

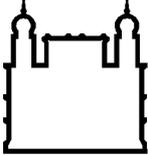
Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Avaliação do efeito da seleção com inibidor de
síntese de quitina e da exposição a doses
parcialmente letais de inseticidas em populações
de campo de *Aedes aegypti***

Thiago Affonso Belinato

Orientadora: Dr^a Denise Valle (IOC)

Rio de Janeiro; maio de 2012



Ministério da Saúde

Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Avaliação do efeito da seleção com inibidor de
síntese de quitina e da exposição a doses
parcialmente letais de inseticidas em populações
de campo de *Aedes aegypti***

Thiago Affonso Belinato

**Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Doutor em
Biologia Parasitária, com área de concentração em Genética e
Bioquímica**

Orientadora: Dra Denise Valle (IOC)

Rio de Janeiro; maio de 2012

Belinato, Thiago Affonso

Avaliação do efeito da seleção com inibidor de síntese de quitina e da exposição a doses parcialmente letais de inseticidas em populações de campo de *Aedes aegypti*

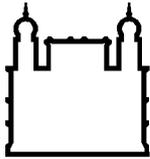
Tese de Doutorado em Biologia Parasitária, área de concentração em Genética e Bioquímica

Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 2012

Número de páginas: ix + 180

Palavras chave: 1. *Aedes aegypti*, 2. resistência a inseticidas, 3. resistência metabólica, 4. inibidor da síntese de quitina, 5. diflubenzuron.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Avaliação do efeito da seleção com inibidor de síntese de quitina e da exposição a doses parcialmente letais de inseticidas em populações de campo de *Aedes aegypti*

Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção de grau em Doutor em Biologia Parasitária, área de concentração: Genética e Bioquímica

Banca Examinadora

Dr Marcos Henrique Ferreira Sorgine

Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Bioquímica Médica

Dr Itabajara da Silva Vaz Junior

Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Departamento de Patologia e Clínica Veterinária

Dr Rafael Maciel de Freitas

FIOCRUZ / Laboratório de Transmissores de Hematozoários

Dr^a Claudia Torres Codeço

FIOCRUZ / PROCC

Dr Alexandre Afranio Peixoto

FIOCRUZ / Laboratório de Biologia Molecular de Insetos



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (Instituto Oswaldo Cruz- IOC) e no Laboratório de Entomologia do Centro de Pesquisa General Dr Ismael da Rocha, Instituto de Biologia do Exército. Foram utilizados recursos da Fundação Oswaldo Cruz, Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM).

“Caminante, son tus huellas
el camino, y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.
Caminante, no hay camino,
sino estelas en la mar.”

António Machado

Dedico este manuscrito à minha família, que inclui meus pais, meus irmãos e todas as pessoas que eu escolhi para viver...

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Pedro e Rosângela, pelo apoio em todos os aspectos da vida.

A todos os amigos do LAFICAVE: Denise, Bento, Jutta, Ademir, Márcia, Isabela, Simone, Luana, Priscila, Diogo, Nathália, Gilberto, Mariana, Helena, Suellen, Aline, Sandrine, Bianca, Ingrid, Renata, André, Luiz Paulo, Felipe, Adriana, Luciana, Gabriela, Diogo, Monique e Letícia.

A Denise Valle, o grande pilar de todo este trabalho e da minha formação. Obrigado por me orientar, ensinar e ajudar com suas boas idéias e dedicação. Tenho muito orgulho de ser seu aluno e espero que nossa parceria (que vem lá dos tempos da Iniciação Científica, não é?) continue sendo produtiva e muito duradoura.

Ao Ademir, que tem grande participação em toda minha formação acadêmica e foi um dos responsáveis pela minha inserção no grupo. Deixo aqui registrado minha imensa gratidão e admiração, tanto pessoal quanto profissional.

Ao Bento, pelo profissionalismo, ótimas ideias e, principalmente, pela boa disposição em ajudar, com toda boa vontade, sempre quando necessário.

A Luana Farnesi, amiga, irmã e companheira desde a graduação. Agradeço a você, por existir, pela amizade intensa e sincera, que cresce a cada dia. Pessoas de sorte são aquelas que têm amigas como a nossa!

A Priscila e Adriana pela grande ajuda na realização dos ensaios bioquímicos e pelas inúmeras risadas.

A Ingrid e Luciana, pela ajuda na dissecação de milhares de espermatozoides de *Aedes aegypti*.

Ao Gilberto, que foi responsável pela alimentação de todas as minhas gaiolas de mosquitos. Figura importante nos momentos de descontração.

A Raquel Fellet pela motivação, carinho e dedicação, fundamentais para a finalização desse manuscrito.

Ao Instituto de Biologia do Exército (IBEx), onde todos os experimentos foram realizados.

Ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) pelo apoio financeiro e técnico para realização deste trabalho.

RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	6
INTRODUÇÃO.....	7
1.1) Aedes aegypti.....	7
1.2) Principais doenças transmitidas por A. aegypti	8
1.2.1) Dengue.....	8
1.2.2) Febre amarela.....	10
1.2.3) Chikungunya.....	11
1.3) Controle de vetores	12
1.3.1) Controle mecânico.....	12
1.3.2) Controle biológico.....	13
1.3.3) Controle químico.....	14
1.4) Alternativas de controle	16
1.4.1) Bactérias entomopatogênicas	17
1.4.2) Reguladores do desenvolvimento de insetos (IGRs).....	18
1.4.2.1) Análogos de hormônio juvenil	19
1.4.2.2) Inibidores da síntese de quitina.....	20
1.5) Resistência a inseticidas	24
1.6) Mecanismos de resistência.....	25
1.6.1) Insensibilidade do sítio alvo	26
1.6.2) Aumento de detoxificação do inseticida.....	29
1.6.2.1) Esterases.....	30
1.6.2.2) Oxidases de função múltipla	31
1.6.2.3) Glutathione-S-Transferases	33
1.6.3) Transportadores ABC	34
1.7) Custo evolutivo da resistência.....	37
1.8) Estratégias de mitigação da resistência a inseticidas.....	39
1.8.1) Misturas de compostos.....	40
1.8.2) Rotação de inseticidas.....	40
1.8.3) Mosaicos.....	41
1.8.4) Uso de altas concentrações.....	41
1.8.5) Controle integrado.....	41
1.8.6) Uso de inseticidas de ação tardia	42
1.9) JUSTIFICATIVA.....	42
2) OBJETIVOS	44
2.1) OBJETIVO GERAL.....	44
2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
3) RESULTADOS.....	45
3.1) ARTIGO 1: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DETOXIFICANTES DE LARVAS DE Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) expostas a doses parcialmente letais de temephos, deltametrina e diflubenzuron	45
3.2) ARTIGO 2 FITNESS EVALUATION OF TWO BRAZILIAN Aedes aegypti field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos.....	77

3.3) ARTIGO 3: POPULAÇÕES DE Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) selecionadas com diflubenzuron, um inibidor da síntese de quitina, apresentam comprometimento de sua viabilidade.....	102
3.4) AVALIAÇÃO DA REVERSÃO DA RESISTÊNCIA AO OP temephos nos grupos não expostos ao diflubenzuron e análise da atividade das enzimas detoxificantes nos grupos selecionados com o ISQ.....	143
3.4.1) <i>Reversão da resistência ao organofosforado temephos em duas populações de campo de A. aegypti mantidas no laboratório na ausência do inseticida.....</i>	144
3.4.2) <i>Avaliação da atividade das principais enzimas detoxificantes em duas populações de campo de A. aegypti selecionadas com diflubenzuron.....</i>	149
4) DISCUSSÃO GERAL	155
5) CONCLUSÕES	160
6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162

Lista de Siglas e Abreviaturas

Ace - acetilcolinesterase
BPU - benzo-fenil-ureias
Bti - *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*
CA - carbamatos
CSI - chitin synthesis inhibitors
DDT - dicloro-difenil-tricloroetano
EST - esterases
GABA - ácido gama-amino-butírico
GST - glutationa S-transferases
ICP - insecticidal crystal proteins
IGR - insect growth regulators
ISQ - inibidor de síntese de quitina
JHA - juvenile hormone analogues
Kdr - Knock-down resistance
MFO - oxidases de função múltipla
MP - matriz peritrófica
OC- organoclorados
OP - organofosforados
PI - piretróides
PTTH - hormônio protoracicotrópico
SNC - sistema nervoso central
SU - sulfonilureias
SUR - sulphonylurea receptor
WHO - World Health Organization

Resumo

Ainda hoje o uso de inseticidas é um componente importante das estratégias de controle de vetores. O organofosforado temephos, por exemplo, é utilizado para controle de populações de *Aedes aegypti* no Brasil desde 1967. Um dos problemas relacionados ao uso intenso de inseticidas por um longo período de tempo é a seleção de indivíduos resistentes. A resistência a inseticidas está, em grande parte, relacionada com o aumento da expansão de *A. aegypti* ao longo das últimas décadas e é desafio atual dos programas de controle do vetor. Outros compostos, com diferentes mecanismos de ação, têm sido empregados nos locais onde as populações encontram-se resistentes aos inseticidas tradicionais. Uma vez que poucos produtos estão disponíveis para controle de *A. aegypti*, entender os mecanismos de resistência relacionados aos principais inseticidas atualmente empregados pode ser fundamental para compreender a evolução da resistência em campo. No presente trabalho, foi avaliada, usando a linhagem Rockefeller e populações de campo de *A. aegypti*, a atividade de enzimas detoxificantes, em resposta a doses parcialmente letais de representantes das principais classes de inseticidas empregados no país: os larvicidas temephos e o inibidor de síntese de quitina (ISQ) diflubenzuron, além do piretróide permetrina. Também foi realizada seleção com diflubenzuron em duas populações de campo, com diferentes níveis de resistência ao OP temephos. Foram investigados, nessas populações, diversos parâmetros do *fitness*, antes e depois da seleção com o ISQ. Verificamos que todas as populações estudadas apresentaram altos níveis de resistência aos inseticidas químicos tradicionais, mas não ao diflubenzuron. Quando aplicado em larvas, temephos provocou diminuição progressiva da atividade de acetilcolinesterase e de esterases, confirmando reação, com OP, dos substratos utilizados nas avaliações do monitoramento dos mecanismos de resistência. Diflubenzuron provocou mudanças no perfil da atividade de GST e MFO em Rockefeller e em uma população de campo. Além disso, populações selecionadas com o ISQ apresentaram aumento da atividade destas duas classes de enzimas. Esses dados apontam para a potencial participação de GST e MFO na metabolização de diflubenzuron. Também verificamos que a resistência a temephos está associada a comprometimento de diversos parâmetros da biologia dos mosquitos. Reversão da resistência em populações mantidas na ausência do inseticida, aliada à recuperação de diversos aspectos do *fitness*, reforça essa hipótese. Do mesmo modo que temephos, a resistência a diflubenzuron também acarreta problemas no *fitness*. De modo geral, houve redução na taxa de aceitação do repasto sanguíneo, quantidade de sangue ingerido, número de ovos e quantidade de fêmeas inseminadas. Esperamos que os resultados aqui apresentados possam contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos de resistência a inseticidas em populações de campo de *A. aegypti* e para promover o desenho de estratégias de controle diferenciadas e racionais do vetor.

