

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS - MBT**

**SUSCETIBILIDADE A INSETICIDAS, ANÁLISE DO GENE *KDR* (*KNOCKDOWN RESISTANCE*) E DE ENZIMAS DE DETOXIFICAÇÃO NO MECANISMO DE RESISTÊNCIA, EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* DA CIDADE DE MANAUS.**

**ELIANE CHRISTINE SANTOS SILVA**

Manaus  
2012

**ELIANE CHRISTINE SANTOS SILVA**

**SUSCETIBILIDADE A INSETICIDAS, ANÁLISE DO GENE *KDR* (*KNOCKDOWN RESISTANCE*) E DE ENZIMAS DE DETOXIFICAÇÃO NO MECANISMO DE RESISTÊNCIA, EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* DA CIDADE DE MANAUS.**

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Universidade do Estado do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia.

Orientadora: Joselita Maria Mendes dos Santos

Manaus  
2012

## Ficha Catalográfica

S586s

Silva, Eliane Christine Santos

Suscetibilidade a inseticidas, análise do gene *Kdr* (knockdown resistance) e de enzimas de detoxificação no mecanismo de resistência, em populações de *Aedes aegypti* da cidade de Manaus. /Eliane Christine Santos Silva. -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2012.

xvi. 81f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2012. Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Joselita Maria Mendes dos Santos.

1. *Aedes aegypti* 2. Resistência *Kdr* I. Título

CDU: 604

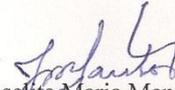


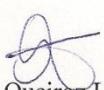
GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

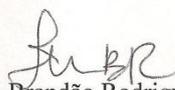
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPEP  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS  
DA AMAZÔNIA – MBT**

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA  
ALUNA ELIANE CHRISTINE SANTOS  
SILVA EM BIOTECNOLOGIA E  
RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA.

Aos vinte e seis dias do mês de outubro do ano de dois mil e doze às nove horas, realizou-se no Auditório da Microbiologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia INPA, (CSAS-INPA) Campus I, localizado na Avenida André Araújo, 2.936, Petrópolis, a Defesa Pública da dissertação de mestrado de Eliane Christine Santos Silva, sob o título “Susceptibilidade a inseticidas, análise do gene Kdr (*Knockdown resistance*) e de enzimas de detoxificação no mecanismo de resistência, em populações de *Aedes aegypti* da cidade de Manaus”, requisito exigido para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, tendo como orientadora a Dra. Joselita Maria Mendes dos Santos, segundo encaminhamento da documentação à Coordenação do Curso e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas - UEA. A banca examinadora foi constituída pelos seguintes professores: Dra. Joselita Maria Mendes dos Santos (Presidente), Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza (membro), e Dra. Iléa Brandão Rodrigues (membro). Após as arguições e encerrada a sessão de defesa, os referidos membros da banca emitiram o parecer final sobre a defesa da dissertação de mestrado, tendo a aluna sido Aprovada.

  
Dra. Joselita Maria Mendes dos Santos  
CPF: 078509.215-34

  
Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza  
CPF: 249.657.302-30

  
Dra. Iléa Brandão Rodrigues  
CPF: 603243847-34

Universidade do Estado do Amazonas  
Av.: Djalma Batista, 3578 - Flores  
CEP: 69050-010 / Manaus - AM

**UEA**  
UNIVERSIDADE  
DO ESTADO DO  
AMAZONAS

  
**AMAZONAS**

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais e ao meu esposo, pelo apoio e financiamento ao longo de meu desenvolvimento intelectual, por terem paciência diante das minhas escolhas, pelo amor, carinho e estímulo que me ofereceram, dedico-lhes essa conquista como gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Dra. Joselita, pela confiança em mim depositada no decorrer do desenvolvimento da pesquisa e pelo incentivo na consecução dos meus objetivos;

Agradeço o Dr. Tadei, pelo suporte, disponibilidade de recursos financeiros e técnicos, necessários à realização dos experimentos, bem como pela oportunidade de participar do curso de metodologias para detecção de resistência em mosquitos - FIOCRUZ-RJ;

Agradeço ao grupo: Aleksey, Érica, Muana, Rejane, Valéria, demais técnicos e motoristas da Casa 15, pela logística e facilitação no desenvolvimento desta pesquisa;

Agradeço a Dra. Iléa, e a dona Maria, pelo acolhimento durante os meus primeiros dias no INPA e pela interação durante o estabelecimento das colônias dos mosquitos;

Agradeço o MsC. Juracy, pelo auxílio e companhia durante a realização das análises e descontração nos momentos de tensão com a piadinha de cada dia;

Agradeço o Dr. José Bento, Dra. Denise Valle e sua equipe, pelo treinamento em metodologias para detecção de resistência em mosquitos, realizado na FIOCRUZ-RJ, pelos esclarecimentos dados quando no surgimento de dúvidas com os bioensaios, disponibilização de ovos da cepa sensível Rockefeller e alíquotas do organofosforado temefós;

Agradeço o Dr. Ademir Martins e sua equipe, pelos esclarecimentos e instruções para detecção do mecanismo *Kdr*, em mosquitos, bem como pela disponibilização dos DNAs controles para a mutação *Kdr* no sítio 1016 em *Aedes aegypti*;

Agradeço a Dra. Gislene Carvalho-Zilse pela disponibilidade e auxílio com a eletroforese vertical, quando no desespero com as mostras não migravam;

Agradeço os colegas de laboratório: Paulinha, Saulo e Adriel, do Laboratório de Biologia Molecular-LTBM, pela presteza e companhia durante as análises moleculares;

Agradeço os colegas: Adriano, Marla, Rochely e Leandro, pelo intercâmbio de informações em conversas de corredor, muitas vezes tarde da noite, fins de semana, nos intervalos dos bioensaios ou em outros momentos;

Agradeço os estagiários: Fabrício, Noêmia e Poliana, pelo auxílio nas coletas e manutenção dos mosquitos;

Agradeço também a todas as Marias, Joãos, Franciscas, Pedros, Terezas..., que permitiram a realização das coletas em seus domicílios.

A todos, meu muito obrigado!

*“Dificuldades e obstáculos são fontes valiosas de saúde e força para qualquer sociedade”.*

*Albert Einstein*

## RESUMO

O uso continuado e indiscriminado de inseticidas químicos ocasiona uma intensa pressão de seleção, acarretando problemas para os programas de controle vetorial dos insetos. Resistências do tipo *Kdr* (*Knockdown resistance*) têm sido reportadas em várias localidades do Brasil e demais áreas tropicais e subtropicais do mundo, sendo caracterizada por alterações no canal de sódio dos insetos, ocasionando perda da coordenação, após a exposição ao inseticida, com recuperação após o seu efeito, frequentemente, causada por mutações de caráter recessivo, dentre as quais, *Val1016Ile*, localizadas no canal de sódio voltagem dependente de mosquitos da espécie *A. aegypti* (*AaNa<sub>v</sub>*), vetor da dengue. Este trabalho teve como objetivos, avaliar a suscetibilidade de larvas de 3º estágio final e 4º inicial ao inseticida temefós, formulação Abate 1G e adultos, ao inseticida deltametrina, bem como, verificar atividade das esterases, fosfoglicomutase e hexoquinase, e presença da mutação *Val1016Ile*, em quatro populações de *A. aegypti* na cidade de Manaus/AM, submetidas e não submetidas aos inseticidas. Foram analisadas, por meio de bioensaios de suscetibilidade a inseticidas, as populações de *A. aegypti* dos bairros: Alvorada I, Coroado I, Monte das Oliveiras e Praça 14 de Janeiro, de modo a estimar as taxas de mortalidade, utilizando as doses diagnósticas de ABATE 1G (0,012 mg/L) e deltametrina (5µg). Com os resultados obtidos dos bioensaios foram identificadas as populações Praça 14 e Alvorada I, como sendo as mais resistentes e as demais, Coroado I e Monte das Oliveiras, menos resistentes. Não foi possível associar a atividade esterásica com a resistência ao organofosforado temefós, nem à deltametrina, embora tenham sido observadas mais bandas (isoenzimas) em populações do campo, quando comparadas a da linhagem suscetível Rockefeller, submetidas ao inseticida piretróide. Neste caso, há possibilidade das esterases estarem sendo reguladas por algum mecanismo genético que, em presença do inseticida ocorra ativação preferencial de determinadas formas isoenzimáticas. A presença da mutação *Kdr* foi verificada em todas as populações analisadas, sendo que a população da Praça 14 foi a que apresentou a maior frequência (0,98) e o Monte das Oliveiras, a menor (0,58). Os valores de  $X^2$ , para as quatro populações, não foram significativos, indicando que as mesmas estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com excesso de heterozigotos e diferenciação genética interpopulacional moderada, sendo as populações da Praça 14 e do Monte das Oliveiras as mais distantes geneticamente. A presença da mutação *Val1016Ile* em todas as populações analisadas sugere que o uso de piretróides está expondo as populações a intensas pressões de seleção. Assim, faz se necessário a revisão das medidas utilizadas para o controle vetorial, bem como, a substituição do deltametrina por inseticidas alternativos, cuidando para que a suscetibilidade seja constantemente monitorada, de modo a garantir o controle populacional deste vetor.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*–resistência–organofosforados–piretróides–*Kdr* (*Resistance*)

## ABSTRACT

Continued use of chemical pesticides and has led population to intense selection pressure, causing problems for vector control programs. Resistances *Kdr* (*Knockdown resistance*) have been reported in several locations in Brazil and other tropical and subtropical areas of the world, characterized by changes in sodium channel of insects, causing loss of coordination, after exposure to the insecticide, with recovery its effect often caused by recessive mutations, among which, *Val1016Ile*, located on voltage-gated sodium channel mosquito species *A. aegypti* (*AaNa<sub>v</sub>*), dengue vector. This study aimed to evaluate the susceptibility of third instar larvae to the insecticide temefós, formulation ABATE 1G and adults, deltamethrin, and determining esterase activity, phosphoglucomutase and hexokinase, and the presence of the mutation *Val1016Ile* in four *A. aegypti* populations Manaus / AM, submitted and not submitted to insecticides. Were analyzed by means of bioassays of insecticide susceptibility, neighborhoods *A. aegypti* populations: Alvorada I, Coroado I, Monte das Oliveiras and Praça 14 de Janeiro, in decreasing order to estimate mortality rates, using the diagnostic doses of ABATE 1G (0.012 mg / L) and deltamethrin (5µg). With the results of bioassays were identified Praça 14 and Alvorada I populations like being the more resistant, and Coroado I and Monte das Oliveiras, less resistant. Unable to associate the esterase activity with resistance to organophosphate temephos, nor to deltamethrin, although they have been observed more bands (isoenzymes) in field populations when compared to the susceptible strain Rockefeller, submitted to the pyrethroid insecticide. In this case, there is possibility of esterases are being regulated by a genetic mechanism that insecticide occurs in the presence of preferential activation of certain isoenzyme form. The presence of *Kdr* mutation was found in all populations studied, and the Praça 14 population was the one with the highest frequency (0.98) and the Monte das Oliveiras, the lowest (0.58). The  $X^2$  values for the four populations were not significant, indicating that they are in Hardy-Weinberg equilibrium, with an excess of heterozygotes interpopulation and moderate genetic differentiation, and Praça 14 and the Monte das Oliveiras populations, the most distant genetically. The presence of the mutation *Val1016Ile* in all populations analyzed suggests that the use of pyrethroids is exposing populations to intense selection pressures. Thus, it is necessary to review the measures used for vector control, as well as the substitution of alternative insecticides deltamethrin by, making sure that the susceptibility is constantly monitored to ensure population control of this vector.

Keywords: *Aedes aegypti* – resistance – organophosphates – pyrethroids – *Kdr* (*Resistance*)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Países/Áreas com risco de transmissão de dengue no ano de 2009, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (Fonte: WHO, 2009).....	1
Figura 2	Estrutura química do larvicida organofosforado temefós, de nome químico <i>O,O</i> -(ditio-4,1fenileno) bis ( <i>O,O</i> -dimetilfosforotioato); <i>O,O'</i> (ditio-4,4-fenileno) <i>O,O',O'</i> ,tetrametil bis fosfotioato.....	5
Figura 3	Estrutura química dos piretróides: a) Cipermetrina ( $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$ ) e b) Deltametrina ( $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ ).....	6
Figura 4	Esquema do canal de sódio voltagem dependente, seus quatro domínios homólogos e suas seis subunidades hidrofóbicas (Fonte: PICCOLI, 2010).....	11
Figura 5	Bairros de Manaus: Alvorada I (A), Coroado I (B), Monte das Oliveiras (C), Praça 14 de Janeiro (D), onde foram realizadas as coletas (Fonte: google maps).....	16
Figura 6a	Ovitrapas.....	18
Figura 6b	Identificação das palhetas.....	18
Figura 6c	Visualização dos ovos nas palhetas.....	18
Figura 6d	Bacias para criação das larvas.....	18
Figura 6e	Recipiente misto, para emergência dos adultos.....	18
Figura 6f	Identificação dos adultos quanto à espécie.....	18
Figura 6g	Identificação dos adultos quanto à espécie.....	18
Figura 6h	Acondicionamento dos adultos em gaiolas.....	18
Figura 6i	Copo contendo desovas F1.....	18
Figura 7	Soluções de uso (temefós) e suas respectivas concentrações.....	20
Figura 8	Garrafas para testes com inseticidas.....	23
Figura 9	Dose-resposta de larvas <i>de A. aegypti</i> , da linhagem Rockefeller, submetidas a diferentes concentrações do larvicida temefós, formulação ABATE 1G.....	29
Figura 10	Dose-resposta de larvas <i>de A. aegypti</i> , da população Alvorada I, submetidas a diferentes concentrações do larvicida temefós, formulação ABATE 1G.....	30
Figura 11	Dose-resposta de larvas <i>de A. aegypti</i> , da população Coroado I, submetidas a diferentes concentrações do larvicida temefós, formulação ABATE 1G.....	30
Figura 12	Dose-resposta de larvas <i>de A. aegypti</i> da população Monte das Oliveiras, submetidas a diferentes concentrações do larvicida temefós, formulação ABATE 1G.....	31
Figura 13	Ensaio dose-resposta com larvas <i>de A. aegypti</i> , da população Praça 14 de Janeiro, submetidas a diferentes concentrações do larvicida temefós, formulação ABATE 1G, corrigidos pela fórmula de Abbott, constando apenas o controle, dose diagnóstica e superdose.....	31

Figura 14	Comparação das doses-respostas de larvas de <i>A. aegypti</i> , das populações Rockefeller, Alvorada I, Coroado I, Monte das Oliveiras e Praça 14, submetidas a diferentes concentrações do larvicida temefós, formulação ABATE 1G.....	32
Figura 15	Calibração com a linhagem suscetível, Rockefeller <i>A. aegypti</i> , submetida ao bioensaio de garrafa com o inseticida deltametrina.....	34
Figura 16	Taxas de mortalidade de indivíduos <i>A. aegypti</i> da população Alvorada I, submetidos aos bioensaios com deltametrina.....	34
Figura 17	Taxas de mortalidade de indivíduos <i>A. aegypti</i> , da população Coroado I, submetidos aos bioensaios com deltametrina.....	35
Figura 18	Taxas de mortalidade de indivíduos <i>A. aegypti</i> , da população Monte das Oliveiras, submetidos aos bioensaios com deltametrina.	36
Figura 19	Taxas de mortalidade de indivíduos <i>A. aegypti</i> , da população Praça 14 de Janeiro, submetidos aos bioensaios com deltametrina..	37
Figura 20	Comparação da mortalidade em função do tempo, entre as cinco populações de <i>Aedes aegypti</i> , submetidas à dose diagnóstica de deltametrina (5µg).....	37
Figura 21	Perfil eletroforético das esterases em populações de <i>A. aegypti</i> da cidade de Manaus, submetidos ao bioensaio com temefós. Amostras: 1 a 3 (Linhagem Rockfeller); 4 a 6 (Alvorada I); 7 a 9 (Monte das Oliveiras); 10 a 12 (Praça 14) e 13 a 15 (Coroado I).....	39
Figura 22	Perfil eletroforético das esterases em populações de <i>A. aegypti</i> da cidade de Manaus, submetidos ao bioensaio com deltametrina. Amostras: 1 a 3 (Linhagem Rockfeller); 4 a 6 (Praça 14); 7 a 9 (Coroado I); 10 a 12 (Alvorada I) e 13 a 15 (Monte das Oliveiras)..	40
Figura 23	Perfil eletroforético da hexoquinase em populações de <i>A. aegypti</i> da cidade de Manaus, submetidos ao bioensaio com deltametrina. Amostras: 1 a 3 (Linhagem Rockfeller); 4 a 6 (Praça 14); 7 a 9 (Coroado I); 10 a 12 (Alvorada I) e 13 a 15 (Monte das Oliveiras)..	40
Figura 24	Perfil eletroforético da fosfoglicomutase em populações de <i>A. aegypti</i> da cidade de Manaus, submetidos ao bioensaio com deltametrina. Amostras: 1 e 2 (Linhagem Rockfeller); 3 a 5 (Praça 14); 6 a 8 (Monte das Oliveiras); 9 a 11 (Coroado I) e 12 a 14 (Alvorada I).....	41
Figura 25	Perfil eletroforético dos genótipos utilizados como controle para mutação <i>Kdr</i> no sítio 1016 do canal de sódio. Amostras: 1 - genótipo selvagem ( <i>Val/Val</i> ), com 98pb; 2 - genótipo heterozigoto ( <i>Val/Ile</i> ); amostra 3 - genótipo mutante ( <i>Ile/Ile</i> ), com 78pb; e 4 - marcador Ultra Low Range.....	41
Figura 26	Perfil eletroforético da variabilidade genética em populações de <i>A. aegypti</i> da cidade de Manaus, com base no gene <i>Kdr</i> (mutação no sítio 1016). Amostras: 1 e 12, controles heterozigotos ( <i>Val/Ile</i> ). Amostras 2 a 7, fêmeas do Monte das Oliveiras selecionadas pelo bioensaio com deltametrina, 8 a 11 e 13 a 20, indivíduos da Praça 14, não tratados com inseticida.....	42
Figura 27	Dendrograma resultante do agrupamento das populações, sem deltametrina, com base na distância genética (NEI, 1978).....	44

Figura 28	Perfil eletroforético da variabilidade genética em populações de <i>A. aegypti</i> da cidade de Manaus, com base no gene <i>Kdr</i> (mutação no sítio 1016). Amostras: 1 e 12, controles heterozigotos ( <i>Val/Ile</i> ); 2 a 11, 13 e 14, fêmeas da Alvorada I, e 15 a 20, Monte das Oliveiras, ambas selecionadas pelo bioensaio com deltametrina.....	44
Figura 29	Dendrograma resultante do agrupamento das populações, com deltametrina, com base na distância genética (NEI, 1978).....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Status</i> da suscetibilidade das populações <i>de A. aegypti</i> submetidas aos bioensaios com Abate (dose diagnóstica=0,012mg/L).....	32
Tabela 2	Valores de CL <sub>50</sub> , CL <sub>90</sub> , RR <sub>50</sub> e RR <sub>90</sub> , obtidos mediante análise de próbite para as populações <i>de A. aegypti</i> submetidas aos bioensaios com temefós.....	33
Tabela 3	<i>Status</i> da suscetibilidade das populações <i>de A. aegypti</i> submetidas aos bioensaios com deltametrina.....	38
Tabela 4	Estimativa da variabilidade genética e teste de equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> em populações naturais de <i>A. aegypti</i> da cidade de Manaus, com base no gene <i>Kdr</i> ( <i>Knockdown resistance</i> ).....	43
Tabela 5	Matriz de similaridade e distância genética em populações naturais de <i>A. aegypti</i> da cidade de Manaus, com base no gene <i>Kdr</i> ( <i>Knockdown resistance</i> ). Valores acima da diagonal correspondem à similaridade genética, e abaixo, a distância genética (Nei, 1978).....	44
Tabela 6	Estimativa da variabilidade genética e teste de equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> em populações de <i>A. aegypti</i> da cidade de Manaus, submetidas ao inseticida Deltametrina, com base no gene <i>Kdr</i> ( <i>Knockdown resistance</i> ).....	45
Tabela 7	Matriz de similaridade e distância genética em populações naturais de <i>A. aegypti</i> da cidade de Manaus, submetidas ao inseticida Deltametrina, com base no gene <i>Kdr</i> ( <i>Knockdown resistance</i> ). Valores acima da diagonal correspondem à similaridade genética e abaixo, a distância genética (Nei, 1978).....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$AaNa_v$	Canal de sódio dependente de voltagem de <i>A. aegypti</i>
ACh	Acetilcolina
AChe	Acetilcolinesterase
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal para 50% dos indivíduos da linhagem suscetível
CL <sub>90</sub>	Concentração Letal para 90% dos indivíduos da linhagem suscetível
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
$F_{is}$	Índice de diferenciação genética dentro da população
$F_{it}$	Índice de diferenciação genética na população total
$F_{st}$	Índice de diferenciação genética entre as populações
FVS/AM	Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas
GABA	Ácido gama amino butírico
H	Heterozigosidade
$H_e$	Heterozigosidade esperada
$H_o$	Heterozigosidade observada
IGR	Insect Grown Regulator
<i>Kdr</i>	<i>Knockdown resistance</i>
LIRAA	Levantamento do Índice Rápido de <i>A. aegypti</i>
MORENAa	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de <i>A. aegypti</i>
$Na_v$	Canal de sódio dependente de voltagem
OMS	Organização Mundial da Saúde
OP	Organofosforados
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
POPGENE	Population Genetic Analysis
SINAN/AM	Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Amazonas
TFPGA	Tools for Population Genetic Analyses
U	Unidade

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 A DENGUE E O <i>Aedes aegypti</i> .....	1
1.2 INSETICIDAS QUÍMICOS.....	3
<b>1.2.1 Organofosforados.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2.2 Piretróides.....</b>	<b>5</b>
1.3 MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA.....	6
<b>1.3.1 Tipos de ensaios para avaliação de resistência.....</b>	<b>7</b>
1.3.1.1 Bioensaios dose-diagnóstica.....	7
1.3.1.2 Bioensaios dose-resposta.....	7
1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	8
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>12</b>
2.1 RESISTÊNCIA DO <i>A. aegypti</i> AOS INSETICIDAS QUÍMICOS.....	12
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	13
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
4.1 ÁREA DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DOS BAIRROS ANALISADOS.....	14
4.2 COLETAS E MANUTENÇÃO DAS COLÔNIAS DE <i>A. aegypti</i> .....	15
4.3 BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE.....	17
<b>4.3.1 Bioensaio com temefós, formulação ABATE 1G (Fersol®).....</b>	<b>17</b>
<b>4.3.2 Bioensaio com temefós grau técnico.....</b>	<b>17</b>
4.3.2.2 Bioensaios dose-resposta.....	18
4.4 BIOENSAIO COM DELTAMETRINA.....	20
4.5 ANÁLISES ISOENZIMÁTICAS.....	22
<b>4.5.1 Preparo dos suportes e das amostras.....</b>	<b>22</b>
<b>4.5.2 Sistemas enzimáticos.....</b>	<b>23</b>
4.5.2.1 Esterases (E.C.3.1.1.1).....	23
4.5.2.2 Fosfoglicomutase (E.C.5.4.2.2).....	23
4.5.2.3 Hexoquinase (E.C.2.7.1.1).....	24
4.6 ANÁLISE GENÉTICA DA MUTAÇÃO <i>Kdr (Val1016Ile)</i> NO CANAL DE SÓDIO.....	24
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
<b>4.7.1 Análise da variabilidade genética das populações de <i>A. aegypti</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>4.7.2 Estrutura genética das populações de <i>A. aegypti</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
5.1 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE LARVAS DE <i>A. aegypti</i> .....	27
<b>5.1.1 Bioensaio com temefós formulação ABATE 1G (Fersol®).....</b>	<b>27</b>
<b>5.1.2 Bioensaio com temefós grau técnico.....</b>	<b>30</b>

5.2 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE MOSQUITOS ADULTOS <i>A. aegypti</i> SUBMETIDOS AO INSETICIDA DELTAMETRINA, EM POPULAÇÕES DE MANAUS.....	31
5.3 ANÁLISES ISOENZIMÁTICAS.....	36
5.4 ANÁLISE GENÉTICA DA MUTAÇÃO <i>Kdr (Val1016Ile)</i> NO CANAL DE SÓDIO.....	38
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
6.1 BIOENSAIOS DE SUSCETIBILIDADE A INSETICIDAS.....	44
6.2 ANÁLISES ISOENZIMÁTICAS.....	48
6.3 ANÁLISE GENÉTICA DA MUTAÇÃO <i>Kdr (Val1016Ile)</i> NO CANAL DE SÓDIO.....	50
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>

## INTRODUÇÃO

### 1.1 A DENGUE E O *Aedes aegypti*

A dengue é considerada a arbovirose mais frequente em todo o mundo, constituindo causa importante de morbidade e mortalidade (SAMUEL e TYAGI, 2006). Estima-se que 2,5 a 3,0 bilhões de pessoas residam em áreas onde existe transmissão dos vírus da dengue e que, a cada ano, ocorram 50 milhões de infecções com 500.000 casos de dengue hemorrágica e 12.000 mortes em todo o mundo (BRICKS, 2004). Ocorre em regiões tropicais e subtropicais, compreendidas principalmente, entre os paralelos (latitudes) 45 °N e 35 °S ou mesmo fora desses limites, mas dentro das zonas isotermiais de 20 °C (Figura 1), predominantemente, em áreas urbanas, suburbanas e também em áreas rurais (CHATURVEDI, 2006). O agente etiológico da dengue é um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae. Apresentam propriedades antigênicas distintas que caracterizam quatro sorotipos denominados vírus dengue 1 (DENV 1), vírus dengue 2 (DENV 2), vírus dengue 3 (DENV 3) e vírus dengue 4 (DENV 4). É transmitido aos humanos através da picada de fêmeas infectadas, de espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo *A. aegypti* a principal vetora (GUBLER, 1998).

