

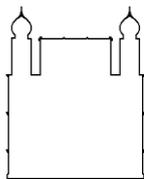
Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Diversidade do gene de canal de sódio regulado por voltagem de *Aedes aegypti*  
Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) e resistência a piretróide**

Ademir de Jesus Martins Junior

Orientadores: Dra Denise Valle (IOC/ LAFICAVE) e Dr Alexandre Afrânio Peixoto (IOC/ LBMI)

Rio de Janeiro, junho de 2009



Ministério da Saúde  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Instituto Oswaldo Cruz  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Diversidade do gene de canal de sódio regulado por voltagem de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762**

**(Diptera: Culicidae) e resistência a piretróide**

Ademir de Jesus Martins Junior

**Tese de doutorado apresentada como requisito à obtenção do título de Doutor em Biologia Parasitária, com área de concentração em Variabilidade Genética de Parasita, Vetores e Hospedeiros.**

Orientadores: **Dra Denise Valle** (IOC/ Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores) e **Dr Alexandre Afrânio Peixoto** (IOC/ Laboratório de Biologia Molecular de Insetos)

Rio de Janeiro, junho de 2009

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

M386

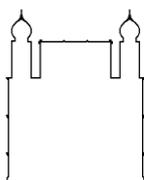
Martins Junior, Ademir de Jesus.

Diversidade do gene de canal de sódio regulado por voltagem de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Díptera: Culicidae) e resistência a piretróide / Ademir de Jesus Martins Junior. – Rio de Janeiro, 2009. x, 120 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2009.  
Bibliografia: f. 116-130

1. *Aedes aegypti*. 2. Resistência a piretróide. 3. Canal de sódio. 4. Knockdown resistance. 5. Duplicação gênica. I. Título.

CDD 616.921



Ministério da Saúde

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**Diversidade do gene de canal de sódio regulado por voltagem de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762**

**(Diptera: Culicidae) e resistência a piretróide**

Tese submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção de grau em Doutor em Biologia Parasitária, **Variabilidade Genética de Parasita, Vetores e Hospedeiros.**

Banca Examinadora

**Dr Ricardo Lourenço de Oliveira – Presidente da banca examinadora**

FIOCRUZ/ Instituto Oswaldo Cruz/ Laboratório de Transmissores de Hematozoários

**Dr Fernando Ariel Genta – Revisor do texto**

FIOCRUZ/ Instituto Oswaldo Cruz/ Laboratório de Bioquímica de Insetos

**Dr Ricardo Iglesias Rios**

UFRJ/ Instituto de Biologia/ Departamento de Ecologia

**Dr Marcos Henrique Ferreira Sorgine**

UFRJ/ Instituto de Bioquímica Médica

**Dra Ima Aparecida Braga**

Ministério da Saúde/ Secretaria de Vigilância em Saúde

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores e no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz. Grande parte das atividades foi realizada no Laboratório de Entomologia do Instituto de Biologia do Exército, que alberga a maior parte das instalações físicas do Laficave.



Foram utilizados recursos da Fundação Oswaldo Cruz, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Howard Hughes Medical Institute – HHMI, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ e Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS.

*“Na história da humanidade (e dos animais também) aqueles que aprenderam a colaborar e improvisar foram os que prevaleceram”*

*Charles Darwin (1809 – 1882)*

À Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio,  
quem me despertou o amor e o respeito pela Ciência.

## Agradecimentos

Tenho a satisfação de entregar este trabalho à sociedade brasileira, que desde o ensino médio vem financiando meus estudos e, mais recentemente, apostando nos objetivos de minhas pesquisas para o desenvolvimento científico e sanitário do nosso país. Agradeço, portanto, ao Estado brasileiro pelas oportunidades oferecidas, por meio de suas instituições e agências de fomento.

A Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto Oswaldo Cruz pelo apoio institucional e ao Instituto de Biologia do Exército pela parceria com o Laficave, com disponibilidade verdadeira e compromisso concreto com nosso grupo de pesquisa. Este trabalho também não teria sido possível sem o apoio da Secretaria de Vigilância em Saúde, que nos concedeu suas amostras, promoveu uma série de reuniões técnicas sobre a questão da resistência e nos apoiou na participação de eventos e em publicação de materiais científicos.

A minha orientadora e amiga Dra Denise Valle, que desde minha época da escola vem investindo na minha formação e me preparando com grandes desafios. Sob sua orientação, mais do que conhecimento em Biologia, venho desenvolvendo meu senso de coletividade e de visão além de meus interesses pessoais sobre o trabalho que realizamos. Temos uma relação tão intensa, que parece até que somos da mesma família. Por isso, às vezes até discutimos. Mas logo tudo se resolve, porque me lembro que Denise é do bem, e que ela é também meu norte de determinação, disposição e caráter. Atualmente, além de orientadora e grande amiga é também minha chefe imediata, a quem espero retribuir à altura toda confiança que me tem sido concedida.

Ao meu amigo e orientador Dr Alex Peixoto, uma pessoa de raciocínio rápido e genial, que é também uma das pessoas mais humildes, criativas e divertidas que eu já conheci. É admirável a forma como Alex consegue se depurar instantaneamente os projetos de seus vários alunos, ao mesmo tempo. Sua experiência na bancada, sua forte conexão com a literatura e sua sagacidade permitem que nossas dúvidas recebam dele sempre uma saída, no mínimo, interessante. Espero que algum dia, apesar de minha mente convoluta, eu tenha condições de alcançar seu raciocínio sem precisar fazer tanto esforço. Espero também que você permita que eu possa estar sempre em seu laboratório, produzindo conhecimento e aprendendo com as pessoas geniais de sua equipe.

Dois orientadores assinam esta tese. No entanto, tive a oportunidade de contar direta e ativamente com a experiência de outras pessoas. Uma dessas é o Dr José Bento, que junto com a Denise, me adotou quase que como filho em seu laboratório. Bento, como é internacionalmente conhecido, é uma das maiores autoridades em Culicidologia, sendo que maior parte de seu aprendizado foi adquirido no campo e literalmente na pele. Com seu jeito calmo, sereno e preciso, tem disponibilidade para ensinar e divulgar suas experiências de forma eficiente. É também graças ao Bento que tenho a honra de ser hoje um servidor da

FIOCRUZ, pois além de ter me ensinado tudo que sei sobre mosquitos, é também responsável pelos itens mais importantes do meu curriculum. Jutta Linss é outra pesquisadora fundamental a este trabalho. Com ela tive suporte a todas as metodologias de Biomol que aqui utilizamos. É uma das pessoas com quem todos gostariam de trabalhar ao lado, por ser extremamente organizada, precisa, direta e gentil. Bento e Jutta são também meus grandes exemplos e meus fraternos amigos.

Aos Drs Isabella Montella, Gustavo Rezande, Marcia Adegas, pesquisadores do Laficave que impulsionam a discussão científica no laboratório. Gustavo, graças a sua inteligência e determinação ressuscitou uma das linhas de pesquisa do laboratório tão bela e interessante e hoje impulsiona nossas publicações a um patamar de alto nível acadêmico. Isabela, extremamente disciplinada e inteligente, vem conseguindo organizar uma quantidade enorme de resultados na tentativa de interpretar a caixa preta, que são os mecanismos de resistência em *Aedes*. Marcia projetou as condições ideais de trabalho nos insetários do laboratório, obedecendo às normas de biossegurança, atreladas às necessidades de criação dos insetos e às atividades dos usuários. Estes três gigantes foram fundamentais à realização deste trabalho, tanto no suporte aos experimentos, como no enriquecimento da interpretação e discussão dos resultados.

Aos alunos Thiago Belinato, Camila Dutra e Luiz Paulo Brito, que me permitiram o desafio de co-orientar seus projetos de pesquisa, contribuindo imensamente para minha formação na prática enquanto pesquisador e em meu amadurecimento intelectual. Com Thiago, investigamos o efeito de inseticidas alternativos, em sua iniciação científica e no mestrado. Camila, em seu mestrado, estudou os efeitos da resistência no fitness do vetor, ou seja, trabalhou diretamente em um dos objetivos desta tese. Luiz Paulo é atualmente um dos meus braços na bancada e meu modelo de estudo experimental na formação científica de um aluno. O trabalho destes três foi indispensável à realização desta tese.

Aos demais alunos e pesquisadores do Laficave: Priscila, Luana, Nathalia, e aos tantos do LBMI: Antônio, Camila, Carla, Felipe, Gabriel, Gustavo, João, Kiko, Luiza, Paulo, Rafaela, Raquel, Renata, Ricardo, Samira, Tamara, *et al.*, que estiveram sempre dispostos a ajudar, além de tornarem o ambiente produtivo e agradável. Gratidão especial devo à Rachel Lins, que me apresentou as condições de trabalho no LBMI e com quem realizamos nossas primeiras explorações no até então desconhecido gene de canal de sódio de *Aedes*.

A toda equipe técnica de ambos os laboratórios, que muito contribuíram no suporte aos diversos experimentos. Devo citar Priscila Fernandes e Diogo Bellinato (Laficave) que tiveram participação direta na execução de vários experimentos aqui apresentados. Na manutenção das colônias de insetos: Tânia, Eliane, Gilberto, Edna, Luciana, Adriana, Henrique (Laficave); e no suporte aos ensaios moleculares e à manutenção do bom astral do ambiente: Robson (LBMI). Não menos imprescindível foi o apoio administrativo que muito contribuiu no desenlace de uma série de questões burocráticas e do dia-a-dia, representados por Rosi,

Údula, Luciana e, mais recentemente, Mariana, no IBEx e Ester e Ângela no campus da FIOCRUZ. No LBMI, pude sempre contar com o apoio da Lurdinha.

Ao Dr Fernando Ariel Genta, que revisou minuciosamente esta tese e me deu uma verdadeira aula a cada tópico discutido. Sem dúvida, suas colocações foram muito relevantes à apresentação de nosso trabalho. Espero que possamos colaborar em muitos projetos no futuro.

A Saori que é também aluna do LBMI e que contribuiu muito, principalmente, no procedimento das etapas de sequenciamento e análise de sequências. Desde que começamos a compartilhar a mesma casa, tenho tido o privilégio de sua amizade acolhedora, seu carinho e seu zelo em fazer do ambiente um espaço harmonioso.

Deixei por último a consideração mais importante. A realização não apenas desta tese, mas de qualquer projeto acadêmico que participei, não teria sido possível sem a prática do que me foi orientado pela minha mãe, Nilda, e meu pai, Ademir. Essas duas pessoas grandiosas me ensinaram através de atitudes a importância da honestidade e do trabalho. Além disso, estive sempre cercado pela proteção infalível dos meus irmãos, sempre disponíveis a qualquer momento, para qualquer causa que me favorecesse. Portanto, chegar até aqui é motivo de muita satisfação não somente pessoal, mas principalmente para esta torcida incansável, que me nutre e me ilumina. Muito obrigado e, por favor, estejam sempre ao meu lado, sendo exatamente quem vocês tem sido.

Hoje sirvo ao meu país em uma das maiores instituições de pesquisa do mundo. Tive orientadores brilhantes enquanto pesquisadores e íntegros enquanto pessoas, que me encheram de grandes desafios. Tenho uma família que me apóia em tudo, porque confia nos meus propósitos. Tenho amigos que contribuem com minha alegria constante. Sei que ainda sou muito novo e espero que tenha muito tempo a viver. Por isso tenho muitos projetos baseados no meu trabalho e nos meus sonhos. Entre os muitos já realizados, a conclusão deste trabalho é um dos principais. Agradeço a todos que participaram desta realização.

## Índice

<b>RESUMO</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTA DAS PRINCIPAIS SIGLAS E ABREVIATURAS UTILIZADAS</b> .....	<b>4</b>
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>5</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
1.1.    O Aedes Aegypti e suas arboviroses de importância sanitária .....	7
1.1.1.    Ciclo de vida.....	7
1.1.2.    Distribuição geográfica do Aedes.....	8
1.1.3.    Arboviroses que transmite no Brasil.....	10
1.2.    USO DE INSETICIDAS NO COMBATE AO Aedes Aegypti no Brasil .....	13
1.2.1.    DDT, piretróides e organofosforados .....	14
1.3.    RESISTÊNCIA A INSETICIDAS.....	16
1.4.    CANAL DE SÓDIO REGULADO POR VOLTAGEM: A MOLÉCULA-ALVO DE PIRETRÓIDES E DDT .....	19
1.5.    ESTRUTURA, FUNÇÃO E EVOLUÇÃO DO CANAL DE SÓDIO NOS INVERTEBRADOS .....	20
1.6.    DIVERSIDADE DO CANAL DE SÓDIO.....	26
1.6.1.    Splicing alternativo no gene Nav .....	27
1.6.2.    Edição de RNA no gene de canal de sódio regulado por voltagem .....	29
1.7.    MUTAÇÕES NO CANAL DE SÓDIO E RESISTÊNCIA A PIRETRÓIDE.....	31
1.8.    JUSTIFICATIVA.....	34
<b>2 – OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3 – RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 – VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL POLYMORPHISM AND METABOLIC RESISTANCE IN PYRETHROID-RESISTANT Aedes Aegypti FROM BRAZIL .....	36
3.2 – FREQUENCY OF VAL1016ILE MUTATION IN THE VOLTAGE GATED SODIUM CHANNEL GENE OF Aedes Aegypti BRAZILIAN POPULATIONS .....	45
3.4 – EFFECT OF PYRETHROID SELECTION UNDER LABORATORY CONDITIONS OF A NATURAL Aedes Aegypti POPULATION ON DEVELOPMENT, LONGEVITY AND REPRODUCTION .....	69
<b>4 - DISCUSSÃO</b> .....	<b>96</b>
4.1 - MUTAÇÃO KDR EM Ae. Aegypti e seu diagnóstico molecular.....	96
4.2 – DUPLICAÇÃO GÊNICA E SEUS POSSÍVEIS EFEITOS NA RESISTÊNCIA E EM OUTROS PARÂMETROS ADAPTATIVOS.....	100
<b>5 - CONCLUSÕES</b> .....	<b>105</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO)</b> .....	<b>106</b>
<b>APÊNDICE 1</b> .....	<b>117</b>
ALGUMAS CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS SOBRE OS EXPERIMENTOS DE PRESSÃO DE SELEÇÃO EM LABORATÓRIO .....	117
<b>APÊNDICE 2</b> .....	<b>119</b>
ÍNDICE DE SELEÇÃO A FAVOR DO ALELO MUTANTE 1016 ILE.....	119
<b>APÊNDICE 3</b> .....	<b>120</b>
PUBLICAÇÕES DURANTE A VIGÊNCIA DO DOUTORADO NÃO DIRETAMENTE RELACIONADAS AO OBJETIVO PRINCIPAL DA TESE .....	120

## Resumo

No Brasil o controle das formas aladas do vetor de dengue, o mosquito *Aedes aegypti*, é feito com inseticidas da classe dos piretróides. Porém, apesar da recente utilização deste composto em escala nacional, várias populações do vetor já estão resistentes. O canal de sódio regulado por voltagem, no sistema nervoso do inseto, é a molécula-alvo de piretróides. Investigamos, em populações brasileiras de *Ae. aegypti*, a diversidade molecular em uma região deste gene (*AaNa<sub>v</sub>*) com o objetivo de identificar potenciais alterações relacionadas à resistência. Clonagem e sequenciamento da região genômica entre os exons 20 e 21 do *AaNa<sub>v</sub>* de indivíduos de cinco localidades distintas, confirmaram polimorfismo no íntron e em dois sítios do exon 20 que geram substituições sinônimas. De acordo com estas características, as sequências foram agrupadas em tipos A ou B. Observamos ainda mutações causando substituições de aminoácidos: Ile → Met no sítio 1011 e Val → Ile no sítio 1016, somente em sequências do tipo A. Indivíduos da cepa Rockefeller, referência de susceptibilidade, apresentaram apenas sequências do tipo B e os alelos selvagens nas duas posições, 1011 ou 1016. Tipagem molecular por PCR alelo-específica em indivíduos de 15 localidades revelou que a mutação Ile1011Met está disseminada por todo país, diferentemente da Val1016Ile, concentrada nas regiões mais ao centro. Nas cinco localidades onde os indivíduos avaliados foram divididos em resistentes e susceptíveis, o alelo mutante 1016Ile esteve significativamente mais presente nos resistentes, principalmente quando em homozigose, indicando o caráter recessivo da mutação para a resistência. Surpreendentemente, uma série de observações sugeriu a ocorrência de polimorfismo envolvendo uma duplicação gênica, de forma que o haplótipo duplicado estaria constituído de uma sequência do tipo B ligada à outra do tipo A com a mutação 1011Met. Corroborou esta hipótese a tipagem do sítio 1011 na prole de cruzamentos com genótipos determinados. Finalmente, comparação entre linhagens mantidas na presença ou na ausência de pressão de seleção com piretróide, em laboratório, sugeriu efeitos pleiotrópicos negativos da resistência em aspectos do desenvolvimento e da reprodução destes mosquitos.

### Abstract

In Brazil, control of adults of the dengue vector, the mosquito *Aedes aegypti*, is performed with pyrethroid insecticides. However, despite the recent implementation of this compound in national scale, several populations of this vector are already resistant. The voltage gated sodium channel is the pyrethroid target site, in the insect nervous system. We investigated the molecular diversity of a particular region of this gene (*AaNav*) in *Ae. aegypti* Brazilian populations in order to identify potential substitutions implicated with insecticide resistance. Cloning and sequencing of the genome region between the *AaNav* exons 20 and 21 in individuals from five distinct localities, confirmed polymorphism in the intron and in two positions of exon 20, these latter related to synonymous substitutions. According to these characteristics sequences were grouped into types A or B. Two additional predictive substitutions were noted: Ile → Met and Val → Ile, respectively, in 1011 and 1016 sites, both only in type A sequences. Individuals from the Rockefeller insecticide susceptible reference strain exhibited only type B sequences and the wild alleles on both 1011 and 1016 positions. Allele-specific PCR molecular typing of individuals from 15 localities showed that the Ile1011Met mutation is widespread throughout Brazil, whereas Val1016Ile is more prominent toward the middle of the country. In five localities typing was performed separately in susceptible or resistant individuals; the mutant 1016Ile allele was significantly more present in the resistant ones, especially in homozygosity, suggesting the recessive character of this resistant mutation. Surprisingly, a series of observations suggested the occurrence of a gene duplication consisting of both type B and A sequences this last one with the 1011Met mutation. Typing of the 1011 site in the offspring of couples with specific genotypes corroborated this hypothesis. Finally, comparisons among lineages selected or not with pyrethroid suggested negative pleiotropic effects of resistance on development and reproduction aspects.

### Lista das principais siglas e abreviaturas utilizadas

- 1011Ile – alelo selvagem do sítio 1011
- 1011Met – alelo mutante do sítio 1011
- 1016Ile – alelo mutante do sítio 1016
- 1016Val – alelo selvagem do sítio 1016
- AaNa<sub>v</sub>* – gene do canal de sódio regulado por voltagem de *Aedes aegypti*
- ace* – gene da enzima Acetilcolinesterase
- DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano, inseticida organoclorado
- GST – enzima Glutathione S-transferase
- Ile1011Met – substituição de uma Isoleucina por uma metionina no sítio 1011
- Leu1014Phe – substituição de uma leucina por uma fenilalanina (clássica mutação *ldr*) no sítio 1014
- MoReNAa - Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas
- Na<sub>v</sub>* – canal de sódio regulado por voltagem
- Na<sub>v</sub>* – gene do canal de sódio regulado por voltagem
- OFM – Oxidase de função mista (ou Monooxigenase P450)
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- OP – organofosforado (classe de inseticida)
- PNCD – Programa Nacional do Controle de Dengue
- Rock – Rockefeller, cepa referência de *Aedes aegypti*
- SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde
- Val1016Ile – substituição de uma Valina por uma isoleucina no sítio 1016

## Apresentação

A investigação de alterações no gene que codifica o canal de sódio regulado por voltagem em *Aedes aegypti* (*AaNav*) iniciou-se em nosso grupo em 2003, na tentativa de explorar sua diversidade em populações brasileiras do vetor. Naquela época estava bem estabelecido que uma única mutação pontual, a Leu1014Phe, estava diretamente relacionada com a resistência a piretróide e DDT em vários insetos, incluindo mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Culex*. Paralelamente, desenvolviam-se várias alternativas de diagnóstico molecular em larga escala, baseadas em PCR alelo-específica. Nossos objetivos iniciais, que já nortearam, inclusive, o desenvolvimento de dissertação de Mestrado (também pelo PPGBP/ IOC/ FIOCRUZ), eram principalmente a busca daquela mutação e o desenvolvimento de diagnóstico em larga escala para identificá-la em populações brasileiras de *Ae. aegypti*. Este objetivo se somava às expectativas do Laficave no entendimento dos mecanismos de resistência do vetor aos inseticidas. Ia também ao encontro das linhas de pesquisa do LBMI, no estudo de genética de populações de insetos vetores.

Avaliamos então a diversidade de uma região do gene *AaNav* de populações do Nordeste e Sudeste do país, por clonagem e sequenciamento. Observamos polimorfismo nas sequências, muito bem destacado na região do íntron entre os exons 20 e 21 do gene, onde se localiza a posição 1014. De acordo com esta diversidade, classificamos as sequências em dois grupos de haplótipos, "A" ou "B". Não observamos a mutação Leu1014Phe, mas uma outra, a Ile1011Met. Destacamos que indivíduos da cepa controle de susceptibilidade, Rockefeller, apresentam apenas sequências do haplótipo B, no qual também se classifica a sequência disposta no projeto genoma de *Ae. aegypti*. Por outro lado, todas as sequências com a mutação Ile1011Met eram do grupo A. Ao analisarmos um número maior de indivíduos de duas localidades, Natal (RN) e Nova Iguaçu (RJ), observamos, também por sequenciamento, que a frequência dos diferentes haplótipos não diferia entre estas duas regiões. No entanto, ao compararmos estas frequências entre indivíduos de Natal resistentes e susceptíveis a piretróides, observamos que os resistentes apresentaram maior frequência de sequências com a mutação Ile1011Met e, inesperadamente, de sequências do tipo B. Adicionalmente, avaliamos a atividade das enzimas envolvidas com a resistência metabólica nas populações estudadas.

Nossa perspectiva era conhecer melhor a diversidade do gene *AaNav*, estudando um número maior de populações naturais e, através de pressão de seleção com piretróide no laboratório, avaliar a dinâmica das frequências de seus haplótipos ao longo das gerações. Iniciaríamos ainda investigação sobre o modelo de herança dos haplótipos do canal de sódio de *Aedes aegypti* nas populações aqui avaliadas. Os resultados observados sugeriam fortemente a existência de uma duplicação do gene que codifica o canal sódio.

O documento está organizado com uma introdução geral seguida da seção Resultados, dividida em cinco seções. A seção 3.1 apresenta um artigo com aqueles resultados do mestrado, complementados com resultados obtidos no doutorado, onde foi explorada a diversidade de sequências da região compreendendo os exons 20 e 21 do *AaNav* em populações naturais, além da avaliação de alterações na atividade de enzimas relacionadas à resistência. O artigo da seção 3.2 trata da relação entre resistência a

piretróide e uma outra mutação, a Val1016Ile, no exon 21 do *AaNav*, através da genotipagem deste sítio em 16 populações naturais brasileiras. Segue o terceiro artigo, seção 3.3, onde sugerimos a existência de duplicação gênica no *AaNav*, suscitada pela frequência das classes genotípicas de populações naturais, somada à análise de sequenciamento de indivíduos destas populações. Esta hipótese foi testada a partir de cruzamentos entre determinados genótipos. Os resultados da pressão de seleção em laboratório são apresentados no quarto artigo, seção 3.4, que discute a influência da resistência a inseticida sobre o *fitness* de populações mantidas sob pressão. Parte deste artigo foi tema de outra dissertação de mestrado de nosso grupo, co-orientada informalmente durante este doutorado. Concluindo, seguem-se as discussões gerais sobre o assunto da tese e as considerações finais. Alguns resultados que ainda não foram contemplados nos artigos, mas que são importantes para a discussão dos resultados aqui apresentados, estão presentes nos apêndices 1 e 2. Uma listagem com os trabalhos publicados durante a vigência do doutorado, mas não diretamente relacionado aos objetivos gerais desta tese está apresentada no apêndice 3.

## 1 – Introdução

### 1.1. O *Aedes aegypti* e suas arboviroses de importância sanitária

Os mosquitos do gênero *Aedes* são taxonomicamente classificados na ordem Diptera, família Culicidae, tribo Aedini. O gênero compreende mais de 900 espécies, distribuídas em 44 subgêneros, dos quais apenas nove foram encontrados nas Américas. As espécies *Aedes aegypti* (Linnaeus) e *Aedes albopictus* (Skuse) pertencem ao subgênero *Stegomyia*, que compreende principalmente espécies afrotropicais, paleárticas e orientais. A chegada destas espécies às Américas, hoje parte da fauna culicídica neotropical, se deu passivamente com o desenvolvimento do sistema de transporte humano (Forattini 2002).

#### 1.1.1. Ciclo de vida

Os mosquitos são holometábolos, ou seja, sofrem metamorfose completa durante o desenvolvimento. Apresentam quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. Ao eclodir do ovo, a larva atravessa três ecdises larvais (caracterizando os estádios larvais L1-L4) antes de se tornar uma pupa. Nestes estágios ocupam ecótopo aquático; os adultos passam a ocupar o ecótopo terrestre, uma vez que se tornam alados. Deste modo, os mosquitos podem ser classificados como animais fundamentalmente aquáticos, uma vez que é neste *habitat* que passam a maior parte da vida vegetativa. A postura de seus ovos também está sempre associada a ambientes úmidos ou alagados (Forattini 2002).

Os adultos se alimentam de seiva vegetal e as fêmeas também se alimentam de sangue, que é fundamental para a produção de seus ovos. As fêmeas de *Ae. aegypti* são bastante antropofílicas e realizam a hematofagia preferencialmente durante o dia (Scott et al. 1993). Passados cerca de três dias (Canyon et al. 1999a,b), as fêmeas fazem sucessivos movimentos exploratórios e espalham seus ovos, depositando pequenos grupos em diferentes locais, em posturas isoladas, também referidas como “oviposição aos saltos” (Chadee & Corbet 1993). Em média, uma fêmea produz 120 ovos em um ciclo gonotrófico, embora esta espécie não apresente concordância gonotrófica, ou seja, cada oviposição não é necessariamente precedida de um único repasto sanguíneo (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). A oviposição geralmente não é feita na superfície da água, mas em margens úmidas de potenciais reservatórios para as larvas, sujeitos a futuros alagamentos. Entretanto, como os ovos são bastante resistentes à dessecação, numerosas posturas podem ser feitas em áreas amplas do terreno sem que estes tenham, de imediato, condições para albergar os criadouros (Forattini 2002).

O embrião do *Ae. aegypti* leva em média 77,5 horas para se desenvolver completamente, sob temperatura constante de 25°C (Farnesi et al. 2009) mas, após este período, pode entrar em diapausa, permanecendo viável por até 450 dias (Leite 1942 *apud* Franco 1976). Este processo é possível graças à resistência à dessecação proporcionada pela casca dos ovos e por uma estrutura quitinosa, a cutícula serosa, disposta na interface entre o embrião e o ovo (Rezende et al. 2008). As formas aquáticas são bastante resistentes às adversidades do meio, sendo dotadas de grande mobilidade, locomovendo-se inclusive sobre substratos apenas úmidos. O acesso ao oxigênio atmosférico é feito através do sifão respiratório, um apêndice do oitavo segmento abdominal, em cuja extremidade apical abrem-se os

espiráculos. A larva pode respirar com o corpo pendurado para dentro da água, ao colocar a extremidade sifonal em contato com a superfície da água. A alimentação envolve a coleta ativa de microorganismos e detritos orgânicos livres, a raspagem de partículas firmemente aderidas a superfícies e ainda a roedura de fragmentos de tecido vegetal e de invertebrados mortos. Já as pupas não se alimentam (Forattini 2002). É na fase aquática que o controle pelo uso de inseticidas tem maior potencial de sucesso, já que a espécie se cria em reservatórios antrópicos.

A dispersão ativa do vetor varia em função da localidade, das condições climáticas e da disponibilidade de sítios de postura. No Rio de Janeiro, por exemplo, experimentos de marcação e recaptura mostraram que fêmeas atingiram no máximo 363 m em regiões de favela, onde há muita oferta de criadouros (Maciel de Freitas et al. 2007) a até pelo menos 800 m em áreas onde esta oferta era escassa (Honorio et al. 2003). Com o acúmulo de água das chuvas, facilmente são formados ambientes propícios à oviposição, à eclosão dos ovos e ao desenvolvimento das formas aquáticas. Deste modo, o acúmulo de ovos em determinado local e a subsequente eclosão simultânea das larvas, estimulada pela inundação dos criadouros, resulta no aparecimento também simultâneo, ou quase, de grande número de adultos (Forattini 2002).

#### 1.1.2. Distribuição geográfica do *Aedes*

O *Ae. aegypti* é natural da região afrotropical, tratando-se de mosquito classicamente tropical e subtropical, presente entre os paralelos 45° de latitude norte e 40° de latitude sul. Esta distribuição biogeográfica faz com que seja quase cosmopolita, resultado da dispersão por meios de transporte humanos. Mattingly (1957) descreveu algumas formas do que Forattini (2002) chamou de Complexo *Aegypti*. A forma típica corresponderia ao *Ae. aegypti aegypti* associado ao ambiente antrópico e com grau elevado de domiciliação; em um outro extremo estaria o *Ae. aegypti formosus*, silvático, até então confinado à região sub-Saariana. Intermediário a estas estaria o *Ae. aegypti queenslandensis*, inicialmente encontrado no norte da Austrália. Tais formas foram inicialmente sugeridas devido à presença de polimorfismo na coloração dos adultos (Mattingly 1957). Nas Américas, não existem evidências claras que suportem a presença de morfotipos diferenciados de *Ae. aegypti*.

As populações de *Ae. aegypti* mais susceptíveis a infecções experimentais com o vírus dengue sorotipo 2 (DENV-2) são aquelas encontradas na América do Sul, no Sudeste Asiático e em regiões do sul do Pacífico, ou seja, onde são encontradas as formas domésticas do vetor (Vazeille et al. 2001, 2003). As formas nativas da espécie (*Ae. aegypti formosus*) apresentam baixa susceptibilidade à infecção experimental (Failloux et al. 2002). Além disso, o *Ae. aegypti* urbano é infectivo somente ao produzir uma carga viral acentuada. Desta forma, foi sugerido que estes mosquitos somente tenham, portanto, selecionado cepas do vírus que produzem alta carga viral em humanos. Por exemplo, na Polinésia francesa, esta espécie, quando comparada a outras simpátricas (como *Ae. albopictus* e *Aedes polynesiensis*), requer um título maior de vírus para se tornar infectiva (Rodhain & Rosen 1997).

Vários trabalhos demonstram que a dispersão do vírus da dengue depende da estrutura genética da população do vetor e de sua dinâmica no espaço e no tempo (Vazeille et al. 2001, Lourenco-de-Oliveira et al. 2003, Paupy et al. 2003). No Brasil, as populações de *Ae. aegypti* são bastante heterogêneas, e muitas são localmente estruturadas, em maior grau que as outras já analisadas (Lourenco-de-Oliveira et al. 2002, Ayres et al. 2003, Fraga et al. 2003, Santos et al. 2003). Medidas de controle do vetor provavelmente estão, ao longo do tempo, interrompendo o fluxo gênico entre populações locais, o que também se reflete na alta heterogeneidade verificada na susceptibilidade a infecções experimentais ao DENV-2 e ao vírus da febre amarela (YFV) (Lourenco-de-Oliveira et al. 2004a). Em certas regiões, entretanto, as populações tendem a ser mais homogêneas. Este é o caso de locais densamente povoados, principalmente comunidades carentes, onde as populações do vetor já se estabeleceram por bastante tempo devido às condições altamente favoráveis de criação do mosquito, sem a necessidade de grandes deslocamentos (Lourenco-de-Oliveira et al. 2004b).

Com relação ao *Ae. albopictus*, sua origem provável é a região florestal do sudeste asiático, onde parece ter permanecido restrito, atingindo como limites algumas regiões da Ásia Oriental e ilhas dos Oceanos Índico e Pacífico (Huang 1972). A partir da década de 1980, a espécie se difundiu rapidamente, e hoje está presente em todos os continentes, exceto na Austrália e na Antártica (Ayres et al. 2002). Nas Américas, o primeiro registro ocorreu no Texas (EUA) em 1985 (Sprenger & Wuithiranyagool 1986), tendo sido encontrado pela primeira vez no Brasil na cidade do Rio de Janeiro em 1986 (Forattini 1986), provavelmente oriundo do Japão (Kambhampati & Rai 1991), através de migração passiva do inseto, por via marítima (Sant'Ana 1996).

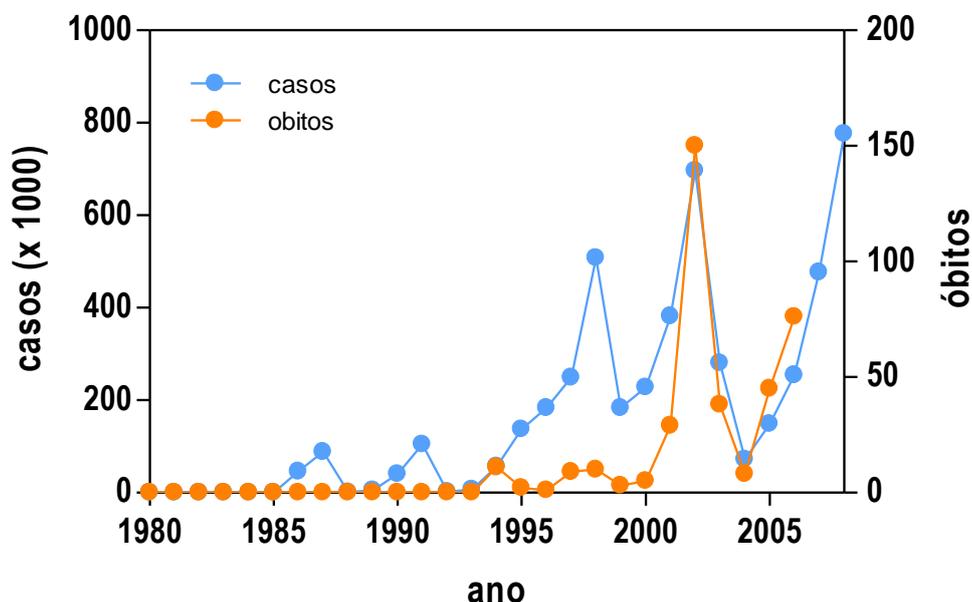
Vários fatores comportamentais do *Ae. albopictus* contribuem para o receio de que esta espécie seja um bom vetor de dengue, febre amarela urbana (FAU) e outras arboviroses. Um aspecto importante é sua grande adaptabilidade a diferentes *habitats*, podendo conectar o meio silvestre com o urbano (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994). O *Ae. albopictus*, embora não seja tão susceptível à infecção experimental pelo vírus dengue (DENV), transmite-o à prole de modo mais eficiente e os machos ainda podem transmiti-lo de forma venérea. Além disto, esta espécie coloniza áreas rurais e peri-urbanas e não se alimenta exclusivamente do homem, podendo manter um potencial ciclo silvestre em áreas com animais susceptíveis, em épocas não-epidêmicas (Vazeille et al. 2003). Quando o único vetor encontrado é o *Ae. albopictus*, podem ocorrer epidemias de dengue, como registrado no Japão (Sabin 1952), em Seychelles (Metselaar et al. 1980) e no Hawaii (Vazeille et al. 2003). Contudo, no Brasil, o papel do *Ae. albopictus* na transmissão de dengue ainda não está definido, embora alguns estudos no país mostrem que este vetor é passível de se infectar com o DENV e transmiti-lo a sua prole (Serufo et al. 1993, Castro et al. 2004). Degallier et al. (2003) sugeriram que, na epidemia de dengue no Brasil ocorrida no verão de 2002, o *Ae. albopictus* não participou da transmissão para o homem, uma vez que não foram encontrados mosquitos infectados desta espécie. Desta forma, *Ae. aegypti* ainda é considerado o vetor primário de dengue em situações endêmicas e epidêmicas na maior parte do mundo (Vazeille et al. 2003), apesar da falta de

evidências acerca da transmissão vertical do vírus neste mosquito e da grande heterogeneidade de suas populações no Brasil (Ayres et al. 2003, Santos et al. 2003, Lourenco-de-Oliveira et al. 2004a).

### 1.1.3. *Arboviroses que transmite no Brasil*

A dengue e sua forma mais grave, a dengue hemorrágica (DH), é uma arbovirose essencialmente tropical e urbana. O agente etiológico é um vírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, de quatro sorotipos conhecidos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) que, apesar de fortemente relacionados, são antigenicamente distintos. A infecção por um destes sorotipos não oferece, portanto, imunidade cruzada permanente com os outros (Jacobs 2000). A dengue é atualmente a arbovirose com maior incidência no Brasil. Desde que a doença re-emergiu no país, em 1986, e até 2007, foram oficialmente notificados 4.559.812 casos da doença, com 493 mortes (Coelho et al. 2008). Só o Estado do Rio de Janeiro contribuiu com cerca de 17% do número de casos no mesmo período (SESDEC-RJ 2009). A Figura 1 apresenta a série histórica do número de casos e óbitos por dengue no Brasil desde 1980.

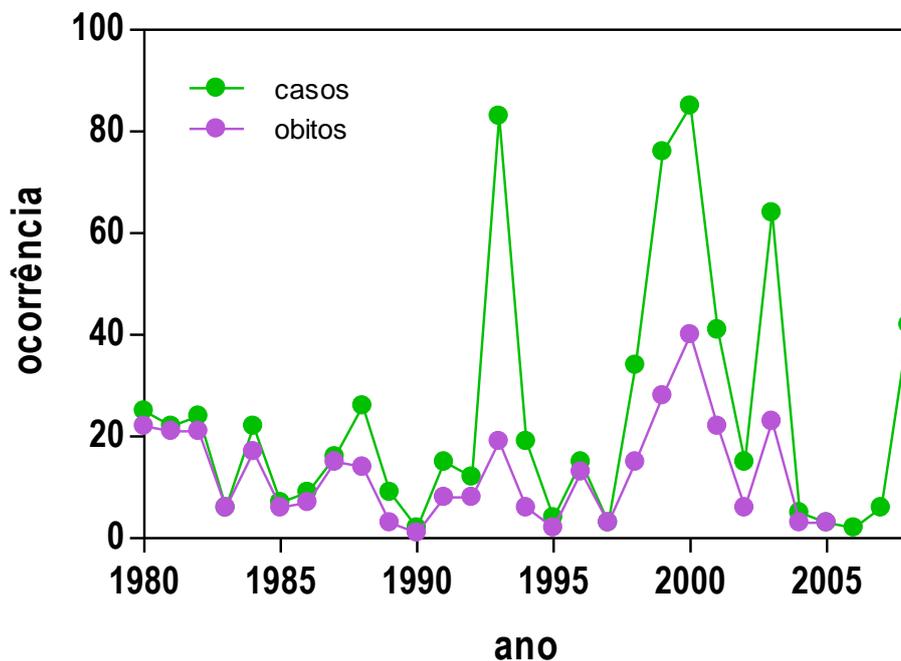
Depois do surto epidêmico, rapidamente contido, provocado pela introdução de DENV-1 e DENV-4 em Roraima, em 1981, o DENV-1 foi o único agente etiológico a circular no país até 1990. Nesse ano foi detectado o DENV-2, que ocasionou manifestações hemorrágicas importantes da doença (Nogueira et al. 1999, Schatzmayr 2000). A introdução do DENV-3 resultou em uma grande epidemia de dengue no Brasil, em 2002, com quase 800 mil notificações, correspondendo a cerca de 80% dos casos das Américas naquele ano. O DENV-3 havia sido detectado um ano antes (Nogueira et al. 2001). Nos anos seguintes, o vírus se espalhou pelo país causando importantes epidemias. Em 2007, o DENV-3 foi responsável por 81% dos casos da doença, de forma que até metade daquele ano já havia quase mil casos de dengue hemorrágica, dos quais cerca de 10% foi a óbito (Coelho et al. 2008). Em 2008, o Estado do Rio de Janeiro sofreu a maior epidemia de dengue da história, com mais de 248 mil casos registrados da doença (SESDEC-RJ 2009). O país vive no momento uma nova expansão do DENV-2, que começa a predominar em vários estados.



**Figura 1** – Casos de dengue e óbitos relacionados à febre hemorrágica de dengue no Brasil. Fontes: casos confirmados autóctones - série histórica de 1980 a 2007, SES/SP, dados atualizados em 14/11/2008. Ano de 2008, planilha simplificada SESs/UF, atualizado em 26/12/2008. Óbitos por febre hemorrágica de dengue - série histórica de 1990 a 2006, planilha paralela SES, dados atualizados em 26/12/2008. Todos os dados estão disponíveis na página web da Secretaria de Vigilância em Saúde [HTTP://www.saude.gov.br/svs].

Com relação à febre amarela urbana, o primeiro registro de uma epidemia no Brasil data de 1685, na cidade do Recife (PE). Nos anos seguintes, até 1692, a febre amarela atingiu a Bahia, provocando muitas mortes. Registros subsequentes só existem em meados do século XIX, quando várias províncias distantes do litoral foram atingidas, chegando até o Planalto Central. Desde então, o Rio de Janeiro enfrentou as epidemias mais graves da doença registradas no país, nos anos de 1850 e de 1928-29. Em 1901, o *Ae. aegypti* foi considerado o único vetor da doença nas Américas. No entanto, em 1932, foi relatada uma epidemia em Vale do Canaã (ES), onde se reconheceu pela primeira vez o ciclo silvestre da doença, na ausência de *Ae. aegypti* (Franco 1976).

Houve intensa vacinação nas duas primeiras décadas do século XX que, associada a campanhas de controle do vetor, erradicaram a febre amarela urbana do país. Apesar da febre amarela silvestre não ter sido erradicada, o ciclo silvestre se manteve sob controle através da vacinação compulsória de habitantes e transeuntes de áreas endêmicas. Nestas áreas, têm ocorrido pequenas epidemias esporádicas, principalmente durante as estações chuvosas, com picos a cada 7-10 anos (Monath 1999). Os últimos casos de febre amarela urbana no país foram notificados em 1942, em Sena Madureira, AC (Nobre et al. 2009). Desde então só têm sido registrados casos silvestres da doença. A Figura 2 mostra que, no período entre 1980 e 2005, foram confirmados 642 casos de febre amarela, com 332 óbitos, representando uma taxa de letalidade de 51,7% no período.



**Figura 2** – Casos de febre amarela urbana e óbitos relacionados à doença no Brasil. Série histórica de 1990 a 2007. Fonte: MS/SVS, SES e SINAN. Dados de 2008 atualizados em 08/01/2009. Dados disponíveis no portal web da Secretaria de Vigilância em Saúde [HTTP://www.saude.gov.br/svs].

A dispersão e o aumento da densidade de populações de *Ae. aegypti* em áreas urbanas e semi-rurais têm ocorrido em paralelo com a disseminação de *Aedes albopictus* (Skuse) no país. O nicho ecológico desta espécie favorece a transferência entre o ciclo silvestre de arboviroses e o ciclo urbano (Lourenco-de-Oliveira et al. 2004b). A esses fatores somam-se condições precárias de moradia, deficiência na educação sanitária da população e outros problemas sócio-políticos das grandes cidades brasileiras. A comunidade científica tem lançado vários alarmes sobre a forte tendência de re-urbanização da febre amarela no país (Massad et al. 2003, Codeco et al. 2004, Lourenco-de-Oliveira et al. 2004a,b).

Existem várias outras arboviroses associadas a ciclos silváticos, podendo provocar febre e quadros agudos de encefalite no homem. O *Ae. aegypti* é susceptível a vários arbovírus silvestres, endêmicos na América do Sul. Citam-se como principais exemplos de importância sanitária no Brasil a Febre Mayaro (vírus MAY, *Alphavirus*, *Togaviridae*) e a encefalite equina venezuelana (vírus EEV, *Alphavirus*, *Togaviridae*) (Forattini 2002). Mais recentemente, a possibilidade da entrada do vírus da febre do Nilo ocidental, através de aves migratórias, tem chamado a atenção das autoridades sanitárias, uma vez que o *Ae. aegypti* pode participar do ciclo desta doença (Franco 1976, Turell et al. 2001, Holick et al. 2002). Tal

como ocorre com a urbanização da febre amarela, o homem contaminado no campo pode domiciliar estas infecções, uma vez que exista um vetor potencial em abundância. Frente a esta situação, o controle das populações de *Ae. aegypti* é fundamental enquanto medida de saúde pública.

## **1.2. Uso de inseticidas no combate ao *Aedes aegypti* no Brasil**

As primeiras medidas de controle de *Ae. aegypti* no Brasil estão diretamente relacionadas às tentativas de combate à febre amarela, desde o início do século XX (Braga & Valle 2007a). No final da década de 1950, vários países da América Latina, incluindo o Brasil, foram declarados livres de infestação pelo *Ae. aegypti*. A erradicação deveu-se a ações, em caráter militar, de eliminação de focos e uso de DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), inseticida recém descoberto. Com a ausência de registros de febre amarela urbana, o mosquito deixou de ser considerado um problema de saúde pública no país. Contudo, no final da década de 1960, o Prof Leônidas Deane, então no Instituto Evandro Chagas, no Pará, identificou um espécime de *Ae. aegypti* encontrado em Belém (Franco 1976).