Abstract

Insecticides still play an important role in vector control strategies. For instance, in Brazil, the organophosphate (OP) temephos has been employed since 1967 against *Aedes aegypti*. One major consequence related to the intense use of insecticides for long periods is selection of resistance. Insecticide resistance is associated to *A. aegypti* expansion over the past decades and is a current challenge for vector control programs. Compounds with different mechanisms of action are presently being employed in localities where vector populations are resistant to traditional insecticides. Since there are few products available for *A. aegypti* control, knowledge of the mechanisms of resistance to insecticides currently in use could be essential to understanding the evolution of resistance in the field. In this study, the activity of detoxifying enzymes of *A. aegypti* Rockefeller strain and field populations was evaluated after exposure to partially lethal doses of three insecticides, representative of the main classes employed in the country: the OP temephos, the chitin synthesis inhibitor (CSI) diflubenzuron and the pyrethroid (PI) permethrin. Selection with diflubenzuron of two field populations, with distinct temephos resistance levels was also performed. Several fitness parameters were investigated in these populations, before and after selection with the ISQ. We previously identified, in both populations, high resistance levels to the conventional chemical insecticides, but not to diflubenzuron. When applied to larvae, temephos caused progressive decrease in the activity of acetylcholinesterase and esterases, confirming that substrates used in routine monitoring of resistance mechanisms indeed reacts with OP. Diflubenzuron caused changes in the activity profile of MFO and GST in both Rockefeller strain and in a field population. In addition, populations selected with the ISQ showed increased activity of these two enzyme classes. These data point to the potential participation of MFO and GST in diflubenzuron metabolism. We also found that temephos resistance is associated with the impairment of several parameters of mosquitoes' biology. Reversion of resistance in populations maintained in absence of insecticides, coupled with the recovery of various fitness aspects, supports this hypothesis. As with temephos, diflubenzuron resistance causes fitness problems. Overall, there was a reduction in blood meal acceptance, amount of ingested blood, number of eggs and frequency of inseminated females. Our results may contribute to a better knowledge of insecticide resistance mechanisms in *A. aegypti* field populations and to the development of novel and rational control strategies.

Apresentação da dissertação

Esta tese apresenta o estudo da eficácia de diflubenzuron, um inibidor da síntese de quitina (ISQ), sobre duas populações de campo de *A. aegypti* resistentes ao piretróide deltametrina e com diferentes níveis de resistência ao OP temephos. Essas duas populações foram selecionadas em laboratório com o ISQ e a evolução da resistência ao longo das gerações e seu impacto em diversos parâmetros da biologia de *A. aegypti* foram verificados. O efeito de doses parcialmente letais de três classes de inseticidas sobre a atividade, em larvas de *A. aegypti*, das principais enzimas relacionadas com a resistência metabólica a inseticidas também foi realizada.

Na introdução da tese, foi apresentado um breve relato sobre o mosquito *A. aegypti* e as principais doenças por ele transmitidas. As metodologias de controle, o problema da resistência a inseticidas, os mecanismos e o custo evolutivo relacionado à aquisição da resistência foram apresentados. A seção Resultados está dividida em quatro capítulos, três dos quais sob a forma de manuscritos, um cuja versão final, revisada, já foi submetida à revista (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz) e dois em preparação. O primeiro capítulo trata do efeito de doses parcialmente letais de três classes de inseticidas sobre a linhagem Rockefeller, padrão de susceptibilidade, e sobre populações de campo. O capítulo seguinte mostra que a resistência de duas populações a OP e PI afeta diversos parâmetros do *fitness*. Estas mesmas populações foram posteriormente selecionadas com diflubenzuron: o terceiro capítulo trata da evolução da resistência em laboratório a este ISQ e os impactos no *fitness* relacionados à resistência. Este texto será submetido ao periódico *PLoS Neglected Tropical Diseases*. O último capítulo dessa seção mostra a atividade das enzimas detoxificantes nos grupos do capítulo anterior, tanto os selecionados com diflubenzuron quanto os grupos controle, mantidos em paralelo sem pressão de seleção com inseticidas. Este capítulo também evidencia a queda do nível de resistência a temephos ao longo das gerações, nos grupos controle, não expostos a diflubenzuron. Seguem-se, após essa seção, uma discussão e uma conclusão gerais, que sintetizam todo o trabalho desenvolvido durante os últimos quatro anos.

Introdução

1.1) *Aedes aegypti*

Mosquitos do gênero *Aedes* spp. possuem ampla distribuição geográfica, compreendendo espécies que vivem desde a região sul até o norte do globo. Algumas espécies desse gênero vivem sob clima extremamente hostil, como alguns lugares de regiões árticas (Service 2008).

Muitas espécies desse gênero são insetos florestais. Entretanto alguns integrantes se adaptaram perfeitamente ao *habitat* humano, e se tornaram importantes transmissores de doenças ao longo do tempo. *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), por exemplo, é o principal transmissor de dengue e febre amarela em áreas urbanas (Barret & Higgs 2007, Jansen & Beebe 2010). Acredita-se que a forma doméstica de *A. aegypti*, proveniente de um ancestral silvestre, tenha se estabelecido no norte da África por volta do ano 200 a.C. Desde então, esta espécie vem se dispersando para várias regiões do mundo. Provavelmente, nas Américas, *A. aegypti* foi introduzido entre os séculos XV e XVII, por meio de navios. Entretanto, a data exata desta introdução ainda permanece incerta (Barret & Higgs 2007).

O clima é um dos fatores relacionados com a distribuição do *A. aegypti*. Essa espécie é mais abundante em regiões tropicais e subtropicais, principalmente entre as latitudes 35°N e 35°S (WHO 2009). Entretanto, a presença humana é fator primordial na distribuição desse vetor, já que trata-se de espécie altamente sinantrópica (Ponlawat & Harrington 2005, Jansen & Beebe 2010).

No ambiente urbano, *A. aegypti* está presente principalmente no domicílio e no peridomicílio, onde encontra condições favoráveis para completar seu ciclo vital (Figura 1). Os adultos são diurnos, com maior atividade crepuscular e nas primeiras horas da manhã (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994, Lima-Camara et al. 2011). Quando grávidas, as fêmeas depositam seus ovos preferencialmente em recipientes artificiais como tanques de armazenamento de água, potes, vasos de plantas e pneus usados (Nelson

1986). Nesses criadouros os ovos, quando secos, podem permanecer viáveis por muitos meses (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994).

Todas essas características biológicas de *A. aegypti*, como preferência por alimentação em humanos, habilidade de realizar posturas em pequenos criadouros e ovos resistentes à dessecação, são responsáveis pela expansão geográfica dessa espécie ao longo dos anos. Esse fato é preocupante, visto que a disseminação desse vetor está diretamente relacionada com o aumento do número de casos de dengue e, possivelmente, de outras arboviroses (Weaver & Reisen 2010).

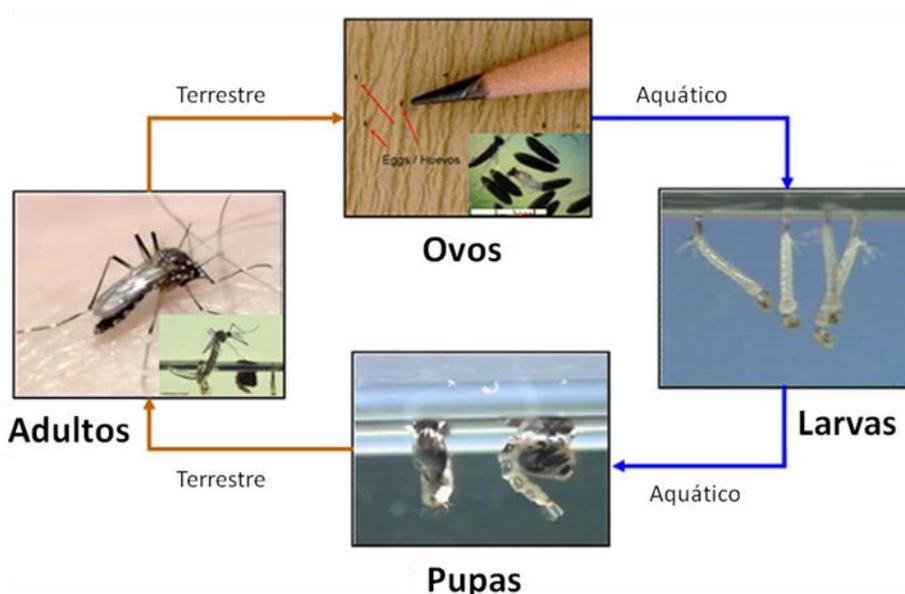


Figura 1: Ciclo de vida do *A. aegypti*. Figura adaptada de http://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m_lifecycle.html

1.2) Principais doenças transmitidas por *A. aegypti*

1.2.1) Dengue

A dengue é uma doença causada por um vírus RNA fita simples positiva do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*. Existem quatro sorotipos desse vírus (DEN1-4) e, diferente de outras arboviroses causadas por

flavivírus, o ser humano é reservatório exclusivo desse patógeno (Guzman et al. 2010).

As primeiras epidemias atribuídas ao vírus da dengue ocorreram em 1780 (Siler et al. 1926 apud Henchal & Putnak 1990). Entretanto, esta doença se tornou mais relevante a partir da década de 1950 (Figura 2), quando foram registradas grandes epidemias em diversos países (Maihuru et al. 2004, Halstead et al. 2007). Desde então, o número de casos de dengue aumenta gradualmente e, provavelmente, a expansão da distribuição de *A. aegypti* ao longo das últimas décadas contribui fortemente para esse panorama (Mackenzie et al. 2004). Outros fatores, como falha no controle de populações do vetor, resistência a inseticidas, globalização, crescimento populacional e urbanização não planejada, também contribuem para o aumento da doença em todo o mundo (Rigau-Perez et al. 1998).

Atualmente, a dengue é a principal arbovirose transmitida por mosquitos e está presente em mais de 100 países (Endy et al. 2010). Estimativas atuais sugerem que cerca de 50 milhões de pessoas contraem a doença anualmente e 2,5 bilhões vivem em área de risco (WHO 2009). Nas Américas, o Brasil tem destaque com relação ao número de casos. Desde 1980, mais de 60% do total de casos de dengue são registrados no país (Nogueira et al. 2007).

Grandes esforços têm sido concentrados para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra os quatro sorotipos do vírus (Thomas & Andy 2011). Entretanto, até o presente momento, todas as vacinas disponíveis estão em fase de testes. Por esse motivo, atualmente, a única maneira de combater a dengue é por meio do controle do vetor.

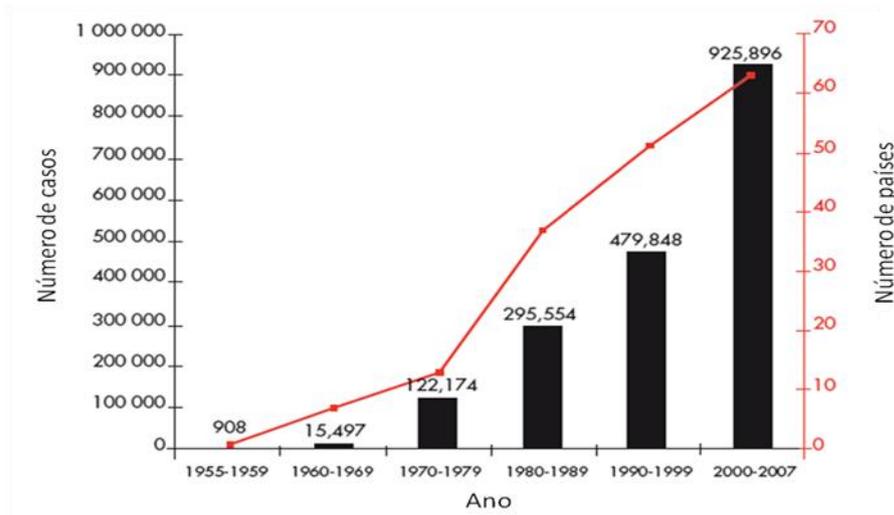


Figura 2: Número anual médio de casos confirmados de dengue/dengue hemorrágica e número de países afetados pela doença entre 1955-2007. Figura adaptada de WHO (2009); Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.

