro, e o *An. gambiae* s.s é a mais frequente nas regiões centro e norte (Cuamba, 2003). O *An. merus*, embora não seja comum, desempenha um papel importante em algumas localidades (Cuamba & Mendis, 2009). O *An. funestus* s.s, está amplamente distribuído ao longo do país, e é o membro quase exclusivo do grupo *An. funestus* encontrado dentro das habitações (Cuamba, 2003).

Assim como em outros países Africanos, para o controlo do vector e prevenção da malária, o Programa Nacional de Controlo da Malária de Moçambique (PNM) tem priorizado medidas baseadas no uso de insecticidas químicos, nomeadamente a pulverização intra-domiciliária com insecticidas de efeito residual (PIDOM) e o uso de redes mosquiteiras tratadas com insecticidas de longa duração (REMILDs) (PNM, 2014). Estes programas de controlo do vector da malária, são em grande parte dependentes de piretróides sintéticos, que são a única classe de insecticidas recomendados pela OMS para as REMILDs (Nkya *et al.*, 2013). O DDT e o bendiocarbo, tem sido

usado para a PIDOM em muitos países Africanos, incluindo Moçambique (PNM, 2014). Ambos o DDT e piretróides interferem nos canais de sódio regulado por voltagem, alterando o equilíbrio do sódio, impedindo a transmissão nervosa normal, provocando paralisia no mosquito seguida de morte, fenómeno conhecido por “knockdown” (*kdr*) (Coats, 1990), enquanto que os carbamatos bloqueiam a degradação do neuromediador acetilcolina por inibição da acetilcolinesterase (Fukuto, 1990).

Após anos de uso intensivo, a eficácia dos insecticidas está agora ameaçada pelo aumento da resistência em populações de *Anopheles*. Tal fenómeno está ocorrendo em todo continente Africano e se espalha em uma taxa rápida (Hargreaves *et al.*, 2000; Casimiro *et al.*, 2006). Em Moçambique, relatos de resistência a insecticidas usados na PIDOM e REMILDs em vectores da malária eram raros, mais a situação agora esta mudando com a ascensão de resistência a piretróides e carbamatos em várias regiões (PNM, 2014). De facto, inquéritos a nível nacional indicaram que as espécies do complexo *An.gambiae* ainda estavam susceptíveis a carbamatos, enquanto a resistência a piretróides e DDT estava aumentando em algumas áreas (PNM, 2014).

Em vectores de malária, a resistência pode ser consequência de mutações em proteínas-alvo (local alvo insensitivo), uma baixa penetração ou sequestro do insecticida, ou um aumento de biodegradação do insecticida devido às actividades de detoxificação (resistência metabólica). A resistência aos piretróides basea-se principalmente na mutação *kdr* e resistência metabólica, apesar de outros mecanismos, tais como a alteração da cutícula também estarem envolvidos (Chengyuan *et al.*, 2009; Wood *et al.*, 2010; Nkya *et al.*, 2013). Mutações *kdr* e elevado nível de enzimas de detoxificação também conferem resistência ao DDT, enquanto que resistência a carbamatos pode ser conferida por mutação *ace1* e detoxificação (Martinez-Torres *et al.*, 1999; Ranson *et al.*, 2000; Brooke *et al.*, 2001).

O uso recorrente de insecticidas no controlo do vector é acreditado como sendo a principal causa da resistência em *Anopheles* (Protopopoff *et al.*, 2008). Concomitantemente, o uso de insecticidas para o controlo de pragas na agricultura e a presença de poluentes em áreas urbanas e industriais tem jogado um papel significativo na selecção da resistência aos insecticidas nos *Anopheles* (Nkya *et al.*, 2013). De facto, muitos pesticidas usados na agricultura tem o mesmo alvo com aqueles usados no controlo do vector, e desta maneira pode, portanto, seleccionar para mecanismos de resistência em mosquitos procriados em áreas de actividades agrícolas intensas (Antonio-Nkondjio

et al, 2011). Tais selecções cruzadas também podem ocorrer em ambiente urbanos, onde a rápida urbanização promove o cultivo de vegetais em pequena escala como fonte de subsistência e renda e tem levado a um uso descontrolado de agrotóxicos (Dinham, 2003).

1.1. A Biologia da Malária

1.1.1. O parasita

A malária é causada pelos parasitas do género *Plasmodium*. Estegénero inclui cerca de 120 espécies que infectam hospedeiros vertebrados mamíferos, aves e répteis. Contudo, as espécies *P. vivax*, *P. malariae*, *P. falciparum*, *P. ovale* e *P. knowlegi* são os únicos agentes etiológicos da malária humana (INS, 1990).

O género *Plasmodium* obedece a seguinte classificação sistemática: Reino Protista, Filo Apicomplexa, classe Hematozoa, ordem Haemosporidae, família Plasmodiidae, género *Plasmodium* (Ayala *et al.*, 1998)

Durante o seu ciclo de vida, o *Plasmodium* alterna entre dois hospedeiros: um vertebrado (por exemplo. o Homem) e um invertebrado (o mosquito) (figura 1.1). O ciclo de vida pode ser dividido em 4 fases:

1. Fertilização: fase sexuada que ocorre no estômago do mosquito vector após uma refeição com sangue infectado.
2. Esporogonia, primeira fase assexuada que ocorre na parede do estômago do mosquito.
3. Esquizogonia hepática, segunda fase assexuada que tem lugar no fígado do hospedeiro vertebrado após inoculação do parasita pela refeição sanguínea do mosquito. A duração desta fase depende da espécie de *Plasmodium*, mas dura de 5 a 7 dias para o *P. falciparum*
4. Esquizogonia eritrocitária, terceira fase assexuada que ocorre nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, responsável pelos sintomas de malária.

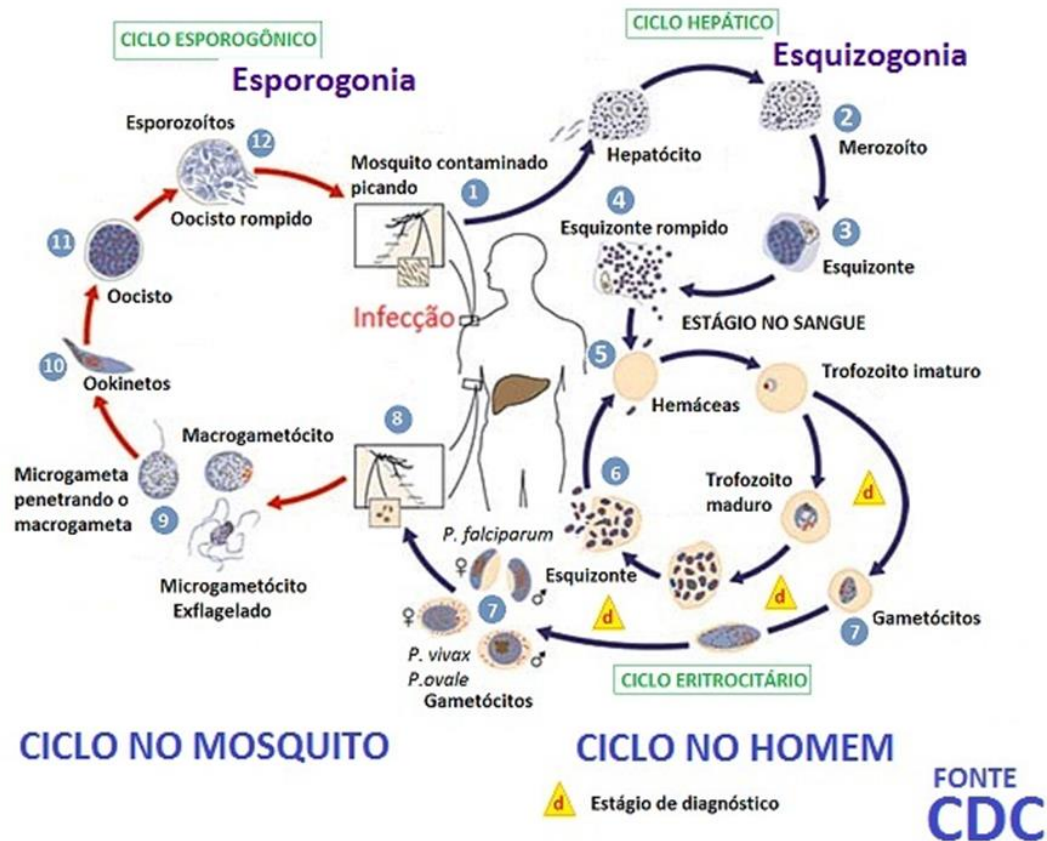


Figura 1.1: O ciclo de vida do parasita da malária (www.medicinageriatrica.com.br).

Durante uma refeição sanguínea, um mosquito fêmea infectado inocula esporozoítos no hospedeiro humano. Os esporozoítos infectam os hepatócitos e sofrem maturação que envolve multiplicação por mitoses sucessivas, passando a esquizontes, os quais se rompem libertando merozoítos. Após esta multiplicação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica) o parasita sofre reprodução assexuada nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica). Os merozoítos infectam os glóbulos vermelhos que se desenvolvem em esquizontes, os quais se rompem libertando merozoítos. Alguns merozoítos diferenciam-se em gametócitos. Os gametócitos macho (microgametócitos) e fêmea (macrogametócitos), são ingeridos por um mosquito fêmea durante a refeição sanguínea.

O ciclo esporogônico compreende a multiplicação dos parasitas no mosquito. Ainda no estômago do mosquito, as microgâmetas fertilizam as macrogâmetas originando zigotos. Os zigotos sofrem meiose e tornam-se móveis e alongados (oocinets) os quais invadem as paredes do estômago do mosquito onde se desenvolvem formando oocistos. Ocorre então uma fase de multiplicação por mitoses sucessivas e os oocistos rompem-se libertando esporozoítos. Estes deslocam-se para as

glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos num novo hospedeiro humano reinicia o ciclo de vida.

1.1.2. O Vector

Os mosquitos pertencem à Família Culicidae, uma das mais importantes da Ordem Diptera, e caracterizam-se por ter um aparelho bucal do tipo picador- sugador alongado, constituído por vários estiletos protegidos por uma bainha comum. Esta morfologia permitiu a aquisição de hábitos hematófagos podendo alimentar-se de sangue de vários vertebrados entre os quais o Homem, conferindo-lhes uma grande importância médica (Richards & Davies, 1977). A subfamília Anophelinae inclui três géneros (*Anopheles*, *Bironella* e *Chagasia*) sendo o género *Anopheles* o de maior importância médica, uma vez que são os únicos mosquitos que transmitem as espécies de *Plasmodium* que infectam humanos, além de serem vectores de filarioses e várias arboviroses (Service, 1980).

O género *Anopheles* conta com cerca de 430 espécies conhecidas das quais 70 são vectores da malária e destes apenas 40 possuem relevância médica (Service & Townson, 2002).

O género *Anopheles* obedece a seguinte classificação sistemática: Reino Animalia, Filo Arthropoda, Classe Insecta, Subclasse Pterigota, Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Culicidae, Subfamília Anophelinae, Género *Anopheles*(Richards & Davies, 1977).

1.1.3. Ciclo de vida do mosquito do género *Anopheles*

O ciclo de vida de um mosquito compreende uma fase aquática e uma fase terrestre (figura 1.2). Os ovos demoram cerca de 1 a 2 dias a eclodir, originando larvas que irão passar por quatro estágios sucessivos. Após o quarto estágio, a larva sofre uma metamorfose para a pupa. Apesar da pupa não se alimentar, ela mantém-se activa durante 1 a 2 dias após os quais o adulto emerge apresentando uma cabeça, tórax e abdómen distintos. Normalmente, o mosquito macho emergem cerca de 24 horas antes do mosquito fêmea. A maturação dos ovos leva geralmente 2 a 4 dias.

A duração do ciclo de vida do mosquito depende da espécie e das condições ambientais, em particular da temperatura.