Algumas medidas emergenciais foram tomadas, mas depois de inspeção mais cuidadosa, constatou-se que o mosquito já se havia disseminado por toda a cidade e por diversas localidades do interior, indicando que a re-infestação não era tão recente. Além disso, ensaios biológicos sugeriam que uma nova população do vetor havia se instalado, uma vez que o mosquito exibia resistência ao DDT, tal qual as populações encontradas na Guiana Francesa e no Suriname, sua provável procedência (Franco 1976). A partir de então, iniciou-se o uso dos organofosforados (OPs) temephos e fention, respectivamente para o controle de larvas e adultos. Ainda assim, naquele período deu-se maior ênfase à profilaxia da febre amarela, preferencialmente por imunização em massa, e o combate ao vetor ficou em segundo plano. Naquele momento, e também com a dengue uma década depois, o combate ao *Ae. aegypti* não foi considerado o meio mais viável, barato e eficiente de controle da doença, bem como de bloqueio ao aparecimento de outras endemias. A explosão dos casos de dengue na década de 1980 provavelmente refletiu a falta de controle das populações de *Ae. aegypti*.

Desde a re-infestação do país por *Ae. aegypti*, várias estratégias de controle foram utilizadas, todas mal sucedidas, principalmente devido à escolha inapropriada de determinados inseticidas e à pouca participação da sociedade na eliminação de criadouros do vetor (Lourenco-de-Oliveira et al. 2004a). Em 1998 foram oficialmente iniciadas as discussões sobre a necessidade de avaliação da susceptibilidade dos vetores aos inseticidas no país, dando origem à criação, em 1999, da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas (MoReNAa), sob coordenação da Funasa (Braga & Valle 2007b). Frente ao diagnóstico de resistência ao temephos de várias populações do vetor, já a partir de 2000 novas estratégias de controle foram adotadas. A primeira medida implementada foi a substituição de OPs pelos piretróides cipermetrina e deltametrina no controle de adultos, visando diminuir a pressão seletiva sobre o vetor pelo emprego da mesma classe de inseticida nas diferentes fases de desenvolvimento (Braga & Valle 2007b). Com isto pretendia-se retardar a seleção de indivíduos resistentes (Ferrari 1996). Neste mesmo

ano, o larvicida temephos foi também substituído, em alguns municípios, por *Bti* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*), um biolarvicida (Lima et al. 2003).

Em 2002, quando já havia sido admitida a impossibilidade de erradicação do vetor, foi criado o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), vigente até os dias atuais, que elaborou estratégias permanentes de controle, visando o aumento da participação popular e o fortalecimento da vigilância epidemiológica, entre outros (Braga & Valle 2007b). Em 2003 foi criada a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), órgão diretamente ligado ao Ministério da Saúde, que passou a coordenar todas as ações de prevenção e controle de doenças, incluindo o PNCD (MS 2004). Apesar dos esforços, até 2004, *Ae. aegypti* já estava presente em 3.794 municípios (SVS 2004). Resistência ao temephos (Lima et al. 2003, Macoris et al. 2003, Braga et al. 2004, Montella et al. 2007) e aos piretróides cipermetrina e deltametrina (Da-Cunha et al. 2005, Montella et al. 2007) têm sido detectadas em várias populações desse vetor.

### 1.2.1. DDT, piretróides e organofosforados

Os principais inseticidas utilizados em saúde pública estão divididos em quatro classes: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. Todos estes compostos atuam no sistema nervoso do inseto, levando-o à morte. Frente ao problema da resistência aos inseticidas “clássicos” e de pressões por produtos menos nocivos ao meio-ambiente, os biolarvicidas e os Reguladores do Desenvolvimento de Insetos começam a ser indicados contra larvas de mosquitos e, inclusive, para uso em água potável (Martins et al. 2008, Belinato et al. 2009). Contudo, o uso dos inseticidas clássicos deverá provavelmente perdurar por muito tempo, devido à sua ação imediata, facilidade de aplicação e baixo custo (Zaim & Guillet 2002). A estrutura química de um exemplar de cada uma das principais classes de inseticida utilizado em saúde pública está apresentada na Figura 3.

Compostos organofosforados (OPs) são aqueles derivados do ácido fosfórico, desenvolvidos a partir de 1937. Neste período surgiram os compostos clássicos como tetraetil-pirofosfato (TEPP) e parathion, entre outros mais voláteis, que foram inclusive utilizados como produtos químicos na segunda grande guerra. Grande parte dos OPs conhecidos entrou no mercado em meados da década de 1960 (Casida & Quistad 1998). Os inseticidas deste grupo são classificados em três categorias, de acordo com sua natureza química: os alifáticos (malathion, vapon, vidrin etc.), os aromáticos (etil e metil parathion, fenitrothion, temephos etc.) e os heterocíclicos (clorpirifos, clorpirifos-metil etc) (Palchick 1996, Ware & Whitacre 2004). O temephos foi registrado nos EUA em 1965, e até recentemente era um dos poucos larvicidas de ação neurotóxica recomendado pela OMS para o controle de mosquitos em água potável (Braga & Valle 2007b). Os OPs têm como alvo a enzima Acetilcolinesterase nas sinapses colinérgicas (Hemingway & Ranson 2000).

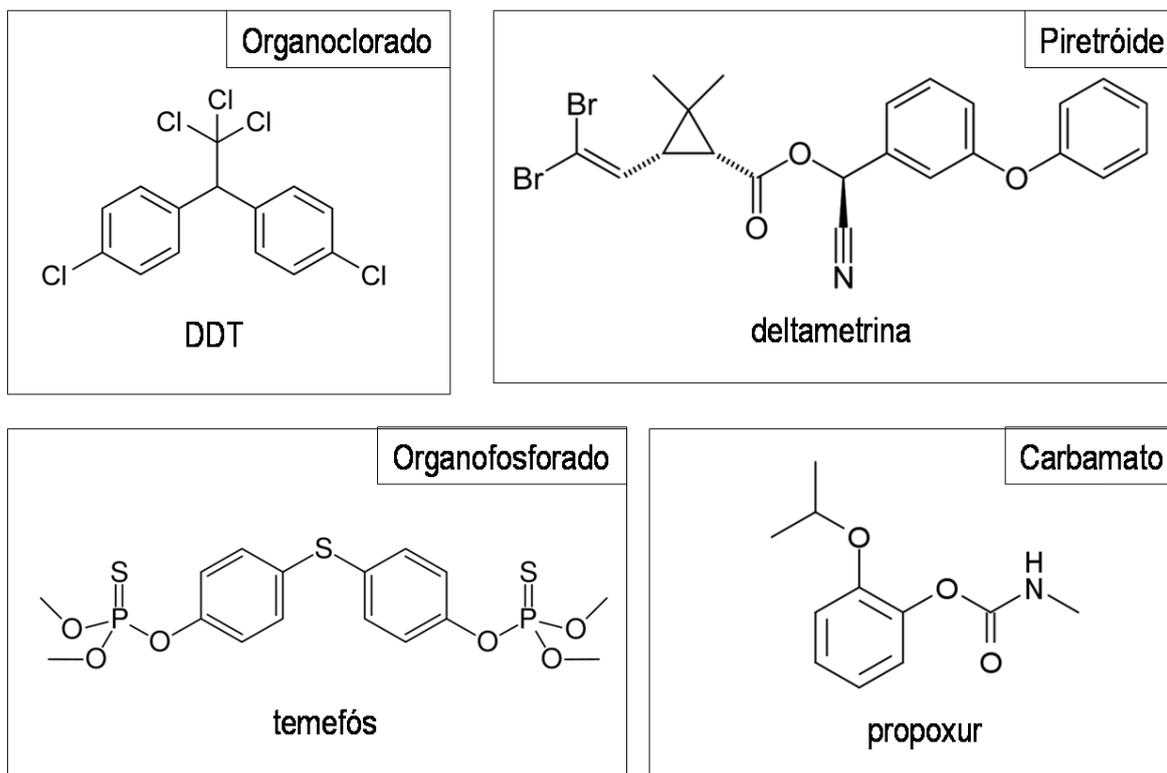
O organoclorado DDT afeta principalmente os nervos periféricos, de forma que exposição ao composto leva o inseto à paralisia seguida de morte. Já os piretróides afetam ambos os nervos periféricos e centrais, com efeitos similares aos provocados pelo DDT, porém mais pronunciados e em menos tempo (Davies et al. 2007a,b). Como discutido detalhadamente adiante, DDT e piretróides têm afinidade pela mesma molécula do sistema nervoso central do inseto: o canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_v$ ). A

interação destes compostos com o  $Na_v$  provocam no inseto efeito conhecido por *knockdown*, que consiste de espasmos involuntários, culminando em paralisia subletal que, sob exposição contínua ao inseticida, leva-o à morte.

Os organoclorados dominaram o mercado de inseticidas durante muitos anos e foram intensamente usados entre as décadas de 1940 e 1960 em programas de controle de malária, com bastante sucesso. Porém, a partir dos anos 1970, começaram a sofrer restrições de uso pelas autoridades sanitárias de vários países, devido às suspeitas de efeitos tóxicos às pessoas e ao ambiente (Beaty & Marquardt 1996). Em função disto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) organizou um comitê para rever a literatura sobre o assunto. No entanto, este grupo não encontrou justificativas toxicológicas ou epidemiológicas convincentes acerca dos efeitos adversos da exposição do DDT para controle de vetores. Mesmo assim, sugeriu-se que os países que ainda usavam o produto fizessem a substituição por outros inseticidas (OMS 1995). Recentemente, a OMS reconsiderou o uso de DDT como principal agente intradomiciliar no controle de malária não apenas em áreas epidêmicas, mas também nas regiões sob constante e alta transmissão da doença (OMS 2006). No Brasil, em 1985, o DDT foi banido da agricultura, mas permaneceu liberado para o controle de vetores, sendo também proibido para este fim somente em 1994, pela Fundação Nacional de Saúde. A partir do ano seguinte, foi proibido o uso de DDT no país (Ferreira et al. 2004).

Os piretróides formam atualmente a classe mais utilizada de inseticidas neurotóxicos. São análogos sintéticos do ácido crisantêmico (tipo I) e do ácido pirétrico (tipo II), encontrados nas flores do *Chrysanthemum cinerifolius* (Davies et al. 2007b). Estruturalmente os piretróides tipo I e II se diferenciam, respectivamente, pela presença ou ausência do grupamento alfa-ciano (Du et al. 2008). A produção comercial de piretrinas extraídas do crisântemo começou em meados do século XIX. Contudo, somente no início da década de 1970 foram desenvolvidos compostos fotoestáveis, com alta atividade inseticida, baixa toxicidade aos mamíferos e persistência limitada nos solos. Os primeiros a serem comercializados foram permetrina, cipermetrina e deltametrina, este último o inseticida mais ativo que se conhecia até aquela época. Nos anos seguintes foram desenvolvidos compostos mais eficazes e também ativos contra ácaros e carrapatos. Em 1996, cerca de 1,5 bilhões de dólares foram gastos com o consumo de piretróide em agricultura, pecuária, proteção animal e saúde humana em todo o mundo (Davies et al. 2007b).

Os primeiros casos de resistência cruzada entre DDT e piretróides foram registrados já em meados da década de 1970 em populações de *Musca domestica* na Europa. Até 1980, já haviam sido identificadas mais de 200 espécies com resistência cruzada entre esses compostos (Davies et al. 2008). Percebeu-se a necessidade de investigar o fenômeno a fim de tentar contorná-lo. Há perspectivas de que estudos de modelamento *in silico* do  $Na_v$ , identificando os principais sítios importantes na interação de piretróides e DDT com o canal, têm o potencial de orientar a síntese de novos compostos mais eficazes e, ao mesmo tempo, mais específicos para determinadas espécies (Davies et al. 2008). A disseminação do uso de mosquiteiros impregnados com piretróides e o incentivo à utilização de DDT em alguns casos, principalmente para combate à malária na África, impulsionam estes estudos (Hougard et al. 2003).



**Figura 3** – Fórmula química estrutural de um representante das quatro classes principais de inseticidas utilizados em saúde pública: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides.

### 1.3. Resistência a inseticidas

A resistência aos inseticidas pode ser funcionalmente definida como a habilidade de uma população de insetos de sobreviver a doses de um determinado composto tóxico, letais à maioria dos indivíduos de uma linhagem susceptível da mesma espécie (Beaty & Marquardt 1996). A resistência tem como base a variabilidade genética de populações naturais, a partir da qual, por pressão do inseticida, determinados fenótipos podem ser selecionados e, conseqüentemente, aumentarem em frequência. A resistência de uma população a determinado composto pode ser avaliada através de ensaios de laboratório e de campo.

A OMS recomenda bioensaios destinados a detectar e a quantificar a resistência aos inseticidas. A susceptibilidade a piretróides de *Ae. aegypti* adultos é hoje avaliada no país através de ensaios do tipo “dose-diagnóstica”. Estes consistem na exposição de fêmeas de uma população a uma determinada dose, suficiente para matar todos os indivíduos expostos de uma população controle, susceptível. Mortalidade inferior a 80% nestes casos indica resistência da população testada. Já para quantificação da resistência, os indivíduos são expostos a uma série de concentrações do inseticida, por

meio das quais são definidas as concentrações letais (para 50 ou 95%, respectivamente  $CL_{50}$  ou  $CL_{95}$ , da população analisada). A razão entre uma determinada CL e aquela equivalente da população susceptível (controle) é conhecida como Razão de Resistência (RR) (OMS 1981). No Brasil encontra-se em discussão a aplicação de ensaios quantitativos para avaliação da resistência a piretróides de *Ae. aegypti* adultos. No caso de larvicidas (diferentemente dos piretróides, que são usados no país apenas como adulticidas), atualmente no Brasil considera-se que, quando a RR é superior a 3, o controle em campo com aquele inseticida está comprometido - e recomenda-se substituição. Este critério tem sido adotado recentemente no controle de *Ae. aegypti* por OPs (SVS 2006).

A resistência a um inseticida pode resultar da seleção de um ou vários mecanismos. Para tentar elucidar a natureza da resistência, muitos trabalhos têm sido feitos com a seleção, em laboratório, de linhagens resistentes (Kumar et al. 2002, Paeoporn et al. 2003, Rodriguez et al. 2003, Saavedra-Rodriguez et al. 2007, Chang et al. 2009). Com a disponibilidade de ferramentas moleculares, tem sido usada também outras estratégias de estudo, onde moléculas alteradas são expressas em sistemas-modelo e o efeito do inseticida, avaliado. Esta abordagem tem sido usada para a determinação de mutações no sítio-alvo do piretróide relacionadas à resistência (Smith et al. 1997).

Independente do caráter mono ou polifatorial da resistência, este fenômeno pode ser didaticamente dividido em categorias. A primeira pode ser chamada de resistência comportamental: o inseto passa a simplesmente evitar o contato com o inseticida, através de mudanças de comportamento, que podem estar ligadas a fatores genéticos (Sparks et al. 1989). Uma vez que os piretróides também apresentam efeito de repelência, é possível que seu uso selecione este tipo de resistência. Entre os artrópodes estudados em relação à resistência por alteração comportamental, os mosquitos constituem a maior parcela (Lockwood et al. 1984). Existem relatos de que mosquitos anofelinos (vetores de malária) da região Amazônica tinham o hábito de repousar nas paredes das casas após a hematofagia, passando a não mais fazê-lo quando estas estavam impregnadas com inseticida (Roberts & Alecrim 1991). Estudos neste sentido para populações de *Ae. aegypti*, infelizmente, não têm sido realizados.

Acredita-se que determinadas alterações na cutícula reduzam a taxa de penetração do inseticida e que estes efeitos sejam inespecíficos, podendo produzir resistência a uma série de xenobióticos, mecanismo de resistência conhecido por penetração reduzida do inseticida. Este mecanismo provavelmente não confere altos níveis de resistência, mas pode interagir de forma sinérgica com outros. Não se conhece ainda relatos dos processos fisiológicos ou dos mecanismos moleculares que governam este tipo de resistência (Raymond et al. 1989, Scott 1995).

Uma das principais formas de resistência se dá pelo metabolismo dos inseticidas, gerando o que se conhece como resistência metabólica. Enzimas que são naturalmente detoxificantes podem ter sua atividade aumentada. Entre as enzimas responsáveis pela resistência metabólica, as mais conhecidas são as Oxigenases de função mista (OFM ou P450), as Esterases e as Glutathione-S-transferases (GST) (Hemingway & Ranson 2000, French-Constant et al. 2004). A resistência metabólica é bastante plástica,

uma vez que estas enzimas têm funções parcialmente redundantes. Adicionalmente, em todos os casos estas enzimas são codificadas por super-famílias gênicas (Ranson et al. 2002).

A resistência metabólica está associada a alterações quantitativas e/ou qualitativas das enzimas e dos genes que as codificam (French-Constant et al. 2004, Hemingway et al. 2004). No primeiro caso verifica-se aumento do número de moléculas de determinadas enzimas, enquanto mudanças qualitativas estão relacionadas à maior afinidade pelo substrato ou à maior velocidade catalítica. Por exemplo, mutações na região codificante do gene de uma determinada enzima podem levar a um aumento da eficiência catalítica sobre um composto específico. Este é o caso da enzima Malaoxonase (ou Malaoxon esterase), a variação de uma Esterase que degrada o organofosforado malaoxon, em mosquitos dos gêneros *Culex* (Whyard et al. 1995) e *Anopheles* (Karunaratne et al. 2001). Pode também haver amplificação gênica, de modo que uma região contendo genes de enzimas detoxificantes seja duplicada no genoma. Desta forma pode ocorrer maior produção de enzimas. Para este caso também são citadas as Esterases: o super locus *ester*, que abriga vários genes desta classe, pode ser duplicado, resultando em maior produção destas enzimas (Guillemaud et al. 1997, 1999). Também pode haver superexpressão sem amplificação gênica concomitante. Um exemplo ocorre com *Drosophila melanogaster*, que, devido à seleção da inserção de um elemento de transposição no promotor de um gene Oxidase de função mista (OFM ou Monoxigenase P450), tem sua expressão muito aumentada (Chung et al. 2007). Em suma, em se tratando de resistência metabólica, distintos mecanismos moleculares podem ser selecionados para o mesmo efeito, que essencialmente significa maior atividade na detoxificação dos inseticidas.

Enzimas que detoxificam xenobióticos têm papel importante na resistência de populações brasileiras de *Ae. aegypti*. Como discutido acima, a detecção de resistência aos organofosforados no país em 1999 resultou na substituição dos adjuvantes por compostos piretróides. No entanto, em curto período de tempo foram diagnosticadas populações resistentes também aos piretróides. Estas populações já possuíam um nível de Esterases elevado, o que sugeria sua participação na resistência aos inseticidas. É provável ainda que, em algum nível, alterações no perfil de expressão destas enzimas possam conferir resistência cruzada aos piretróides. Além das Esterases, foi detectado aumento da expressão de GST nas populações brasileiras deste vetor, a partir da implementação dos piretróides (Montella et al. 2007).

A modificação do sítio-alvo é outro mecanismo de resistência importante. Os inseticidas clássicos têm como alvo final, diferentes moléculas do sistema nervoso central: a enzima Acetilcolinesterase (para OPs e carbamatos), os receptores de ácido  $\gamma$ -amino-butírico (para ciclodienos) e o canal de sódio (para DDT e piretróides). Indivíduos resistentes apresentam moléculas-alvo ainda funcionais, porém com menor ou nenhuma afinidade pelo inseticida. No entanto, pouquíssimas mutações são observadas nestas moléculas porque, como participam de processos fisiológicos extremamente importantes, a viabilidade de seus portadores quase sempre é comprometida (French-Constant et al. 1998, Raymond et al. 2001).

#### 1.4. Canal de sódio regulado por voltagem: a molécula-alvo de piretróides e DDT

No início da década de 1950, ou seja, poucos anos após o início da utilização do DDT como inseticida, foram descritas linhagens de moscas domésticas resistentes. Estes insetos, ao serem expostos ao DDT, ou não sofriam paralisia seguida de morte (*knockdown*) ou apresentavam uma paralisia momentânea seguida de total recuperação locomotora. O fenótipo ficou conhecido como *kdr* (do inglês, *knockdown resistance*) (Busvine 1951, Harris 1951, Milani 1954). Desde a introdução dos piretróides, foram observados insetos resistentes exibindo o fenótipo *kdr*, por pressão seletiva exercida pelo DDT, caracterizando-se em resistência cruzada entre estes compostos (Hemingway & Ranson 2000). O mecanismo de resistência *kdr* ocorre devido a uma redução na sensibilidade do alvo ao inseticida, de 10 a 20 vezes. Linhagens *kdr* de algumas espécies podem ter aumento de até 100X na resistência, efeito que é denominado *super-kdr*. Os alelos que conferem resistência *kdr* e *super-kdr* são recessivos e podem persistir em baixos níveis na população (Davies et al. 2007a).

Cerca de três décadas após a identificação do efeito *kdr*, estudos eletrofisiológicos em células ou tecidos neuronais sugeriram que os sítios de ação dos piretróides seriam os canais de sódio dependentes de voltagem ( $Na_v$ ). Estes trabalhos indicavam que a resistência cruzada entre piretróides e DDT poderia estar relacionada a este canal (Pauron et al. 1989). Paralelamente, foi clonado e sequenciado o gene *paralytic (para)* de *D. melanogaster*, que está no *locus* ligado a alterações de comportamento e paralisia a altas temperaturas semelhantes àquelas produzidas por piretróides e DDT (*knockdown*) (Loughney et al. 1989). Comparações com sequências de vertebrados revelaram que *para* é homólogo a genes codificantes de  $Na_v$  (Loughney & Ganetzky 1989). Em seguida, ficou também evidenciado em uma linhagem de moscas domésticas resistentes ao DDT, que o *locus* homólogo ao *para* estava fortemente ligado ao fenótipo *kdr* (Williamson et al. 1993) (Kniple et al. 1994). Esta evidência se estendeu a outras espécies de insetos pragas ou vetores, entre elas a mosca do chifre *Haematobia irritans* (McDonald & Schmidt 1987), a praga do tabaco *Heliothis virescens* (Taylor et al. 1993), a barata *Blattella germanica* (Dong & Scott 1994) e o mosquito *Ae. aegypti* (Severson et al. 1997).

Os canais de sódio são alvos efetivos para uma variedade de neurotoxinas produzidas por plantas e animais, como estratégia de defesa contra predação. São também alvos de várias toxinas e fármacos aplicados aos mamíferos, de forma que muitos estudos já vinham sendo conduzidos na tentativa de elucidar aspectos biofísicos e bioquímicos de seu funcionamento (Goldin 2003b). A descoberta de que alterações neste canal resultam em resistência ao inseticida mais usado no passado e aos que atualmente apresentam melhor desempenho, tem colaborado para grandes avanços no conhecimento do canal de sódio (French-Constant et al. 1998).

Até o momento conhece-se apenas o  $Na_v$  como a molécula-alvo dos piretróides e DDT. Foi visto que, em baratas, piretróides do tipo II podem interagir com a subunidade de outro canal, o receptor de GABA (que é o alvo principal dos organoclorados da classe do dieldrin). No entanto, esta interação não foi considerada toxicologicamente importante (Soderlund & Bloomquist 1989).

### 1.5. Estrutura, função e evolução do canal de sódio nos invertebrados

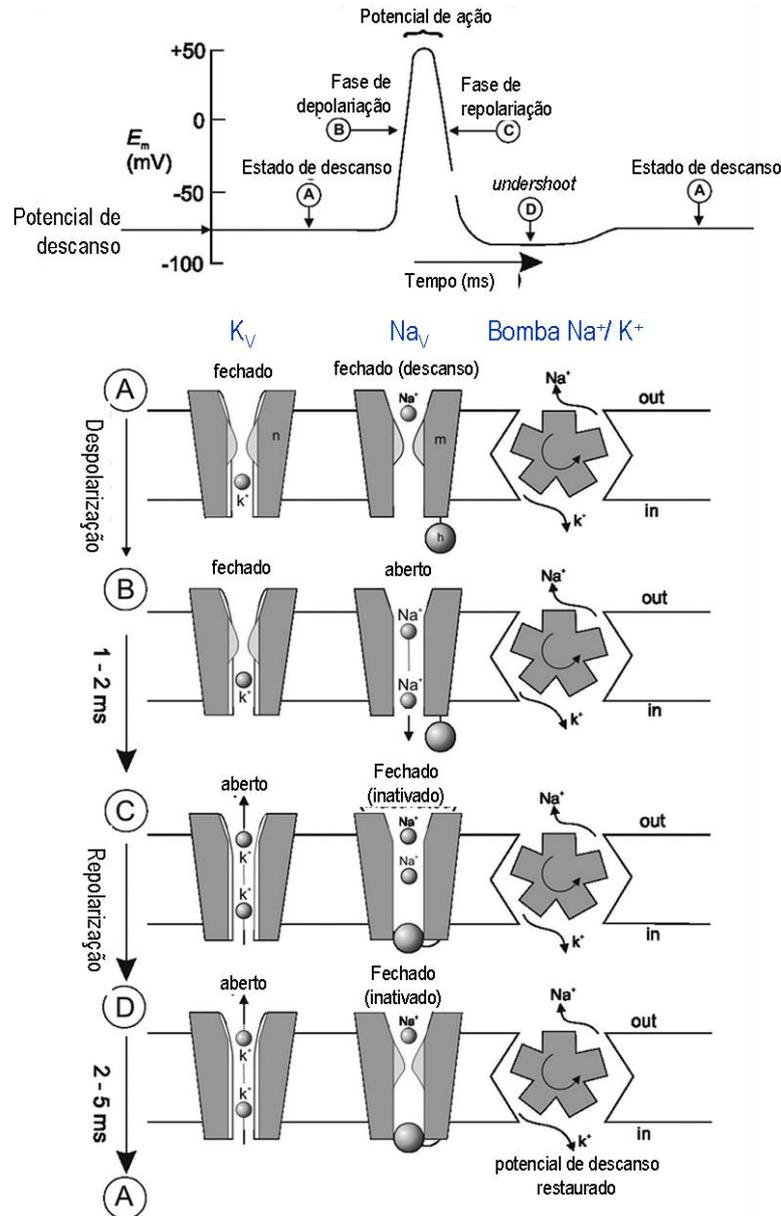
A membrana da maioria das células é polarizada. Isto porque, em relação ao meio extracelular, mantém  $K^+$  em alta concentração e  $Na^+$  em baixa, através de transporte ativo por meio de bombas  $Na^+/K^+$ -ATPase. A membrana de todas as células excitáveis (neurônios, miócitos, células endócrinas e célula-ovo) possui canais iônicos regulados por voltagem, responsáveis pela geração de potenciais de ação. Estas células respondem a mudanças no potencial da membrana, aumentando a permeabilidade específica a determinados íons, em intervalos da ordem de milissegundos (Randal et al. 2000, Alberts et al. 2002).

Os canais de sódio regulados por voltagem ( $Na_V$ ) são proteínas transmembranares responsáveis pela fase inicial do potencial de ação em células eletricamente excitáveis (Catterall 2000). São membros de uma superfamília que inclui também os canais de  $Ca^{+2}$  ( $Ca_V$ ) e de  $K^+$  ( $K_V$ ) dependentes de voltagem (Jan & Jan 1992). Os  $Na_V$  e os  $Ca_V$  são compostos por quatro domínios homólogos e os  $K_V$ , de um tetrâmero com domínio único. A rota evolutiva proposta assume que os  $Ca_V$  evoluíram dos  $K_V$  por duplicação gênica, durante a evolução dos eucariotos multicelulares. Já os  $Na_V$  teriam evoluído a partir de uma família ancestral dos  $Ca_V$  (família  $Ca_V3$ ) (Spafford et al. 1999). De acordo, os quatro domínios do  $Na_V$  são mais similares aos domínios do  $Ca_V$  do que entre eles próprios (Strong et al. 1993).

No momento ainda não há consenso na literatura sobre a nomenclatura para o canal de sódio, seu gene e suas variações. Em nossos trabalhos, temos adotado a convenção proposta por Goldin et al. (2000b), baseada em sistema numérico de classificação, de acordo com a similaridade de sequência de aminoácidos. Estas orientações já vinham sendo seguidas para os canais de  $K^+$  (Chandy & Gutman 1993b) e  $Ca^{++}$  (Chandy & Gutman 1993a, Ertel et al. 2000). Resumidamente, neste sistema, o nome de um canal consiste do símbolo químico (Na) com a inicial do principal regulador fisiológico (no caso, voltagem) subscrito ( $Na_V$ ). Como os canais de sódio pertencem a uma única família, segue-se um número, que indica a subfamília ( $Na_V1$ ), acrescido de um ponto e de um segundo número, que identifica o canal ( $Na_V1.1$ ). Este último refere-se à ordem de identificação de cada gene. Variantes geradas por *splicing* alternativo recebem ainda uma letra em minúsculo ( $Na_V1.1a$ ) (Goldin et al. 2000a). Referências à espécie precedem o símbolo  $Na_V$  e são feitas com as iniciais do gênero e do termo específico. Toda a grafia deve estar em itálico. Exemplo: gene do canal de sódio de *Aedes aegypti* – *AaNa<sub>V</sub>*.

Um potencial de ação é iniciado pela despolarização da membrana plasmática, que é a mudança para um potencial menos negativo. Um estímulo que cause despolarização em uma região da membrana promove a ativação (abertura) dos  $Na_V$  naquela região. Este processo permite que íons  $Na^+$  entrem na célula, despolarizando ainda mais a membrana. O potencial de ação funciona em retro-alimentação positiva, ou seja, uma vez iniciado, não necessita de estímulo adicional para continuar. Entretanto, um milissegundo após o canal ser ativado, o potencial da membrana ao redor do canal atinge o potencial de equilíbrio do  $Na^+$ , inativando o canal. Neste estado, o poro do canal continua aberto, porém assume conformação que impede a entrada do íon na célula. Após milissegundos, a membrana é repolarizada e o canal se fecha, voltando à sua conformação de repouso (Catterall 1993, Randal et al. 2000,

Alberts et al. 2002). Um esquema, apresentado na recente revisão de Davies et al. (2007b), está reproduzido na Figura 4. O correto funcionamento do Nav é essencial para a transmissão do impulso nervoso; quando o processo é interrompido, via ação de um inseticida por exemplo, ocorre paralisia do organismo, levando-o eventualmente à morte.



**Figura 4** – Participação do canal de sódio na geração de potencial de ação. O fluido extracelular que banha os axônios dos insetos possui elevada  $[Na^+]$  e baixa  $[K^+]$ . O oposto ocorre no meio intracelular. No potencial de descanso (A), a membrana do axônio é relativamente permeável ao  $K^+$ , mas não ao  $Na^+$ , tornando o meio interno mais negativo que o extracelular. O estímulo nervoso permeabiliza a membrana do axônio ao  $Na^+$  devido à abertura dos canais de sódio (B). Com isto, o meio intracelular fica transientemente positivo, desencadeando a fase de crescimento do potencial de ação (*rising phase*). O fechamento ou inativação do canal de sódio (C) é concomitante à saída de  $K^+$  pela abertura dos canais de potássio, gerando uma fase de decaimento do potencial de ação. A geração do potencial de ação ocorre devido à despolarização sequencial das regiões vizinhas no axônio, resultando em uma onda de despolarização ao longo do axônio. Uma bomba  $Na^+/K^+$  mantém o gradiente iônico através da membrana (D) e restaura o potencial de descanso. Figura adaptada de Davies et al (2007b).

A subunidade  $\alpha$  do  $\text{Na}_v$  é a subunidade formadora do poro, sendo funcional por si só. Contudo, a cinética de abertura e fechamento do canal dependente de voltagem é modificada por outras subunidades ( $\beta$  em mamíferos e TipE em drosófilas) (Catterall et al. 2003). Em mamíferos são conhecidas as subunidades  $\beta_1$ , 2, 3 e 4 (Goldin 2003a, Yu & Catterall 2003). Os sítios receptores de todos os agentes farmacológicos que atuam no canal de sódio estão na subunidade  $\alpha$ . Pelo menos seis sítios receptores distintos para neurotoxinas e um sítio receptor para anestésicos locais e drogas relacionadas foram identificados (Cestele & Catterall 2000).

Estruturalmente, o  $\text{Na}_v$  está organizado em quatro domínios homólogos (I-IV), cada qual contendo seis alfa-hélices transmembranares, denominadas segmentos S1 a S6, e um *loop* adicional entre os segmentos S5 e S6, o *P-loop* (Figura 5). Os segmentos S4 são positivamente carregados e sensíveis às mudanças na corrente elétrica, de forma que se movem através da membrana para iniciar a ativação do canal em resposta à despolarização da membrana. A pequena região extracelular, de ligação entre os segmentos III e IV, funciona como uma “porta de inativação”, dobrando-se para dentro da estrutura do canal e bloqueando a entrada de  $\text{Na}^+$  durante a repolarização da membrana (Narahashi 1992, Catterall et al. 2003, Goldin 2003). Adicionalmente, sabe-se também que os quatro aminoácidos D, E, K e A nos *P-loops* dos domínios I, II, III e IV, respectivamente, são críticos para a sensibilidade ao  $\text{Na}^+$  (Zhou et al. 2004).

Os quatro segmentos S5 e S6 formam o poro por onde passa o  $\text{Na}^+$ , sendo os segmentos S1-S4 a parte do canal sensível à voltagem. As regiões de ligação entre S5 e S6 (*P-loops*) formam um filtro seletivo ao íon na porta extracelular do poro. Em resposta à despolarização, o canal sofre uma mudança conformacional, permitindo o influxo do  $\text{Na}^+$  através do poro. Durante a despolarização, a permeabilidade ao  $\text{Na}^+$  aumenta rapidamente e, em seguida, decai quando o canal passa aos estados inativado e não condutor, assim permanecendo até que a membrana seja repolarizada e o canal se feche (Catterall 2000).

No estado fechado, os sítios de contato do inseticida com o canal estão bloqueados, o que é condizente com o fato de que os piretróides e o DDT têm maior afinidade pelo canal aberto, estabilizando-o nesta conformação (O'Reilly et al. 2006). Assim, estes inseticidas inibem a transição do canal de sódio aos estados não-condutor e inativado (Davies et al. 2008). Ao interagirem com o canal, formam uma espécie de cunha entre IIS5 e IIS6, restringindo o movimento das hélices S5 e S6, que formam o poro, e prevenindo o fechamento do canal. Consequentemente, a entrada de  $\text{Na}^+$  é prolongada, de forma que a mudança estável no potencial da membrana faz com que a célula funcione em um estado anormal de hiper-excitabilidade. A amplitude da corrente de  $\text{Na}^+$  continua sem diminuir até que o nível de hiper-excitabilidade se sobreponha à capacidade da célula manter a atividade da bomba de sódio. Nos insetos, este estado produz um efeito de incapacidade subletal, o efeito *knockdown*, que pode levar à paralisia e morte do inseto (Davies et al. 2007b, 2008).

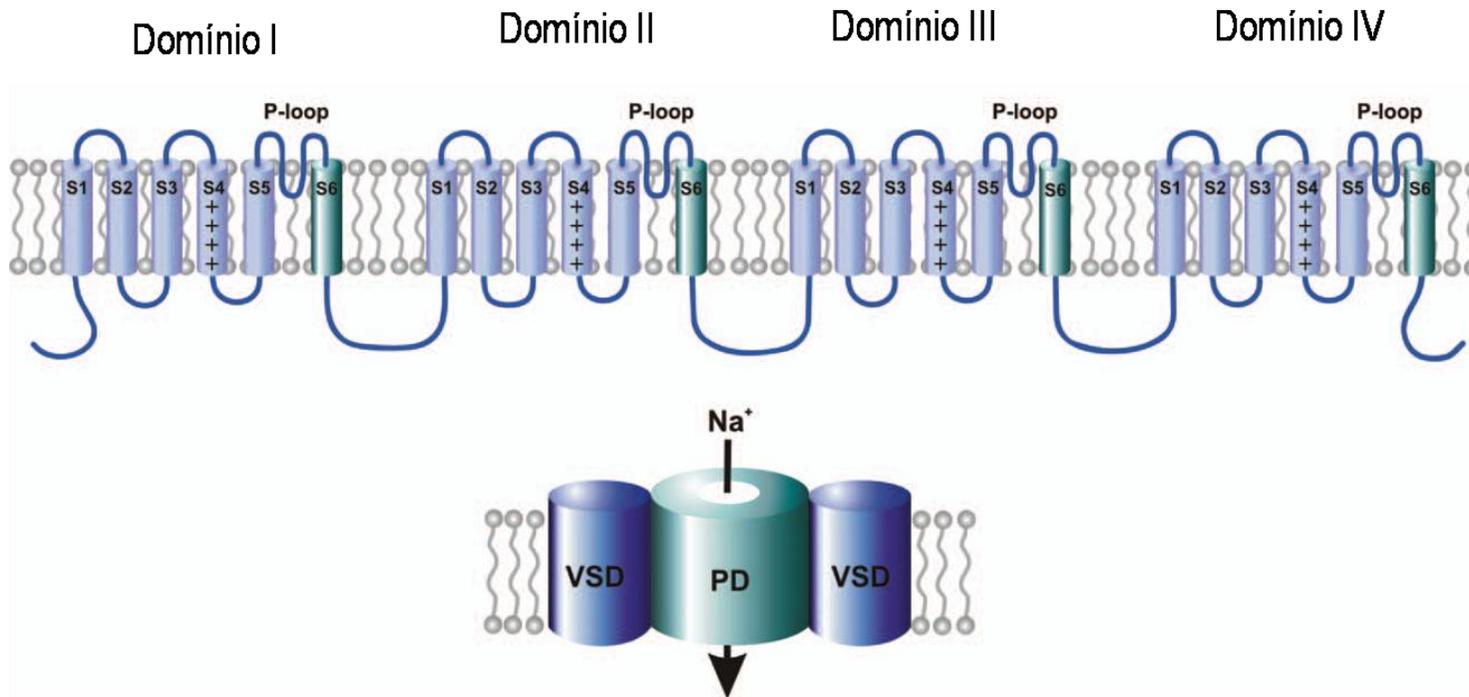
Modelos preditivos do canal sugerem que os sítios de ligação do DDT e piretróides estão localizados em uma cavidade longa e estreita, delimitada pelo *linker* IIS4-S5 e as hélices IIS5-IIS6, acessível aos inseticidas lipofílicos (O'Reilly et al. 2006). Embora sujeitos a erros, estes modelos corroboram e explicam uma série de observações, levantadas na revisão de Davies et al. (2007b): i) os sítios de ligação

para os piretróides tipo II (que são os mais potentes) são formados durante a ativação do canal; a ligação dos piretróides ao canal é inversamente proporcional à temperatura, o que correlaciona favoravelmente com o fato de que temperaturas mais baixas prolongam o tempo de abertura do canal; ii) a ligação do canal ao piretróide estabiliza seu estado aberto; iii) piretróides se ligam em uma conformação “estendida”; iv) a ligação é dependente da estrutura; v) o DDT ocupa uma área restrita na cavidade de ligação, o que é consistente com sua potência inferior a dos piretróides; vi) mutação na posição 918 *super-kdr* (veja abaixo) tem pouco efeito na ligação do DDT; vii) a cavidade de ligação contém vários dos sítios onde mutações relacionadas à resistência a piretróides e DDT já foram descritas (*linker* entre IIS4-S5, hélices IIS5 e IIS6); viii) uma Ile no *linker* entre IIS4-S5 do Na<sub>v</sub> de mamíferos, em sítio homólogo ao 918 *super-kdr* de insetos, é responsável, em parte, pela baixa sensibilidade dos mamíferos aos piretróides; e ix) outros aminoácidos nestas mesmas hélices contribuem para seletividade de insetos e carrapatos àqueles compostos. Ressalta-se que alguns aminoácidos das hélices que possuem os sítios de contato potenciais não são conservados entre artrópodes e os demais animais, sugerindo ser esta a grande contribuição à seletividade dos piretróides ao grupo (O'Reilly et al. 2006).

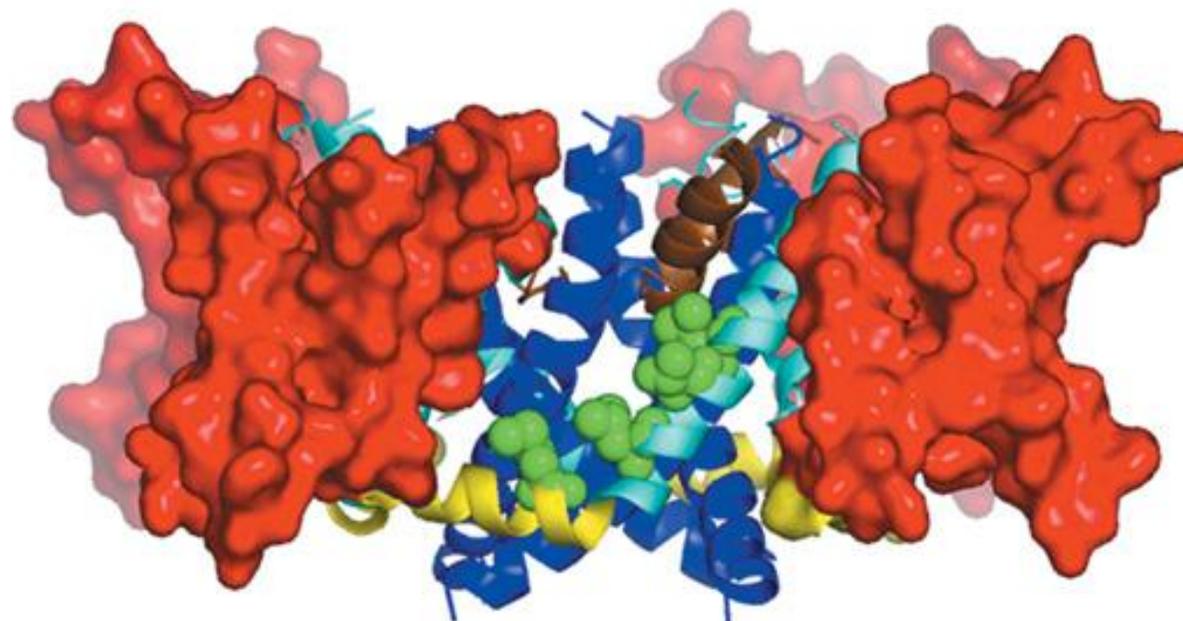
Os genes ortólogos de *D. melanogaster* e *An. gambiae* compartilham em média 56-62% de identidade; no entanto, o cDNA do Na<sub>v</sub> destas espécies apresenta 82% de identidade mostrando que são genes bastante conservados (Davies et al. 2007a). A região extrema do C-terminal do Na<sub>v</sub> é mais variável, mas em todos os Diptera é dominada por aminoácidos com radicais de cadeia curta (Gly, Ala, Ser, Pro) ou negativos (Asp, Glu), sugerindo uma função conservada neste grupo (Davies et al. 2007a). Análise filogenética da sequência dos genes Na<sub>v</sub> de várias espécies de Neoptera indicou distâncias genéticas condizentes com aquelas estimadas para o tempo de separação entre as diferentes espécies analisadas (Davies et al. 2007a). A Figura 6 apresenta o cladograma resultante desta análise.

O gene que codifica o canal de sódio de *Ae. aegypti* (*AaNa<sub>v</sub>*) ocupa 293 kb de DNA genômico, e se distribui em 33 exons. O maior transcrito observado, uma ORF de 6.441 pb, codifica 2.147 aminoácidos, gerando uma proteína com massa estimada de 241 kDa (Chang et al. 2009). Comparativamente, a sequência genômica do canal de sódio de *Anopheles gambiae* (*AgNa<sub>v</sub>*) também é composta por 33 exons, gerando uma proteína com até 2.139 aminoácidos, com massa molecular calculada em 240 kDa (Zhou et al. 2004, Davies et al. 2007a). No entanto os introns de *AaNa<sub>v</sub>* e *AgNa<sub>v</sub>* diferem significativamente em tamanho. Foi ainda observada uma inserção não usual de 21 pb localizada entre as regiões de *splicing* alternativo (ver item a seguir) apenas em *An. gambiae*. Os outros 32 exons se apresentaram conservados (Davies et al. 2007a).