1.2.2) Febre amarela

Assim como o vírus da dengue, o vírus da febre amarela é um flavivírus, da família Flaviviridae. Fortes evidências indicam que tem origem na África, tendo chegado aos países do Novo Mundo durante o tráfico de escravos (Bryant et al. 2007). Aqui, iniciou-se ciclo de transmissão desse vírus entre primatas e mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, representando uma ameaça até os dias de hoje (Bryant et al. 2003).

A febre amarela foi, entre os séculos XV e XIX, a doença mais temida, devido ao grande número de epidemias que ocorreram nos trópicos, subtropicais e em países da Europa (WHO 1998). Em 1848, Josiah Clark Nott sugeriu que esta doença provavelmente era transmitida por mosquitos. Pouco tempo depois, em 1881, Carlos Finlay, um cientista cubano, publicou uma série de hipóteses sobre a possibilidade de transmissão via mosquitos. A confirmação de *A. aegypti* como vetor dessa arbovirose em áreas urbanas só ocorreu em 1927 (Gardner & Ryman 2010).

A história da febre amarela mudou radicalmente em 1937, quando uma vacina extremamente eficaz (17D) foi desenvolvida. A partir desse momento, intensas campanhas de vacinação foram responsáveis pelo controle

da doença em diversas regiões (Barrett & Teuwen 2009). Entretanto, programas de vacinação devem ser realizados continuamente, já que o ciclo silvestre da doença permanece nos trópicos. No Paraguai, por exemplo, uma epidemia ocorreu em 2008, mas foi rapidamente controlada por meio de vacinação em massa (Weaver & Reisen 2010).

1.2.3) Chikungunya

O vírus chikungunya pertence ao gênero alphavirus (família Togaviridae) e é transmitido para humanos por meio de picadas de mosquitos do gênero *Aedes* spp. Os seres humanos funcionam como reservatórios durante os períodos epidêmicos, mas vários vertebrados são reservatórios naturais deste vírus. Alguns exemplos são espécies de roedores, macacos e até de pássaros (Pialoux et al. 2007). Os principais vetores de chikungunya são *A. aegypti* e *A. albopictus*. Entretanto, outras espécies do gênero *Aedes* e algumas do gênero *Culex*, *Anopheles* e *Mansonia* também podem participar da transmissão (Jupp et al. 1981, Jupp & McIntosh 1990).

O primeiro registro de epidemia de chikungunya ocorreu na Tanzânia em 1952-53 (Robinson 1955). A partir desse evento, diversas epidemias foram relatadas em países da África e da Ásia, principalmente depois de 2000 (Pialoux et al. 2007, Simon et al. 2008, Ching Ng & Hapuarachchi 2010). Nos países americanos não houve, até o momento, qualquer epidemia de chikungunya. Na Europa, em 2007, um caso importado gerou transmissão autóctone, afetando cerca de 200 pessoas na Itália (Rezza et al. 2007). Este e outros casos importados têm sido registrados em outros países da Europa, principalmente em pessoas que estiveram em locais onde a doença é endêmica. Este fato preocupa autoridades, principalmente aquelas da América, onde os principais vetores de chikungunya estão presentes (Pialoux et al. 2007). Além disso, como a dengue é endêmica em muitos países das Américas, o risco de disseminação de chikungunya é grande, já que os ciclos de transmissão dessas duas arboviroses compartilham muitas semelhanças (Weaver & Reisen 2010).

1.3) Controle de vetores

O controle de insetos prejudiciais ao homem teve início na agricultura. Há cerca de 2500 anos a.C., os seres humanos começaram a usar os primeiros compostos, como o enxofre, para proteger suas plantações. Em Saúde Pública, os primeiros métodos de controle datam de 1800, com a utilização de querosene e verde de paris diretamente nos criadouros de mosquitos (Floore 2006). Entretanto, o controle sistemático e intenso desses insetos data, principalmente, do século passado (Braga & Valle 2007a).

As medidas de controle podem ser direcionadas contra as formas imaturas e/ou adultas. Os métodos mais utilizados no combate aos vetores são: 1) controle mecânico, 2) controle biológico e 3) controle químico (Neves et al. 2001, Floore 2006, Service 2008).

1.3.1) Controle mecânico

Controle mecânico de vetores é, muitas vezes, referido como controle físico. Consiste, basicamente, na identificação e eliminação dos possíveis criadouros dos mosquitos.

Dentre todas as alternativas, é considerada a melhor opção a longo prazo, desde que ocorra participação contínua da população. Nesse caso, pode reduzir ou tornar desnecessário o uso de outros métodos de controle (Floore 2006). Entretanto, o uso dessa metodologia é inviável ou extremamente difícil, quando os insetos utilizam criadouros naturais. Algumas espécies de mosquitos, por exemplo, podem se criar em ocos de árvore ou em grandes coleções de água. Por esse motivo, a localização e remoção desses criadouros não são viáveis ou podem resultar em grandes desequilíbrios ambientais (Service 2008).

Por outro lado, no caso de espécies sinantrópicas, essa estratégia pode ser extremamente útil, já que os criadouros podem ser facilmente removidos. Esse é o caso de *A. aegypti*, que usa preferencialmente recipientes de origem humana, como pneus, potes plásticos, calhas de água ou qualquer

outro reservatório que possa acumular água, para depositar seus ovos. Apesar de ser uma alternativa barata e ecologicamente correta, geralmente é negligenciada, pois depende da sensibilização e de intensa participação da população (Pérez et al. 2007).

1.3.2) Controle biológico

Controle biológico consiste no uso de organismos com a finalidade de diminuir a densidade populacional de insetos. Muitas vezes o conceito de controle biológico é confundido com controle natural, já que nos dois casos estão envolvidos organismos que afetam os vetores. Quando se trata de controle natural, não há interferência humana. Por outro lado, no controle biológico existe, artificialmente, introdução de organismos para que ocorra diminuição da densidade populacional do inseto-alvo (Service 2008).

O controle biológico pode ser realizado com o uso de predadores naturais ou patógenos, como fungos, vírus, protozoários e bactérias (Becnel & White 2007, Lacey 2007, Service 2008). No caso de predadores naturais, o uso de peixes larvófagos tem destaque. Antes do uso de DDT, a principal estratégia de controle de anofelinos baseava-se no uso de peixes (Gosh & Dash 2007). Entretanto, com o advento dos inseticidas sintéticos, esta metodologia foi parcialmente negligenciada. Apenas nas últimas duas décadas, devido aos problemas derivados do uso intenso de inseticidas, como resistência e poluição ambiental, houve aumento da utilização de peixes larvófagos. Atualmente, diversos países usam apenas esta estratégia para controlar vetores ou, ainda, como parte do controle integrado (Rozendaal 1997).

Gambusia affinis (Baird & Girard, 1853) e *Poecilia reticulata* Peters, 1859 são as espécies mais eficazes e, por isso, bastante utilizadas no controle de vetores. Ambas são vivíparas e pertencem à família Poeciliidae (Walton 2007). *Gambusia affinis* suporta grandes variações de temperatura, é tolerante à salinidade, mas não resiste à poluição. Por outro lado, *P. reticulata* está mais adaptada a temperaturas mais elevadas e pode sobreviver em águas com certo nível de poluição (Rozendaal 1997). Além dessas espécies, existem outras

com diferentes características biológicas. Por esse motivo, a escolha ideal deve ser baseada na biologia do inseto e na capacidade adaptativa do peixe.

Alguns estudos mostram que o uso de peixes larvófagos pode representar uma estratégia viável no controle de vetores. Lima et al. (2010), verificaram que *Betta splendens* Regan, 1910 pode ser eficaz no controle de *A. aegypti*, já que a presença de formas imaturas em depósitos de água diminuiu consideravelmente nos locais onde o peixe foi inserido. Gosh et al. (2005) também constataram que *Poecilia reticulata* pode diminuir expressivamente populações de anofelinos. Nas áreas onde houve intervenção com essa espécie, houve redução significativa de casos de malária.

Apesar de ser uma alternativa viável, o uso de peixes predadores, por si só, não se sustenta. Isso se deve ao fato de que as populações de insetos podem permanecer em baixas densidades e que, muitas vezes, os peixes não conseguem se manter por muito tempo nos criadouros. Além disso, a introdução de espécies exóticas pode ocasionar diversas alterações ambientais. *Gambusia affinis*, por exemplo, é nativa do sul dos EUA e do norte do México, mas já foi introduzida em mais de 70 países com a finalidade de controle de larvas de mosquitos (Service 2008). Nesses países, esse peixe é responsável pela alteração da biota aquática em função da predação de invertebrados e vertebrados aquáticos (Hoodle 2004).

1.3.3) Controle químico

O controle de vetores por meio de inseticidas é a estratégia mais empregada para diminuição da transmissão de doenças como malária, dengue, leishmaniose e doença de Chagas (van den Berg et al. 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as principais classes de inseticidas utilizadas em Saúde Pública são: organoclorados (OC), organofosforados (OP), carbamatos (CA), piretróides (PI), reguladores do crescimento dos insetos (IGR, sigla do termo em inglês: "Insect Growth Regulators") e os inseticidas derivados de bactérias (*Bacillus thuringiensis israelensis* e *Bacillus sphaericus*) (WHO 2009).

O primeiro inseticida usado no controle de vetores com ação residual foi o DDT, um organoclorado. Este inseticida possui grande espectro de ação e foi empregado em larga escala entre 1940 e 1970. Após esse período, o DDT começou a ser usado cada vez menos, principalmente devido aos problemas ambientais a ele atribuídos (Braga & Valle 2007a). No Brasil, seu uso foi sendo proibido gradualmente: a primeira restrição ocorreu em 1985, na agricultura; em 1997, no controle de vetores; e, em 1998, foi banido para toda finalidade (Guimarães et al. 2007). Apesar disso, em muitas localidades, seu uso é aprovado pela OMS, especialmente na África onde existe grande incidência de malária (WHO 2007).

Além dos organoclorados, os organofosforados e os piretróides são, atualmente, as classes de inseticidas mais utilizadas (Figura 3). Nos últimos 10 anos, os países das Américas foram os que mais empregaram estes produtos para controle de vetores de dengue (WHO 2009). As demais classes de inseticidas são ainda pouco utilizadas no controle. Os IGRs, por exemplo, incluem compostos que foram descobertos há décadas e mesmo assim seu uso ainda é bastante limitado (van de Berg et al. 2012).

No Brasil, o controle de *A. aegypti* teve início no começo do século XX, devido às epidemias de febre amarela. Grande avanço ocorreu depois da Segunda Guerra Mundial, pois nesse momento se iniciou a aplicação do organoclorado DDT. De acordo com a Organização Panamericana de Saúde, *A. aegypti* foi erradicado em 22 países nas Américas nesse período (PAHO 1994). Este culicídeo chegou a ser erradicado duas vezes do território brasileiro desde o início dos programas sistematizados de controle. Entretanto, atualmente, essa espécie ocupa grande parte do país, com distribuição semelhante à da década de 1940 (Guzman & Couri 2003, Braga & Valle 2007b).

O larvicida temephos (OP) tem sido usado no controle desse vetor desde 1967. Inseticidas do grupo dos piretróides também são empregados com finalidade de controle, contra adultos, através de aplicação espacial (Braga & Valle 2007b). O uso indiscriminado e por um longo período desses compostos resultou na disseminação de resistência em diversas populações de campo (Macoris et al. 1999, Lima et al. 2003, Braga et al. 2004, Da-Cunha et al. 2005,

Macoris et al. 2007). Por esse motivo, atualmente, novas alternativas de controle têm sido utilizadas. Diflubenzuron, um inibidor da síntese de quitina, foi recentemente introduzido no país com essa finalidade (Ministério da Saúde 2009).