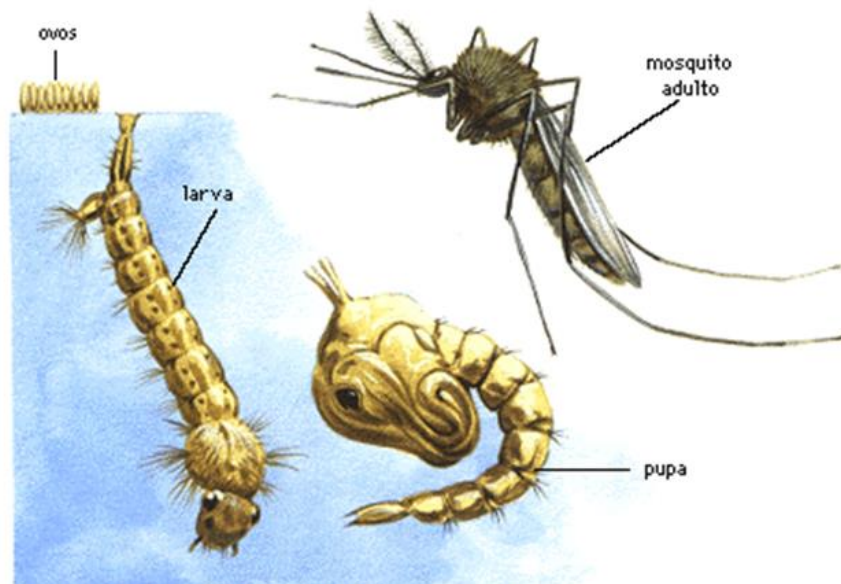


Figura 1.2: Ciclo de vida do mosquito do género *Anopheles* (www.biomedicosdaunibh.com)

1.2. O Complexo *Anopheles gambiae* s.l

Frequentemente, critérios morfológicos permitiram o agrupamento de populações de mosquitos numa determinada espécie. Contudo, subsequentes análises genéticas, moleculares e de cruzamentos em laboratório, revelaram que estas populações pertencem a entidades reprodutivamente isoladas, constituindo espécies biológicas diferentes. Estas espécies, crípticas ou gémeas, apesar de morfológicamente indistintas, podem apresentar grandes diferenças bioecológicas e comportamentais, que influenciam o modo como transmitem a malária (Coluzzi, 1984). Um grupo constituído por várias espécies, com ascendência evolutiva comum, tem a designação de complexo específico (White, 1974).

O Complexo *An. gambiae* s.l. é composto por 7 espécies gémeas: *An. gambiae sensu stricto* (s.s.) Giles, 1902; *An. arabiensis* Patton, 1905; *An. quadriannulatus* Theobald, 1911; *An. melas* Theobald, 1903; *An. merus* Dönitz, 1902; *An. bwambae* White, 1985; e *An. quadriannulatus* espécie

B (Hunt *et al.* , 1998). Este Complexo inclui os mais eficientes vectores Afrotropicais de malária, nomeadamente *An. gambiae s.s.* e *An. arabiensis* (White 1974; Coetzee *et al.*, 2000). Estas são igualmente as espécies do complexo com maior distribuição geográfica no continente Africano. *An. gambiae s.s.* predomina em regiões húmidas, é antropofílico e repousa no interior das habitações (endofilia). *An. arabiensis*, apesar de ser também encontrado em regiões húmidas, é mais tolerante a regiões de savana, mais áridas e é relativamente menos antropofílico que *An. gambiae s.s.* , alimentando-se também em animais domésticos. Estas duas espécies ocorrem em simpatria em extensas áreas da sua distribuição e as abundâncias relativas variam sazonalmente (White & Rosen 1973, Charlwood *et al.*, 1995). *An. quadriannulatus* encontra-se restrito a zonas do Nordeste e Sul de África, sendo exofílico e zoofílico, bem como o único membro do complexo que não é considerado vector da malária. As espécies *An. merus* e *An. melas*, ocorrem nas regiões litorais do Este e Oeste africanos, respectivamente. Ambas estão adaptadas a ambientes de água salobra e apresentam também alguma tendência zoofílica e exofílica, sendo considerados vectores de menor importância (Lindsay *et al.* , 1998; Coetzee *et al.* , 2000).

Dadas as diferenças bio-ecológicas existentes entre as espécies do Complexo Gambiae, a identificação específica é claramente uma fase crítica para qualquer programa de controlo vectorial que se queira efectivo (Collins *et al.*, 2000). Uma vez que as espécies crípticas que compõem os complexos geralmente diferem na sua capacidade vectorial, uma identificação correcta das espécies é essencial para a investigação das patologias transmitidas. No caso do complexo Gambiae , é possível discriminar inequivocamente todas as espécies, essencialmente com recurso a duas técnicas. A análise citogenética permite a identificação das espécies com base em inversões cromossómicas paracêntricas fixas, específicas de espécie, em regra localizadas no cromossoma X (Coluzzi, 1968; Hunt, 1973). Mais recentemente, foram desenvolvidos métodos moleculares para identificação das espécies deste Complexo. Estes métodos baseiam-se essencialmente em técnicas de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR), que amplificam sequências da região intergenica (IGS) do DNA ribossomal os quais apresentam polimorfismos de tamanho específicos para cada espécie (Scott *et al.*, 1993).

1.3. O Controlo da Malária

Em 1955, a Organização Mundial da Saúde (OMS) iniciou uma grande campanha de erradicação da malária obtendo um grande sucesso, essencialmente em países de regiões temperadas (Beales & Gilles, 2002). No início de 1962, a malária foi erradicada nestes locais salvando cerca de 317 milhões de pessoas. No entanto, as condições para a erradicação não foram encontradas em todas as áreas afectadas, especialmente em África, onde nunca se desenvolveram verdadeiros esforços continuados. Os recursos logísticos, humanos e financeiros necessários apenas foram reunidos num reduzido número de países, o que terá levado ao abandono do conceito de erradicação (WHO, 2006).

Actualmente o controlo da malária tem-se baseado em medidas direccionadas para o vector e no recurso a medicamentos anti-maláricos tanto para a cura como para a profilaxia (Cravo & Rosário, 2002). No caso do vector, pulverizações domiciliárias com insecticidas residuais e redes mosquiteiras impregnadas com insecticidas constituem os dois métodos principais de intervenção da O.M.S. para o controlo da malária (WHO, 2006).

1.3.1. Controlo Vectorial

O principal objectivo do controlo vectorial é a redução dos níveis de mortalidade e morbidade através de uma diminuição gradual da transmissão da doença (Collins *et al.* , 2000). Este controlo pode ser biológico ou químico. O primeiro envolve a redução do vector por introdução de um predador, competidor ou patogénio. Estas metodologias têm a grande vantagem da especificidade, minimizando assim o desequilíbrio ambiental (e.g. *Bacillus thuringiensis*) (Hemingway, 2005). O controlo químico envolve o uso de insecticidas de síntese química. O sucesso de ambos os tipos de controlo requer um bom conhecimento da biologia do vector bem como das condições locais e ecológicas.

1.3.2. Controlo vectorial químico

Todos os insecticidas foram inicialmente desenvolvidos com fins agrícolas, tendo sido, mais tarde, adaptados ao uso em saúde pública (Hemingway & Ranson, 2005). Os programas de controlo vectorial químico baseiam-se principalmente em quatro classes de insecticidas: organoclorados, organofosfatos, carbamatos e piretróides sendo preferencialmente utilizados os primeiros e os últimos.

Os organoclorados são compostos que possuem em sua molécula um ou mais átomos de cloro, causam efeitos patológicos ao longo prazo interferindo nas transmissões dos impulsos nervosos. Esta classe de insecticidas foram desenvolvidos principalmente na segunda guerra mundial para proteção contra a malária, tifo e outras doenças provocadas por insectos e para o controle de pragas na agricultura. Incluem insecticidas como o dicloro difeniltricloroetano (DDT), aldrin, endrin, hexacloro benzeno (BHC), ensossulfan, heptacloro, lindane, toxafeno. Estes compostos e seus análogos, pelo seu alto carácter lipofílico penetram a estrutura cuticular do insecto tendo como alvo os canais de sódio das membranas axonais do sistema nervoso periférico, provocando a morte por hiper-excitação nervosa (Narashi, 1976).

Neste grupo alguns são considerados como poluentes orgânicos persistentes (POPs). Os POPs são compostos altamente estáveis e persistentes no ambiente por longo tempo, podem migrar por grandes distâncias causando sérios efeitos na saúde humana e animal. Podem ser gerados acidentalmente como produtos secundários em processos industriais e de combustão e representam uma classe especial de problema para a saúde e para o meio ambiente. Em humanos os POPs estão relacionados com mal formações congênicas, cânceres, problemas de fertilidade, psicomotores, diminuição da inteligência e mais suscetibilidade para doenças em geral (ANVISA, 2010).

Os insecticidas piretróides são os únicos compostos licenciados pela OMS para a impregnação de redes mosquiteiras (ITNs) uma vez que são de acção rápida, efectiva e com uma forte acção excito-repelente (Chandre *et al.*, 2000). São compostos químicos análogos estruturais das piretrinas, compostos activos naturais extraídos das flores de algumas espécies de crisântemo (Macan, 2006).

A lambdacialotrina e a deltametrina são dois dos piretróides mais conhecidos. Este tipo de insecticida não apresenta risco significativo para os mamíferos uma vez que o rápido metabolismo evita a sua acumulação (Macan *et al.* , 2006). Tal como o DDT, estes insecticidas actuam no sistema nervoso, modificando a cinética dos canais de sódio, o que leva à inibição tanto da activação como da inactivação destes canais, despolarizando a membrana neuronal e provocando a morte do mosquito por paralisia (Hemingway *et al.*, 2004).

1.4. Resistência aos insecticidas

A resistência aos insecticidas é uma característica hereditária envolvendo mudanças num ou mais genes de um insecto (Hemingway *et al.*, 2004). O uso extensivo de pesticidas e insecticidas na agricultura, em programas de controlo de vectores e a nível doméstico são considerados as principais causas do aparecimento de resistência em diversas espécies. De acordo com a WHO (1968), a resistência é definida como a “aptidão de uma população de insectos tolerar doses de um determinado insecticida, as quais exerceriam uma acção letal sobre a maioria dos indivíduos de uma população normal da mesma espécie.

Os vectores de malária na região Africana têm vindo a apresentar estas mudanças relativamente aos insecticidas mais usados em programas de saúde pública. Testes de susceptibilidade ao DDT foram feitos em *An. gambiae* em 21 países sendo que em 10 destes foi observada resistência, a qual é acentuada nas regiões do Oeste, Centro e Sul do continente. Para a permetrina (insecticida piretróide) os níveis de resistência foram testados em 17 países, sendo observada em 8, sobretudo nas regiões a Oeste e Centro (Bagayoko *et al.* , 2005). Devido ao uso em larga escala na agricultura e também a nível doméstico, as pressões selectivas dos insecticidas contra populações anofelineas são quase impossíveis de controlar.

Os mecanismos de resistência a insecticidas podem ser divididos em dois grupos principais: (1) a resistência metabólica que envolve alterações dos níveis ou da actividade das proteínas enzimáticas de destoxificação e (2) mecanismos “target site ” que impedem a ligação do insecticida ao seu alvo. Estes mecanismos podem actuar separadamente ou em conjunto, conferindo resistência a todas as classes de insecticidas.

Adicionalmente, muitos insecticidas, como o DDT e a permetrina, influenciam também o comportamento do insecto, por exemplo reduzindo as taxas de entrada dos insectos nas habitações e alterando o número de picadas (Mathenge *et al.* , 2001). Outras alterações consistem no desenvolvimento de cutículas mais espessas ou de estrutura alterada de modo a dificultar a penetração do insecticida (Apperson & Georghiou, 1975).

A resistência aos organoclorados, organofosforados e carbamatos é conferida por um número limitado de mecanismos em todos os insectos analisados até o momento. Estes mecanismos envolvem predominantemente a desintoxicação metabólica do insecticida, antes de chegar ao seu local alvo, ou alterações na sensibilidade do local alvo, de modo que já não é susceptível à inibição do insecticida (Hemingway, 2000).

Os mecanismos de resistência metabólicos mais comuns envolvem: esterases, glutathione S-transferase ou mono-oxigenases. Na maioria dos casos de resistência metabólica, resistências individuais em insectos podem ser detectadas através de um aumento nas quantidades de enzimas em comparação com os seus homólogos susceptíveis. Ao longo da última década, a base molecular destes mecanismos de resistência tem sido gradualmente elucidados, abrindo a possibilidade excitante de manipulação destes sistemas enzimáticos ao longo prazo para restaurar a susceptibilidade aos insecticidas por manipulação dos seus padrões de expressão (Hemingway, 2000).

1.4.1. Resistência Metabólica.

A resistência metabólica a organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides tem sido associada principalmente ao aumento da detoxificação desses insecticidas promovida por três principais enzimas: glutathione-S-transferases (GSTs), esterases (ESTs) e citocromo P450 (CYPs) (Hemingway, 2000; Perry *et al.*, 2011).