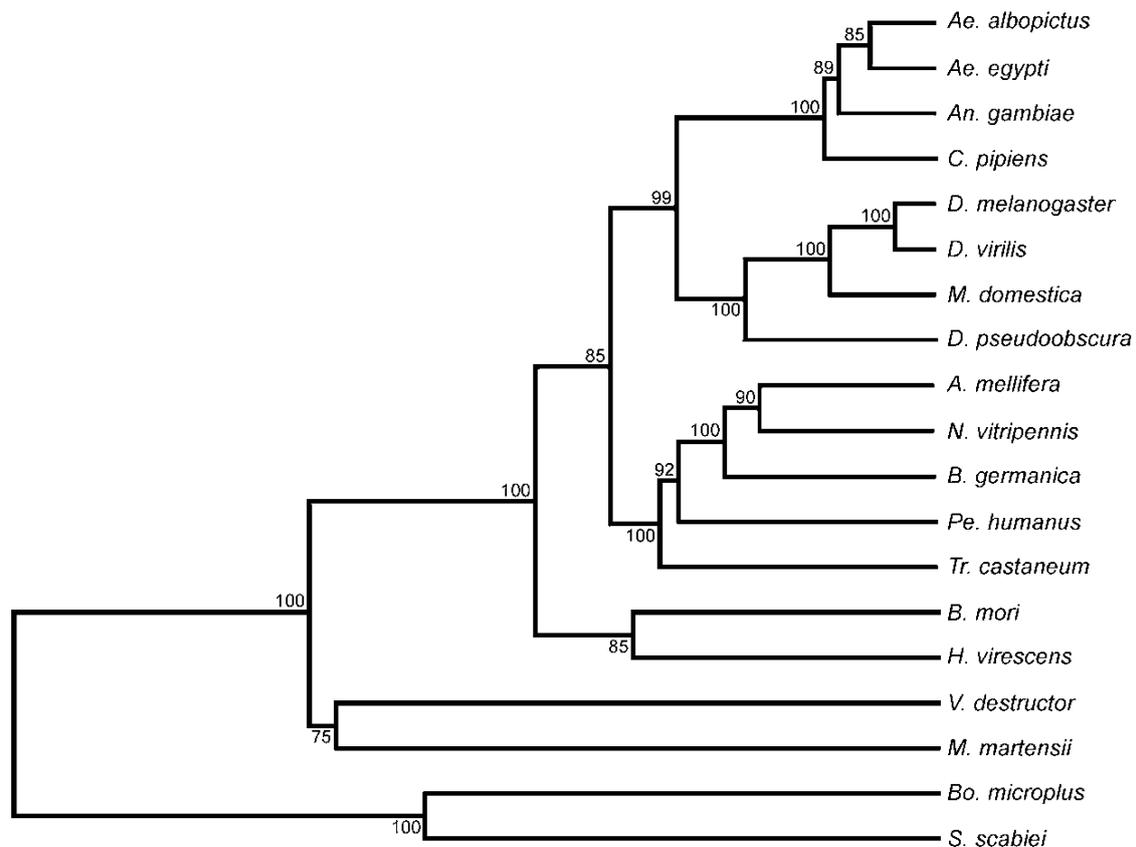
A



**B**



**Figura 5** – Esquema da topologia transmembranar do canal de sódio regulado por voltagem. **A** - A unidade formadora do poro (subunidade  $\alpha$ ) consiste de uma única cadeia polipeptídica composta por quatro domínios homólogos (I-IV), cada qual com seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6). Os segmentos S5, S6 e a região de ligação entre estes (*P-loop*) dos quatro domínios se juntam, formando um poro central hidrofílico (PD, do inglês *pore domain*). Os segmentos S1-S4 de cada domínio formam os quatro domínios sensores de voltagem (VSD, do inglês *voltage sensing domain*). A ativação dependente de voltagem ocorre devido ao movimento dos quatro segmentos S4, que são carregados positivamente. O esquema inferior representa dois dos quatro VSD e o canal de passagem do  $\text{Na}^+$  (PD). Esquema adaptado de Davies et al. (2007b). **B** – Representação da estrutura terciária do canal. Vermelho: domínios sensores de voltagem; amarelo: região de ligação entre S4-S5, ciano: segmento S5, marrom: *P-loop*, azul: segmento S6. Cadeias laterais dos resíduos importantes na interação com piretróides estão indicadas em verde: Met918, Leu925, Thr929 e Leu932. Extraída de O'Reilly et al (2006).



**Figura 6** – Cladograma do canal de sódio em Neopteras. Análise filogenética de seqüências de cDNA de canais de sódio de insetos do grupo dos Neoptera de diferentes ordens: Diptera (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Drosophila* e *Musca*), Hymenoptera (*Apis*, *Nassonia*), Lepidoptera (*Bombyx* e *Heliothis*), Coleoptera (*Tribolium*), Phthiraptera (*Pediculus*) e Blatária (*Blatella*). Foram também incluídas seqüências de cDNA do canal de sódio de aracnídeos: *Mesobuthus martensii*, *Varroa destructor*, *Boophilus microplus* e *Sarcoptes scabiei*. Figura extraída de Davies et al. (2007a).

### 1.6. Diversidade do canal de sódio

Uma grande variedade de canais de sódio foi identificada por ensaios eletrofisiológicos, purificação e clonagem (Goldin 2001). Em mamíferos, são conhecidos nove genes da subunidade  $\alpha$  do  $Na_v$ , que codificam nove isoformas do canal, com distintas propriedades eletrofisiológicas e diferentes perfis de expressão dentre os variados tecidos e etapas do desenvolvimento (Goldin 2002, Yu & Catterall 2003). Análise filogenética revela que todos são membros de uma única família, resultante de duplicações gênicas e de rearranjos cromossômicos relativamente recentes. Ao contrário dos  $Na_v$ , os  $Ca_v$  e os  $K_v$  possuem pouca identidade de seqüência protéica e apresentam funções diversas, o que pressupõe duplicações mais antigas dos genes que os codificam (Catterall et al. 2003).

Foi sugerida a existência de duas linhagens evolutivas do  $Na_v$  em invertebrados, representadas, em *D. melanogaster*, pelos genes *para* e *DSC1* (Spafford et al. 1999). Contudo, estas duas linhagens não correspondem às diferentes linhagens observadas entre os vertebrados (Goldin 2002), e

teriam se formado depois da separação entre os dois grupos. Nos invertebrados, o gene *para* de *D. melanogaster* e seus ortólogos estão relacionados com a resistência a inseticidas e com alterações do comportamento, sendo de fato codificantes para canal de sódio. Além do *DSC1* de *D. melanogaster* (Salkoff et al. 1987), o *BSC1*, seu homólogo em *B. germanica* (Liu et al. 2001), havia também sido identificado como possível gene de canal de sódio. Sabe-se que, em *B. germanica*, o homólogo de *para* é expresso no cordão nervoso e em músculos, enquanto *BSC1* aparece em vários tecidos, além destes: intestino, corpo gorduroso e ovários (Liu et al. 2001). Entre as poucas informações existentes sobre estes genes, sabe-se que o *DSC1* contribui para o processamento de informações olfativas em *Drosophila* (Kulkarni et al. 2002). Em nenhum caso, porém, a localização do *DSC1/ BSC1* coincidiu com algum *locus* de manifestação de resistência a inseticidas (Loughney et al. 1989, Salkoff et al. 1997). Mais recentemente, foi sugerido que *DSC1* e *BSC1* representariam, na verdade, o protótipo de uma nova família de  $Ca_v$ , estreitamente relacionada aos  $Na_v$  e  $Ca_v$  conhecidos (Zhou et al. 2004). Portanto, até o momento está confirmada a existência de apenas um  $Na_v$  funcional nos invertebrados ou, pelo menos, entre os insetos.

Em sua revisão, Goldin sugere que em invertebrados deveriam existir entre dois e quatro genes que codificam canais de sódio (Goldin 2002) e que em insetos a diversidade de sequência encontrada seja resultado principalmente de *splicing* alternativo e de edição de RNA. De fato, mesmo depois da disponibilização do genoma de uma série de insetos, não há menção à duplicidade de genes de canal de sódio em uma mesma espécie. Trabalhos recentes relatam diversidade de sequência de aminoácidos e, conseqüentemente, fisiológica, atribuídas a modificações pós-transcricionais. Estas modificações parecem ser tecido- e estágio-específicas, podendo, inclusive, ter efeito na susceptibilidade a piretróides (Liu et al. 2004, Song et al. 2004, Sonoda et al. 2008). Atualmente vários grupos estão empenhados em explorar esta diversidade e sua regulação molecular.

#### 1.6.1. *Splicing* alternativo no gene *Nav*

Resumidamente, *splicing* alternativo é caracterizado quando, durante a transcrição, determinados exons são, em algumas situações, removidos junto com os introns. Este é um mecanismo comum para a regulação da expressão gênica e aumento da diversidade protéica em eucariotos, podendo ocorrer de diferentes formas. Exons inteiros podem ser incluídos ou excluídos (exons opcionais), as posições do sítio de *splicing* tanto a 5' como a 3' podem ser alteradas ou introns que seriam sujeitos à excisão passam a ser retidos. Há ainda pares de exons mutuamente exclusivos, caracterizados quando dois exons nunca estão simultaneamente presentes no mesmo transcrito. *Splicing* alternativo também introduz variabilidade no tamanho das regiões intracelulares do canal de sódio, que por si só podem ter impacto em seu funcionamento (Davies et al. 2007a). A regulação para a remoção de um ou outro exon pode ser tecido e desenvolvimento (tempo) específica. No contexto da resistência a piretróide é importante conhecer os sítios de *splicing* alternativos, para avaliar se a presença ou ausência de determinados aminoácidos comprometem a interação do inseticida com o  $Na_v$ . É necessário também investigar a quantidade dos transcritos alternativos ao longo do desenvolvimento, e nos diferentes tecidos do inseto.

O gene  $Na_V$  contém exons alternativos e potencialmente sintetiza um grande número de diferentes RNAm. As sequências de aminoácidos destas regiões de *splicing*, traduzidas a partir de exons opcionais, são conservadas e codificam domínios intracelulares do canal, sugerindo importância funcional nesta conservação. Há também exons mutuamente exclusivos que, por outro lado, ocorrem na região transmembranar dos domínios II e III (Davies et al. 2007a). A Figura 7-A apresenta um esquema com a compilação da distribuição dos exons alternativos conhecidos nos genes  $Na_V$  de insetos.

Em *D. melanogaster* foram identificados diversos sítios de *splicing* alternativo, com sete regiões opcionais (*a, b, e, f, h, i, j*) e dois pares de exons mutuamente exclusivos (*c/d* e *k/l*) (Figura 7) (Olson et al. 2008). Estes mesmos sítios de *splicing* alternativo estão conservados no gene  $Na_V$  de *Musca domestica* ( $MdNa_V$ ) (Lee et al. 2002). A diversidade de transcritos do  $Na_V$  geradas por *splicing* alternativo tem sido investigada em insetos de várias ordens, revelando conservação entre os insetos. Por exemplo, no gene do canal de sódio do bicho-da-seda *Bombyx mori* ( $BmNa_V$ ) foram encontrados os dois pares de exons mutuamente exclusivos *19a/19b* e *27a/27b* (que correspondem, respectivamente, aos pares *c/d* e *k/l* das moscas), porém com algumas peculiaridades no perfil de expressão ao longo do desenvolvimento (Shao et al. 2008). A complexidade de exons alternativos no gene de canal de sódio tem sido também revelada na barata *B. germanica* ( $BgNa_V$ ) (Liu et al. 2001, Song et al. 2004) e na mariposa *Plutella xylostella* ( $PxNa_V$ ) (Sonoda et al. 2008), entre outros.

Alguns sítios de *splicing* alternativo parecem ser conservados entre os insetos e outros animais, sugerindo uma origem comum. A expressão dos exons mutuamente exclusivos *c/d* e *k/l* em várias espécies (ver Figura 7) potencialmente geraria diferentes variantes (*c/k, c/l, d/k, d/l*), possibilitando alterações nas características funcionais do canal, reguláveis de acordo com o ambiente (Davies et al. 2007a). No entanto, em determinadas espécies alguns exons não foram observados no genoma ou sua expressão não foi detectada. Por exemplo, em relação aos equivalentes do par mutuamente exclusivo *c/d* de  $MdNa_V$  e  $DmNa_V$ , somente o exon *d* foi encontrado no  $AgNa_V$  e no  $AaNa_V$  (ver Figura 7). Da mesma forma, somente o exon *l* (do par mutuamente exclusivo *27 k/l* de  $MdNa_V$ ) foi observado no  $DmNa_V$ , no  $AgNa_V$  e no  $AaNa_V$  (Davies et al. 2007a, Chang et al. 2009). O coleoptera *Tribolium castaneum* também não possui os exons *c* e *k*, limitando seu repertório à variante *d/l* (Davies et al. 2007a). Em *Ae. aegypti*, foram ainda observados três outros exons alternativos não conhecidos em outras espécies: *m* e *n* na região de ligação entre os domínios I e II; e *f* na região de ligação entre os domínios II e III (Chang et al. 2009).

Ainda na Figura 7, percebe-se que a presença de três segmentos que sofrem *splicing* alternativo na região intracelular de ligação entre os domínios I-II (exons *i, a, b*) e II-III (exons *e, f, h*), aponta para um papel modulatório destas regiões. Davies et al. (2007b) sugerem que estas regiões, intracelulares, seriam sítios de fosforilação e, portanto, responsáveis por modular a sensibilidade do canal. Curiosamente, em *An. gambiae*, a região de *splicing* e não foi identificada nas sequências de cDNA ou genômica, o que pode ter um significado adaptativo.

Com relação aos exons mutuamente exclusivos *c/d*, seus aminoácidos são altamente conservados, sugerindo função importante. Compreendem parte da região crítica do sensor de voltagem do

domínio II (IIS4), mais a região de ligação intracelular entre IIS4-S5 e a hélice IIS5. A ausência de um destes exons em algumas espécies pode ter influência direta sobre a resistência a piretróides, já que é nesta região que ocorre a mutação *super-kdr* (M918T), como será discutido adiante.

Os exons mutuamente exclusivos *k/l* incluem a região sensível à voltagem do domínio III do  $Na_v$ , tendo portanto potencial relação seletiva com as propriedades de abertura/fechamento do canal (ver Figura 7). As duas variantes de barata, *BgNav1.1a*<sup>1</sup> (que contém o exon *l*) e *BgNav1.1b*<sup>2</sup> (que contém o exon *k*), exibiram diferentes propriedades eletrofisiológicas quando expressas em sistema heterólogo em oócitos da rã *Xenopus laevis*. A variante *BgNav1.1b* foi 100X mais resistente à deltametrina do que a *BgNav1.1a*. Isto porque neste exon, na posição 1.356 do gene  $Na_v$ , existe uma Ala que contribui para a baixa sensibilidade à deltametrina dos canais *BgNav1.1b* (o aminoácido correspondente no *BgNav1.1a* é Val) (Du et al. 2006). Variações nesta posição também são encontradas entre os Diptera: exon *k* contém Ser em *Drosophila* e *Musca* ou Val em mosquitos; exon *l* contém Val em *Drosophila*, Ala em *Musca* ou Cys em mosquitos (Davies et al. 2007a).

#### 1.6.2. Edição de RNA no gene de canal de sódio regulado por voltagem

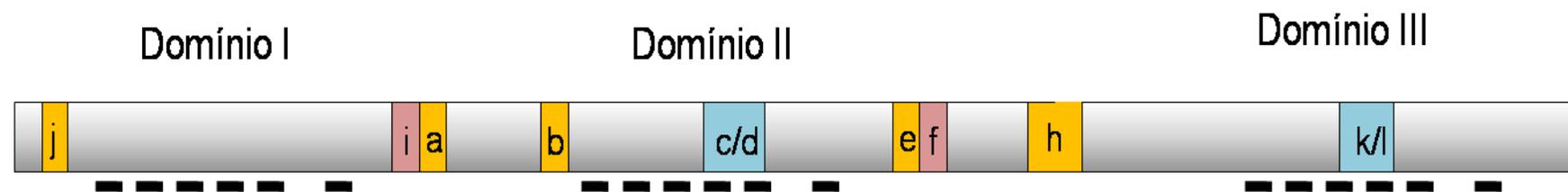
A edição de RNA tem papel importante na regulação da diversidade protéica e da expressão gênica. Trabalhos recentes mostram participação da edição de RNA na retirada de exons em sítios de *splicing* alternativo, no antagonismo a RNAi, na modulação do processamento de RNAm e na criação de novos exons (para revisão, veja Yang et al. 2008). O processo mais comum envolve a conversão dos nucleotídeos adenosina (A) em inosina (I) no RNA via ação da enzima ADAR (do inglês *Adenosine deaminase acting on RNA*) (Bass 2002, Maas et al. 2003). Está bem aceito que o processo de edição de RNA na síntese de proteínas pré-sinápticas e de canais iônicos é fundamental para as funções normais do sistema nervoso. O evento de edição de RNA mais conservado em insetos conhecido até hoje ocorre no gene de  $K_v2$ , observado em insetos de sete ordens distintas, que leva à substituição Ile/Val em sítio conservado entre as espécies. Com relação ao  $Na_v$ , foi sugerido que edição de RNA seja o principal mecanismo regulatório que modula as funções deste canal (Liu et al. 2004). Trabalho recente mostrou, para seis variantes do *DmNav* originadas por *splicing* alternativo, que não houve alteração das propriedades do canal de sódio em *Drosófila*; foi sugerido que o papel principal na modulação das propriedades do canal seria exercido pela edição de RNA (Olson et al. 2008). Dez sítios de edição de RNA A/I foram observados no *DmNav*, com regulação sugerida ao longo do desenvolvimento (Palladino et al. 2000). Estes sítios são bastante conservados em vários organismos. Edição do tipo U/C, que é mais frequentemente encontrada em mitocôndrias e plastídeos de vegetais superiores, foi também observada no *DmNav* e no *BgNav*, promovendo alterações eletrofisiológicas no canal em ambos os casos (Liu et al. 2004).

---

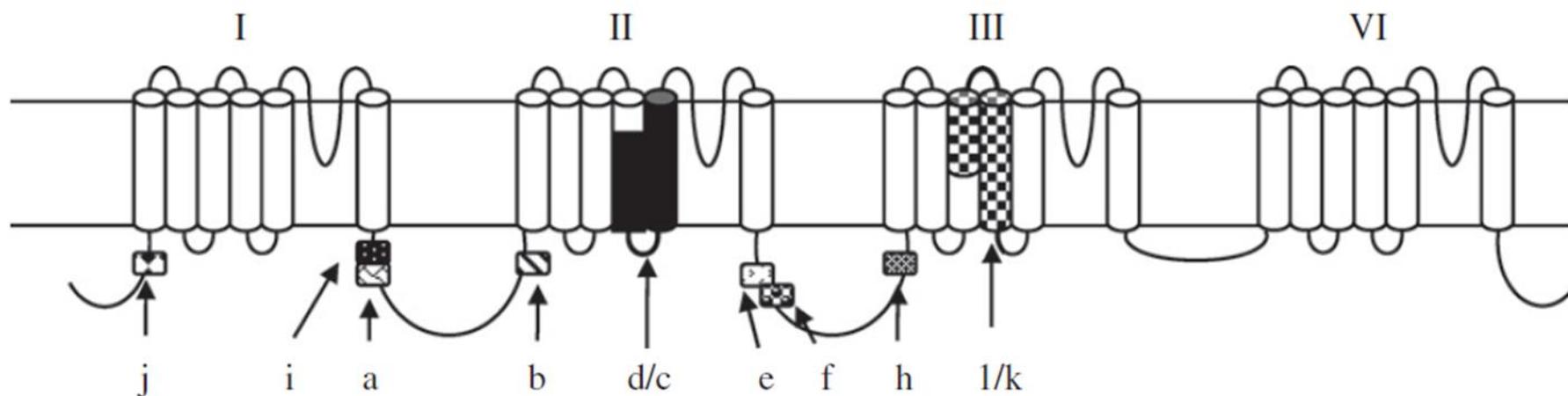
<sup>1</sup> A denominação acima está de acordo com a nomenclatura sugerida por Goldin (2000). No texto original esta variante é apresentada como *BgNav1.1*

<sup>2</sup> A denominação acima está de acordo com a nomenclatura sugerida por Goldin (2000). No texto original esta variante é apresentada como *BgNav1.2*.

A



B



**Figura 7:** Posições onde ocorre splicing alternativo no gene do canal de sódio em insetos. **A** - Representação geral dos exons alternativos do canal de sódio de insetos. Esquema dos domínios I a III do gene  $Na_v$  representando a disposição dos exons opcionais (laranja ou vermelho) e mutuamente exclusivos (azul). A região dos segmentos transmembranares (S1-S6) estão indicadas pelas barras em preto sob o esquema. Adaptado de Davies et al. (2007b). **B** - Diagrama esquemático do canal de sódio de *D. melanogaster* (*DmNav*), indicando a posição dos exons alternativos, onde c/d e l/k são exons mutuamente exclusivos e os restantes, opcionais. Esquema reproduzido de Olson et al. (2008).

A edição de RNA deve, portanto, gerar canais com diferentes afinidades a inseticidas. Como exemplo, foi observada edição de RNA no gene que codifica o receptor GABA de *D. melanogaster*, alterando sua sensibilidade ao inseticida piretróide fipronil (Es-Salah et al. 2008). Deste modo, parece razoável sugerir que pode haver seleção para o mecanismo que modula a edição de forma tempo/espço específica, em resposta adaptativa à pressão exercida por inseticidas. Em *Ae. aegypti*, contudo, análise recente dos transcritos do *AaNav* de uma linhagem resistente ao piretróide permetrina, não detectou indícios de edição de RNA (Chang et al 2009).

### 1.7. Mutações no canal de sódio e resistência a piretróide

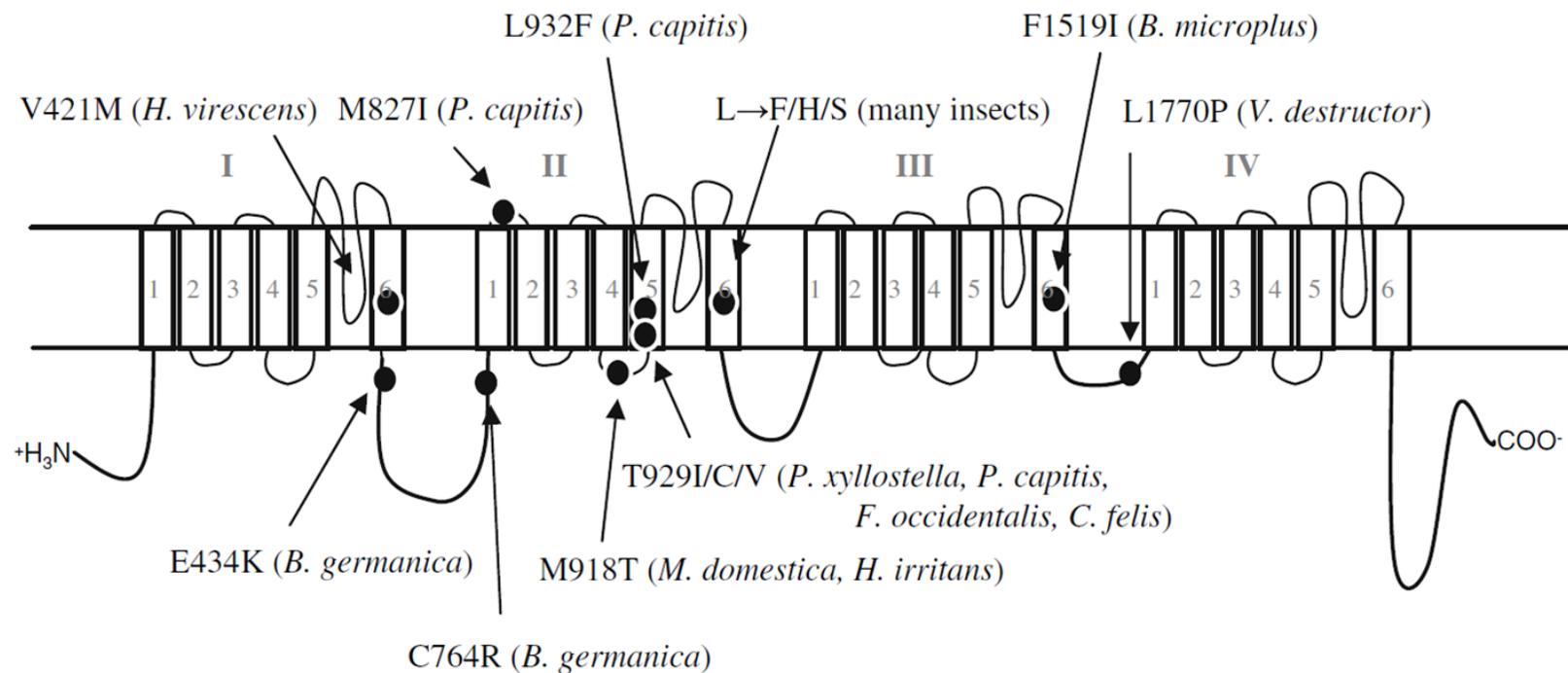
A primeira mutação identificada com ligação ao fenótipo *kdr* foi a substituição de uma leucina por uma fenilalanina (Leu1014Phe)<sup>3</sup> no segmento S6 do domínio II do gene *Nav* de *M. domestica* (ver Figura 5) (Ingles et al. 1996). A partir dessa descoberta, a sequência da região IIS6 passou a ser estudada em uma série de insetos. Em muitos, a mesma substituição foi observada. Em populações de *An. gambiae* foram observadas duas mutações no sítio 1014, de Leu para Phe ou Ser. Estas são respectivamente encontradas em populações africanas mais a oeste e mais a leste, sendo por isso referidas por alguns autores como mutações *w-kdr* e *e-kdr*, de *West*, oeste e *East*, leste (Pinto et al. 2006). Nesta mesma posição já foi também observada a mudança para uma His, em *H. virescens* (Park & Taylor 1999).

Vários estudos identificaram uma série de substituições adicionais. A maioria está localizada na região de ligação dos segmentos S4/ S5 e nos segmentos S5 e S6 do domínio II. Uma compilação das substituições observadas no *Nav* de várias espécies foi recentemente apresentada por Davies et al. (2007b) e Dong (2007) (Figura 8).

É importante destacar que várias mutações aqui mencionadas não estão no sítio de ligação do inseticida, mas em regiões que regulam as propriedades de condução do Na<sup>+</sup>. Por outro lado, é provável que alterações no sítio de ligação do piretróide gerem fenótipo tipo *super-kdr*, que tem efeito bem mais acentuado na resistência (Davies et al. 2007b). Este efeito foi primeiramente percebido também em *M. domestica* (Williamson et al. 1996) e em seguida na mosca do chifre *H. irritans* (Guerrero et al. 1997). Nestas espécies, moscas com outra mutação (Met918Thr) além da Leu1014Phe apresentaram razão de resistência a piretróides muito maior, ficando a Met918Thr conhecida como a mutação *super-kdr* (Jamroz et al. 1998). Vale ressaltar que esta mutação só é encontrada em indivíduos que possuem a Leu1014Phe. Dessa forma, seus efeitos isolados não são conhecidos.

---

<sup>3</sup> A numeração indicada se refere à posição da sequência primária de aminoácidos do canal de sódio de *M. domestica* Vssc1, de acordo com convenção (Soderlund & Knipple 2003a).



**Figura 8:** Esquema representativo das posições de ocorrência de mutações no canal de sódio de insetos. Apenas as mutações com relação confirmada com a resistência a piretróides estão indicadas (pontos pretos). As mutações estão numeradas de acordo com a sequência primária do canal de sódio de *M. domestica* (M827I, M918T, T929I e L932F), *B. germanica* (E434K, C764K e F1519I), *H. virescens* (V421M) e *V. destructor* (L1770P). Figura extraída da revisão de Dong (2007).

A Met918Thr ocorre nos exons mutuamente exclusivos *c/d* (figura 7-B). Desta forma, a opção por um ou outro exon pode ser fundamental para a resistência a piretróide. Para que o fenótipo de resistência ocorra, é necessário que ambos os exons, “*c*” e “*d*”, tenham a mutação. Alternativamente, se apenas um dos exons apresentar a mutação, é necessário então que somente este seja expresso. Este é o caso de *M. domestica*, espécie na qual o exon *c* contém um *stop codon*, de forma que todos os transcritos funcionais são derivados somente do exon *d* (Lee et al. 2002). Portanto, em *M. domestica* uma mutação no exon *d* seria suficiente para assegurar que todos os canais de sódio funcionais do indivíduo contivessem a Met918Thr (Davies et al. 2007a). Ou seja, esta mutação, assim como outras no mesmo sítio, como a Met918Val em *Bemisia tabaci*, deve somente ser selecionada em espécies na qual *splicing* alternativo no *locus* dos exons *c/d* produza canais funcionais a partir de apenas um destes exons exclusivos (Soderlund & Knipple 2003). Em *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis* e *T. castaneum*, um dos exons (*c* ou *d*) também não é codificado, tal qual em adultos de *An. gambiae* (apenas o exon *d* foi observado em cDNAs, mesmo o *c* sendo potencialmente transcrito). Embora até hoje mutação equivalente à *super-kdr* não tenha sido observada em nenhum mosquito, foi sugerido que a mutação Leu932Phe, em associação com a mutação Ile936Val em *Culex*, possa ser o primeiro exemplo de *super kdr* neste grupo (Davies et al. 2007a).

Substituições no sítio 929, no domínio IIS5, também têm envolvimento com resistência a piretróide. Na Lepidoptera *Plutella xylostella* a substituição Thr929Ile, detectada em associação com a Leu1014Phe, conferiu maior resistência a piretróides (Schuler et al. 1998). Na mesma posição, foram detectadas as substituições Thr/Cys e/ou Thr/Val na traça *Frankliniella occidentalis* (Forcioli et al. 2002) e na pulga *Ctenocephalides felis* (Bass et al. 2004). Ainda nesta posição foi observada a substituição Thr/Ile no piolho *Pediculus humanus capitis*, neste caso acompanhada da mutação Leu932Phe (Lee et al. 2000). Embora muitas substituições tenham sido observadas, a relação da maioria com alteração na afinidade por DDT ou piretróide é apenas especulativa. Análises computacionais recentes sugerem modelos tridimensionais para a região do poro do canal de sódio de *Drosophila*, que facilitam a indicação de possíveis sítios de interação do canal com outras moléculas, como os piretróides (O'Reilly et al. 2006).

Em *Ae. aegypti* a clássica mutação *kdr* Leu1014Phe não foi observada, diferentemente de outros mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Culex*. No domínio II do *AaNav* foram reveladas alterações em quatro sítios distintos: 923, 982, 1011 e 1016. Mais recentemente, identificou-se outra substituição, no *P-loop* do domínio IV: Asp1794Tyr (Tabela 1).

Anteriormente, foi detectada a substituição Ile1011Met em populações do Nordeste e do Sudeste do Brasil (Martins 2005). Na população de Natal (RN), esta substituição esteve em maior frequência entre os indivíduos resistentes ao piretróide cipermetrina. Ensaio eletrofisiológicos observaram que indivíduos de Belém (PA), com a substituição Ile1011Met em combinação com a Gly923Val e uma população do vetor oriunda do Vietnã com a substituição Leu982Trp apresentaram menor sensibilidade a piretróides (Bregues et al. 2003). Estes mesmos ensaios não revelaram alteração em população da Indonésia, com a substituição Val1016Gly (Bregues et al. 2003). Além da Ile1011Met,

outra substituição neste sítio, a Ile1011Val, foi observada em populações da América Latina e da Tailândia (Saavedra-Rodriguez et al. 2007, Rajatileka et al. 2008). Contudo, ensaios de pressão de seleção com piretróides indicaram que substituições nesta posição não devem estar relacionadas com a resistência a piretróide (Saavedra-Rodriguez et al. 2007). O sítio 1016 apresentou alterações na América Latina, Val1016Ile, e na Ásia, Val1016Gly (Saavedra-Rodriguez et al. 2007, Rajatileka et al. 2008). Pressão de seleção em laboratório sobre populações de Cuba e do México elevou drasticamente a frequência do alelo 1016Ile em poucas gerações (Saavedra-Rodriguez et al. 2007).

### **1.8. Justificativa**

Iniciamos no país estudo sobre a diversidade molecular do *AaNav* na busca de característica diagnóstica que correlacionasse mutação no gene com resistência a piretróide, único adjuvante usado no país em escala nacional. Não encontramos a mutação classicamente associada à resistência a piretróides, a Leu1014Phe. Por outro lado, identificamos grande diversidade molecular nas populações naturais de *Ae. aegypti*, e ausência de relação entre os alelos encontrados e resistência a piretróide, como tão bem estabelecido para outros mosquitos e insetos. Fez-se necessário estudar um número maior de indivíduos e populações distintas, com diferentes níveis de susceptibilidade ao inseticida, na busca da relação entre variantes alélicas do *AaNav* e resistência. Adicionalmente, pressão de seleção com inseticida, sob condições controladas no laboratório, nos permitiu avaliar, além da dinâmica das frequências alélicas, o efeito da resistência no *fitness* do inseto ao longo das gerações. Embora a literatura recente corrobore nossos novos achados - forte relação entre a mutação Val1016Ile e a resistência a piretróide, a segregação dos alelos do *AaNav* nas populações naturais tem se mostrado de alta complexidade. Portanto, além do conhecimento das variedades alélicas envolvidas com a resistência, é também necessário compreender sua herança e dinâmica evolutiva nas populações.

## 2 – Objetivos

**Objetivo geral:** estudo da diversidade do gene de canal de sódio em populações brasileiras de *Aedes aegypti*

**Objetivos específicos:**

- 1) *Clonagem e sequenciamento da região entre os exons 20 e 21 de indivíduos de cinco populações distintas e da cepa referência Rockefeller*
- 2) *Tipagem molecular dos sítios 1011 e 1016 do AaNa<sub>v</sub>, através de PCR alelo-específica, de indivíduos de 15 populações distintas*
- 3) *Correlacionar os alelos mutantes com a resistência, através de comparação de frequência dos fenótipos moleculares dos sítios 1011 e 1016 entre indivíduos resistentes e susceptíveis, em cinco populações naturais*
- 4) *Investigação de suspeita de duplicação gênica n AaNa<sub>v</sub>*
- 5) *Estudo através de pressão de seleção em laboratório da influência da resistência a piretróide na dinâmica evolutiva de populações de Ae. aegypti.*

### 3 – Resultados

#### **3.1 – Voltage-Gated Sodium Channel Polymorphism and Metabolic Resistance in Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* from Brazil**

Trabalho publicado no periódico *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.

Este artigo traz os resultados da nossa primeira incursão na problemática no gene do canal de sódio do *Aedes aegypti*. A tentativa inicial foi localizar a ocorrência da mutação Leu1014Phe, classicamente referida como “a mutação *kdr*” em mosquitos, moscas e outros insetos. Não observamos aquela mutação, mas apresentamos aqui o primeiro panorama da diversidade alélica da região IIS6 do *AaNa<sub>v</sub>* de populações brasileiras. Propusemos uma classificação destes alelos, baseados na ocorrência de polimorfismo no íntron da região sequenciada e na presença de uma substituição (Ile/Met) no sítio 1011. Tentamos ainda correlacionar os diferentes tipos de sequências observados com a resistência a piretróide.

## Voltage-Gated Sodium Channel Polymorphism and Metabolic Resistance in Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* from Brazil

Ademir Jesus Martins, Rachel Mazzei Moura de Andrade Lins, Jutta Gerlinde Birgitt Linss, Alexandre Afranio Peixoto, and Denise Valle\*

Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ, Brazil;  
Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro – RJ, Brazil;  
Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro – RJ, Brazil

**Abstract.** The nature of pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* Brazilian populations was investigated. Quantification of enzymes related to metabolic resistance in two distinct populations, located in the Northeast and Southeast regions, revealed increases in Glutathione-S-transferase (GST) and Esterase levels. Additionally, polymorphism was found in the IIS6 region of *Ae. aegypti* voltage-gated sodium channel (*AaNa<sub>v</sub>*), the pyrethroid target site. Sequences were classified in two haplotype groups, A and B, according to the size of the intron in that region. Rockefeller, a susceptible control lineage, contains only B sequences. In field populations, some A sequences present a substitution in the 1011 site (Ile/Met). When resistant and susceptible individuals were compared, the frequency of both A (with the Met mutation) and B sequences were slightly increased in resistant specimens. The involvement of the *AaNa<sub>v</sub>* polymorphism in pyrethroid resistance and the metabolic mechanisms that lead to potential cross-resistance between organophosphate and pyrethroids are discussed.

### INTRODUCTION

Dengue plagues more than 100 countries inhabited by 2.5 billion people. Every year 20–100 million new cases of classic dengue and 500,000 cases of dengue hemorrhagic fever are responsible for approximately 24,000 deaths. The affected areas are mainly concentrated in tropical and subtropical regions, as dengue is endemic in Latin America, Africa, Eastern Mediterranean, Southeast Asia, and Western Pacific.<sup>1</sup> In Brazil during the last two decades, dengue has increased both in number and severity of cases, the dissemination of the vector populations, the mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792), being the principal cause of this scenario.<sup>1,2</sup> *Aedes aegypti* is also the urban yellow fever vector, another disease that threatens the country because of the growing human occupation of sylvatic areas, where the yellow fever virus may circulate.<sup>3</sup> Dissemination of the mosquito is due in part to the emergence of insecticide resistant populations. However, because an effective dengue vaccine is not yet available, insecticides still play a major role in vector control.<sup>4</sup> The major classes of insecticides for vector control act on different targets of the central nervous system, leading to malfunctions in nerve impulse transmission and consequent death. Organophosphates (OP) and carbamates bind to the Acetylcholinesterase (ACE) enzyme at the cholinergic synapses. Pyrethroids and the organochlorine DDT have affinity for the  $\alpha$ -subunit of the voltage gated sodium channel ( $Na_v$ ), preventing its operation and resulting in repetitive firings of nerve cells.<sup>5</sup>

In Brazil, the OP temephos has been used as a larvicide since 1967, with the introduction of pyrethroids (PY) in 2000 for the control of adults. Resistance to both classes of insecticides has developed throughout the country.<sup>6–9</sup>

Two mechanisms are mainly responsible for insecticide resistance. The first is an increased activity of detoxifying enzymes known as metabolic resistance. The key enzymes associated to metabolic resistance are Esterases, Glutathion-S-transferases (GST), and Mixed-Function Oxydases (MFOs or P450). The

second mechanism is a consequence of structural changes in the insecticide target site in the central nervous system, leading to a decreased affinity for the insecticide.<sup>10</sup>

Binding of PY insecticides to  $Na_v$  provoke the phenomenon known as *knockdown*, defined as “rapid and involuntary movements, followed by paralysis and death.”<sup>11,12</sup> Phenotype *knockdown resistance (kdr)* was first documented in a strain of *Musca domestica* resistant to DDT,<sup>13</sup> later being established that the *kdr* phenotype was linked to the  $Na_v$  gene of that species.<sup>14,15</sup> The same was observed in other insect pests and disease vectors, such as *Haematobia irritans*,<sup>16</sup> *Heliothis virescens*,<sup>17</sup> *Blattella germanica*,<sup>18</sup> and *Ae. aegypti*.<sup>19</sup>

Structurally, the  $Na_v$  has four homologous domains (I–IV), each of which is composed of six hydrophobic segments (S1–S6).<sup>20</sup> The  $Na_v$  sequence is highly conserved among animals, and because of its physiologic role, there are few viable mutations in this molecule.<sup>21</sup> The *kdr* phenotype is related to the same point mutation in a variety of species from different orders: the replacement Leu1014Phe (numbering based on the primary sequence from *M. domestica*) in the segment IIS6.<sup>22</sup> Another mutation (Met918Thr), referred to as *super kdr*, exists always in the presence of the classic *kdr*, and was found in the *H. irritans* horn fly and in *M. domestica*, increasing pyrethroid resistance more than 1,000 times.<sup>23</sup> High throughput techniques based on allelic-specific polymerase chain reaction (PCR) and real time PCR have been adopted for the diagnosis of classic *kdr* mutation in a number of insect species.<sup>24–26</sup> In addition to this well-known mutation, others have been described in some insect populations resistant to PY and/or DDT. Nevertheless, in many cases their relation with resistance remains to be determined, as extensively revised.<sup>27,28</sup>

In *Ae. aegypti*, although the Leu1014Phe substitution has not been found, other replacements in the IIS5–S6 region are reported: Gly923Val, Leu982Trp, Ile1011Met, Ile1011Val, Val1016Ile, and Val1016Gly.<sup>29,30</sup> The Ile1011Met substitution was found in a Brazilian population from Belém, PA, with low sensitivity to pyrethroid as measured by an electrophysiologic assay.<sup>29</sup> Nevertheless, selection pressure with pyrethroids in the laboratory strongly suggested that the *kdr* mutation in *Ae. aegypti* is the Val1016Ile.<sup>30</sup> It was recently reported that the substitution Asp1794Tyr, out of domain II, together with the known Val1016Gly is also related to pyrethroid resistance.<sup>31</sup>

\*Address correspondence to Denise Valle, Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro-RJ, CEP: 2104-900, Brazil. E-mail: dvalle@ioc.fiocruz.br

We adapted a protocol based on procedures from Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and World Health Organization (WHO),<sup>22,23</sup> which measures changes in the activity of the enzymes involved in metabolic resistance and ACE, the target of OP.<sup>24</sup> Even though large scale tools to detect those described mutations in the *AaNa<sub>v</sub>* 1011 and 1016 sites are available,<sup>25</sup> it is necessary to evaluate the *AaNa<sub>v</sub>* polymorphism and possible mutations and their actual role in PY resistance in the monitored localities. Herein, we report the analysis of the metabolic resistance and molecular variation in the *AaNa<sub>v</sub>* for dengue vector populations of two distinct Brazilian regions.

#### MATERIALS AND METHODS

**Samples.** The *Aedes aegypti* Rockefeller strain was adopted as the insecticide-susceptible control for biochemical and molecular assays. *Aedes aegypti* field populations were collected according to recommendations of the Brazilian *Aedes aegypti* Insecticide Resistance Monitoring Network (MoReNAa), as described elsewhere.<sup>26</sup> Two other *Aedes* species, *Aedes albopictus* and *Ochlotrotatus fluviatilis* (also referred as *Aedes fluviatilis*), kindly provided by the Laboratório de Transmissores de Hematozoários/ IOC/FIOCRUZ, were adopted for comparison of sodium channel sequences.

Initial analysis of the *AaNa<sub>v</sub>* variability was performed with vector populations from cities in Brazilian Southeast (Rio de Janeiro and Nova Iguaçu, both in Rio de Janeiro State) and Northeast (Maceió, in Alagoas State) regions. All other assays were carried out exclusively with populations from Natal (in Rio Grande do Norte State, Northeast Brazil) and Nova Iguaçu (Figure 1). Both are resistant to the larvicide OP temephos and PY used as an adulticide in the country: Natal and Nova Iguaçu populations exhibit temephos RR<sub>25</sub> of 12.8 and 18.6, respectively<sup>26</sup>; the pyrethroid cypermethrin kills 59% and 61.4% adults from Nova Iguaçu and Natal populations, respectively.<sup>27,28</sup> For both populations, males and females were used respectively to evaluate *AaNa<sub>v</sub>* polymorphism frequency

and to perform enzymatic assays to quantify the activity of enzymes involved in metabolic resistance.

**Bioassays.** Adult females were exposed for 1 hour to 250 mL glass bottles impregnated with 2 µg of cypermethrin (cypermethrin 250CE; Vectocell, São Paulo, Brazil), adapted according to the CDC protocol. The females that survived after a 24 hour recovery period were considered resistant, as previously standardized.<sup>27</sup>

**Molecular assays.** The DNA from individual adult mosquitoes was extracted in 200 µL of "squishing buffer" (2 mM EDTA, 0.2% Triton X-100, and 10 mM Tris-HCl pH 8.2), according to Jowett<sup>29</sup> with slight modifications. Primers were designed based on the alignment of the IIS6 region, partially encompassing exons 20 and 21, obtained from *AaNa<sub>v</sub>* cDNA (GenBank accession no. AF534112) and the *Drosophila melanogaster* orthologous genomic DNA sequence (GenBank accession no. M32078): 5'-ACAATGTGGATCGCTTCCC-3' and 5'-TGGACAAAAGCAAGGCTAAG-3'.

Molecular analysis was performed in three steps. 1) We aimed to obtain a general picture of the *AaNa<sub>v</sub>* polymorphism in Brazilian populations. To accomplish this, DNA pools of 10 females of distinct *Ae. aegypti* populations were amplified. For each PCR reaction, 4–5 clones (see later) were sequenced. The same was performed with *Ae. albopictus* and *O. fluviatilis* female mosquitoes. The *Ae. aegypti* Rockefeller strain was also submitted to the same procedure but with a pool of 100 females and 89 clones. These were analyzed to detect any possible rare variants segregating in the susceptible strain. 2) Our objective was to investigate, in distinct localities, the *AaNa<sub>v</sub>* frequency of the sequences previously detected. Two distinct Brazilian localities were chosen (Natal and Nova Iguaçu), and one pool of 405 males was amplified for each population. In both cases, roughly 100 individual clones were analyzed. 3) The *AaNa<sub>v</sub>* frequency of distinct sequences was compared between PY resistant and non-resistant mosquitoes. In this case, females of one population (Natal) were exposed to cypermethrin as indicated previously. Pools of respectively 340 and 541 cypermethrin resistant and susceptible females were amplified, approximately 100 clones of each group being analyzed. It is worth mentioning that in all cases, pools were composed of 1 µL DNA per individual.