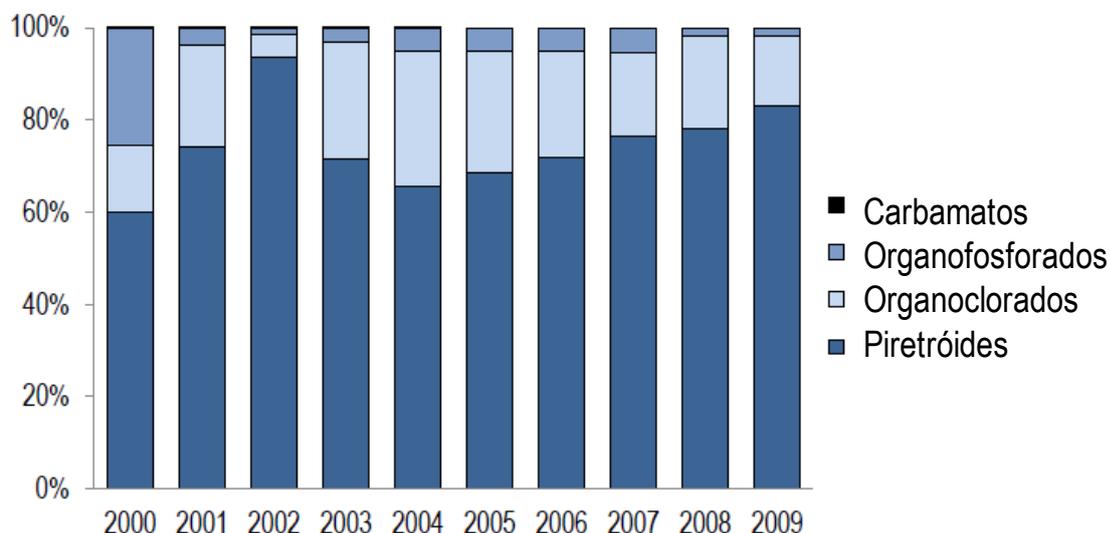


Figura 3: Uso global anual das quatro principais classes de inseticidas químicos entre 2000 e 2009. Figura adaptada de van den Berg et al. (2012).

1.4) Alternativas de controle

A resistência a inseticidas representa um entrave para os programas de controle. Muitas populações de insetos, vetores de doenças, encontram-se resistentes às principais classes de inseticidas utilizadas. Por esse motivo, outras medidas, de natureza biológica ou química têm sido cada vez mais empregadas. Dentre as alternativas atualmente disponíveis, tem destaque o uso de bactérias entomopatogênicas, como *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) e *Bacillus sphaericus* (Lacey 2007). Outro grupo importante é o dos reguladores de crescimento de insetos, que compreendem, principalmente, os análogos de hormônio juvenil (JHA, do inglês *Juvenile Hormone Analogues*) e os inibidores da síntese de quitina (CSI, do inglês *Chitin Synthesis Inhibitors*) (Graf 1993).

1.4.1) Bactérias entomopatogênicas

Em Saúde Pública, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é, indubitavelmente, o patógeno mais utilizado no controle de vetores. Esta bactéria distingue-se das outras espécies do gênero *Bacillus* devido à presença de uma inclusão parasporal, também conhecida como corpo parasporal ou cristais, que são produzidos simultaneamente durante a esporulação (Schnepf et al. 1998). A atividade larvicida de *Bacillus thuringiensis* ocorre devido à presença de toxinas nessas inclusões parasporais, conhecidas coletivamente como “ δ -endotoxinas” (delta-endotoxinas) ou “ICP” (do inglês, *insecticidal crystal proteins*) (Crickmore et al. 1998, Raymond et al 2010).

Diferente da maioria das cepas de *Bt*, em *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) a inclusão parasporal é arredondada, não tendo forma de cristais (Lacey 2007). Quatro tipos de protoxinas, localizadas em diferentes partes da inclusão parasporal, são encontradas em *Bti* (Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cyt1A). Quando ingeridas pelo inseto, as inclusões parasporais são solubilizadas no intestino e as protoxinas, agora livres, são hidrolisadas por proteases intestinais. As toxinas ativas resultantes se ligam a receptores específicos no tubo digestivo, o que acarreta em desregulação do balanço osmótico das células intestinais, levando à degradação do intestino e à morte do inseto. Este efeito é específico para organismos que têm tais receptores, não se estendendo a seres humanos, peixes ou outros animais (Hofte & Whiteley 1989). Entretanto, estas toxinas não atuam exclusivamente sobre mosquitos e podem afetar outras espécies de dípteros como simulídeos (Cavados et al. 2005) e quironomídeos (Yiallourous et al. 1999). Apesar de *Bti* apresentar grande seletividade, a persistência em campo das formulações atualmente disponíveis para controle é relativamente baixa, fato este que limita seu uso em larga escala contra vetores (Lima et al. 2005).

Outras espécies do gênero *Bacillus* também são eficazes contra mosquitos. *Bacillus sphaericus* é bastante utilizado no controle de *Culex quinquefasciatus* e *Culex pipiens*. Seu uso intenso em países como França, Tunísia, Índia, e China culminou com a resistência de várias populações de insetos (Rao et al. 1995, Yuan et al. 2000, Nielsen-Leroux et al. 2002).

Provavelmente a resistência de populações de campo a *B. sphaericus* relaciona-se à produção, por esta bactéria, de apenas duas toxinas. No caso de *Bti*, a seleção de resistência seria mais complexa, já que esta bactéria produz quatro tipos de toxinas. Vale ressaltar que linhagens resistentes a *B. sphaericus* não apresentam resistência cruzada a *Bti* (Wirth et al. 2000).

1.4.2) Reguladores do desenvolvimento de insetos (IGRs)

Na década de 1970, Staal (1975) criou o termo “IGR” para descrever compostos que, independente do seu mecanismo de ação, eram capazes de alterar (acelerando, retardando ou inibindo) processos fisiológicos essenciais ao desenvolvimento do inseto ou de sua progênie (Siddal 1976, Mian & Mulla 1982, Graf 1993, Rozendaal 1997).

Diferente dos inseticidas que atuam no SNC, os IGR não provocam a morte imediata dos insetos. Entretanto, são moléculas extremamente tóxicas especialmente contra os estágios imaturos, já que seus efeitos ocorrem principalmente durante a muda e a metamorfose (Graf 1993). Desse modo, tais compostos requerem mais tempo para reduzir populações de insetos, quando comparados aos inseticidas convencionais (Rozendaal 1997). Apesar dos IGRs afetarem principalmente as larvas dos insetos, há registros na literatura mostrando que adultos sobreviventes a doses parcialmente letais possuem uma série de problemas que comprometem sua viabilidade e reprodução (Vasuki 1992, Vasuki & Rajavel 1992, Vasuki 1999, Belinato et al. 2009, Suman et al. 2010).

Comparativamente aos inseticidas clássicos, os IGR representam um grupo de substâncias mais seguro ao meio ambiente. Em geral, apresentam baixa toxicidade para mamíferos, pássaros, peixes e insetos adultos. No entanto, podem ser tóxicos contra crustáceos e estágios imaturos de insetos aquáticos (Mian & Mulla 1982, Rozendaal, 1997). Desse modo, seu uso é indicado apenas em locais com baixo risco de contaminação de organismos não-alvo.

1.4.2.1) Análogos de hormônio juvenil

O sistema neuroendócrino de insetos é formado por quatro componentes: células neurosecretórias cerebrais, *corpora cardiaca*, *corpora allata* e as glândulas protorácicas. Todos interagem para regular o desenvolvimento e crescimento dos insetos. Uma característica peculiar ao crescimento dos artrópodes é a substituição do exoesqueleto antigo e a reposição por um novo, processo conhecido como ecdise (Carlson & Benthey 1977). Isso ocorre quando a larva (em insetos holometábolos) ou a ninfa (em insetos hemimetábolos) atingem um tamanho crítico. Nesse momento, inicia-se a produção do hormônio protoracicotrópico (PTTH) que, em última instância, acarreta a liberação de ecdisona, o “hormônio da muda”, pelas glândulas protorácicas (Bollenbacher et al. 1987). A presença de ecdisona ativa uma série de processos metabólicos que culminam com a muda do inseto. Este evento, de muda, conta ainda com a participação de um outro hormônio: o hormônio juvenil, que impede a diferenciação do inseto para a forma adulta. No último estágio larval a concentração do hormônio juvenil cai e, durante a metamorfose, na fase de pupa, praticamente não existe mais (Retnakaran et al. 1985). Nos adultos, o hormônio juvenil passa a ser novamente produzido e está relacionado com o desenvolvimento dos ovários, síntese de vitelo e desenvolvimento das glândulas acessórias nos machos (Noriega 2004, Parthasarathy et al. 2009). Aplicações de análogos de hormônio juvenil (JHA), em determinados momentos do desenvolvimento, provocam anormalidades morfológicas irreversíveis que, na maioria dos casos, levam à morte do inseto durante ou depois da metamorfose (Braga et al. 2005). O primeiro JHA produzido comercialmente foi o methoprene (Henrick 2007). Entretanto, outros JHA, como piriproxifen e fenoxicarb, estão disponíveis atualmente (Mulla et al. 1985, Gómez et al. 2011).

Estes compostos afetam principalmente os estágios imaturos (Axtell et al. 1979, Ali et al. 1995, Braga et al. 2005). Entretanto, existem registros na literatura que indicam que adultos sobreviventes a doses parcialmente letais apresentam diversos problemas fisiológicos, como redução da quantidade de fêmeas que realizam repasto sanguíneo, longevidade reduzida, alterações morfológicas e reprodutivas (Arias & Mulla 1975, Sawby et al. 1992,

Sithiprasana et al. 1996, Ritchie et al. 1997). Além disso, aspectos reprodutivos de adultos podem ser afetados quando estes são expostos aos JHAs. Divakar & Rao (1975) verificaram que cerca de 80% dos ovos de *Anopheles stephensi*, quando alimentados com solução de methoprene, eram pequenos, frágeis e esbranquiçados. Bai et al. (2010) verificaram que aplicação tópica de methoprene causa atraso no desenvolvimento dos ovários e na maturação dos ovos de *Anopheles gambiae*. Os autores relacionaram esses problemas com a diminuição da expressão de ecdisteróides nos insetos tratados, já que essas substâncias participam ativamente da vitelogênese.

Existem poucos relatos de resistência a JHA. Dame et al. (1998) verificaram que uma linhagem de *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann, 1821) da Flórida era 14,9 vezes mais resistente do que uma linhagem mantida em laboratório. Vasquez et al. (2009) verificaram que populações de *Culex pipiens pipiens* do Chipre possuíam Razões de Resistência entre 4,6 e 12 para methoprene. Até o presente momento, não existem registros de resistência a JHAs em *Aedes aegypti*. É provável que os poucos casos de resistência a esses compostos estejam relacionados ao uso não corriqueiro em campo desse grupo de inseticidas.

1.4.2.2) Inibidores da síntese de quitina

Depois da celulose, a quitina é o polissacarídeo mais abundante do planeta. Esta molécula não é encontrada somente nos artrópodes, mas também em diversos outros organismos como celenterados, esponjas, nematódeos, moluscos, fungos, protistas e algas (Merzendorfer 2011). A função dessa molécula, nos diferentes grupos taxonômicos, está relacionada com a proteção, sustentação ou revestimento de estruturas biológicas. Por exemplo, a quitina presente na casca de ovos de nematódeos tem função protetora contra possíveis danos físicos ou químicos. Protozoários, quando estão em meio impróprio ou em fase de latência, secretam uma parede cística quitinosa que também os protege do meio externo (Merzendorfer 2011).