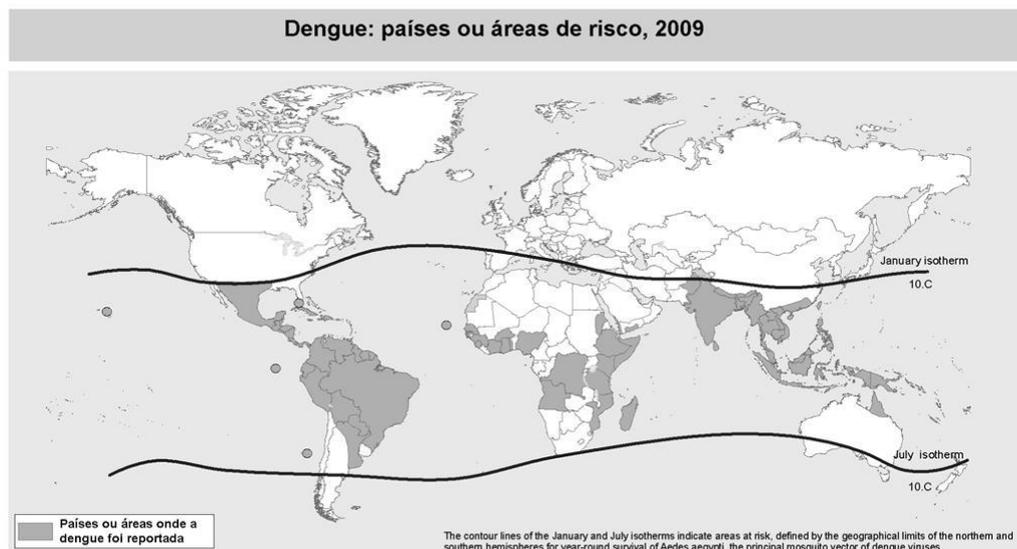


Figura 1: Países/Áreas com risco de transmissão de dengue no ano de 2009, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (Fonte: WHO, 2009).

Pertencente à classe Insecta, ordem Díptera, família Culicidae, gênero *Aedes*, subgênero *Stegomyia*, *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 é uma espécie que possui desenvolvimento holometábolo (quatro estágios: ovo-larva-pupa-adulto, sendo quatro estádios larvais), hábito diurno ou crepuscular vespertino, oportunista, deposita seus ovos diretamente sobre a superfície líquida ou em um substrato úmido, próximo a água ou em local inundável. Produz ovos resistentes à dessecação, ou seja, uma vez que o embrião esteja formado no interior do ovo, o mesmo mantém-se viável em locais secos por mais de um ano. O contato com a água induz a eclosão das larvas, fazendo com que a espécie dê preferência a criadouros transitórios, naturais ou artificiais como: bromélias, bambus cortados, pneus, latas, vidros, cacos de garrafa, pratos de vasos, entre outros, que durante o período de chuvas, ocasiona grande flutuação de densidade de adultos, variando com o aumento da quantidade de chuvas e da temperatura ambiente, característico do verão. É neste período que os criadouros são preenchidos pelas águas das chuvas sendo ciclicamente reabastecidos, desencadeando o processo de eclosão dos ovos depositados ali meses antes. Assim, as chuvas influenciam positivamente na densidade desses insetos, elevando-a enormemente nessas ocasiões. Por outro lado, durante o período de menor precipitação e temperaturas mais baixas, estes insetos podem manter-se completamente ausentes ou em níveis de densidade bem baixos. A transitoriedade dos criadouros utilizados impõe um desenvolvimento rápido das suas fases larvais e da pupa, pois o ciclo inteiro deve ser completado antes da evaporação total do líquido do criadouro (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).

Facilmente reconhecido, o *A. aegypti* apresenta coloração escura, variando do marrom ao preto, com escamas ornamentais prateadas, que formam o clássico desenho da lira em seu tórax. O abdome é escuro com manchas brancas prateadas formando anéis. Os fêmures e tíbias são revestidos de escamas brancas e os artículos tarsais com nítidas anelações brancas na extremidade basal (SUCEN, 1997).

Atingida a fase adulta, após a cópula, as fêmeas de *A. aegypti*, saem em busca da alimentação sanguínea, necessária à maturação dos óvulos. Geralmente preferem sugar o sangue de mamíferos, sendo o sangue humano preferido em primeira instância. Na ocasião do repasto sanguíneo, a fêmea é infectada com o vírus ao se alimentar do sangue de um indivíduo infectado, durante a fase de viremia. Após um período de incubação extrínseca, que dura de oito a dez dias, ela está apta a transmitir o vírus por toda sua vida (DONALÍSIO e GLASSER, 2002), seja para o homem, através da picada e injeção de saliva, ou para outros mosquitos, através da cópula ou de forma vertical. O período de incubação do vírus no homem dura, em

média, de quatro a sete dias, durante os quais, a doença pode variar de forma assintomática e clinicamente inespecífica até quadros fatais (FERREIRA *et al.*, 2005; SINGHI *et al.*, 2007).

Geograficamente, esta espécie é originária do Velho Mundo, da região etiópica, sendo descrita no Egito (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994), acompanhou o homem em sua migração pelo mundo, onde as alterações antrópicas propiciaram a sua proliferação. Está presente nos locais para onde o homem a levou em embarcações, trens, automóveis, aviões etc., e onde encontrou condições favoráveis para a sua multiplicação. No Brasil foi introduzida durante o período colonial, com o tráfego de escravos. Devido a sua importância como transmissora da febre amarela foi intensamente combatida no território brasileiro, tendo sido considerada erradicada em 1955. Contudo, países vizinhos como as Guianas e a Venezuela, dentre outros sul-americanos, como também os Estados Unidos da América, Cuba e vários países Centro-americanos, não a erradicaram. Esse descuido provocou a reinfestação no Brasil pelo *A. aegypti*, em Belém do Pará, em 1967, no Estado do Rio de Janeiro, provavelmente, em 1977 e em Roraima no início da década de 1980, ocorrendo, inclusive nos Estados litorâneos, do Maranhão ao Paraná, e da Região Centro-Oeste, além de Minas Gerais e Tocantins (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Como não existe vacina, o combate a dengue se baseia no controle do inseto vetor. Embora ocorram importantes avanços no desenvolvimento de medidas alternativas, o uso de inseticidas químicos continua sendo essencial nos programas de controle integrado, sendo utilizados há muitos anos devido a sua eficácia, sustentabilidade e baixo custo (ROSE, 2001; PRIETO *et al.*, 2002).

Entre as principais classes de inseticidas comumente usados no controle destes vetores estão os organofosforados e os piretróides. Porém, os principais problemas do uso indiscriminado destes inseticidas são aparecimentos de populações resistentes de mosquitos a esses produtos e os danos ambientais provocados por seu uso intensivo (POLANCZYK *et al.*, 2003; LUNA *et al.*, 2004).

## 1.2 INSETICIDAS QUÍMICOS

O controle químico, com inseticidas de origem orgânica ou inorgânica é uma das metodologias mais adotada, como parte do manejo sustentável e integrado, para o controle de vetores em Saúde Pública (ROSE, 2001). O desenvolvimento de inseticidas que permanecem ativos por períodos longos foi um dos mais importantes avanços no controle de insetos acontecidos no século XX. O primeiro inseticida de efeito prolongado, ou propriedade

residual foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), um organoclorado desenvolvido durante a Segunda Guerra Mundial, que, quando aplicado em paredes e tetos de casas, permanecia ativo contra os insetos por vários meses (ROZENDAAL, 1997). Os outros compostos orgânicos pertencem, principalmente, aos grupos dos organofosforados, carbamatos ou piretróides. Todos esses grupos atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos e têm sido usados nos programas de controle de doenças transmitidas por vetores (MELLON e GEORGHIOU, 1984; RATHBURN, 1985; PALCHICK, 1996).

### 1.2.1 Organofosforados

Os inseticidas organofosforados (OP) pertencem à classe de maior interesse comercial e toxicológico. Possuem esse nome por serem ésteres ou tióis derivados de ácidos fosfóricos, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico (V. SANTOS *et al.*, 2007). A aplicação comercial destes compostos na agricultura começou em 1941, com o Scharadan (octametilpirofosforamida) (GILMAN, 2003). São amplamente utilizados em água estagnada e reservatórios de água potável para uso doméstico por serem biodegradáveis, porém, devido à instabilidade química, requerem aplicações periódicas, em ciclos bimestrais (BRAGA e VALLE, 2007; MELO *et al.*, 2008).

Esta classe de inseticidas age por contato e ingestão, ligando-se ao centro esterásico da enzima acetilcolinesterase (AChE), impossibilitando-a de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético. A presença continuada da acetilcolina nas terminações nervosas interfere no mecanismo de transmissão neuronal. Deste modo, na presença do organofosforado, o estímulo do sistema nervoso central é contínuo, ocasionando paralisia e morte do inseto (BRAGA e VALLE, 2007).

O organofosforado temefós ( $C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$ ) (Figura 2) foi introduzido no mercado em 1965 (MELO *et al.*, 2008), sendo o único larvicida do grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquito, aprovado pela Organização Mundial da Saúde para uso em água de consumo humano, por suas características de baixa toxicidade aguda e pouca persistência no ambiente (WHO, 2007). No entanto, esse produto pode causar intoxicações graves se absorvido pelos pulmões ou ingerido em altas doses, sendo ainda discretamente irritante em contato com a pele e olhos (FISPQ, 2011).

No Brasil, este composto é utilizado desde 1967 (BRASIL/MS, 1968), sendo aplicado em ciclos bimestrais. Após a epidemia de 1986 o uso de organofosforados se intensificou (SCHATZMAYR, 1986; DLETZ, 1990; BRAGA *et al.*, 2004), e desde a implantação do

Plano para Erradicação do *A. aegypti* (PEAa), seu uso em programas de saúde pública foi ampliado consideravelmente pela adição de cerca de 5 mil toneladas de temefós por ano (SESA-PE, 1997; FUNASA, 2001).

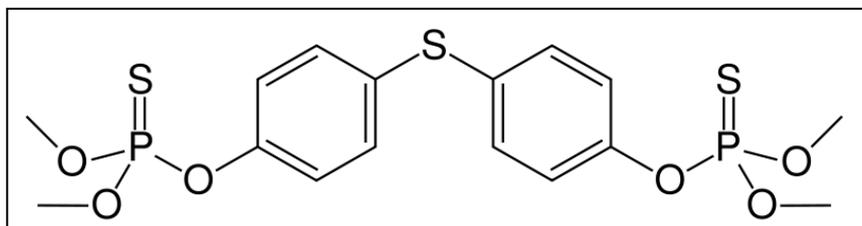


Figura 2: Estrutura química do larvicida organofosforado temefós, de nome químico *O,O*-(ditio-4,1fenileno) bis (*O,O*-dimetilfosforotioato); *O,O'*(ditio-4,4'-fenileno)*O,O',O'*,tetrametil bis fosfotioato.

### 1.2.2 Piretróides

Classe de inseticida amplamente utilizado no país. Estes compostos foram introduzidos no mercado em 1976 e ainda que sejam mais caros por unidade de peso em relação aos outros inseticidas, os piretróides têm sido bastante empregados na área da Saúde e na Agricultura. Isto ocorre devido à sua alta eficiência, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo, resultando em menor contaminação nas aplicações (SUCEN, 2010).

De custo elevado, os piretróides são produzidos a partir de uma substância natural extraída de crisântemos, o piretro. Os piretróides sintéticos classe dois (cipermetrina) e três (deltametrina) (Figura 3) somam aproximadamente 25% do mercado mundial de inseticidas, pois agem rapidamente, são biodegradáveis, não cumulativos e raramente tóxicos a aves e mamíferos (HEMINGWAY, 2004; BRAGA e VALLE, 2007a).

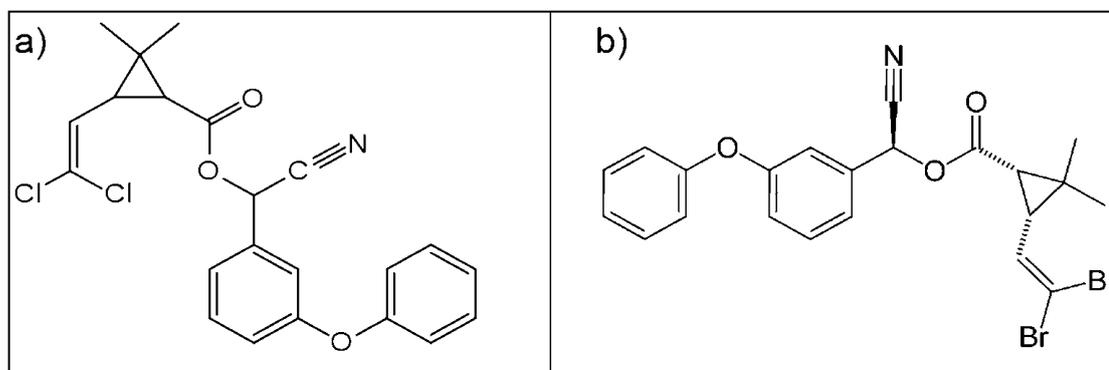


Figura 3: Estrutura química dos piretróides: a) Cipermetrina ( $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$ ) e b) Deltametrina ( $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ ).

A exposição aos piretróides pela população ocorre, principalmente, via ingestão de resíduos presentes nos alimentos e inalação após o uso do inseticida no interior de domicílios. Apesar das vantagens apresentadas pelos piretróides em relação a outros inseticidas, os mesmos cuidados devem ser tomados para sua utilização, já que podem exercer nos vertebrados efeitos neuro e cardiotoxicos, afetando principalmente, o fígado e os rins (M. SANTOS *et al.*, 2007).

Os piretróides, bem como, o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) atuam no sistema nervoso do inseto, alterando a função normal do canal de sódio. Piretróides do tipo I provocam a abertura prolongada do canal de sódio, levando a impulsos repetitivos sem resposta a um único estímulo, causando à exaustão e morte. Piretróides do tipo II causam uma despolarização da membrana, acompanhada por uma supressão do potencial de ação (SODERLUND e BLOOMQUIST, 1989; NARAHASHI, 1992; DONG, 2007).

Em 1999, os piretróides substituíram os organofosforados no controle de adultos de *A. aegypti* na maior parte do país, com exceção de São Paulo, onde são utilizados desde 1989 (MACORIS *et al.*, 1999; BRAGA *et al.*, 2004). A periodicidade das aplicações ocorre de seis meses, porém, a duração do efeito residual destes inseticidas pode variar entre dois e seis meses (R. SANTOS *et al.*, 2007).

### 1.3 MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA

Após a detecção dos primeiros casos de redução de suscetibilidade, visando organizar e sistematizar atividades para o monitoramento da resistência do *A. aegypti* aos inseticidas utilizados no país foi instituída em 1999 dentro da Fundação Nacional da Saúde-FUNASA (Ministério da Saúde) a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti* (MORENAa) a Inseticidas. Inicialmente foram realizados ensaios biológicos expondo larvas a dose diagnóstica do temefós (OMS, 1981; FUNASA, 2000, 2002).

Entre 1999 e 2000, foram avaliadas populações de *A. aegypti* de 67 municípios do país, tendo sido detectada resistência a temefós, principalmente, em municípios das Regiões Sudeste e Nordeste. Posteriormente, foram realizados ensaios do tipo dose-resposta para quantificar a resistência detectada e estudos bioquímicos para determinar os mecanismos envolvidos na resistência. Atualmente, cerca de 80 municípios do país vêm sendo avaliados bianualmente. A resistência ao temefós tem sido detectada em muitas das populações avaliadas e em todas as regiões do país (BRAGA *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2003; MACORIS *et al.*, 2003).

No Brasil, para monitoramento da resistência a piretróides em indivíduos adultos, é utilizado protocolo do CDC, Atlanta (BROGDON e MCALLISTER, 1998) para bioensaios com garrafas impregnadas, e protocolo da OMS para bioensaios com papel impregnado (WHO, 1981). O primeiro tem o objetivo de avaliar o período gasto pelo inseticida para penetrar no mosquito, atravessar os tecidos intervenientes, atingir o sítio alvo e atuar em mosquitos expostos a garrafas impregnadas com o produto avaliado. Também é possível avaliar a dose adequada para matar a população de mosquitos estudados. Pereira-da-Cunha *et al.* (2005) realizaram algumas modificações no procedimento de avaliação para diferir efeito “*knockdown*” de mortalidade nesse ensaio. Os bioensaios com papéis impregnados também avaliam a suscetibilidade dos insetos ao produto testado, e são utilizados sob a forma de kits de acrílico, conhecidos como kit OMS (WHO, 1981).

### **1.3.1 Tipos de ensaios para avaliação de resistência**

#### **1.3.1.1 Bioensaios dose-diagnóstica**

Dose-diagnóstica é a dose predeterminada de um inseticida, que apresenta efeito letal para a maioria dos indivíduos susceptíveis, mas que não afeta a maioria de indivíduos resistentes (FERRARI, 1996). Este é considerado o método mais simples de detecção da resistência, já que a OMS oferece uma lista de doses-diagnósticas de vários inseticidas, para uma variedade de espécies de artrópodes transmissores de doenças (WHO, 1991). Quando o inseticida em questão age em formas aquáticas (larvas/pupas), a dose é aplicada na água. Bioensaios em garrafas são utilizados quando o inseticida testado age nas formas adultas, sendo a dose aplicada na superfície interna do recipiente (BROGDON e MCALLISTER, 1998).

#### **1.3.1.2 Bioensaios dose-resposta**

Este tipo de ensaio é a ferramenta de escolha quando há a necessidade de se monitorar o progresso da resistência em uma determinada população. Uma escala de diferentes doses de inseticidas é utilizada para se obter um espectro de respostas de mortalidade entre as amostras estudadas. A resposta obtida pode ser analisada através da análise de próbites (POLO-PC, 1987).

Ao submeter dados de dose-mortalidade à análise de próbites, é possível observar a resposta de uma determinada linhagem a um inseticida, estabelecendo-se a dose de inseticida capaz de matar uma dada porcentagem dos indivíduos tratados em períodos determinados de tempo. Desta maneira, traçam-se dois parâmetros: a  $CL_{50}$ , concentração letal para 50% da população, e a  $CL_{95}$ , responsável pela morte de 95% dos indivíduos (FERRARI, 1996).

#### 1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

A resistência é definida como a habilidade de uma linhagem de um organismo em tolerar doses de tóxicos que seriam letais para a maioria da população normal (suscetível) da mesma espécie (POLETTI e OMOTO, 2003). Ela pode ser vista como um processo de evolução acelerada, em que uma população resistente é selecionada com o uso de determinados pesticidas (BRAGA e VALLE, 2007).

O uso do inseticida não causa alterações genéticas nos indivíduos, apenas seleciona os que já possuem a característica necessária para sua sobrevivência. Há quatro mecanismos distintos que promovem resistência aos inseticidas: penetração reduzida, alterações comportamentais, resistência metabólica e alterações estruturais nos sítios-alvo (HEMINGWAY e RANSON, 2000; BRENGUES *et al.*, 2003; PAIVA, 2006).

A redução na taxa de penetração do inseticida é um mecanismo no qual, mudanças na composição protéica do integumento podem levar a uma diminuição da penetração do inseticida. É considerado de importância secundária por conferir um baixo nível de resistência, porém associado a outros mecanismos o nível de resistência aumenta consideravelmente (APPERSON e GEORGHIOU, 1975; BRAGA e VALLE, 2007).

As alterações comportamentais podem fazer com que os insetos reconheçam superfícies tratadas com inseticidas, apresentando maior tendência de não adentrar nas áreas sob tratamento, assim, reduzindo a taxa de invasão de domicílios ou modificando o horário do repasto sanguíneo (MATHENGE *et al.*, 2001; PAIVA, 2006). Este mecanismo ainda não está claro, podendo ser um modo de seleção natural (PICCOLI, 2010).

A resistência metabólica se dá devido ao aumento da atividade detoxificante de enzimas, o que possibilita a degradação da molécula química em compostos inertes. O incremento do metabolismo pode ser o resultado de alteração, seja da enzima existente, tornando-a mais eficaz na degradação dos inseticidas, seja dos mecanismos reguladores, que aumentam a produção de moléculas de enzimas já disponíveis em insetos suscetíveis, embora em quantidades muito pequenas (BROGDON e MCALLISTER, 1998; FERRARI, 1996).

Esterases, oxidases, transferases e outras enzimas estão diretamente envolvidas nos processos metabólicos de resistência. Estas enzimas atuam no aumento da eficiência do processo de forma proporcional aos níveis de expressão das mesmas. Enzimas como as oxidases e as transferases estão relacionadas na detoxificação de diversos compostos. As esterases, no entanto, atuam especificamente na detoxificação de organofosforados (CONYERS *et al.*, 1998). No mecanismo de metabolismo de xenobióticos elas podem ser divididas em enzimas de Fase 1 e enzimas de Fase 2. As enzimas de Fase 1 reconhecem e atuam diretamente sobre o composto exógeno, introduzindo um grupo polar reativo na molécula, o que dá origem a substrato para as enzimas de Fase 2. A detoxificação que contribui para a resistência a inseticidas é realizada por enzimas de Fase 1, como as monooxigenases dependentes do citocromo P-450 e esterases, ou de Fase 2, no caso as transferases, como a glutationa s-transferase (POLETTI e OMOTO, 2003).

Os inseticidas químicos atuam no sistema nervoso central, em diferentes sítios-alvos. As alterações estruturais no sítio-alvo diminuem sua afinidade pelo inseticida e são causadas por alterações nos genes que codificam o sítio de ação do inseticida, impedindo ou dificultando a ligação do composto com a molécula-alvo. Este tipo de alteração pode comprometer parcial ou integralmente a atividade do inseticida. A resistência de uma população de insetos pode ser decorrente de alteração desses sítios, de forma a impedir ou dificultar a ligação com o inseticida. Está presente na enzima acetilcolinesterase (AChE), nos receptores neuronais do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e nos canais de sódio voltagem dependente ( $Na_v$ ) (HEMINGWAY *et al.*, 2004).