The PCR was conducted in 40 µL with high fidelity *Pfu* polymerase (Biotools, Madrid, Spain), according to manufacturer instructions, supplemented by 1 µL of DNA and 1 µM of each primer. Reactions were achieved in a thermocycler for 3 minutes at 94°C for initial denaturation, followed by 35 cycles of 30 s at 94°C for denaturation, 30 s at 60°C for annealing, and 60 s at 72°C for polymerase extension. Electrophoresis of 10 µL aliquots of the PCR products in 2.0% agarose gels confirmed amplification. The PCR products were purified in S-400 microcolumns (GE Healthcare, UK) according to manufacturer instructions and cloned with *pMos Blunt ended cloning kit* (GE Healthcare, UK). The DNA sequencing was carried out in an ABI377 Sequencer with the Big Dye 3.1 Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK). Sequence analysis was performed using the GCG software package (Wisconsin Package version 10.2, Genetics Computer Group [GCG], Madison, WI) and MEGA version 3.1.<sup>30</sup> Because we sequenced PCR cloned fragments, only changes in at least two sequences were considered, as some of the singletons might represent PCR-induced mutations. Sequences have been submitted to Genbank (accession nos. FJ479609–FJ47615).

**Enzymatic assays.** Enzymatic assays were performed with snap frozen adult females, one day post emergence to quantify



FIGURE 1. Brazilian map. Localization of Brazilian regions and states (light gray and detail) and cities where *Aedes aegypti* populations were collected, in Northeast (NE) and Southeast (SE) regions.

GST, Esterases, and ACE activities. Esterases were quantified with three distinct substrates:  $\alpha$ -naphthyl acetate ( $\alpha$ -NA),  $\beta$ -naphthyl acetate ( $\beta$ -NA), and para-nitrophenylacetate (*p*-NPA). Individual females were analyzed in duplicate for all the enzymes simultaneously, absorbance determined with a ThermoMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The procedures were precisely the same described elsewhere.<sup>24,28</sup> Females from the Rockefeller strain were used as the susceptibility control. Enzymatic-specific activities were classified according to already established criteria, for a given population the percentage of specimens with activity higher than percentile 99 of the Rockefeller strain: 0–15% (unaltered activity), 15–50% (altered), more than 50% (highly altered).<sup>28</sup>

Additionally, because all the enzymes were quantified in each individual homogenate, it was possible to perform a posterior correlation analysis.

RESULTS

**Molecular variation in the IIS6 region of *AaNa<sub>v</sub>*.** A fragment, including parts of exons 20 and 21 and the intervening intron of the *AaNa<sub>v</sub>*, was sequenced from cypermethrin resistant mosquitoes from Brazilian Southeast and Northeast regions as well as those of the susceptible Rockefeller strain. Two types of introns were detected, with pronounced differences in both sequence and size (see alignment in Figure 2).

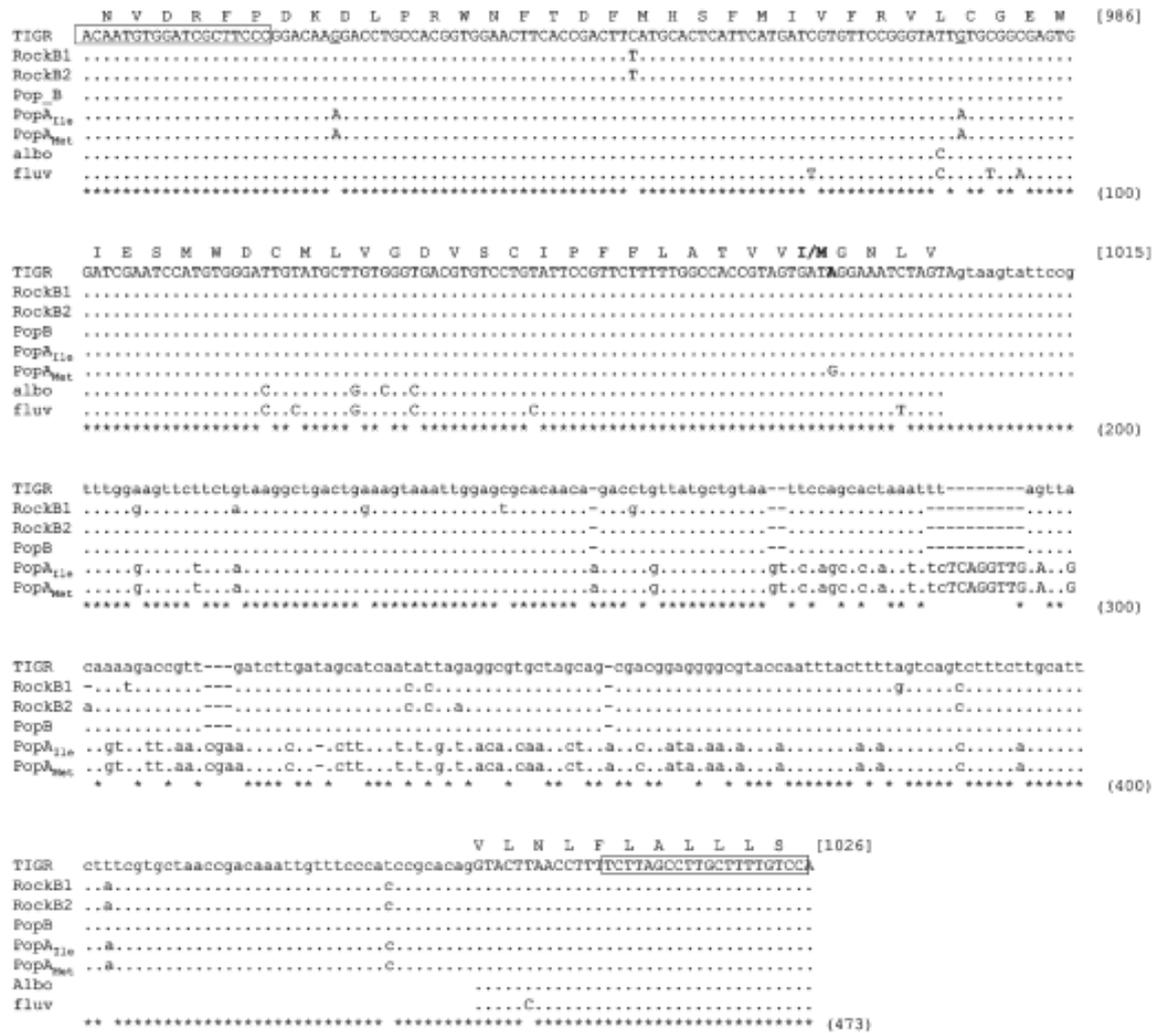


FIGURE 2. Sequence diversity in the *AaNa<sub>v</sub>*, IIS6 region of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Aedes fluviatilis* strains. Nucleotides in upper-case letters correspond to the coding region; those in lower case refer to the intron. Nucleotide numbering, in parenthesis, at the bottom of each block, refers to the sequence shown in the alignment. The numbering of amino acids (between brackets and at the top of each block) is in accordance with the primary sequence of the VSC1 *Musca domestica* protein, as usually presented. The site corresponding to the predicted replacement Ile/Met at codon 1011 is in bold. *Aedes aegypti* sequences were classified as A or B (see text). Sequences were further named Ile or Met according to the amino acid at position 1011. Nucleotides at positions 26 and 89, underlined, are synonymous polymorphic sites that differ between A and B sequences. Only the coding regions of *Ae. albopictus* (albo) and *O. fluviatilis* (fluv) are shown. The TIGR corresponds to the sequence obtained from *Ae. aegypti* genome project, RockB1 and RockB2 are Rockefeller sequences; PopB, PopA<sub>11e</sub>, and PopA<sub>Met</sub> are sequences of the populations studied here. Boxed regions indicate primer positions. Invariable sites are indicated with \*.

Based on intron length differences, sequences were classified in haplotype groups A (250 pb) and B (234 pb). Additionally, two synonymous transitions (a → g) in exon 20, positions 26 and 89, separate the sequences of groups A and B. Rockefeller sequences were all allocated to group B. Additional differences were observed in this strain, and the sequences obtained could be classified in two haplotypes (RockB1 and RockB2) (Figure 2).

Out of 33 sequences from resistant mosquitoes, 72.7% belong to group A. Although the classic *kdr* mutation (Leu1014Phe) was not detected, a predicted replacement Ile/Met in the codon 1011 (Ile1011Met) appeared in half of the group A sequences, denominated  $A_{Ile}$  or  $A_{Met}$ . No amino acid substitution was found in group B sequences. *Aedes albopictus* and *O. fluviatilis* exon sequences revealed some synonymous substitutions but no amino acid changes when compared with *Ae. aegypti* (Figure 2).

**Frequency of haplotypes in two field populations.** Analysis of *AaNa<sub>v</sub>* sequences from Nova Iguaçú and Natal confirmed the polymorphism described previously. Again, the Ile1011Met replacement was only found in group A. Frequencies of the three haplotypes ( $A_{Ile}$ ,  $A_{Met}$ , and B) did not differ significantly between Nova Iguaçú and Natal (Table 1), when tested separately or when pooled according to haplotype group (A or B) or amino acid at position 1011 (Ile or Met).

**Correlation between haplotypes and pyrethroid resistance.** Frequencies of the different *AaNa<sub>v</sub>* alleles were evaluated in resistant and susceptible females from Natal. Females were previously selected by pyrethroid exposure, as indicated in the Materials and Methods section. A total of 340 (38.6%) live (resistant) and 541 (61.4%) dead (susceptible) females were selected 24 hours after exposure to cypermethrin. We obtained 87 and 73 sequences from resistant and susceptible populations, respectively (Table 2). As before, the only predicted amino acid replacement was the Ile1011Met in sequences belonging to haplotype group A. Frequencies of the haplotypes differed between Natal resistant and susceptible groups (Table 2). Resistant mosquitoes presented higher frequencies of  $A_{Met}$  and B when compared with the susceptible group (Figure 3).

**Enzymatic assays.** The activity profile of Esterases, GSTs, and ACE was analyzed in 1-day-old adult females from Nova Iguaçú and Natal, both highly resistant to the organophosphate temephos.<sup>36</sup> No alteration in Acetylcholinesterase, the

TABLE 1

Haplotype frequencies in the IIS6 region of *AaNa<sub>v</sub>* in two Brazilian populations\*

	Nova Iguaçú		Natal		$\chi^2$ ; df; P
	n	n/total	n	n/total	
Haplotypes					2.194; 2; NS
$A_{Ile}$	12	0.143	6	0.073	
$A_{Met}$	32	0.381	36	0.439	
B	40	0.476	40	0.488	
Haplotypes (Pooling $A_{Ile}$ and $A_{Met}$ )					0.0224; 1; NS
Group A	44	0.524	42	0.512	
Group B	40	0.476	40	0.488	
Amino acid at site1011					0.364; 1; NS
Met	33	0.393	36	0.439	
Ile	51	0.607	46	0.561	
Total	84		82		

\*Data show the number of sequences (n) followed by its frequency (n/total), with  $\chi^2$  value, degrees of freedom (df) and significance (P) at 0.05 level. NS = not significant.

TABLE 2

Haplotype frequencies in the *AaNa<sub>v</sub>* IIS6 region in cypermethrin resistant and susceptible mosquitoes from Natal\*

	Natal-R		Natal-S		$\chi^2$ ; df; P
	n	n/total	n	n/total	
Haplotypes					28.390; 2; ***
$A_{Ile}$	7	0.080	31	0.425	
$A_{Met}$	41	0.471	28	0.384	
B	39	0.448	14	0.192	
Haplotypes (Pooling $A_{Ile}$ and $A_{Met}$ )					11.790; 1; ***
Group A	48	0.552	59	0.808	
Group B	39	0.448	14	0.192	
Amino acid at codon1011					1.722; 1; NS
Met	46	0.529	31	0.425	
Ile	41	0.471	42	0.575	
Total	87		73		

\*Natal-R and Natal-S indicate, respectively, surviving and dead Natal *Ae. aegypti* females resulting from 1 hour exposure to the pyrethroid cypermethrin followed by a 24 hour recovery. Sequence classification is the same as in Figure 2. Legend as in Table 1. NS = not significant; \*\*\* P < 0.001.

target site of organophosphates and carbamates, was detected (Figure 4, Table 3). With exception of Esterase with  $\beta$ -NA substrate in Nova Iguaçú, increased activity of Esterases was observed in both populations with all three substrates used (Figure 4, Table 3). Correlation analysis of Esterases with  $\alpha$ -NA and  $\beta$ -NA substrates displayed high and significant values for Nova Iguaçú, Natal, and Rockefeller (Table 4). The activity of GST was highly increased in both populations. Overall, the assays exhibited higher levels of enzyme activity in mosquitoes from Natal when compared with Nova Iguaçú (Figure 4).

DISCUSSION

All over the world, chemical insecticides are still the most widely used vector control strategy. Hence, monitoring of insecticide resistance is crucial to the long-term maintenance of this strategic tool.<sup>41</sup> Increased metabolic detoxification is the most common mechanism of insecticide resistance.<sup>10</sup> We researched the metabolic resistance mechanisms selected in mosquito populations from distinct localities (Natal and Nova Iguaçú) in Southeast and Northeast Brazil, resistant to the OP temephos and the PY cypermethrin.<sup>36-38</sup> Activities of Esterases, followed by GST, were altered in both populations. Regarding Esterases, we observed higher activity with substrate  $\alpha$ -NA than  $\beta$ -NA. The activity with the *p*-NPA substrate was also high for both populations. Differences of Esterase activity when  $\alpha$ -NA and  $\beta$ -NA are used remain unclear, because there

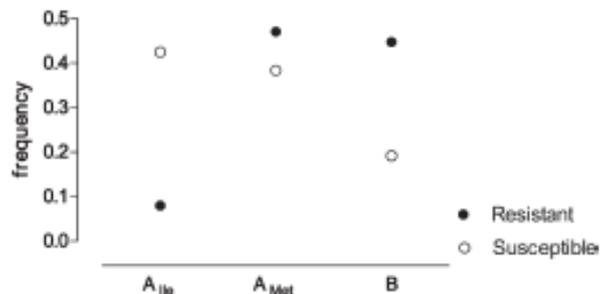


FIGURE 3. Haplotype frequencies in the *AaNa<sub>v</sub>* IIS6 region in cypermethrin resistant and susceptible mosquitoes from Natal.

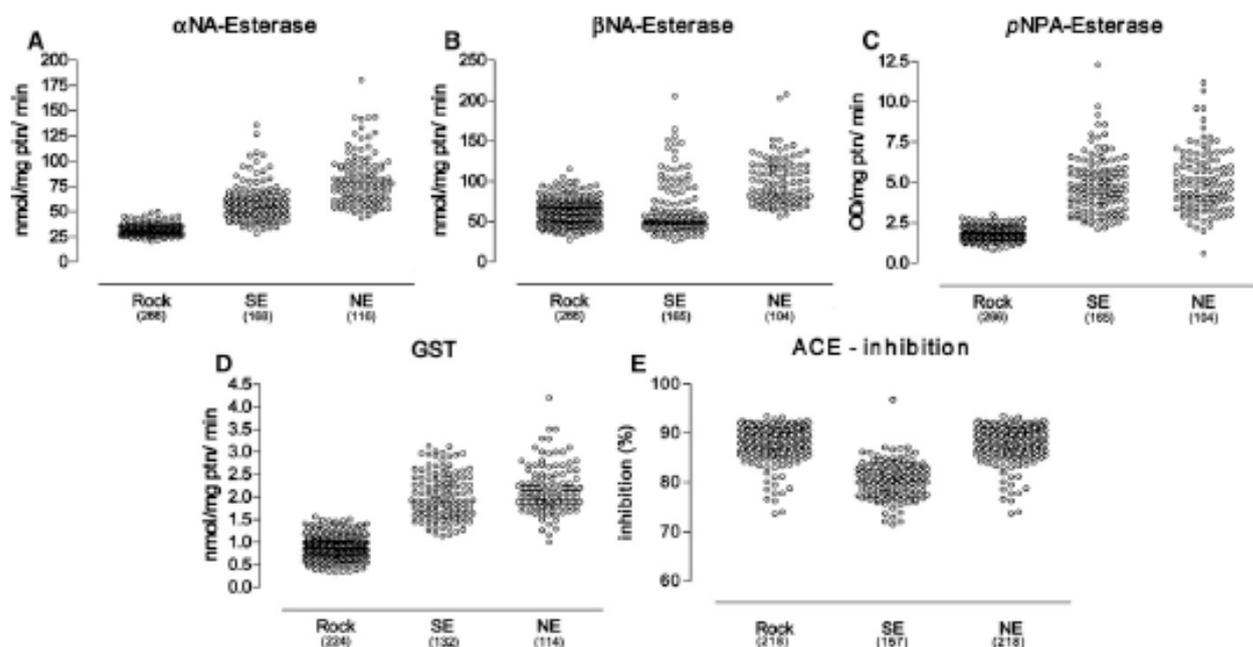


FIGURE 4. (A–E) The enzymes involved in the metabolic resistance and ACE are shown in the dot graphics for individual mosquitoes. A, B, and C represent the dot graphic of activity quantification for three different Esterase substrates. D is the quantification for GST enzyme activity and E to quantify the percentage of ACE inhibition. The number of samples used is indicated under the population name. The Rockefeller strain (Rock) values were used as control of susceptibility.

are high and significant correlations of these activities in both populations as well as in the Rockefeller strain. This suggests that the same substrates ( $\alpha$ -NA and  $\beta$ -NA) are being used by the same enzymes (for further discussions see Reference 38). The existence of different Esterases exhibiting co-regulated expression could also be hypothesized. Interestingly, a significant correlation between  $p$ -NPA and  $\alpha$ -NA or  $\beta$ -NA was observed only in the Nova Iguaçu population, suggesting that, compared with Natal, different Esterase might have been selected in that population.

The high Esterase activity with the  $p$ -NPA substrate in the Nova Iguaçu and Natal populations could be construed as indirect evidence of the Esterase role in PY resistance. This result corroborates a previous report that associates  $p$ -NPA Esterase activity increase with the introduction of PY in adult mosquito control in the country.<sup>10</sup> Regardless, PY hydrolysis by Esterase has not been observed in mosquitoes, although it has been experimentally evidenced in some arthropods, such as the tick *Boophilus microplus* and the aphid *Myzus persicae*.<sup>42,43</sup>

There has been an increase of GST activity in Nova Iguaçu and Natal populations, which are resistant to both OP and PY. The GST activity has also augmented in Brazilian *Ae.*

*aegypti* populations since PY introduction in field efforts of adult control, suggesting participation of this class of enzymes in PY resistance.<sup>38</sup> A recent microarray analysis with the "*Aedes detox chip*" indicates higher expression of particular GST genes.<sup>44</sup> To date, only one gene (*GST-2*),<sup>45</sup> out of the 26 known from the GST family has been incriminated as responsible for DDT and permethrin resistance in South American *Ae. aegypti* populations.<sup>46</sup> It has already been claimed that another gene, *GSTe2*, associated with *Ae. aegypti* and *An. gambiae* DDT resistance, might also participate in PY resistance.<sup>47</sup>

Because enzymes associated with metabolic resistance are general detoxifying agents, it was not possible to conclude whether their altered expression observed in Nova Iguaçu and Natal populations was the result of selective pressure with OP or PY. Recently developed procedures, based on quantitative trait loci (QTL) and microarray analyses, will certainly contribute to elucidate the specific *Ae. aegypti* detoxifying genes selected by PY pressure.<sup>44,48</sup>

Resistance to DDT and PY is linked to the sodium channel gene (*Na<sub>v</sub>*) locus in *Ae. aegypti*<sup>10</sup> and in a number of other

TABLE 3  
Frequencies (%) of specimens in Nova Iguaçu and Natal populations with enzyme activity higher than Rockefeller percentile 99 values\*

Enzyme assay	Nova Iguaçu	Natal
$\alpha$ -NA Est	75.2	99.1
$\beta$ -NA Est	12.7	44.2
$p$ -NPA Est	92.4	93.9
GST	86.3	94.8

\*The classification criteria follow: 0–15 (unaltered), < 15–50 (altered), > 50 (highly altered) (for these criteria details see Montella and others<sup>9</sup>).

TABLE 4  
Correlation analysis of Esterases activity after quantification with three different substrates\*

	Esterase ( $\beta$ -NA)			Esterase ( $p$ -NPA)		
	Rock	Nova Iguaçu	Natal	Rock	Nova Iguaçu	Natal
Esterase ( $\alpha$ -NA)	0.779 ***	0.815 ***	0.539 ***	-0.019 NS	0.637 ***	0.116 NA
Esterase ( $\beta$ -NA)				-0.001 NS	0.454 ***	-0.071 NS

\*Numbers represent Pearson correlation indexes. Codes below indicate significance at 0.05 level; NS = not significant; \*\*\*  $P < 0.001$ .

insect species.<sup>27,28</sup> In the 1980s, absence of metabolic changes together with DDT cross-resistance exhibited by some PY resistant *Ae. aegypti* populations, had already suggested the occurrence of mutations in the target site.<sup>46</sup> Hitherto, the vast majority of mutations in the  $Na_v$  of arthropods conferring resistance to DDT and PY, including the Leu1014Phe classic *kdr* mutation, occur in the IIS6 hydrophobic domain.<sup>27</sup>

Two mutations in the IIS5-IIS6 inter-segment region of Thai *Ae. aegypti* populations still remain to be effectively associated to resistance.<sup>30</sup> The same is true regarding four putative amino acid replacements in the IIS4-S6 segments of  $AaNa_v$  detected in *Ae. aegypti* samples from 13 different regions of the world.<sup>29</sup> As stated before, the substitution here described (Ile1011Met) has also appeared in a sample from Belém, a city of Pará State, in Northern Brazil. Nevertheless, its correlation with resistance was not confirmed after laboratory PY resistance selection of Mexico and Cuba populations. On the other hand, these authors pointed to a strong association between PY resistance and the Val1016Ile substitution,<sup>29</sup> not found in the Natal and Nova Iguaçu populations here described.

Based on the intron length polymorphism occurring in the IIS6 domain, the sequences here generated were grouped into two haplotype groups, A and B (Figure 2). Rockefeller, the laboratory strain usually adopted as a susceptible control, exhibited only B sequences, homologous to the one annotated in the *Ae. aegypti* genome project (Vector Based contig 1.186). A recent analysis of the molecular variation in the IIS6 region from some Latin American localities grouped  $AaNa_v$  sequences in three clades ("1," "2," and "3").<sup>29</sup> Based on the figure presented in that work, the A sequences should be located in the clade 2 and the B sequences in the clades 1 and 3.

Brazilian field populations have both haplotypes A and B, but the Ile1011Met replacement was observed only in haplotype A. In *Culex* mosquitoes, in addition to the classic *kdr* Leu1014Phe mutation,<sup>51</sup> there are multiple haplotypes of the  $Na_v$  associated to PY resistance.<sup>52</sup> Besides the Leu1014Phe mutation, different  $Na_v$  haplotypes were also observed in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* resistant to PY.<sup>53</sup>

Here, although the general profile of the  $AaNa_v$  haplotypes was distinct in both resistant and susceptible Natal mosquitoes, major differences emerged regarding  $A_{ne}$ , which was more frequent in the susceptible group and B sequences, present mainly in the resistant group (Figure 3). It is possible that the B haplotype, which lacks amino acid substitutions in the studied fragment, is hitchhiking some replacement in some other region of the gene. Alternatively, haplotype B could be associated to some form of transcriptional or post-transcriptional regulation of  $Na_v$  expression that would affect the sensitivity to PY. This hypothesis would not be surprising, because such a type of regulation of  $Na_v$  expression is common in insects.<sup>27</sup> However, there was no evidence of  $AaNa_v$  post-transcription regulation related to pyrethroid resistance in the only *Ae. aegypti* resistant strain studied hitherto.<sup>31</sup> In the *B. germanica* cockroach, RNA editing alters the channel sensitivity to a neurotoxin,<sup>54</sup> and alternative splice variants exhibit different sensitivities to PY.<sup>55</sup> Pyrethroid resistance derived from post-transcriptional regulation of *Cx. quinquefasciatus*  $Na_v$  has also been suggested.<sup>52</sup>

Brazilian populations of *Ae. aegypti* have been reported to be genetically structured with relatively little gene flow among them as well as different levels of insecticide resistance.<sup>56,57</sup>

Therefore, the fact that two localities in Northeast (Natal) and Southeast (Nova Iguaçu) Brazil separated by more than 1,200 miles (more than 1,900 km) share very similar haplotype frequencies in the  $AaNa_v$ , suggests that this polymorphism is under strong balancing selection. We are currently researching the prevalence of different haplotypes in the IIS6 region of the  $AaNa_v$  in other Brazilian localities and their relative contribution to PY resistance.

Received November 27, 2008. Accepted for publication March 10, 2009.

**Acknowledgments:** We are grateful to Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) for the intermediation in the collections of *Aedes aegypti* eggs in the localities here studied and to Ricardo Lourenço de Oliveira from the Laboratório de Transmissores de Hematozoários/IOC/FIOCRUZ for the donation of *Aedes albopictus* and *Aedes fluviatilis* specimens. We also thank José Bento Pereira Lima for bioassays assistance, Priscila Fernandes Medeiros Viana and Isabela Reis Montella de Carvalho for the assistance in the colorimetric biochemical assays. We are grateful to be able to count on the collaboration of the Plataforma Genômica - Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ. Finally, we thank the English revision performed by Mitchell Raymond Lishon, native of Chicago, IL, USA-UCLA, 1969.

**Financial support:** This work was supported by Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, Programa de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz, Vice-Presidência de Serviços de Referência e Ambiente/Fundação Oswaldo Cruz, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Financiadora de Estudos e Projetos do Rio de Janeiro, and the Howard Hughes Medical Institute.

**Authors' addresses:** Ademir Jesus Martins, Jutta Gerlinde Birgitt Linn, and Denise Valle, Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro-RJ, 2104-900, Brazil, Tel: +55-21-2580-6598, and Laboratório de Entomologia, Instituto de Biologia do Exército, Rua Francisco Manuel 102 Benfica, Rio de Janeiro-RJ, 20911-270, Brazil, Tel: +55-21-3895-2247, E-mails: ademirjr@ioc.fiocruz.br, jlins@ioc.fiocruz.br, and dvalle@ioc.fiocruz.br. Rachel Mazzei Moura de Andrade Lins and Alexandre Afranio Peixoto, Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro-RJ, 2104-900, Brazil, Tel: +55-21-3865-8231, E-mails: rllins@ioc.fiocruz.br and apeixoto@ioc.fiocruz.br.

## REFERENCES

- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR, 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 10: S98-S109.
- Braga IA, Mello CB, Montella IR, Lima JBP, Junior AJM, Medeiros PFV, Valle D, 2005. Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. *J Med Entomol* 42: 830-837.
- Barrett AD, Higgs S, 2007. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol* 52: 209-229.
- Townson H, Nathan MB, Zaim M, Guillet P, Manga L, Bos R, Kindhauser M, 2005. Exploiting the potential of vector control for disease prevention. *Bull World Health Organ* 83: 942-947.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H, 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 653-665.
- Braga IA, Lima JBP, Soares SD, Valle D, 2004. *Aedes aegypti* resistance to Temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 199-203.
- da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D, 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444.

8. Lima JBP, da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AKR, Soares SD, Braga IA, Ramos RP, Valle D, 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68: 329-333.
9. Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle D, 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467-477.
10. Hemingway J, Ranson H, 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 45: 371-391.
11. Busvine JR, 1951. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature* 168: 193-195.
12. Milani R, 1954. Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbatante del DDT: correlazione tra abbattimento e mortalità in *Musca domestica* L. *Riv Parassitol* 15: 513-542.
13. Harrison CM, 1951. Inheritance of resistance to DDT in the housefly, *Musca-Domestica* L. *Nature* 167: 855-856.
14. Knipple DC, Doyle KE, Marsellaherrick PA, Soderlund DM, 1994. Tight genetic-linkage between the kdr insecticide resistance trait and a voltage-sensitive sodium-channel gene in the house fly. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2483-2487.
15. Williamson MS, Denholm I, Bell CA, Devonshire AL, 1993. Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet* 240: 17-22.
16. McDonald PT, Schmidt CD, 1990. Linkage, expression, and distribution of the pyrethroid resistance gene in the horn fly (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol* 83: 1718-1722.
17. Taylor MFJ, Heckel DG, Brown TM, Kreitman ME, Black B, 1993. Linkage of pyrethroid insecticide resistance to a sodium-channel locus in the tobacco budworm. *Insect Biochem Mol Biol* 23: 763-775.
18. Dong K, Scott JG, 1994. Linkage of kdr-type resistance and the para-homologous sodium channel gene in german cockroaches (*Blattella germanica*). *Insect Biochem Mol Biol* 24: 647-654.
19. Severson DW, Anthony NM, Andreev O, French-Constant RH, 1997. Molecular mapping of insecticide resistance genes in the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *J Hered* 88: 520-524.
20. Catterall WA, 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26: 13-25.
21. French-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A, Anthony N, 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 1685-1693.
22. Soderlund DM, Knipple DC, 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 563-577.
23. Jamroz RC, Guerrero FD, Kammlah DM, Kunz SE, 1998. Role of the kdr and super-kdr sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). *Insect Biochem Mol Biol* 28: 1031-1037.
24. Anstead JA, Williamson MS, Eleftherianos L, Denholm I, 2004. High-throughput detection of knockdown resistance in *Myzus persicae* using allelic discriminating quantitative PCR. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 871-877.
25. Bass C, Nikou D, Donnelly MJ, Williamson MS, Ranson H, Ball A, Vontas J, Field LM, 2007. Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malar J* 6: 1-14.
26. Kulkarni MA, Rowland M, Alifrangis M, Mosha FW, Matowo J, Malima R, Peter J, Kweka E, Lyimo I, Magesa S, Salanti A, Rau ME, 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. *Malar J* 5: 56.
27. Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS, 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* 59: 151-162.
28. Soderlund DM, Knipple DC, 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 563-577.
29. Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J, 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* 17: 87-94.
30. Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black WC, 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 16: 785-798.
31. Chang C, Shen WK, Wang TT, Lin YH, Hsu EL, Dai SM, 2009. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 39: 272-278.
32. Brogdon WG, McAllister JC, 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J Am Mosq Control Assoc* 14: 159-164.
33. Hemingway J, 1998. *Techniques to Detect Insecticide Resistance Mechanisms (Field and Laboratory Manual)*. Geneva: World Health Organization.
34. Valle D, Montella IR, Medeiros PFV, Ribeiro RA, Martins AJ, Lima JBP, 2006. *Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em Aedes aegypti/Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in Aedes aegypti*. First edition. DF: Brasília.
35. Rajatileka S, Black WC, Saavedra-Rodriguez K, Trongtokit Y, Apiwathnasorn C, McCall PJ, Ranson H, 2008. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. *Acta Trop* 108: 54-57.
36. Lima JBP, da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AKR, Soares SD, Braga IA, Ramos RP, Valle D, 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68: 329-333.
37. da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D, 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444.
38. Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle D, 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467-477.
39. Jowett T, 1986. Preparation of nucleic acids. Roberts DB, ed. *Drosophila: A Practical Approach*. Oxford: IRL, 275-286.
40. Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150-163.
41. French-Constant RH, 2005. Something old, something transgenic, or something fungal for mosquito control? *Trends Ecol Evol* 20: 577-579.
42. Devonshire AL, Moores GD, 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic Biochem Physiol* 18: 235-246.
43. Hernandez R, Guerrero FD, George JE, Wagner GG, 2002. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1009-1016.
44. Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne SH, Hemingway J, Black WC 4th, Ranson H, 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 113-123.
45. Lumjuan N, Stevenson BJ, Prapanthadara LA, Somboon P, Brophy PM, Loftus BJ, Severson DW, Ranson H, 2007. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 1026-1035.
46. Grant DF, Hammock BD, 1992. Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Mol Gen Genet* 234: 169-176.
47. Lumjuan N, McCarroll L, Prapanthadara LA, Hemingway J, Ranson H, 2005. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 861-871.

48. Savedra-Rodriguez K, Strode C, Suarez AF, Salas IF, Ranson H, Hemingway J, Black WC IV, 2008. QTL mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 180: 1137–1152.
49. Hemingway J, Boddington RG, Harris J, Dunbar SJ, 1989. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto-Rico. *Bull Entomol Res* 79: 123–130.
50. Yaicharoen R, Kiatfuengfoo R, Chareonviriyaphap T, Rongnoparut P, 2005. Characterization of deltamethrin resistance in field populations of *Aedes aegypti* in Thailand. *J Vector Ecol* 30: 144–150.
51. Martinez-Torres D, Chevillon C, Brun-Barale A, Berge JB, Pasteur N, Pauron D, 1999. Voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L. mosquitoes. *Pestic Sci* 55: 1012–1020.
52. Xu Q, Wang HC, Zhang L, Liu NN, 2006. Kdr allelic variation in pyrethroid resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (S.). *Biochem Biophys Res Commun* 345: 774–780.
53. Forcioli D, Frey B, Frey JF, 2002. High nucleotide diversity in the para-like voltage-sensitive sodium channel gene sequence in the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *J Econ Entomol* 95: 838–848.
54. Liu ZQ, Song WZ, Dong K, 2004. Persistent tetrodotoxin-sensitive sodium current resulting from U-to-C RNA editing of an insect sodium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11862–11867.
55. Du YZ, Liu ZQ, Nomura Y, Khambay B, Dong K, 2006. An alanine in segment 3 of domain III (IIIS3) of the cockroach sodium channel contributes to the low pyrethroid sensitivity of an alternative splice variant. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 161–168.
56. da Costa-Ribeiro MCV, Lourenco-De-Oliveira R, Failloux AB, 2007. Low gene flow of *Aedes aegypti* between dengue-endemic and dengue-free areas in southeastern and southern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 77: 303–309.
57. Padua KD, Araujo JP, Ribolla PEM, 2006. Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. *Genet Mol Biol* 29: 391–395.

### **3.2 – Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations**

Este artigo apresenta a descoberta de mais um alelo do  $AaNa_V$  em populações brasileiras, através de sequenciamento de DNA genômico da região IIS6, correspondendo à substituição de uma valina por uma isoleucina no sítio 1016. É neste texto que apontamos evidências de que a mutação Val1016Ile está fortemente relacionada à resistência a piretróides em populações brasileiras de *Ae. aegypti*.

O trabalho foi publicação no periódico *Tropical Medicine & International Health*.

## Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations

Ademir Jesus Martins<sup>1,2</sup>, José Bento Pereira Lima<sup>1,2</sup>, Alexandre Afranio Peixoto<sup>3</sup> and Denise Valle<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup> Instituto de Biologia do Exército, Benfica, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Mangueiras, Rio de Janeiro, Brazil

### Summary

One of the major insect pyrethroid resistance mechanisms affects its target site, the voltage-gated sodium channel (Na<sub>v</sub>). In *Aedes aegypti*, the Val1016Ile substitution of the AaNa<sub>v</sub> gene is associated to resistance in several Latin American countries. Genotyping of susceptible and resistant mosquitoes from seven Brazilian localities detected the 1016Ile mutation in five populations with a higher frequency of this substitution in resistant specimens in all cases. Furthermore, analysis of nine additional field populations revealed that five also presented the 1016Ile mutation. Our data suggest a recent dissemination and involvement of this substitution with pyrethroid resistance in Brazil.

**keywords** pyrethroid resistance, kdr mutation, sodium channel gene

### Introduction

Insecticide resistance can arise as the result of an increased activity of detoxifying enzymes. This process, called metabolic resistance, produces contact inhibition of the insecticide molecule with its target site in the central nervous system. Another major resistance mechanism involves mutations in these target molecules leading to a reduction or even blockage of insecticide binding (Hemingway & Ranson 2000). Knowledge of both status and mechanisms of resistance is recognized as an essential requirement for the efficient control of vector populations, preventing potential cross resistance among different insecticide classes (Zaim & Guillet 2002).

In Brazil, pyrethroids have been employed in the control of *Aedes aegypti* adults since 2000, as an alternative to organophosphates, resistance to which was first documented in the country in 1998, after three decades of utilization against both larvae and adults (Macoris *et al.* 1999; Lima *et al.* 2003). However, resistance to pyrethroids was detected only few years after their introduction (da-Cunha *et al.* 2005). Detoxifying enzymes, mainly glutathione-S-transferases and esterases, are probably responsible for this cross resistance (Montella *et al.* 2007). However, apart from metabolic resistance, we wonder whether pyrethroid target site mutations are also present in Brazilian dengue vector populations.

The voltage-gated sodium channel (Na<sub>v</sub>) is the target of pyrethroids and DDT (reviewed by Soderlund 2008). This

transmembrane protein consists of four homologous domains (I–IV), each one with six hydrophobic segments (S1–S6). In insects, there is only one sodium channel gene, commonly referred to as *para* (paralytic) due to the locus linked to temperature-sensitive paralysis in *Drosophila* (Ganetzky and Wu 1986). Goldin (2002) suggested a standardization of sodium channel nomenclature based on that applied to other ion channels, which cites the initial species name followed by Na<sub>v</sub>.

A limited number of Na<sub>v</sub> mutations seem to be associated with pyrethroid and DDT resistance (Soderlund 2008). The Ile1014Phe mutation (position defined according to *Musca domestica* Na<sub>v</sub> primary sequence, used as reference) localized in the IIS6 region is employed as a diagnostic of pyrethroid resistance in several insects (Bass *et al.* 2007), including mosquitoes *Anopheles gambiae* (Martinez-Torres *et al.* 1998), *Culex pipiens* (Martinez-Torres *et al.* 1999) and *Culex quinquefasciatus* (Xu *et al.* 2005). The Ile1014Phe mutation was not observed in the *A. aegypti* Na<sub>v</sub> (AaNa<sub>v</sub>). However, there are other substitutions in this species between the IIS5 and IIS6 regions (Gly923Val, Leu982Trp, Ile1011Met, Ile1011Val, Val1016Ile and Val1016Gly) (Bregues *et al.* 2003; Saavedra-Rodriguez *et al.* 2007, 2008; Rajatileka *et al.* 2008). In Brazilian populations only the Ile1011Met substitution was previously found in this AaNa<sub>v</sub> region. It was detected at higher frequency in resistant individuals of a field population (Martins *et al.* 2009) and electrophysiological assays accused loss of sensitivity of AaNa<sub>v</sub> when

A. J. Martins *et al.* **Idr mutation in Brazilian *Aedes aegypti* populations**

the Ile1011Met substitution was present (Brenques *et al.* 2003).

Recently two other substitutions have been described in Latin American *A. aegypti* populations, Ile1011Val and Val1016Ile (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2007), the latter, although strongly associated to pyrethroid resistance (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2007), not having been previously encountered in Brazilian populations of this vector.

**Methods and results**

We thus used the PCR-based genotyping strategy developed by the above mentioned authors to investigate the frequency of the Val1016Ile substitution in pyrethroid susceptible and resistant specimens belonging to seven Brazilian *A. aegypti* populations. Nine additional field populations were further analyzed, totalling 421 specimens from 16 natural populations belonging to the five Brazilian regions.

In all cases, the mosquitoes were collected in the scope of the Brazilian *A. aegypti* Insecticide Resistance Monitoring Network (MoReNAa) (Montella *et al.* 2007). The exception was the Foz do Iguaçu population, kindly provided by that municipality through the Zoonosis Control Center. In this case, eggs were collected in *hot spots* with high incidence of mosquitoes and intense use of pyrethroids against adults. Mosquitoes resulting from this sampling were highly resistant to the deltamethrin pyrethroid (José B. Lima, personal communication). Table 1 presents the location of each municipality, as well as the year samples were collected in the field. Rearing followed the standard laboratory methods (Lima *et al.* 2003).

Bioassays to evaluate the adult status of susceptibility to the deltamethrin pyrethroid were also performed in the

range of MoReNAa, with impregnated glass bottles according to a modification of the CDC recommended procedure (da-Cunha *et al.* 2005). The diagnostic dose was defined as 5.0 µg of insecticide per bottle. Briefly, 3- to 5-day-old adult females were exposed to the deltamethrin impregnated bottles for 1 h and then transferred to small insecticide free cages. Mortality was registered 24 h later. To accomplish the analysis shown here, deltamethrin surviving and killed mosquitoes were considered resistant (R) and susceptible (S), respectively.

Genotyping was performed with genomic DNA, extracted from females whose abdomens had been removed to avoid contamination with male sperm present in the female spermathecae. Individual homogenates were obtained in 200 µl of extraction buffer, according to Jowett (1986), with slight modifications (10 mM Tris-HCl pH 8.2; 2 mM EDTA and 0.2% Triton X-100). PCR was carried out with the GoTaq kit (Promega) containing 0.5 µl of genomic DNA, 0.24 µM of the reverse primer (5'-GGATGAACCGAAATTGGACAAAAGC-3') and 0.12 µM of each one of the forward primers, specific for the amino acids Val (5'-GCGGGCAGGGCGGCGGGGG-CGGGGCCACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG-3') or Ile (5'-GCGGGCACAATTGTTTCCCACCCGC-CTGA-3') as described by Saavedra-Rodríguez *et al.* (2007). Complete reaction volume totalled 12.5 µl. Denaturing, annealing and extension conditions were, respectively, 94 °C/30", 62 °C/1' and 72 °C/45", in 30 cycles.

Since each forward primer has a different GC tail extension generating PCR products that differ 20 bp in size (78 or 98 bp), electrophoresis in 10% polyacrylamide enabled identification of each individual's genotype (homo

**Table 1** Brazilian *Aedes aegypti* populations evaluated

Region	State	Locality	Coordinates	Sampling year
North	Roraima	Boa Vista	2°49'N 60°40'W	2008
	Amapá	Macapá	0°2'N 51°3'W	2003
	Pará	Santa Bárbara	1°13'S 48°17'W	2008
Northeast	Ceará	Fortaleza	3°43'S 38°32'W	2007
	Alagoas	Maceió	9°39'S 35°44'W	2006
Central-West	Mato Grosso	Cuiabá	15°35'S 56°05'W	2006
	Goiás	Aparecida de Goiânia	16°49'S 49°14'W	2006
	Mato Grosso do Sul	Campo Grande	20°26'S 54°38'W	2006
Southeast	Rio de Janeiro	Dourados	22°13'S 54°48'W	2006
		Nova Iguaçu	22°45'S 46°27'W	2008
	Espírito Santo	Colatina	19°32'S 40°37'W	2008
		Cachoeiro de Itapemirim	20°50'S 41°06'W	2008
		Uberaba	19°45'S 47°55'W	2006
South	Paraná	Foz do Iguaçu	25°32'S 54°35'W	2008
	Rio Grande do Sul	Ijuti	28°23'S 53°54'W	2004
		Santa Rosa	27°52'S 54°28'W	2004

A. J. Martins *et al.* **Idr mutation in Brazilian *Aedes aegypti* populations**

or heterozygote). Cloning and sequencing of the IIS6 AaNa<sub>7</sub> region of several individuals was performed according to Martins *et al.* (2009) and Otto *et al.* (2008) and confirmed PCR genotyping in all cases.

Genotyping of resistant (R) and susceptible (S) mosquitoes from seven localities (Aparecida de Goiânia, Cuiabá, Campo Grande, Dourados, Fortaleza, Maceió and Uberaba) was done separately. The 1016Ile mutant allele was absent from mosquitoes of Fortaleza and Maceió, two Northeast regions (Table 2). There were significant differences in the genotypic frequencies between the R and S groups of the five remaining localities, polymorphic at this position (Table 2). Frequency of the mutant 1016 Ile/Ile homozygotes was higher in the resistant individuals in all cases. These data corroborate the association of this mutation with pyrethroid resistance in *A. aegypti* Brazilian populations.

In order to obtain a more complete picture of the Val1016Ile distribution in the country, nine additional field populations were further genotyped. Figure 1 shows the frequencies of 1016Val and 1016Ile alleles in all the 16 analysed populations. Data from the seven populations first genotyped were deduced from Table 2. With exception of Foz do Iguacu, absence of the 1016Ile substitution was confirmed in localities from the North, Northeast and South regions (see below).

Similarly to Brazil, in other Latin American countries like Mexico and Venezuela, this mutation was not evident in all assayed localities (Saavedra-Rodriguez *et al.* 2007). We suggest the AaNa<sub>7</sub> 1016Ile allele is spreading

throughout Brazil, originating from municipalities localized in the Central West region bordering other countries.

**Discussion**

The Brazilian South Region has few dengue cases in comparison to other parts of the country. This is the consequence of the temperate climate and low infestation levels. In this regard, it is worth mentioning that Southern Brazilian localities are less exposed to insecticides than the remainder in the rest of the country. In spite of this, the 1016Ile allele was present in Foz do Iguacu (sample collected in 2008), an important Southern touristic locality bordering Argentina and Paraguay. Its absence from Ijuí and Santa Rosa populations, two other Southern Brazil localities, sampled in 2004, is suggestive of a recent entry in the country.