Este polissacarídeo é composto por resíduos de N-acetilglicosamina ligados entre si através de pontes glicosídicas. Os polímeros de quitina formam

microfibrilas de 3 nm de diâmetro, estabilizadas por pontes de hidrogênio. De modo geral, a quitina pode ser encontrada em três formas, α , β e γ , que diferem entre si pelo grau de hidratação e disposição e número de microfibrilas (Merzendorfer 2011). A forma α é a mais abundante na natureza, encontrada principalmente na parede celular de fungos e na cutícula dos artrópodes. As formas β e γ , por sua vez, são abundantes na estrutura de sustentação interna de lulas (“*squid pens*”) e em casulos de insetos, respectivamente (Merzendorfer & Zimock 2003, Merzendorfer 2011).

A quitina é considerada um dos componentes mais importantes do exoesqueleto dos artrópodes. A associação desse polímero com proteínas confere forte rigidez ao exoesqueleto e, por esse motivo, capacidade de crescimento limitada (Chapman, 1998). Outras estruturas, como traqueias, casca de ovos e matriz peritrófica (MP), também possuem quitina em sua composição.

A MP é uma camada secretada por células do epitélio intestinal de muitos organismos, incluindo insetos, nematódeos, anelídeos e moluscos (Merzendorfer 2011). É constituída por um complexo de proteínas, glicoproteínas e proteoglicanas que se associam a microfibrilas de quitina (Clements 1992). Dois tipos de MP são encontrados em insetos, a do tipo 1 e a do tipo 2). A MP tipo 1 é sintetizada por todo o intestino, e é encontrada em Coleoptera, Dictyoptera, Ephemeroptera, Hymenoptera, Odonata, Orthoptera, Phasmida, larvas de Lepdoptera e adultos hematófagos de Diptera. Por outro lado, a MP tipo 2 é produzida exclusivamente por células especializadas da cárdia, uma área localizada entre o esôfago e o intestino anterior. É encontrada em Dermaptera, Isoptera e larvas de Diptera (Hegedus et al. 2009).

A MP desempenha importantes funções, pois participa na digestão e protege o intestino contra danos mecânicos, espécies reativas de oxigênio e microrganismos patogênicos. Com exceção dos hemípteros, tisanópteros e lepidópteros adultos, a maioria dos insetos possui MP. Em alguns insetos a produção é contínua, mas em outros ocorre somente em resposta à alimentação, como é o caso da MP tipo 1 nos mosquitos hematófagos (Lehane 1997).

Uma vez que a quitina tem papel fundamental em muitos aspectos na biologia de insetos, a inibição ou interferência em processos relacionados ao metabolismo desse polissacarídeo são consideradas importantes para o desenvolvimento de inseticidas com novos mecanismos de ação. Por esse motivo, compostos que interferem com o metabolismo da quitina, como as benzo-fenil-ureias (BPU), têm ganhado atenção especial no controle de vetores de doenças e de pragas agrícolas. O potencial de inibição da síntese de quitina dos BPU foi descoberto na década de 1970, culminando com o desenvolvimento de diflubenzuron, o primeiro BPU utilizado no controle de insetos. A princípio, este BPU foi utilizado no controle de pragas agrícolas e, posteriormente, no controle de moscas, no âmbito da medicina veterinária (Graf 1993).

Apesar de diflubenzuron ter sido descoberto há mais de 40 anos, o mecanismo de ação desse e de outros BPU ainda não é totalmente claro. Outras substâncias que interferem com a síntese de quitina, como polioxinas e nikomicinas, são inibidores *in vitro* diretos da quitina-sintase, uma enzima chave na polimerização da quitina, cujo sítio catalítico é voltado para o meio citoplasmático (Merzendorfer 2011). Diflubenzuron, por outro lado, só inibe a síntese de quitina em sistemas celulares e tecidos intactos (Cohen & Casida 1980, Mayer et al. 1981, Zimock et al. 2005). Além disso, diflubenzuron não inibe a síntese de quitina em fungos, como as polioxinas e nikomicinas (Eck 1979). Há relatos de que os BPU inibem a incorporação de precursores radioativos de quitina, sugerindo que esses compostos podem afetar a polimerização, mas apenas em sistemas *in vivo* (Hajjar & Casida 1978, Clarke & Jewess 1990). Desse modo, é improvável que diflubenzuron seja um inibidor da quitina-sintase.

Estudos mais recentes indicam que diflubenzuron tem estrutura similar a sulfonilureias (SU), fármacos utilizados no tratamento de diabetes tipo II em humanos. Estas moléculas se ligam em receptores de membrana chamados SUR (*sulfonylurea receptor*), bloqueando a entrada de K^+ nas células β . Isso acarreta aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} e estimula a liberação de insulina (Matsumura 2010). Nasonkin et al. (1999) verificaram a presença de um SUR em *Drosophila melanogaster*, homólogo ao

SUR de humanos, sensível a glibenclamida, uma sulfonilureia. Interessantemente, Abo-Elghar et al. (2004) verificaram que glibenclamida inibia a síntese de quitina em ninfas de *Blattella germanica* e a ocorrência de uma série de anormalidades morfológicas classicamente encontradas em insetos tratados com diflubenzuron. Além disso, nesse mesmo estudo, a glibenclamida acarretou diminuição da captação de Ca^{+2} em preparados vesiculares, da mesma forma que diflubenzuron. Nesse sentido, apesar do mecanismo de ação dos CSI não estar elucidado, acredita-se que eles interferem com o fluxo de íons e que isso, de algum modo ainda não conhecido, acarrete diminuição da síntese de quitina.

Ainda que o mecanismo de ação dos BPU não seja claro, existem vários relatos de sua eficiência sobre vetores, principalmente diflubenzuron (Ansari et al. 2005), lufenuron (Wilson & Cryan 1997), novaluron (Mulla et al. 2003) e triflumuron (Martins et al. 2008). Como a quitina está presente em todas as fases do ciclo de vida dos insetos, estruturas como os ovos, matriz peritrófica, espermateca e traqueias dos adultos também podem ser afetadas. Nesse sentido, existem registros de que adultos sobreviventes a doses parcialmente letais de BPU possuem uma série de parâmetros afetados. Vasuki (1992,1999) verificou que *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* e *Aedes aegypti* sobreviventes ao tratamento com hexaflumuron tinham longevidade reduzida, ingeriam menos sangue e, conseqüentemente, colocavam menor quantidade de ovos. Belinato et al. (2009) e Suman et al. (2010) observaram resultados semelhantes em *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* sobreviventes a triflumuron e a diflubenzuron, respectivamente. Quando administrados diretamente a adultos, os BPUs também acarretam problemas nos insetos. Fêmeas alimentadas com esses produtos colocam menor quantidade de ovos e muitos deles não são viáveis (Miura et al. 1976, Wilson & Cryan 1997, Sáenz-de-Cabezón et al. 2006).

O uso de BPUs tem sido intensificado no controle de populações de mosquitos resistentes, já que seu mecanismo de ação é distinto dos inseticidas neurotóxicos tradicionalmente utilizados. Em laboratório, triflumuron e diflubenzuron são eficazes contra populações de *A. aegypti* resistentes ao temephos e à deltametrina (Martins et al. 2008, Belinato et al. 2012).

Entretanto, os mesmos autores verificaram que populações com elevados níveis de resistência ao OP temephos são mais tolerantes a esses IGR (Belinato et al. 2012, Belinato et al. em preparação). Entretanto, Fontoura et al. (2012) não encontraram relação entre o nível de resistência ao temephos e tolerância a novaluron, outro CSI. É provável que tolerância a ISQ seja decorrente de níveis elevados de enzimas detoxificantes, situação muito comum entre populações brasileiras de *A. aegypti*. Tolerância a diflubenzuron associada a Oxidases de Função Mista (MFO), por exemplo, já foi encontrada em moscas (Kotze et al. 1997). Apesar disso, não existem registros demonstrando resistência aos inibidores de síntese de quitina em populações de mosquitos.

1.5) Resistência a inseticidas

O uso de inseticidas ainda é uma ferramenta muito utilizada para diminuir a transmissão de doenças ao ser humano. Além disso, inseticidas exercem papel fundamental na produção de alimentos, pois são utilizados no controle de diversas pragas agrícolas (Perry et al. 2011). Entretanto, um dos grandes problemas do controle químico é a seleção de resistência nas populações de insetos. No início, estima-se que a frequência de alelos relacionados à resistência em uma população seja bastante baixa (Roush & McKenzie 1987). Todavia, com o uso contínuo e massivo de um mesmo produto, a frequência de indivíduos resistentes pode alcançar níveis que comprometem o controle (Price 1991, French-Constant 2006).

Os casos de resistência se intensificaram principalmente depois de 1940, com a introdução dos inseticidas organo-sintéticos. Atualmente, existem registros de resistência em pelo menos 600 espécies de insetos e ácaros. Já foi detectada, somente em *A. aegypti*, resistência a mais de 19 compostos químicos (IRAC 2012). Uma das consequências da aquisição de resistência é a inviabilização do uso de determinados inseticidas. O OP temephos, por exemplo, foi intensamente utilizado no Brasil no controle de larvas de *A. aegypti*, o que resultou na seleção de diversas populações com altos níveis de resistência a esse composto. A resistência a inseticidas é particularmente

grave no caso de *A. aegypti*, espécie que utiliza criadouros de origem antrópica: com a necessidade de aprovação dos larvicidas contra *A. aegypti* para uso em água potável, o número de compostos disponíveis atualmente é extremamente reduzido. Por esse motivo, é essencial manter a vida útil desses compostos em campo (Perry et al. 2011).

Além disso, muitas vezes, a resistência de um determinado organismo pode ser manifestada para dois ou mais compostos químicos distintos, o que chamamos de resistência cruzada. Este fenômeno ocorre quando um mesmo mecanismo confere resistência a mais de um produto. Esta situação tem sido registrada com frequência (Kasai et al. 2007, Ocampo et al. 2011) e representa uma dificuldade adicional ao controle de vetores em geral, pois tende a limitar ainda mais os inseticidas disponíveis para uso em Saúde Pública.

Uma das formas racionais de contornar a resistência de vetores é a mensuração periódica do *status* de susceptibilidade dos insetos, associada à elucidação dos potenciais mecanismos de resistência envolvidos. Tais estudos podem ajudar na definição de estratégias de controle que possibilitem o manejo adequado antes que a resistência a um produto alcance um limiar que dificulte ações no campo (Braga et al. 2004).

1.6) Mecanismos de resistência

A resistência a inseticidas é um fenômeno genético, envolve mutações que afetam a metabolização ou o sítio alvo dos diferentes produtos (ffrench-Constant et al. 2004, Li et al. 2007). Existem quatro mecanismos clássicos de resistência a inseticidas descritos: resistência comportamental, redução da penetração do inseticida, insensibilidade do sítio-alvo e aumento da detoxificação do inseticida (Price 1991, McKenzie & Batterham 1994, Hemingway 2000, Hemingway & Ranson 2000, ffrench-Constant et al. 2004, Li et al. 2007, Bass & Field 2011). Os dois últimos são considerados os mecanismos mais relevantes e, sozinhos ou combinados, podem conferir resistência, muitas vezes em altos níveis, a todas as classes de inseticidas químicos disponíveis (Hemingway et al. 2004). Além disso, pesquisas indicam

que transportadores ABC também podem estar relacionados com a resistência a inseticidas, tanto em pragas agrícolas quanto em vetores de saúde pública.