Acetilcolinesterase (AChE) é o sítio-alvo de organofosforados e carbamatos (HEMINGWAY e RANSON, 2000). Essa enzima é a responsável pela degradação de acetilcolina, neurotransmissor que, quando presente na fenda sináptica, promove a propagação do impulso nervoso, uma vez que provoca a abertura de canais de sódio na célula pós-sináptica. Em situação normal, após a cessação do estímulo, a acetilcolina é removida por recaptação ou por degradação enzimática, sendo a acetilcolinesterase a enzima responsável. Organofosforados e carbamatos atuam inibindo a AChE e, em consequência, a acetilcolina permanece na fenda sináptica e o impulso não cessa, levando o inseto à morte. Nestes casos, a resistência está relacionada com afinidade reduzida da AChE pelo inseticida, o que permite a interrupção normal, ou quase, do estímulo nervoso (FERRARI, 1996; FRENCH-CONSTANT *et al.*, 1998; HEMINGWAY e RANSON, 2000).

Receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) são os sítios-alvos dos ciclodienos e policloroterpenos (organoclorados). Pertencem a uma superfamília de receptores presentes

nas junções sinápticas do sistema nervoso central e das sinapses neuromusculares de insetos (HEMINGWAY e RANSON, 2000). Os inseticidas atuam sobre os receptores de GABA, impedindo a entrada de íons cloro para o meio intracelular e, com isso, provocando a emissão de impulsos espontâneos que levam à contração muscular, convulsões, paralisia e morte. A resistência, ocasionada por insensibilidade do receptor de GABA aos inseticidas, já foi associada com mutação de único par de bases do receptor, ocasionando substituição de um aminoácido (alanina por serina) (HEMINGWAY e RANSON, 2000).

O canal de sódio voltagem dependente ( $Na_v$ ) é uma proteína transmembrana constituída por quatro domínios homólogos (I-IV), cada qual com seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6) (Figura 4) (LOUGHNEY *et al.*, 1989; MARTINS *et al.*, 2009).

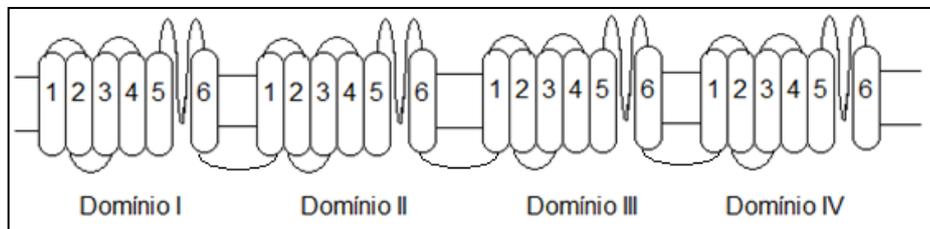


Figura 4: Esquema do canal de sódio voltagem dependente, seus quatro domínios homólogos e suas seis subunidades hidrofóbicas (Fonte: PICCOLI, 2010).

O funcionamento correto destes canais é essencial para a transmissão normal do impulso nervoso e, quando em contato com o inseticida, ocasiona a morte do inseto (GARCÍA *et al.*, 2009). São os principais sítios-alvo dos piretróides e de alguns organoclorados [como os difenil-alifáticos (DDT) e o hexaclorociclohexano (BHC)]. A ligação desses inseticidas mantém os canais de sódio na conformação aberta e, conseqüentemente, há propagação contínua do impulso nervoso, podendo levar o inseto à morte. A resistência é resultante de sensibilidade reduzida do canal de sódio a esses compostos (BLOOMQUIST, 1993; WARE, 2000; HEMINGWAY e RANSON, 2000). Mais conhecido como mecanismo *knockdown resistance* (ou *kdr*), esse tipo de resistência a DDT e piretróides foi registrado para várias espécies (VAIS *et al.*, 2000). No entanto, é mais bem caracterizado em moscas domésticas, para as quais, diversas variantes de *kdr* são descritas inclusive o fator *super-kdr* (WILLIAMSON *et al.*, 1993). Por causa da resistência cruzada entre DDT e piretróides, ensaios biológicos que identificam resistência a ambas as classes de inseticidas podem ser úteis como um indicador de resistência do tipo *kdr* (BRAGA e VALLE, 2007).

No total, mais de 20 mutações foram descritas, associadas à resistência a piretróides (SODERLUND e KNIPPLE, 2003), todas encontradas no domínio II do canal de sódio de

mosquitos vetores como, *Culex pipiens* e *A. gambiae* do kenyan, com a mutação *Leu1014Ser* (MARTINEZ-TORRES *et al.*, 1999; RANSON *et al.*, 2000), porém, Chang *et al.*, em 2009, identificaram a ocorrência da mutação *Asp1794Tyr*, fora do domínio II, ocorrendo em conjunto com a mutação *Val1016Gly* descrita anteriormente em populações de *A. aegypti* da Ásia (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

Em *A. aegypti* foram identificadas as mutações *Ile1011Met* em populações do Nordeste e Sudeste do Brasil (MARTINS *et al.*, 2009), *Ile1011Met* associada à *Gly923Val* em populações de Belém/PA e em uma população do Vietnã com a substituição *Leu982Trp*, correlacionadas com menor suscetibilidade a piretróides (BRENGUES *et al.*, 2003).

Em populações da América Latina e da Tailândia além da *Ile1011Met*, foi também encontrada no mesmo sítio a alteração *Ile1011Val* (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; RAJATILEKA *et al.*, 2008), porém, sob pressão de seleção com piretróides não foi verificada a relação entre a resistência e a ocorrência de mutação (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

O sítio 1016 apresentou alteração 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 mostraram elevação drástica da frequência do alelo *1016Ile* em poucas gerações (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

## 2. JUSTIFICATIVA

### 2.1 RESISTÊNCIA DE *A. aegypti* AOS INSETICIDAS QUÍMICOS

Por mais de 30 anos e ainda hoje, o organofosforado temefós é o larvicida exclusivo usado no Brasil para o controle de *A. aegypti*. Com as epidemias de 1986, seu uso foi amplamente intensificado. Em pouco tempo, casos de resistência ao temefós em diversas regiões do Brasil começaram a surgir, levando à implantação de programas de monitoramento da suscetibilidade do mosquito aos inseticidas químicos (ANDRADE e MODOLO, 1991; CAMPOS e ANDRADE, 2001; POLANCZYK *et al.*, 2003; BRAGA *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2004; LUNA *et al.*, 2004). A existência de vetores resistentes a um determinado produto químico pode ocorrer como resultado de fatores genéticos e operacionais, entre outros. A resistência é uma característica genética que se insere numa população em função do uso de inseticidas. Ou seja, quanto mais o inseticida for utilizado, mais rápido e maior é a seleção de insetos resistentes na população e, conseqüentemente, maior o nível de resistência atingido. A capacidade dos insetos de tolerar concentrações inicialmente letais promove uma redução gradual na eficácia dos inseticidas, até a sua completa ineficiência. Os fatores operacionais também desempenham um importante papel na implantação da resistência. Estes estão relacionados ao uso de inseticidas (classe, formulação e concentração, método de aplicação, frequência de tratamentos, etc.) e por isso, podem ser perfeitamente controlados, fato que, na verdade, não ocorre devido ao uso indiscriminado dos produtos (CRUZ, 2002; CARVALHO *et al.*, 2004).

No processo de desenvolvimento de resistência pode ocorrer um fenômeno denominado de “resistência cruzada” (proteção contra mais de um inseticida por apenas um mecanismo de ação, comum entre inseticidas piretróides), onde toda a classe pode ficar comprometida. E, dependendo do mecanismo envolvido, a resistência a um determinado inseticida pode levar também ao estabelecimento de resistência aos inseticidas de outras classes, dificultando a substituição do produto. Os principais problemas quando ocorre suspeita de resistência são o emprego de maiores concentrações ou quantidade do composto, na tentativa de recuperar sua eficácia e o aumento da frequência de aplicação e substituição do produto. Além dessas ações serem ambientalmente negativas, não são eficazes no controle da expansão territorial dos insetos vetores (CRUZ, 2002).

Diante desse aumento da pressão de seleção, a OMS tem divulgado o problema e as formas de retardar os processos de resistência, além de padronizar os métodos de detecção e

vigilância desses processos. A detecção e o monitoramento de alteração da suscetibilidade em uma população de vetores podem ser realizados por ensaios biológicos, bioquímicos e moleculares. Os biológicos são importantes para detectar a alteração de resposta da população avaliada por meio das taxas de mortalidade obtidas nos ensaios; já os bioquímicos e os moleculares podem detectar os mecanismos de resistências envolvidos, o que permite determinar a resistência cruzada a vários inseticidas, facilitando a escolha dos inseticidas ou métodos alternativos (OMS, 1992).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o nível de suscetibilidade a inseticidas e sua relação com a presença de detoxificação enzimática e mutação *Kdr* (*Knockdown resistance*) em populações de *Aedes aegypti* de quatro bairros da cidade de Manaus, submetidas a bioensaios de resistência com os inseticidas temefós e deltametrina.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a suscetibilidade de larvas de *A. aegypti* de terceiro estágio final e quarto inicial ao larvicida temefós, em populações de quatro bairros da cidade de Manaus;

- Determinar a suscetibilidade de alados de *A. aegypti* ao inseticida deltametrina, em populações de quatro bairros da cidade de Manaus;

- Avaliar a atividade enzimática do gene das esterases, fosfoglicomutase, e hexoquinase, por meio de eletroforese de enzimas, em populações de quatro bairros da cidade de Manaus;

- Relacionar as atividades das enzimas com os níveis de suscetibilidade aos inseticidas, envolvidos no mecanismo de resistência;

- Amplificar a região codificadora do canal de sódio, sítio 1016 e verificar a presença ou não de mutação do tipo *Kdr* (*knockdown resistance*);

- Calcular a frequência alélica do gene *Kdr* em amostras da população natural e em amostras de indivíduos submetidos aos bioensaios;

- Relacionar a presença/ausência de mutação *Kdr* com a ocorrência ou não de populações resistentes.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ÁREA DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DOS BAIRROS ANALISADOS

Foram analisadas populações de mosquitos provenientes de quatro bairros do município de Manaus no Estado do Amazonas, tomando como base o Levantamento Rápido de Índice para *A. aegypti* (LIRAA) de 2010, fornecido pela Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas - FVS/AM.

A escolha dos bairros foi mediante aqueles que apresentaram os maiores índices do LIRAA por zona da cidade de Manaus, a saber: Alvorada I (zona Oeste); Coroado I (zona Leste); Monte das Oliveiras (Zona Norte) e Praça 14 de Janeiro (Zona Sul) (Figura 5).

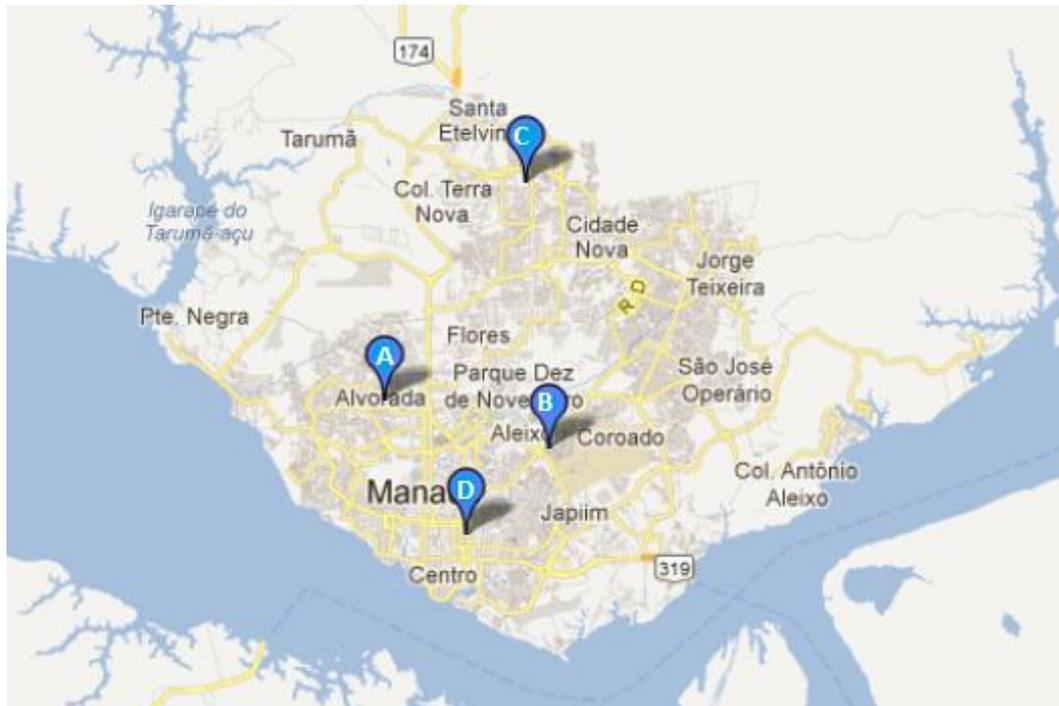


Figura 5: Bairros de Manaus: Alvorada I (A), Coroado I (B), Monte das Oliveiras (C), Praça 14 de Janeiro (D), onde foram realizadas as coletas (Fonte: google maps).

## 4.2 COLETAS E MANUTENÇÃO DAS COLÔNIAS DE *A. aegypti*

Ovos de *Aedes* spp. foram coletados utilizando ovitrampas (Figura 6a), que são armadilhas de oviposição, constituídas de recipientes escuros contendo paletas de Eucatex (Figura 6b) de 2 cm de largura por 12 cm de comprimento, presas ao suporte plástico com cliques, contendo infusão de Capim Colonião (*Panicum maximum*) a 10%, usado como atrativo de oviposição (REITER *et al.*, 1991). Mensalmente, 30 destas armadilhas foram distribuídas ao longo de toda extensão de cada bairro, no peri e intradomicílio das residências, lá permanecendo por um período de sete dias.

Após sete dias, as ovitrampas foram coletadas e levadas ao insetário da Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde- CPCS, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia- INPA, onde ficaram armazenadas em condições de temperatura ( $26\pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade ( $80\pm 10\%$ ) e fotoperíodo (12h:12h) controlados. Foi realizada a triagem das paletas para verificar presença/ausência de ovos e/ou larvas de mosquitos, com auxílio de uma lupa (Figura 6c). Três dias após a recepção das paletas (tempo necessário para o desenvolvimento embrionário), as mesmas foram postas em recipiente contendo água desclorada e ração para gatos WHISKAS<sup>®</sup> triturada, para induzir a eclosão das larvas.

As larvas obtidas foram transferidas para bacias esmaltadas, contendo água desclorada e ração triturada, cobertas com tecido de malha fina, preso com um elástico, contendo um furo preenchido por um chumaço de algodão para facilitar a alimentação e o acesso com capturador de Castro (Figura 6d). Estas receberam alimento e troca de água sempre que necessário, porém, ao atingirem o estágio de pupa, foram transferidas para um recipiente misto, consistindo de um compartimento inferior contendo água, ligado a um compartimento superior, amplo e telado, para abrigar os adultos recém-emergidos (Figura 6e). Após a emergência, os adultos foram identificados por meio da chave de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994) (Figura 6f e g) e separados em gaiolas confeccionadas com armação de madeira, coberta com telas (Figura 6h). Estas gaiolas foram identificadas com os nomes dos bairros selecionados e utilizadas para acondicionar os adultos de *A. aegypti*. Nessas gaiolas com capacidade para acomodar cerca de 250 casais, foi oferecida solução de sacarose a 10% para alimentação contínua dos machos e fêmeas. O repasto sanguíneo das fêmeas foi realizado uma vez por semana em um hamster (*Mesocricetus auratus*) anestesiado. No interior das gaiolas, em condições ótimas de temperatura ( $\pm 26^\circ\text{C}$ ) e luminosidade, os cruzamentos ocorreram espontaneamente. Após cerca de três dias do repasto sanguíneo,

foram colocados pequenos copos descartáveis contendo papel filtro umedecido em seu interior para receberem as oviposições, permanecendo na gaiola por três dias. Após este período, os copos contendo as desovas, geração F1, (Figura 6i) foram então retirados das gaiolas juntamente com a solução açucarada, antecedendo o repasto sanguíneo seguinte. Este procedimento foi realizado repetidas vezes até que se obtivesse a quantidade necessária de ovos a serem utilizadas nos testes com inseticida.

Os testes foram realizados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Laboratório de Bioensaios, Casa 15, em sala com temperatura controlada, variando de 26,1 °C a 27,2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Nos testes, a cepa referência de suscetibilidade (Rockefeller) foi utilizada para comparação das mortalidades obtidas.

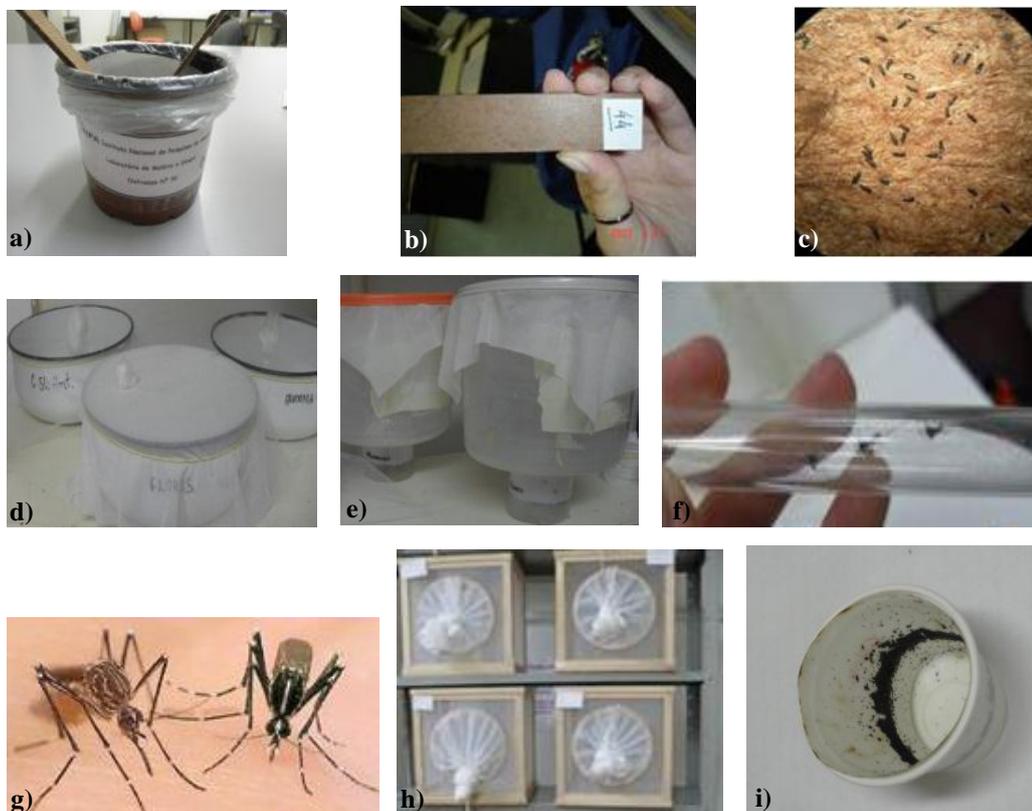


Figura 6: a) Ovitrapas; b) Identificação das palhetas; c) Visualização dos ovos nas palhetas; d) Bacias para criação das larvas; e) Recipiente misto, para emergência dos adultos; f) e g) Identificação dos adultos quanto à espécie; h) Acondicionamento dos adultos em gaiolas; i) Copo contendo desovas F1. Fonte: Fotos b, c, f, g (PICCOLI, 2010).

### 4.3 BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE

#### 4.3.1 Bioensaio com temefós, formulação ABATE 1G (Fersol®)

As larvas de mosquitos da geração F1 foram submetidas a diferentes doses do larvicida, categorizadas em: superbaixa, baixa, mediana, dose diagnóstica e superdose, correspondendo a 0,0015 mg/L, 0,003 mg/L, 0,006 mg/L, 0,012 mg/L e 0,024 mg/L, de temefós formulação ABATE 1G (Fersol®), respectivamente.

Este larvicida tem sido utilizado segundo orientações das Diretrizes Nacionais do Programa Nacional de Controle da Dengue – PNCD, porém em muitos Estados brasileiros vem sendo substituído por inibidores de crescimento devido o desenvolvimento de resistência a esta classe de inseticidas (BRAGA e VALLE, 2007b).

Após 24 horas de exposição, a mortalidade foi verificada, sendo as populações do campo testadas em paralelo com a linhagem de referência Rockefeller, 100% susceptível. Avaliaram-se os resultados em porcentagem de mortalidade, seguindo o critério da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1976) na interpretação do padrão de susceptibilidade: maior ou igual a 98% - população susceptível; de 80 a 98% - verificação da resistência; e menor ou igual a 80% - população resistente.

#### 4.3.2 Bioensaio com temefós grau técnico

Para realização de ensaios de avaliação de suscetibilidade padronizados é empregado em laboratórios de referência nacional, para o monitoramento de resistência a inseticidas em insetos vetores, o larvicida temefós grau técnico, segundo orientações das Diretrizes do Programa Nacional de Controle da Dengue – PNCD, cujas instruções são preconizadas pela Organização Mundial de Saúde – OMS (BRAGA e VALLE, 2007b).

Avaliaram-se os resultados de mortalidade em porcentagem, conforme o critério da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1976) na interpretação do padrão de susceptibilidade: maior ou igual a 98% - população susceptível; de 80 a 98% - verificação da resistência; e menor ou igual a 80% - população resistente.

A análise de próbite dos resultados obtidos geraram como resultados as  $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$ ,  $RR_{50}$  e  $RR_{90}$ , que são as concentrações capazes de matar 50 e 90 % dos indivíduos expostos, e as razões de resistência 50 e 90, respectivamente. Estas últimas indicam quantas vezes mais resistentes são as populações do campo em relação à linhagem susceptível, Rockefeller.

#### 4.3.2.2 Bioensaios dose-resposta

Larvas de mosquitos da geração F1 de cada população, inclusive da população suscetível, foram expostas a uma série de concentrações do larvicida temefós de modo a delimitar as concentrações a serem utilizadas para detecção, por meio de análise de próbite, das  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  com o *software* POLO-PC (1987).

Foram utilizadas soluções com concentrações de 3, 6, 9, 12, 15 e 18 mg/L, preparadas diariamente, obtidas a partir de uma solução estoque de temefós com concentração de 3000 mg/L, preparada mensalmente, tomando-se o cuidado de não utilizar quantidades inferiores a 50  $\mu$ L, nem superiores a 600  $\mu$ L de solução inseticida. Nos controles foi empregado apenas etanol P.A., que é utilizado como solvente do larvicida.

Para realização dos ensaios preliminares de delimitação das doses foi construído um quadro contendo a solução e o volume correspondente a determinada concentração, de modo a facilitar a escolha das doses a serem testadas, tomando-se o cuidado de selecionar entre as concentrações, apenas as que não se repetissem, para então escolher a solução ou soluções a serem utilizadas (Figura 7).

Solução	Volume em microlitros ( $\mu$ L)											
[mg/L]	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
3	0,0015	0,003	0,0045	0,006	0,0075	0,009	0,0105	0,012	0,0135	0,015	0,0165	0,018
6	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,021	0,024	0,027	0,03	0,033	0,036
9	0,0045	0,009	0,0135	0,018	0,0225	0,027	0,0315	0,036	0,0405	0,045	0,0495	0,054
12	0,006	0,012	0,018	0,024	0,03	0,036	0,042	0,048	0,054	0,06	0,066	0,072
15	0,0075	0,015	0,0225	0,03	0,0375	0,045	0,0525	0,06	0,0675	0,075	0,0825	0,09
18	0,009	0,018	0,027	0,036	0,045	0,054	0,063	0,072	0,081	0,09	0,099	0,108

Figura 7: Soluções de uso (temefós) e suas respectivas concentrações.

A submissão das larvas a diferentes doses do larvicida tem como objetivo selecionar doses capazes de causar mortalidade abaixo de 10% ( $CL_{10}$ ), maiores e menores que 50% ( $CL_{50}$ ) e próxima de 99% ( $CL_{99}$ ), realizadas no teste preliminar.