As GSTs são enzimas diméricas e multifuncionais que possuem função de detoxificação de vários xenobióticos (Prapanthadara *et al.*, 1996). Elas promovem resistência a organofosforados, organoclorados e piretróides por conjugação da glutathione reduzida a estes compostos ou a produtos tóxicos primários do metabolismo destes insecticidas. Duas famílias de GST,

classificadas como I e II, são conhecidas em insectos e ambas parecem ter associação com resistência a insecticidas (Hemingway, 2000).

A alta actividade de enzimas de detoxificação pode estar associada à elevação dos níveis de expressão dos genes que codificam estas enzimas, como por exemplo, foi descrito para linhagens de *An. gambiae* resistentes a DDT, que apresentam os genes de GSTs super expressos (Ortelli *et al.*, 2003). Outro processo que pode levar ao aumento de actividade de detoxificação de insecticidas é o *splicing* alternativo, como observado para um dos genes de GST do mosquito *An. gambiae*, o gene *aggst1a*, que produz quatro transcritos de RNAm distintos, que geram enzimas GSTs que diferem em sua capacidade de metabolizar insecticidas (Ranson *et al.*, 1997; Ranson *et al.*, 1998). O aumento da actividade de enzimas de detoxificação pode ainda ser resultante de substituições de aminoácidos, que modificam sua afinidade pelo composto tóxico, aumentando o nível de resistência (Hemingway, 2000).

As ESTs compreendem seis famílias de proteínas pertencentes à superfamília de α/β hidrolases que destroem um amplo espectro de insecticidas, por hidrolisarem as ligações ésteres destes compostos (Oakshott *et al.*, 1993). As ESTs também agem sequestrando os insecticidas mais rapidamente do que os metabolizam, impedindo, desse modo, que cheguem ao local de acção (Kadous *et al.*, 1983). Essas enzimas são importantes na resistência a insecticidas organofosforados e carbamatos, e em menor escala, aos piretróides. Também já foi observado que um mecanismo alterado de acetilcolinesterase produz um espectro amplo de resistência aos organofosforados e/ou aos insecticidas do tipo carbamato (SUCEN, 2001).

As enzimas CYPs são hemoproteínas que utilizam o NADPH como co-substrato (Hemingway & Ranson, 2000). Esta complexa família de enzimas é encontrada em muitos organismos, incluindo insectos. Essas enzimas estão envolvidas com o metabolismo de drogas, xenobióticos e na detoxificação de quase todas as classes de insecticidas (Hemingway & Ranson, 2000). Elas também possuem um papel no metabolismo endógeno de esteróides, ácidos graxos e colesterol (Martin, 2003). São enzimas que catalisam reacções de oxi-redução, com a utilização de oxigênio molecular, onde apenas um dos átomos de oxigênio é incorporado ao substrato orgânico e o outro é reduzido à água.

1.4.2. Resistência *Knockdown*

Os canais de sódio são o local-alvo dos piretróides e de alguns organoclorados como o DDT. A ligação destes inseticidas mantém os canais de sódio na conformação aberta e, conseqüentemente, há uma propagação contínua do impulso nervoso, que resulta na morte do insecto por paralisia. Conhecido como mecanismo *knockdown resistance (kdr)*, este tipo de resistência resulta de mutações pontuais no gene que codifica o canal de sódio, que alteram a sua afinidade ao insecticida (Soderlund, 1997; Soderlund & Knipple, 1999). Este tipo de resistência foi observado em várias espécies de insectos, tendo sido inicialmente descrito em *Musca domestica* (Soderlund & Knipple, 1999).

No vector da malária *An. gambiae s.s.*, foram descritas duas mutações pontuais associadas à resistência *kdr*; a primeira envolve uma mudança nucleotídica que resulta na substituição de um resíduo de leucina (TTA), presente no alelo selvagem, para uma fenilalanina (TTT) na posição aminoacídica 1014 do gene que codifica a subunidade transmembranar S6 do domínio II do canal de sódio. Esta mutação está bastante dispersa na África Ocidental (Yawson *et al.*, 2004). A segunda é uma substituição do resíduo leucina (TTA) por uma serina (TCA) na mesma posição aminoacídica e foi inicialmente encontrada na África Oriental (Ranson *et al.*, 2000).

As mutações *kdr* não são homogeneamente distribuídas entre as duas formas moleculares (M e S) de *An. gambiae s.s.* Ambas foram encontradas inicialmente na forma S, com a mutação L1014F a atingir elevadas frequências em populações da África ocidental e a mutação L1014S aparentemente restrita a populações da África Central (em co-ocorrência com L1014F) e África orientada (Santolamazza *et al.*, 2008). Em contraste, a frequência de mutações *kdr* na forma M parece ser bastante inferior, mesmo quando se estudaram populações desta forma em simpatria com populações da forma S que apresentam elevada frequência *kdr*, na África Ocidental (Santolamazza *et al.*, 2008). Na África Ocidental, um estudo revelou que a mutação L1014F terá sido introduzida na forma M por introgressão a partir da forma S (Weill *et al.*, 2000), embora origens independentes desta mutação na forma M tenham sido também observadas nos Camarões (Etang *et al.*, 2009). Estudos mais recentes sugerem que as frequências *kdr* também estão a aumentar na forma M na África Ocidental. Também já foi detectada a mutação L1014S em *An.*

arabiensis no Quênia (Kulkarni *et al.*, 2006; Mathias *et al.*, 2011). Estes resultados sugerem uma rápida dispersão das mutações *kdr*, possivelmente associada a pressões selectivas por acção dos insecticidas, quer de programas de controlo quer do uso na agricultura (Diabaté *et al.*, 2002; Awolola *et al.*, 2005). Há evidências de que o uso do DDT contra pragas na agricultura na década de 1960 e 1970 também poderá ter contribuído para a seleção da mutação *kdr* nestes vectores (Chandre *et al.*, 1999b; Etang *et al.*, 2003).

A resistência *kdr* em *An. gambiae* s.l. tem-se tornado comum em diferentes regiões de África e pode representar uma ameaça para a implementação bem sucedida e sustentável de programas de controlo.

1.5. A Malária em Moçambique

1.5.1. Espécies edistribuição de Vectores da Malária em Moçambique

Das 422 espécies de *Anopheles* no mundo, em Moçambique foram identificadas aproximadamente 30 espécies e 5 sub-espécies. Destes somente as espécies do complexo *An. gambiae* s.l. e *An. funestus* s.l. transmitem o parasita da malária (INS, 1990).

No país ocorrem quatro espécies biológicas pertencentes ao complexo *An. gambiae* s.l. nomeadamente: *An. arabiensis*, *An. gambiae* s.s., *An. merus* e *An. quadriannulatus* (INS, 1990). Estudos moleculares indicam que as espécies *An. gambiae* s.s., *An. arabiensis* e *An. funestus* s.s. são os principais vectores de parasitas da malária em Moçambique e que o *An. gambiae* ocorre apenas na forma molecular S (Cuamba, 2003).

O *An. arabiensis* encontra-se amplamente distribuído pelo País, enquanto *An. gambiae* s.s. é incomum em áreas do sul onde a precipitação é inferior a 600 mm por ano. A transição de vegetação de Miombo para Floresta aberta parece limitar a distribuição do *An. Gambiae* á sul de 24°S. Esta espécie é mais prevalente em direcção ao norte do país. O *An. merus* é encontrado a 350 Km para o interior, bem como ao longo da costa, mas no litoral sempre em áreas com vegetação de mangal. O *An. quadriannulatus* foi encontrado restrito a áreas secas a sul de 24°S (Cuamba, 2003).

1.5.2. A Epidemiologia da Malária em Moçambique

A malária é endêmica em todo o país, variando de mesoendêmica a holoendêmica. Moçambique é, no entanto, propenso a desastres naturais, como secas, ciclones e inundações e estes podem contribuir para um aumento dramático na transmissão da malária, em particular nas zonas costeiras de baixa altitude e ao longo dos principais rios (Cuamba, 2003).

A transmissão da malária é estável e ocorre durante todo o ano, com um pico que se estende de Dezembro a Abril (PNCM, 2002). O *Plasmodium falciparum* é responsável por cerca de 90% de todas as infecções de malária, com *P. malariae* e *P. ovale* responsáveis por cerca de 9% e 1%, respectivamente (PMI, 2007).

Em Moçambique, a malária é ainda um problema de saúde pública, causando uma alta mortalidade e morbidade e reivindicando cerca de 46% de todas as consultas externas, 33 % de todos os internamentos e 11% de óbitos nas enfermarias de pediatria (INE, 2013). Dados do Inquérito Demográfico e de Saúde de 2011 mostram que a prevalência da malária em crianças menores de 5 anos diminuiu de 38,5% em 2007 para 35,1% em 2011 diagnosticado por microscopia óptica, e de 51.5% para 38,3% diagnosticado por testes de diagnóstico rápido (PNCM, 2014).

A incidência de malária clínica estabelecida através de detecção activa de casos semanais sugere que o risco de malária clínica é maior na faixa etária entre um e três anos, quando as crianças experimentam uma média de mais de 2 episódios por ano. O risco de malária cai drasticamente após a idade de 6 anos (Mabunda, 2006).

A malária é também um problema grave em mulheres grávidas nas zonas rurais. Aproximadamente 20% das mulheres são parasitêmicas, e mostram uma maior prevalência de 31% na primeira gravidez (Mabunda, 2006).

1.5.3. História do uso de insecticidas no controlo da Malária em Moçambique

Em Moçambique, assim como em muitas outras partes do mundo, a história do controlo da malária começou no início do ano 1900, com a descoberta das drogas antimaláricas e a implementação de actividades anti-larval. A descoberta dos efeitos dos insecticidas DDT, BHC e Deltamentrina

levou a um aumento considerável das actividades de controlo da malária em todo mundo (Molineaux & Gramiccia, 1980).

A primeira actividade antimalárica em Moçambique iniciou em Maio de 1907, na cidade de Lourenço Marques, actualmente cidade de Maputo, e consistiu da aplicação de larvicidas tais como óleo residual que matam estágios imaturos do mosquito e, gestão ambiental para eliminação dos criadouros dos mosquitos (Serrão de Azevedo, 1910).

As primeiras intervenções de grande escala contra a malária começaram em 1942 na antiga capital colonial Lourenço Marques e consistiu da aplicação de pesticidas, utilizando querosene, piretróides e larvicidas em todos os criadouros permanentes identificados. Em áreas suburbanas, os criadouros foram tratados usando óleo residual (Serrão de Azevedo, 1910). O uso de DDT e BHC começou em 1946, na cidade de Lourenço Marques e áreas arredores, e mais tarde expandido para João Belo (actualmente cidade de Xai-Xai), cidade de Inhambane e para o vale do Limpopo, na região sul do país (Mabunda, 2006).

Mais tarde, em meados de 1946, actividades antivectoriais foram expandidas para a cidade da Beira. Uma medida complementar incluindo nebulização espacial com máquina Tifa, seguindo um regime semanal, em áreas urbanas e suburbanas da cidade de Lourenço Marques. Estas medidas eram destinadas a diminuir a densidade de mosquitos vectores, bem como de outros insectos incômodos (Soeiro, 1959).

Em 1948, na cidade de Beira, a segunda maior cidade situada na região central de Moçambique, o DDT foi adicionado a outras actividades anti-maláricas. Progressivamente o uso do DDT foi expandido para outras cidades, como Quelimane, Nampula e Porto Amélia (actualmente Pemba), na região norte do país (Soeiro, 1959).

Em 2000, o programa Iniciativa de Desenvolvimento Espacial do Lumbombo (LSDI), introduziu o carbamato bendiocarbo na PIDOM na província de Maputo, devido à descoberta de resistência a piretróides na população de *An. funestus*. Em 2002, foram detectados alguns níveis de resistência do *An. funestus* ao bendiocarbo, no Sul de Moçambique, e foi observado que estava em propagação. Com base nesta evidência, em 2005 foi reintroduzido o DDT tornando-se deste modo o principal insecticida utilizado para o controlo de vectores da malária em Moçambique (Casimiro *et*

al., 2006). Actualmente, o País está a usar os insecticidas DDT, deltametrina, lambdacialotrina e bendiocarbo para a PIDOM e deltametrina para as REMILDs (PNM, 2014).