De modo geral, três fatores, quantitativos ou qualitativos, são responsáveis pela resistência a inseticidas:

- a) Amplificação gênica: corresponde a um aumento do número de cópias de um gene que codifica alguma enzima envolvida com a resistência. A amplificação gênica de esterases, relacionada com a resistência a inseticidas, é bastante encontrada em mosquitos (Paton et al. 2000).
- b) Expressão gênica alterada: ocorre devido a mutações pontuais, inserções ou deleções na região promotora dos genes causando mudanças nos níveis de expressão gênica. Alteração de expressão de MFO devido a mudanças na região promotora, por exemplo, já foi vista em *Drosophila melanogaster* (Li et al. 2007).
- c) Mudança estrutural: ocorre devido a mutações na região codificante dos genes relacionados à resistência. Neste caso, ocorre uma mudança estrutural na enzima que aumenta sua afinidade pelo substrato, potencializando sua atividade. Mudanças qualitativas em enzimas envolvidas com resistência a inseticidas já foram encontradas em diversos insetos (Hemingway et al. 2004).

1.6.1) Insensibilidade do sítio alvo

Este tipo de resistência ocorre quando mutações acarretam mudanças nas moléculas alvo do inseticida ocasionando, geralmente, diminuição ou bloqueio da interação com seu sítio de ação (Beatty & Marquadt 1996). Organofosforados (OP) e carbamatos (CA), por exemplo, têm como sítio alvo a enzima acetilcolinesterase (Ace). A Ace está presente em uma grande variedade de animais, como mamíferos, pássaros, répteis, peixes e insetos (Fukuto 1990). Esta enzima é responsável pela rápida degradação hidrolítica do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses, acarretando interrupção momentânea do impulso nervoso (Soreq & Seidman 2001). Quando insetos entram em contato com OP e CA, a Ace fica inibida e não é capaz de hidrolizar

a acetilcolina. Desse modo, grande quantidade do neurotransmissor fica acumulada nas sinapses, acarretando impulsos nervosos repetitivos que podem levar à morte (Fukuto 1990). Muitas vezes, a resistência a OP e CA é causada por mudança estrutural da Ace, decorrente de mutações, de modo que os inseticidas não reconhecem mais essa enzima (Hemingway & Ranson 2000).

Inicialmente, a maioria das alterações na Ace relacionadas com resistência a inseticidas foram descritas em *Drosophila melanogaster* (Price 1991). Várias mutações já foram detectadas e, sozinhas ou combinadas, são responsáveis por diferentes níveis de resistência (Walsh et al. 2001). Estudos indicam que insetos podem possuir dois genes que codificam acetilcolinesterases (*ace-1* e *ace-2*) (Weill et al. 2002). Mosquitos apresentam ambos, mas a maioria dos trabalhos mostra que apenas mutações em *ace-1* estão diretamente relacionadas com a resistência a inseticidas (Weill et al. 2002, 2003, Ahoua Alou et al. 2010, Alout et al. 2011). Até o presente momento, em mosquitos do gênero *Aedes* não existem registros de mutações em Ace relacionadas com a resistência a inseticidas.

Organoclorados e piretróides também atuam no SNC dos insetos. Os OC são divididos em três grupos: 1) DDT e seus análogos, 2) Hexaclorohexanos e 3) Ciclodienos. Aparentemente, o DDT, seus análogos e os hexoclorohexanos atuam diretamente no canal de sódio (Figura 4), mantendo sua conformação aberta, impedindo o fluxo normal de íons. Por outro lado, os ciclodienos atuam no receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA), impedindo a entrada de íons cloreto nos neurônios (Ware & Whitacre 2004). O mecanismo de ação dos PI é semelhante ao do DDT, pois também atuam mantendo o canal de sódio na sua conformação aberta. Em todos os casos, quando insetos estão expostos aos OC e PI, a transmissão de impulsos nervosos torna-se repetitiva, provocando paralisia, convulsões e morte do inseto.

O principal mecanismo de resistência a esses compostos se dá através de mutações que alteram a afinidade desses compostos pelo seu receptor. Nesse caso, os insetos sofrem paralisia momentânea seguida de recuperação completa de sua locomoção ("*Knock-down resistance*" - *Kdr*)

(Busvine 1951). A primeira mutação identificada e relacionada ao fenótipo *kdr* foi consequência de uma substituição de uma leucina por uma fenilalanina no segmento S6 do domínio II do canal de sódio de *Musca domestica* (Williamson et al. 1996). Outras mutações no gene do canal de sódio também estão relacionadas com resistência a PI. Diversas populações de *A. aegypti*, por exemplo, possuem substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 1016, que também contribui para resistência a essa classe de inseticidas (Garcia et al. 2009, Martins et al. 2009).

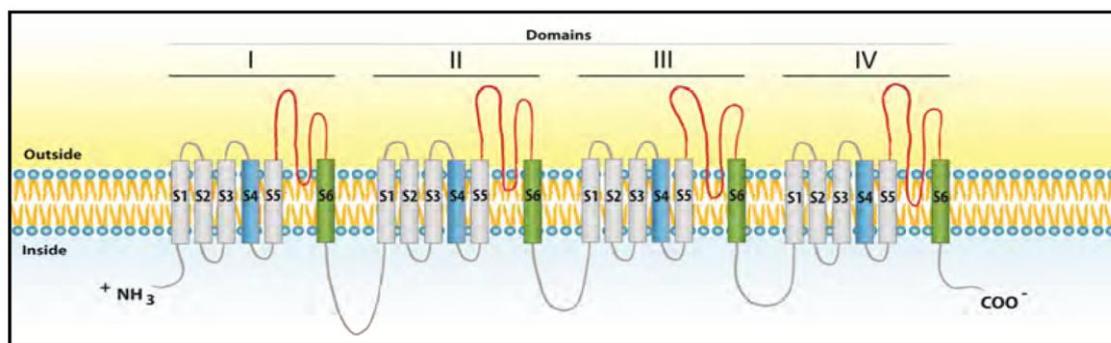


Figura 4: Estrutura do canal de sódio regulado por voltagem. Esta proteína possui quatro domínios homólogos (I - IV), cada qual com seis segmentos hidrofóbicos (S1 - S6). Figura retirada de Martins & Valle (2012).

Resistência a ciclodienos envolvendo mutações em receptores de GABA também já foram documentadas. Os receptores de GABA são canais de cloro envolvidos com a interrupção do estímulo nervoso. Quando o GABA se liga nesses canais, ocorre entrada de íons Cl⁻, deixando a membrana hiperpolarizada. Ciclodienos, como dieldrin, se ligam nos receptores de GABA e impedem o influxo de Cl⁻, deixando a membrana do axônio sensível a impulsos nervosos repetitivos, o que pode culminar com a morte dos insetos (Bermudez et al. 1991). Já foram detectados, em *D. melanogaster*, alelos relacionados com resistência a dieldrin. A resistência decorre, principalmente, de substituição de aminoácido (A301S) no receptor de GABA, o que provoca mudança de afinidade pelo inseticida (French-Constant et al. 1993).

1.6.2) Aumento de detoxificação do inseticida

Todos os organismos, desde bactérias até os seres humanos, desenvolvem uma resposta transcricional coordenada quando entram em contato com algum tipo de composto tóxico presente no meio ambiente. Estes compostos, também conhecidos como xenobióticos, podem entrar no corpo através de contato físico, inalação ou ingestão. Toxinas de plantas, poluentes químicos e pesticidas são os principais exemplos de xenobióticos que podem afetar os seres vivos (Misra et al. 2011).

Algumas classes de enzimas desempenham função protetora contra os danos potenciais que estes compostos podem vir a causar. Estas enzimas metabolizam, eliminam e detoxificam, através de um processo conhecido como biotransformação. Basicamente, neste processo, os xenobióticos passam por uma série de etapas enzimáticas que os transformam em substâncias polares, solúveis em água, e por isso, de fácil excreção (Meyer 1996). A biotransformação é dividida em três fases, e três principais grupos de enzimas participam desse processo: esterases, oxidades de função múltipla (MFO) e as glutathione-S-transferases (GST).

A Fase I inclui as MFO, que realizam modificação química de uma grande variedade de xenobióticos, alterando sua atividade biológica. Na Fase II, ocorre participação ativa das GST. Estas enzimas agem nos produtos gerados pela Fase I, tornando as moléculas mais hidrofílicas através de uma reação de conjugação. As esterases, que podem ser consideradas como enzimas de Fase I ou Fase II, realizam hidrólise de ligações éster presentes nos xenobióticos (Xu et al. 2005, Frova 2006, Misra et al. 2011, Testa et al 2012). Durante a fase III ocorre a exportação ativa, por meio de transportadores ABC e de outras proteínas transmembranares, dos metabólitos gerados durante as duas primeiras fases (Meyer 1996, Xu et al. 2005, Misra et al. 2011).

Em muitos insetos, o aumento da atividade dessas enzimas está relacionado à resistência aos inseticidas utilizados em Saúde Pública. Este mecanismo de resistência é conhecido como resistência metabólica (Hemingway & Ranson 2000). Vários estudos mostram que populações de

campo, sujeitas a pressão constante com inseticidas, possuem maior atividade das enzimas detoxificantes (Montella et al. 2007, Marcombe et al. 2009). Entretanto, alguns trabalhos mostram que, muitas vezes, quando insetos são expostos a pequenas concentrações de compostos tóxicos, como poluentes e toxinas de plantas (e não necessariamente apenas inseticidas), ficam mais tolerantes a inseticidas, em uma exposição posterior. Essa tolerância é relacionada com a indução temporária do aumento da atividade de enzimas detoxificantes, provocada pelos xenobióticos (David et al. 2006, Poupardin et al. 2008, Riaz et al. 2009). Desse modo, é provável que diversos tipos de xenobióticos presentes no meio ambiente estejam relacionados, de certa forma, com a evolução da resistência aos inseticidas empregados em Saúde Pública.

1.6.2.1) Esterases

As esterases (EST) constituem uma diversificada família de enzimas que pertencem à classe das Hidrolases, grupo que promove a degradação de compostos orgânicos através da adição de água. Atuam sobre ligações éster de compostos endógenos ou exógenos, gerando álcool e ácido carboxílico (Wheelock et al. 2005, Montella et al. 2012).

Em insetos, as esterases estão envolvidas em vários aspectos fisiológicos e reprodutivos. Em *Drosophila melanogaster*, foi constatado, por exemplo, que esterases presentes no líquido seminal dos machos aumentam o tempo em que a fêmea permanece sem copular (Richmond et al. 1979). Essas enzimas também estão envolvidas com a metabolização de feromônios nas antenas dos insetos. Aparentemente, a rápida degradação dos feromônios sexuais femininos nas antenas dos machos é essencial para que encontrem as fêmeas durante seu vôo (Ishida & Leal 2005). Esterases também participam da digestão (Kapin & Ahmad 1980) e da regulação do desenvolvimento (Liu et al. 2008, Kamita et al. 2011).

Diversos trabalhos mostram que essas enzimas também estão envolvidas com a resistência a inseticidas. Compostos OP, CA e PI possuem ligações éster em sua estrutura e, desse modo, podem ser alvos das esterases

– porém, de forma distinta: esterases de insetos têm alta afinidade por OP e CA, e os hidrolisam com taxas muito lentas. Por esse motivo, diz-se que as esterases de insetos “sequestram” esses inseticidas. Situação inversa ocorre no caso dos piretróides, que são rapidamente hidrolisados (Ketterman et al. 1992, Hemingway & Karunaratne 1998).