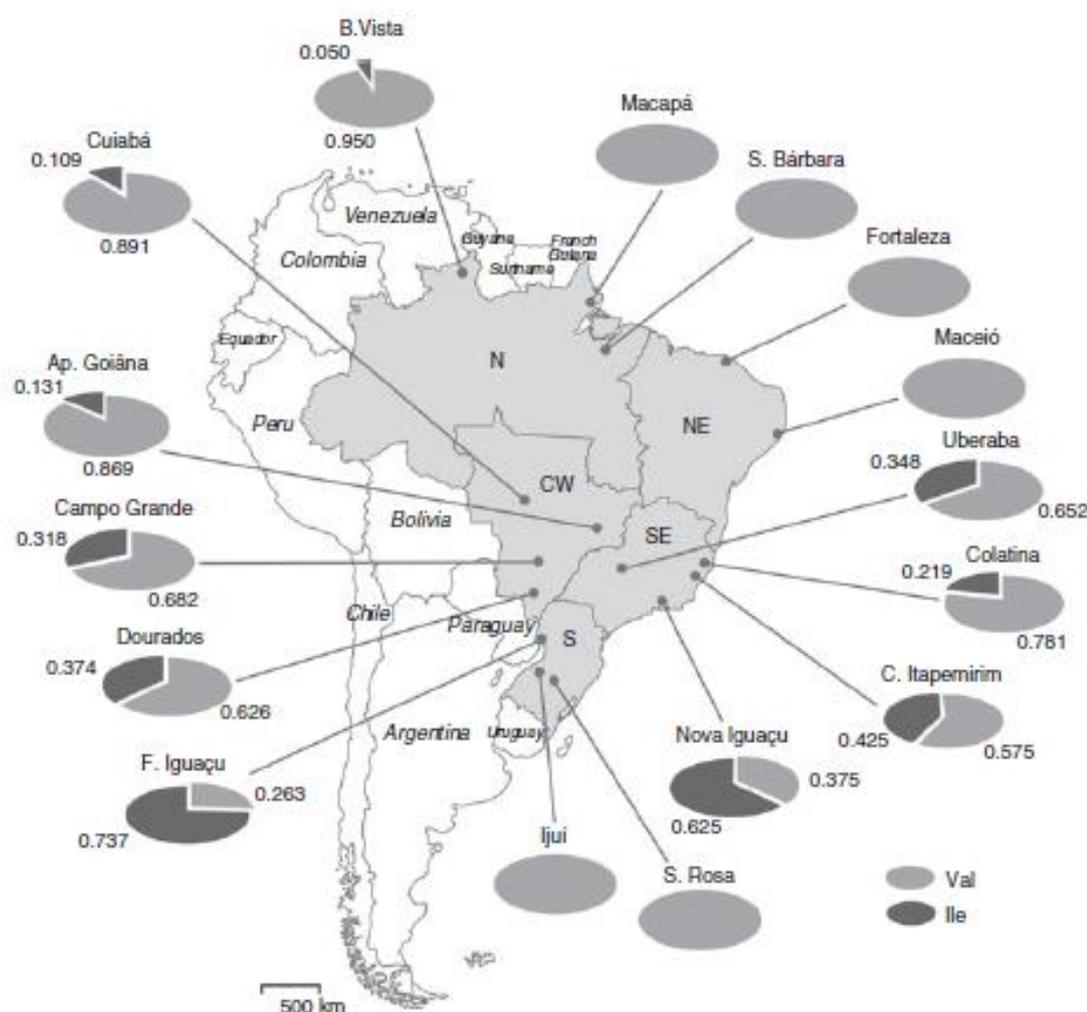
One must be aware that the highest 1016Ile frequency previously witnessed in Latin America was 0.293, in Havana, Cuba (Saavedra-Rodriguez *et al.* 2007). The high frequency of this allele observed in Foz do Iguacu (0.737) can be attributed to the sampling methodology of that locality, conducted exclusively at *hot spot* areas. However, a high frequency of the mutant allele also appeared in Nova Iguacu (0.625, see Figure 1), despite this 2008 mosquito collection encompassing the whole municipality. This result is particularly interesting since the 1016Ile allele was not found in this locality in 2003 (Martins *et al.* 2009). The increase in frequency of this recessive insecticide resistant allele (Saavedra-Rodriguez *et al.* 2007) in such a

**Table 2** Analysis of the AaNa<sub>7</sub> 1016 position polymorphism in Brazilian deltamethrin resistant and susceptible mosquitoes from different populations

Locality	Status	n	Genotypic frequency			$\chi^2$ , df P ( $\alpha = 0.05$ )	Survival/ mortality (%) <sup>*</sup>
			Val/Val	Val/Ile	Ile/Ile		
Aparecida de Goiânia	R	18	0.556	0.222	0.222	8.065, 2 0.0177	34.0
	S	19	0.947	0.053	0		66.0
Cuiabá	R	13	0.538	0.077	0.385	6.621, 2 0.0365	10.8
	S	14	0.857	0.143	0		89.2
Campo Grande	R	23	0.174	0.391	0.435	13.57, 2 0.0011	35.9
	S	21	0.714	0.286	0		64.1
Dourados	R	16	0.314	0.188	0.500	7.126, 2 0.0284	36.2
	S	20	0.600	0.300	0.100		63.8
Fortaleza	R	16	1.0	0	0	-	53.1
	S	16	1.0	0	0		46.9
Maceió	R	15	1.0	0	0	-	37.2
	S	15	1.0	0	0		62.8
Uberaba	R	24	0.208	0.417	0.375	12.07, 2 0.0024	42.4
	S	20	0.700	0.250	0.050		57.6

R and S refer to *Aedes aegypti* female adults that survived or were killed after exposure to the pyrethroid deltamethrin, respectively.

<sup>\*</sup>See text for details.



**Figure 1** *AaNa*<sub>1016</sub> allelic frequency distribution of the 1016 position. Allelic frequencies of Aparecida de Goiânia, Campo Grande, Cuiabá, Dourados, Fortaleza, Maceió and Uberaba mosquitoes were calculated from data shown in Table 2, taking into account the proportion of resistant and susceptible individuals in each population. The remaining populations were genotyped without previous exposure to pyrethroid bioassay, as explained in the text. Number of tested specimens: Boa Vista (20), Cachoeiro do Itapemirim (20), Colatina (16), Foz do Iguaçu (19), Ijuí (20), Macapá (20), Nova Iguaçu (20), Santa Bárbara (16), Santa Rosa (20) and Uberaba (44). For other populations, see Table 2.

short time is indicative of a very strong selective pressure. Additionally, its current presence in coastal areas, where metabolic resistance is also present (Montella *et al.* 2007), points to an extremely difficult situation regarding control. Further work is needed to investigate the relative role of these two resistance mechanisms and the interaction between the mutations in the 1011 and 1016 positions of the *AaNa*<sub>1016</sub> with regard to pyrethroid resistance in Brazilian populations.

#### Acknowledgements

We thank the Brazilian Dengue Control Program that allowed utilization of samples collected in the scope of the Brazilian *A. aegypti* Insecticide Resistance Monitoring Network (MoReNAa); Rafael Freitas, Laboratório de Transmissores de Hematozoários, who helped to obtain mosquitoes from Foz do Iguaçu; Diogo F Bellinato for technical assistance with mosquitoes preparation and

A. J. Martins *et al.* **kdr** mutation in Brazilian *Aedes aegypti* populations

resistance bioassays; and the Plataforma Genômica - Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ for availability of sequencing facilities. This work was supported by Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, Programa de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz, Vice-Presidência de Serviços de Referência e Ambiente/Fundação Oswaldo Cruz, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Financiadora de Estudos e Projetos do Rio de Janeiro and the Howard Hughes Medical Institute.

## References

- Bass C, Nikou D, Donnelly MJ, *et al.* (2007) Detection of knockdown resistance (kdr) mutations in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. *Malaria Journal* 6, 111.
- Bregues C, Hawkes NJ, Chandre F, *et al.* (2003) Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology* 17, 87–94.
- da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE & Valle D (2005) Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 441–444.
- Ganetzky B & Wu CF (1986) Neurogenetics of membrane excitability in *Drosophila*. *Annual Review Genetics* 20, 13–44.
- Goldin AL (2002) Evolution of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Journal of Experimental Biology* 205, 575–584.
- Hal TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.
- Hemingway J & Ranson H (2000) Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 45, 371–391.
- Jowett T (1986) Preparation of nucleic acids. In: *Drosophila: A Practical Approach* (ed Roberts DB) IRL, Oxford, pp. 275–286.
- Lima JBP, da-Cunha MP, Da Silva RC, *et al.* (2003) Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 329–333.
- Macoris M, Andrighetti MT, Takaku L, *et al.* (1999) [Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the state of Sao Paulo, Brazil]. *Revista de Saúde Pública* 33, 521–522.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, *et al.* (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* 7, 179–184.
- Martinez-Torres D, Chevillon C, Brun-Barale A, *et al.* (1999) Voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L. mosquitoes. *Pesticide Science* 55, 1012–1020.
- Martins AJ, Lins RMM, Lins JGB, Peixoto AA & Valle D (2009) Voltage gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81, 108–115.
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, *et al.* (2007) Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 467–477.
- Otto TD, Vasconcelos EA, Gomes LH, *et al.* (2008) ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genetics and Molecular Research* 7, 861–871.
- Rajatileka S, Black WC, Saavedra-Rodriguez K, *et al.* (2008) Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. *Acta Tropica* 108, 54–57.
- Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, *et al.* (2007) A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 16, 785–798.
- Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Suarez AF, *et al.* (2008) QTL mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 180, 1137–1152.
- Soderlund DM (2008) Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pesticide Management Science* 64, 610–616.
- Xu Q, Liu H, Zhang L & Liu N (2005) Resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, and possible mechanisms for resistance. *Pesticide and Management Science* 61, 1096–1102.
- Zaim M & Guillet P (2002) Alternative insecticides: an urgent need. *Trends in Parasitology* 18, 161–163.

**Corresponding Author** Denise Valle, Instituto de Biologia do Exército, Rua Francisco Manuel 102 – Benfica, 20911-270, Rio de Janeiro RJ, Brazil. E-mail: dvalle@ioc.fiocruz.br

### 3.3 – Evidência de Duplicação no Gene de Canal de Sódio Envolvido com a Resistência a Piretróides em *Aedes aegypti*

Neste artigo sugerimos a ocorrência de duplicação no gene do canal de sódio em *Ae. aegypti*, apresentando uma série de experimentos que corroboram esta hipótese. Este achado é inédito em insetos e outros invertebrados. O manuscrito está em preparação.

## **Evidência de Duplicação no Gene de Canal de Sódio Envolvido com a Resistência a Piretróides em *Aedes aegypti***

Running title: Duplication in the *AaNav*

Ademir Jesus Martins<sup>1</sup>, Jutta Gerlinde Birgitt Linss<sup>1</sup>, Denise Valle<sup>1</sup>, Alexandre Afranio Peixoto<sup>2</sup>

Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ /

Laboratório de Entomologia, Instituto de Biologia do Exército <sup>1</sup> and Laboratório de Biologia Molecular de

Insetos Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ<sup>2</sup>, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro-RJ, 2104-900, Brazil

### Resumo

Mutações no gene do canal de sódio regulado por voltagem (*Nav*) estão relacionadas à resistência a inseticidas da classe dos piretróides e DDT em uma série de insetos. No mosquito *Aedes aegypti*, este gene apresenta polimorfismo que agrupa as sequências em tipo A ou B, de acordo com a sequência do íntron 20 e de apenas duas substituições sinônimas no exon que o antecede. Observamos que mutações relativas aos aminoácidos dos sítios 1011 (Ile1011Met) e 1016 (Val1016Ile) apareceram apenas em sequências do tipo A. Além disso, as duas mutações não foram observadas na mesma sequência.

Fenotipagem molecular destes dois sítios por PCR alelo-específica demonstrou que a mutação Ile1011Met está amplamente disseminada, mas que a Val1016Ile é quem de fato parece estar relacionada à resistência a piretróides em populações brasileiras de *Ae. aegypti*. Curiosamente, o sequenciamento da região do *Nav* de alguns destes indivíduos, revelou a ocorrência de três haplótipos distintos, suscitando a hipótese da ocorrência de um polimorfismo envolvendo uma duplicação gênica onde o haplótipo duplicado estaria constituído de uma sequência do tipo B ligada a outra do tipo A com a mutação Ile1011Met. Sustentou esta hipótese a observação de excesso de indivíduos “heterozigotos”, a ausência de determinados fenótipos moleculares e a tipagem da prole de alguns cruzamentos.

Palavras-chaves: duplicação gênica, mutação kdr, canal de sódio, resistência a inseticida, *Aedes aegypti*

### Introdução

O DDT logrou grande sucesso em programas de erradicação de vetores e pragas no início da segunda metade do século passado. Contudo, seu uso foi abolido em todo o mundo devido a indícios de envolvimento com prejuízos ao meio ambiente e à saúde animal e humana [1]. Mesmo assim, devido à crescente disseminação da resistência aos inseticidas utilizados contra mosquitos vetores, entre outros fatores, a própria OMS recentemente voltou a recomendar o uso do DDT como principal agente intradomiciliar para o controle de malária, em regiões epidêmicas e em áreas endêmicas [2]. Os piretróides possuem mecanismo de ação semelhante ao DDT e baixo efeito residual no meio ambiente, representando atualmente a principal classe de inseticidas utilizada no controle de artrópodes vetores de importância médica e veterinária e de pragas agrícolas [3].

O uso do DDT foi responsável pela erradicação do *Aedes aegypti*, mosquito vetor de dengue e febre amarela urbana, em vários países da América Latina na década de 1950 [4]. Depois da reintrodução do vetor no continente, organofosforados e piretróides têm sido utilizados no controle, porém com eficácia reduzida devido à resistência de diversas populações a estes compostos. No Brasil, apesar da introdução recente de piretróides no controle de *Ae. aegypti* em escala nacional, várias populações têm sido diagnosticadas como resistentes a estes compostos [5,6].

Piretróides e DDT agem no sistema nervoso central do inseto, provocando rápidas contrações musculares involuntárias, seguidas de paralisia e morte, efeito conhecido como *knockdown* [7,8]. A molécula alvo destes compostos é o canal de sódio regulado por voltagem, composto por quatro domínios homólogos (I-IV), cada qual com seis segmentos hidrofóbicos transmembranares (S1-S6) [9]. O estudo de mutações no gene do canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_v$ ) em insetos tem sido intensificado nas duas últimas décadas, contribuindo para o entendimento da dinâmica da resistência a DDT e piretróides. Este esforço visa formular estratégias para prolongar o tempo de uso destes importantes compostos, como também desenvolver novas drogas cujo alvo seja o canal de sódio [10,11]. A maioria das mutações descritas no  $Na_v$  de insetos que são relevantes para a resistência ocorre na região IIS6 do canal, sendo a substituição Leu/Phe no sítio 1014 (de acordo com a sequência primária do  $Na_v$  de *Musca domestica*) a mais usualmente referida como a mutação *kdr* (*knockdown resistance*). Algumas revisões recentes sobre mutações no canal de sódio e resistência a DDT e piretróides estão disponíveis [1,3,12].

Atualmente, estão identificadas algumas mutações entre as regiões IIS5 e IIS6 do gene que codifica o canal de sódio de *Ae. aegypti* ( $AaNa_v$ ): Gly923Val, Leu982Trp, Ile1011Met, Ile1011Val, Val1016Ile e Val1016Gly [13–17]. Fora do domínio II, foi observada a substituição Asp1794Tyr, apenas em indivíduos portadores da Val1016Gly [18]. A substituição Ile1011Met associada à baixa sensibilidade a piretróides, por meio de ensaios eletrofisiológicos [13], teve maior frequência entre indivíduos resistentes de uma população natural do Brasil [14]. Contudo, substituições no sítio 1016 (Val/Ile na América do Sul e Central e Val/Gly na Tailândia) parecem ser as mais importantes para o efeito *kdr* em *Ae. aegypti* [15–17].

Em trabalho anterior, destacamos o polimorfismo da região IIS6 do  $AaNa_v$  de populações brasileiras do vetor, dividindo as sequências em duas categorias, A e B, de acordo com características do intron presente nesta região; verificamos que apenas sequências A apresentaram a substituição Ile1011Met [14]. Aqui aprofundamos a investigação deste polimorfismo. O sequenciamento deste domínio do  $AaNa_v$  e a tipagem, por PCR alelo específica, de populações naturais revelou a presença de três haplótipos em alguns indivíduos e a ausência de indivíduos homocigotos para a mutação 1011Met. Estes dados, somados aos resultados obtidos em experimentos com cruzamentos, sugerem a presença de duplicação deste *locus* em indivíduos de algumas populações do vetor. O envolvimento deste evento com a resistência a piretróides é discutido.

## Resultados

### Tipagem da região IIS6 do canal de sódio de populações naturais de *Ae. aegypti* por PCR alelo específica.

A frequência dos alelos do sítio 1011 do  $AaNa_v$  foi avaliada em 15 localidades distintas no Brasil, para os mesmos indivíduos que tiveram o sítio 1016 previamente analisado [15]. O alelo mutante 1011Met só esteve ausente das amostras de Boa Vista, RR. Entre as sete localidades em que as amostras foram separadas em resistentes e susceptíveis a piretróide, apenas em Campo Grande, MS a frequência alélica no sítio 1011 foi diferente entre os dois grupos (Fisher exact test,  $p = 0.007$ ). Estes dados sugerem que, no geral, a mutação no sítio 1011 por si só deve ter pouca influência na resistência a piretróide nas populações aqui avaliadas. A tabela 1 mostra a frequência observada nestas populações, entre as nove combinações possíveis (fenótipos moleculares), considerando-se os sítios 1011 e 1016. Observamos que o fenótipo mais frequente entre os indivíduos resistentes foi 1011 Ile/Ile + 1016 Ile/Ile, ou seja, sem a mutação em 1011 e em “homozigose” para a mutação em 1016 (Tabela 1). Isto sugere que a mutação no sítio 1016 está mais diretamente ligada à resistência a piretróide, independente das variações no sítio 1011. Surpreendentemente, não detectamos a mutação 1011Met em “homozigose” em nenhum indivíduo. Além disso, a combinação 1011 Ile/Met + 1016 Ile/Ile também não foi observada. Teste de contingência revelou uma distribuição não aleatória entre as mutações nos dois sítios, mesmo desconsiderando a ausência dos possíveis “homozigotos” 1011 Met/Met ( $\chi^2 = 84.3$ ; g.l. = 2;  $p < 0.001$ ). A fim de melhor entendermos estes dados, clonamos e sequenciamos a região IIS6 de alguns indivíduos de populações naturais.

### Sequenciamento da região IIS6 do canal de sódio de *Ae. aegypti*.

Sequenciamento confirmou polimorfismo na região IIS6 do  $AaNa_v$  de cinco populações brasileiras. A Figura 1 mostra os haplótipos obtidos, cujas sequências foram submetidas ao GeneBank (accession number XXXXXX...). As sequências foram classificadas como A ou B, de acordo com as diferenças observadas no intron existente nesta região (ver [14] para maiores detalhes). Observamos a substituição Ile1011Met em todas as populações avaliadas, enquanto Val1016Ile não foi detectada nas populações do Nordeste (Maceió, AL e Fortaleza, CE). Ambas as mutações só estavam presentes em sequências do tipo A. Não foi observada nenhuma sequência com mutação nos dois sítios. Deste modo, foram observados apenas quatro haplótipos (1011Ile + A + 1016Val, 1011Ile + A + 1016Ile, 1011Ile + B + 1016Val e 1011Met + A + 1016Val) entre os oito possíveis considerando-se o tipo de sequência (A ou B) e os sítios 1011 (Ile/Met) e 1016 (Val/Ile) (Tabela 2). Além disso, o haplótipo 1011Met + A + 1016Val só apareceu em indivíduos que possuíam também o haplótipo 1011Ile + B + 1016Val e seriam, portanto, classificados como “heterozigotos”. De fato, tipagem de diversas populações naturais revelou a ausência de indivíduos “homozigotos” para a mutação 1011Met (ver acima). Curiosamente alguns indivíduos apresentaram três haplótipos, sendo em todos os casos: 1011Ile + A + 1016Ile, 1011Ile + B + 1016Val e 1011Met + A + 1016Val (Tabela 2). Vale ressaltar que

para os indivíduos sequenciados foram utilizadas fêmeas sem o abdômen para evitar eventual amplificação de contaminação por espermatozoides armazenados na espermateca e que nenhuma evidência de contaminação foi observada nos controles negativos dos PCRs destes indivíduos. Além disso, a última coluna da Tabela 2 apresenta os “genótipos” que seriam esperados através da tipagem (ver acima) do intron e dos sítios 1011 e 1016. Em todos os indivíduos testados a tipagem por PCR alelo-específica confirmou os resultados do sequenciamento (dados não mostrados).

A existência de três alelos em um único indivíduo sugere a presença de uma duplicação gênica nesta região. Contudo, análise das sequências do projeto genoma de *Ae. aegypti* indicam que a linhagem Liverpool apresenta apenas uma cópia do canal de sódio, representada pelo haplótipo 1011 Ile + B + 1016 Val. Isto sugere que esta duplicação não ocorre em todos os indivíduos desta espécie sendo, portanto, um caráter polimórfico. Nas amostras que analisamos, foram detectados indivíduos “homozigotos” para os haplótipos 1011Ile + B + 1016Val, 1011Ile + A + 1016Val e 1011Ile + A + 1016Ile, todos “selvagens” na posição 1011. Contudo, o haplótipo 1011Met + A + 1016Val (“mutante” na posição 1011) não foi detectado em “homozigose”, mas sempre em associação com o haplótipo 1011Ile + B + 1016Val, sugerindo que a duplicação envolva estas variantes (Tabela 2). A Figura 2 apresenta um esquema dos haplótipos de  $AaNa_V$  em populações brasileiras segundo esta hipótese. Para testá-la, tipamos a prole de alguns cruzamentos de parentais com determinadas combinações.

#### Cruzamentos para testar a hipótese de duplicação.

Para testar a hipótese de duplicação realizamos cruzamentos de indivíduos com fenótipo molecular conhecido, determinando as frequências das variantes no sítio 1011 na prole. Inicialmente foi avaliada a prole  $F_1$  de quatro casais, onde um dos parentais era “selvagem” (1011 Ile/Ile) e o outro “heterozigoto” nesta posição (1011 Ile/Met). Tipagem da prole destes casais revelou que a hipótese de duplicação não pôde ser rejeitada nas quatro famílias analisadas (Tabela 3). Já nas famílias #3 e #4, o parental portador da mutação Met pode ser tanto um heterozigoto para a duplicação (Ile/Ile\_Met) ou heterozigoto para haplótipos não duplicados, pois cerca de metade dos indivíduos de suas proles era Ile/Ile (Figura 3). Sendo assim estes dois últimos cruzamentos não são informativos.

Contudo, uma vez que toda a prole das famílias #1 e #2 foi diagnosticada como Ile/Met, seu parental portador da mutação era necessariamente homozigoto para a duplicação (Ile\_Met/Ile\_Met) (Figura 3). Tipagem da prole  $F_2$  de um cruzamento da família #1 (#1.1) e de outro da família 2 (#2.1) revelou segregação em proporção aproximada de 3 Ile/Met: 1 Ile/Ile (Tabela 4), reforçando a hipótese da duplicação.

#### Discussão

*Splicing* alternativo e edição do RNA são fontes de diversidade no canal de sódio de insetos [19]. A regulação pós-transcricional permite que diversos transcritos sejam produzidos pela combinação de diferentes exons alternativos e de sítios editados, o que pode ser regulável de acordo com diferentes

estímulos ao longo do desenvolvimento ou condições ambientais. No entanto, na única linhagem de *Ae. aegypti* para a qual se tem informações sobre a expressão do gene do canal de sódio completo, não há relato de nenhuma variedade de *splicing* alternativo ou de edição de RNA correlacionada com a resistência a piretróide [18].

Uma outra possível fonte de diversidade molecular seria a ocorrência de polimorfismo envolvendo duplicações gênicas. Contudo, de nosso conhecimento, ainda não foi descrito nenhum caso de duplicação recente no gene que codifica o canal de sódio de insetos. Acreditava-se que haveria um gene adicional de canal de sódio em insetos (*DSC1* em *D. melanogaster* e *BSC1* em *B. germanica*), porém análises mais recentes apontaram-no como sendo mais próximo evolutivamente e funcionalmente aos canais de cálcio [20].

Exemplos de duplicação em genes associados com resistência a inseticida já foram observados em mosquitos. O caso mais clássico é o dos genes de Esterases, enzimas envolvidas com a resistência a organofosforados, super-expressas em linhagens resistentes de *Culex*. Esta super-expressão pode resultar de duplicação de genes de dois tipos de Esterases (que os autores chamam de A e B), ou de apenas um deles (Esterase B) [21,22]. O primeiro evento descrito neste contexto foi a amplificação do gene Esterase B1 em mosquitos da Califórnia [23]. Foi também observado que ocorre variação no número de cópias deste gene e que, quanto maior a amplificação, maior a taxa de resistência a organofosforados [24]. Verificou-se, com uma linhagem de laboratório, que exposição ao inseticida resultou em aumento do número de cópias do gene. No entanto, não é esperado que este aumento do número de cópias seja indeterminado, uma vez que a amplificação gênica gera um alto custo evolutivo, pelo menos neste caso [25]. Desta forma, é provável que o número de cópias deste gene seja reduzido na ausência de pressão pelo inseticida, principalmente em função de taxas altas de recombinação desigual naquele *locus* [24].

Duplicação gênica associada à resistência também foi observada em outra enzima relacionada à resistência a inseticida, Oxidase de função mista (MFO ou P450). Dois genes desta classe (*CYP6P9* e *CYP6P4*) estavam super-expressos em linhagens de *Anopheles funestus* resistentes a piretróide, em função de duplicação gênica, *in tandem*, localizada em um QTL (*rp1*) responsável por 87% da variação genética para resistência a piretróide. Além disso, nestes genes foram observados SNPs que servem como marcadores para a resistência [26].

Duplicações em genes que codificam enzimas envolvidas com resistência metabólica são de certa forma esperadas, uma vez que estas enzimas são componentes de famílias supergênicas de vários genes parálogos, geralmente organizados em *clusters* no genoma [27]. Estas famílias gênicas têm evoluído rapidamente, de forma que poucos ortólogos estão sendo identificados entre os insetos [28]. No genoma de *Ae. aegypti* foram identificados pelo menos 26, 160 e 49 genes de GST, MFO e Esterases, respectivamente, o que representa um aumento total de 36% no número destes genes, quando comparado a *An. gambiae* [29]. Além disso, no caso das enzimas envolvidas com a resistência metabólica, a duplicação gênica pode ser seletivamente vantajosa, aumentando a capacidade

detoxificante do organismo. Ao mesmo tempo, novas funções poderiam ser geradas pelo acúmulo de substituições nos genes duplicados [30]. Eventos como estes estariam mais “livres” de ocorrer, já que o sistema de detoxificação enzimática é redundante, pois conta com a presença de várias enzimas de funções semelhantes. Desta forma, o acúmulo de alterações que resultassem em perda da função original, tenderia a não comprometer de forma significativa o metabolismo do organismo [31].

Em contrapartida, eventos de duplicação gênica nas moléculas que atuam como alvos dos inseticidas neurotóxicos seriam menos comuns. Isto porque, no geral, estas moléculas apresentam atividades muito específicas e essenciais, bastante conservadas ao longo da evolução. O aumento do número de cópias destas moléculas tenderia a comprometer as funções neurológicas do organismo, evento conhecido como dosage-balance hypothesis [32]. Como exemplo, foi identificada uma linhagem de *Culex pipiens* com dois genes para a enzima Acetilcolinesterase, alvo de organofosforados e carbamatos. Esta linhagem apresenta atividade da enzima 60% aumentada; apesar de gerar resistência, esta duplicação está associada a um elevado custo em outros aspectos do valor adaptativo [33,34]. Por outro lado, em outras populações de *Culex pipiens*, a insensibilidade da Acetilcolinesterase a organofosforados e carbamatos ocorre devido à uma mutação no gene *ace-1*. Contudo, devido ao alto custo no valor adaptativo, a frequência do alelo mutante tende a diminuir rapidamente na ausência de inseticida [35,36].

No entanto, foram descritas linhagens de *Culex* nas quais teria havido uma duplicação recente, há menos de 40 anos, do gene *ace-1*, de forma a coexistirem no mesmo cromossomo, duas cópias, com e sem a mutação. Este fenótipo molecular “heterozigoto” para a mutação é resistente e tem um menor custo em outros aspectos do valor adaptativo [37], sugerindo assim um mecanismo que pode favorecer a ocorrência de duplicações em genes que codificam alvos de inseticidas.

DDT e piretróides têm como alvo o canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_V$ ), codificado por um gene de cópia única. Esta molécula é componente estrutural das membranas dos axônios, com função fisiológica fundamental na transmissão do impulso nervoso, possuindo arquitetura altamente complexa e evolutivamente conservada [39]. Mutações gênicas pontuais, bem como eventos pós-transcricionais na expressão do  $Na_V$  estão diretamente relacionados à resistência àqueles compostos [3]. Neste trabalho, apresentamos resultados que indicam a ocorrência de uma duplicação gênica do  $Na_V$  em populações brasileiras de *Ae. aegypti*. Observamos a presença de três haplótipos em alguns indivíduos de populações naturais. A exemplo do que verificamos para  $AaNa_V$ , recentemente, foram detectados espécimes de *Anopheles gambiae* com três alelos do gene *ace-1*, o que também foi interpretado como evidência da ocorrência de uma duplicação [38]. Além disso, observamos também a ausência de algumas combinações genotípicas e a segregação dos haplótipos de acordo com a existência de mais de um *locus*, reforçando assim a hipótese de duplicação.

Na avaliação do envolvimento de mutações no  $AaNa_V$  com a resistência, Saavedra-Rodriguez et al [17] analisaram a prole  $F_3$  de um casal parental ♀ 1011 Ile/Met + 1016 Ile/Ile (da população de Isla Mujeres) X ♂ 1011 Ile/Ile + 1016 Val/Val (da linhagem controle de susceptibilidade New Orleans), discriminando-os

como resistentes ou susceptíveis a piretróide, com bioensaios. Foi observada associação altamente significativa do alelo 1016 Ile com a resistência. No entanto, o mesmo não foi verdade para o alelo 1011Met. Este resultado foi inesperado, mesmo que o alelo 1011Met não tivesse relação com a resistência: como estes sítios estão distantes em cerca de apenas 300pb, e considerando o genótipo da fêmea parental, esperava-se que metade dos alelos que contêm a 1016 Ile também apresentassem a 1011Met. Com esta pequena distância entre os sítios, seria improvável que ocorressem taxas de recombinação tão altas de forma que, em apenas três gerações, aqueles dois sítios segregassem independentemente. Por outro lado, estas observações podem ser explicadas se assumirmos a ocorrência de duplicação na fêmea parental. Para tanto, por exemplo, esta fêmea deveria possuir um haplótipo duplicado com mutação em ambos os sítios (1011 Met + 1016 Ile\_1011 Met + 1016 Ile) e outro não duplicado com mutação apenas no sítio 1016 (1011 Ile + 1016 Ile), sendo este último aquele selecionado para a resistência. Desta forma, o haplótipo com mutação no sítio 1011 segregaria independente daquele envolvido com a resistência.

No trabalho aqui apresentado, porém, não foi observada qualquer sequência com mutação em ambos os sítios, como no exemplo sugerido acima para o haplótipo duplicado. Contudo, vale salientar que existe uma série de diferenças na diversidade destas sequências entre as populações aqui avaliadas e outras localidades. Por exemplo, no sítio 1011 existe outra variação, a substituição Ile1011Val [16,17], que não observamos em nossas amostras. Além disso, a mutação Ile1011Met ocorreu em “homozigose” (1011 Met/Met) com alta frequência em várias localidades da América Latina [17], enquanto nenhum indivíduo com esta característica foi observado na amostragem aqui apresentada. É necessário portanto aprofundar a investigação da distribuição das variações encontradas neste *locus*.

Nossa hipótese é que, pelo menos nas populações aqui avaliadas, a mutação no sítio 1011 ocorra apenas em sequências do tipo A no haplótipo que contém a duplicação, e que este haplótipo não apresente a mutação no sítio 1016. Além disso, o gene duplicado estaria em desequilíbrio de ligação com outra sequência do tipo B, portanto, sem mutação nos sítios 1011 e 1016 (Figura 2). Corroboram esta hipótese a alta frequência de “heterozigotos” A/B, a ausência de indivíduos 1011 Met/Met e de indivíduos 1011 Ile/Met + 1016 Ile/Ile, além dos fenótipos observados nas proles dos cruzamentos aqui realizados. Está registrado que *Ae. aegypti* foi erradicado do Brasil no final da década de 1950, em grande parte, pelo uso de DDT [4]. Alguns anos mais tarde, houve nova infestação do vetor a partir de uma ou mais populações resistentes àquele inseticida. Talvez a população invasora (que se acredita seja um misto de introduções a partir de países das Américas Central e da Ásia [40]) tivesse a mutação Ile1011Met, que teria se disseminado por todo país. Uma possibilidade que pretendemos investigar é que a mutação Ile1011Met esteja envolvida na resistência a DDT e que seja remanescente da época em que este inseticida era empregado.

Classificamos as sequências da região IIS6 do *AaNav* em tipos A ou B de acordo com a sequência e o tamanho do íntron e de duas substituições sinônimas no exon 20 [14], valendo ainda ressaltar que as mutações Ile1011Met e Val1016Ile ocorrem exclusivamente nas sequências do tipo A [14,15]. Com os

dados disponíveis até então não é possível determinar a rota evolutiva do surgimento da duplicação no *AaNav*. Algumas pistas sugerem que sequência do tipo B seja a ancestral. A linhagem Rockefeller, utilizada normalmente como controle de susceptibilidade em ensaios com inseticidas, mantida há pelo menos cinco décadas em laboratório, só apresentou sequências do tipo B [14]. Outra evidência pode ser encontrada na comparação de sítios polimórficos na região codificando o domínio IIS6 do canal entre *Ae. aegypti* e outras espécies de mosquitos. Alinhamento da região correspondente ao exon 20 do *Nav* entre sequências de *Ae. aegypti* do tipo A e B com sequências de *Aedes vexans*, *Aedes cinereus*, *Aedes albopictus*, *Ochlerotatus fluviatilis*, *Culex pipiens* e *Culex quinquefasciatus*, revelou que a sequência de *Ae. aegypti* do tipo B compartilha com aquelas espécies as duas substituições sinônimas no exon 20 acima mencionadas (posições 26 e 89, ver material suplementar S1). Contudo, não é possível descartar a hipótese de que a sequência do tipo A seja a ancestral.

Concluindo, este trabalho apresentou as primeiras evidências genéticas da ocorrência de duplicação no gene de canal de sódio em algumas populações brasileiras de *Ae. aegypti*, vetor de dengue e febre amarela urbana. Além disso, embora indivíduos "homozigotos" 1011 Met/Met já tenham sido observados em outras regiões da América Latina [17], nas populações aqui avaliadas esta mutação parece estar exclusivamente associada à duplicação. O conhecimento da dinâmica dos genes de resistência a inseticidas em populações de mosquitos contribuirá para a elaboração de melhores estratégias de controle destes vetores.

#### Materiais e métodos

**Mosquitos.** Indivíduos da linhagem Rockefeller mantidos no laboratório foram utilizados como controle de susceptibilidade a inseticida e referência para os alelos "selvagens" do *AaNav*. Tipagem por PCR para o sítio 1011 e sequenciamento foram realizados nos mesmos indivíduos analisados em trabalho anterior [15]. Os cruzamentos foram realizados entre indivíduos da linhagem Rockefeller e R1, esta última provinda do grupo selecionado por pressão com o piretróide deltametrina por nove gerações [41], seguida de mais três gerações sem a pressão de seleção. Criação e manutenção das colônias foram feitas de acordo com [42].

**Análises moleculares.** Tipagens individuais foram realizadas por PCR a partir de DNA genômico extraído de fêmeas sem o abdômen, de forma a evitar possível amplificação de espermatozoides contidos na espermateca, como previamente descrito [14,15]. As reações de PCR foram realizadas com o kit GoTaq (Promega) contendo os primers específicos e 0.5 µL do DNA genômico, em 12.5 µL de reação. Para amplificação da região contendo o íntron entre os exons 20 e 21, que permite a classificação das sequência em tipo A ou B (veja [14]), foi utilizado 1 µM dos primers *forward* (5'-AGGCTGACTGAAAGTAAATTGG-3') e *reverse* (5'-CAAAAGCAAGGCTAAGAAAAGG-3'). As condições de desnaturação, anelamento e extensão foram respectivamente, 94°C/ 30", 60°C/ 1' e 72°C/ 45", em 30 ciclos. Para a tipagem do sítio 1011 foram utilizados 0.24 µM do primer *forward* (5'-GTCCTGTATTCCGTTCTTTTT-3') e 0.12 µM de cada um dos primers reversos, específicos para o alelo "selvagem" Ile (5'-GCGGGCTACTTACTACTAGATTTACT-3') e "mutante" Met (5'-

GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGGCCTACTTACTACTAGATTTGCC-3') como descrito por [17]. As condições de desnaturação, anelamento e extensão foram respectivamente, 94°C/ 30", 57°C/ 1' e 72°C/ 45", em 30 ciclos. O fenótipo molecular dos indivíduos para o sítio 1016 está apresentado em [15]. A região IIS6 do *AaNa<sub>v</sub>* foi clonada e sequenciada em indivíduos de populações brasileiras da região Centro Oeste (Uberaba, Cuiabá e Aparecida de Goiânia) e Nordeste (Maceió e Fortaleza), sob as condições idênticas àquelas descritas anteriormente [14]. Estes indivíduos são oriundos de coletas previamente descritas [15]. Foram sequenciados de seis a oito clones de cada indivíduo. Com esta metodologia, a probabilidade de que sejam seqüenciados clones de apenas um haplótipo em um indivíduo heterozigoto é de cerca de 3%.

*Cruzamentos.* Foram realizados cruzamentos com quatro casais individuais entre "homo" (1011 Ile/Ile) e "heterozigotos" (1011 Ile/Met) no sítio 1011 para genotipagem da prole F<sub>1</sub>. Com esta F<sub>1</sub> foram feitos novos cruzamentos para tipagem da F<sub>2</sub> subsequente. A frequência fenotípica dos indivíduos, obtida a partir de PCR alelo-específico para o sítio 1011, foi utilizada para testar as hipóteses levantadas, acerca de uma possível duplicação gênica. Os parentais 1011 Ile/Ile e 1011 Ile/Met são provenientes das colônias Rockefeller e R1 [41], respectivamente. Para montagem dos casais foram reunidos um macho e uma fêmea virgem com, pelo menos, três dias pós-emergência em adulto em um tubo cônico de 50 mL forrado internamente com papel filtro e telado em sua abertura. Um algodão embebido em solução açucarada foi continuamente mantido sobre a tela para alimentação dos mosquitos. A alimentação sanguínea foi oferecida às fêmeas por meio de camundongos anestesiados colocados sobre a tela, no mínimo três dias após a formação do casal. O estímulo à postura dos ovos foi feito individualmente para cada fêmea, como descrito em [43]. Após a postura das fêmeas, os mosquitos foram mantidos congelados a -20°C até a extração de DNA.

#### Agradecimentos

Agradecemos ao Programa Nacional do Controle de Dengue do governo brasileiro, que nos permitiu a utilização de amostras coletadas no escopo da Rede de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas, e à Plataforma Genômica - Sequenciamento de DNA /PDTIS-FIOCRUZ pelos serviços de sequenciamento de DNA.

**Tabela 1** – Frequência fenotípica, considerando os sítios 1011 e 1016 do *AaNa<sub>v</sub>* em populações de *Ae. aegypti* do Brasil.

Localidade	status	n	genótipos								
			1011 (Ile/Ile)			1011 (Ile/Met)			1011 (Met/Met)		
			1016 (Val/Val)	1016 (Val/Ile)	1016 (Ile/Ile)	1016 (Val/Val)	1016 (Val/Ile)	1016 (Ile/Ile)	1016 (Val/Val)	1016 (Val/Ile)	1016 (Ile/Ile)
Aparecida de Goiânia	R	18	0,056	0	0,222	0,5	0,222	0	0	0	0
	S	19	0,105	0,053	0	0,842	0	0	0	0	0
Campo Grande	R	22	0,045	0,273	0,455	0,091	0,136	0	0	0	0
	S	17	0,118	0,118	0	0,588	0,176	0	0	0	0
Cuiabá	R	13	0,231	0	0,385	0,308	0,077	0	0	0	0
	S	14	0,571	0,143	0	0,286	0	0	0	0	0
Dourados	R	16	0	0,063	0,5	0,313	0,125	0	0	0	0
	S	20	0,25	0,25	0,1	0,35	0,05	0	0	0	0
Fortaleza	R	16	0,25	0	0	0,75	0	0	0	0	0
	S	16	0,313	0	0	0,688	0	0	0	0	0
Maceió	R	15	0,467	0	0	0,533	0	0	0	0	0
	S	15	0,333	0	0	0,667	0	0	0	0	0
Uberaba	R	23	0,043	0,087	0,391	0,174	0,304	0	0	0	0
	S	20	0,3	0,05	0,05	0,4	0,2	0	0	0	0
média*	R		0,075	0,084	0,391	0,277	0,173	0	0	0	0
	S		0,269	0,123	0,03	0,493	0,085	0	0	0	0
Boa Vista		20	0,950	0	0,050	0	0	0	0	0	0
Cachoeiro do Itapemirim		20	0,200	0	0,250	0,200	0,350	0	0	0	0
Colatina		16	0	0,250	0,063	0,625	0,063	0	0	0	0
Foz do Iguaçu		19	0	0,053	0,526	0,053	0,368	0	0	0	0
Ijuí		20	0,900	0	0	0,100	0	0	0	0	0
Macapá		20	0,300	0	0	0,700	0	0	0	0	0
Santa Bárbara		16	0,938	0	0	0,063	0	0	0	0	0
Santa Rosa		20	0,650	0	0	0,350	0	0	0	0	0

Os indivíduos genotipados são os mesmos apresentados em Martins et al. (2009b), aqui sendo considerados os sítios 1011 e 1016.

# Algumas populações estão divididas quanto ao *status* de resistência a piretróide: resistentes (R) ou susceptíveis (S).

\*média das frequências de indivíduos R e S, excluindo-se as populações Maceió e Fortaleza, que não apresentaram variação no sítio 1016.

**Tabela 2** – Sequenciamento da região IIS6 do *AaNav* de diferentes indivíduos de diferentes populações brasileiras de *Ae. aegypti*.

Localidade	1011 →	Ile	Met	Haplótipos (1011 + intron + 1016)				Ile	Met	Fenótipo molecular (1011 + intron + 1016)
	Intron →	A	A	Ile	Met	Ile	Met	B	B	
	1016 →	Val	Val	Ile	Ile	Val	Val	Ile	Ile	
Uberaba	UB04	X				X				Ile/Ile + AB + Val/Val
	UB08		X			X				Ile/Met + AB + Val/Val
	UB10		X	X		X				Ile/Met + AB + Val/Ile
	UB-S25	X		X						Ile/Ile + AA + Val/Ile
	UB-S26	X		X						Ile/Ile + AA + Val/Ile
	UB-R1			X						Ile/Ile + AA + Ile/Ile
	UB-R3			X						Ile/Ile + AA + Ile/Ile
	UB-R10						X			Ile/Ile + BB + Val/Val
	UB-R11			X			X			Ile/Ile + AB + Val/Ile
	UB-R13		X	X			X			Ile/Met + AB + Val/Ile
	UB-R20			X						Ile/Ile + AA + Ile/Ile
	UB-R22			X						Ile/Ile + AA + Ile/Ile
UB-R26			X						Ile/Ile + AA + Ile/Ile	
Cuiabá	CB01			X		X				Ile/Ile + AB + Val/Ile
	CB02	X								Ile/Ile + AA + Val/Val
	CB03	X				X				Ile/Ile + AB + Val/Val
	CB04	X				X				Ile/Ile + AB + Val/Val
	CB07	X				X				Ile/Ile + AB + Val/Val
	CB08	X				X				Ile/Ile + AB + Val/Val
	CB12	X				X				Ile/Ile + AB + Val/Val
	CB-R16	X				X				Ile/Ile + AB + Val/Val
	CB-S15		X			X				Ile/Met + AB + Val/Val
Aparecida de Goiânia	AG01	X		X						Ile/Ile + AA + Val/Ile
	AG02		X	X		X				Ile/Met + AB + Val/Ile
	AG04		X			X				Ile/Met + AB + Val/Val
	AG05		X			X				Ile/Met + AB + Val/Val
	AG06		X			X				Ile/Met + AB + Val/Val
	AG07		X	X		X				Ile/Met + AB + Val/Ile
	AG08		X			X				Ile/Met + AB + Val/Val
	AG09		X			X				Ile/Met + AB + Val/Val
	AG10		X			X				Ile/Met + AB + Val/Val
	AG11		X			X				Ile/Met + AB + Val/Val
	AG12		X			X				Ile/Met + AB + Val/Val
	Maceió	MA02		X			X			
MA07						X				Ile/Ile + BB + Val/Val
MA09						X				Ile/Ile + BB + Val/Val
Fortaleza	HJ21		X			X				Ile/Met + AB + Val/Val
	HJ22	X								Ile/Ile + AA + Val/Val
	HJ23					X				Ile/Ile + BB + Val/Val
	HJ28	X				X				Ile/Ile + AB + Val/Val

A identificação das amostras corresponde à localidade de coleta: UB, Uberaba; CB, Cuiabá; AG, Aparecida de Goiânia; MA, Maceió e HJ, Henrique Jorge (bairro de Fortaleza). Os haplótipos indicam a combinação do sítio 1011 (Ile ou Met) + categoria de sequência de acordo com o intron (A ou B) + sítio 1016 (Val ou Ile). O “X” marca os tipos de haplótipos encontrados em cada indivíduo. A última coluna indica a classificação genotípica dos indivíduos determinada por PCR alelo-específico.