Dessa maneira, a população suscetível foi exposta a diferentes quantidades da solução de 3 mg/L, que representa as concentrações mais baixas, devido a suscetibilidade característica da linhagem Rockefeller. Estas quantidades variaram de 50 a 230  $\mu$ L, por estarem abaixo da dose diagnóstica descrita pela OMS (WHO, 1981).

As populações Alvorada I, Coroado I, Monte das Oliveiras e Praça 14, foram submetidas às soluções com concentração de 12 mg/L e 18mg/L, com volumes que variaram de 50 a 600 µL da solução, visto que abrangem grande parte das concentrações a serem testadas.

Tanto na realização dos ensaios preliminares, quanto na realização dos bioensaios com as doses já estabelecidas, foram utilizados lotes de 20 larvas, dispostos em pequenos beckeres graduados, contendo água desclorada com volume final de 20 mL, transferidos para copos descartáveis de 50 mL. Após esta seleção as larvas ficaram em repouso por 30 minutos para verificar se houve alguma injúria durante a manipulação.

Seguidamente, partiu-se para o preparo das concentrações a serem usadas. Para cada concentração foram utilizadas quatro réplicas com 20 larvas cada, totalizando 80 larvas expostas por concentração, caracterizando um teste completo.

A análise da suscetibilidade de uma população requer a realização de no mínimo três testes completos, realizados em dias diferentes, para garantir reprodutibilidade dos resultados.

Mediante a taxa de mortalidade observada no ensaio preliminar, foram utilizadas as seguintes soluções para cada população: Rockefeller (3 mg/L); Alvorada I (12 mg/L); Coroado I (12 e 15 mg/L); Monte das Oliveiras (12 mg/L) e Praça 14 (12 e 18 mg/L).

A ordem de preparo das concentrações e homogeneização das mesmas foi da mais diluída para a mais concentrada; sendo pipetados quantidades da solução de trabalho de 3, 6, 9, 12, 15 e 18 mg/L de temefós, representantes de diferentes concentrações. Estas quantidades foram depositadas em copos descartáveis (capacidade 180 mL), contendo 80 mL de água desclorada. Destes copos, dependendo da quantidade da solução usada, foram retiradas alíquotas de água, correspondente ao maior volume a ser utilizado de solução inseticida no bioensaio. Após a retirada das alíquotas de água, foram adicionados quantidades de etanol P.A., suficientes para que, somando ao volume da solução inseticida correspondessem ao maior volume de inseticida utilizado no bioensaio, mantendo o volume de 80 mL.

Após o preparo, as soluções foram agitadas vigorosamente, por 30 segundos, com bastão de vidro e após 15-30 minutos do preparo, as larvas (lotes com 20 larvas), dispostas em copos descartáveis, totalizando o volume final de 20 mL, foram adicionadas ao copo contendo a solução inseticida, de modo a não ultrapassar o volume máximo de 100 mL.

Após um período de 24 horas, foram feitas as contagens da mortalidade e análise de próbite com o *software* POLO-PC (1987).

Como critério para avaliação, larvas moribundas e mortas foram contabilizadas, consideradas mortas àquelas que não se moviam quando espetadas por uma agulha no sifão

ou região cervical, e, moribundas, aquelas incapazes de subir à superfície (dentro de um período razoável de tempo) ou se mover quando na agitação da água, podendo também mostrar descolorações, posições anormais, tremores, incordenação motora ou rigor.

Larvas que passaram ao estágio de pupa, durante o teste, foram descartadas, portanto não contabilizadas. Porém, se mais que 10 % das larvas pertencentes ao grupo controle empupassem durante o experimento, o teste deveria então ser descartado. Testes com mortalidade de 20 % ou mais para o grupo controle são considerados insatisfatórios e devem ser repetidos. Foram realizadas três repetições para cada população de larvas de mosquitos, e os dados utilizados para construção de uma linha-base de suscetibilidade. Se a mortalidade do controle estiver entre 5 % e 20 %, o percentual de mortalidade deve ser corrigido pela Fórmula de Abbott (1925):

$$\frac{\% \text{ mortalidade do teste} - \% \text{ mortalidade do controle}}{100 - \% \text{ mortalidade do controle}} \times 100$$

Após os bioensaios, as larvas mortas foram desprezadas. Os indivíduos sobreviventes foram imediatamente congelados e armazenados em freezer a -80 °C para verificação posterior da atividade enzimática.

#### 4.4 BIOENSAIO COM DELTAMETRINA

Foram realizados bioensaios utilizando garrafas impregnadas com inseticida deltametrina, seguindo a metodologia descrita por Brogdon e McAllister (1998), com modificações feitas por Pereira-da-Cunha *et al.* (2005).

A determinação da suscetibilidade de fêmeas de *A. aegypti* do campo submetidas ao inseticida deltametrina, foi realizada mediante a uma calibração prévia do bioensaio com garrafas impregnadas com o inseticida, utilizando fêmeas da linhagem Rockefeller, que foram expostas a quantidades diferentes de deltametrina impregnada em garrafas de vidro, com leitura de mortalidade a cada 15 minutos durante duas horas, ou até que todas estivessem mortas, de modo a encontrar a dose diagnóstica, que é a menor dose capaz de matar 100% dos mosquitos no menor tempo.

Após o estabelecimento da dose diagnóstica, procedeu-se o preparo das garrafas de teste. Foram utilizadas garrafas de vidro de 250 ml (Figura 8), impregnadas com 1,0 ml de solução, contendo 5µg de deltametrina, dose diagnóstica para a cepa Rockefeller, diluída em acetona (50µl de solução, contendo deltametrina na concentração de 0,01% e 950µl de acetona) (WHO, 1998).

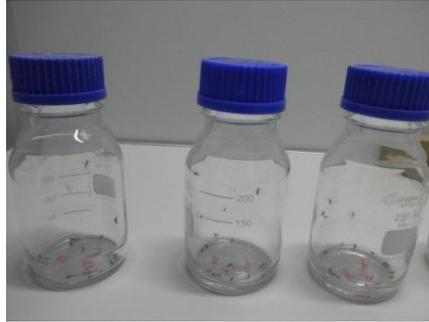


Figura 8: Garrafas para testes com inseticidas.

A garrafa controle foi impregnada apenas com 1,0 ml de acetona. Em cada garrafa foram colocadas 20 fêmeas não alimentadas com sangue, da geração F1, com 1 a 2 dias de idade, contados a partir da emergência do adulto. A mortalidade foi registrada em intervalos regulares de 15 minutos, durante duas horas. Para excluir o efeito *knockdown* (efeito reversivo após término do contato com o inseticida), no final do período de exposição, os mosquitos foram transferidos para gaiolas de recuperação livres do inseticida; sendo a última avaliação realizada 24 horas após o início do teste. Os testes foram realizados em triplicata utilizando o inseticida deltametrina.

O critério de leitura para os testes foi o mesmo proposto por Brogdon e McAllister (1998), o qual define como mortos, os mosquitos incapazes de voar ou se recuperar, enquanto a garrafa é levemente balançada.

Como critério para avaliação das mortalidades, valores obtidos para as populações de campo foram comparados com a cepa referência de suscetibilidade (Rockefeller). Nos casos em que a mortalidade aferida esteve acima de 98%, a população testada foi considerada suscetível e abaixo de 80%, resistente. Valores entre 80% e 98% caracterizam alterações da suscetibilidade e necessidade de vigilância da população (BROGDON e MCALLISTER, 1998; PEREIRA-DA-CUNHA *et al.*, 2005).

Paralelo ao ensaio com a dose diagnóstica, ao qual é atribuído o *status* de resistência, foi realizado um ensaio de dose-resposta, no qual as populações são submetidas a várias concentrações e as suas respostas analisadas por meio da análise de próbit, visando estabelecer as concentrações letais  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ , bem como a razão de resistência (RR), obtida mediante divisão do valor da  $CL_{50}$  das populações resistentes, pela  $CL_{50}$  da linhagem suscetível Rockefeller, podendo ser caracterizada em: baixo nível de resistência, quando  $<5$ , resistência moderada, entre 5-10 e alto nível de resistência, se for  $>10$  (MAZZARRI e GEORGHIOU, 1995).

Os resultados obtidos dos bioensaios foram submetidos à análise de próbite, utilizando o *software* POLO-PC (1987).

## 4.5 ANÁLISES ISOENZIMÁTICAS

### 4.5.1 Preparo dos suportes e das amostras

Nas análises isoenzimáticas, foi utilizado o sistema horizontal (CONTEL *et al.*, 1984) com dois tipos de suporte de fracionamento: acrilamida e amido-agarose em tampão apropriado.

Os géis de acrilamida foram preparados na concentração de 7%, dissolvidos em 200 mL de tampão específico. Colocado sobre placa de vidro (30 cm x 20 cm), previamente montada.

Os géis de amido-agarose foram preparados na concentração de 2% e 1 % respectivamente, em tampão específico. O amido e a agarose foram cozidos separadamente, em 50 mL de tampão cada, até a fervura, quando então foi desaerado e colocado sobre placa de vidro (22 cm x 15 cm), previamente montada e após 20 minutos em temperatura ambiente, o gel ficou pronto para receber as amostras.

A eletroforese para todos os sistemas foi processada a uma temperatura de mais ou menos 4 °C por aproximadamente 5 horas a 120 volts, até que fosse obtida uma linha de frente de 10 centímetros do ponto de aplicação das amostras.

Nos estudos isoenzimáticos, foram utilizadas as larvas provenientes dos bioensaios com inseticidas. Foram homogeneizados individualmente em placas escavadas de porcelana sobre gelo, com auxílio de um bastão de vidro, utilizando-se 15 µl de 2-β - mercaptoetanol a 0,5% a fim de impedir a oxidação do material e, conseqüentemente, a perda da atividade enzimática. Após a homogeneização, foram colocados sobre a placa escavada contendo as amostras, pedaços de papel fino ("yes"), medindo aproximadamente 1,5 cm x 1,5 cm e, sobre esses, papel de filtro Whatman nº 3 (2 mm x 5 mm), os quais foram embebidos nas amostras e, posteriormente, inseridos verticalmente no gel. O papel fino teve a função de impedir a passagem de resíduos do extrato das amostras para o papel de filtro, possibilitando melhor separação das bandas eletroforéticas.

As colorações foram feitas diretamente sobre os géis, que após serem corados, foram incubados em estufa a 37 °C, até a revelação das zonas de atividade enzimática. Em seguida, lavados, fixados em solução de ácido acético glacial, etanol e água destilada na proporção de 1:5:5, fotografados e interpretadas as suas leituras.

## 4.5.2 Sistemas enzimáticos

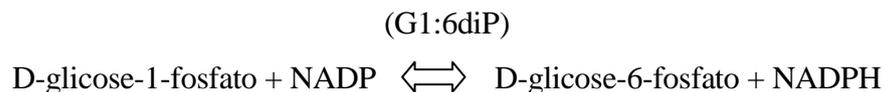
### 4.5.2.1 Esterases (E.C.3.1.1.1)

As esterases são enzimas que hidrolisam ligações do tipo éster. Em seu estudo foi utilizado gel de acrilamida (7%), preparado com tampão Tris-Citrato (tris - 0,017 M, ácido cítrico - 0,0023 M) pH 8,0. Nas cubas foi empregado o tampão Borato (ácido bórico 0,3 M) pH 8,0 (SANTOS, 1992). As pontes entre os eletrodos e o gel foram feitas com pano fino (Perfex), dobrado em quatro partes iguais.

A atividade das regiões esterásicas foram reveladas na superfície do gel, mergulhada em uma mistura de 40 mg do corante Fast Blue RR Salt, dissolvidos em 100 ml de tampão Fosfato (fosfato de sódio monobásico 0,05 M) pH 6,5 e adicionados 4 ml da solução estoque do substrato  $\alpha$ -naftil acetato (0,5 g do éster dissolvido em 25 ml de acetona P.A. e 25 ml de água destilada) e incubado em estufa a 37 °C, até a revelação das zonas de atividade.

### 4.5.2.2 Fosfoglicomutase (E.C.5.4.2.2)

A fosfoglicomutase é uma transferase, mais especificamente, uma fosfotransferase, que catalisa a seguinte reação:



Para a análise da fosfoglicomutase foi empregado gel de amido-agarose, 2% e 1% respectivamente. Nas cubas foi utilizado tampão TEMM (Tris 0,1 M, anidrido maléico 0,1 M, EDTA 0,01 M e MgCl<sub>2</sub> 0,01 M) pH 7,4 e no gel, este mesmo tampão diluído de 1:15 em água deionizada (LIMA, 1989; SANTOS, 1992).

Para a observação da atividade dessa enzima, a coloração foi composta de 35 mg do substrato  $\alpha$ -D-glicose-1-fosfato, 10 ml de tampão Tris-MgCl<sub>2</sub> (Tris 0,1 M e MgCl<sub>2</sub> 0,02 M) pH 8,0, 5 mg de NADP, 10  $\mu$ l de glicose-6-fosfato desidrogenase (170 unidades/mg de proteína), 1 ml de MTT, 1 ml de PMS e 10 ml de ágar a 2% . Em seguida o gel foi incubado a 37 °C, até a visualização das bandas.

#### 4.5.2.3 Hexoquinase (E.C.2.7.1.1)

A hexoquinase é uma transferase que catalisa a seguinte reação:



Na análise dessa enzima foi utilizado o gel de acrilamida 7%. Para a observação das zonas de atividade, foi empregada a coloração composta de 50 mg de  $\alpha$ -D(+)-glicose, 35 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, 1 ml de  $\text{MgCl}_2$  0,1 M, 5 mg de NADP, 40 mg de ATP, 10  $\mu\text{l}$  de glicose-6-fosfato desidrogenase (500 unidades/mg de proteína), 1 ml de MTT, 0,5 ml de PMS (STEINER e JOSLYN, 1979). Incubado em estufa a 37 °C, até a visualização das bandas.

#### 4.6 ANÁLISE GENÉTICA DA MUTAÇÃO *Kdr (Val1016Ile)* NO CANAL DE SÓDIO

A amplificação do sítio 1016 do canal de sódio de populações de *A. aegypti* da América Latina tem demonstrado alterações na sequência de aminoácidos, sendo considerado selvagem, o alelo valina (*Val*), e mutante, o alelo isoleucina (*Ile*), sendo, portanto, chamada de alteração *Val1016Ile*, que sob pressão de seleção em laboratório sobre populações de Cuba e do México mostraram elevação drástica da frequência do alelo *1016Ile*, mutante, em poucas gerações (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

Para verificar a presença ou não da mutação *Val1016Ile*, foram utilizados trinta indivíduos resistentes das quatro populações de *A. aegypti* da cidade de Manaus, previamente selecionados pelos bioensaios. Paralelamente, foram analisados 30 indivíduos de cada população, não selecionados por meio de bioensaios, de modo a aferir a frequência da mutação em populações naturais.

A extração de DNA de todos os indivíduos utilizados nas análises moleculares seguiu o protocolo de Wilkerson *et al.* (1995). Um fragmento de 98 pb de DNA genômico foi amplificado em um volume total de 12  $\mu\text{L}$ , contendo tampão 10X, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs, 0,24  $\mu\text{M}$  do *primer reverse* (5' GGA TGA ACC GAA ATT GGA CAA AAG C 3'), 0,12  $\mu\text{M}$  do *primer forward Val* (5' GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCA CAA ATT GTT TCC CAC CCG CAC CGG 3'), 0,12  $\mu\text{M}$  do *primer forward Ile* (5' GCG GGC ACA AAT TGT TTC CCA CCC GCA CTG A 3'), como descrito por Saaverdra-Rodriguez

*et al.* (2007), 0,5 µL de DNA genômico e 0,025 U/ µL de Taq Polimerase. A PCR foi realizada em termociclador Eppendorf sob as seguintes condições: 3 minutos a 95 °C, seguidos por 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 40 segundos a 61 °C e 45 segundos a 72 °C, com uma extensão final por 5 minutos a 72 °C.

O resultado da reação foi visualizado em gel de acrilamida 10% e o tamanho do fragmento amplificado estimado por comparação ao marcador *Ladder (Ultra Low Range – Fermentas)*, corado com gel *red*, misturado ao tampão de carregamento (4 µL), inserido no gel juntamente com a PCR, na proporção 1:1. Os genótipos obtidos foram também comparados com os DNA controles (positivo e negativo) para caracterização da mutação *Val1016Ile*, cedidos pela FIOCRUZ-RJ.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos testes com inseticidas foram submetidos à análise de próbite, utilizando o *software* POLO-PC, de modo a encontrar as CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> (1987).

Os perfis eletroforéticos foram analisados baseados nas atividades isoenzimáticas observadas nas amostras das populações tratadas e não tratadas com inseticida/larvicida. Considerando que não houve diferença significativa entre as amostras naturais e as oriundas de bioensaios com inseticida/larvicida, não foi possível calcular as frequências dos alelos nessas populações.

Os dados das análises moleculares do gene *Kdr*, tanto das populações naturais quanto das selecionadas pelos bioensaios, foram analisados através do programa estatístico TFPGA (MILLER, 1997) e POPGENE versão 1.3 (YEH *et al.*, 1999). Foi utilizado também o teste de qui-quadrado para verificar se as frequências genotípicas estão de acordo com o modelo de equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, calculado pelos mesmos programas.

##### 4.7.1 Análise da variabilidade genética das populações de *A. aegypti*

Os resultados das genotipagens foram analisados no programa TFPGA e POPGENE versão 1.3 (YEH *et al.*, 1999) para a visualização do padrão dos alelos. Os genótipos das quatro populações foram inseridos em uma matriz para a formação do banco de dados desses programas para calcular a heterozigosidade observada (H<sub>o</sub>) e esperada (H<sub>e</sub>), valores de qui-quadrado para o equilíbrio de *Hard-Weinberg* e os níveis de significância.

#### 4.7.2 Estrutura genética das populações de *A. aegypti*

As estatísticas  $F$  de Wright (WRIGHT, 1951) foram calculadas nos programas POPGENE e confirmada com o programa TFGA (MILLER, 1997). Nestes mesmos programas, foram calculadas a distância de Nei (1978) e a identidade genética, realizada para verificar o grau de diferenciação genética entre as duas populações estudadas, com base nos valores de  $F_{st}$ .

A partir do valor de  $F_{st}$ , foi verificada a existência de estrutura genética entre as populações, onde atribui os indivíduos a um número  $K$  de populações assumindo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* dentro de cada população.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE LARVAS DE *A. aegypti*

#### 5.1.1 Bioensaio com temefós formulação ABATE 1G (Fersol<sup>®</sup>)

Quando submetidas às diferentes concentrações de larvicida temefós, formulação ABATE 1G (Fersol<sup>®</sup>), a linhagem suscetível apresentou taxas de mortalidade, 32%, 66,67% e 96,47%, nas concentrações superbaixa, baixa e mediana, respectivamente, e 100% de mortalidade na dose diagnóstica e na superdose, estando, portanto, a população sensível Rockefeller, de acordo com a definição de dose diagnóstica da WHO (1981), onde afirma ser a menor dose capaz de matar 100% dos indivíduos de uma linhagem suscetível (Figura 9).

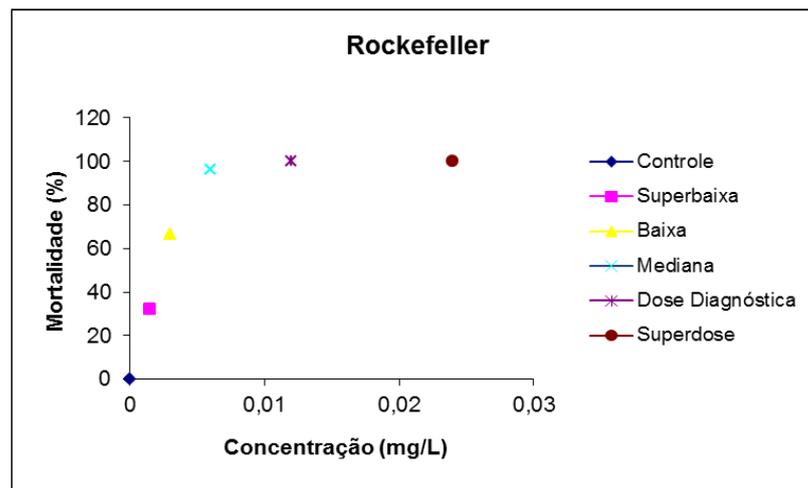


Figura 9: dose-resposta de larvas de *A. aegypti*, da linhagem Rockefeller, submetidas a diferentes concentrações do larvicida temefós, formulação ABATE 1G, após 24 horas de exposição.

Larvas da população Alvorada I também submetidas a diferentes concentrações do ABATE 1G, não mostrou mortalidade alguma nas doses superbaixa e baixa, no entanto, nas doses mediana e diagnóstica houve mortalidade de 5%, e na superdose a mortalidade foi de 21,25% (Figura 10).

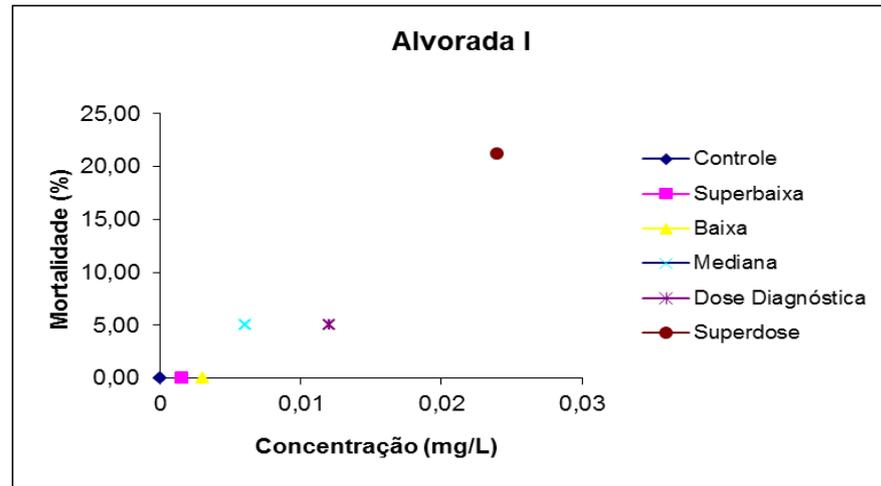


Figura 10: dose-resposta de larvas *de A. aegypti*, da população Alvorada I, submetidas a diferentes concentrações do larvicida temefós, formulação ABATE 1G, após 24 horas de exposição.

Na população Coroado I, não houve mortalidade, quando submetida a dose superbaixa do ABATE 1G, porém, ao ser submetida às doses de concentração baixa, mediana, diagnóstica e superdose, as taxas de mortalidade foram: 7,69%, 12,66%, 35% e 56,41%, respectivamente (Figura 11).

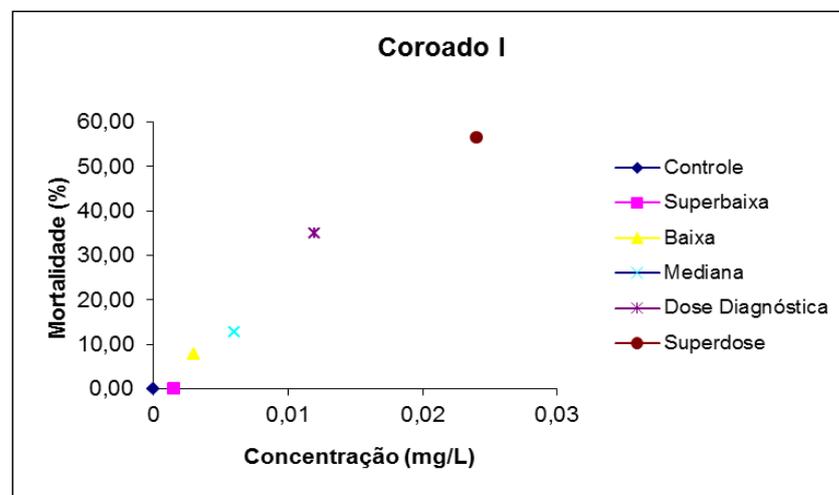


Figura 11: dose-resposta de larvas *de A. aegypti*, da população Coroado I, submetidas a diferentes concentrações do larvicida temefós, formulação ABATE 1G, após 24 horas de exposição.