O perfil actual da resistência aos insecticidas em Moçambique baseia-se em dados antigos e escassos provenientes de inquéritos em locais isolados. Em algumas áreas na região sul do País o *An. funestus* é resistente aos piretróides, mas susceptível ao DDT. O *An. gambiae* é resistente ao DDT e o *An. arabiensis* é resistente aos piretróides. Em algumas áreas na região centro do País, concretamente na província da Zambézia o *An. funestus* é resistente aos piretróides mas, susceptível ao DDT. Na zona norte do País, o *An. funestus* é susceptível ao DDT e aos piretróides enquanto que as espécies do complexo *An. gambiae* foram resistentes aos piretróides e ao DDT (PNM, 2014).

Estes dados sugerem, que diferentes mecanismos estão envolvidos na resistência dos vectores *An. gambiae* e *An. funestus* em diferentes regiões do País, e que a distribuição da resistência aos insecticidas no País não é uniforme (PNM, 2014).

2. OBJECTIVOS

2.1. Geral

- Avaliar a resistência do mosquito *Anopheles gambiae* s.l. aos insecticidas usados na saúde pública, no bairro da Polana Caniço, cidade de Maputo.

2.2. Específicos

- Identificar as espécies do grupo *Anopheles gambiae* s.l. presentes no bairro da Polana Caniço.
- Determinar os níveis de resistência do *Anopheles gambiae* s.l. aos insecticidas das classes piretróides, carbamato e organoclorato
- Determinar os mecanismos responsáveis pela resistência aos insecticidas no bairro da Polana Caniço.

3. METODOLOGIA

3.1. Área de estudo

A colheita de amostras biológicas foi feita no bairro da Polana Caniço, cidade de Maputo. Com uma extensão territorial de 22,2 Km² o bairro da Polana Caniço localiza-se a sudeste do município de Maputo, e próximo ao litoral da baía de Maputo no distrito Kamaxakeni, entre os paralelos 25° 55' 45" a 25° 57'00" S e 32°35'30" a 32°37' 00" (Fig 3.1) (CMCM, 2010). Devido a sua localização geográfica, nas cercanias do paralelo 26°S, o bairro da Polana Caniço é marcada por um clima tropical húmido com chuvas predominantes na época quente(CMCM,2010).

O bairro da Polana Caniço tem uma população de 45.528 habitantes, o que equivale a 4.7% da população total da cidade de Maputo, sendo que 22.322 são homens e 23.561 são mulheres (CMCM,2010).

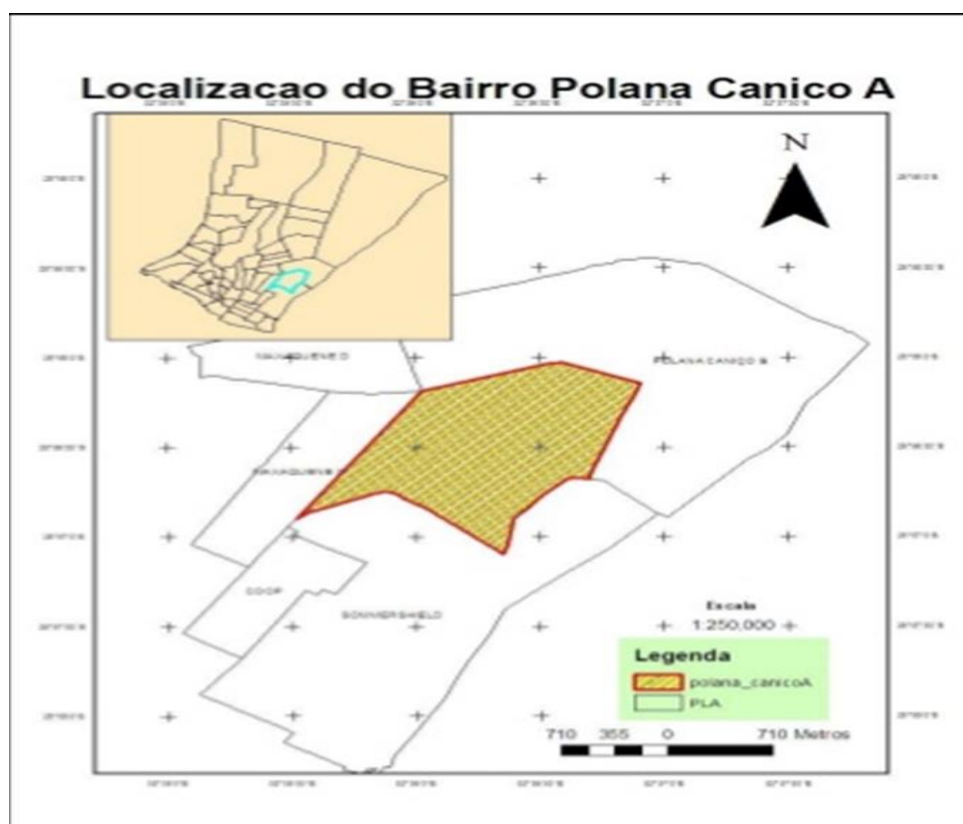


Figura 3.1: Localização do bairro da Polana Caniço entre os bairros da cidade de Maputo.

3.2. Colheita das Amostras

As colheitas de amostras foram feitas entre Março e Junho de 2014. Os mosquitos imaturos foram colhidos entre as 06:00 e as 11:00 horas da manhã através da prospeção de criadouros larvares, com recurso a conchas e pipetas seguindo protocolos já existentes (WHO, 1975). Foram colhidas larvas nos seus quatro estágios de desenvolvimento, em criadouros temporários todos de água doce, consistindo em pequenas lagoas de água limpa e com alguma vegetação, e caminhos/buracos de água em machambas.

Após a colheita, as larvas foram transportadas em frascos marcados com a data e o local de colheita, para o insectário do laboratório de entomologia do Instituto Nacional de Saúde, para o crescimento até a fase de mosquito adulto. No insectário as larvas foram alimentadas com uma mistura de farinha láctea (cerelac da Nestlé) e leverina até a fase de pupa. Após esta fase, elas foram mantidas até à emergência dos adultos em gaiolas cúbicas (30cm por lado) numa sala de ambiente controlado (25-28°C, 75-85% HR).

3.3. Identificação Morfológica do Mosquitos

Após o crescimento das larvas em insectário, os mosquitos na fase adulta foram separados morfológicamente em géneros e espécies segundo caracteres morfológicos das chaves de identificação de Gilles e De Meillon (1968) e Gillies e Coetzee (1987) se fossem Anofelinos, e chave publicada por Service (1990) e Gillet (1972) se fossem outros Culicídeos, respectivamente. De seguida, seleccionou-se os mosquitos fêmeas identificados como *An. gambiae* s.l. para a realização dos testes de susceptibilidade aos insecticidas.

3.4. Ensaio de susceptibilidade aos insecticidas

3.4.1. Procedimento dos Testes de Susceptibilidade

Mosquitos fêmeas adultos da espécie *An. gambiae* s.l. de 2 a 4 dias foram sujeitos a ensaios de susceptibilidade com “kits” fornecidos pela OMS (WHO, 1970). Estes foram feitos em locais livres de insecticidas contaminantes, temperaturas extremas, humidade, iluminação e correntes de ar. A

temperatura foi sempre controlada ao longo dos testes. Foi testada a susceptibilidade a 5 insecticidas às concentrações recomendadas pela OMS: Lambdacialotrina (0,05%), Deltametrina (0.05%), Permetrina (0.75%) Bendiocarbo (0.1%) e DDT (4%). No interior de cada um dos tubos de exposição e de controlo foi introduzida uma folha de papel impregnado (com insecticida nos tubos de exposição e com o excipiente do insecticida nos tubos de controlo) ajustado às paredes e fixo por cliques.

Em cada tubo foram expostos 15 a 25 mosquitos fêmeas adultos da espécie *An. gambiae* s.l. A exposição decorreu com os tubos na posição vertical e a ponta da grelha voltada para cima durante uma hora sob condições de iluminação difusa, temperatura e humidade relativa adequadas ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 70-80% HR). O número de mosquitos mortos foi registrado a cada 10 minutos até aos 60 minutos.

No fim do tempo de exposição, os mosquitos foram transferidos para os tubos de repouso. Os tubos de repouso contendo os mosquitos sobreviventes foram colocados em posição vertical apoiados na lâmina e sobre a grelha, situada na parte superior do tubo por 24 horas em um local abrigado tendo sido registadas as temperaturas máximas e mínimas. Pedacos de algodão embebido numa solução de glicose a 10% posicionados sobre a grelha garantiram o alimento dos mosquitos sobreviventes. Estes foram também protegidos de insectos predadores e mantidos em insectário.

Para a leitura removeu-se os mosquitos mortos e, os vivos foram contados por atordoamento, agitando ligeiramente o tubo. Após a leitura as amostras foram mantidas em laboratório, e ficaram preservadas a -20°C até à identificação molecular da espécie.

3.4.2. Interpretação dos testes de susceptibilidade

A contagem da mortalidade para cada insecticida foi feita 24 horas após a realização do teste. Os indivíduos mortos nos tubos de exposição foram contados e, foi calculada a percentagem de mortalidade.

Segundo a OMS (1968) uma elevada mortalidade no controlo pode dever-se a uma má manipulação dos insectos ou ao facto de, acidentalmente, terem entrado em contacto com o insecticida, ou ainda a uma exposição a condições desfavoráveis. Assim, nos casos em que tal aconteceu, procedeu-se da seguinte forma: para uma mortalidade superior a 20% invalidou-se o

teste e este foi repetido. Em casos onde os valores de mortalidade do controlo se mostrarem entre 5 e 20%, a mortalidade registrada nos tubos expostos ao insecticida foi corrigida pela fórmula de Abbot (WHO, 1963).

De acordo com a OMS, as taxas de mortalidade observadas nas exposições aos insecticidas dão uma indicação do estado de susceptibilidade da população em estudo, com base nos seguintes intervalos:

- 98 – 100%: de mortalidade indicam susceptibilidade.
- 80 – 97%: de mortalidade sugerem a possibilidade de resistência.
- < 80%: resistência confirmada.

3.5. Identificação específica das espécies do complexo *An. gambiae* s.l.

Para a identificação dos membros do complexo *An. gambiae* s.l., procedeu-se os ensaios de PCR convencional. Esta técnica baseia-se em polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição específicos das espécies, localizados nos espaçadores intergénicos (IGS) do DNA ribossomal. O método é baseado na digestão directa de um fragmento de rDNA de tamanho variável consoante a espécie, amplificado por PCR, e permite uma identificação simultânea de todas as espécies do complexo *An. gambiae* s.l.

A reacção de PCR decorreu em tubos de 0.2 ml utilizando um “primer forward” universal (UN: 5'-GTG TGC CCC TTC CTC GAT GT-3'), comum a todas as espécies, e “primers reverse” específico para o *An. gambiae* s.s. (GA: 5'-CTG GTT TGG TCG GCA CGT TT-3'), *An. arabiensis* (AR: 5'-AAG TGT CCT TCT CCA TCC TA-3'), *An. merus* (ME: 5'-TGA CCA ACC CAC TCC CTT GA-3'), e *An. quadriannulatus* (QUAD: 5'-CATAATGAGTGCACAGCATA - 3').

A mistura de reacção de amplificação foi preparada com 4.9µl de água esterilizada, 1.25µl de 10X PCR tampão, 0.5µl MgCl₂ (25mM), 1.25µl 10X dNTPs (2.5 mM mix G,A,T,C), 1.0µl de “primer” UN, AR, GA, ME, 0.5µl de “primer” QDA, e 0.1µl de Taq DNA polimerase (5U/µl) perfazendo o volume total de 12.5µl.

Após a preparação da mistura, foi utilizado 1 asa ou pata do mosquito como DNA molde para cada reacção de amplificação. Adicionou-se 12.5 µl do mix a cada tubo contendo asa/pata, e levou-se imediatamente ao termociclador. Cada grupo de reacções de amplificação incluiu controlos positivos para cada espécie (composto por asas ou patas de mosquitos anteriormente identificados) e um controlo negativo (sem nenhuma parte do mosquito).

O programa de PCR foi feito em termocicladores iCYCLER™ da Bio- Rad (California, USA) nas seguintes condições: 30 ciclos de (1) desnaturação a 95°C durante 30 segundos; (2) emparelhamento a 50°C durante 30 segundos; e (3) extensão a 72°C durante 30 segundos.

Realizou-se ainda uma etapa final de alongamento a 72°C durante 5 minutos. Para conservação no termociclador, o programa foi concluído a uma temperatura de 4°C. As amostras foram conservadas a -20°C até à separação dos fragmentos por electroforese em gel de agarose.