Resistência mediada por esterases já foi encontrada em diversas espécies de mosquitos. Em espécies do gênero *Culex*, aumento da atividade de esterases, resultante de amplificação gênica, é bastante documentada (Hemingway & Ranson 2000, Hemingway et al. 2004, Li et al. 2007). Ensaios bioquímicos também têm mostrado, em diversas localidades do mundo, aumento de esterases não-específicas em populações de *A. aegypti* (Montella et al. 2007, Marcombe et al. 2009, Bisset et al. 2011, Fonseca-González, 2011, Polson et al. 2011).

1.6.2.2) Oxidases de Função Múltipla

As oxidases de função múltipla (MFO) são um grande grupo de enzimas presentes virtualmente em todos os organismos aeróbicos (Scott 1999). Existem cerca de 4000 enzimas descritas e uma característica comum é a presença de um grupamento heme em sua estrutura (hemeproteínas) (Werk-Reichhart & Feyereisen 2000, Denisov et al. 2005). Na literatura, essas enzimas são conhecidas por uma grande variedade de nomes como monoxigenases citocromo P450, oxidases microssomais e oxidases de função mista. Podem ser microssomais (quando presentes no retículo endoplasmático) ou mitocondriais (Feyereisen 1999). Uma característica peculiar dessa família de enzimas é a plasticidade com relação aos substratos que podem metabolizar. Além de uma mesma enzima ser capaz de reagir com diferentes tipos de substratos, uma única mutação pontual pode ser responsável pela alteração drástica de sua afinidade por estes (Feyereisen 1999). Em geral, MFO metabolizam substratos hidrofóbicos ou pouco solúveis em água. Entretanto, alcoóis, fenóis, detergentes e outras moléculas orgânicas também podem ser processados.

O ciclo catalítico das MFO é extremamente complexo. Basicamente, a enzima na sua forma oxidada se liga ao substrato. Nesse momento, o complexo P450-substrato recebe um elétron e a enzima se liga a um oxigênio. Em uma segunda etapa de redução, o oxigênio molecular é clivado e ocorre a inserção de um átomo de oxigênio no substrato e o outro é reduzido a uma molécula de água (Denisov et al. 2005).

As MFO desempenham importantes funções na biologia dos seres vivos, pois estão envolvidas no metabolismo de compostos endógenos e exógenos. Em insetos, por exemplo, estão envolvidas com a síntese e degradação de feromônios e hormônios, incluindo a 20-hidroxiecdisona e o hormônio juvenil (Scott 1999). Sanders et al. (2003) verificaram aumento de MFO em *A. aegypti* após alimentação sanguínea, provavelmente relacionado com a detoxificação de substâncias presentes no sangue. Alguns registros também evidenciam a relação entre MFO e tolerância a toxinas de plantas (Schuler 2011). Quando *A. aegypti* é exposto a xenobióticos provenientes de plantas, ocorre aumento da atividade e expressão de genes MFO (David et al. 2006). Assim, a sobrevivência e adaptação dos insetos frente a condições adversas do meio estão diretamente relacionadas ao papel desempenhado pelas MFO.

Além das funções metabólicas na fisiologia nos insetos, em muitos casos, as MFO estão envolvidas diretamente com a resistência a inseticidas (Hemingway & Ranson 2000). Devido a sua grande diversidade genética e plasticidade frente aos substratos, há potencial para que as MFO participem da metabolização de todas as classes de inseticidas disponíveis (Li et al. 2007). Entretanto, a maioria dos trabalhos indica que o envolvimento de MFOs na resistência ocorre principalmente frente a PI (Ranson et al. 2011).

Análises de microarranjos em populações de *Anopheles gambiae* resistentes a piretróides têm mostrado o aumento de vários genes que codificam MFO. Müller et al. (2008) detectaram maior expressão de CYP6P3, e verificaram que esta enzima é capaz de metabolizar piretróides. Resultados semelhantes foram obtidos por Stevenson et al. (2011) estudando a expressão de CYP6M2. Vários outros genes P450 são mais expressos em populações resistentes a piretróides do que nas susceptíveis (McLaughlin et al. 2008,

Hardstone et al. 2010). Entretanto, na maioria dos casos, a relação com a detoxificação de inseticidas não é comprovada.

Seleção de *A. aegypti* em laboratório com piretróide também acarreta aumento de atividade de MFO (Paeporn et al. 2004). Além disso, existem trabalhos que mostram atividade elevada de MFO em populações naturais de *A. aegypti*, muitas vezes em associação com alteração de esterases e GST. Polson et al. (2011) verificaram, através de ensaios bioquímicos, que diversas populações de campo de Trinidad possuíam atividade elevada de MFO em relação à linhagem susceptível. Pethuan et al. (2007) obtiveram resultados semelhantes em populações da Tailândia.

Além de estar envolvida com a resistência aos inseticidas clássicos, as MFO podem participar da metabolização de IGR. Existem relatos de aumento da atividade de MFO em insetos resistentes a análogos de hormônio juvenil, além de indícios de participação destas enzimas na resistência a inibidores de síntese de quitina (Plapp 1976, Kotze et al. 1997). Esta família de enzimas também parece ter importante papel na resistência cruzada. Uma população de *A. aegypti* selecionada com o OP temephos em laboratório apresentou também aumento significativo da resistência ao PI deltametrina. Ensaio com sinergistas indicaram o envolvimento de MFO nesse fenômeno (Rodriguez et al. 2002).

1.6.2.3) Glutathione-S-Transferases

Glutathione-S-Transferases são uma grande família de enzimas que, assim como as esterases e as MFO, estão envolvidas em diversos processos fisiológicos nos insetos. É o principal grupo de enzimas presentes na Fase II do processo de biotransformação, tanto em plantas quanto em animais. A maioria dos estudos das GST de insetos está relacionada com a resistência a inseticidas, detoxificação de aleloquímicos de plantas e resposta ao *stress* oxidativo (Enayati et al. 2005).

Existem duas principais classes de GST em insetos: as citossólicas ou GST solúveis (cGST) e as microsossomais, também conhecidas como MAPEG (*“membrane-associated proteins involved in eicosanoid and*

glutathione metabolism”) (Frova 2006). As cGST incluem as enzimas que estão envolvidas com a resistência a inseticidas. Devido a sua grande diversidade em insetos, essa classe é subdividida em seis subclasses principais, que são: Delta, Epsilon, Sigma, Omega, Theta e Zeta. As subclasses Delta e Epsilon são as mais abundantes (Lumjuan et al. 2007, Friedman 2011).

As cGST possuem duas subunidades, cada uma com um sítio de ligação a um composto (sítios G e H). No sítio G, bastante conservado, ocorre a ligação com a glutathione. Por outro lado, no sítio H, variável, ocorre a interação com os substratos hidrofóbicos (Sheehan et al. 2001, Frova 2006). De modo geral, essas enzimas metabolizam uma série de compostos hidrofóbicos, como substratos endógenos e xenobióticos, catalizando a conjugação de uma glutathione no centro hidrofílico dos substratos. A consequência dessa reação é o aumento da solubilidade dos compostos, facilitando sua compartimentalização e excreção pelas enzimas de Fase III (Sheehan et al. 2001).

GST podem participar da resistência a OC, OP e PI (Li et al. 2007). Têm sido apontadas como as principais enzimas responsáveis pela resistência metabólica a DDT e PI (Hemingway 2000, Hemingway et al. 2004). Essas enzimas podem estar envolvidas com o sequestro (Kostaropoulos et al. 2001) e a metabolização direta do xenobiótico (Wei et al. 2001), ou ainda com a proteção contra efeitos tóxicos secundários, tais como aumento de peroxidação lipídica decorrente de exposição a inseticidas (Vontas et al. 2001). Alguns trabalhos também mostram que muitas populações de campo possuem atividade alterada de GST, o que, possivelmente, está relacionado com a resistência aos principais inseticidas utilizados no controle (Montella et al. 2007, Pethuan et al. 2007, Cuamba et al. 2010, Polson et al. 2011).

1.6.3) Transportadores ABC

Os transportadores ABC constituem uma superfamília de proteínas transmembranares presentes em uma grande variedade de seres vivos (Biemans-Oldehinkel et al. 2006). Essas proteínas utilizam a energia

proveniente da hidrólise do ATP para transportar substratos através da bicamada lipídica das células (Locher 2009). Basicamente, existem dois tipos de transportadores ABC: os exportadores e os importadores. Em ambos os casos, a hidrólise do ATP é realizada por um par de domínios citoplasmáticos (ABC, do inglês *ATP-binding cassette*) e a translocação dos substratos ocorre por meio de dois domínios transmembranares (TMD, do inglês *transmembrane domains*) (Locher 2009, figura 5).

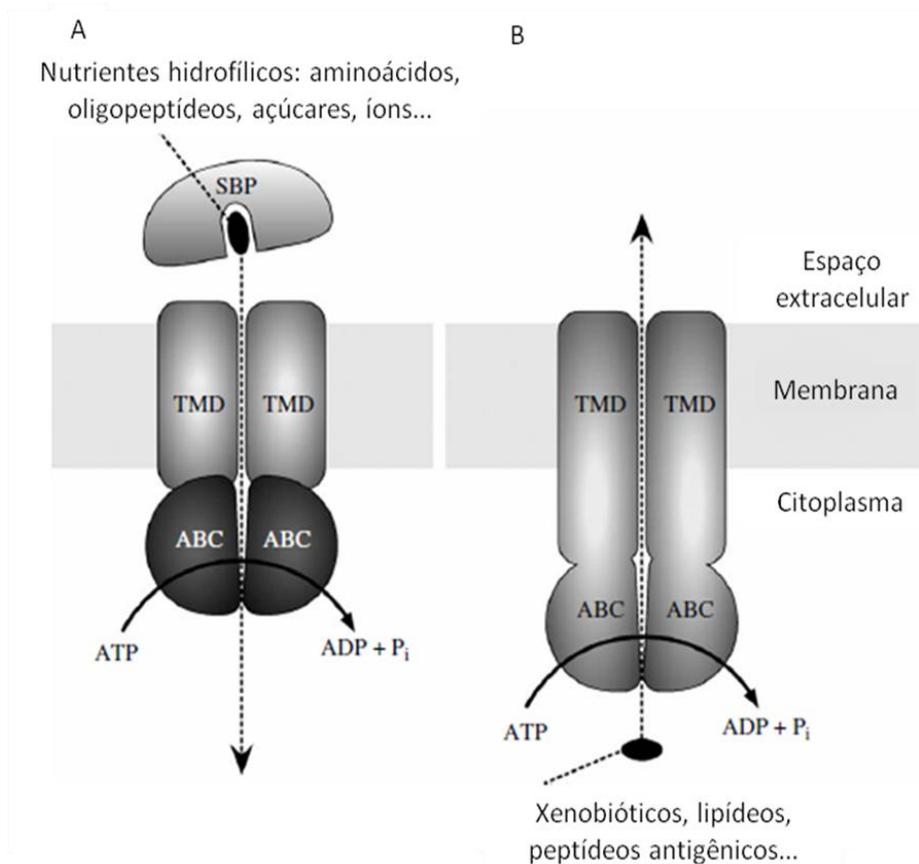


Figura 5: Transportadores ABC de importação (a) e de exportação (b). Ambos utilizam a energia liberada pela hidrólise do ATP para translocar substratos. ABC: ATP-binding cassette; TMD: transmembrane domain; SBP: substrate binding protein. Figura adaptada de Locher 2009.