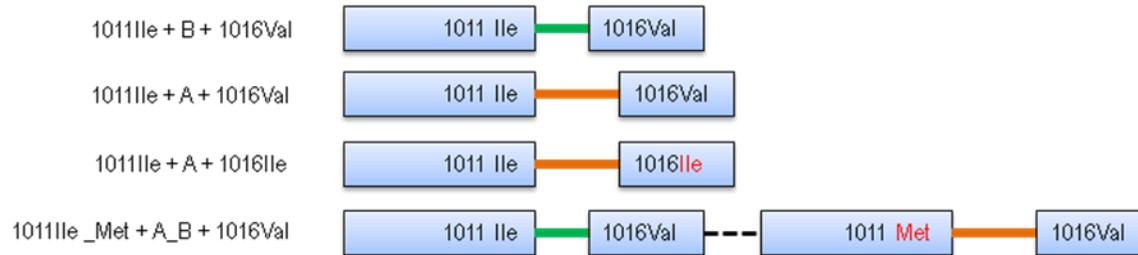
**Figura 1** – Diversidade de seqüências em uma região do canal de sódio regulado por voltagem observadas em populações brasileiras de *Aedes aegypti*.

TIGR	...	CMLVGDVSCIPFFLATV <b>V</b> IGNLV <b>V</b> LNLF <b>L</b> ALLLS...
1011 Ile + B + 1016 Val	...	CMLVGDVSCIPFFLATV <b>V</b> IGNLV <b>V</b> LNLF <b>L</b> ALLLS...
1011 Ile + A + 1016 Val	...	CMLVGDVSCIPFFLATV <b>V</b> IGNLV <b>V</b> LNLF <b>L</b> ALLLS...
1011 Met + A + 1016 Val	...	CMLVGDVSCIPFFLATV <b>M</b> GNLV <b>V</b> LNLF <b>L</b> ALLLS...
1011 Ile + A + 1016 Ile	...	CMLVGDVSCIPFFLATV <b>V</b> IGNLV <b>I</b> LNLF <b>L</b> ALLLS...

exon 20
intron
exon 21

Parte das regiões correspondentes aos exons 20 e 21 e a posição do intron entre eles estão representados. A e B indica o tipo de intron observado, como relatado anteriormente [14]. Os aminoácidos nos sítios 1011 e 1016 estão em negrito. As seqüências nucleotídicas do genoma de cada um dos haplótipos estão disponíveis no Genebank: 1011 Ile + B + 1016 Val (#.....), 1011 Ile + A + 1016 Val (#.....), 1011 Met + A + 1016 Val (#.....) e 1011 Ile + A + 1016 Ile (#.....).. TIGR = seqüência da linhagem Liverpool, projeto genoma de *Aedes aegypti* (Vector Base).

**Figura 2** – Esquema representativo dos haplótipos sugeridos para o *AaNa<sub>v</sub>* observados em populações brasileiras.

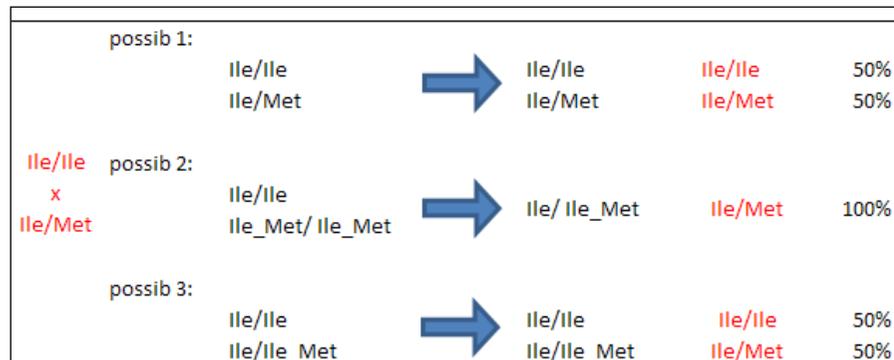


As caixas azuis representam os exons 20 e parte do 21, com o intron entre eles, que classifica os haplótipos como B (verde) ou A (laranja). Os sítios 1011 e 1016 estão representados com aminoácido selvagem (preto) ou mutante (vermelho). De acordo com nossa hipótese, há uma duplicação em algumas populações, composta pelos haplótipos 1011 Ile + B 1016 Val e 1011 Met + A 1016 Val. A linha preta tracejada no haplótipo duplicado sugere que as regiões estão ligadas, mas não define qual sequência estaria a 3' da outra.

**Tabela 3** - Frequência fenotípica do sítio 1011 de *AaNa*, na F1 dos cruzamentos individuais de quatro casais *Aedes aegypti* Ile/Ile X Ile/Met.

Cruzamento	F <sub>1</sub> observada (n)		Hipóteses (&)								
			sem duplicação			com duplicação					
			possib: 1		possib: 2			possib: 3			
Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met	p	Ile/Ile	Ile/Met	p	Ile/Ile	Ile/Met	p	
#1 (♀ Ile/Met x ♂ Ile/Ile)	0	20	10	10	***	0	20	ns	10	10	***
#2 (♀ Ile/Met x ♂ Ile/Ile)	0	20	10	10	***	0	20	ns	10	10	***
#3 (♀ Ile/Met x ♂ Ile/Ile)	8	12	10	10	ns	0	20	**	10	10	ns
#4 (♀ Ile/Ile X ♂ Ile/Met)	9	9	9	9	ns	0	18	***	9	9	ns

(&) O cálculo do número esperado em cada genótipo (possib 1, 2 e 3) foi feito de acordo com as possibilidades da constituição haplotípica dos parentais e da F<sub>1</sub> (veja figura 3). Probabilidade obtida através do teste exato de Fisher (ns = não significativo, \*\* <0.01 e \*\*\*<0.001).



**Figura 3** – Possíveis haplótipos determinantes dos genótipos parentais e da F1 dos cruzamentos apresentados na Tabela 3, considerando a posição 1011 do *AaNa*. Diagrama representativo das frequências de haplótipos (em preto) e como seriam seus respectivos genótipos detectados por PCR (em vermelho), com as hipóteses de segregação na F<sub>1</sub> sem (possib 1) e com (possib 2 e 3) duplicação do sítio 1011.

**Tabela 4** - Frequência dos fenótipos moleculares do sítio 1011 na F<sub>2</sub> de cruzamentos das famílias #1 e #2 testando a hipótese de duplicação gênica

cruzamentos (F <sub>1</sub> )	F <sub>2</sub> (n)				
	observado		esperado		p
	Ile/Ile	Ile/Met	Ile/Ile	Ile/Met	
#1.1 (♀ Ile/Met x ♂ Ile/Met)	5	25	8	22	ns
#2.1 (♀ Ile/Met x ♂ Ile/Met)	7	23	8	22	ns

O número esperado de representantes em cada fenótipo na F<sub>2</sub> considerou a constituição haplotípica da prole F<sub>1</sub>, de acordo com a hipótese de ocorrência da duplicação (veja Tabela 3 e Figura 3), sendo, portanto, 0.25 Ile/Ile e 0.75 Ile/Met (0.50 de Ile/Ile\_Met + 0.25 de Ile\_Met/ Ile\_Met). Probabilidade obtida através do teste exato de Fisher (ns = p>0.05).

#### Referências

- Davies TG, Field LM, Usherwood PN, Williamson MS (2007) DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* 59: 151-162.
- United Nations Environment Programme (2003). WHO Publications Related to the Use of DDT in Disease Vector Control. UNEP/POPS/INC.7/INF/22.
- Soderlund DM (2008) Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pesticide Management Science* 64: 610-616.
- Braga IA, Valle D (2007) *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 295-302.
- Da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D (2005) Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 441-444.
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA, Valle D (2007) Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467-477.
- Busvine JR (1951) Mechanism of Resistance to Insecticide in Houseflies. *Nature* 168: 193-195.
- Harrison CM (1951) Inheritance of Resistance to DDT in the Housefly, *Musca-Domestica* L. *Nature* 167: 855-856.
- Catterall WA (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26: 13-25.
- Du Y, Nomura Y, Luo N, Liu Z, Lee JE, Khambay B, Dong K (2009) Molecular determinants on the insect sodium channel for the specific action of type II pyrethroid insecticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 234: 266-272.
- O'Reilly AO, Khambay BP, Williamson MS, Field LM, Wallace BA, Davies TG (2006) Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem J* 396: 255-263.
- Davies TE, O'Reilly AO, Field LM, Wallace B, Williamson MS (2008) Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modelling. *Pest Manag Sci* 64: 1126-1130.
- Bregues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J (2003) Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* 17: 87-94.

14. Martins AJ, Lins RMMA, Linss JGB, Peixoto AA, Valle D (2009) Voltage gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* *in press*.
15. Martins AJ, Lima JB, Peixoto AA, Valle D (2009) Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Tropical Medicine & International Health* *submitted*.
16. Rajatileka S, Black WC, Saavedra-Rodriguez K, Trongtokit Y, Apiwathnasorn C, McCall PJ, Ranson H (2008) Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. *Acta Trop* 108: 54-57.
17. Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black WC (2007) A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 16: 785-798.
18. Chang C, Shen WK, Wang TT, Lin YH, Hsu EL, Dai SM (2009) A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* In Press, Accepted Manuscript. doi: DOI: 10.1016/j.ibmb.2009.01.001.
19. Davies TG, Field LM, Usherwood PN, Williamson MS (2007) A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Mol Biol* 16: 361-375.
20. Zhou W, Chung I, Liu Z, Goldin AL, Dong K (2004) A voltage-gated calcium-selective channel encoded by a sodium channel-like gene. *Neuron* 42: 101-112.
21. Raymond M, Chevillon C, Guillemaud T, Lenormand T, Pasteur N (1998) An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 1707-1711. 10.1098/rstb.1998.0322 [doi].
22. Rooker S, Guillemaud T, Berge J, Pasteur N, Raymond M (1996) Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity* 77: 555-561.
23. Mouches C, Pasteur N, Berge JB, Hyrien O, Raymond M, Desaintvincent BR, Desilvestri M, Georghiou GP (1986) Amplification of An Esterase Gene Is Responsible for Insecticide Resistance in A California *Culex Mosquito*. *Science* 233: 778-780.
24. Guillemaud T, Lenormand T, Bourguet D, Chevillon C, Pasteur N, Raymond M (1998) Evolution of resistance in *Culex pipiens*: Allele replacement and changing environment. *Evolution* 52: 443-453.
25. Raymond M, Poulin E, Boiroux V, Dupont E, Pasteur N (1993) Stability of Insecticide Resistance Due to Amplification of Esterase Genes in *Culex pipiens*. *Heredity* 70: 301-307.
26. Wondji CS, De Silva WAPP, Hemingway J, Ranson H, Karunaratne SHPP (2008) Characterization of knockdown resistance in DDT- and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* populations from Sri Lanka. *Tropical Medicine & International Health* 13: 548-555.
27. Ranson H, Claudianos C, Ortelli F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R (2002) Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298: 179-181.
28. Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG (2006) A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol Biol* 15: 615-636. IMB672 [pii];10.1111/j.1365-2583.2006.00672.x [doi].

29. Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne SH, Hemingway J, Black WC, Ranson H (2008) Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 113-123. S0965-1748(07)00233-0 [pii];10.1016/j.ibmb.2007.09.007 [doi].
30. Kimura M, King JL (1979) Fixation of a deleterious allele at one of two "duplicate" loci by mutation pressure and random drift. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 2858-2861.
31. Conant GC, Wolfe KH (2008) Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nat Rev Genet* 9: 938-950. nrg2482 [pii];10.1038/nrg2482 [doi].
32. Papp B, Pal C, Hurst LD (2003) Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast. *Nature* 424: 194-197. 10.1038/nature01771 [doi];nature01771 [pii].
33. Bourguet D, Raymond M, Fournier D, Malcolm CA, Toutant JP, Arpagaus M (1996) Existence of two acetylcholinesterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Neurochem* 67: 2115-2123.
34. Bourguet D, Pasteur N, Bisset J, Raymond M (1996) Determination of Ace.1 Genotypes in Single Mosquitoes: Toward an Ecumenical Biochemical Test. *Pestic Biochem Physiol* 55: 122-128. PB960041 [pii].
35. Berticat C, Boquien G, Raymond M, Chevillon C (2002) Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res* 79: 41-47.
36. Berticat C, Duron O, Heyse D, Raymond M (2004) Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*. *Genet Res* 83: 189-196.
37. Labbe P, Berthomieu A, Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T, Weill M (2007) Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol* 24: 1056-1067. msm025 [pii];10.1093/molbev/msm025 [doi].
38. Djogbenou L, Labbe P, Chandre F, Pasteur N, Weill M (2009) Ace-1 duplication in *Anopheles gambiae*: a challenge for malaria control. *Malar J* 8: 70. 1475-2875-8-70 [pii];10.1186/1475-2875-8-70 [doi].
39. Goldin AL (2002) Evolution of voltage-gated Na(+) channels. *J Exp Biol* 205: 575-584.
40. Bracco JE, Capurro ML, Lourenco-de-Oliveira R, Sallum MA (2007) Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 573-580. S0074-02762007000500006 [pii].
41. Ribeiro CDM, Martins AJ (2009) Seleção. *Journal of Insect Physiology* .
42. Lima JB, Da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AK, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D (2003) Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68: 329-333.
43. Belinato TA, Martins AJ, Lima JB, de Lima-Camara TN, Peixoto AA, Valle D (2009) Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 43-47.

### ***3.4 – Effect of pyrethroid selection under laboratory conditions of a natural Aedes aegypti population on development, longevity and reproduction***

Este artigo apresenta o estudo do efeito pleiotrópico da resistência a inseticida sobre outros parâmetros adaptativos do inseto. O texto encontra-se em fase final de preparação.

Effect of pyrethroid selection under laboratory conditions of a natural *Aedes aegypti* population on development, longevity and reproduction

Ademir Jesus Martins<sup>a#</sup>, Camila Dutra e Mello Ribeiro<sup>a#</sup>, Alexandre Afranio Peixoto<sup>b</sup>, José Bento Pereira Lima<sup>a\*</sup>, Denise Valle<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz / Laboratório de Entomologia, Instituto de Biologia do Exército

<sup>b</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz

#authors contributed equally

\* Corresponding authors at: Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel./fax: +55 21 38952247

E-mail addresses: [jbento@ioc.fiocruz.br](mailto:jbento@ioc.fiocruz.br) and [dvalle@ioc.fiocruz.br](mailto:dvalle@ioc.fiocruz.br)

## **Abstract**

*Aedes aegypti* dispersion is a major reason for increasing dengue transmission in South America. In Brazil, control of this mosquito strongly relies on the use of pyrethroids and organophosphates against adults and larvae, respectively. In consequence, many *Ae. aegypti* field populations are insecticide resistant. Resistance has a high adaptive value in the presence of insecticide treatment. However some selected mechanisms can influence important biological processes, leading to a high fitness cost in the absence of insecticide pressure. In order to investigate the fitness cost of insecticide resistance, we observed some life table parameters of a population kept in the laboratory for nine generations, selected or not with pyrethroid in the adult stage. Larval development, adult longevity, amount of ingested blood, egg laying and egg viability were negatively affected in the pyrethroid selected group. However, from the fifth generation on the resistance status of the selected group did not increase. Our results suggest the selection process caused the accumulation of alleles with negative epistatic effects on viability. Additionally, cross resistance to the organophosphate temephos was verified in the group selected with pyrethroid. Our data corroborate the hypothesis that insecticide resistance is associated to a high fitness cost.

## **1. Introduction**

Insecticide resistance is one of the major obstacles in the attempt to control disease vectors and agricultural pest insects. The continuous insecticide pressure can select insect populations with 1) an altered integument, less permissive to the insecticide penetration, 2) modifications in the structure or expression level of naturally detoxifying enzymes, 3) mutations in the insecticide target molecules, in the central nervous system, that hamper interaction with the insecticide, or 4) behavioral changes, such as avoiding contact with the insecticide (Hemingway and Ranson, 2000). While some modifications conferring a selective advantage spread quickly in a given population under insecticide pressure, they can be associated with a high fitness cost. It is assumed that, in general, genes that rapidly increase in frequency as a consequence of adaptation to a new environment should have a fitness cost in the original population habitat (Fisher, 1958; Holloway et al., 1990; Carrière et al., 1994). This is probably the

consequence of reallocation of resources, affecting physiologic and reproductive processes (Davies et al., 1996).

Since the vectorial capacity of an insect is estimated through biological (development and reproduction), ecological and behavioral parameters (Lourenço-de-Oliveira, 2005), insecticide resistance can interfere with the vectorial capacity of species involved in pathogen transmission. Mebrahtu et al. (1997), working with *Aedes aegypti* specimens resistant to the pyrethroid permethrin, observed changes in the fecundity rate, time elapsed between blood meal and egg laying and in the amount of time dedicated to oviposition, when compared to susceptible specimens. DDT selection of *Ae. aegypti* also resulted in the decrease of egg production, hatching rate and larvae survival (Abedi and Brown, 1961). Controlled insecticide selection in the laboratory would enable the study of resistance dynamics and its related mechanisms and allow anticipating, for instance, the effect of introducing a new insecticide in the context of a control program (Mckenzie and Batterham, 1998).

Brazil presents a growing number of dengue cases, mainly due to the low efficacy of actions against its vector, presently resistant to organophosphates and pyrethroids in many localities (Lima et al., 2003; Da-Cunha et al., 2005; Montella et al., 2007). Reports of *Ae. aegypti* pyrethroid resistance in the country point to metabolic and target site resistance mechanisms (Montella et al. 2007; Martins et al. 2009). In order to investigate both resistance dynamics and resistance effects on insect viability, we quantified several developmental and reproductive parameters in a field *Ae. aegypti* population that was exposed to controlled pyrethroid selection in the laboratory through several generations.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Mosquito populations*

The Rockefeller (Rock) strain, established in 1959 in the Rockefeller Institute (New York, NY), was used as a control of vigor, fecundity and insecticide susceptibility (Hartberg and Craig, 1970). Controlled pyrethroid selection, in the laboratory, was performed with mosquitoes collected at Natal, RN, Northeast Brazil, in 2005. Different developmental and reproductive parameters, related to mosquito vectorial

capacity, were evaluated in several groups deriving from Natal population (see below, "Selection"), at F<sub>1</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>6</sub> and F<sub>9</sub> generations.

## 2.2. Mosquitoes rearing

After allowing *Ae. aegypti* eggs to hatch during 24 hours, around 500 larvae were transferred to plastic basins (27 X 19 X 7 cm) filled with 1L of dechlorinated water. Larvae were fed with 0.5g of cat food (Friskies, Purina/ Camaquã/RS), added each third day. Larvae were kept in BOD incubators at 28±1°C. Under these conditions all larvae develop into pupa in 5-6 days. Pupae were transferred to carton cages (17 cm diameter X 18 cm high) and resulting adults were fed *ad libitum* with 10% (w/v) sugar solution. Adults were kept under 25±2°C and 70±10% rh. Adult females were fed on anesthetized guinea pigs. Three days after the blood meal, oviposition cups, covered internally with a filter paper and partially filled with water, were introduced in the cages to receive oviposition. Two days later oviposition cups were removed from the cages and eggs were stored for further use up to six months after drying.

## 2.3. Pyrethroid selection

Pyrethroid selection started with F<sub>1</sub> mosquitoes from Natal, RN, in bioassays performed with deltamethrin impregnated glass bottles, according to a slight modification of CDC procedure adopted in our laboratory (Da-Cunha et al., 2005). The amount of insecticide was frequently calibrated to produce mortality rates around 50%, as indicated below. Only females, 3-5 days old, were exposed to the pyrethroid. These females were already inseminated by non-selected males (see Discussion). Bioassays and selection consisted of 1 hour exposure to the impregnated bottles, followed by a 24-hour recovery period, in recipients free of insecticide. Surviving (resistant) females were then transferred to carton cages, in three distinct lineages of 200 females each, named R1-R3. During the selection procedure, throughout generations, each R lineage remained isolated from the others. Control group, non pyrethroid-selected, reared from Natal F<sub>1</sub> mosquitoes, was also prepared. Three control lineages, named S (S1-S3), also consisting of 200 females each and reared in the same conditions of R group, except for the deltamethrin

selection, were established. As for R lineages, there was not exchange of specimens among S ones. In both S and R groups, 200 females were used to start every new generation for each lineage. In all lineages and for each generation, three weekly blood meals were offered, in order to ensure eggs production.

#### *2.4. Insecticide resistance bioassay*

The susceptibility deltamethrin status of R and S lineages was compared using impregnated bottles exactly as described above for the R group selection at the F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>8</sub> and F<sub>9</sub> generations. Rockefeller mosquitoes were included for comparison in bioassays with F<sub>8</sub> and F<sub>9</sub>. At least three deltamethrin impregnated bottles (1.5 µg/bottle at F<sub>3</sub> and 3.0 µg/bottle afterwards) were used for each lineage. Each bioassay was repeated at least three times.

Dose-response bioassays with the organophosphate temephos were also performed with S and R L3 larvae at the F<sub>9</sub> generation, according to Lima et al. (2003). Briefly, for each bioassay larvae were exposed to a series of 7-9 insecticide concentrations prepared in 100 mL in plastic cups, with four replicas per concentration and 20 larvae per replica. Bioassays for each lineage were performed four times. The resistance ratios (RR<sub>95</sub>) were calculated by comparison with Rockefeller values, obtained by linear regression of mortality rates transformed by Probit analysis with the software Polo-PC (LeOra Software, Berkeley, CA).

#### *2.5. Development and longevity evaluation assays*

The following assays were performed at least twice with the indicated generations of R and S groups. In every case assays were conducted in parallel with Rock mosquitoes, as an internal control.

Kinetics of larval development. Eggs were immersed in water during 24 hours to induce hatching.

Duplicate samples of 200 larvae each were carefully transferred to plastic basins containing 1 liter of

dechlorinated water and reared as detailed above. Pupae were daily scored and transferred to cages. The cumulative rate of pupae formed up to the 6<sup>th</sup> day after larva hatching was evaluated.

Sex ratio. The sex of adults resulting from the assay described above was monitored and the numbers of females and males were compared.

Adult longevity. Adult longevity was monitored in duplicate samples of 100 couples each. Comparisons of female or male survivorship were performed 30 and 60 days after adult emergence.

Blood meal size. For each group, three pools of 10 non-blood fed females were weighed in an analytical balance (APX – 200, Denver Instrument). Anesthetized guinea pigs were offered to five-day old adult females during 30 minutes. Additional pools of blood fed females were then weighed and the weight ratio between pools of the same samples, before and after feeding, was calculated.

## *2.6. Evaluation of reproductive aspects*

Several parameters were considered: a) the ratio of egg-laying females; b) the number of eggs per female and c) the egg hatching rate. Oviposition of adult females, three days after blood meal, was individually stimulated, in 6 cm diameter Petri dishes, covered with a wet filter paper, as described elsewhere (Valencia et al., 1996). The number of egg-laying females was registered 24 hours later. Seven days after the end of oviposition, 10 Petri dishes, deriving from individual females, were randomly chosen. Hatching was stimulated by immersion of the filter papers in organic matter rich water (Farnesi et al., 2009), during 24 hours.

## *2.7. Statistical analysis*

Lineages within each group S (S1-3) and R (R1-3) were compared by ANOVA, followed by Bonferroni multiple comparison test. Since in many circumstances no significant differences among S or among R lineages were observed, in some cases, in order to better display the results, data are presented for pooled S and R groups. When there were no significant differences among lineages of each group, in order to better display the results, data from groups S or R were pooled. Comparisons among R and S

groups and Rockefeller were made through ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test, except for the comparison of egg numbers, performed with the non-parametric Kruskal-Wallis test. Numbers of female and male adults were compared by Fisher's exact test. Analyses were performed utilizing the GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

### 3. Results

#### 3.1. Pyrethroid selection and resistance evaluation

*Aedes aegypti* adult females from Natal, RN were selected with 1.5 µg deltamethrin / bottle from F<sub>1</sub> (48% mortality) to F<sub>3</sub> (20-34% mortality). Deltamethrin dosage was then increased to 3.0 µg / bottle. At the beginning of the selection procedure, R groups' survival of subsequent generations tended to increase after exposure to the same pyrethroid dosage, as expected. Surprisingly, from F<sub>5</sub> on, this trend was reversed (Figure 1). On the other hand, S females tended to become progressively more susceptible to deltamethrin (Figure 1). The independent lineages of S (S1, S2 and S3) and R (R1, R2 and R3) groups followed the same tendency within each group. From F<sub>5</sub> on, the survival rate was significantly different between S and R groups (Supplementary Table S1).

#### 3.2. Development and longevity of laboratory selected groups

Dynamics of larval development. Time needed to complete larval development was progressively increased over generations in the R group. Figure 2 presents the rate of pupa formation at the 6<sup>th</sup> day after egg hatching throughout generations. There is a significant progressive delay in larval development of R lineages (up to two days until pupa formation, see Supplementary Figure S1). At the end of the selection process (F<sub>9</sub>), a total of respectively 79 and 11% of pupae were formed in S and R groups at the 6<sup>th</sup> day after hatching.

Sex ratio. The observed sex ratio was in accordance with 1:1 expected values in all groups and generations evaluated (Supplementary Table S2).

Adult longevity. In all cases, including Rockefeller strain, females lived longer than males. In the F<sub>9</sub> generation a tendency of reduction in the R females longevity was observed (Supplementary Figure S2). Comparisons among Rock, S and R groups were performed at 30 and 60 days after adult emergence (Table 1). At the 30<sup>th</sup> day, all groups were equivalent up to F<sub>6</sub>. Difference between S and R lineages was significant only for F<sub>9</sub> females. By contrast, at the 60<sup>th</sup> day, the higher survival rate of Rock specimens compared to S and R groups was evident in all generations. In this case a lower survival rate of R females, compared to S ones, was also observed from F<sub>6</sub> on (Table 1).

Blood feeding. The amount of ingested blood varied significantly between S and R groups since F<sub>3</sub> (Table 2 and Supplementary Figure S3).

### *3.3. Oviposition and egg viability of laboratory selected groups*

The rate of egg-laying females was lower in S and R groups since F<sub>1</sub> generation, when compared to Rock. Additionally, in the R group the proportion of these females decreased along the selection process (Figure 3). If only F<sub>9</sub> generation is considered, a decrease of roughly 20 and 45% is noted for groups S and R, respectively, when compared to Rockefeller (Table 3). The number of eggs laid was also significantly affected in the R group, differing from Rock values at F<sub>6</sub> and F<sub>9</sub> generations (see Figure 4 and Supplementary Table S3). In the F<sub>9</sub> generation, when compared to Rock, a reduction of 22.6% in the number of eggs per female was noted in the R group, contrasting with a 6.8% reduction in the S group (Table 3). Eggs viability profile presented the same tendency (Figure 5), with a significant reduction (roughly 30%) for R group at F<sub>9</sub> generation (Table 3).

A general decline in the performance of nearly all parameters evaluated was noted for both S and R groups at the end of the selection process (F<sub>9</sub>). In all cases, a decrease was more prominent for R group (Table 3). Larval development was the most affected aspect: on the 6<sup>th</sup> day after larval hatching approximately 10% of pupae were observed in the R group, against 90 and 70% specimens in the Rockefeller strain and S group, respectively.

### 3.4. Resistance to organophosphate of laboratory selected groups

F<sub>9</sub> larvae from R and S groups were submitted to dose response bioassays in order to quantify resistance to temephos. Resistance ratios (RR<sub>95</sub>) of 26.0 and 15.6 were estimated for R and S groups, respectively, suggesting selection with the pyrethroid deltamethrin resulted in cross resistance to the organophosphate.

## 4. Discussion

Investigations regarding fitness cost, or life history, are generally performed through comparisons, under controlled laboratory conditions, of biological parameters, such as developmental kinetics, fecundity, or even growing rates (Foster et al., 2003). In the present work we investigated the effects of insecticide resistance over *Aedes aegypti* fitness. In order to accomplish that, we compared strains, derived from one field population, selected or not with pyrethroid during nine generations in the laboratory. A series of life table parameters related to the vectorial capacity were evaluated, regarding larval development, reproduction and longevity. The Rockefeller strain, kept for decades under laboratory conditions, employed as a reference, exhibited the better performance, a reflex of its adaptation to confined conditions.

Duration of the mean development time along generations is a primary aspect of fitness in disseminating mosquito populations (Charlesworth, 1980). In the presence of natural predators or parasites, every delay of development has a potential to reduce the survival rate of larval instars (Agnew and Koella, 1999). We observed a progressive delay in the larval development of the pyrethroid selected group (R) from F<sub>1</sub> to F<sub>9</sub>. Changes in the development dynamics were also observed in the Lepidoptera *Spodoptera exigua* selected with the pyrethroid fenvalerate (Brewer and Trumble, 1991). Accordingly, development of two *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) strains, selected in the laboratory with the pyrethroid deltamethrin or with the Insect Growth Regulator diflubenzuron, was delayed when compared to the susceptible lineage (Bouvier et al., 2001).

Longevity reduction, mainly in females, was observed in the pyrethroid exposed (R) group along the selection procedure. This is a relevant issue, since adult female longevity is one major aspect of mosquito

vectorial capacity. No differences in longevity were observed in some strains of the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi* exhibiting  $\gamma$ -HCH and dieldrin resistance (Rowland, 1991a). The amount of ingested blood directly influences the number of eggs deposited by females, and this is an important parameter regarding species dissemination. In addition, the blood meal size should determine the ingested parasite load. A significant reduction of the ingested blood was observed in the pyrethroid selected R lineages at the F<sub>9</sub> generation, compared to both Rockefeller and S group. Interestingly, Corbel et al. (2004) reported that the amount of blood ingested by the main malaria vector, *An. gambiae*, was inversely proportional to the cypermethrin sub-lethal dosage employed.

A reduction in the number of egg-laying females was noted for R group, suggesting either a lower fecundity rate or, alternatively, decreased egg-laying ability. Mebrahtu et al. (1997) observed that the rate of inseminated *Ae. aegypti* females of a field permethrin resistant population was lower when compared to a susceptible field strain. Additionally, resistant females took longer to lay their eggs. Lower insemination rates observed for  $\gamma$ -HCH and dieldrin resistant *An. gambiae* and *An. stephensi* females were attributed to a lower activity of resistant males (Rowland, 1991b).

As mentioned above, a smaller proportion of group R (F<sub>9</sub>) females were able to lay eggs in one gonotrophic cycle. Besides, group R females tended to produce eggs with lower viability. There is a series of reports describing reduction in the number of eggs laid by insecticide resistant strains derived from controlled selection experiments. This is the case of fenvalerate resistant *Spodoptera exigua* (Brewer and Trumble, 1991), deltamethrin and diflubenzuron resistant *Cydia pomonella* (Bouvier et al., 2001) and DDT resistant *Ae. aegypti* (Abedi and Brown, 1961). Mebrahtu et al. (1997) also detected reduced larval hatching rate of *Ae. aegypti* derived from permethrin resistant specimens.

We described a series of changes in the development and reproduction of an *Ae. aegypti* field population further selected with the pyrethroid deltamethrin for several generations. This population was collected in 2005 at Natal, RN, a municipality at Northeast Brazil. Insecticide resistance monitoring performed in 2004, when temephos was routinely used, revealed RR<sub>95</sub> of 18.6 for this organophosphate at that locality (Montella et al., 2007). Controlled pyrethroid selection, in the laboratory (group R) resulted in temephos RR<sub>95</sub> of 26.0. Group S, reared in parallel, but without insecticide selection, revealed a 60% lower RR<sub>95</sub>, of 15.6. At the locality of Natal temephos was replaced by *Bti* in the course of 2005 and resistance

monitoring was repeated in 2007, when a temephos RR decrease, to 10.4, was detected (Lima, personal communication). Taken together, our data strongly suggest that pyrethroid selection induced cross resistance to the organophosphate temephos probably due to an increase in the activity of metabolic resistance mechanisms, putatively used on detoxifying enzymes. Interestingly, several natural Brazilian *Ae. aegypti* populations, exposed to organophosphates for three decades, developed cross resistance to pyrethroids, probably due to the increase in the activity of Esterases and Glutathione-S-transferases (Montella et al., 2007).

Our results suggest a correlation between the acquired pyrethroid resistance and a significant reduction in various aspects of the fitness of the resistant populations. However, we also observed that from the F<sub>5</sub> generation on the mortality after insecticide exposure tended to increase, in contrast to other reports dealing with *Ae. aegypti* pyrethroid selection especially when measured in the larval stage (Mebrahtu et al., 1997; Urmilla et al., 2001; Kumar et al., 2002; Rodríguez et al., 2005; Saavedra-Rodríguez et al., 2007). In fact, Kumar et al. (2002) working with insecticide selection for 40 generations observed high resistance levels only when *Ae. aegypti* larvae, but not adults, were employed. It should also be noted that in our experiment only adult females were submitted to deltamethrin selection. Therefore, it is possible that susceptible males with putative higher mating success might have potentially contributed to the maintenance of susceptible alleles during the selection process decreasing its efficiency. Nevertheless, the decrease in general fitness of the selected strains suggest an accumulation of deleterious effects due to pleiotropy of the resistant alleles or by a hitch-hiking effect (Maynard-Smith and Haigh, 1974).

Several mechanisms can contribute to the establishment of a resistant population and as a consequence the deleterious effects associated with this resistance might differ among natural populations. Therefore, the life-trait parameters we studied here should also be analyzed in individuals from natural populations with different susceptibility status for distinct insecticides. This analysis might contribute to our understanding of this phenomenon, as well as the evolution of insecticide resistance.

**Acknowledgments:** To the Programa Nacional de Controle da Dengue / Secretaria de Vigilância em Saúde (PNCD/SVS) for requesting collections of *Aedes aegypti* eggs in the localities here studied. To Diogo Fernandes Bellinato for bioassays assistance.

**Financial support:** This work was supported by the Programa Nacional de Controle da Dengue / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde (PNCD/SVS/MS), Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde Pública / Fundação Oswaldo Cruz (PDTSP/Fiocruz), Vice-Presidência de Serviços de Referência e Ambiente/Fundação Oswaldo Cruz (VPSRA/Fiocruz), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos do Rio de Janeiro (Faperj) and the Howard Hughes Medical Institute (HHMI).

**Table 1** - Adult longevity of an *Aedes aegypti* field population submitted to controlled selection in the laboratory.

generation	days after adult emergency						
	30 <sup>th</sup> day			60 <sup>th</sup> day			
	Rock	S	R	Rock	S	R	
males	F <sub>3</sub>	60.4±3.06 <sup>a</sup>	58.5±2.06 <sup>a</sup>	58.5±4.06 <sup>a</sup>	15.6±3.61 <sup>a</sup>	5.71±1.34 <sup>b</sup>	2.6±1.23 <sup>b</sup>
	F <sub>6</sub>	64.0±2.62 <sup>a</sup>	58.6±1.59 <sup>a</sup>	57.2±2.57 <sup>a</sup>	22.4±3.90 <sup>a</sup>	12.3±1.04 <sup>b</sup>	8.7±1.40 <sup>b</sup>
	F <sub>9</sub>	64.3±10.27 <sup>a</sup>	61.9±2.52 <sup>a</sup>	51.7±2.48 <sup>a</sup>	28.4±8.12 <sup>a</sup>	9.8±3.20 <sup>b</sup>	8.7±2.22 <sup>b</sup>
females	F <sub>3</sub>	82.5±1.29 <sup>a</sup>	85.7±2.51 <sup>a</sup>	84.1±1.53 <sup>a</sup>	30.6±5.62 <sup>a</sup>	15.7±1.82 <sup>b</sup>	6.5±2.96 <sup>b</sup>
	F <sub>6</sub>	81.4±2.96 <sup>a</sup>	74.4±2.10 <sup>a</sup>	65.4±5.18 <sup>a</sup>	35.7±1.83 <sup>a</sup>	21.6±2.11 <sup>b</sup>	8.6±1.74 <sup>c</sup>
	F <sub>9</sub>	81.6±2.17 <sup>a</sup>	81.2±2.11 <sup>a</sup>	61.9±1.59 <sup>b</sup>	40.0±1.21 <sup>a</sup>	22.9±2.65 <sup>b</sup>	8.9±1.09 <sup>c</sup>

Values represent percent survival rate ± standard error, 30 or 60 days after adult emergence. Rock, R and S refer, respectively, to Rockefeller and groups derived from Natal, RN population selected or not with deltamethrin throughout generations. In each generation, values followed by the same letter do not differ significantly ( $p > 0.05$ , ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison Test).

**Table 2** - Increase of *Aedes aegypti* adult females weight after a blood meal; comparison of groups exposed (R) or not (S) to pyrethroid selection and the reference strain, Rockefeller (Rock).

Generation	Rock		S		R	
	n	weight ratio	n	weight ratio	n	weight ratio
F <sub>1</sub>	3	1.9 ± 0.18 <sup>a</sup>	9	1.7 ± 0.12 <sup>a</sup>	6	1.6 ± 0.09 <sup>a</sup>
F <sub>3</sub>	6	1.7 ± 0.04 <sup>a</sup>	18	1.4 ± 0.04 <sup>b</sup>	18	1.3 ± 0.03 <sup>c</sup>
F <sub>6</sub>	6	2.0 ± 0.04 <sup>a</sup>	17	1.8 ± 0.02 <sup>a</sup>	18	1.3 ± 0.04 <sup>b</sup>
F <sub>9</sub>	3	2.2 ± 0.02 <sup>a</sup>	15	2.0 ± 0.08 <sup>a</sup>	15	1.4 ± 0.03 <sup>b</sup>

Ratios were obtained by comparison of females weight after and before the blood meal, in all cases. Values indicate mean and standard error. (n) represents the number of 10-female pools employed in each case. Values obtained for the different groups at each generation were compared; values followed by the same letter do not differ significantly ( $p > 0.05$ , ANOVA, followed by Bonferroni's Multiple Comparison Test).

**Table 3** - Comparison of development, longevity and reproduction parameters obtained for the *Aedes aegypti* reference strain Rockefeller, and a field population kept for 9 generations in the laboratory with (R) or without (S) exposure to the pyrethroid deltamethrin.

parameter	Rock X selected lineage (F9)			average reduction (%)	
	Rock	S	R	S	R
larval dev rate <sup>1</sup>	89.9 ± 14.30 <sup>a</sup>	70.9 ± 11.86 <sup>a</sup>	9.4 ± 2.92 <sup>b</sup>	21.1	89.5
♂ longevity rate 30 <sup>th</sup> day <sup>2</sup>	64.3 ± 14.53 <sup>a</sup>	61.9 ± 6.16 <sup>a</sup>	51.7 ± 6.08 <sup>a</sup>	3.7	24.4
♀ longevity rate 30 <sup>th</sup> day <sup>2</sup>	81.6 ± 3.07 <sup>a</sup>	81.2 ± 5.16 <sup>a</sup>	61.9 ± 3.91 <sup>b</sup>	0.5	24.1
bloodmeal engorg <sup>3</sup>	2.2 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.10 <sup>b</sup>	10.0	40.0
rate of egg laying ♀ <sup>4</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>	81.7 ± 2.89 <sup>b</sup>	55.0 ± 5.00 <sup>c</sup>	18.3	45.0
eggs/female <sup>5</sup>	92.3 ± 24.03 <sup>a</sup>	86.0 ± 37.96 <sup>a</sup>	71.4 ± 46.43 <sup>b</sup>	6.8	22.6
eggs viability rate <sup>6</sup>	96 ± 1.0 <sup>a</sup>	92 ± 4.7 <sup>a</sup>	67 ± 17.4 <sup>b</sup>	4.2	30.2

All values represent the mean ± standard deviation of the considered parameter. In the first block ("Rock X selected lineage"), R and S represent values obtained after 9 generations of mosquitoes selected or not with deltamethrin, respectively.

Same letters indicate non significant differences (ANOVA, p>0.05). Comparisons considered each parameter independently. The last columns ("average reduction") compare S and R groups with the Rockefeller strain.

(1) Larvae development is the rate of pupae formed up to the 6<sup>th</sup> day after larval hatching.

(2) Longevity is represented by the mean survival rate at the 30<sup>th</sup> day after adult emergency.

(3) Blood meal engorgement refers to the females' weight after/ before bloodfeeding.

(4) Percentage of blood fed females that laid eggs.

(5) Mean number of eggs laid by bloodfed females.

(6) Rate of L<sub>1</sub> larvae hatching.

Supplementary Table S1 – Survival comparison of *Aedes aegypti* females from groups R and S after exposure to deltamethrin at the indicated generations of laboratory selection.

Generation	<i>t</i>	df	p
F3	0.980	4	0.3828
F4	1.481	4	0.2128
F5	9.128	4	0.0008
F8	10.32	4	0.0005
F9	8.105	4	0.0013

Test *t* comparison for the rate of survival females 24 hours after exposure to impregnated bottles with 3.0µg deltamethrin. *t* = *t* value; df = degrees of freedom; p = probability. This test was performed with pooled lineages from both groups S (S1, S2 and S3) and R (R1, R2 and R3).

Supplementary Table S2 – *Aedes aegypti* sex ratio of control (S) or deltamethrin exposed (R) groups under laboratory conditions, throughout generations.

	F1			F3			F6			F9		
	♀	♂	p	♀	♂	p	♀	♂	p	♀	♂	p
Rock	88	80	0.7434	88	90	1.000	108	98	0.6934	89	108	0.364
	97	99	1.000	97	93	0.9183	103	102	1.000	87	96	0.6758
S1	118	113	0.8524	97	102	0.8411	95	106	0.6187	99	110	0.6247
	93	114	0.3251	98	122	0.2935	106	98	0.7664	97	102	0.8411
S2	-	-	-	95	111	0.4901	106	105	1.000	80	100	0.342
	-	-	-	95	113	0.4324	81	122	0.0464*	89	90	1.000
S3	100	124	0.2979	89	106	0.4175	123	120	0.9279	97	94	0.9185
	103	124	0.3475	101	114	0.5627	99	97	1.000	100	87	0.5348
R1	-	-	-	105	105	1.000	88	108	0.3627	84	94	0.6715
	-	-	-	75	131	0.0072**	90	109	0.3664	80	85	0.8258
R2	74	86	0.576	91	117	0.2384	86	114	0.1924	77	96	0.3326
	140	167	0.2936	113	108	0.8491	95	104	0.6891	100	109	0.6956
R3	111	101	0.6976	116	108	0.7768	86	114	0.1924	89	91	1.000
	87	107	0.3602	98	128	0.1868	-	-	-	77	93	0.4472

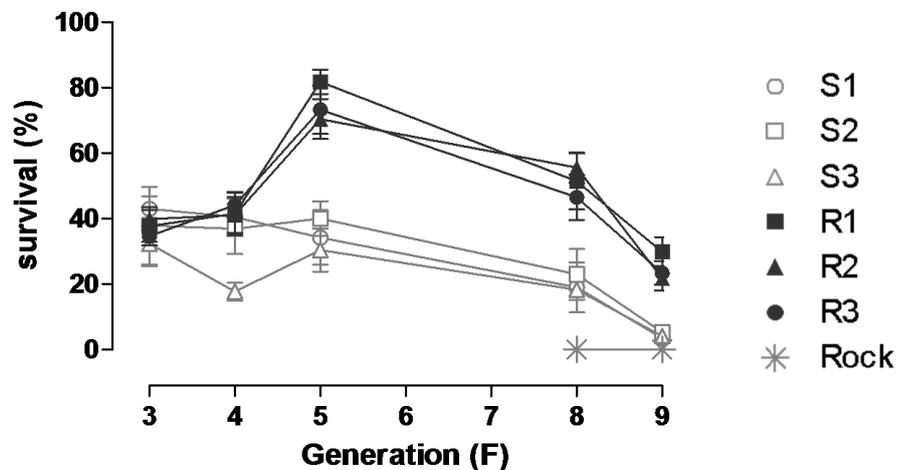
Number of females and males obtained from S1-S3 and R1-R3 lineages and from Rockefeller strain (Rock). For every lineage, each line shows an independent assay. p = probability for Fisher's exact test; \* = p<0.05; \*\* = p<0.01; - = not done.

Supplementary Table S3: Number of eggs per *Aedes aegypti* female of a field population kept in the laboratory for 9 generations with (R) or without (S) exposure to the pyrethroid deltamethrin. Rockefeller (Rock) mosquitoes are included as a control lineage.