As taxas de mortalidade da população Monte das Oliveiras, após ser submetida às doses superbaixa, baixa, mediana, diagnóstica e superdose foram: 1,28%, 9,21%, 23,08%, 37,5% e 72,5%, respectivamente (Figura 12).

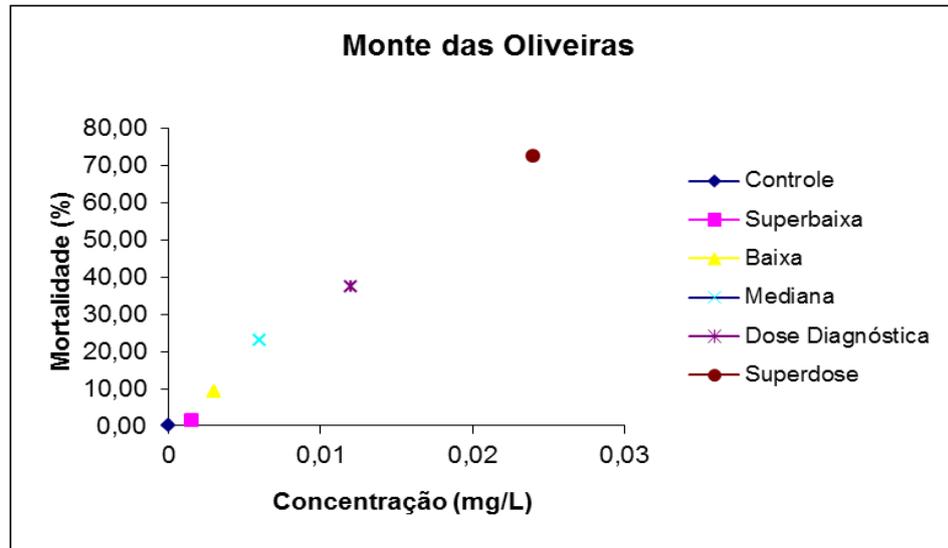


Figura 12: dose-resposta de larvas de *A. aegypti* da população Monte das Oliveiras, submetidas a diferentes concentrações do larvicida temefós, formulação ABATE 1G, após 24 horas de exposição.

Os resultados do bioensaio obtidos na população Praça 14 de Janeiro, após ser submetida a diferentes concentrações do ABATE 1G, tiveram que ser corrigidos pela fórmula de Abbott, por apresentarem 5% de mortalidade no controle.

Assim, as taxas de mortalidade observadas para as doses: superbaixa, baixa e mediana, foram excluídas por apresentarem valores negativos, ficando as doses diagnóstica e superdose, com 12,74% e 77,63% de mortalidade, respectivamente (Figura 13).

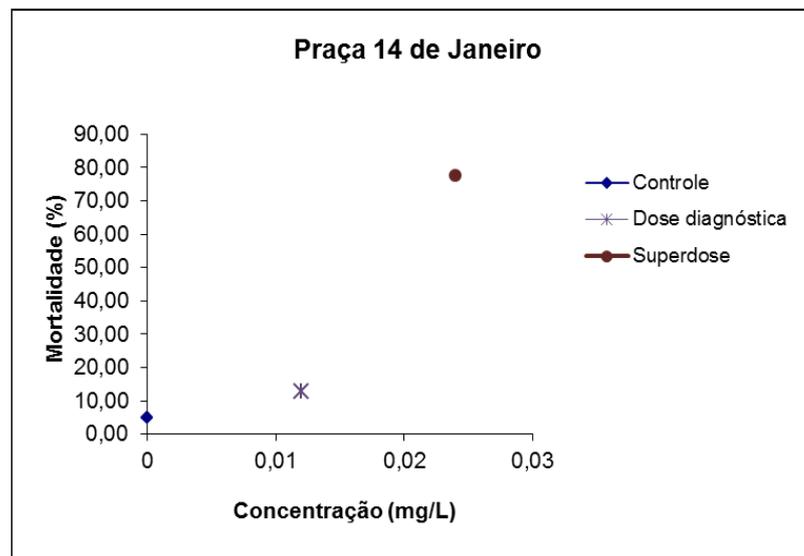


Figura 13: Ensaio dose-resposta com larvas de *A. aegypti*, da população Praça 14 de Janeiro, submetidas a diferentes concentrações do larvicida temefós, formulação ABATE 1G, após 24 horas de exposição, corrigidos pela fórmula de Abbott, constando apenas o controle, dose diagnóstica e superdose.

A partir da obtenção das taxas de mortalidade das populações, submetidas à diferentes concentrações, foi feita a comparação entre elas, usando como critério a mortalidade na dose e tempo diagnóstico, indicada pela linha pontilhada (Figura 14).

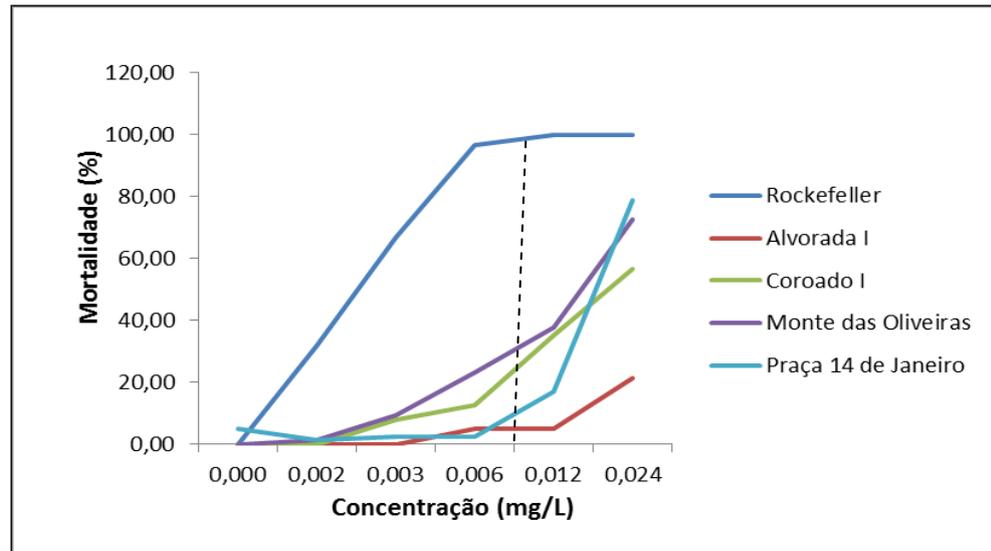


Figura 14: Comparação das doses-respostas de larvas *de A. aegypti*, das populações Rockefeller, Alvorada I, Coroadó I, Monte das Oliveiras e Praça 14, submetidas a diferentes concentrações do larvicida temefós, formulação ABATE 1G, após 24 horas de exposição.

Com base na mortalidade observada, as populações foram caracterizadas quanto ao *status* de suscetibilidade (Tabela 1), sendo que todas as populações do campo foram consideradas resistentes, com taxas de mortalidade que variaram de 5% a 37,5%, na Alvorada I e Monte das Oliveiras, respectivamente.

Tabela 1: *Status* da suscetibilidade das populações *de A. aegypti* submetidas aos bioensaios com ABATE 1G (dose-diagnóstica=0,012mg/L).

População	N	Mortalidade (%)	<i>Status</i>
Rockefeller	76	100,00	Suscetível
Alvorada I	80	5,00	Resistente
Coroadó I	80	35,00	Resistente
Monte das Oliveiras	80	37,50	Resistente
Praça 14 de Janeiro	76	12,74	Resistente

### 5.1.2 Bioensaio com temefós grau técnico

Mediante respostas obtidas nos ensaios de dose-resposta, foram obtidas as  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  para todas as populações, sendo que a população Alvorada I apresentou os maiores valores tanto para uma, quanto para outra. O menor valor calculado para  $CL_{50}$  foi observado na linhagem Rockefeller (0,0282), já para  $CL_{90}$ , o menor valor foi para população Monte das Oliveiras (0,0735).

Com base nas concentrações letais encontradas e razões de resistência calculadas (Tabela 2), as populações foram categorizadas, segundo critérios de Mazzarri e Georghiou (1995), dispostas em ordem crescente de razão de resistência. Estando, portanto, as populações Monte das Oliveiras, Praça 14 de Janeiro e Coroado I, classificadas como baixo nível de resistência e a população Alvorada I, com alto nível de resistência.

Tabela 2: Valores de  $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$ ,  $RR_{50}$  e  $RR_{90}$ , obtidos mediante análise de próbite para as populações de *A. aegypti* submetidas aos bioensaios com temefós.

<b>Localidade</b>	<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>CL<sub>90</sub></b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>RR<sub>50</sub></b>	<b>Nível de Resistência</b>
Rockefeller	0,0282	0,1675	1,53	-	Suscetível
Alvorada I	0,5421	1,9166	3,65	19,22	Alto nível de resistência
Coroado I	0,0787	0,3115	10,94	2,79	Baixo nível de resistência
Monte das Oliveiras	0,0499	0,0735	0,82	1,76	Baixo nível de resistência
Praça 14 de Janeiro	0,0945	0,2115	7,77	3,35	Baixo nível de resistência

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE MOSQUITOS ADULTOS *A. aegypti* SUBMETIDOS AO INSETICIDA DELTAMETRINA, EM POPULAÇÕES DE MANAUS

Na calibração do experimento foram empregadas doses que variaram de 2 µg a 30 µg. A menor dose testada (2 µg), resultou em 100% de mortalidade dos indivíduos em 45 minutos.

Para diminuir o tempo de mortalidade, a quantidade de inseticida impregnado foi aumentada gradativamente até uma dose bem elevada (30 µg), resultando em mortalidade total no tempo mínimo de 30 minutos, tempo diagnóstico, então a dose foi reduzida gradativamente, de modo a encontrar a menor dose capaz de matar 100% dos indivíduos testados em 30 minutos.

No caso da linhagem padrão de suscetibilidade (Rockefeller), a dose encontrada foi de 5µg de deltametrina/garrafa, similar à dose encontrada por Martins *et al.*(2009). Com base nestes dados foi construído um gráfico mostrando a redução do tempo de mortalidade, mediante aumento da concentração do inseticida (Figura 15), sendo que em determinado ponto, o aumento da dose não mais provoca redução do tempo, chamado ponto de saturação. A partir de então, houve a diminuição da concentração, até que se obtivesse 100% de mortalidade no menor tempo (30 minutos).

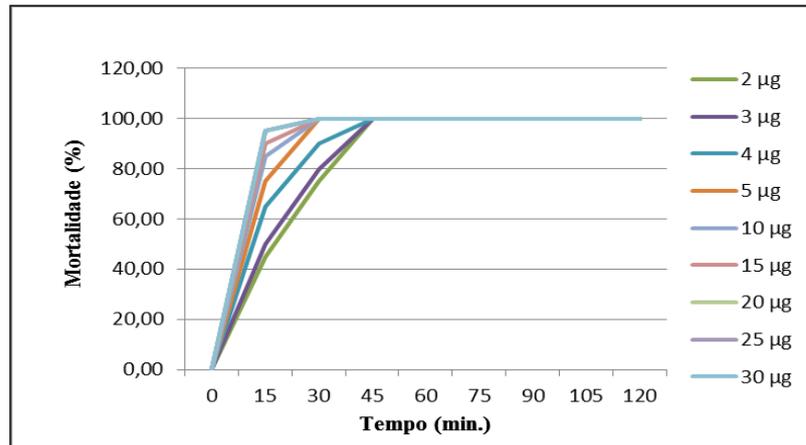


Figura 15: Calibração com a linhagem suscetível, Rockefeller *A. aegypti*, submetida ao bioensaio de garrafa com o inseticida deltametrina.

Indivíduos da população Alvorada I, quando submetidos a diferentes doses de deltametrina (1 µg, 3 µg, 5 µg, 7 µg e 9 µg) impregnadas nas garrafas, durante os 120 minutos de teste, apresentaram mortalidade máxima de 68,89%; quando submetidos à maior dose (9 µg), sendo que, após 24 horas (1.440 minutos), período de recuperação, em ambiente isento de inseticida, chegaram a apresentar mortalidade máxima de 85,19%. Durante o período de recuperação foi observado o aumento da mortalidade para todas as doses, não havendo, portanto, recuperação (Figura 16).

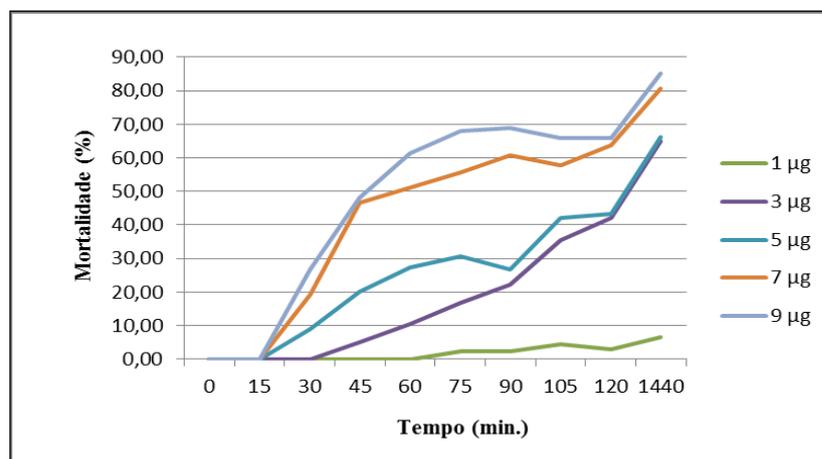


Figura 16: Taxas de mortalidade de indivíduos *A. aegypti* da população Alvorada I, submetidos aos bioensaios com deltametrina.

Indivíduos da população Coroadó I, quando submetidos a diferentes doses de deltametrina (1 µg, 3 µg, 5 µg, 7 µg e 9 µg), impregnadas nas garrafas, durante os 120 minutos de teste, apresentaram mortalidade máxima de 61,48%, na garrafa impregnada com a maior dose (9 µg), e outros valores de mortalidade inferiores, nas doses menores. Após 24

horas (1440 minutos), período de recuperação, passado em ambiente isento de inseticida, foi realizada nova aferição da taxa de mortalidade, visando identificar se houve alguma recuperação ou não. A taxa de mortalidade aferida em 1440 minutos aumentou, em relação à taxa aferida ao final da exposição ao inseticida deltametrina, que foi variável em cada dose testada, sendo as que apresentaram maiores valores de mortalidade foram as fêmeas expostas a 7 µg de deltametrina, com 83,7%.

Similar à resposta obtida da população Alvorada I, os indivíduos submetidos às doses 1 µg, 7 µg e 9 µg, apresentaram taxa de mortalidade aumentada, no entanto, com a dose de 3 µg, houve recuperação de 8,34% dos indivíduos considerados mortos ao final do tempo de exposição (120 minutos). Já para a dose de 5 µg, que é a dose diagnóstica, houve recuperação de 21,67% dos indivíduos (Figura 17).

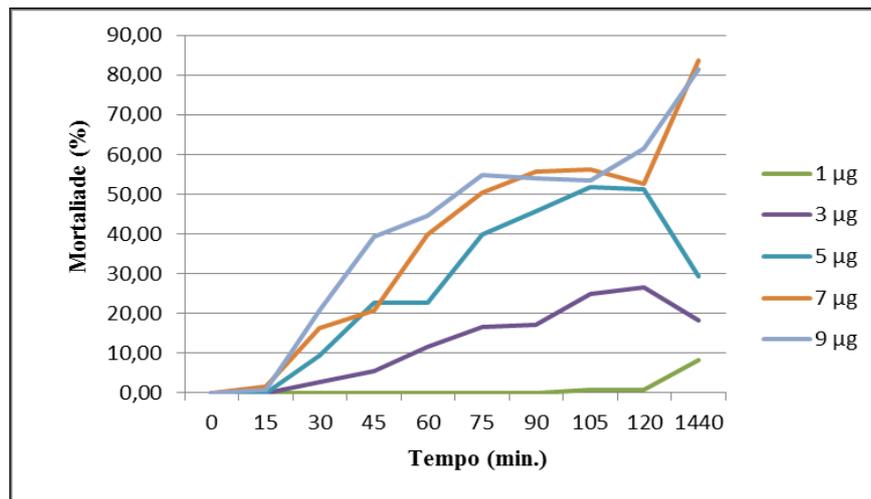


Figura 17: Taxas de mortalidade de indivíduos *A. aegypti*, da população Coroado I, submetidos aos bioensaios com deltametrina.

Indivíduos da população Monte das Oliveiras, quando submetidos a diferentes doses de deltametrina (1 µg, 5 µg, 7 µg e 9 µg) impregnadas nas garrafas, durante os 120 minutos de teste, apresentaram mortalidade máxima de 66,67%; quando submetidos à dose diagnóstica (5 µg), sendo que, após 24 horas (1440 minutos), período de recuperação, em ambiente isento de inseticida, as fêmeas que foram expostas à maior dose (9 µg) tiveram a taxa de mortalidade aumentada, chegando a apresentar mortalidade de 88,89%.

Com exceção às fêmeas que foram expostas à dose-diagnóstica (5 µg), todas os demais grupos de fêmeas tiveram a taxa de mortalidade aumentada após a recuperação. Após o período de recuperação, houve um aumento da taxa de mortalidade para as doses 1 µg, 7 µg

e 9  $\mu\text{g}$ , porém, na dose diagnóstica (5  $\mu\text{g}$ ), houve recuperação de 35% dos indivíduos testados (Figura 18).

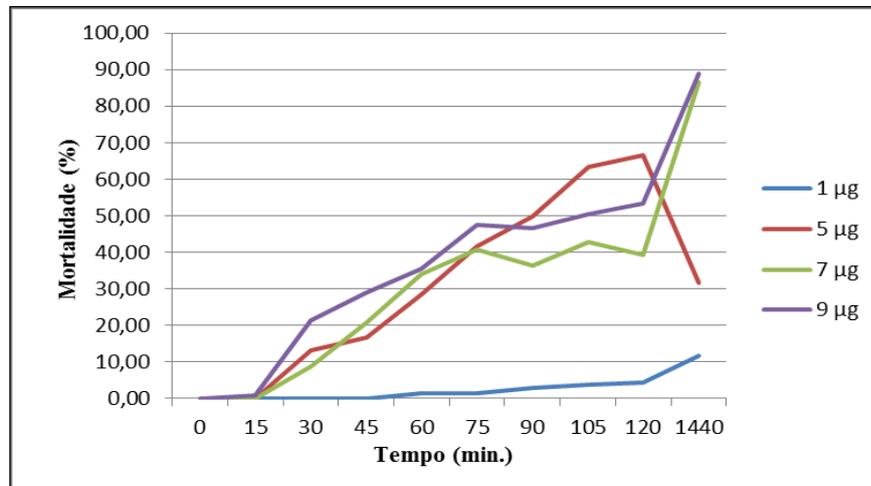


Figura 18: Taxas de mortalidade de indivíduos *A. aegypti*, da população Monte das Oliveiras, submetidos aos bioensaios com deltametrina.

Indivíduos da população Praça 14 de janeiro, quando submetidos a diferentes doses de deltametrina impregnada nas garrafas (1  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$ , 7  $\mu\text{g}$  e 9  $\mu\text{g}$ ), durante os 120 minutos de teste, apresentaram mortalidade máxima de 45,19%, correspondendo à maior dose impregnada (9  $\mu\text{g}$ ).

Após o período de recuperação, houve um aumento da taxa de mortalidade para as doses 1  $\mu\text{g}$ , 3  $\mu\text{g}$ , 7  $\mu\text{g}$  e 9  $\mu\text{g}$ , chegando a apresentar mortalidade máxima de 68,89%, no grupo exposto a 7  $\mu\text{g}$ , porém, na dose diagnóstica, 5  $\mu\text{g}$ , houve recuperação de 2,78% dos indivíduos testados (Figura 19).

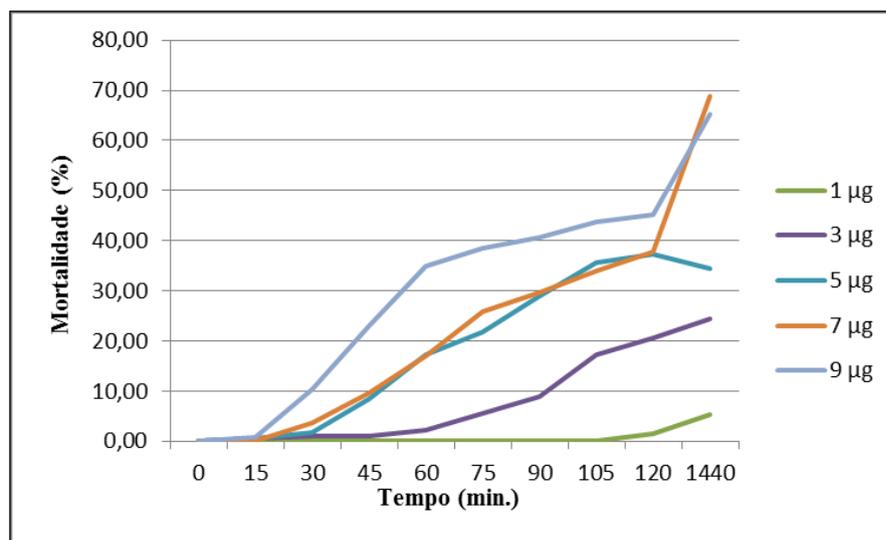


Figura 19: Taxas de mortalidade de indivíduos *A. aegypti*, da população Praça 14 de Janeiro, submetidos aos bioensaios com deltametrina.

Quando comparadas entre si, as populações: Rockefeller, Alvorada I, Coroado I, Monte das Oliveiras e Praça 14 de Janeiro, submetidas à dose diagnóstica (5 µg), no tempo diagnóstico (30 minutos), indicados pela linha pontilhada (Figura 20), mostraram que as fêmeas da população Praça 14 de Janeiro foram as que apresentaram a menor taxa de mortalidade (1,67%), portanto, as mais resistentes. As da Alvorada I apresentaram taxa de mortalidade de 8,89%, seguida da população do Coroado I, com 9,44% e do Monte das Oliveiras, com 13,33%, sendo a última a mais suscetível.

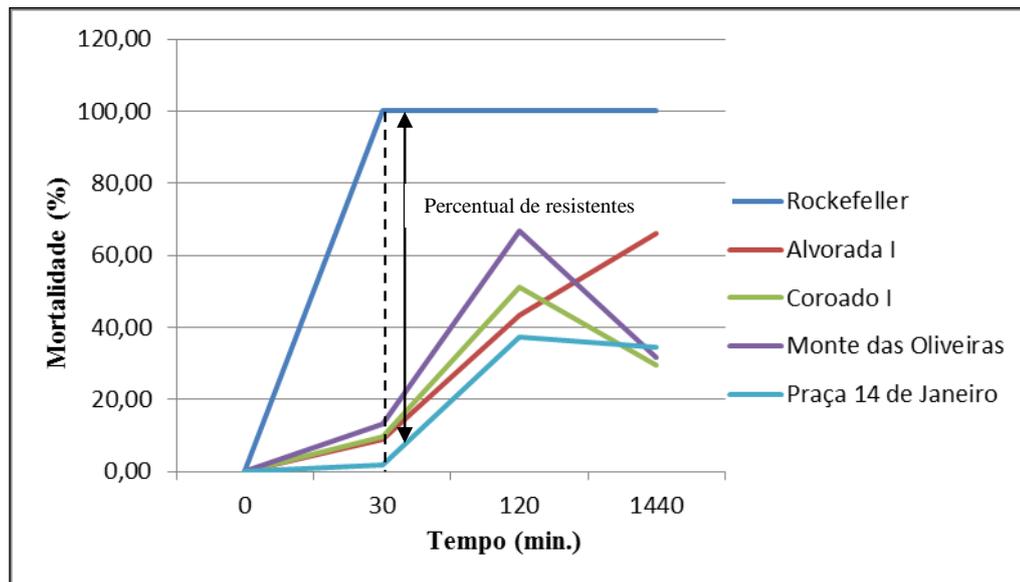


Figura 20: Comparação da mortalidade em função do tempo, entre as cinco populações de *Aedes aegypti*, submetidas à dose diagnóstica de deltametrina (5µg).