Os produtos amplificados foram separados por electroforese em gel de agarose (Promega™, Madison USA) a 2.5 % com brometo de etídio (Sigma™, St Louis USA). 12 µl de cada amostra foi aplicado no gel correndo a 110-130V durante 60 a 90 minutos e sendo posteriormente visualizado e fotografado num transiluminador de luz UV (UVitec, Alfagene, UK). Foi usado marcador molecular 100bp DNA ladder (Fermentas, Burlington, Canada).

3.6. Análises Bioquímicas

Apenas amostras identificadas como pertencentes ao complexo *An. gambiae* s.l. foram analisadas de forma individual para os seguintes testes enzimáticos: Acetilcolinesterase (AChE), Acetilcolinesterase insensitivo (IAChE), Análise de elevada esterase não específica e reacção de Oxidase.

Para a preparação das amostras, cada mosquito adulto foi triturado em 100 µl da solução tampão (KPO₄). Após a trituração, foi adicionado 900 µl da mesma solução, até perfazer o volume total de 1 ml. De seguida, foram realizados as análises enzimáticas acima mencionadas.

Após as análises, as micro-placas foram preparadas para a leitura da densidade óptica em um espectrofotómetro acoplado a um computador.

As populações susceptíveis mostraram um limite superior de intervalo de absorvância para susceptibilidade em termos de actividade. Indivíduos com níveis acima desse limite foram menos susceptíveis.

3.6.1 Preparação das soluções tampão

Tampão Fosfato de potássio (KPO₄)

Para a preparação do KPO₄, misturou-se 6.6 g de fostato de potássio dibásico, 1.7g de fosfato de potássio monobásico, e 1 litro de água. Ajustou-se o pH para 7.2.

Tampão Acetato de sódio (NaOAc)

Misturou-se 83 ml de 3M de NaOAc com 900 ml de água, e ajustou-se o pH até 5 com ácido glacial acético. O volume final foi de 1 litro.

3.6.2. Análise de Elevada Esterase não Específica

Esta análise, mede o nível de β esterase não específica presente no mosquito.

Preparou-se o β - naftil acetato , misturando 56 mg de β - naftil acetato, 20 ml de acetona e 80 ml de KPO₄. De seguida preparou-se a Dianisidine através da mistura de 100 mg de 0-dianisidine tetrazotizado e 100 ml de água. Imediatamente, colocou-se em cada poço da placa 100 μ l da solução do mosquito triturado e, adicionou-se 100 μ l de β - naftil acetato. Incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos. Após a incubação adicionou-se 100 μ l de Dianisidine em cada poço. Incubou-se novamente por 2 minutos, e fez-se a leitura no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540nm. Usou-se β - naftil acetato como controlo positivo e o tampão KPO₄ como controlo negativo. O limiar de resistência a 540 nm considerado para a actividade da enzima foi de 0.9.

3.6.3. Reacção de Oxidase

Esta reacção, mede o nível da enzima peroxidase presente no mosquito. Preparou-se o Tetramethyl-Benzidine (TMBZ), através da mistura de 50 mg 3,3',5,5'-TMBZ, 25ml de Metanol, e 75ml de 0.25M tampão NaOAc. De seguida, colocou-se 100µl do mosquito triturado em cada poço da placa. Adicionou-se 200 µl de TMBZ e 25 µl de H₂O₂. Incubou-se por 5 minutos e lêu-se a placa no espectrofotómetro a um comprimento de onda de 620nm. Usou-se o Citocromo C como controle positivo e o tampão KPO₄ como controle negativo. O limiar de resistência considerado para a actividade da enzima foi de 0.8.

3.6.4. Análise de Acetilcolinesterase (AChE)

Esta análise mede a quantidade de AChE presente no mosquito.

Preparou-se o Acetylthiocholine iodide (ATCh), dissolvendo 75 mg de ATCh, 10ml de acetona e 90ml do tampão KPO₄. De seguida preparou-se o ácido Dithio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), dissolvendo 13 mg do DTNB em 100ml do buffer KPO₄.

Colocou-se 100µl da solução de mosquito triturado em cada poço da placa. Adicionou-se 100µl de ATCh e 100 µl de DTNB a cada poço. De seguida fez-se imediatamente a leitura (T₀) no espectrofotómetro a um comprimento de onda de 414nm. Incubou-se a temperatura ambiente durante 10 minutos, e fez-se a leitura (T₁₀) também a um comprimento de onda de 414 nm. Usou-se o tampão KPO₄ como controle negativo.

3.6.5. Análise de Acetilcolinesterase Insensitivo (IAChE)

IAChE tem sido associado com resistência a carbamatos e organofosfatos. O propoxur é usado neste ensaio para inibir a actividade da AChE, permitindo a detecção da enzima alterada quando está presente.

Preparou-se o ATCh, dissolvendo 75mg de ATCh, 21 mg de propoxur, 10 ml de acetona e 90 ml de tampão KPO₄. De seguida, colocou-se 100 µl do mosquito triturado em cada poço da placa, e adicionou-se 100 µl de ATCh e 100µl de DTNB. Fez-se imediatamente a leitura (T₀) da placa a um

comprimento de onda de 414 nm. De seguida incubou-se a temperatura ambiente durante 10 minutos e fez-se a leitura (T_{10}), a um comprimento de onda de 414 nm. Usou-se o tampão KPO_4 como controle negativo. A percentagem de inibição igual ou superior a 70% indicou que não ocorreu alteração no gene AChE, enquanto que uma percentagem inferior a 70% indicou que houve alteração no gene AChE.

4. RESULTADOS

4.1. Colheita de mosquitos

As colheitas larvas de mosquitos foram feitas no bairro da Polana caniço, entre Março a Junho de 2014. Das colheitas, obteve-se 1870 mosquitos adultos que foram morfológicamente identificados como pertencentes ao complexo *Anopheles gambiae* s.l. Destes 675 fêmeas foram submetidas aos testes de susceptibilidade aos insecticidas. Um número mínimo de 100 amostras foi considerado para cada teste de susceptibilidade.

4.2. Testes de susceptibilidade

Os testes de susceptibilidade foram feitos de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS (1998), onde mortalidade < 80% após 24 horas de exposição indica resistência.

Nenhuma resistência foi observado para o DDT, tendo sido observado 100% de mortalidade após 24 horas de exposição (Tabela 4.1).

Uma mortalidade de 61%, 87% e 88% foi observado para ospiretróideslambdacialotrina, deltametrina e permetrina respectivamente, após 24 horas de exposição (Tabela 4.1).

Uma mortalidade de 80.8% foi observado para o bendiocarbo após 24 horas de exposição (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Resultados dos teste de susceptibilidade da WHO feitos em *Anopheles arabiensis* de 2 a 4 dias de idade, no bairro de Polana Caniço,

Insecticida	N	% Mortalidade
Lambdacialotrina	150	61%
Deltametrina	100	87%
Permetrina	150	88
Bendiocarbo	175	80.8
DDT	100	100

4.3. Identificação específica por PCR

675 amostras de ADN, correspondendo a igual número de espécimes, foram submetidas ao PCR para identificação específica das espécies. Das amostras amplificadas com sucesso, 100% pertenciam a espécie *Anopheles arabiensis*.

4.4. Análises bioquímicas

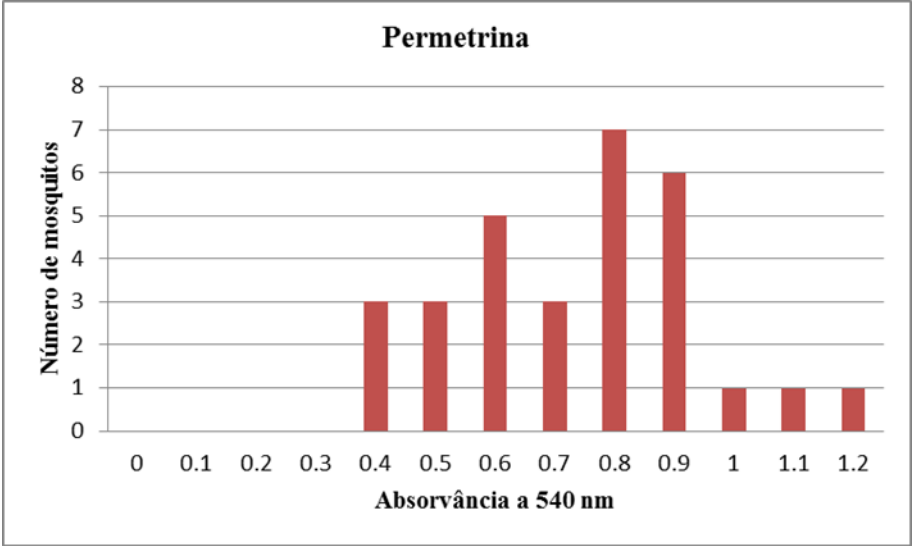
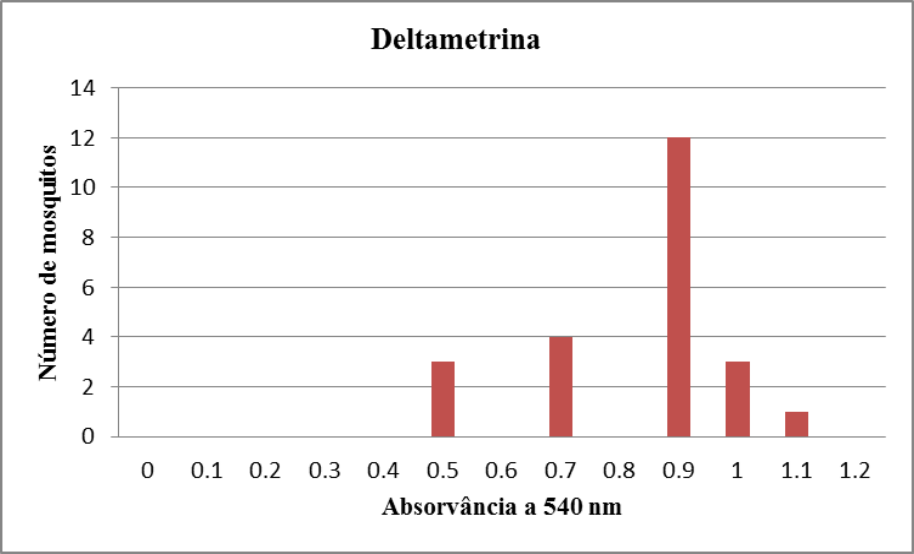
No total, foram selecionados 120 mosquitos anteriormente submetidos aos ensaios de susceptibilidade, para as análises bioquímicas. Destes 90 mosquitos testados para piretróides (30 para cada insecticida) foram analisados de forma a medir a actividade da enzima esterase e oxidase, e 30 mosquitos testados para o insecticida bendiocarbo foram submetidos a análise da actividade da enzima AChE e IChE.

4.4.1. Análise de elevada Esterase não específica

Este ensaio, mede o nível de Esterase não-específica presente. Estas enzimas têm sido implicadas na resistência a organofosfatos e piretróides.

Das 30 amostras de mosquitos analisadas para o insecticida deltametrina, 4 amostras estiveram acima do limiar de 0.9, sugerindo um aumento na actividade da esterase com o substrato β -naftil acetato, com uma variação de 0.5 a 1.1 (Figura 4.1).

Nas 30 amostras testadas para o insecticida permetrina, 3 amostras tiveram um aumento na actividade da esterase com o β -naftil acetato. A actividade de esterase variou de 0.4 a 1.2 (Figura 4.1). Das 30 amostras testadas para o lambda cialotrina 4 mostraram um aumento na actividade da esterase com o β -naftil acetato, sendo que a actividade de esterase variou de 0.7 a 1.1 (Figura 4.1).