Generation	Median number eggs			Difference in rank sum for Dunn's Multiple comparison Test		
	Rock	S	R	Rock Vs S	Rock Vs R	S Vs R
F1	109.5	105.5	111.0	1.370	-2.247	-3.617
F3	105.5	98.0	92.5	-1.066	1.402	2.467
F6	123.0	113.5	88.5	8.582	27.02**	18.43*
F9	93.5	80.0	76.0	10.07	21.22*	11.14

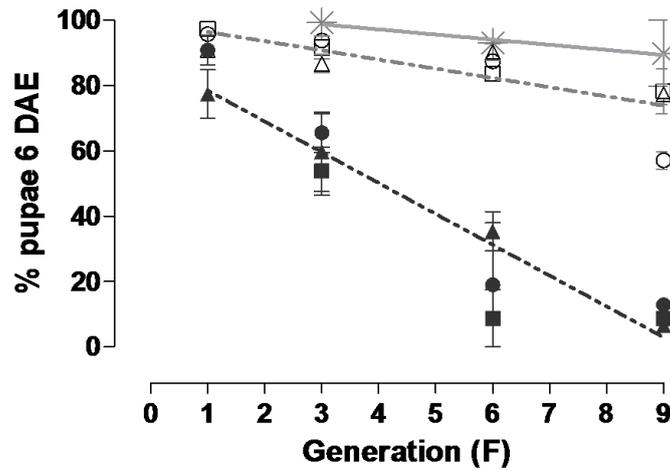
Comparison of number of eggs among pooled S and R lineages and with Rockefeller strain (Rock). Groups were compared two by two with the non parametric ANOVA Dunn's Multiple comparison Test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

### Figures

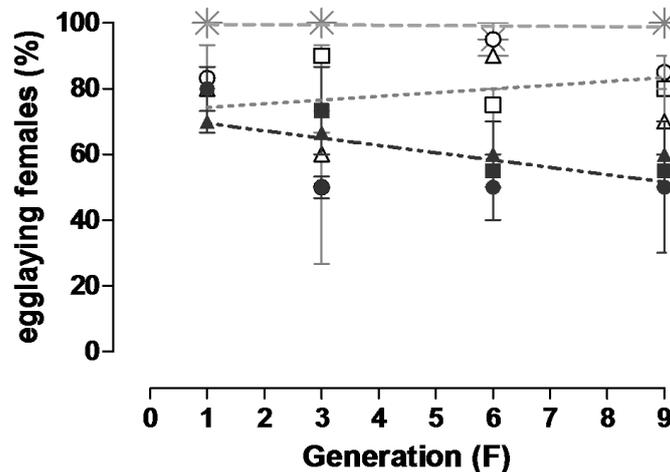


**Figure 1:** pyrethroid survival rate dynamics of an *Aedes aegypti* field population submitted to controlled selection in the laboratory. R lineages (R1, R2 and R3) represent adult females selected with deltamethrin at each generation (1.5  $\mu\text{g}/\text{bottle}$  at F3 and 3.0  $\mu\text{g}/\text{bottle}$  afterwards); S lineages (S1, S2 and S3) were reared in parallel, without insecticide selection. Rockefeller strain was exposed to the same bioassay at F<sub>8</sub> and F<sub>9</sub> generations. Vertical bars represent the standard deviation.

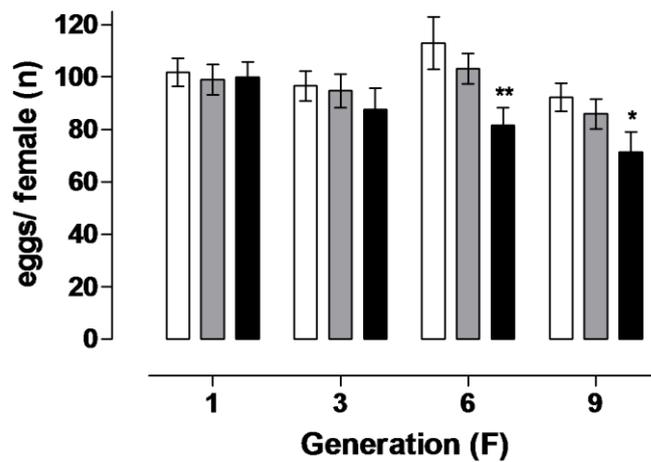
Figure 2



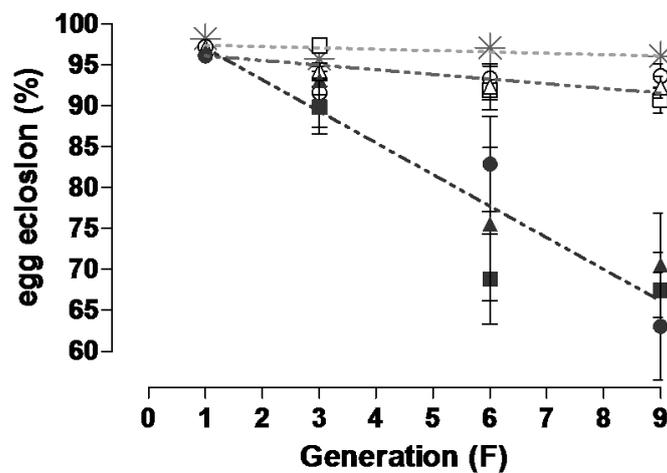
**Figure 2:** larval development dynamics of an *Aedes aegypti* field population submitted to pyrethroid selection in the laboratory. Dotted lines are regression of mean rate of pupae formation at the 6<sup>th</sup> day after larva hatching for pooled lineages of R and S, respectively selected or not with deltamethrin. Rockefeller was used as environment control (regression in blue line). Values for linear regression analysis are: Rock ( $\beta = -1.565$ ,  $r^2 = 0.285$ ,  $p > 0.05$ ), S ( $\beta = -2.817$ ,  $r^2 = 0.6095$ ,  $p < 0.0001$ ) and R ( $\beta = -9.434$ ,  $r^2 = 0.8217$ ,  $p < 0.0001$ ). Vertical bars for each symbol represent the standard error. Legends as in Figure 1.



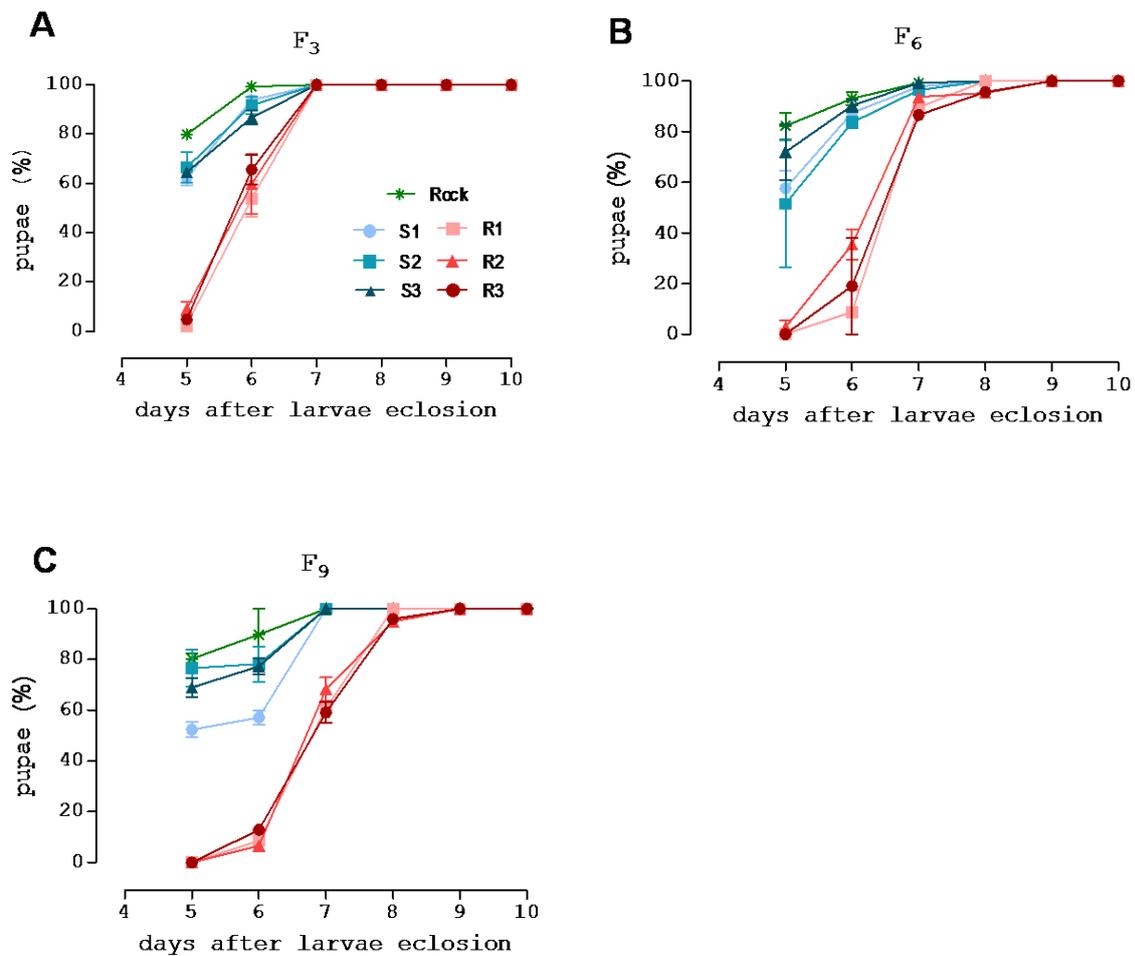
**Figure 3:** egg-laying females of an *Aedes aegypti* field population submitted to pyrethroid selection in the laboratory. Rate was calculated considering all blood-fed females. Mean number with standard error of egg-laying females from R and S lineages, selected or not with deltamethrin, respectively, are represented. Stars: Rockefeller (Rock). Lines indicate linear regression analysis for Rock ( $\beta = -0.0996$ ,  $r^2 = 0.0332$ ,  $p > 0.05$ ), and pooled S ( $\beta = 1.136$ ,  $r^2 = 0.0691$ ,  $p > 0.05$ ) and R ( $\beta = -2.228$ ,  $r^2 = 0.4114$ ,  $p < 0.05$ ) lineages. Legends as in Figure 1.



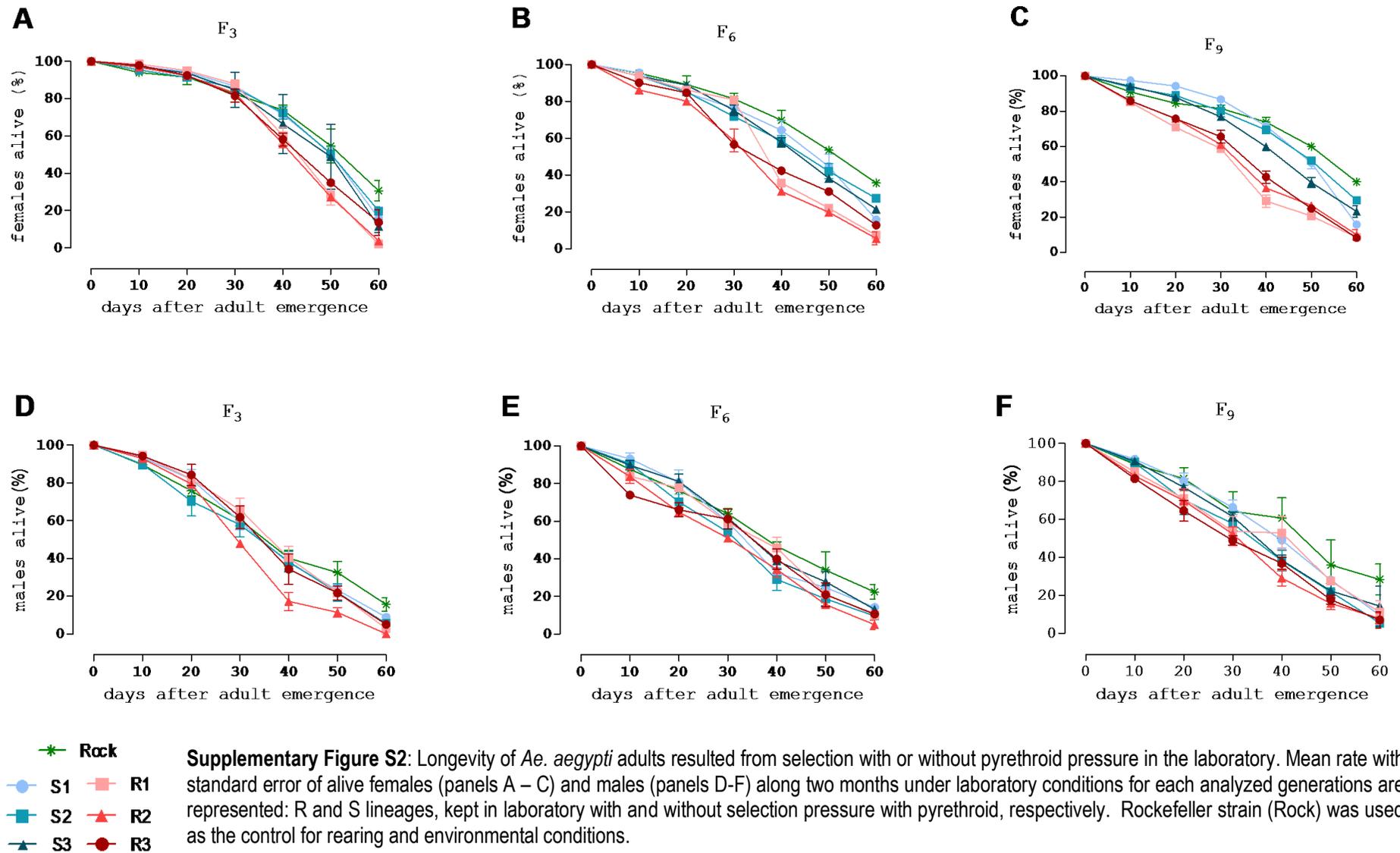
**Figure 4:** number of eggs per egg-laying female of an *Aedes aegypti* field population submitted to pyrethroid selection in the laboratory. White, grey and black bars indicate respectively Rock, S and R females. Vertical bars represent the standard error. Values significantly or highly significantly different from Rock are indicated by (\*) or (\*\*), respectively.

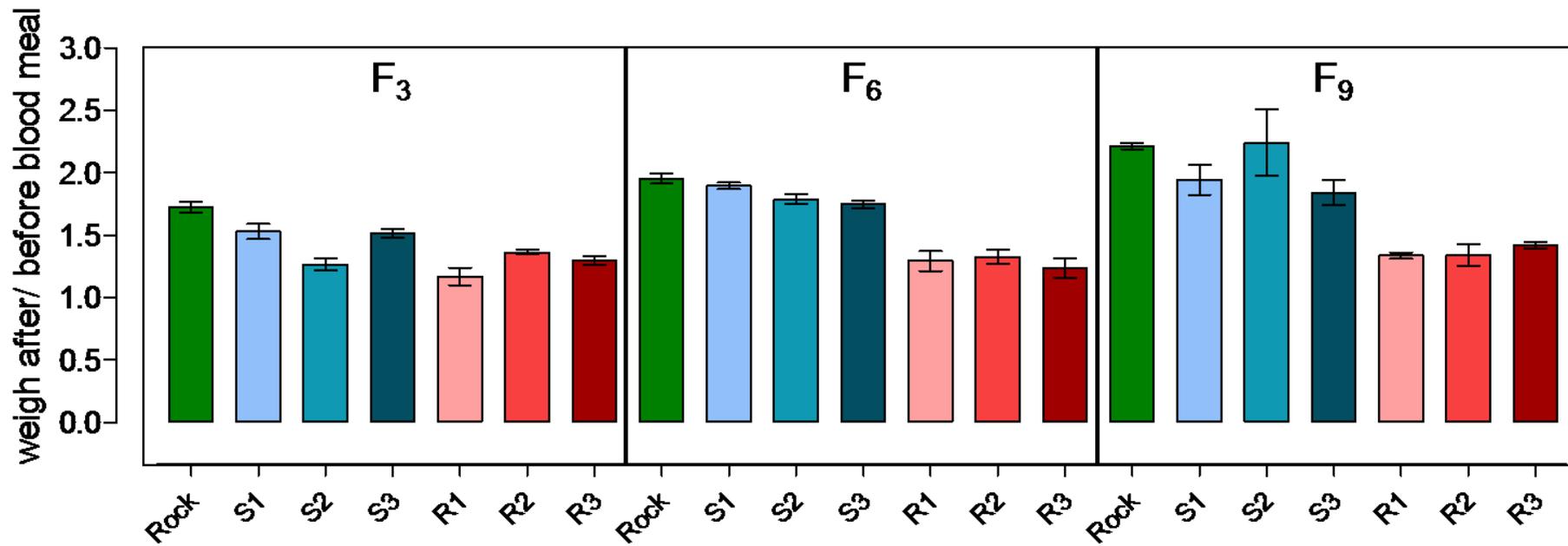


**Figure 5:** egg viability of *Ae. aegypti* resulted from selection with or without pyrethroid pressure in the laboratory. Mean egg hatching rate with standard error are represented for each S (S1, S2 and S3) and R (R1, R2, R3) lineages. Rockefeller (Rock) strain was used as the assay conditions and environment control. Dotted lines are the linear regression curves for pooled S and R lineages and Rock strain. Values for linear regression analysis are: Rock ( $\beta = -0.1644$ ,  $r^2 = 0.2748$ ,  $p > 0.05$ ), S ( $\beta = -0.5666$ ,  $r^2 = 0.5212$ ,  $p < 0.05$ ) and R ( $\beta = -3.854$ ,  $r^2 = 0.8998$ ,  $p < 0.0001$ ). Legends as in Figure 1.



**Supplementary Figure S1:** dynamics of *Ae. aegypti* pupae formation along the days. Mean rate with standard error of pupae formation in R and S lineages, kept in laboratory with and without selection pressure with pyrethroid, respectively. Rockefeller strain (Rock) was used as the control for rearing and environmental conditions. The panels (A-C) represent the dynamics of the analyzed generations.





**Supplementary Figure S3:** Blood meal ingestion of *Ae. aegypti* adults resulted from selection with or without pyrethroid pressure in the laboratory. Mean with standard error proportion of weigh after and before blood ingestion for R and S lineages, kept in laboratory with and without selection pressure with pyrethroid, respectively. Rockefeller strain (Rock) was used as the control for rearing and environmental conditions.

## References

- Abedi,Z.H. and Brown,A.W.A., 1961. DDT-resistance hazard in North American populations of *Aedes aegypti*. Mosquito News 21, 1-4.
- Agnew,P., Koella,J.C., 1999. Life history interactions with environmental conditions in a host-parasite relationship and the parasite's mode of transmission. Evolutionary Ecology 13, 67-89.
- Amim,A.M. and White,G.B., 1984. Relative fitness of organophosphate-resistant and susceptible strains of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Bulletin of Entomological Research 74, 591-598.
- Bourguet,D., Guillemaud,T., Chevillon,C., Raymond,M., 2004. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. Evolution 58, 128-135.
- Bouvier,J.C., Bues,R., Boivin,T., Boudinhon,L., Beslay,D., Sauphanor,B., 2001. Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved. Heredity 87, 456-462.
- Brewer,M.J. and Trumble,J.T., 1991. Inheritance and fitness consequences of resistance to fenvalerate in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology 84, 1638-1644.
- Carrière,Y., Deland,J.P., Roff,D.A., Vincent,C., 1994. Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. Proceedings of the Royal Society London Ser B-Biol Sci 258, 35-40.
- Charlesworth,B., 1980. Evolution in age-structured populations. Cambridge University Press, London.
- Corbel,V., Chandre,F., Brengues,C., Akogbeto,M., Lardeux,F., Hougard,J.M., Guillet,P., 2004. Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. Malaria Journal 3: 22.
- Da-Cunha,M.P., Lima,J.B.P., Brogdon,W.G., Moya,G.E., Valle,D., 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 100, 441-444.
- Davies,A.G., Game,A.Y., Chen,Z., Williams,T.J., Goodall,S., Yen,J.L., McKenzie,J.A., Batterham,P., 1996. Scalloped wings is the *Lucilia cuprina* Notch homologue and a candidate for the modifier of fitness and asymmetry of diazinon resistance. Genetics 143, 1321-1337.
- Farnesi,L.C., Martins,A.J., Valle,D., Rezende,G.L., 2009. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104, 124-126.
- Fisher,R.A., 1958. The genetical theory of natural selection, Dover Ed. New York.

- Foster,S.P., Woodcock,C.M., Williamson,M.S., Devonshire,A.L., Denholm,I., Thompson,R., 1999. Reduced alarm response by peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), with knock-down resistance to insecticides (*kdr*) may impose a fitness cost through increased vulnerability to natural enemies. *Bulletin of Entomological Research* 89, 133-138.
- Foster,S.P., Young,S., Williamson,M.S., Duce,I., Denholm,I., Devine,G.J., 2003. Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. *Heredity* 91, 98-106.
- Hartberg,W.K. and Craig-Jr,G.B., 1970. Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitos. II Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. *Evolution* 24, 692-703.
- Hemingway,J. and Ranson,H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review Entomology* 45, 371-391.
- Holloway,G.J., Povey,S.R., Sibly,R.M., 1990. The Effect of New Environment on Adapted Genetic Architecture. *Heredity* 64, 323-330.
- Kumar,S., Thomas,A., Sahgal,A., Verma,A., Samuel,T., Pillai,M.K.K., 2002. Effect of the synergist, piperonyl butoxide, on the development of deltamethrin resistance in yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera : Culicidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 50, 1-8.
- Lima,J.B.P., Da-Cunha ,M.P., Da Silva,R.C., Galardo,A.K.R., Soares,S.D., Braga,I.A., Ramos,R.P., Valle,D., 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 329-333.
- Lourenço-de-Oliveira,R., 2005. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. In:Coura, J. R., *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 75-97.
- Martins,A.J., Lins,R.M.M.A., Linss,J.G.B., Peixoto,A.A., Valle,D., 2009. Voltage gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* *in press*.
- Maynard-Smith,J. and Haigh,J., 1974. The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genet.Res.* 23, 23-35.
- McKenzie,J.A. and Batterham,P., 1998. Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response. *Philos.Trans.R Soc.Lond B Biol.Sci.* 353, 1729-1734.

Mebrahtu, Y.B., Norem, J., Taylor, M., 1997. Inheritance of larval resistance to permethrin in *Aedes aegypti* and association with sex ratio distortion and life history variation. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 56, 456-465.

Montella, I.R., Martins, A.J., Viana-Medeiros, P.F., Lima, J.B.P., Braga, I.A., Valle, D., 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 467-477.

*Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica* 112-113, 287-296.

Rodriguez, M.M., Bisset, J.A., De, A.Y., Ramos, F., 2005. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *Journal of American Mosquito Control Association* 21, 437-445.

Rowland, M., 1991a. Activity and mating competitiveness of gamma HCH/dieldrin resistant and susceptible male and virgin female *Anopheles gambiae* and *An.stephensi* mosquitoes, with assessment of an insecticide-rotation strategy. *Medical and Veterinary Entomology* 5, 207-222.

Rowland, M., 1991b. Behaviour and fitness of gamma HCH/dieldrin resistant and susceptible female *Anopheles gambiae* and *An.stephensi* mosquitoes in the absence of insecticide. *Medical and Veterinary Entomology* 5, 193-206.

Saavedra-Rodriguez, K., Urdaneta-Marquez, L., Rajatileka, S., Moulton, M., Flores, A.E., Fernandez-Salas, I., Bisset, J., Rodriguez, M., McCall, P.J., Donnelly, M.J., Ranson, H., Hemingway, J., Black, W.C., 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 16, 785-798.

Urmilla, J., Vijayan, V.A., Ganesh, K.N., Gopalan, N., Prakash, S., 2001. Deltamethrin tolerance & associated cross resistance in *Aedes aegypti* from Mysore. *Indian Journal of Medical Research* 113, 103-107.

Valencia, M.D., Miller, L.H., Mazur, P., 1996. Permeability of intact and dechorionated eggs of the *Anopheles* mosquito to water vapor and liquid water: a comparison with *Drosophila*. *Cryobiology* 33, 142-148.

Yan, G., Chadee, D.D., Severson, D.W., 1998. Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics* 148, 793-800.

## 4 - Discussão

### 4.1 - Mutação *kdr* em *Ae. aegypti* e seu diagnóstico molecular

Nos dias atuais, os piretróides formam a classe de inseticidas globalmente mais utilizada, devido à combinação de fatores como atividade inseticida, fotoestabilidade, baixa toxicidade aos mamíferos e persistência limitada no solo (Soderlund 2008). A deltametrina chegou a ser considerada o inseticida mais potente na época de sua invenção (Davies et al. 2007b). No Brasil, o uso de piretróides foi somente introduzido em âmbito nacional no controle de *Ae. aegypti* no início dos anos 2000, enquanto alternativa de controle dos adultos, já que grande parte das populações do vetor no país estavam resistentes aos organofosforados (Braga e Valle 2007b). Inicialmente foi utilizada a cipermetrina, sendo substituída logo em seguida pela deltametrina. No entanto, poucos anos depois da introdução dos piretróides em escala nacional, foram detectadas populações resistentes por todo o país (da-Cunha et al. 2005; Montella et al. 2007). Este rápido surgimento da resistência pode ser atribuído: 1) à resistência cruzada, pelo intenso uso de organofosforados nas três décadas anteriores, selecionando aumento da expressão de enzimas detoxificantes; 2) à rápida seleção, causada pelo uso do piretróide, para aumento na expressão ou na metabolização das enzimas detoxificantes; e 3) ao aumento da frequência de mutações no gene que codifica o canal de sódio, comprometendo a sensibilidade do sítio alvo dos piretróides.

Os resultados aqui discutidos apontam para a importância da mutação Val1016Ile do canal de sódio na resistência a piretróides, devido à maior frequência do alelo mutante entre os indivíduos resistentes. A população de Foz do Iguaçu, amostrada em locais estratégicos, nos focos que receberam tratamento intensificado, apresentou a maior frequência do alelo 1016 Ile (73%) entre as localidades avaliadas. Bioensaios com papel impregnado com piretróide indicaram razão de resistência de 42,4, a maior já detectada pelo laboratório (Giglio e Lima, comunicação pessoal). Além disso, entre outubro de 2006 e julho de 2007, Foz do Iguaçu foi a localidade com o maior *LIRa* (índice de amostragem que avalia a densidade populacional de *Ae. aegypti*), entre as 61 cidades brasileiras investigadas quanto à densidade de mosquitos, ficando ainda entre as dez primeiras cidades com maior incidência de casos de dengue (Coelho et al 2008).

Os trabalhos mais recentes que tratam da relação entre mutação no *AaNa<sub>v</sub>* e resistência a piretróide apontam alterações no sítio 1016 como responsáveis pelo fenótipo *kdr* em *Ae. aegypti*, Val→Ile na América Latina e Val→Gly na Tailândia (Saavedra-Rodriguez et al. 2001; Rajatileka et al. 2008). Outra substituição, fora da região IIS6, foi identificada em linhagem com razão de resistência a piretróide de 190 vezes. Esta linhagem, originária do Taiwan e mantida sob

pressão de seleção no laboratório, também apresenta a substituição Val1016Gly (Cheng et al. 2009).

Ensaio nossos, ainda em andamento, revelaram que uma linhagem homocigota para o alelo mutante 1016Ile é, no mínimo, 100 vezes mais resistente do que a linhagem susceptível Rockefeller. Além disso, híbridos 1016 Val/Ile resultantes do cruzamento entre Rock e aquela linhagem 1016 Ile/Ile não são resistentes, indicando o caráter recessivo da mutação. Este aspecto também foi percebido pelos cruzamentos realizados por Saavedra-Rodriguez et al. (2007) e estão de acordo com trabalhos mais antigos, nos quais o fenótipo *kdr* tem sido apontado como recessivo (veja revisão em Davies et al., 2007b).

O alelo mutante 1016Ile ainda não está presente em todo o país. Contudo, sua disseminação parece estar ocorrendo de forma bastante acelerada: 1) na coleta realizada em Nova Iguaçu em 2003 a mutação Val1016Ile não havia sido identificada (seção 3.1). Nova coleta, realizada no final de 2008 naquela localidade, detectou o alelo 1016 Ile em 62,5% dos indivíduos analisados; 2) em coletas realizadas nas regiões Norte e Nordeste entre 2003 e 2007 esta mutação não foi observada em nenhuma localidade (ver seção 3.2); hoje este cenário parece ser diferente. Das três populações do Nordeste avaliadas mais recentemente (coletas realizadas em 2008/2009), uma apresentou o alelo mutante 1016Ile, ainda que em baixa frequência (7%); 3) em uma localidade da região Centro-Oeste, a frequência deste alelo aumentou de 13,1% em 2006 para 20% em 2008 (Belinato e Brito, comunicação pessoal). Esta rápida disseminação da mutação pelo país certamente é fruto da forte pressão de seleção por piretróide, devido à intensificação do controle das formas adultas com o inseticida nas grandes epidemias mais recentes, entre 2005 e 2008 (ver Apêndice 2).

É esperado que alelos raros, ainda que com alto valor adaptativo, aumentem de frequência lentamente nas gerações subsequentes à sua introdução na população, principalmente se este alelo for recessivo para o fenótipo selecionado (Ridley 2006). Uma vez que o alelo 1016Ile, que confere resistência e tem caráter recessivo, parece estar aumentando de frequência rapidamente nas populações brasileiras, seu valor adaptativo deve ser extremamente alto.

Com base no perfil das frequências alélicas do sítio 1016 apresentado na seção 3.2, e nas observações acima, é tentador sugerir que a mutação Val1016Ile esteja se espalhando no Brasil a partir de poucas introduções originadas de países vizinhos. Contudo não podemos excluir a possibilidade de que esta mutação tenha surgido independentemente mais de uma vez. Foi sugerido que, em *An. gambiae*, a mutação *kdr* (Leu1014Phe) surgiu pelo menos quatro vezes de forma independente (Pinto et al. 2007). Uma vez que alterações no canal de sódio são pouco permissivas para suas funções fisiológicas, devem ser raros os sítios que, estando alterados, possibilitem o desenvolvimento do indivíduo (French-Constant et al. 1998). Como os mosquitos podem produzir várias gerações sucessivas em curto espaço de tempo; na presença de uma forte

pressão de seleção a favor do alelo, esse tenderia a aumentar rapidamente em frequência, mesmo recessivo, como foi o caso do exemplo de Nova Iguaçu. É possível que estejamos observando o início de uma rápida expansão do alelo 1016lle nas populações brasileiras de *Ae. aegypti*.

Um cenário passível de ser considerado é, de um lado, a redução do valor adaptativo, na ausência de aplicação de inseticidas, do homocigoto mutante (que seria o resistente) e, de outro lado, o grande tamanho das populações do vetor, suficiente para que o alelo mutante não seja perdido por deriva gênica. Deste modo, mesmo que a aplicação de inseticida seja interrompida e que a mutação tenha custo evolutivo relativamente alto quando em homocigose, uma vez que o alelo esteja presente na população de uma dada área, seria necessário um número muito grande de gerações até que fosse eliminado, já que estaria “escondido” da seleção natural nos heterocigotos. Estes, por sua vez, poderiam introduzir o alelo mutante em outras áreas por migração. No Brasil a situação é bastante preocupante: pode-se pensar na hipótese de suspensão do controle com os adulticidas piretróides, e na intensificação do controle larvar; porém muitas populações estão resistentes aos organofosforados, usados contra as larvas. De fato, os adulticidas são somente indicados em situações emergenciais, com epidemia constatada. Contudo, ações particulares de associações de moradores e condomínios residenciais utilizam continuamente este tipo de “controle”, que acaba trazendo mais danos que benefícios.

Estamos convencidos que o valor adaptativo da mutação Val1016lle é alto nas populações naturais de *Ae. aegypti*, frente à pressão com piretróide. A avaliação periódica da frequência do alelo mutante em populações brasileiras do vetor seria, sem dúvida, uma importante ferramenta para o monitoramento da resistência.

Na tentativa de definir uma ferramenta molecular para diagnóstico e determinação de frequência das mutações na região IIS6 do *AaNav*, ao longo do nosso trabalho testamos uma série de *primers* específicos para amplificação das variantes dos sítios com mutação. O melhor método avaliado foi a PCR alelo-específica (*AS-PCR*) apresentada por Saavedra-Rodriguez et al. (2007), procedimento no qual a adição de uma cauda CG de tamanho diferenciado para cada *primer* específico (veja seções 3.2 e 3.3) amplifica produtos facilmente diferenciáveis por eletroforese ou por curva de dissociação. Embora este método tenha sido bem sucedido em nosso laboratório, temos como perspectiva imediata adequá-lo para avaliações em larga escala, de forma a incluir estes testes na rotina do monitoramento da resistência. De início, pretendemos eliminar a etapa de eletroforese, substituindo-a pela análise de curva de dissociação via PCR em tempo real. A eletroforese, apesar de pouco onerosa, oferece risco de acidente com produtos químicos (como acrilamida e brometo de etídio), demanda tempo equivalente ao da amplificação e está mais sujeita a erros de leitura e interpretação.

Outras técnicas, não baseadas em amplificação alelo-específica, têm sido utilizadas com sucesso na detecção de mutações no canal de sódio. A técnica *HOLA* (*Heated Oligonucleotide Ligation Assay*, para detalhes veja Black et al. 2006) revelou alta especificidade na detecção dos alelos nos sítios 1011 (Ile, Met e Val) e 1016 (Val, Ile e Gly) em populações tailandesas de *Ae. aegypti* (Rajatileka et al. 2008) e do sítio 1014 de *Culex quinquefasciatus* do Sri Lanka (Wondji et al. 2008), com discriminação visual de hetero e homozigotos para cada sítio. Wondji et al. (2008) compararam a especificidade da *HOLA* com o pirosequenciamento, metodologia relativamente recente que surge como mais uma alternativa para detecção da mutação *kdr*. Naquele trabalho, o diagnóstico da Leu1014Phe em *Cx. quinquefasciatus* revelou maior especificidade com o pirosequenciamento.

Bass et al. (2006) compararam as metodologias descritas na literatura - 1) PCR alelo-específica, 2) *HOLA*, 3) *SSOP-ELISA* (*Sequence Specific Oligonucleotide Probe – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) e 4) *PCR-Dot Blot* - com duas outras, baseadas em fluorescência, apresentadas em seu trabalho: 1) *TaqMan probes* e 2) *HRM* (*high resolution melt*). Foram comparadas a eficiência e a especificidade destas metodologias na detecção da mutação *kdr* por meio de avaliação de quase uma centena de indivíduos da espécie *An. gambiae*. Foram considerados não somente o desempenho dos métodos, como a facilidade do protocolo experimental, o custo monetário e questões de biossegurança relativas aos reagentes. Concluiu-se que o método com melhor sensibilidade e especificidade foi a *Taq-Man* em tempo real (*TaqMan probes*). Contudo, os autores advertem que esta técnica foi a mais onerosa, sugerindo que, para redução do custo, o investigador poderia adaptar o ensaio para um termociclador convencional. Desta forma, ao invés da leitura em tempo real, o produto seria lido ao término da reação em um fluorímetro, o que resultaria em pouca redução de sensibilidade e especificidade. Os outros métodos foram bastante adequados, ainda que inferiores ao *TaqMan probes*. A *SSOP-Elisa* foi o método com melhor relação custo-benefício para diagnóstico rápido e em larga escala, recomendado para laboratórios com poucos recursos.

Com relação às outras técnicas acima discutidas, em princípio acreditamos que metodologias baseadas em hibridização, como *HOLA*, *SSOP-Elisa* e *PCR-Dot Blot*, apresentam muitas etapas adicionais (e, conseqüentemente, maior susceptibilidade a erros de manipulação) e não trariam vantagens significativas sobre a especificidade da PCR alelo-específica que temos utilizado.

Independente desta discussão, é importante destacar que, em relação à resistência de *Ae. aegypti* a piretróides, apesar de termos mostrado fortes evidências de envolvimento da mutação Val1016Ile, sua detecção não deveria ser o critério exclusivo de avaliação das populações. A correlação entre

estimativas da frequência de mutações *kdr* e indicação de resistência a DDT/ piretróide, deve ser precedida de ensaios biométricos, funcionais, sob risco de adoção de estratégia equivocada (Brooke, 2008). Deve-se considerar em primeiro lugar o resultado dos bioensaios que avaliam diretamente o efeito do inseticida sobre o inseto. Vale lembrar também que outras causas de resistência devem ser consideradas, como o perfil de alteração nas enzimas relacionadas à resistência metabólica (GST, MFOs e Esterases).

#### 4.2 – Duplicação gênica e seus possíveis efeitos na resistência e em outros parâmetros adaptativos

Foi demonstrado, por meio de análises genômicas, que genes parálogos evoluem mais rapidamente do que ortólogos, ou seja, há uma evolução acelerada em genes duplicados, explicada por um afrouxamento da seleção purificadora, por seleção positiva, ou pela combinação de ambos. Embora a duplicação gênica produza genes redundantes, há várias citações de benefícios imediatos da duplicação, como por exemplo, resistência de células tumorais a quimioterápicos e de microorganismos a antibióticos; e na diminuição de sensibilidade a condições adversas, como limitações nutricionais, exposição a toxinas, metais pesados e a temperaturas extremas (Kondrashov et al. 2002). Como discutido na seção 3.3, o efeito da duplicação de genes que codificam Esterases tem sido observado na resistência de *Cx. pipiens* a organofosforados (Tabashnik 1990; Raymond et al. 1998; Guillemaud et al. 1999). Nestes casos, a duplicação assume um efeito dose-dependente, ou seja, quanto maior número de cópias destas enzimas, maior a eficiência de detoxificação do inseticida. No caso do canal de sódio, sugerimos que a duplicação possa ter permitido o acúmulo de mutações sem inviabilizar o indivíduo, uma vez que a cópia original estaria presente.

Apresentamos aqui fortes evidências da ocorrência de duplicação no *AaNa<sub>v</sub>*, em caráter polimórfico, amplamente disseminado em populações brasileiras. Sugerimos ainda que a mutação no sítio 1011 ocorra somente no haplótipo duplicado, que é ainda formado por sequências do tipo A e B (1011Met + A + 1016Val \_ 1011Ile + B + 1016Val). No momento, estamos conduzindo ensaios de quantificação do número de cópias do exon 20 em cada indivíduo, por PCR em tempo real, além de cruzamentos adicionais que serão objeto de tipagem molecular para observação das frequências. Estes experimentos nos ajudarão a compreender melhor a dinâmica evolutiva do gene de canal de sódio do mosquito *Ae. aegypti* e suas relações com a resistência a inseticida.

Como discutido acima, a mutação no *AaNa<sub>v</sub>* mais importante para a resistência *kdr* está no sítio 1016. No entanto, a mutação Ile1011Met deve ter algum efeito na resistência em populações nas quais o alelo 1016Ile não está presente. *Aedes aegypti* foi erradicado do país no final da década de 1950, em grande parte em consequência do uso de DDT e, alguns anos mais tarde, houve nova infestação do vetor a partir de população(ões) resistente(s) àquele inseticida

(Franco 1976). Talvez a população invasora que se disseminou por todo país (que, de acordo com Bracco et al. 2007, é originária da América Central e da Ásia,) tivesse a mutação Ile1011Met. Pretendemos analisar a suscetibilidade ao DDT daquela linhagem gerada por pressão de seleção com piretróide (grupo R). A sugestão é que a mutação Ile1011Met possa ser remanescente da época em que teria sido vantajosa frente ao ambiente tratado com aquele inseticida.

Considerando nossa hipótese de que a mutação Ile1011Met está presente apenas no haplótipo duplicado (seção 3.3), no grupo R este haplótipo deve ter se fixado, ou se aproximado da fixação: todos os indivíduos foram genotipados como “heterozigotos” no sítio 1011 e no íntron entre os exons 20 e 21 (1011 Ile/Met + A/B). A ausência de indivíduos com fenótipo “homozigoto” 1011 Met/Met nos grupos selecionados é reforço adicional à nossa hipótese de duplicação. Além disso, os resultados com a tipagem da prole dos cruzamentos apresentados no artigo da seção 3.3 mostraram que o genótipo potencial 1011 Met/Met não seria letal). De fato, se este fosse o caso, nos grupos selecionados R e S (seção 3.4), esperaríamos, além de maior frequência de heterozigotos (1011 Ile/Met), também de homozigotos sem a mutação (1011 Ile/Ile). Contudo, apenas “heterozigotos” (1011 Ile/Met) foram observados no grupo R (Apêndice). É provável, contudo, que outros haplótipos, distintos daqueles que observamos em nosso trabalho, existam. Saavedra-Rodriguez et al (2007) observaram indivíduos “homozigotos” para a mutação no sítio 1011 (1011 Met/Met), resultando em fenótipos moleculares que não encontramos (como discutido no artigo apresentado na seção 3.3).

De acordo com Kimura & King (1979), a duplicação gênica cria condições mais permissivas para a ocorrência de mutações deletérias recessivas, em comparação com sequências presentes em cópia única. Desta forma, mutações que apresentam algum comprometimento na viabilidade poderiam ter se fixado, caso tenham sido essenciais para adaptação a alguma condição particular no passado. Isto poderia explicar a diminuição da sobrevivência do grupo R quando exposto ao inseticida, a partir da geração F<sub>5</sub> (seção 3.4): digamos que, nas primeiras gerações sob seleção, a mutação presente no haplótipo duplicado tenha sido importante para a sobrevivência dos indivíduos. Sua frequência teria aumentado no grupo R, até a fixação. Ou seja, até que todos os indivíduos fossem homozigotos para a duplicação. Em paralelo, aumentaria também a intensidade dos efeitos negativos desta característica em outros aspectos da *fitness* do grupo R (seção 3.4).

Antes da introdução de inseticidas contra uma população de insetos, alelos de resistência em geral estão em baixa frequência. Com o uso do inseticida, estes genes tornam-se adaptativamente favoráveis e rapidamente se espalham na população. Segundo Clarke (1997), a incorporação destes novos alelos no genoma resulta em uma desestruturação de complexos gênicos co-adaptados, podendo ter consequências pleiotrópicas em diversas características

fenotípicas. Observações realizadas em nosso laboratório com populações de campo deram reforço a nossa hipótese de que o haplótipo duplicado poderia estar interferindo negativamente em outros parâmetros adaptativos. Fortaleza e Maceió foram as populações com maior comprometimento em aspectos relacionados ao desenvolvimento e à reprodução (Ribeiro 2008). Estas localidades foram também as duas com maior frequência do fenótipo molecular 1011 Ile/Met entre os indivíduos resistentes a piretróide (respectivamente, 75 e 67%, veja tabela 1 da seção 3.3). É provável que parte destes indivíduos 1011 Ile/Met sejam homozigotos para a duplicação, principalmente em Fortaleza, que teve frequência mais alta. Sugerimos, portanto, que o haplótipo duplicado pode fornecer algum nível de resistência a piretróide, mas que, em homozigose, pode comprometer outros aspectos da *fitness* da população, devido a efeitos pleiotrópicos.

Linhagens mantidas em laboratório recebem alimentação em quantidade ideal, estão submetidas a alterações ambientais mínimas, e praticamente não precisam disponibilizar recursos energéticos contra predação, competição ou infecções por parasitas. Já populações de campo estão sujeitas a enfrentar todas estas adversidades. Portanto, fatores genéticos que diminuam o sucesso do indivíduo na presença destes fatores devem ser muito mais percebidos em linhagens de laboratório, criadas sob condições permissivas. Em termos quantitativos, em cativeiro, o acúmulo de tais alelos deletérios só teria efeito negativo depois de limiar muito superior àquele enfrentado por populações de campo. Talvez por isso não tenhamos observado o haplótipo duplicado associado à mutação 1011Met nas populações naturais em frequência tão alta como no laboratório.

Por exemplo, algumas linhagens de campo de *Cx. quinquefasciatus* resistentes a organofosforados perderam a resistência na ausência do inseticida. No entanto uma delas, quando mantida em laboratório também sem contato com inseticida durante um ano e meio, manteve os mesmos níveis de resistência (Raymond et al. 1993). Ou seja, ao contrário do campo, fatores deletérios pleiotrópicos à resistência não foram suficientes para interferir com a viabilidade daquela linhagem no laboratório, indicando que o custo evolutivo da resistência depende do ambiente. Em outro exemplo, estudos com o pulgão *Myzus persicae* demonstraram que indivíduos resistentes a piretróide, portadores da mutação *kdr* (neste caso a Leu1014Phe), apresentavam menor resposta ao feromônio de alarme. Da mesma forma, linhagens *kdr* de *M. domestica*, diferentemente de indivíduos susceptíveis, não mostraram preferência quando expostas a um gradiente de temperatura (Foster et al. 2003). Uma série de trabalhos do grupo francês do *Laboratoire Génétique et Environnement*, Montpellier, demonstra que o mesmo caráter que conferiu resistência a OP a linhagens de *Cx. pipiens*, a presença de duplicações em genes Esterases, reduziu outros aspectos da *fitness* (como discutido no artigo da seção 3.4).

Em uma revisão que aborda aspectos ecológicos e genéticos da resistência, Roush e McKenzie (1987) sugeriram que este caráter, em populações de campo, deve ser preferencialmente monogênico, e que se instala em decorrência da seleção de alelos que conferem vantagem frente à

pressão exercida pelo inseticida. Se estes alelos forem relativamente raros na população, a probabilidade de que estejam incluídos em uma amostragem levada ao laboratório (para experimentos de seleção) é baixa. Como consequência, a resistência selecionada em laboratório a partir de pequenas amostragens iniciais seria poligênica, com a participação de vários genes, cada qual contribuindo com menor ou maior parcela do fenótipo da resistência (Wilson, 2001). Em nosso caso, a mutação Ile1011Met do canal de sódio estava presente em alta frequência em nossa amostragem inicial da população de Natal. Ainda assim, outros fatores devem ter sido selecionados durante o processo de manutenção em cativeiro. Uma evidência indireta foi a alteração da razão de resistência ao organofosforado temephos, inseticida de outra classe de inseticida, com alvo distinto dos piretróides: houve aumento da resistência no grupo R e diminuição no grupos S (seção 3.4). Neste caso, a participação da resistência metabólica é provável, de forma que alterações nas enzimas detoxificantes podem levar à resistência cruzada entre compostos de classes diferentes (Hemingway 2004).