Baseados na mortalidade observada em cada população, segundo critério estabelecido por Brogdon e McAllister (1998), as populações foram categorizadas em suscetível ou resistente, conforme a tabela 3.

Tabela 3: *Status* da suscetibilidade das populações de *A. aegypti* submetidas aos bioensaios com a dose diagnóstica de deltametrina.

Localidade	Fêmeas expostas	(%) Mortalidade	Status
Rockefeller	180	100,00	Suscetível
Alvorada I	180	8,89	Resistente
Coroado I	180	9,44	Resistente
Monte das Oliveiras	180	13,33	Resistente
Praça 14 de Janeiro	180	1,67	Resistente

### 5.3 ANÁLISES ISOENZIMÁTICAS

A análise isoenzimática das larvas oriundas do bioensaio com temefós apresentou apenas dois locos esterásicos, presentes apenas nas populações de campo, conforme figura 21 (amostras 4 a 15). Quando submetida a este larvicida, a população sensível expressou apenas o loco indicado como *EST 1*.

Quanto à atividade enzimática, não foram observadas diferenças na intensidade das bandas que pudessem estar associadas à resistência, visto que em amostras da mesma população, existem bandas fortes e fracas.

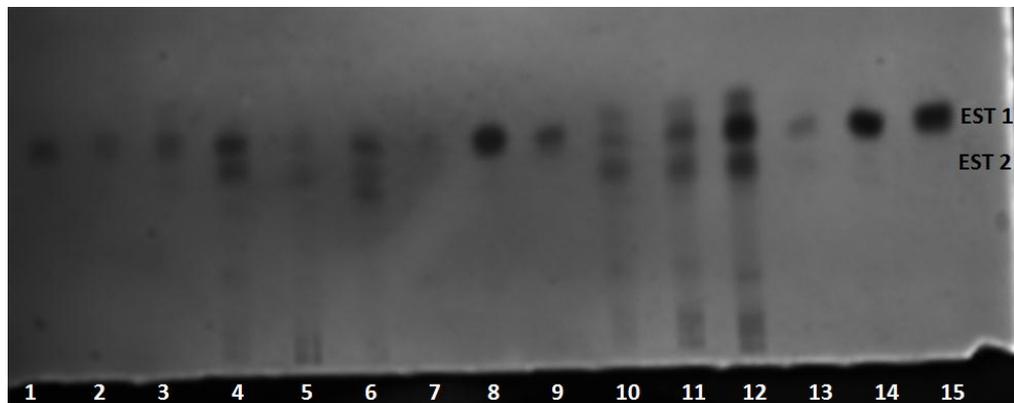


Figura 21: Perfil eletroforético das esterases em populações de *A. aegypti* da cidade de Manaus, submetidos ao bioensaio com temefós. Amostras: 1 a 3 (Linhagem Rockfeller); 4 a 6 (Alvorada I); 7 a 9 (Monte das Oliveiras); 10 a 12 (Praça 14) e 13 a 15 (Coroado I).

Já na análise isoenzimática das larvas oriundas do bioensaio com deltametrina, quatro locos esterásicos puderam ser observados (*EST 1*, *EST 2*, *EST 3* e *EST 4*), estes, porém, estiveram presentes apenas nas populações de campo, conforme figura 22 (amostras 4 a 15). A população suscetível, expressou apenas os locos *EST 2* e *EST 3*.

Quanto à atividade enzimática, foi observado um aumento na intensidade das bandas localizadas no loco *EST 2* das populações Alvorada I (amostras 10 a 12) e Praça 14 de Janeiro (amostras 4 a 6). Nas demais populações não houve diferenças entre as bandas que pudessem estar associadas à resistência.

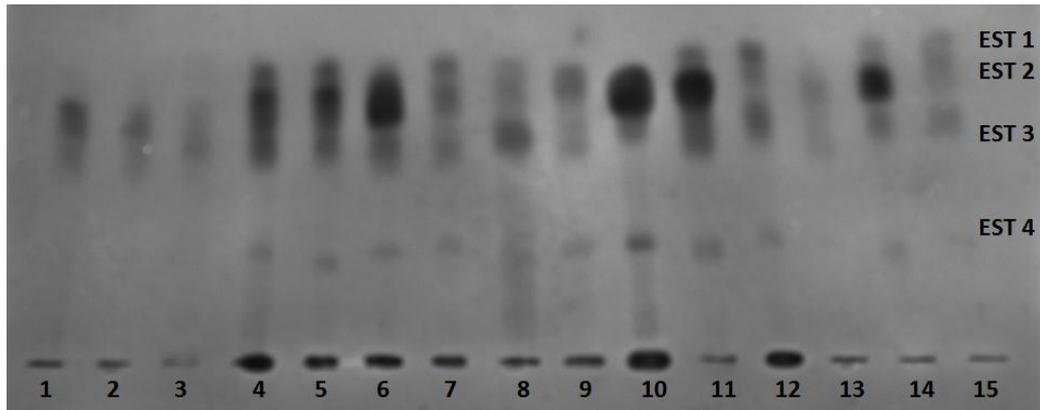


Figura 22: Perfil eletroforético das esterases em populações de *A. aegypti* da cidade de Manaus, submetidos ao bioensaio com deltametrina. Amostras: 1 a 3 (Linhagem Rockfeller); 4 a 6 (Praça 14); 7 a 9 (Coroado I); 10 a 12 (Alvorada I) e 13 a 15 (Monte das Oliveiras).

A análise da hexoquinase em amostras oriundas do bioensaio com deltametrina mostrou a existência de apenas um loco, com atividade enzimática uniforme, de média intensidade, para as populações do campo (amostras 4 a 15) e de intensidade baixa a média, para linhagem sensível (amostras 1 a 3) (Figura 23).

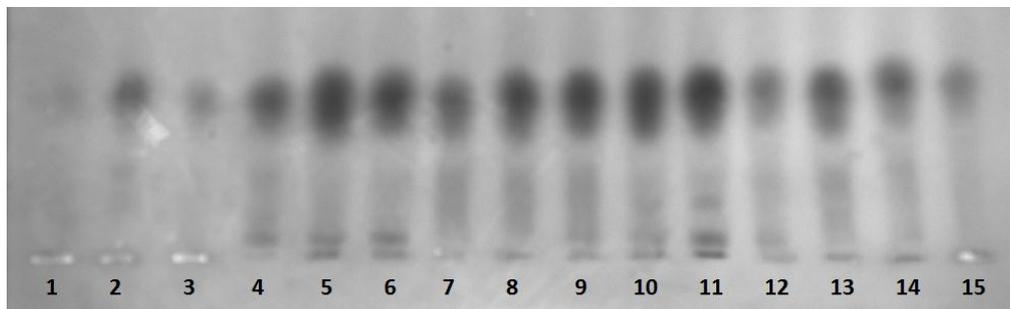


Figura 23: Perfil eletroforético da hexoquinase em populações de *A. aegypti* da cidade de Manaus, submetidos ao bioensaio com deltametrina. Amostras: 1 a 3 (Linhagem Rockfeller); 4 a 6 (Praça 14); 7 a 9 (Coroado I); 10 a 12 (Alvorada I) e 13 a 15 (Monte das Oliveiras).

A análise da fosfoglicomutase de amostras oriundas do bioensaio com deltametrina mostrou a existência de apenas um loco, com bandas de intensidade variada, tanto na população sensível, quanto nas populações do campo, que não puderam ser associadas à resistência a inseticidas, visto que a população sensível apresentou bandas fortes (amostras 2 e 3). Porém, as amostras 7 e 8 da população Monte das Oliveiras apresentaram-se com intensidade fraca (Figura 24). Mesmo assim, esses dados não mostram alguma associação desta enzima à resistência, mesmo que dentre as populações do campo, esta seja a menos resistente.

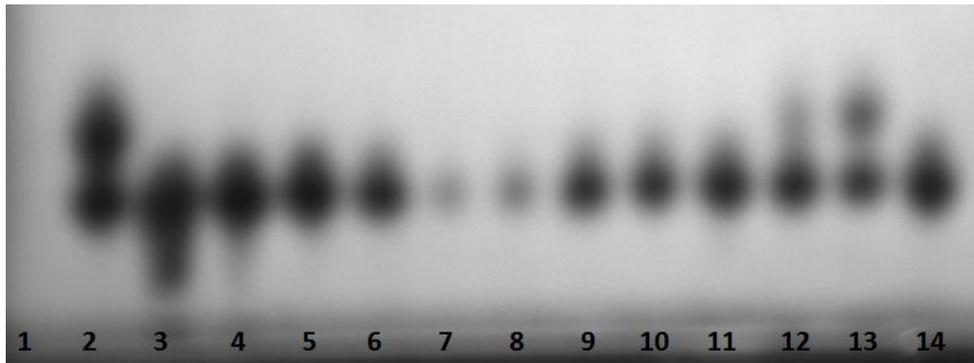


Figura 24: Perfil eletroforético da fosfoglicomutase em populações de *A. aegypti* da cidade de Manaus, submetidos ao bioensaio com deltametrina. Amostras: 1 e 2 (Linhagem Rockefeller); 3 a 5 (Praça 14); 6 a 8 (Monte das Oliveiras); 9 a 11 (Coroado I) e 12 a 14 (Alvorada I).

#### 5.4 ANÁLISE GENÉTICA DA MUTAÇÃO *Kdr* (*Val1016Ile*) NO CANAL DE SÓDIO

Vários trabalhos têm evidenciado a existência de relação entre a resistência a piretróides, como no caso o deltametrina, amplamente usado no controle vetorial de mosquitos no Brasil e a presença de mutações no gene do canal de sódio, regulado por voltagem de *A. aegypti* (*AaNa<sub>v</sub>*), denominadas *Kdr* (*Knockdown resistance*).

Saavedra-Rodriguez *et al.* (2007) apontaram que a principal mutação associada a este tipo de resistência é a *Val1016Ile*, de caráter recessivo, onde ocorre a substituição de uma valina (*Val*), presente em indivíduos selvagens, por uma isoleucina (*Ile*), presente em indivíduos mutantes.

Para verificar a presença ou não da mutação no sítio 1016, os genótipos das populações do campo foram comparados aos genótipos controles: selvagem (*Val/Val*), heterozigoto (*Val/Ile*) e mutante (*Ile/Ile*) (Figura 25).

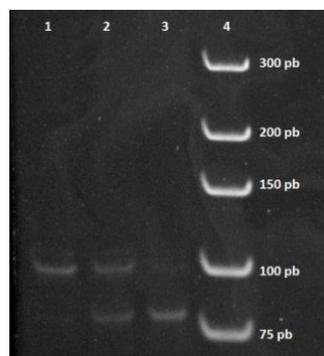


Figura 25: Perfil eletroforético dos genótipos utilizados como controle para mutação *Kdr* no sítio 1016 do canal de sódio. Amostras: 1 - genótipo selvagem (*Val/Val*), com 98pb; 2 - genótipo heterozigoto (*Val/Ile*); amostra 3 - genótipo mutante (*Ile/Ile*), com 78pb; e 4 - marcador Ultra Low Range.

Dos 28 indivíduos analisados, de amostras não submetidas aos bioensaios, da população Alvorada I, somente 2 foram heterozigotos (*Val/Ile*), os 26 demais foram todos homozigotos mutantes (*Ile/Ile*).

Na população natural do Coroado I, dos trinta indivíduos analisados, 8 apresentaram genótipo heterozigoto (*Val/Ile*) e 22, genótipo homozigoto mutante (*Ile/Ile*).

Entre os indivíduos das quatro populações que tiveram o sítio 1016 amplificado, apenas os da população Monte da Oliveira apresentaram genótipo selvagem (*Val/Val*), sendo que, dos 28 analisados, 5 foram selvagens (*Val/Val*), 13 heterozigotos (*Val/Ile*) e 10 mutantes (*Ile/Ile*).

Dos 29 indivíduos naturais da Praça 14, 2 foram heterozigotos (*Val/Ile*) e 27 homozigotos mutantes (*Ile/Ile*).

De todos os indivíduos analisados, não submetidos ao deltametrina, os da população Praça 14 foram os que mais apresentaram genótipos mutantes (93,1%) (Figura 26); e a que apresentou menos genótipos mutantes foi a população do Monte das Oliveiras (35,71%).

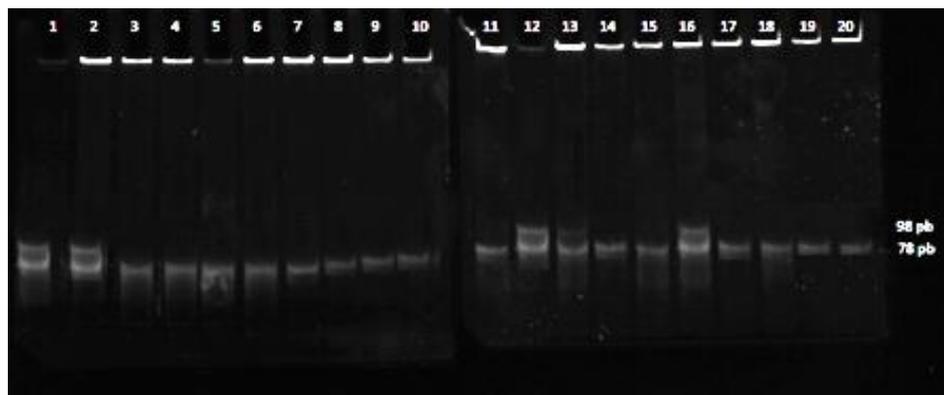


Figura 26: Perfil eletroforético da variabilidade genética em populações de *A. aegypti* da cidade de Manaus, com base no gene *Kdr* (mutação no sítio 1016). Amostras: 1 e 12, controles heterozigotos (*Val/Ile*). Amostras 2 a 7, fêmeas do Monte das Oliveiras selecionadas pelo bioensaio com deltametrina, 8 a 11 e 13 a 20, indivíduos da Praça 14, não tratados com inseticida.

Embora se tratando de amostras provenientes da natureza, portanto, não submetidas ao bioensaio com deltametrina, a frequência do alelo mutante *1016Ile* foi maior que a do selvagem *Val1016* em todas as populações, variando de 0,5893 a 0,9655 nas populações Monte das Oliveiras e Praça 14, respectivamente; enquanto a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,0690 a 0,4643, sendo a população Monte das Oliveiras a que mostrou heterozigosidade mais elevada, e a da Praça 14 com menor heterozigosidade (Tabela 4). Nessa mesma tabela, verifica-se que os valores de  $X^2$  para as quatro populações analisadas, estão de acordo com o Equilíbrio de *Hardy Weinberg*, cujas probabilidades (P) indicam que

cada uma delas é uma população panmítica, onde nesse momento, essas populações de *A. aegypti* estão geneticamente estáveis.

O índice de fixação interpopulacional ( $F_{st}$ ) foi de 0,1820, maior que o índice de endocruzamento ( $F_{is}$ ) -0,0244, indicando a existência de excesso de heterozigotos nas populações analisadas, isto porque, considera o excesso de heterozigotos em função da ausência de homozigotos selvagens, demonstrando, com isso certa diferenciação genética entre as populações (Tabela 4).

Tabela 4: Estimativa da variabilidade genética e teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em populações naturais de *A. aegypti* da cidade de Manaus, com base no gene *Kdr* (*Knockdown resistance*).

	Alelo	Genótipo	População			
			Alvorada I	Coroadó I	Monte das Oliveiras	Praça 14
(N)			(28)	(30)	(28)	(29)
	<i>Val</i>		0,0357	0,1333	0,4107	0,0345
	<i>Ile</i>		0,9643	0,8667	0,5893	0,9655
Observados		<i>Val/Val</i>	0	0	5	0
		<i>Val/Ile</i>	2	8	13	2
		<i>Ile/Ile</i>	26	22	10	27
		<i>Val/Val</i>	0,0357	0,5333	4,7232	0,0345
Esperados		<i>Val/Ile</i>	1,9286	6,9333	13,5536	1,9310
		<i>Ile/Ile</i>	26,0357	22,5333	9,7232	27,0345
			0,0384	0,7101	0,0467	0,0370
$\chi^2$			0,8446	0,3994	0,8289	0,8475
P			0,0714	0,2667	0,4643	0,0690
$H_{obs}$			0,0701	0,2350	0,4929	0,0678
$H_{esp}$						

Índices de Fixação:  $F_{is}$ = -0,0244;  $F_{it}$ = 0,1620;  $F_{st}$ = 0,1820.

Quanto à similaridade genética, as populações apresentaram ampla variação ( $I$ = 0,8481 a 1,00), sendo as da Praça 14 e Alvorada I, as que mostraram maior identidade genética ( $I$ = 1,00), ambas, as mais antigas e que se mostraram mais resistentes ao inseticida quando submetidas aos bioensaios (Tabela 5).

Em relação às distâncias genéticas, os valores encontrados também foram bastante variados ( $D$ = 0,00 a 0,1939), sendo as populações da Praça 14 e Monte das Oliveiras, as que apresentaram maior distância ( $D$ = 0,1939), sendo, a primeira, mais resistente, e a última, mais suscetível aos inseticidas (Tabela 5).

Tabela 5: Matriz de similaridade e distância genética em populações naturais de *A. aegypti* da cidade de Manaus, com base no gene *Kdr* (*Knockdown resistance*). Valores acima da diagonal correspondem à similaridade genética, e abaixo, a distância genética (NEI, 1978).

População	Monte das Oliveiras	Coroado I	Alvorada I	Praça 14
Monte das Oliveiras	*****	0,9079	0,8488	0,8481
Coroado	0,0966	*****	0,9965	0,9963
Alvorada I	0,1648	0,0035	*****	1,0000
Praça 14	0,1939	0,0037	0,0000	*****

A figura 27 mostra o dendrograma das quatro populações analisadas, construído a partir dos valores de distância genética (NEI, 1978), o qual separou essas populações em dois grandes clusters: um formado pelas populações Praça 14 e Alvorada I, o qual separa da população do Coroado I; e o outro formado apenas, pela população Monte das Oliveiras.

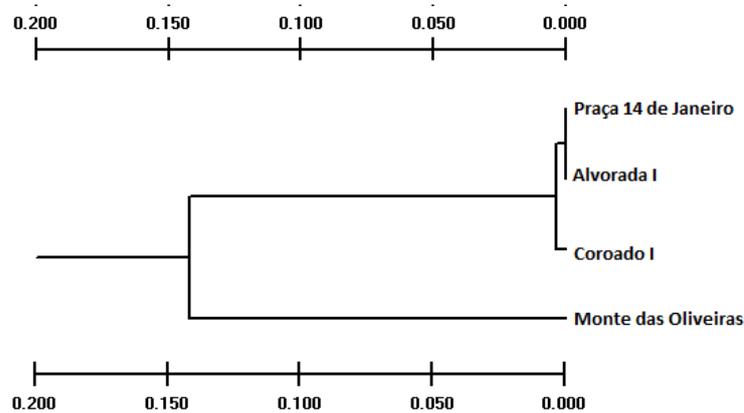


Figura 27: Dendrograma resultante do agrupamento das populações, sem deltametrina, com base na distância genética (NEI, 1978). Valores de bootstrap com 1000 réplicas.

Das amostras oriundas do bioensaio com deltametrina, a população da Praça 14 foi a que apresentou maior quantidade de indivíduos homozigotos mutantes (*Ile/Ile*), correspondendo a 97,05%, de uma amostra de 34 indivíduos analisados, e menor quantidade de heterozigotos, 2,94%. Já a população do Monte das Oliveiras foi a que apresentou menor quantidade de homozigotos mutantes (48,27%) (Figura 28).

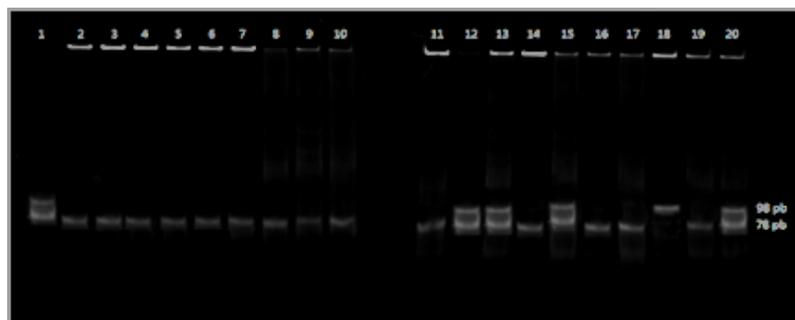


Figura 28: Perfil eletroforético da variabilidade genética em populações de *A. aegypti* da cidade de Manaus, com base no gene *Kdr* (mutação no sítio 1016). Amostras: 1 e 12, controles heterozigotos (*Val/Ile*); 2 a 11, 13 e 14, fêmeas da Alvorada I, e 15 a 20, Monte das Oliveiras, ambas selecionadas pelo bioensaio com deltametrina.

Embora a mutação *Val1016Ile*, associada à resistência a piretróides seja de caráter recessivo, alguns indivíduos sobreviventes aos bioensaios com o inseticida deltametrina, revelaram genótipos homozigotos selvagens nas populações Monte das Oliveiras e Coroado I (6,9% e 7,14%), respectivamente. Assim como, também foram detectados heterozigotos.

A frequência observada do alelo *1016Ile* variou de 0,7069 a 0,9853 nas populações Monte das Oliveiras e Praça 14, respectivamente. O valor de heterozigosidade observada apresentou ampla variação ( $H_o=0,0294$  a  $0,4483$ ), sendo a população da Praça 14 a que revelou menor heterozigosidade; enquanto a do Monte das Oliveiras apresentou o valor mais elevado (Tabela 6). Assim como nas populações oriundas da natureza, sem serem submetidas ao bioensaio com deltametrina, essas populações também mostraram equilíbrio genético, cujos valores de  $X^2$  estão de acordo com o Equilíbrio de *Hardy Weinberg*. Similarmente, o valor de  $F_{st}$  (0,0894) também foi maior que o de  $F_{is}$  (-0,0390), indicando diferenciação genética nas populações analisadas (Tabela 6) e excesso de heterozigotos.

Tabela 6: Estimativa da variabilidade genética e teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em populações de *A. aegypti* da cidade de Manaus, submetidas ao inseticida Deltametrina, com base no gene *Kdr* (*Knockdown resistance*).

	Alelo	Genótipo	População			
			Alvorada I	Coroado I	Monte das Oliveiras	Praça 14
(N)			(28)	(28)	(29)	(34)
Observados	<i>Val</i>		0,1071	0,2500	0,2931	0,0147
	<i>Ile</i>		0,8929	0,7500	0,7069	0,9853
		<i>Val/Val</i>	0	2	2	0
		<i>Val/Ile</i>	6	10	13	1
Esperados		<i>Ile/Ile</i>	22	16	14	33
		<i>Val/Val/</i>	0,3214	1,7500	2,4914	0,0074
		<i>Val/Ile</i>	5,3571	10,5000	12,0172	0,9853
		<i>Ile/Ile</i>	22,3214	15,7500	14,4914	33,0074
	$\chi^2$		0,4032	0,0635	0,1939	0,0076
	P		0,5254	0,8011	0,6597	0,9306
	$H_{obs}$		0,2143	0,3571	0,4483	0,0294
	$H_{esp}$		0,1948	0,3818	0,4217	0,0294

Índices de Fixação:  $F_{is} = -0,0390$ ;  $F_{it} = 0,0538$ ;  $F_{st} = 0,0894$ .

Em relação à similaridade genética, os valores encontrados variaram de 0,9354 a 1,00, indicando grande identidade genética nessas populações, sendo as populações Monte das Oliveiras e Coroado I as mais similares ( $I = 1,00$ ), assim como, Alvorada I e Praça 14 ( $I = 0,9969$ ). Quanto à distância genética, os valores encontrados foram baixos, variando de 0,00 a

0,0668, sendo as populações do Monte das Oliveiras e Praça 14 as que revelaram maior distância genética ( $D= 0,0668$ ) (Tabela 7).