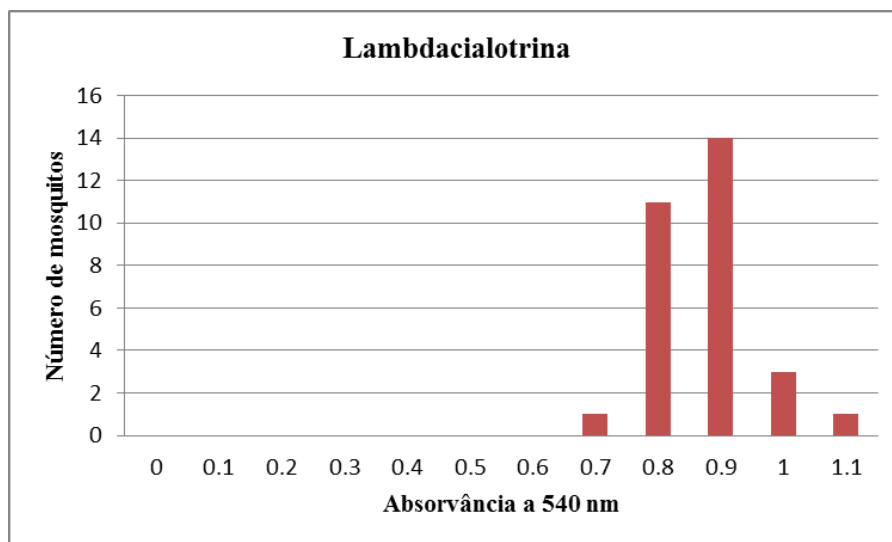
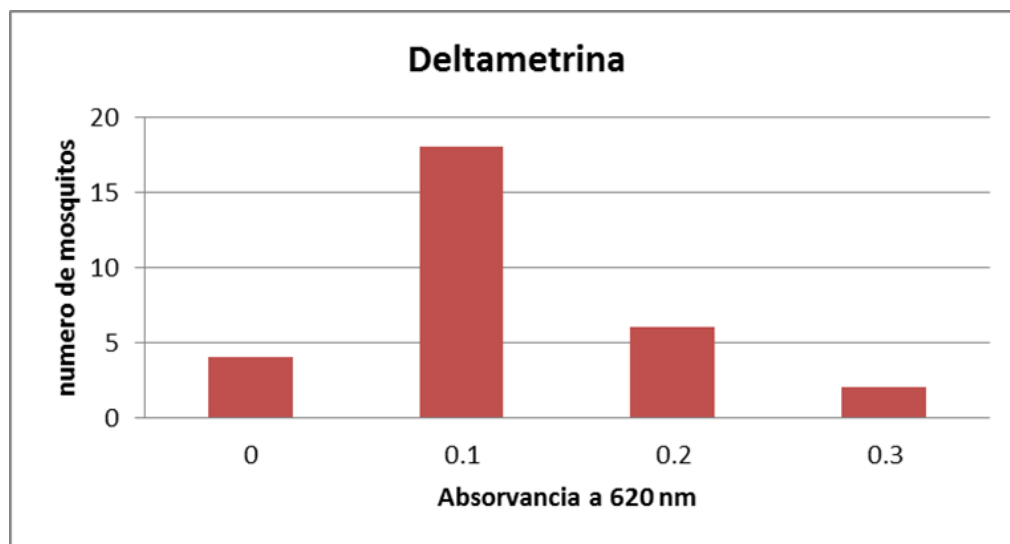


Figura 4.1: Densidade óptica da actividade da esterase em *Anopheles arabiensis* provenientes do bairro da Polana Caniço.

4.4.2. Análise de oxidase

Em todas 90 amostras testadas para a enzima oxidase, nenhuma apresentou a densidade óptica (OD) acima ou próxima ao limiar de 0.8. A média da OD para Lambdacialotrina, Permetrina e Deltametrina foi de 0.1, 0.07, 0.06, respectivamente (Fig 4.2).



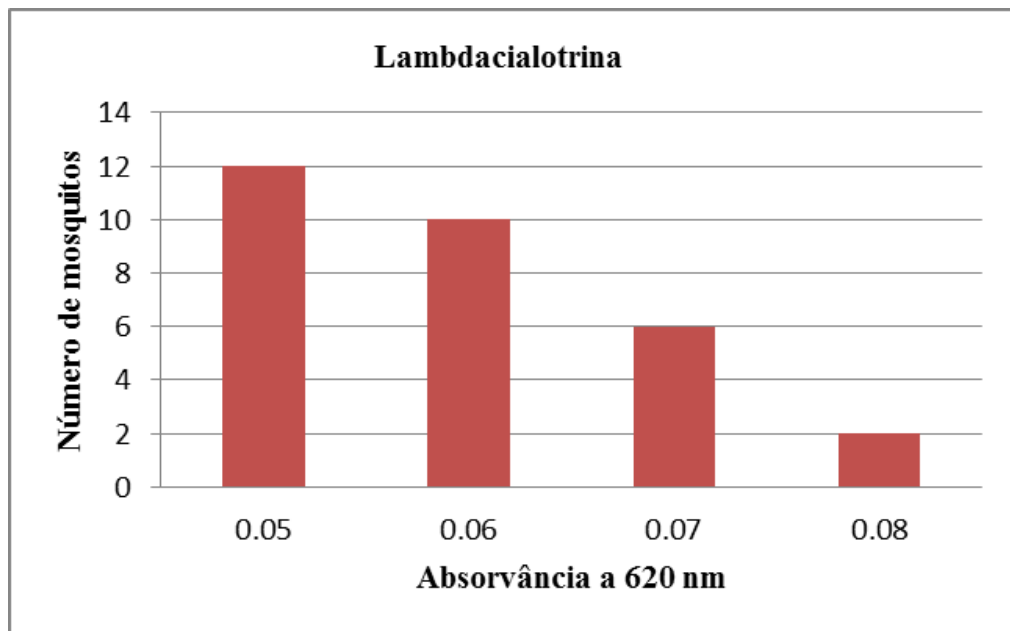
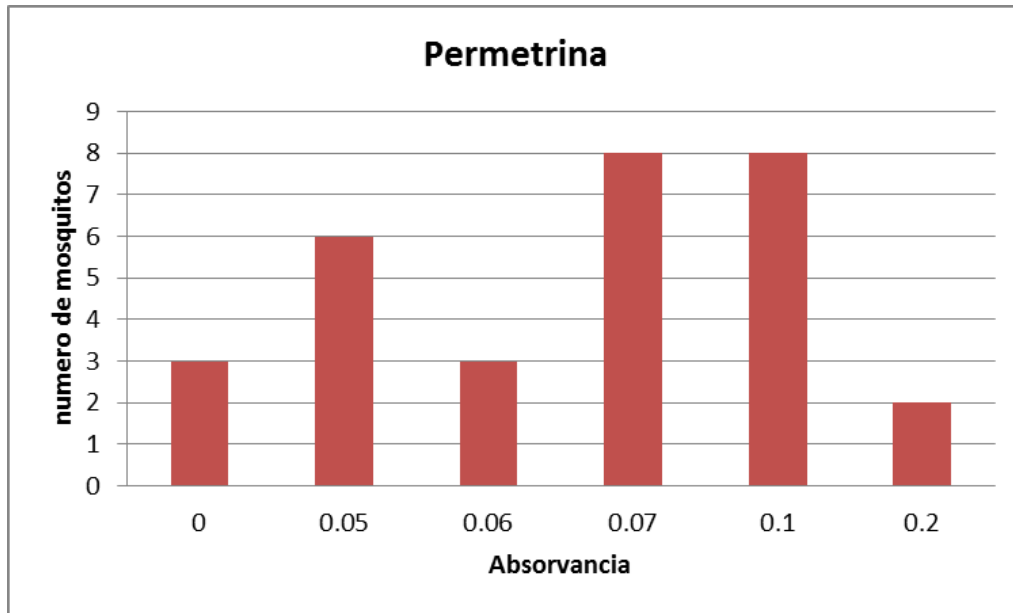


Figura4.2: Densidade óptica da actividade da oxidase em *Anopheles arabiensis* provenientes do bairro da Polana Caniço.

4.4.3. Análise de Acetilcolinesterase

30 amostras de mosquitos testados para o inseticida bendiocarbo por ensaios de susceptibilidade da WHO, foram submetidos a análise da Acetilcolinesterase e insensitivo Acetilcolinesterase. A taxa de inibição nas amostras variou de 0 a 84%, indicando que 93% das amostras testadas, tem alguma uma alteração no gene AChE (Fig 4.3).

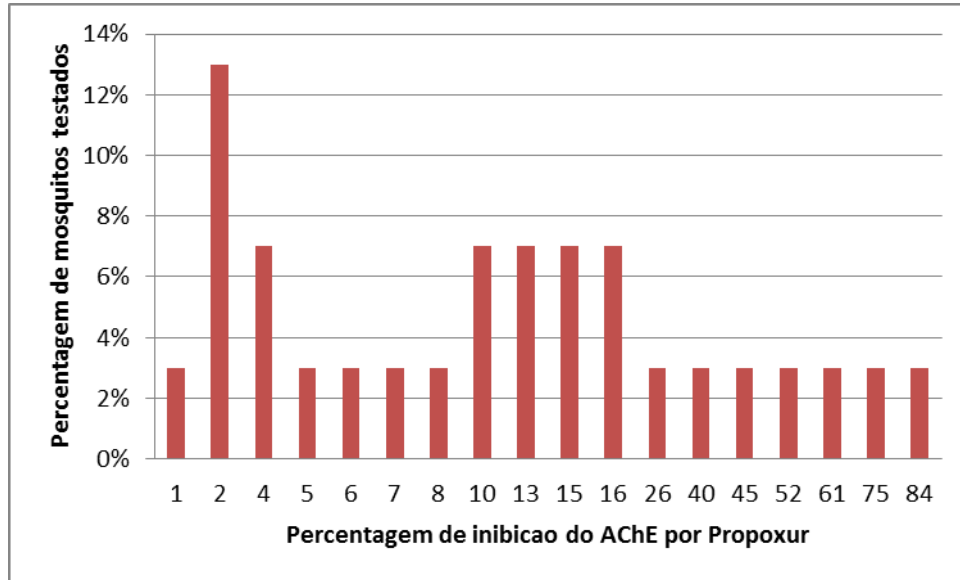


Figura4.3: Taxa de inibição de Acetilcolinesterase em *Anopheles arabiensis*, provenientes do bairro da Polana Caniço.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foram coletadas e criadas larvas de *An. arabiensis*, a fim de analisar o padrão de susceptibilidade da população desta espécie a uma ampla gama de inseticidas usados na saúde pública e identificar os principais mecanismos de resistência envolvidos.

O nível de resistência observado em *An. arabiensis* para a lambda cialotrina (61%) no bairro da Polana caniço foi notavelmente alta, daquela observada nesta mesma área em 2006 (mortalidade de 100%) e 2010 (mortalidade de 94.8%) (Casimiro *et al.*, 2006; Sibindy & Cuamba, 2010), sugerindo que com o tempo ocorreu uma mudança na susceptibilidade do *An. arabiensis* ao lambda cialotrina no bairro da Polana caniço. Este nível de resistência observado no estudo (61%) também foi alta em relação ao observado para o *An. arabiensis* em outras localidades da província de Maputo, como Bela vista, Catuane e Moamba (89%, 98%, 99% respectivamente) (Casimiro *et al.*, 2006).

Evidências de um baixo nível de resistência do *An. arabiensis* para o piretróide deltametrina (87%) foi observados no bairro da Polana Caniço. Este nível de resistência difere daquele observado em 2006 nas localidades de Manjacaze (75%) e Mocuba (95%) (Casimiro *et al.*, 2006) e em 2010 no mesmo bairro da Polana Caniço (99.2%) (Sibindy & Cuamba, 2010).

Uma resistência de 88% foi observada para o piretróide permetrina. Este nível de resistência difere do observado em estudos anteriores em 2006 (mortalidade de 100%) nas localidades de Boane, Catuane, Manhica, Mocuba, Quelimane e Tete (Casimiro *et al.*, 2006) e em 2010 (100%) no mesmo bairro (Sibindy & Cuamba, 2010).

A resistência observada para o *An. arabiensis* ao bendiocarbo (80,8%) no bairro da Polana caniço foi relativamente alta em relação ao observado em 2006 (mortalidade 100%) no mesmo bairro e nas localidades de Boane, Catuane, Marracuene, Ressano Garcia, Chokwé, Mafambisse, Mocuba e cidade de Nampula (Casimiro *et al.*, 2006) e no bairro da Polana Caniço em 2010 (mortalidade de 93%) (Sibindy & Cuamba 2010), sugerindo uma mudança na susceptibilidade do *An. arabiensis* a este carbamato.

Estes níveis de resistência aos piretróides e carbamato ainda não tinha sido relatado no bairro da Polana Caniço. Este facto indica que a resistência do *An. arabiensis* em Moçambique esta

aumentando ao longo do tempo e se expandindo para áreas onde esta espécie era completamente susceptível.

O *An. arabiensis* foi susceptível ao DDT (100%), no bairro da Polana Caniço. Este resultado é similar ao que foi observado em 2006 (100%) nesta mesma área e, nas localidades de Bela Vista, Boane, Catembe, Manhiça, Ressano Garcia, Mocuba, (Casimiro *et al.*, 2006) e em 2010 (99.8%) no bairro da Polana Caniço (Sibindy & Cuamba, 2010), sugerindo que neste bairro não ocorreu uma mudança na susceptibilidade do *An. arabiensis* ao DDT.