Há outra questão importante a ser considerada: uma vez que a resistência tenha se disseminado, a pressão contínua com inseticida pode favorecer mutações (modificadores) em outros loci ou no mesmo locus que amenizem os efeitos deletérios do novo alelo, até que os genótipos resistentes sejam tão bem adaptados (ou quase) quanto os susceptíveis em ambiente livre de inseticida. Por exemplo, foi observada a seleção de um gene “modificador” que reduziu os efeitos negativos da resistência na ausência de inseticida em uma população de campo de *Lucilia cuprina* resistente (Clarke 1997). Portanto, seria potencialmente ingênuo o argumento de que populações de mosquitos altamente resistentes tenderiam sempre a ter a capacidade vetorial comprometida e, conseqüentemente, ser menos importantes em um ciclo de transmissão de doenças.

Dada a crescente perda de vidas humanas pela dengue no país nas duas últimas décadas, muito devido ao fracasso no controle de populações do vetor, atualmente temos a certeza de que as estratégias de controle do *Ae. aegypti* devem ser fruto da interação entre os cientistas e as autoridades sanitárias, baseadas na investigação científica multidisciplinar, e em aspectos sanitários e educativos. Contudo, esta sugestão já havia sido plantada por Antonio Golçalves Peryassu e Oswaldo Cruz há 100 anos (Lourenço-de-Oliveira 2009). O uso de inseticida deve perdurar ainda por muito tempo como uma das ferramentas mais importantes no controle de mosquitos, sendo os piretróides aqueles com maior custo-benefício no combate às formas aladas, já que possuem efeito rápido e menor acúmulo residual no ambiente. No Brasil, por exemplo, gastou-se cerca de 39.963 quilos de ingrediente ativo de piretróides no ano de 2007 (Ima Braga, comunicação pessoal). Para evitar que percamos mais esta ferramenta devemos monitorar e

compreender a dinâmica evolutiva dos mecanismos de resistência nas populações de *Ae. aegypti* de localidades estratégicas.

Ao longo de nosso trabalho, evidenciamos modificações no gene que codifica o sítio alvo de piretróides que provavelmente estão correlacionadas com a resistência àqueles compostos. Além disso, tentamos compreender o grau de comprometimento da capacidade vetorial de populações resistentes. Observamos um complexo polimorfismo no gene de canal de sódio entre as populações de *Ae. aegypti* investigadas, de forma que ficou claro o envolvimento de algumas variedades com a resistência. Nesta busca, obtivemos forte evidência da ocorrência de um polimorfismo envolvendo uma duplicação gênica, que pode também estar relacionada com a resistência. Estes achados criaram novas perspectivas de investigação sobre o entendimento da rota evolutiva da resistência em populações naturais, o que certamente aumentará nossas chances de intervir com sucesso no controle de mosquitos vetores por meio do uso de inseticidas.

## 5 - Conclusões

- Confirmamos polimorfismo no gene *AaNav*, que codifica o canal de sódio regulado por voltagem em populações brasileiras do vetor *Ae. aegypti*. As sequências foram separadas em dois tipos, A e B, de acordo com a sequência do íntron entre os exons 20 e 21 e com substituições sinônimas no exon 20.
- Confirmamos também que nenhuma sequência do tipo B apresentou mutação em ambos os sítios 1011 e 1016. Além disso, a cepa Rockefeller, controle de susceptibilidade e vigor, apresenta apenas sequências do tipo B.
- Detectamos a mutação Val1016Ile, associada apenas a sequências do tipo A, e mostramos indícios de sua forte associação à resistência à piretróide. Apesar de não ter sido detectada em todas as localidades analisadas, há evidências de que esteja se espalhando rapidamente pelo país.
- Confirmamos a presença da mutação Ile1011Met no Brasil, ausente de apenas uma entre as 17 localidades avaliadas. Em todos os casos, esteve presente em sequências do tipo A de indivíduos que também possuem sequência do tipo B. Esta mutação parece conferir alguma resistência a piretróide, porém com alto custo evolutivo em outros parâmetros adaptativos.
- Sugerimos a ocorrência de duplicação na região estudada do *AaNav*, de forma que o haplótipo duplicado (1011Met + A + 1016Val\_1011Ile + B + 1016Val) seja um caráter polimórfico. Esta hipótese foi apresentada a partir das observações: 1) indivíduos com três alelos, 2) excesso de “heterozigotos” 1011 Ile/Met + A/B, 3) ausência de indivíduos classificados com “homozigotos” 1011 Met/Met em populações brasileiras, 4) ausência do fenótipo molecular 1011 Ile/Met + 1016 Ile/Ile e 5) resultado de frequência fenotípica da prole de cruzamentos.

## 6 – Referências (introdução e discussão)

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of THE CELL. 4 ed. New York: Garland Science, 2002.
- Ayres CF, Romao TP, Melo-Santos MA, Furtado AF 2002. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 97: 871-875.
- Ayres CF, Melo-Santos MA, Sole-Cava AM, Furtado AF 2003. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. *J.Med Entomol.* 40: 430-435.
- Bass BL 2002. RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu.Rev.Biochem.* 71: 817-846.
- Bass C, Schroeder I, Turberg A, Field M, Williamson MS 2004. Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of the cat flea, *Ctenocephalides felis*. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 34: 1305-1313.
- Beaty BJ, Marquardt WC. The biology of disease Vectors. Colorado: University Press of Colorado, 1996.
- Belinato TA, Martins AJ, Lima JB, de Lima-Camara TN, Peixoto AA, Valle D 2009. Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem.Inst Oswaldo Cruz* 104: 43-47.
- Black WC, Gorrochotegui-Escalante N, Duteau NM 2006. Heated oligonucleotide ligation assay (HOLA): an affordable single nucleotide polymorphism assay. *J.Med.Entomol.* 43: 238-247.
- Bourguet D, Guillemaud T, Chevillon C, Raymond M 2004. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution* 58: 128-135.
- Bracco JE, Capurro ML, Lourenco-de-Oliveira R, Sallum MA 2007. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 573-580.
- Braga IA, Lima JB, Soares SS, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem.Inst Oswaldo Cruz* 99: 199-203.
- Braga IA, Valle D 2007a. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol.Serv.Saúde* 16: 295-302.
- Braga IA, Valle D 2007b. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol.Serv.Saúde* 16: 179-293.
- Bregues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med.Vet.Entomol.* 17: 87-94.
- Brooke BD 2008. kdr: can a single mutation produce an entire insecticide resistance phenotype? *Trans.R Soc Trop.Med.Hyg.* 102: 524-525.
- Busvine JR 1951. Mechanism of Resistance to Insecticide in Houseflies. *Nature* 168: 193-195.

- Canyon DV, Hii JL, Muller R 1999a. Adaptation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) oviposition behavior in response to humidity and diet. *J.Insect Physiol* 45: 959-964.
- Canyon DV, Hii JL, Muller R 1999b. Effect of diet on biting, oviposition, and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J.Med.Entomol.* 36: 301-308.
- Casida JE & Quistad GB 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu.Rev Entomol* 43: 1-16.
- Castro MG, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Lourenco-de-Oliveira R 2004. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 809-814.
- Catterall WA 1993. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Trends Neurosci.* 16: 500-506.
- Catterall WA 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26: 13-25.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG 2003. International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol.Rev.* 55: 575-578.
- Cestele S, Catterall WA 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82: 883-892.
- Chadee DD & Corbet PS 1993. The gonotrophic status and diel pattern of entry to outdoor oviposition sites of female *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 87: 263-268.
- Chandy KG, Gutman GA 1993. Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol.Sci.* 14: 434.
- Chang C, Shen WK, Wang TT, Lin YH, Hsu EL, Dai SM 2009. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology In Press, Accepted Manuscript*.
- Clarke GM 1997. The genetic and molecular basis of developmental stability: The *Lucilia* story. *Trends in Ecology & Evolution* 12: 89-91.
- Clements AN. The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction. London: 1992.
- Codeco CT, Luz PM, Struchiner CJ 2004. Risk assessment of yellow fever urbanization in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans.R.Soc.Trop Med Hyg.* 98: 702-710.
- Coelho GE, Burattini MN, Teixeira MG, Coutinho FA, Massad E 2008. Dynamics of the 2006/2007 dengue outbreak in Brazil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 103: 535-539.
- Consoli R, Lourenço-de-Oliveira R. Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: 1994.
- Chung H, Bogwitz MR, McCart C, Andrianopoulos A, French-Constant RH, Batterham P, Daborn PJ 2007. Cis-regulatory elements in the Accord retrotransposon result in tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* insecticide resistance gene *Cyp6g1*. *Genetics* 175: 1071-1077.

- Da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 441-444.
- Davies TG, Field LM, Usherwood PN, Williamson MS 2007a. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Mol.Biol.* 16: 361-375.
- Davies TG, Field LM, Usherwood PN, Williamson MS 2007b. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB.Life* 59: 151-162.
- Davies TE, O'Reilly AO, Field LM, Wallace B, Williamson MS 2008. Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modelling. *Pest.Manag.Sci.* 64: 1126-1130.
- Degallier N, Teixeira JMS, Soares SS, Pereira RD, Pinto SCF, Chaib AJM, Vasconcelos PFC, Oliveira E 2003. *Aedes albopictus* may not be vector of dengue virus in human epidemics in Brazil. *Rev Saúde Pública* 37: 386-387.
- Du Y, Liu Z, Nomura Y, Khambay B, Dong K 2006. An alanine in segment 3 of domain III (IIIS3) of the cockroach sodium channel contributes to the low pyrethroid sensitivity of an alternative splice variant. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 36: 161-168.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25: 533-535.
- Es-Salah Z, Lapied B, Le GG, Hamon A 2008. RNA editing regulates insect gamma-aminobutyric acid receptor function and insecticide sensitivity. *Neuroreport* 19: 939-943.
- Failloux AB, Vazeille M, Rodhain F 2002. Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *J.Mol.Evol.* 55: 653-663.
- Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL 2009. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Mem.Inst Oswaldo Cruz* 104: 124-126.
- Ferrari JA. Insecticide resistance. The Biology of Disease Vectors. Colorado: University of Colorado, 1996.
- Ferreira CP, de-Oliveira ACAX, Koifman S, Nunes FP, Kotake ET, Ferreira RN, Paumgarten FJR (2004) Exposição Ocupacional ao DDT em Atividades de Controle da Malária na Região Amazônica [apresentação *on-line*]. ENSPSA/FIOCRUZ. Disponível na Internet via WWW: <URL: <http://chagas.redefiocruz.fiocruz.br/~ensp/biblioteca/dados/Belem2004p.ppt>> . [Arquivo capturado em 20 de dezembro de 2004].
- Forattini OP 1986. Identification of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) in Brazil. *Rev.Saude Publica* 20: 244-245.
- Forattini OP. Culicidologia médica. São Paulo: 2002.
- Forcioli D, Frey B, Frey JE 2002. High nucleotide diversity in the para-like voltage-sensitive sodium channel gene sequence in the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *J.Econ.Entomol.* 95: 838-848.

- Fraga EC, Santos JMM, Maia JF 2003. Enzymatic variability in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Manaus-AM, Brazil. *Genetic and Molecular Biology* 26: 181-187.
- Franco O. História da Febre Amarela no Brasil. Rio de Janeiro: 1976.
- French-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A, Anthony N 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 353: 1685-1693.
- French-Constant RH, Daborn PJ, Le GG 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet.* 20: 163-170.
- Foster SP, Young S, Williamson MS, Duce I, Denholm I, Devine GJ 2003. Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. *Heredity* 91: 98-106.
- Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28: 365-368.
- Goldin AL 2001. Resurgence of sodium channel research. *Annu.Rev.Physiol* 63: 871-894.
- Goldin AL 2002. Evolution of voltage-gated Na(+) channels. *J.Exp.Biol.* 205: 575-584.
- Goldin AL 2003. Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr.Opin.Neurobiol.* 13: 284-290.
- Guerrero FD, Jamroz RC, Kammlah D, Kunz SE 1997. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of kdr and super-kdr point mutations. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 27: 745-755.
- Guillemaud T, Makate N, Raymond M, Hirst B, Callaghan A 1997. Esterase gene amplification in *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology* 6: 319-327.
- Guillemaud T, Raymond M, Tsagarakou A, Bernard C, Rochard P, Pasteur N 1999. Quantitative variation and selection of esterase gene amplification in *Culex pipiens*. *Heredity* 83 ( Pt 1): 87-99.
- Haldane JBS 1924. A mathematical theory of natural and artificial selection. Part I. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society* 23: 19-41.
- Harrison CM 1951. Inheritance of Resistance to DDT in the Housefly, *Musca-Domestica* L. *Nature* 167: 855-856.
- Hemingway J, Ranson H 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu.Rev.Entomol.* 45: 371-391.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 34: 653-665.
- Holick J, Kyle A, Ferraro W, Delaney RR, Iwaseczko M 2002. Discovery of *Aedes albopictus* infected with west Nile virus in southeastern Pennsylvania. *J Am Mosq.Control Assoc.* 18: 131.
- Honorio NA, Silva WC, Leite PJ, Goncalves JM, Lounibos LP, Lourenco-de-Oliveira R 2003. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 98: 191-198.

- Hougard JM, Duchon S, Darriet F, Zaim M, Rogier C, Guillet P 2003. Comparative performances, under laboratory conditions, of seven pyrethroid insecticides used for impregnation of mosquito nets. *Bull. World Health Organ* 81: 324-333.
- huang YM 1972. Contributions to the mosquito fauna of Southeast Asia. XIV - The subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in Southeast Asia I. The scutellaris group of species. *Contrib Am Entomol Inst Ann Arbor* 9: 1-109.
- Ingles PJ, Adams PM, Knipple DC, Soderlund DM 1996. Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant house fly strains. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 319-326.
- Jacobs M 2000. Dengue: emergence as a global public health problem and prospects for control. *Trans. R Soc Trop. Med. Hyg.* 94: 7-8.
- Jamroz RC, Guerrero FD, Kammlah DM, Kunz SE 1998. Role of the kdr and super-kdr sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 1031-1037.
- Jan LY, Jan YN 1992. Tracing the roots of ion channels. *Cell* 69: 715-718.
- Kambhampati S, Rai KS 1991. Mitochondrial DNA variation within and among populations of the mosquito *Aedes albopictus*. *Genome* 34: 288-292.
- Karunaratne SH, Hemingway J 2001. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bull. World Health Organ* 79: 1060-1064.
- Kimura M, King JL 1979. Fixation of A Deleterious Allele at One of 2 Duplicate Loci by Mutation Pressure and Random Drift. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 2858-2861.
- Kondrashov FA, Rogozin IB, Wolf YI, Koonin EV 2002. Selection in the evolution of gene duplications. *Genome Biol.* 3: RESEARCH0008.
- Kulkarni NH, Yamamoto AH, Robinson KO, Mackay TFC, Anholt RRRH 2002. The DSC1 channel, encoded by the smi60E locus, contributes to odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 161: 1507-1516.
- Kumar S, Thomas A, Sahgal A, Verma A, Samuel T, Pillai MKK 2002. Effect of the synergist, piperonyl butoxide, on the development of deltamethrin resistance in yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera : Culicidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 50: 1-8.
- Lee SH, Yoon KS, Williamson MS, Goodson SJ, Takano-Lee M, Edman JD, Devonshire AL, Clark JM 2000. Molecular analysis of kdr-like resistance in permethrin-resistant strains of head lice, *Pediculus capitis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 66: 130-143.
- Lee SH, Ingles PJ, Knipple DC, Soderlund DM 2002. Developmental regulation of alternative exon usage in the house fly *Vssc1* sodium channel gene. *Invert. Neurosci.* 4: 125-133.

- Lima JB, Da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AK, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 68: 329-333.
- Liu Z, Chung I, Dong K 2001. Alternative splicing of the BSC1 gene generates tissue-specific isoforms in the German cockroach. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 31: 703-713.
- Liu Z, Song W, Dong K 2004. Persistent tetrodotoxin-sensitive sodium current resulting from U-to-C RNA editing of an insect sodium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101: 11862-11867.
- Loughney K, Kreber R, Ganetzky B 1989. Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell* 58: 1143-1154.
- Loughney K, Ganetzky B 1989. The Para Locus Encodes A Protein Homologous to the Vertebrate Sodium-Channel. *Journal of Neurogenetics* 5: 262.
- Lockwood JA, Sparks TC, Story RN 1984. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. *Bull.Entomol.Soc.Am.* 30: 41-51.
- Lourenco-de-Oliveira R, Vazeille M, Bispo de Filippis AM, Failloux AB 2002. Oral susceptibility to yellow fever virus of *Aedes aegypti* from Brazil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 97: 437-439.
- Lourenco de OR, Vazeille M, de Filippis AM, Failloux AB 2003. Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. *Am.J.Trop Med Hyg.* 69: 105-114.
- Lourenco-de-Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AM, Failloux AB 2004a. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans.R.Soc.Trop Med Hyg.* 98: 43-54.
- Lourenco-de-Oliveira R, Castro MG, Braks MA, Lounibos LP 2004b. The invasion of urban forest by dengue vectors in Rio de Janeiro. *J.Vector.Ecol.* 29: 94-100.
- Lourenço-de-Oliveira R. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 2005. 2ª Ed. p. 75-97.
- Maas S, Rich A, Nishikura K 2003. A-to-I RNA editing: recent news and residual mysteries. *J.Biol.Chem.* 278: 1391-1394.
- Maciel-de-Freitas R, Codeco CT, Lourenco-de-Oliveira R 2007. Daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro, Brazil. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 76: 659-665.
- Macoris ML, Andrighetti MT, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of Sao Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem.Inst Oswaldo Cruz* 98: 703-708.
- Martins AJ, Belinato TA, Lima JB, Valle D 2008. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Pest.Manag.Sci.* 64: 676-680.
- Massad E, Burattini MN, Coutinho FA, Lopez LF 2003. Dengue and the risk of urban yellow fever reintroduction in Sao Paulo State, Brazil. *Rev Saude Publica* 37: 477-484.

- Mattingly PF 1957. Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem. I. Taxonom: and bionomics. *Ann.Trop Med Parasitol* 51: 392-408.
- McDonald PT, Schmidt CD 1987. Genetics of permethrin resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). *J.Econ.Entomol.* 80: 433-437.
- Metselaar D, Grainger CR, Oei KG, Reynolds DG, Pudney M, Leake CJ, Tukei PM, D'Offay RM, Simpson DI 1980. An outbreak of type 2 dengue fever in the Seychelles, probably transmitted by *Aedes albopictus* (Skuse). *Bull.World Health Organ* 58: 937-943.
- Milani R 1954. Comportamento Mendeliano della Resistenza alla Azione Abbattente del DDT e Correlazione tra Abbattimento e Mortalita' in *Musca domestica* L. *Revista di Parassitologia* 15: 513-542.
- Monath TP 1999. Facing up to re-emergence of urban yellow fever. *Lancet* 353: 1541.
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA, Valle D 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg.* 77: 467-477.
- MS (2004). Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde. [texto online]. Disponível na internet via www <URL: <http://saude.gov.br/svs/info/info00.htm>>. [Arquivo capturado em 10 de março de 2004].
- Muir LE, Kay BH 1998. *Aedes aegypti* survival and dispersal estimated by mark-release-recapture in northern Australia. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 58: 277-282.
- Narahashi T 1992. Nerve Membrane Na<sup>+</sup> Channels As Targets of Insecticides. *Trends in Pharmacological Sciences* 13: 236-241.
- Nobre A, Antezana D, Tauil PL 2009. Febre Amarela e Dengue no Brasil: epidemiologia e controle. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* 27: 59-66.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, dos Santos FB, de Araujo ES, de Filippis AM, de Souza RV, Zagne SM, Nicolai C, Baran M, Teixeira FG 1999. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 94: 297-304.
- Nogueira RM, Miagostovich MP, de Filippis AM, Pereira MA, Schatzmayr HG 2001. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 96: 925-926.
- OMS (1981). Organização Mundial de Saúde. *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. WHO/VBC/81.807. 1981. World Health Organization.
- OMS (1995). Organização Mundial da Saúde. Vector Control for malaria and other Mosquito-Born Diseases. Report of a WHO Study Group. Geneva, World Health Organization, 1995. *WHO TRS n° 857*.
- O'Reilly AO, Khambay BP, Williamson MS, Field LM, Wallace BA, Davies TG 2006. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem.J.* 396: 255-263.
- Olson RO, Liu Z, Nomura Y, Song W, Dong K 2008. Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channel variants from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 38: 604-610.
- Paeporn P, Komalamisra N, Deesin V, Rongsriyam Y, Eshita Y, Thongrungrat S 2003. Temephos resistance in two forms of *Aedes aegypti* and its significance for the resistance mechanism. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34: 786-792.

- Palchick S. Chemical control of vectors. *The Biology of the Disease Vectors*. Colorado: University Press of Colorado, 1996: 502-11.
- Palladino MJ, Keegan LP, O'Connell MA, Reenan RA 2000. A-to-I pre-mRNA editing in *Drosophila* is primarily involved in adult nervous system function and integrity. *Cell* 102: 437-449.
- Park Y, Taylor MF, Feyereisen R 1999. Voltage-gated sodium channel genes *hscp* and *hDSC1* of *Heliothis virescens* F. genomic organization. *Insect Mol.Biol.* 8: 161-170.
- Paupy C, Chantha N, Vazeille M, Reynes JM, Rodhain F, Failloux AB 2003. Variation over space and time of *Aedes aegypti* in Phnom Penh (Cambodia): genetic structure and oral susceptibility to a dengue virus. *Genet.Res.* 82: 171-182.
- Pauron D, Barhanin J, Amichot M, Pralavorio M, Berge JB, Lazdunski M 1989. Pyrethroid Receptor in the Insect Na<sup>+</sup> Channel - Alteration of Its Properties in Pyrethroid-Resistant Flies. *Biochemistry* 28: 1673-1677.
- Pinto J, Lynd A, Elissa N, Donnelly MJ, Costa C, Gentile G, Caccone A, Do R, V 2006. Co-occurrence of East and West African *kdr* mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon. *Med Vet.Entomol* 20: 27-32.
- Rajatileka S, Black WC, Saavedra-Rodriguez K, Trongtokit Y, Apiwathnasorn C, McCall PJ, Ranson H 2008. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. *Acta Trop.* 108: 54-57.
- Randall D, Burggren W, French K. *Fisiologia animal. Mecanismos e Adaptações*. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; New York: W.H. Freeman and Company, 2000.
- Ranson H, Claudianos C, Ortelli F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298: 179-181.
- Raymond M, Heckel DG, Scott JG 1989. Interactions Between Pesticide Genes - Model and Experiment. *Genetics* 123: 543-551.
- Raymond M, Poulin E, Boiroux V, Dupont E, Pasteur N 1993. Stability of Insecticide Resistance Due to Amplification of Esterase Genes in *Culex pipiens*. *Heredity* 70: 301-307.
- Raymond M, Chevillon C, Guillemaud T, Lenormand T, Pasteur N 1998. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philos.Trans.R Soc Lond B Biol Sci* 353: 1707-1711.
- Raymond M, Berticat C, Weill M, Pasteur N, Chevillon C 2001. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica* 112-113: 287-296.
- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA, Valle D 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC.Dev.Biol.* 8: 82.
- Ribeiro, CDM. Avaliação de aspectos da capacidade vetorial de população de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) mantida no laboratório na ausência ou na presença de piretróide. Dissertação

- de Mestrado, defendida pelo programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária/ IOC/ FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2008.
- Ridley M. Evolução. 2006. 3.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2006.
- Roberts DR, Alecrim WD 1991. [Response of *Anopheles darlingi* to spraying with DDT in Amazonas, Brazil]. *Bol.Oficina Sanit.Panam.* 110: 480-488.
- Rodhain FI, Rosen L 1997. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships dengue and dengue hemorrhagic fever. *CAB International* 10-14.
- Rodriguez MM, Bisset JA, Diaz C, Soca LA 2003. [Cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* from Cuba induced by the selection with organophosphate malathion]. *Rev Cubana Med Trop* 55: 105-111.
- Roush RT, McKenzie JA 1987. Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. *Annual Review of Entomology* 32: 361-380.
- Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black WC 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol.Biol.* 16: 785-798.
- Sabin AB 1952. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1: 30-50.
- Sant'Ana AL 1996. Primeiro encontro de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Estado do Paraná, Brasil. *Rev Saúde Pública* 30: 392-393.
- Santos VM, Macoris MLG, Andrighetti MTM, Avila PE, Kirchgatter K 2003. Analysis of genetic relatedness between populations of *Aedes aegypti* from different geographic regions of São Paulo state. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 45: 99-101.
- Salkoff L, Butler A, Wei A, Scavarda N, Giffen K, Ifune C, Goodman R, Mandel G 1987. Genomic Organization and Deduced Amino-Acid-Sequence of A Putative Sodium-Channel Gene in *Drosophila*. *Science* 237: 744-749.
- Schatzmayr HG 2000. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 95 Suppl 1: 179-181.
- Schuler TH, Martinez-Torres D, Thompson AJ, Denholm I, Devonshire AL, Duce IR, Williamson MS 1998. Toxicological, electrophysiological, and molecular characterisation of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 59: 169-182.
- Scott TW, Chow E, Strickman D, Kittayapong P, Wirtz RA, Lorenz LH, Edman JD 1993. Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. *J.Med.Entomol.* 30: 922-927.
- Scott JG 1995. Effects of temperature on insecticide toxicity. *Rev Pestic Toxicol* 3: 111-135.
- SEDESC-RJ 2009. Secretaria de Estado de Saúde e Defesa Civil do Rio de Janeiro. Quadro Demonstrativo de Casos de Notificados de Dengue no Estado do Rio de Janeiro. Disponível na Internet via www < <http://www.saude.rj.gov.br/Docs/Acoes/dengue/Dengue/Casos%20Notificados%20de%20Dengue%201986-2009%20RJ.pdf>>. [Arquivo capturado em janeiro de 2009].

- Severson DW, Anthony NM, Andreev O, French-Constant RH 1997. Molecular mapping of insecticide resistance genes in the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *J.Hered.* 88: 520-524.
- Shao YM, Dong K, Tang ZH, Zhang CX 2008. Molecular characterization of a sodium channel gene from the Silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.Mol.Biol.*
- Serufó JC, de Oca HM, Tavares VA, Souza AM, Rosa RV, Jamal MC, Lemos JR, Oliveira MA, Nogueira RM, Schatzmayr HG 1993. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 503-504.
- Smith TJ, Lee SH, Ingles PJ, Knipple DC, Soderlund DM 1997. The L1014F point mutation in the house fly *Vssc1* sodium channel confers knockdown resistance to pyrethroids. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 27: 807-812.
- Soderlund DM, Bloomquist JR 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annu.Rev.Entomol.* 34: 77-96.
- Soderlund DM, Knipple DC 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 33: 563-577.
- Soderlund DM 2008. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest.Manag.Sci.* 64: 610-616.
- Song W, Liu Z, Tan J, Nomura Y, Dong K 2004. RNA editing generates tissue-specific sodium channels with distinct gating properties. *J.Biol.Chem.* 279: 32554-32561.
- Sonoda S, Igaki C, Tsumuki H 2008. Alternatively spliced sodium channel transcripts expressed in field strains of the diamondback moth. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 38: 883-890.
- Sonoda S, Tsukahara Y, Ashfaq M, Tsumuki H 2008. Genomic organization of the para-sodium channel alpha-subunit genes from the pyrethroid-resistant and -susceptible strains of the diamondback moth. *Arch.Insect Biochem.Physiol* 69: 1-12.
- Spafford JD, Spencer AN, Gallin WJ 1999. Genomic organization of a voltage-gated Na<sup>+</sup> channel in a hydrozoan jellyfish: insights into the evolution of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel genes. *Receptors.Channels* 6: 493-506.
- Sparks TC, Lockwood JA, Byford RL, Graves JB, Leonard BR 1989. The Role of Behavior in Insecticide Resistance. *Pesticide Science* 26: 383-399.
- Sprenger D, Wuithiranyagool T 1986. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *J.Am.Mosq.Control Assoc.* 2: 217-219.
- Strong M, Chandy KG, Gutman GA 1993. Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability. *Mol.Biol.Evol.* 10: 221-242.
- SVS (2004). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância epidemiológica: Dengue. [texto on-line]. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível na Internet via www <URL <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/dengue/dengue0.htm>>. [Arquivo capturado de 12 de dezembro de 2004].
- SVS (2006). Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde, 2006. Reunião Técnica Para Discutir Status de Resistência de *Aedes aegypti*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde.

- Tabashnik BE 1990. Implications of gene amplification for evolution and management of insecticide resistance. *J.Econ.Entomol.* 83: 1170-1176.
- Taylor MF, Heckel DG, Brown TM, Kreitman ME, Black B 1993. Linkage of pyrethroid insecticide resistance to a sodium channel locus in the tobacco budworm. *Insect Biochem.Mol.Biol.* 23: 763-775.
- Trpis M, Hausermann W, Craig GB, Jr. 1995. Estimates of population size, dispersal, and longevity of domestic *Aedes aegypti aegypti* (Diptera: Culicidae) by mark-release-recapture in the village of Shauri Moyo in eastern Kenya. *J.Med.Entomol.* 32: 27-33.
- Turell MJ, O'Guinn ML, Dohm DJ, Jones JW 2001. Vector competence of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *J Med Entomol* 38: 130-134.
- Vazeille M, Mousson L, Rakatoarivony I, Villeret R, Rodhain F, Duchemin JB, Failloux AB 2001. Population genetic structure and competence as a vector for dengue type 2 virus of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. *Am.J.Trop Med Hyg.* 65: 491-497.
- Vazeille M, Rosen L, Mousson L, Failloux AB 2003. Low oral receptivity for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from Southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti* . *Am.J.Trop Med Hyg.* 68: 203-208.
- Ware GW, Whitacre DM (2004). An Introduction to insecticides [texto on-line]. Meister Media Worldwide. 4 ed. Ohio (Willoughby): MeisterPro Information Resources. Disponível na Internet via www <URL: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>>. [Arquivo capturado de 12 de dezembro de 2004].
- Whyard S, Downe AE, Walker VK 1995. Characterization of a novel esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Arch.Insect Biochem.Physiol* 29: 329-342.
- Williamson MS, Denholm I, Bell CA, Devonshire AL 1993. Knockdown Resistance (Kdr) to Ddt and Pyrethroid Insecticides Maps to A Sodium-Channel Gene Locus in the Housefly (*Musca domestica*). *Molecular & General Genetics* 240: 17-22.
- Williamson MS, MartinezTorres D, Hick CA, Devonshire AL 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Molecular & General Genetics* 252: 51-60.
- Wilson TG 2001. Resistance of *Drosophila* to toxins. *Annual Review of Entomology* 46: 545-571.
- Wondji CS, De Silva WAPP, Hemingway J, Ranson H, Karunaratne SHPP 2008. Characterization of knockdown resistance in DDT- and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* populations from Sri Lanka. *Tropical Medicine & International Health* 13: 548-555.
- Yang Y, Lv J, Gui B, Yin H, Wu X, Zhang Y, Jin Y 2008. A-to-I RNA editing alters less-conserved residues of highly conserved coding regions: implications for dual functions in evolution. *RNA.* 14: 1516-1525.
- Yu FH, Catterall WA 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* 4: 207.
- Zaim M, Guillet P 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol* 18: 161-163.
- Zhou W, Chung I, Liu Z, Goldin AL, Dong K 2004. A voltage-gated calcium-selective channel encoded by a sodium channel-like gene. *Neuron* 42: 101-112.

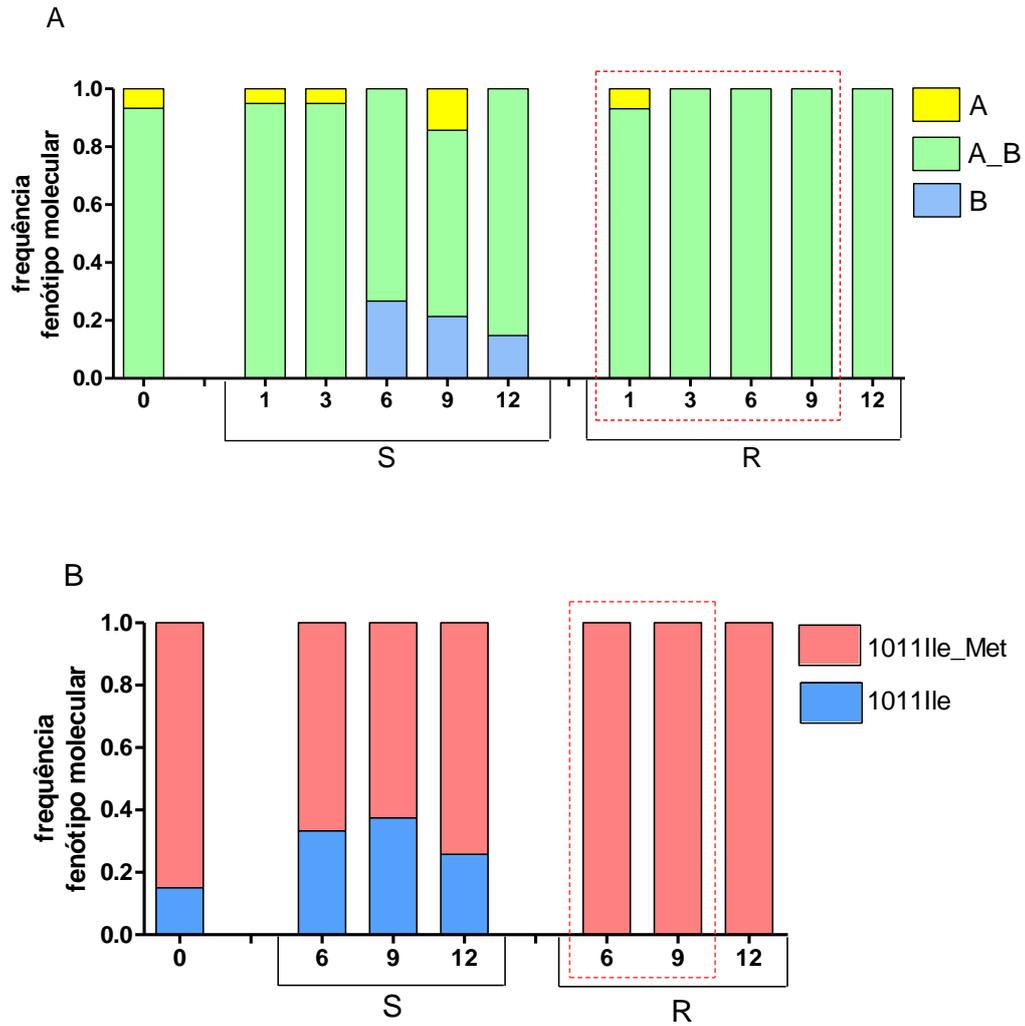
## Apêndice 1

### Algumas considerações adicionais sobre os experimentos de pressão de seleção em laboratório

Na seção 3.4 observamos que o grupo R, mantido sob pressão de seleção por piretróide, apresentou o *fitness* bastante comprometido com relação ao controle Rock e ao grupo S, mantido sob as mesmas condições, mas sem inseticida. Avaliação da atividade das enzimas envolvidas com a resistência metabólica, ao longo das gerações, não revelou qualquer tendência (dados não mostrados). Com relação a alterações no *AaNa<sub>v</sub>*, a população de Natal, a partir da qual foram estabelecidas as linhagens R e S, não apresenta a mutação Val1016Ile, mas somente a Ile1011Met (vide Martins et al. 2009a, seção 3.1). Para avaliação preliminar da dinâmica dos alelos de *AaNa<sub>v</sub>* nos grupos selecionados, indivíduos dos grupos R e S foram tipados ao longo das gerações, quanto à categoria de sequência de acordo com o intron (A ou B) e ao sítio 1011 (metodologia descrita na seção 3.3).

A frequência inicial de indivíduos com fenótipo molecular do tipo A\_B na população de Natal ( $F_0$ ), de 93,3%, alcançou 100% no grupo R já na geração  $F_3$ , assim se mantendo até a  $F_9$ . Ou seja, todos os indivíduos do grupo R avaliados foram tipados como A\_B. Ao contrário, no grupo S, a frequência de A\_B havia diminuído, chegando a 64,3% na geração  $F_9$  (Figura A1-A). A partir daí, embora os grupos S e R continuassem sendo mantidos separadamente, a pressão de seleção com inseticida, em R, foi interrompida. Na geração  $F_{12}$  a frequência de A\_B continuou em 100% para o grupo R e foi de 85,2% no grupo S. De acordo com nossa hipótese de ocorrência de duplicação gênica (seção 3.3), o haplótipo duplicado é caracterizado pelo fenótipo molecular A\_B, em análise de PCR. Portanto, os indivíduos com este fenótipo podem ser homocigotos, contendo dois haplótipos duplicados; ou heterocigotos, contendo um duplicado e outro do tipo A ou B. Contudo, vale lembrar, que nem todos os indivíduos tipados como A\_B possuem necessariamente o haplótipo duplicado, já que há indivíduos portadores de uma sequência do tipo A e outra do tipo B.

Uma forma mais precisa para avaliação da frequência do haplótipo duplicado pode ser tida pela tipagem do sítio 1011, já que todas as sequências com a mutação Ile1011Met estão no haplótipo duplicado (1011Met + A + 1016Val\_1011Ile + B + 1016Val). Os indivíduos portadores de pelo menos um haplótipo duplicado deveriam ser tipados, portanto, como A\_B, para o tipo de sequência, e Ile\_Met para o sítio 1011. A frequência do fenótipo molecular 1011 Ile/Met na população original ( $F_0$ ) era de 85,0%, chegando a 100% no grupo R na  $F_6$  e assim se mantendo até a  $F_{12}$ . Ou seja, a partir da geração  $F_6$  todos os indivíduos tipados do grupo R eram portadores do haplótipo duplicado. Por outro lado, sua frequência diminuiu no grupo S, já que a frequência do fenótipo molecular 1011 Ile\_Met variou aproximadamente entre 62 e 78% neste mesmo período (Figura A1-B). O aumento da frequência do haplótipo duplicado no grupo R e sua diminuição no grupo S sugere correlação deste haplótipo com a resistência, ainda que moderada, ao piretróide e/ou com alteração no *fitness* do inseto.



**Figura A1** – Tipagem molecular dos grupos selecionados. Frequência dos fenótipos moleculares de indivíduos dos grupos sob seleção, mantidos na presença (R) e ausência (S) de pressão com piretróide ao longo de nove gerações sucessivas (veja seção 3.4). O quadrado pontilhado em vermelho compreende as gerações sob seleção com piretróide. A partir da geração F<sub>9</sub> os grupos R e S foram mantidos sem inseticida. **A** – Frequência dos fenótipos moleculares considerando-se o tipo de sequência, sendo estes representados por indivíduos com haplótipos somente do tipo A (A) ou B (B) e por aqueles que apresentam os dois haplótipos (podendo incluir ou não a duplicação) (A\_B). Foram utilizados para F<sub>0</sub>: 15 machos da população original de Natal; F<sub>1</sub>, machos R (29 R1 e 24 R3) e S (20 S3); F<sub>3</sub>: machos R (24 R1 e 20 R3) e S (20 S1 e 20 S3); F<sub>6</sub>: machos R (15 R1) e S (15 S3); F<sub>9</sub>: machos R (15 R1) e S (18 S1); F<sub>12</sub>: R (R1 – 10 machos e 11 fêmeas) e S (S1 – 10 machos e 17 fêmeas). **B** – Frequência dos fenótipos moleculares considerando-se o sítio 1011, caracterizados por aqueles com haplótipos sem a mutação (1011Ile) ou com pelo menos um haplótipo com mutação (1011Ile\_Met, que é o haplótipo duplicado). Foram utilizados para F<sub>0</sub>: 20 machos da população original de Natal; grupo R: R1 (14 machos F<sub>6</sub>: 20 machos F<sub>9</sub> e 10 machos mais 14 fêmeas F<sub>12</sub>) e grupo S: indivíduos do grupo S1 (15 machos F<sub>6</sub>) e S3 (19 machos F<sub>9</sub> e 15 machos mais 18 fêmeas F<sub>12</sub>).

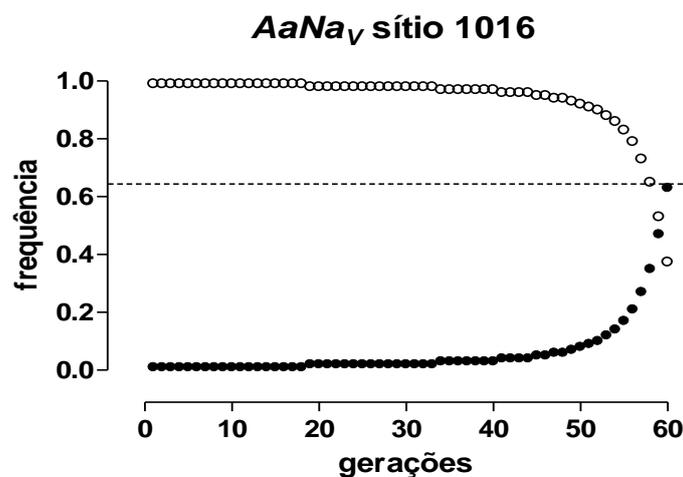
## Apêndice 2

### Índice de seleção a favor do alelo mutante 1016 Ile

Na seção 3.2 apresentamos evidências da relação da mutação Val1016Ile com a resistência a piretróide. Embora a mutação 1016 Ile não tenha sido observada na amostra de 2003 de Nova Iguaçu, foi encontrada com uma frequência de 62,5% em 2008. A partir destes dados, simulamos a dinâmica da frequência dos alelos do sítio 1016 e a seleção natural a favor do alelo mutante. O coeficiente de seleção pode ser expresso como o índice que representa a redução no valor adaptativo, relativa ao melhor genótipo.

Em nosso caso, o melhor genótipo seria o 1016 Ile/Ile e segundo Saavedra-Rodrigues et al (2007) esta mutação é recessiva. Para obtermos uma estimativa preliminar do coeficiente de seleção contra os outros genótipos na população de Nova Iguaçu assumimos que: 1) o tempo de geração de *Ae. aegypti* é de aproximadamente um mês em condições naturais, resultando em cerca de 60 gerações entre as duas amostragens de Nova Iguaçu; 2) a frequência inicial do alelo 1016Ile foi de 0,01 (embora esta mutação não tenha sido observada na amostra de 2003); 3) ao longo deste tempo a seleção tem sido contínua e constante; 4) os efeitos de deriva e migração podem ser desprezados.

Foi utilizada a fórmula  $p' = p(1-s) / (1-p^2s-2pqs)$  (Haldane 1924 *apud* Ridley 2006) para cálculo da frequência do alelo dominante de uma característica recessiva, uma geração seguinte, sob impacto da seleção natural. Na fórmula, p e q correspondem, respectivamente, à frequência inicial do alelo dominante (1016 Val) e recessivo (1016 Ile); p' à frequência do alelo dominante após uma geração; e s, o coeficiente de seleção. Como ilustrado na figura abaixo, o coeficiente de seleção encontrado, de 0,65 contra os genótipos homozigotos e heterozigotos para o alelo 1016 Val explicaria a variação de frequências entre as coletas de 2003 e 2008 em Nova Iguaçu. Isto significaria que, em condições naturais e com o uso de inseticidas, 1016 Val/Val e 1016 Val/Ile têm em média cerca de 35% de chances de sobrevivência, em relação a 1016 Ile/Ile.



**Figura A2** – Estimativa da frequência dos alelos do sítio 1016 na localidade de Nova Iguaçu entre as coletas de 2005 e 2008. Símbolos abertos e fechados representam, respectivamente, os alelos selvagem (1016 Val) e mutante (1016 Ile). A linha pontilhada indica a frequência do alelo 1016 Ile na 60ª geração (0,625).

### Apêndice 3

#### Publicações durante a vigência do doutorado não diretamente relacionadas ao objetivo principal da tese

- 1 - Braga IA, Mello CB, Montella IR, Lima JB, **Martins AJ**, Medeiros PF, Valle D **2005**. Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. **J.Med.Entomol.** 42: 830-837.
- 2 - Montella IR, **Martins AJ**, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA, Valle D **2007**. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **Am.J.Trop.Med.Hyg.** 77: 467-477.
- 3 - Valle D, Montella IR, Ribeiro RA, Medeiros PFV, **Martins AJ**, Lima JBP 2007. Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*/ Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. 1. ed. Brasília, DF: Fiocruz e Ministério da Saúde, 128 p. ISBN 85-334-1291-6.
- 4 - **Martins AJ**, Belinato TA, Lima JB, Valle D **2008**. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. **Pest.Manag.Sci.** 64: 676-680.
- 5 - Rezende GL, **Martins AJ**, Gentile C, Farnesi LC, Pelajo-Machado M, Peixoto AA, Valle D **2008**. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC.Dev.Biol.** 8: 82.
- 6 - Belinato TA, **Martins AJ**, Lima JB, de Lima-Camara TN, Peixoto AA, Valle D 2009. Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz** 104: 43-47.
- 7 - Farnesi LC, **Martins AJ**, Valle D, Rezende GL **2009**. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz** 104: 124-126.