Tabela 7: Matriz de similaridade e distância genética em populações naturais de *A. aegypti* da cidade de Manaus, submetidas ao inseticida Deltametrina, com base no gene *Kdr* (*Knockdown resistance*). Valores acima da diagonal correspondem à similaridade genética e abaixo, a distância genética (NEI, 1978).

População	Monte das Oliveiras	Coroado I	Alvorada I	Praça 14
Monte das Oliveiras	*****	1,0000	0,9709	0,9354
Coroado I	0,0000	*****	0,9871	0,9588
Alvorada I	0,0295	0,0130	*****	0,9969
Praça 14	0,0668	0,0421	0,0031	*****

De forma similar às populações da natureza analisadas sem deltametrina, a figura 29 mostra o dendrograma das quatro populações analisadas submetidas a este inseticida, cujos valores de distância genética também separaram essas populações em dois clusters: um, formado pelas populações do Monte das Oliveiras e do Coroado I e o outro pelas populações da Alvorada I e Praça 14 de janeiro, cujos agrupamentos foram muito similares aos obtidos no dendrograma, em populações sem deltametrina.

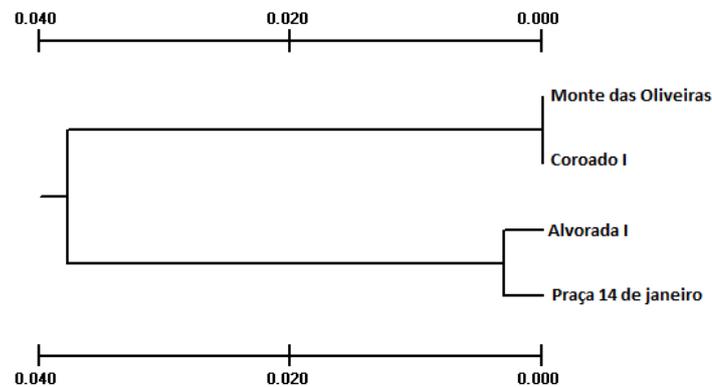


Figura 29: Dendrograma resultante do agrupamento das populações, com deltametrina, com base na distância genética (NEI, 1978). Valores de bootstrap com 1000 réplicas.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 BIOENSAIOS DE SUSCETIBILIDADE A INSETICIDAS

Os resultados obtidos nos bioensaios com larvicida temefós formulação ABATE 1G, mostraram que todas as populações testadas foram caracterizadas como resistentes, sendo as da Alvorada I e Praça 14 de Janeiro as mais resistentes, por apresentarem taxas de mortalidade de 5% e 12,74%, respectivamente. Estes resultados, possivelmente, estão associados à idade dos bairros e as condições propícias para o desenvolvimento dos mosquitos, e em especial, a Praça 14 de Janeiro, por abrigar um pólo de comércio e serviços automotivos consolidados, de onde se originou a primeira grande epidemia ocorrida em Manaus.

Nesta cidade, o *A. aegypti* foi detectado pela primeira vez em novembro de 1996, nesse referido bairro, (Zona Sul) e a partir de 1998, com o início da epidemia, foram encontrados focos nos bairros Vila da Prata, Área Portuária, São Francisco, Coroado, Betânia e Conjunto Tiradentes (BASTOS, 2004; FIGUEIREDO *et al.*, 2004). A partir dessa data, considerando a grande capacidade adaptativa desta espécie, a mesma foi se dispersando para outros bairros, à medida que as condições ecológicas fossem propícias para seu desenvolvimento, e atualmente, já está sendo encontrada em toda cidade de Manaus (PINHEIRO, 2000).

A explicação mais plausível para origem de *A. aegypti* em Manaus no ano de 1998, na Praça 14 de Janeiro, seria pela introdução de ovos, de forma passiva, depositados previamente, em caixas de papelão molhados, devido ao mau armazenamento, utilizadas no transporte de peças para automóveis. Considerando que os ovos produzidos por *A. aegypti* são resistentes à dessecação, ficando viáveis, em estado de dormência por muitos meses, os mesmos podem ter sofrido uma eclosão em massa, em galpões mal cobertos, ocorrida em épocas chuvosas.

Assim, existindo os vetores, faltava apenas o vírus circulando para que acontecesse uma grande epidemia. E esse fato ocorreu em 1981 e 1982, quando uma epidemia em Boa Vista/RR foi documentada clínica e laboratorialmente, confirmando a circulação dos sorotipos 1 e 4 (BRASIL/MS, 2005).

Devido à proximidade e ligação entre os Estados Amazonas e Roraima, via BR-174, e demais localidades, via transporte aéreo e fluvial, a epidemia se disseminou pela região norte

do Brasil e o controle vetorial à base do larvicida temefós, formulação ABATE 1G, passou a ser empregado massivamente pelos agentes de controle de endemias.

Sabe-se que os inseticidas químicos têm sido usados intensiva e indiscriminadamente para o controle de insetos nos últimos 60 anos. A falta de monitoramento, a suspensão prematura dos programas e as falhas no planejamento, entre outras causas, têm facilitado o desenvolvimento de resistência a vários inseticidas em muitas espécies de insetos, inclusive insetos não alvo do controle. Pelo menos 504 espécies de insetos (95 de mosquitos) e ácaros têm apresentado resistência (WHO, 1992; FERRARI, 1996).

Atualmente, no Amazonas, o larvicida de primeira escolha é o organofosforado ABATE 1G, utilizado pelos agentes de saúde da Fundação de Vigilância e Saúde - FVS, porém, em Manaus, devido à detecção de resistência, o mesmo foi substituído por reguladores de crescimento “IGR”, do inglês *Insect Growth Inibitors*, sendo que os mais utilizados no controle de mosquitos pertencem ao grupo das benzoil-feniluréias, conhecidos como inibidores da síntese de quitina (MULLA *et al.*, 1989).

A decisão de substituição do ABATE 1G pelo IGR Novaluron tem vigorado desde abril de 2011, mediante divulgação de resistência a este larvicida, pelo Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), por meio de análise de resistência realizada por Laboratórios de Referência Nacional da Rede de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti* a inseticidas - MORENAa (BRASIL/MS, 2010b).

Em relação ao organofosforado temefós grau técnico, também utilizado nos bioensaios com larvas, os valores para  $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$  e  $RR_{50}$ , não foram coerentes entre si, demonstrando apenas a população Alvorada I com alto nível de resistência ( $RR_{50}=19,22$ ), muito embora esta resistência já tenha sido detectada em populações de Manaus analisadas pela rede Nacional de Monitoramento de Resistência de *A. aegypti* – MORENAa.

Em grande parte dos Estados brasileiros, tem se encontrado grande número de populações de insetos vetores resistentes a inseticidas ou com a suscetibilidade alterada. No estado de São Paulo tem-se suspeitado ou registrado a resistência a organofosforados para *A. aegypti* pelo menos em Campinas (ANDRADE e MODOLO, 1991; MACORIS *et al.*, 1999), Ribeirão Preto, Guariba e Barretos (DINARDO-MIRANDA, 1994), Bauru e Marília (MACORIS *et al.*, 1995), Santos (MACORIS *et al.*, 2003) e para *C. quinquefasciatus* em São Paulo (BRACCO *et al.*, 1997, 1999) e Campinas (CAMPOS e ANDRADE, 2003). No estado de Goiás foi registrada resistência para *A. aegypti* em Goiânia (MACORIS *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 1997). No Rio de Janeiro e no Espírito Santo, pelo menos 10 municípios registraram resistência aos organofosforados para *A. aegypti* (LIMA *et al.*, 2003). No Rio de

Janeiro (RJ) foi registrada resistência ao DDT, um carbamato, três organofosforados, e três piretróides para *C. quinquefasciatus* (GONZÁLEZ *et al.*, 1999), em Campo Grande (MS) e Cuiabá (MT) foi registrada resistência ao temefós para *C. quinquefasciatus* (CAMPOS e ANDRADE, 2003).

Quanto ao bairro Alvorada I, a ocorrência de altos índices de resistência podem estar associados ao tempo de existência do bairro e à sua origem não planejada, que ocorreu mediante “ocupações espontâneas” por trabalhadores da construção civil que ergueram o Conjunto Ajuricaba na década de 1980 (GIATTI *et al.*, 2011), embora existam documentos de trabalhos pastoris que datam do início da década de 70 (WIKIPÉDIA, 2012). Características como a ocupação desordenada e sem planejamento fazem com que a densidade de vetores e conseqüentemente, o controle empregado sejam maiores, devido principalmente, à falta de saneamento básico e a existência de população de baixa renda habitando as margens de igarapés, o que contribui demasiadamente para o aumento do descarte de lixo em locais inadequados, aumentando consideravelmente, a disponibilidade de criadouros para o *A. aegypti*.

Já os bairros do Coroado I e Monte das Oliveiras apresentaram taxas de mortalidade inferior às da Alvorada I e Praça 14 de Janeiro, sendo, respectivamente, 35% e 37,5%, mais ainda assim, foram categorizados como resistente.

Também são bairros que não possuem saneamento básico e o maior agravante é a falta de água, podendo ser provisória, quando há tubulações, mas o abastecimento é deficiente, ou permanente, quando não existem tubulações. No caso do Coroado I, já existe água encanada, mas a sua distribuição não é contínua e a falta é constante. Isso obriga os moradores a armazenarem a água, enquanto disponível, em barris, caixas d’água, baldes e camburões, favorecendo assim o aumento da disponibilidade de criadouros artificiais para o mosquito da dengue.

Já o bairro Monte das Oliveiras, por ser mais recente, também constituído por “habitações espontâneas”, realizadas nas imediações dos conjuntos habitacionais Cidade Nova e Nova Cidade na década de 1990 (GIATTO *et al.*, 2011), apresenta locais que ainda não possuem água encanada. Diante dessa situação, os moradores sentem-se obrigados a cavarem cisternas, que servem de criadouros, tanto para mosquitos da espécie *A. aegypti*, quanto para outras do gênero *Culex*. Assim, além de contribuir com a oferta de criadouros, os moradores ainda se expõem ao risco de contrair enfermidades pela ingestão de água contaminada.

Embora nos bioensaios seja recomendada a utilização de produtos grau técnico (verificando a sua pureza), seguindo-se procedimentos padrões (BROWN, 1986; WHO, 1992; FERRARI, 1996, BROGDON e MCALLISTER, 1998), prévios à operacionalização das atividades de controle, as formulações dos produtos comerciais a serem usados devem ser analisadas quimicamente, de modo a aferir corretamente o percentual do ingrediente ativo (% i.a.) e/ou avaliadas e monitoradas por meio de bioensaios, quanto à sua eficiência, em populações suscetíveis e de campo. Este procedimento deve ser empregado considerando que existem variações nas formulações e na qualidade dos produtos, como: fabricante, transporte, armazenamento, tempo de estoque, etc. (CAMPOS e ANDRADE, 2011).

Além do larvicida organofosforado temefós, formulação ABATE 1G, é utilizado para o controle de adultos de *A. aegypti*, a aplicação espacial de inseticida piretróide (deltametrina), a Ultra Baixo Volume-UBV, tanto em ações de rotina, quando não há surtos epidêmicos, quanto em ações emergenciais (BRASIL/MS, 2005).

O período chuvoso é o mais crítico, visto que a densidade vetorial aumenta consideravelmente, fazendo com que o controle ao vetor seja mais intensificado. Porém, assim como ocorreu com os organofosforados, têm acontecido com os piretróides, episódios de resistência detectados em todo Brasil e também em outros países (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001; BRENGUES *et al.*, 2003; LUNA *et al.*, 2004; PEREIRA-DA-CUNHA *et al.*, 2005; DUSFOUR *et al.*, 2011).

Quando submetidas aos bioensaios com deltametrina, todas as populações testadas foram categorizadas como resistentes, sendo que as populações Praça 14 de Janeiro e Alvorada I foram consideradas as mais resistentes, com 1,67% e 8,89% de mortalidade, respectivamente, não diferindo grandemente dos demais bairros: Coroado I e Monte das Oliveiras, com taxas de mortalidade de 9,44% e 13,33%, respectivamente.

Apesar de ter sido detectada resistência em várias localidades do Brasil e do mundo, por meio, principalmente, da identificação de mutações no canal de sódio voltagem dependente, ainda não houve substituição deste inseticida.

No Brasil, vários Estados já apresentam populações com algum traço de resistência. Assim, os laboratórios que realizam o monitoramento da resistência, preconizam a substituição deste inseticida em cidades aonde tenha sido detectada resistência, principalmente, pelo fato deste tipo de mecanismo de resistência ser muito eficiente, visto que em poucas gerações de população, sob pressão de seleção aumentam significativamente, as frequências com que aparecem (SAAVEDRA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007).

Figueiredo *et al.* (2004), em seu estudo sobre a epidemia de dengue, ocorrida em 1998 e 1999, identificaram a zona sul da cidade de Manaus, próximo ao rio negro, como sendo a área infestada primeiramente, visto que, atua como sítio de entrada, tanto para o vetor, quanto para o vírus. Além disso, a área do centro foi a que apresentou maior ocorrência dos casos, maior concentração do vetor e a maior população ativa durante o dia, favorecendo a disseminação da dengue.

Segundo Costa *et al.* (2009), dos mosquitos analisados e infectados com algum sorotipo do vírus da dengue, 23% foram encontrados na zona leste, 70% na centro-oeste, 60% na Sul, 53% na oeste.

Bastos (2004) observou que a distribuição dos casos de dengue foi menor na zona leste (9%) e maior na zona Sul (25%) e Figueiredo (2008) observou a maior positividade de casos de dengue nas zonas Centro-oeste, Sul e Oeste.

Embora analisando diferentes aspectos, no caso, resistência a inseticidas, ainda assim, os dados destes estudos corroboram com os resultados deste trabalho, visto que as zonas com maior quantidade de mosquitos resistentes são as zonas que comportam a maioria dos casos de dengue notificados.

## 6.2 ANÁLISES ISOENZIMÁTICAS

Os estudos da resistência a inseticidas têm mostrado que, entre outros fatores, a mesma tem sido relacionada ao aumento do metabolismo do inseticida por ação de enzimas de detoxificação. A resistência metabólica é o resultado de uma mudança estrutural na molécula da enzima que aumenta sua habilidade em detoxificar o inseticida e/ou, elevar os níveis da enzima produzida (HEMINGWAY, 2000). Um pequeno grupo de enzimas ou família de enzimas está envolvido neste mecanismo de resistência: as oxidases, as glutational-s-transferases e as esterases (CARINO *et al.*, 1994; RAYMOND *et al.*, 1998).

Neste trabalho foram analisados os perfis eletroforéticos de esterase total, sem uso de inibidores, fosfoglicomutase e hexoquinase, sendo as duas últimas transferases, em populações da cidade de Manaus, submetidas e não submetidas a inseticidas, bem como em comparação com a linhagem suscetível Rockefeller. Embora não tenham sido observadas diferenças nas intensidades das mesmas entre os indivíduos analisados, sabe-se que existe grande relação entre altos níveis de esterases, bem como outras enzimas detoxificantes, com altos níveis de resistência, principalmente, a organofosforados, mas também a piretróides (MENDES *et al.*, 2001; CAMPOS e ANDRADE, 2003).

González *et al.* (1999), por meio de análise bioquímica de esterases e colinesterases, inclusive utilizando sinergistas, juntamente com inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides, verificaram que os piretróides podem fornecer melhor estratégia de controle quando comparado às demais classes.

Ainda assim, como observado nos bioensaios com deltametrina, as populações já apresentam resistência, portanto, outras estratégias tornam-se necessárias.

A maioria dos trabalhos em *A. aegypti* voltados à análise dos perfis esterásicos refere-se à quantificação de esterase total, avaliada no extrato de mosquitos macerados inteiros (FIELD *et al.*, 1999; GAO *et al.*, 2006).

Bisset *et al.* (2001), verificaram altos níveis esterásicos associados ao alto nível de resistência a organofosforados em populações de Cuba e Venezuela.

Paiva (2006) demonstrou por meio de testes bioquímicos, a elevada atividade  $\alpha$ -esterásica em larvas da linhagem Recife-Resistente, submetidas à bioensaios com temefós, em comparação com linhagem Rockefeller, suscetível, com absorbância que variou de 1,2 a 0,9, e de  $\beta$ -esterase variando de 1,9 a 1,4, respectivamente, encontrando inclusive presença de alelos superexpressos.

No Estado de São Paulo, em vários municípios foi observada a resistência a organofosforados associada às esterases, principalmente, em populações com alto nível de resistência (MARCORIS *et al.*, 2003).

Em investigação da resistência em populações de *A. aegypti* do Grand Cayman, integrante das ilhas Caymans, Harris *et al.* (2010) verificaram elevadas atividades de esterases, monooxigenases e transferases, quando comparadas à população suscetível, New Orleans.

Em Martinique, pequena ilha nas Antilhas, oeste do mar do Caribe, algumas das populações analisadas de *A. aegypti*, apresentaram altos níveis das enzimas monooxigenases, carboxilesterases e glutational-s-transferases, em comparação com a cepa suscetível Bora Bora (MARCOMBE *et al.*, 2012).

Muitos trabalhos mostraram que as próprias bandas foram analisadas em géis de poliacrilamida, sugerindo que além do aumento da atividade esterásica, ocorre também o aumento da frequência de algumas bandas esterásicas e redução da frequência de outras, sugerindo a ativação preferencial de determinadas esterases, na presença de inseticidas (GUIRADO, 2008; LIMA-CATELANI *et al.*, 2004; SOUZA-POLEZZI e BICUDO, 2005). Resultados similares foram de certa forma, observados para as esterases nessas populações de *A. aegypti* da cidade Manaus, comparados à população da cepa Rockefeller do Rio de Janeiro,

considerada sensível, utilizada como padrão nesse estudo, cujo perfil eletroforético revelou somente as esterases 2 e 3 na linhagem Rockefeller, enquanto que nas demais populações foram detectadas quatro isoenzimas (*EST1*, *EST2*, *EST3* e *EST4*). Mesmo assim, os dados ainda não foram suficientes para saber se essas enzimas estão desempenhando algum mecanismo de detoxificação nessas populações de *A. aegypti*. Para isso, será necessário aumentar o número de amostras de cada população, usar outros substratos e inibidores enzimáticos.

Quanto à hexoquinases e fosfoglicomutases, não foram observadas diferenças na atividade que possam atribuir a ação metabólica de detoxificação dessas enzimas nas populações de *A. aegypti* analisadas

### 6.3 ANÁLISE GENÉTICA DA MUTAÇÃO *Kdr* (*Val1016Ile*) NO CANAL DE SÓDIO

Introduzida no início dos anos 2000, devido ao aparecimento de populações resistentes aos organofosforados utilizados no controle vetorial, a deltametrina é o inseticida utilizado atualmente em todo Brasil, por se tratar de um produto mais eficiente, menos nocivo, com baixa toxicidade aos mamíferos e limitada persistência no solo (SODERLUND, 2008).

Porém, em menos de dez anos de utilização foram detectadas populações resistentes a este inseticida (PEREIRA-DA-CUNHA *et al.*, 2005; MONTELLA, 2007).

A resistência a piretróides relacionada ao desenvolvimento de mutações tipo *Kdr*, tem sido reportada há muito tempo, em diversas espécies de insetos como em moscas doméstica (WILLIAMSON *et al.*, 1993), em insetos pragas ou vetores, como a mosca do chifre *Haematobia irritans* (MCDONALD e SCHMIDT, 1987), a praga do tabaco *Heliothis virescens* (TAYLOR *et al.*, 1993), a barata *Blattella germanica* (DONG e SCOTT, 1994) e o mosquito *A. aegypti* (SEVERSON *et al.*, 1997).

Saavedra-Rodriguez *et al.*, (2007) verificaram que em ensaios de pressão de seleção com piretróides em populações de Cuba e do México, mostraram aumento drástico da frequência do alelo *1016Ile* em poucas gerações.

Martins *et al.* (2009) sugeriram que esteja ocorrendo um espalhamento do alelo *1016Ile* por todo o Brasil, proveniente de municípios localizados na região Centro-Oeste na fronteira com outros países.

Harris *et al.* (2010), investigando causas da resistência à piretróides, na população do Grand Cayman, verificou a presença da mutação *Val1016Ile*, com frequência do alelo

resistente *1016Ile* de 0,79. Nestas populações de *A. aegypti*, altos níveis de resistência ao DDT e piretróides tem sido descritos.

Em Martinique, Marcombe *et al.* (2012), verificaram alta frequência do alelo *1016Ile*, variando de 0,89 a 0,97, nas populações analisadas, e todas em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Em populações de *A. aegypti* do México, García *et al.* (2009) verificaram aumento drástico da frequência do alelo *1016Ile* em populações resistentes, coletadas entre os anos de 1996 a 2009. Entre 1996 e 2000, a frequência encontrada foi menor que 0,1%. Já entre 2003 e 2006, a frequência variou de 2 a 5%, aumentando consideravelmente entre os anos 2007 e 2009, com 38,3 e 88,3%, respectivamente.

Vale ressaltar que além da mutação *Val1016Ile*, a mutação *Ile1011Met*, também associadas ao mecanismo *Kdr* em *A. aegypti*, tem se disseminado em populações das regiões nordeste e sudeste do Brasil, estando esta última, presente em indivíduos resistentes não portadores da *Val1016Ile* (MARTINS, *et al.*, 2009).

Neste trabalho foi possível detectar a alta frequência com que aparece o alelo *1016Ile*, tanto nas populações naturais, variando de 0,58 a 0,96, quanto nas populações selecionadas com deltametrina, 0,70 a 0,98, considerando os bairros em ordem crescente de resistência: Monte das Oliveiras, Coroado I, Alvorada I e Praça 14 de Janeiro.

Apesar de Martins *et al.* (2012) reportar um *fitness* negativo dessa mutação *Kdr* em populações de *A. aegypti* do estado do Rio de Janeiro, quando não há pressão de seleção por inseticida, a elevada frequência do alelo *1016Ile* encontrada nessas populações de Manaus, num tempo relativamente curto, quando se trata de evolução, indica que essa mutação está sendo favorecida nas condições atuais, mesmo quando o uso do inseticida não é tão intenso, como na população do Monte das Oliveiras.

Esta alta frequência do alelo *1016Ile*, pode possivelmente, estar associada à idade das populações consideradas mais resistentes, características urbanísticas destes locais, saneamento, descarte de lixo, fornecimento da água encanada, grau de instrução dos moradores, e também o *fitness* dessa espécie, entre outros.

A situação é bastante preocupante aqui em Manaus, principalmente, considerando que essas populações estão estabelecidas, onde o fluxo gênico é constante dentro delas, apesar de encontrarem de certa forma, diferenciadas geneticamente, como mostra o índice de fixação ( $F_{st}= 0,1820$ ).

Além disso, o controle massivo com deltametrina em todos os bairros, devido a detecção de altos níveis de infestação obtidas dos LIRAA, realizados periodicamente pelos agentes de controle da FVS, associados a grande incidência de casos de dengue notificados.

De acordo com o LIRAA de 2006, nos Bairros Alvorada I e Praça 14, os recipientes predominantes foram depósitos ao nível do solo, como barris, tambores, tanques, etc., lixo, como recipientes plásticos, garrafas latas sucatas em pátios, ferros velhos, recicladoras e entulhos. Já no bairro Coroado I foi predominante apenas os depósitos ao nível do solo. No Monte das Oliveiras, além de todos os recipientes acima citados, foram encontrados também em caixas d'água ligadas à rede de abastecimento, depósitos elevados e também em pneus descartados.

Toda esta disponibilidade de criadouros, aliada aos altos índices pluviométricos observados na região, influenciam diretamente o aumento da densidade de *A. aegypti*, e conseqüentemente, dos casos de dengue, tanto que no período de 2003 a 2012 houve uma grande flutuação no número de casos notificados, variando de 826 casos em 2006 até 8.633 em 2008, decaindo para 3.645 em 2012, segundo dados do SINAN/AM, disponibilizados pela FVS/AM.