Actualmente, o PNCM está a usar os insecticidas DDT, deltametrina, lambdacialotrina e bendiocarbo para a PIDOM e o deltametrina para as REMILDs. O PNCM, pretende, como medidas a curto prazo, distribuir REMILDs para atingir cobertura universal e expandir a PIDOM para áreas seleccionadas. Uma vez que os piretróides são os insecticidas de eleição na impregnação das redes mosquiteiras, a cobertura universal com REMILDs poderá aumentar a pressão de selecção dos vectores locais aos piretróides no bairro da Polana caniço, uma vez que nos últimos anos este bairro foi pulverizado (PIDOM) com o piretróide deltametrina.

Em Moçambique, em 1993, o DDT, foi substituído pelo piretróide lambdacialotrina no entanto, a resistência ao lambdacialotrina apareceu rapidamente e, em 2000, o piretróide foi substituído pelo carbamato bendiocarbo. Mas devido a resistência ao bendiocarbo, o DDT foi re-introduzido no programa PIDOM em 2006, e tornou-se o principal insecticida utilizado para o controlo de vectores da malária. A selecção do DDT como insecticida escolha foi baseada em evidências, tendo em conta o elevado nível de susceptibilidade dos principais vectores da malária a este insecticida (Casimiro *et al.*, 2007). Desde 2009, os insecticidas lambdacialotrina, deltametrina, bendiocarbo e DDT tem sido usado na PIDOM em diferentes áreas no País. Portanto, era esperado que a pressão de selecção devido aos piretróides usados na PIDOM reduzisse significativamente.

O aumento do nível de resistência observado neste estudo sugere que a fonte desta pressão da selecção não é somente devido a PIDOM, mais também poderá ser devido a utilização de pesticidas na agricultura. Em Moçambique, a urbanização está se espalhando de forma dramática em torno das grandes cidades, e diversas áreas mostram uma intensa actividade agrícola potencialmente afectando o índice de resistência dos vectores da malária aos insecticidas. No bairro da Polana caniço muitas famílias tem pequenas machambas, onde os insecticidas são usados no

controlo de pragas. Em Tanzânia, populações de *An. gambiae* de áreas de agricultura intensa foram encontrados altamente resistentes a piretróides (Dongus *et al*, 2009).

O facto de nenhuma resistência ter sido observada para o DDT, exclui a presença de mutação *knr* nesta população, uma vez que conferiria resistência cruzada com os piretróides (Ranson *et al.*, 2000). Portanto, o mecanismo de resistência aos piretróides nesta população é provavelmente causado pelo mecanismo de resistência metabólica como foi observado nos resultados dos ensaios bioquímicos deste estudo.

Na maior parte dos Países Africanos devido a resistência aos piretróides, os programas de controlo da malária usam o bendiocarbo como uma solução alternativa e complementar para a pulverização intradomiciliar (Protopopoff *et al*, 2013). Este facto não seria recomendável para o bairro da Polana Caniço, visto que observou-se uma tendência para a resistência ao bendiocarbo. No entanto, porque o *An. arabiensis* ainda é totalmente sensível ao DDT, o controlo desta espécie com este insecticida ainda é possível no bairro da Polana Caniço. Contudo, um acompanhamento permanente do estado de susceptibilidade da população de *An. arabiensis* ao DDT neste bairro é fundamental para garantir um controlo bem sucedido desta espécie.

O aumento da actividade da esterase observado em Polana Caniço, sugere que esta enzima desempenha um papel importante na resistência aos piretróides neste bairro. Esta achado discorda com Casimiro (2006), que não observou nenhuma acção desta enzima no mesmo bairro.

O baixo nível de actividade da oxidase observado no bairro da Polana Caniço, sugere que esta enzima não está envolvida na resistência do *An. arabiensis* aos piretróides. Este facto, discorda com o observado por Casimiro (2006), que reportou níveis elevados de enzima do citocromo P450 monooxigenase em o *An. arabiensis* no mesmo bairro.

A alta taxa de inibição por propoxur observada para AChE, sugere que o mecanismo de resistência AChE poderá estar envolvida, na resistência do *An. arabiensis* ao carbamato bendiocarbo no bairro da Polana caniço. No estudo feito no mesmo bairro por Casimiro (2006) foi observado uma baixa actividade da enzima AChE.

A resistência observada aos piretróides e carbamatos na Polana Caniço, é um desafio para as estratégias de gestão da resistência, tal como a rotação de insecticidas aplicadas em Moçambique. O

objectivodestaestratégiaconsiste em reduzir a pressão de selecção causada por um insecticida, de modo que ele possa ser reutilizado no futuro. Isto não será possível para os piretróides e carbamatos no bairro da Polana Caniço, devido ao facto da resistência a estes insecticidas continuarem a aumentar. Por sua vez, este estudo irá ajudar o PNCM, a fazer uma gestão racional da resistência aos insecticidas.

6. CONCLUSÃO

- O *Anopheles arabiensis* foi a única espécie do complexo *Anopheles gambiae* s.l. encontrado no bairro da Polana Caniço.
- O *Anopheles arabiensis* é completamente susceptível ao DDT, mais é resistente ao Lambdaialotrina e ao Bendiocarbo. Uma baixa resistência foi observada para os piretróides Deltametrina e Permetrina.
- Os mecanismos bioquímicos esterase e acetilcolinesterase estão envolvidos na resistência do *Anopheles arabiensis* aos piretróides e carbamatos no bairro da Polana Caniço.
- O níveis de resistência aos piretróides e carbamato observado no bairro da Polana Caniço é um forte indicador que a resistência do *Anopheles arabiensis* em Moçambique esta aumentando ao longo do tempo, e se expandindo para áreas onde esta espécie era completamente susceptível.

RECOMENDAÇÕES

- No âmbito de manejo da resistência, o insecticida DDT parece ser o mais aconselhado para a PIDOM no bairro da Polana Caniço, enquanto se espera pela regressão da resistência aos piretróides e carbamato.
- Porque os insecticidas deltametrina, lambdacialotrina, e bendiocarbo são usados actualmente pelo PNCM na PIDOM, os mecanismos de resistência a estes insecticidas devem ser cuidadosamente monitorados e estratégias de manejo de resistência devem ser desenvolvidas de modo a reduzir a selecção de níveis mais elevados de resistência aos piretróides e carbamatos no bairro da Polana Caniço.
- Embora os ensaios bioquímicos forneceram indicações sobre os potenciais mecanismos envolvidos na resistência aos piretróides e carbamatos, mais estudos de resistência devem ser feitos para elucidar e completar estes mecanismos.

LIMITAÇÕES

- Indisponibilidade de alguns reagentes para as análises bioquímicas de resistência pelas empresas fornecedoras.
- Ausência de outras espécies vetores de malária no local de estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antonio-Nkondjio C., Fossog B., T., Ndo C., Djantio B. M., Tougouet S. Z., Awono-Ambene P., Constantini C, Wondji C. S., Ranson H. (2011). *Anopheles gambiae* distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaounde (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution. *Malaria Journal*, 10:154.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Toxicologia. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/para>>.

Apperson C. S. & Georghiou G. P. (1975). Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides. In *Culex tarsalis*. *Journal of Economic. Biochemistry* 68: 63-78

Awolola, T.S., Oyewole, I.O., Amajoh, C.N., Idown, E.T., Ajayi, M.B., Oduola, A., Manafa, O.U, Ibrahim, K., Koekermoer, L.L., and Coetzee, M. (2005). Distribution of the molecular forms of *Anopheles gambiae* and pyrethroid knock down resistance gene in Nigeria, *Acta Tropica*, 95(3), pp. 204-209.

Ayala F. J., Escalante A. A., Lal A. A., Rich S. M. (1998). Evolutionary relationships of human malaria parasites. In *Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection*, Sherman IV (Ed.), *American Society for Microbiology Press*, Washington D.C. 285-300

Bagayoko M, Ameneshewa B, Faye O, Lyimo E, Govere J, Gebremarian M & Manga L(2005). The status of malária vector resistance to insecticides used for public health in the African Region. *WHO Bulletin*.

Black W. C. & Moore C. G. (1996). *Population biology as a tool for studying vector-borne diseases*. In: Beaty BJ. *The biology of disease vectors*. Niwot (CO): University of Colorado; 393416. Marquardt MC, editors.

Brooke B. D., Kloke G., Hunt R. H., Koekemoer L. L., Temu E. A., Taylor M. .E., Small G., Hemingway J., Coetzee, M. (2001). Bioassay and biochemical analyses of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera:Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*. 91: 265-272.

- Casimiro, S., Coleman M., Hemingway J., Sharp B. (2006). Insecticide resistance in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* from Mozambique. *Journal of Medical Entomology*. 43 (2): 267-275.
- Casimiro S. L., Hemingway J., Sharp B. L., Coleman M. (2007). Monitoring the operational impact of insecticide usage for malaria control on *Anopheles funestus* from Mozambique. *Malaria Journal*, 6:142.
- Coats, J. R. (1990). Mechanisms of toxic action and structure- activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environ. Health. Perspect.* 87, 255-262.
- Coetzee, M., Hunt, R. H., Braack, L. E. O., Davidson, G. (1993). Distribution of mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex, including malaria vectors, south of latitude 15 graus S. *South African Journal of Science*, 89: 227-231.
- Coleman, M., Casimiro S., Hemingway J., Sharp B. (2008). Operational impact of DDT reintroduction for malaria control on *Anopheles arabiensis* in Mozambique. *J. Med. Entomol.* 45:885-890.
- Chandre, F., Manguin, S., Brengues, C., Dosou-yoyo, J., Darriet, F., Diabate, A., Carnevale, P. and Guillet, P. (1999). Current distribution of pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of Mopti form. *Parassitologia*, 41(1-3), pp. 319-322.
- Chandre F., Darriet F., Duchon S., Finot L., Manguin S., Carnevale P., Guillet P. (2000). Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 14:81-8.
- Charlwood JD, Kihonda J, Sama S, Billingsley PF, Heiz B & Takken W (1995). The rise and fall of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in a Tanzanian village. *Bulletin of Entomological Research* 85: 37-44.

- Coetzee M, Craig M, le Sueur D (2000). Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitology Today* 16: 74-77
- Collins F. H, Kamau L, Ranson H. A & Vulule J. M. (2000). Molecular entomology and prospects for malaria control. *Bulletin of the World Health Organization*, 78: 1412-1423
- Coluzzi M (1968). Cromosomi politenici delle cellule nutrici ovariche nel complesso gambiae del genere *Anopheles*. *Parassitologia*, 10: 179-183.
- Coluzzi M. (1984). Heterogeneities of the malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. *WHO Bulletin*. 63: 107-113.
- Constantini C, Sagon N. F, della Torre A, Coluzzi M (1999). Mosquito behavioural aspects of vector human interactions in the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia* 41: 209-217.
- Cuamba N. J. B. (2003). *The bionomics, population structure and roles in transmission of malaria vectors in Mozambique and Angola*. PhD Thesis, Faculty of medicine, The University of Liverpool.
- Cuamba N., Mendis C. (2009). The role of *Anopheles merus* in malaria transmission in an area of southern Mozambique. *Journal of vector borne diseases*. 46: 157-157.
- Cravo P. & Rosário V. E. (2002). Aspectos da genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos. *Boletim de Biotecnologia* 73: 2-8.
- Diabaté, A., Baldet, T., Chandre, F., Guiguemdé, R.T., Brengues, C., Guillet, P., Hemingway, J. and Hougard, J.M. (2002). First report of the kdr mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa. *Parassitologia* 44 (3-4), pp. 157-158.
- Dinham B. (2003). Growing vegetables in developing countries for local urban population and export markets: problems confronting small-scale producers. *Pest Manag Science*, 59:575-582.
- Dongus S., Nyika D., Kannady K., Mtasiwa D., Mshinda H., Gosoni L., Drescher A. W., Fillinger U., Tanner M., Killen G. F., Castro M. C. (2009). Urban agriculture and *Anopheles* habitats in Dar es Salaam, Tanzania. *Geospat Health*, 3: 189-210.