Assim, com a detecção de resistência à deltametrina em populações de Manaus, faz-se necessário a revisão das alternativas de controle vetorial, pois ainda que a mutação *Val1016Ile* represente alto custo adaptativo para as populações, como estudado por Martins *et al.* (2012), este alelo tem se disseminado rapidamente em todas as populações expostas a pressão com inseticidas.

## CONCLUSÕES

Os dados desse trabalho, a partir da análise de quatro populações de *A. aegypti* da cidade de Manaus (Alvorada I, Praça 14 de Janeiro, Coroado I e Monte das Oliveiras), submetidas às diferentes concentrações do larvicida temefós, formulação ABATE 1G, mostraram resistência a esse organofosforado em todas as populações, sendo a da Alvorada I e da Praça 14 de Janeiro, as mais resistentes.

Resultado similar também foi observado, quando essas populações foram submetidas ao inseticida piretróide deltametrina. Neste caso, a população da Praça 14 de Janeiro foi a mais resistente.

É possível, que estes resultados estejam associados à idade dos bairros, as condições propícias para o desenvolvimento dessa espécie, considerando sua elevada capacidade adaptativa e alta pressão de seleção pelo uso de inseticidas organofosforados e piretróides, no combate a dengue.

Não foi possível associar a atividade esterásica com a resistência ao organofosforado temefós, formulação ABATE 1G, nem à deltametrina, embora tenham sido observadas mais bandas (isoenzimas) em populações do campo, do que na linhagem suscetível Rockefeller, quando submetidas ao inseticida piretróide. Neste caso, há possibilidade das esterases estarem sendo reguladas por algum mecanismo genético que, em presença do inseticida ocorra ativação preferencial de determinadas formas isoenzimáticas.

Não foram observadas alterações na atividade das transferases fosfoglicomutase e hexoquinase nas populações analisadas, em comparação com a linhagem suscetível Rockefeller.

As análises genéticas revelaram a presença do alelo mutante *1016Ile*, do gene *Kdr* no Canal de Sódio, em todas as populações analisadas, estando em menor frequência na população do Monte das Oliveiras, sem uso de inseticida (0,58) e em maior frequência na população Praça 14 de Janeiro, selecionada pelos bioensaios (0,98). Os valores de  $X^2$  não foram significativos para as quatro populações, indicando que as mesmas encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com excesso de heterozigotos e diferenciação genética interpopulacional moderada, sendo as populações da Praça 14 de Janeiro e do Monte das Oliveiras as mais distantes geneticamente. Estes resultados podem ser explicados, em decorrência do tempo de infestação, pressão de seleção no controle da dengue e elevado *fitness* desse mosquito.

Assim, diante dos resultados obtidos, faz-se necessário o monitoramento do uso desses inseticidas nas ações de controle, empregando rodízios com diferentes classes de inseticidas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economy Entomology**, v. 18, p. 265-267, 1925.
- ANDRADE, C. F. S.; MODOLO, M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in integrated control. **Revista de Saúde Pública**, v. 25, p. 184-187, 1991.
- APPERSON, C. S.; GEORGHIOU, G. P. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. **Journal Economic Entomology**, v. 68, n. 2, p. 153-7, 1975.
- BASTOS, M. S. **Perfil soroepidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (1998-2001)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.
- BISSET, J. A.; RODRÍGUEZ, M. M.; MOLINA, D.; DÍAZ, C.; SOCA, L. A. Esterasas elevadas como mecanismo de resistência a insecticidas organofosforados em cepas de *Aedes aegypti*. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 53, n. 1, p. 37-43, 2001.
- BLOOMQUIST, J. R. Toxicology, mode of action and target site-mediated resistance to insecticides acting on chloride channels. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 2, p. 301-314, 1993.
- BRACCO, J. E.; DALBON, M.; MARINOTTI, O.; BARATA, J. M. S. Organophosphorus and carbamate resistance in a population of *Culex quinquefasciatus*. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 2, p. 182-183, 1997.
- BRACCO, J. E.; BARATA, J. M. S.; MARINOTTI, O. Evaluation of Insecticide Resistance and Biochemical Mechanisms in a Population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 115-120, 1999.
- BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the state of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 199-203, 2004.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 279-293. 2007a.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil\*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 16, n. 4, p. 295-302, 2007b.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Endemias Rurais – Métodos de trabalho adotados pelo DNERu, Departamento Nacional de Endemias Rurais**. 1968.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias : guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. – 5. ed. amp. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **O uso racional de inseticidas no controle do *Aedes aegypti* e sua utilização oportuna em áreas com transmissão de dengue**. NOTA TÉCNICA N.º 109/2010 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS. 2010b.

BRENGUES, C.; HAWKES, N.J.; CHANDRE, F.; MCCARROLL, L.; DUCHON, S.; GUILLET, P.; MANGUIN, S.; MORGAN, J.C.; HEMINGWAY, J. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. **Medicine Veterinary Entomology**, v. 17, p. 87–94, 2003.

BRICKS, L. F. Vacinas para a dengue: perspectivas. **Pediatrics**, v. 26, p. 268-281, 2004.

BROGDON, W. G.; MCALLISTER, J. C. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time mortality determinations in glass bottles. **Journal American Mosquito Control Association**, v. 14, n. 2, p. 159-164, 1998.

BROWN, A. W. A. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. **Journal American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 123-140, 1986.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. **Avaliação da sensibilidade a inseticidas em mosquitos *Aedes aegypti*, *A. albopictus* e *Culex quinquefasciatus* por meio de bioensaios: Protocolo para avaliação de susceptibilidade e monitoramento da resistência a inseticidas químicos usados no controle**. 4ª ed. Apêndice 5 In: CAMPOS J. Análise Citológica de populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera, Culicinae). Tese Doutorado, Área de Biologia Celular Estrutural, Instituto de Biologia-Unicamp. Campinas-Brasil, 2002. 4.1ª ed., UNICAMP/UFGD, Dourados, 22p, 2011.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, p. 232-236, 2001.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, p. 523 - 527, 2003.

CARINO, F.A.; KOPENER, J.F.; PLAPP, F.W.; FEYREISEN, R. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 24, p. 411-418, 1994.

CARVALHO, M. S. L.; CALDAS, E. D.; DEGALLIER, N.; VILARINHOS, P. T. R.; SOUZA, L. C. K. R.; YOSHIZAWA, M. A. C.; KNOX, M. B.; OLIVEIRA, C. Suscetibilidade de larvas de *Aedes aegypti* ao inseticida temephos no Distrito Federal. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 623-629, 2004.

CHANG, C.; SHEN, W.K.; WANG, T. T.; LIN, Y. H.; HSU, E. L.; DAI, S. M. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 39, p. 272–8, 2009.

CHATURVEDI, U. C. The curse of dengue. **Indian Journal Medical Research**, v. 124, p. 467-470, 2006.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro. 225 p. 1994.

CONTEL, E. P. B.; SANTOS, J. M. M.; TADEI, W. P. Biologia de Anofelinos Amazônicos VI. Variabilidade enzimática em *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae). *Acta Amazônica*, v. 14 (1/2), p. 238-243, 1984.

CONYERS, C. M.; MACNICOLL, A. D.; PRICE, N. R. Purification e characterization de an esterase involved in resistance to organophosphorous insecticides in the saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 28, p. 435-448, 1998.

COSTA, C. A.; SANTOS, I. G. C.; BARBOSA, M. G. Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p.677-681, 2009.

CRUZ, I. **Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith)**. Embrapa Milho e Sorgo. Documentos 21. 15p. 2002.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Mosquito da dengue resiste a inseticidas**. In: Correio Popular,1-Cidades (MT Costa, rep), Campinas, 5 de novembro de 1994.

DLETZ, V.J.; GUBLER, D. J.; RIGAU-PEREZ, J. G.; PINHEIRO, F.; SCHATZMAYR, H.G.; BAILEY, R.; GUNN, R.A. Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: Evaluation of a clinically based dengue surveillance system. **American Journal Epidemiology**, v. 131, p 693–701, 1990.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 259-279, 2002.

DONG, K. Insect sodium channels and insecticide resistance. **Invertebrate Neuroscience**, v. 7, p. 17-30, 2007.

DUSFOUR, I.; THALMENSY, V.; GABORIT, P.; ISSALY, J.; CARINCI, R.; GIROD, R. Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 3, p. 346-352, 2011.

FERRARI J. A. **Insecticide resistance In: The Biology of Disease Vectors**. Colorado: University Press of Colorado; 1996.

FERREIRA, M. L. B.; CAVALCANTI, C. G.; COELHO, C. A.; MESQUITA, S. D. Manifestações neurológicas de dengue. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 63, n. 2-b, p. 488-493, 2005.

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; PITTENDRIGH, B.; VAUGHAN, A.; ANTHONY, N. Why there so few resistance-associated mutation target genes? **Philosophical Transactions of the Royal Society London**, v. 353, p.1685-1693, 1998.

FIELD, L.M.; BLACKMAN, R.L., TYLER-SMITH, C.; DEVONSHIRE, A.L. Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide resistant *Myzus persicae* (Sulzer). **Biochemical Journal**, v. 339, p. 737-742, 1999.

FIGUEIREDO, R. M. P. **Caracterização Molecular e Epidemiológica dos Vírus Dengue no Estado do Amazonas, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

FIGUEIREDO, R. M. P.; THATCHER, B. D.; LIMA, M. L.; ALMEIDA, T. C.; ALECRIM, W. D.; GUERRA, M. V. F. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 476-479, 2004.

FISPQ - **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico. Temefós Fersol 1g**. Disponível em: <<http://www.fersolna.com.br/fersol/fichas/fispq/temefos1g.pdf>> Acesso em: 21/11/2011.

FORATTINI, O.P. **Culicidologia médica**. São Paulo: Ed. USP, 2. 864 p. 2002.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. **Relatório de situação das atividades de epidemiologia, sistema de informação e entomologia relacionadas ao PEAA, no Estado de Pernambuco**. 2001.

GAO, J.R.; YOON, K.S.; RICHARD, K.; GERALD, C.; MARSHALL, J.; CLARK, F. Esterase-mediated malathion resistance in the human head louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **Pesticide Biochemical Physiology**, v. 185, p. 23-37, 2006.

GARCÍA, G. P.; FLORES, A. E.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; SAAVEDRA-RODRÍGUEZ, K.; REYES-SOLIS, G.; *et al.* Recent Rapid Rise of a Permethrin Knock Down Resistance Allele in *Aedes aegypti* in México. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 3, n. 10, p. 531, 2009.

GIATTI, L. L.; FREITAS, C. M.; DESMOULIÈRE, S. J. M.; MEDEIROS M. S. SILVA, M. B. C.; NETO, A. L. S. Manaus: uma análise ecossistêmica através de indicadores de sustentabilidade ambiental e de saúde, 2011. Disponível em: [http://www5.ensp.fiocruz.br/biblioteca/dados/txt\\_426290692.pdf](http://www5.ensp.fiocruz.br/biblioteca/dados/txt_426290692.pdf). Acesso em: 22/09/2012.

GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

GONZÁLEZ, T. et al. Insecticide resistance in a *Culex quinquefasciatus* strain from Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 1, p. 121-122, 1999.

GUBLER D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11. p. 480-496, 1998.

GUIRADO, M.M. **Padrões de esterases em populações resistentes e suscetíveis de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)**. Tese de Doutorado. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista; 2008.

HARRIS, F. A.; RAJATILEKA, S.; RANSON, H. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 277–284, 2010.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry. Molecular Biology**, v. 30, p. 1009-1015, 2000.

HEMINGWAY, J.; HAWKES, J. N.; MCCARROLL, L.; RANSON, H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 653–665, 2004.

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

LIMA, J. B.; PEREIRA-DA-CUNHA, M.; SILVA-JÚNIOR, R. C.; GALARDO, A. K. R.; SOARES, S. S.; BRAGA, I. A.; RAMOS, R. P.; VALLE, D. 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**, v. 68, n. 3, p. 329-333, 2003.

LIMA, L. M. K. S. **Variabilidade protéica em populações naturais de *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: Noctuidae)**. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 158p. 1989.

LIMA-CATELANI, A.R.A.; CERON, C.R.; BICUDO, H.E.M.C. Genetic variation during development, revealed by esterase patterns of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Biochemical Genetic**, v. 42, p. 69-84, 2004.

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

LUNA, J. E. D.; MARTINS, M. F.; ANJOS, A. F.; KUWABARA, E. F.; NAVARRO-SILVA, M. A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p. 242-243, 2004.

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; GARBELOTO, V. C.; CIRINO, V. C. B. Alteration in susceptibility response of *Aedes aegypti* to organophosphates in cities in the state of S. Paulo, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, p. 521-522, 1999.

MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T.; TAKAKU, L. Efeito residual de temephós em larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 4, p. 375-377, 1995.

MACORIS, M. L. G.; et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of São Paulo, Brazil, to Organophosphates Insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 703-708, 2003.

MARCOMBE, S.; MATHIEU, R. B.; POCQUET, N.; RIAZ, M-A.; POUPARDIN, R.; SÉLIOR, S.; DARRIET, F.; REYNAUD, S.; YÉBAKIMA, A.; CORBEL, V.; DAVID, J-P.; CHANDRE, F. Insecticide Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti* from Martinique: Distribution, Mechanisms and Relations with Environmental Factors. **Plos ONE**, v. 7, n. 2, e30989, 2012.

MARTINEZ-TORRES, D.; CHEVILLON, C.; BRUN-BARALE, A.; BERGÉ, J.B.; PASTEUR, N.; PAURON, D. Voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. **Pesticide Science**, v. 55, p. 1012–1020, 1999.

- MARTINS, A. J.; LIMA, J. B. P.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D. Frequency of Val1016Ile mutations in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. **Tropical Medicine International Health**, v. 14, n. 2, p. 1351-1355, 2009.
- MARTINS, A. J.; RIBEIRO, C. D. M.; BELLINATO, D. F.; PEIXOTO, A. A.; VALLE, D.; LIMA, J. B. P. Effect of Insecticide Resistance on Development, Longevity and Reproduction of Field or Laboratory Selected *Aedes aegypti* Populations. **Plos ONE**, v. 7, n. 3, e31889, 2012.
- MATHENGUE, E. M.; GIMNIG, J. E.; KOLCZAK, M.; OMBOK, M.; IRUNGU, L. W.; HAWLEY, W. A. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 531-6, 2001.
- MAZZARRI, M. B.; GEORGHIOU, G. P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. **Journal American Mosquito Control Association**, v. 11, p. 315-322, 1995.
- MELLON, R. B.; GEORGHIOU, G. P. Rotational use of insecticides in mosquito control programs. *In: Proceedings and papers of the fifty-second annual Conference of the California and Vector Control Association*. p. 65-67. 1984.
- MELO, M. E. B.; MERLO, K. C.; FERNANDES, R. R. C.; LUNA, C. F. DINIZ, G. T. N.; CATANHO, M. T. J. A.; REGIS, L. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temephos em células de medula óssea de camundongos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 3, p. 196-201, 2008.
- MENDES, M. C.; SILVA, M. X.; BRACCO, J. E. Teste bioquímico para determinar a resistência de duas cepas do carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI,1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 10, n. 2, p. 61-65, 2001.
- MILLER, M.P. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: **A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data**. Computer software distributed by author, 1997.
- MONTELLA, I. R.; MARTINS, A. J.; VIANA-MEDEIROS, P. F.; LIMA, J. B. P.; BRAGA, I. A.; VALLE, D. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.
- MULLA, M. S.; DARWAZEH, H. A.; SCHREIBER, E. T. Impact of new insect growth regulators and their formulations on mosquito larval development in impoundment and floodwater habitats. **Journal American Mosquito Control Association**, v. 5, n. 1, p. 15-20, 1989.
- NARAHASI, T. Nerve membrane Na<sup>+</sup> channels as targets of insecticides. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, p. 236-241, 1992.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590, 1978.

Organización Mundial de la Salud. **Resistencia de vectores de enfermedades a los plaguicidas (15o Informe Del Comité de Expertos de la OMS en Biología de los Vectores y Lucha Antivectorial)**. Serie de Informes Técnicos, No 818. 1992.

PAIVA, M. H. S. **Monitoramento do gene que codifica a esterase envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil**. Dissertação de Mestrado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Recife, 89 p. 2006.

PALCHICK, S. **Chemical Control of Vectors In: The Biology of Disease Vectors**. Colorado: University Press of Colorado; 1996.

PEREIRA DA-CUNHA M, LIMA, J. B. P., BROGDON, W. G., MOYA, G. E.; VALLE, D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, p. 441-444, 2005.

PICCOLI, C. F. **Análise de mutações no fragmento do gene que expressa a proteína transmembrana de canal de sódio (*kdr*) e da suscetibilidade a inseticidas em populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. Dissertação de mestrado. Curitiba, 83p. 2010.

PINHEIRO, V. C. S. **Dengue em Manaus (AM): Recipientes Preferenciais de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) e Avaliação das Medidas de Controle – Temefós e Termonebulização**. Dissertação de Mestrado, Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade da Amazônia, 2000.

POLANCZYK, R. A.; GARCIA, M. O.; ALVES, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis Berliner* no controle de *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 813-816, 2003.

POLETTI, M.; OMOTO, C. Resistência de inimigos naturais a pesticidas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 30, p. 16-26, 2003.

POLO-PC: **Probit or Logit analysis** [software]. Berkeley, CA, LeOra Software, 1987.

PRIETO, A. V.; M. F. SUÁREZ; R. GONZALEZ. Susceptibilidad de dos poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Cali (Valle, Colombia) a Temefos (Abate®) y Triflumuron (Starycide®). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 28, n. 2, p. 175-178. 2002.

RAJATILEKA, S.; BLACK, W.C.; SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K.; TRONGTOKIT, Y.; APIWATHNASOM, C.; MCCALL, P.J.; RANSON, H. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. **Acta Tropica**, v. 108, p. 54-57, 2008.

RANSON, H.; JENSEN, B.; VULULE, J.M.; WANG, X.; HEMINGWAY, J.; COLLINS, F.H. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. **Insect Molecular Biology**, v. 9, p. 491–497, 2000.

RATHBURN JÚNIOR, C. B. Insecticide formulations – types and uses: a review. **Journal of American Mosquito Control Association**, v. 1, n. 1, p. 80-84, 1985.

RAYMOND, M.; CHEVILLON, C.; GUILLEMAUD, T.; LENORMAND, T.; PASTEUR, N. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 353, p. 1707-11, 1998.

REITER, P.; AMADOR, M. A.; COLON, N. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. **Journal of American Mosquito Control Association**, v.7, n.1, p. 52-55, 1991.

RODRÍGUEZ, M. M.; BISSET, J.; FERNANDEZ, D. M.; LAUZÁN, L.; SOCA, A. Detection of Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. **Journal of Medicine Entomology**, v. 38, n. 5, p. 623-628, 2001.

ROSE, R. I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 17-23, 2001.

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

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. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology**, v.16, p. 785–798, 2007.

SAMUEL, P. P.; TYAGI, B. K. Diagnostic methods for detection and isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. **Indian Journal Medical Research**, v. 123, p. 615-628, 2006.

SANTOS, J. M. M. **Variabilidade Genética em Populações Naturais de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae)**. Tese de Doutorado. PPG INPA/FUA, Manaus. 150 p. 1992.

SANTOS, M. A. T.; ÁREAS, M. A.; REYES, F. G. Piretróides – uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

SANTOS, R. L. C; FAYAL, A. S.; AGUIAR, A. E.; VIEIRA, D. B. R.; PÓVOA, M. M. Avaliação do efeito residual de piretróides sobre anofelinos da Amazônia brasileira. **Revista Saúde Pública**, v. 41, n. 2, p. 276-83, 2007.

SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DA-COSTA, J. B. N.; Caixeiro, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Revista Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; ROSA, A. P. A. T. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 245–246, 1986.

SESA-PE. Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco. **Estruturação do Plano de Erradicação de *Aedes aegypti* no Brasil (PEAa), em Pernambuco, Recife**. 1997.

SILVA, I. G. et al. Provas biológicas para verificar a susceptibilidade do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) ao Cythion. **Revista de Patologia Tropical**, v. 26, p. 31-35, 1997.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intense care unit. *Jornal de Pediatria*, v. 83, suplemento 2, p. 22-35. 2007.

SODERLUND D. M., BLOOMQUIST, J. R. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. **Annual Review Entomology**, v. 34, p. 77-96, 1989.

SODERLUND, D. M. Pyrethroides, knockdown resistance and sodium channels. **Pesticide Management Science**, v. 64, p.610-616, 2008.

SODERLUND, D.M.; KNIPPLE, D.C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 33, p. 563–577, 2003.

SOUZA-POLEZZI, R.C.; BICUDO, H.E.M.C. Genetic variation along time in a Brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), detected by changes in the esterase patterns. **Genetica**, v. 125, p. 43-53, 2005.

STEINER, W. W. M.; JOSLYN, D. J. Electrophoretic techniques for the genetic study of mosquitoes. **Mosquito News**, v. 39, n. 1, p. 35-54, 1979.

SUCEN – Superintendência de controle de endemias. **Classificação de inseticidas (2010)** Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/down/segtrb/sequi2.pdf>> Acesso em: 20/11/2010.

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias – Secretaria de estado da saúde. **Manual de Vigilância Entomológica de *Aedes aegypti***. São Paulo, 1997. Disponível em: <[http://www.sucen.sp.gov.br/down/vetores\\_geral/den\\_vetore.pdf](http://www.sucen.sp.gov.br/down/vetores_geral/den_vetore.pdf)> Acesso em: 09/03/2011

VAIS, H.; WILLIAMSON, M. S.; GOODSON, S. J.; DEVONSHIRE, A. L.; WARMKE, J. W.; USHERWOOD, P. N.; COHEN, C. J. Activation of *Drosophila* sodium channels promotes modification by deltamethrin. Reductions in affinity caused by knock-down resistance mutations. **Journal of General Physiology**, v. 115, n. 3, p. 305-318, 2000.

WARE, G. W. **An introduction to insecticides** [monografia na Internet]. 4rd ed. University of Minnesota; 2009. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>> Acesso em: 9/3/2011.

WIKIPÉDIA. Bairro Alvorada, Manaus. Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Alvorada\\_%28Manaus%29](http://pt.wikipedia.org/wiki/Alvorada_%28Manaus%29). Acesso em: 05/10/12

WILKERSON, R.C.; PARSONS, T.J.; KLEIN, T.A.; GAFFIGAN, T.V.; BERGO, E.; CONSOLIM, J. Diagnosis by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina and Brazil. **Journal Medicine of Entomology**, v. 5, n. 32, p. 697-704, 1995.

WILLIAMSON, M. S.; DENHOLM, I.; BELL, C. A.; DEVONSHIRE, L. A. Knockdown resistance (*kdr*) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*) **Molecular and General Genetics**, n. 240, p. 17-22, 1993.

WHO-World Health Organization Expert Committee on Insecticide Resistance of Vectors and Reservoirs of Diseases to Pesticides. **Criteria and meaning of tests for determining the susceptibility or resistance**. Annex of 585 WHO technical report series, WHO/VBC/ 81.6, 4p. 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**. Geneva, WHO/VBC/81.807, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector resistance to pesticides**. WHO Tech. Rep. Ser. **818**, 63p, 1992.

WHO – World Health Organization. **WHO Specifications and evaluations for public health pesticides: temephos**. 2007. Disponível em: <[http://www.who.int/whopes/quality/Temephos\\_eval\\_June\\_2007\\_corr\\_aug160807.pdf](http://www.who.int/whopes/quality/Temephos_eval_June_2007_corr_aug160807.pdf)> Acesso em: 15/11/2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue, countries or areas at risk**. 2009. Disponível em: <[http://gamapsserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_DengueTransmission\\_ITHRiskMap.png](http://gamapsserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png)> Acesso em: 9/3/2011.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann. Eugenics**, v.15, p.323-354, 1951.

YEH, F. C.; YANG, R-C; BOYLE, T. **POPGENE versão 1.3**: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. 1999.