- Etang, J., Manga, L., Chandre, F., Guillet, P., Fondjo, E., Mimpfoundi, R., Toto, J.C. and Fontenille D. (2003). Insecticide susceptibility status of *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera: Culicidae) in the Republic of Cameroon. *Journal of Medical Entomology*, 40(4), pp. 491-497.
- Etang, J., Vicente, J.L., Nwane, P., Chouaibou, M., Morlais, I., Do Rosario, V.E., Simard, F., Awono-Ambene, P., Toto, J.C. and Pinto, J. (2009). Polymorphism of intron-1 in the voltage-gated sodium channel gene of *Anopheles gambiae* s.s. populations from Cameroon with emphasis on insecticide knockdown resistance mutations. *Molecular Ecology*, 18(14), pp. 3076-3086.
- Fernandez J. & Forattini O. P. (2003). Survival of *Aedes albopictus*: physiological age and reproductive history. *Revista de Saúde Pública* 37:285-91.
- Fukuto T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticide. *Environ Health Perspect.* 87:245-254.
- Gillies M. T. & De Meillon B. (1968). The Anophelinae of Africa South of the Sahara. *The South African Institute for Medical Research.* 54: 343
- Gillies M. T. & Coetzee M. (1987). A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara. *The South African Institute for Medical Research.* 55:143
- Hargreaves K., Koekemoer L. L., Brooke B. D., Hunt R. H., Mthembu J., Coetzee M. (2000). *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol*, 14: 181-189.
- Hemingway, J. (2000). The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 1009-1015.
- Hemingway, J., Ranson, H. (2000). Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 371-391.
- Hemingway J., Hawkes N. J., McCarroll L., Ranson H. (2004). The molecular basis of resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology* 18: 153-60.

- Holan, G. (1969). New halocyclopropane insecticides and the mode of action of DDT. *Nature* 221, 1025-1029.
- Hunt R. H., Coetzee M., Fettene M. (1998). The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 92: 231-235.
- INE. (2007). *Inquérito Demográfico e de Saúde- Moçambique*. Instituto Nacional de estatística/ Ministério da Saúde.
- INE. (2013). *Inquérito Demográfico e de Saúde- Moçambique*. Instituto Nacional de estatística/ Ministério da Saúde.
- Jones C. M., Toe H. K., Samou A., Namountougou M., Hughes A., Diabate A., Diabire R., Simard F., Ranson H. (2012) Additional selection for insecticide resistance in urban malaria vectors: DDT resistance in *Anopheles arabiensis* from Bobo - Dioulasso. Burkina Faso. *Plos One*, 7: e 45995.
- Kadous A. A., Ghiasuddin, S. M., Matsumura F. (1983). Difference in the picrotoxinin receptor between the cyclodiene-resistant and susceptible strains of the German cockroach. *Pest. Biochem. Physiol.* 19, 157-166.
- Kulkarni M. A., Rowland M., Alifrangis M., Mosha F. W., Matowo J., Robert Malima R., Peter J., Kweka E., Lyimo I., Magesa, S., Salanti A., Rau M.E., Drakeley C. (2006). Occurrence of the leucine-to-phenylalanine knockdown resistance (kdr) mutation in *Anopheles arabiensis* populations in Tanzania, detected by a simplified high-throughput SSOP-ELISA method. *Malaria Journal*.
- Lindsay SW, Parson L, Thomas CJ (1998). Mapping the ranges and relative abundance of the two principal African malaria vectors, *Anopheles gambiae* sensu stricto and *Anopheles arabiensis*, using climate data. *Proceedings of the Royal Society of London*. 265: 847-854.
- Macan J, Varnay VM, Turk R (2006). Health effects of pyrethrins and pyrethroids. *Arhiv za higijenu rada I toksikologiju* 57: 237-43
- Mabunda, S. J. A. (2006). *The Epidemiology and the burden of malaria in Mozambique*. PhD thesis, Faculty of Medicine, The University of Barcelona.

- Mathias, D.K., Ochomo, E., Francis Atieli, F., Ombok, M., Bayoh, M.N., George Olang, D., Muhia, D., Kamau, L., Vulule, J.M., Mary J Hamel, M.J., Hawley, W.A., Walker, E.D. and Gimnig, J.E. (2011). Spatial and temporal variation in the kdr allele L1014S in *Anopheles gambiae* s.s. and phenotypic variability in susceptibility to insecticides in Western Kenya. *Malaria Journal*, 10(10).
- Martin, T., Ochou, O. G., Vaissayre, M., Fournier, D. (2003). Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hubner) to triazophos in West Africa. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 9:883-887.
- Martinez- Torres D., Chandre F., Williamson M.S., Darriet fd., Berge J. B., Devonshire A. L., Guillet P., Pasteur N., Pauron D. (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol*, 7: 179-184.
- Mathenge E. M., Gimnig J. E., Kolczak M., Ombok M., Irungu L. W., Haeley W. A. (2001). Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behaviour, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. *Journal of Medical Entomology* 38: 531-536.
- Narashi, T. (1976). Nerve membrane as a target for pyrethroids. *Pesticide Science* 7: 267-272.
- Nkya T. E., Akhouayri I., Kisinza W., David J. P. (2013). Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect Biochem Mol Biol*, 43: 407-416.
- Oakeshott, J. G., Van Papenrecht E. A., Boyce T. M., Healy M. J., Russell R. J. (1993). Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica*. 90: 239-268.
- Ortelli, F., Rossiter, L. C., Vontas, J. (2003). Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide resistance locus, from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem Jour*, 373:957-963.
- Pereira, C.M. (1957). Sobre a possível mudança de comportamento de mosquitos vectores (*Anopheles funestus* e *Anopheles gambiae*) numa região de Lourenço Marques. *Separata dos Anais do Instituto de Medicina Tropical*, 14, 179-186..

Poupardin R., Riaz M. A., Jones C. M., Chandor-Proust A., Reynaud S., David J. P. (2012). Do Pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. *Aquatic Toxicol*, 114: 49-57.

Prapanthadara, L., Koottathep, S., Promtet, N. (1996). Purification and characterization of a major glutathione-S-transferase from the mosquito *Anopheles dirus*. *Insect Biochem Mol. Biol.*, 26, 277285.

PMI (2007). *Malaria Operational Plan President's Malaria Initiative*. Mozambique.

PNCM (2002). *Relatório de avaliação do desempenho do programa da malária*, Moçambique.

PNCM (2010). *Relatório de avaliação do desempenho do programa da malária*, Moçambique.

PNCM (2014). *Estratégia de Gestão Vectorial Integrada e Gestão de Resistência aos insecticidas para o Controlo do Vektor da Malária em Moçambique*.

Protopopoff N., Verhaeghen K., Van Bortel W., Roelants P., Marcotty T., Baza D., D' Alessandro U., Coosemans M. (2008). A significant increase in kdr in *Anopheles gambiae* is associated with an intensive vector control intervention in Burundi highlands. *Trop Med Int Health*, 13:1479-1487.

Ranson, H., Prapanthadara, L., Hemingway, J. (1997). Cloning and characterisation of two glutathione S-transferases from a DDT resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.*, 324, 97-102.

Ranson, H., Collins, F. H., Hemingway, J. (1998). The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the *Anopheles gambiae* class I glutathione S-transferase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14284-14289.

Ranson H., Abdallah H., Badolo A., Guelbeogo W. M., Keraf- Hinzoumbe C., Yangalbe-Kalnone E., Sagnon N. F., Simard F., Coetzee M. (2009). Insecticide resistance in *Anopheles gambiae*: data from the first year of a multi-country study highlight the extent of the problem. *Malaria Journal*, 8: 299.

- Ranson H., Jensen B., Vulule J. M., Wang X., Hemingway J., Collins F. H. (2000). Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol*, 9:491-497.
- Riaz M. A., Poupardin R., Reynaud S., Strode C., Ranson H., David J. P. (2009). Impact of glyphosate and benzo a pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquatic Toxicol*, 93:61-69.
- Richards O. W. & Davies R. G. (1977). Imm's general book of entomology II.
- Scott J. A., Brogdon W. G., Collins F. H. (1993). Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical*.
- Santolamazza, F., Calzetta, M., Etang, J., Barrese, E., Dia, I., Caccone, A., Donnelly, M. J., Petrarca, V., Simard, F., Pinto, J. and della Torre, A., 2008. Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malaria Journal, Medicine and Hygiene*, 49:520-529.
- Service M. W. (1980). A Guide to Medical Entomology. *The McMillan Inst. College* (1st Ed). London.
- Service M. W. & Townson H (2002). The Anopheles vector In Warrel D. A & Gilles H. M. *Essential Malariology*. (4 th Ed), London: 59-84
- Schwalbach, J. & Maza, M. (1985). *A máalaria em Moçambique (1937-73)*. Ministério da Saúde. Maputo, Moçambique.
- Sibindy, S., & Cuamba N. (2010). *Monitorização de resistência dos vectores de malária aos insecticidas em Moçambique*. INS/MISAU. Relatório não publicado.
- Soderlund, D.M. (1997). Molecular mechanisms of insecticide resistance. In Sjut, V., Volume 13 (1997). *Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals*. Berlin: Springer. pp. 21-56.

Soderlund, D.M. & Knipple, D.C. (1999). Knockdown resistance to DDT and pyrethroids in the house fly (Diptera: Muscidae): from genetic trait to molecular mechanism. *Annals of the Entomological Society of America*, 92(6), 909-915.

Soeiro, A. (1956). A malária em Moçambique, com especial referência a campanha antimalárica numa região predominantemente urbana (Lourenço Marques) e uma região predominantemente rural (Vale de Limpopo). *Anais do Instituto de Investigação de Medicina Tropical*, 13:615-634.

Soeiro, A., Pereira, M., Pereira, A. (1956). A luta antimalárica em Lourenço Marques. *Anais do Instituto de Investigação de Medicina Tropical*, 13: 635-669.

Soeiro, A. (1959). Resultados da campanha antimalárica na região de Lourenço Marques após 6 anos de utilização de um insecticida de efeito residual (B.H.C.) com especial referência ao seu efeito sobre os vários sectores da população de Lourenço Marques. *Proc. 6th Int. Congr. Trop. Med. and Malar.* 7: 264-280.

Weill, M., Chandre, F., Brengues, Manguin, S., Akogbeto, Pasteur, M.N., Guillet, P. and Raymond, M. (2000). The kdr mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s. s. through introgression. *Insect Molecular Biology*, 9(5), pp. 451-455.

Wood O. R., Hnrahan S., Coetze M., Koekemoer L. L., Brooke D. B. (2010). Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasit Vector*, 3:67.

White G. B. & Rosen P. (1973). Comparative studies on sibling species of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera, Culicidae). Ecology of species A and B in savanna around Kaduna, Nigeria, during transition from wet to dry season. *Bulletin of entomological research* 62:613-625.

White G. B. (1974). *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 68 : 278-301.

WHO. (1963). *Résistance aux insecticides et lutte contre les vecteurs. Treizième rapport du comité OMS d'experts des insecticides*, Genève:OMS, Séries de Rapports Techniques 265.

WHO. (1970). *Insecticide Resistance and vector control. Seventh Report of the WHO Expert Committee on Insecticides*. Technical Report Series 443. WHO. Geneva.

WHO. (1998). *Tests Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, BioEfficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surfaces*. Report of the WHO Informal Consultation. Geneva.

WHO. (2005). World Malaria Report. WHO, Geneva.

WHO. (2006). WHO gives indoor use of DDT a clean bill of health for controlling malaria.

WHO. (2011). World Malaria Report. WHO Geneva.

WHO. (2013): World Malaria Report. WHO Geneva.

Yawson, A.E., McCall, P.J., Wilson, M.D. and Donnelly, M.J. (2004). Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. *Medical and Veterinary entomology*, 18(4), pp. 372-377.

ANEXOS

Tabela 2: Resultados da análise da elevada Esterase não específica.

Insecticida	Número de mosquitos	Número de mosquitos
Deltametrina	3	0.5
	7	0.7
	16	0.9
	3	1.0
	1	1.1
Permetrina	3	0.4
	3	0.5
	5	0.6
	3	0.7
	7	0.8
	6	0.9
	1	1.0
	1	1.1
	1	1.2
Lambdacialotrina	1	0.7
	11	0.8
	14	0.9
	3	1.0
	1	1.1

Tabela 3: Resultados da análise de Oxidase

Insecticida	Número de mosquitos	Absorvância a 620 nm
Deltametrina	4	0
	18	0.1
	6	0.2
	2	0.3
Permetrina	3	0
	6	0.05
	3	0.06
	8	0.07
	8	0.1
	2	0.2
Labdacialotrina	12	0.05
	10	0.06
	6	0.07
	2	0.08