Enquanto os importadores estão presentes apenas em procariotos, os exportadores são encontrados em praticamente todos os seres vivos, incluindo seres humanos. Além da participação de processos fisiológicos básicos como transporte de açúcares, aminoácidos, colesterol, fosfolipídeos, peptídeos e proteínas, os transportadores ABC também são capazes de eliminar xenobióticos. Desse modo, mutações em genes desses

transportadores podem alterar drasticamente o metabolismo dos organismos. Em humanos, por exemplo, diversas doenças estão relacionadas a defeitos nos transportadores ABC (Gottesman & Ambudkar 2001). Além disso, aumento da expressão de alguns membros dessa superfamília é responsável pela resistência a drogas utilizadas em tratamento de câncer, representando um desafio adicional ao combate da doença (Patel & Rothenberg 1994).

Em insetos, alguns trabalhos indicam que transportadores ABC podem estar relacionados com a resistência a inseticidas. Diversos estudos mostram que linhagens de insetos resistentes a inseticidas possuem aumento da expressão desses transportadores. Silva et al. (2012) detectaram, após a exposição a um carbamato, aumento de expressão de genes de transportadores ABC em espécimes de *Myzus persicae* (Sulzer, 1776). Larvas de *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777), selecionadas com piretróides, possuem aumento da expressão de P-glicoproteína (Pgp), um tipo de transportador ABC (Lanning et al. 1996). Nesse estudo, foi encontrada maior mortalidade das larvas frente a um carbamato, quando as mesmas eram tratadas com quinidina, um inibidor da Pgp. Gahan et al. (2010) encontraram, para esta mesma espécie, correlação entre a resistência a uma toxina de *Bti* e mutação em um transportador ABC. Do mesmo modo, Srinivas et al. (2004) verificaram que populações de campo de *Helicoverpa armigera* Hübner, 1805 expressavam Pgp, ao contrário da linhagem susceptível mantida em laboratório. Nessa mesma espécie, Aurade et al. (2010) demonstraram que alguns inseticidas interagem e são capazes de estimular a atividade de Pgp.

Poucos estudos correlacionam à resistência a inseticidas com a presença de transportadores ABC em culicídeos. Buss et al. (2002) encontraram sinergismo entre veparamil, um inibidor de Pgp, e três inseticidas em *Culex pipiens*. Resultados semelhantes foram encontrados em *Aedes caspius* (Pallas, 1771). Nesse caso, veparamil apresentou efeito sinergista com temephos e diflubenzuron, sendo que o maior efeito foi encontrado com o IGR (Porretta et al. 2008).

1.7) Custo evolutivo da resistência

O uso intenso de inseticidas seleciona, ao longo do tempo, aqueles indivíduos que são naturalmente resistentes. Entretanto, a disseminação e a evolução da resistência não dependem somente da vantagem ligada ao nível de resistência dos insetos, mas também ao custo no *fitness* associado aos alelos de resistência. A frequência alélica inicial e a dominância dos fenótipos são outros fatores que, adicionalmente, estão envolvidos com a evolução da resistência (Roush e Mckenzie 1987).

Os primeiros casos de resistência a inseticidas detectados em artrópodes ocorreram logo após a Segunda Guerra Mundial. Entretanto, até os dias de hoje, trabalhos que envolvem os aspectos relacionados à evolução da resistência são escassos. Isso porque, muitas vezes, a mensuração desses fatores é extremamente complexa. Grande parte dos trabalhos que relacionam depreciação no *fitness* e sua relação com a resistência, por exemplo, são da última década. Esses estudos mostram que, de modo geral, populações resistentes possuem problemas em uma série de parâmetros biológicos (Li et al. 2002, Agnew et al. 2004, Kumar et al. 2009, Kumar & Pillai 2011). A deficiência no *fitness* em insetos resistentes é associada com realocação de recursos energéticos, mudanças nas funções metabólicas ou alterações no processo de desenvolvimento (Roush & Mckenzie 1987). Por exemplo, Hardstone et al. (2010) verificaram que uma linhagem de *Culex quinquefasciatus*, cuja resistência à permetrina é conferida por monoxigenases P450, possui menor quantidade de lipídeos e glicogênio em comparação com a linhagem susceptível.

O custo da resistência a inseticidas tem sido verificado principalmente em populações selecionadas em laboratório (Kumar et al. 2009, Kumar & Pillai 2011, Martins et al. 2012). Uma das maneiras de avaliar se existe algum custo associado à resistência é a comparação entre diferentes parâmetros da tabela de vida entre linhagens resistentes e susceptíveis. Em culicídeos, parâmetros como tempo de desenvolvimento, longevidade dos adultos, fecundidade, capacidade de alimentação sanguínea e eficiência na cópula são bastante utilizados para este fim (Roush & Mackenzie 1987,

Belinato et al. 2012, Martins et al. 2012). Outra metodologia de avaliação do custo da resistência é a investigação, ao longo das gerações, da frequência dos alelos relacionados à resistência em ambiente livre de inseticidas. A vantagem desse método é que o custo da resistência, mesmo não sendo medido diretamente, é expresso em todo ciclo de vida dos insetos. Este método é bastante efetivo em laboratório, ambiente no qual o fluxo genético é controlado (Roush & McKenzie 1987, Paris et al. 2011).

Uma vez que a resistência geralmente está associada à depreciação de algum parâmetro da tabela de vida, indivíduos resistentes só possuem vantagem em ambientes onde existe aplicação do inseticida. Dessa maneira, na ausência de pressão de seleção, é esperada uma queda na frequência dos indivíduos resistentes. Por exemplo, foi observado que indivíduos resistentes possuem diminuição da capacidade reprodutiva (Berticat et al. 2002), são mais susceptíveis aos inimigos naturais (Berticat et al. 2004), possuem longevidade reduzida (Li et al. 2002) ou colocam menor quantidade de ovos (Kumar & Pillai 2011). Desse modo, na ausência de inseticidas, os indivíduos susceptíveis têm maior probabilidade de aumentar sua frequência na população (Berticat et al. 2008). Alternativamente, existem mecanismos de resistência que podem ter um efeito positivo no *fitness* de insetos. Expressão de GST, por exemplo, pode influenciar na longevidade de *Drosophila melanogaster*, provavelmente devido à proteção de tecidos contra espécies reativas de oxigênio (McElwee et al. 2007, Rivero et al. 2010).

Diversos fatores podem influenciar nos parâmetros da tabela de vida em linhagens resistentes. Emprego de diferentes metodologias, peculiaridades de cada espécie e *background* genético estão entre os principais fatores. Além disso, na maioria das vezes, as populações de insetos possuem múltiplos mecanismos de resistência, cuja interação pode influenciar negativa ou positivamente o *fitness*. Os alelos *ace-1^R* e *Kdr^R* quando sozinhos, por exemplo, provocam efeito negativo no *fitness*, sendo que o efeito de *ace-1^R* é mais expressivo. Entretanto, quando combinados, o efeito no *fitness* é equivalente àquele causado somente pela mutação *Kdr^R*. Aparentemente, isso ocorre devido a um efeito compensatório causado pela presença do alelo *Kdr^R* (Berticat et al. 2008).

Por tudo isso, o conhecimento do custo no *fitness* poderia fornecer informações relevantes para a compreensão da evolução da resistência em campo e, também, para o desenho de estratégias racionais de controle. Em adição, como a resistência afeta a qualidade dos vetores, provavelmente a dinâmica da transmissão de doenças também seria alterada. Longevidade e padrões comportamentais seriam parâmetros críticos que, quando modificados, poderiam influenciar significativamente na transmissão de doenças (Rivero et al. 2010).

1.8) Estratégias de mitigação da resistência a inseticidas

A seleção de populações resistentes em campo não é reflexo apenas da interação entre insetos e os inseticidas utilizados. Fatores como classe do inseticida, tempo de aplicação, área de cobertura, dose utilizada e métodos de controle podem ser diretamente controlados para reduzir ou aumentar a pressão de seleção. Entretanto, fatores ecológicos, genéticos, fisiológicos e comportamentais não podem ser controlados e interferem, do mesmo modo, na evolução da resistência em campo (Denholm & Rowland 1992).

A resistência a inseticidas é um processo evolucionário. Por esse motivo, é provável que ocorra seleção de indivíduos resistentes em qualquer metodologia que se baseie fundamentalmente no uso de substâncias químicas. Desse modo, o desenho de estratégias que têm por objetivo a mitigação da resistência é um desafio, principalmente no caso de vetores de doenças, já que o número de compostos disponíveis para controle é pequeno.

Diversas táticas de controle de pragas podem ser empregadas, na tentativa de reduzir ou mesmo impedir a seleção de populações de insetos resistentes. Entretanto, a utilização dessas metodologias ocorre principalmente na agricultura. Na Saúde Pública, devido à maior complexidade, o uso de estratégias diversificadas de controle ainda é muito limitado.

1.8.1) Misturas de compostos

Nessa estratégia, os insetos são expostos de modo simultâneo a dois ou mais compostos, com diferentes mecanismos de ação (Hoy 1998). O princípio dessa tática é a eliminação dos indivíduos resistentes a um inseticida, quando os mesmos entram em contato com o outro composto. Nesse caso, os únicos sobreviventes seriam aqueles indivíduos resistentes aos dois produtos. Por esse motivo, quando se utiliza a mistura de compostos, é essencial manter 'áreas de refúgio', que não receberão inseticidas, com o objetivo de preservar indivíduos susceptíveis, para retardar a disseminação da resistência (Curtis 1985, Comins 1986).

O sucesso do uso combinado de compostos depende de não haver resistência cruzada entre os inseticidas. Além disso, se a resistência não for completamente recessiva, a taxa de indivíduos resistentes pode aumentar rapidamente na população (Hoy 1998).

1.8.2) Rotação de inseticidas

De acordo com esta tática, dois ou mais inseticidas são utilizados, de modo alternado, ao longo do tempo. A hipótese desse método consiste na diminuição da frequência de indivíduos resistentes a cada troca de composto. Adicionalmente, se o mecanismo de ação selecionado for atrelado a um custo no *fitness*, é possível que a frequência de indivíduos resistentes diminua de modo mais expressivo durante a aplicação do novo composto (Hoy 1998).

A principal diferença entre a rotação e o uso de misturas é que, no primeiro método, insetos resistentes a um inseticida possuem uma vantagem seletiva temporária. Por outro lado, quando se emprega dois inseticidas simultaneamente, isso não ocorre. Assim como no caso do uso combinado de inseticidas, a rotação provavelmente é inviável quando ocorre seleção de mecanismos de resistência reduntantes (Denholm & Rowland 1992).

1.8.3) Mosaicos

A aplicação em mosaico consiste no uso de diferentes compostos químicos em fragmentos de uma mesma área. O objetivo é a realização de diferentes pressões seletivas, diminuindo a possibilidade de resistência a um composto específico. Esse método só é aplicável se os indivíduos realizarem intensa dispersão. Por esse motivo, o tamanho dos fragmentos deve, necessariamente, ser escolhido de acordo com a biologia dos insetos. Assim como nos casos anteriores, resistência cruzada entre os compostos utilizados pode tornar esta tática inviável (Denholm & Rowland 1992, Hoy 1998).

1.8.4) Uso de altas concentrações

Esta tática se baseia no uso de altas doses de inseticidas, na tentativa de eliminar todos ou a maioria dos insetos alvo. Neste método, é necessária cobertura completa da área com os compostos químicos. Vários problemas, além da rápida seleção da resistência, podem ocorrer ao longo do tempo. Problemas ambientais, eliminação de predadores naturais, efeitos em organismos não alvo são, dentre outros, possíveis consequências do uso de altas concentrações de inseticidas (Hoy 1998).

1.8.5) Controle integrado

O controle integrado consiste na utilização de várias metodologias, como, por exemplo, o emprego simultâneo do controle mecânico, químico ou biológico. Por ser uma abordagem multi-tática, o controle integrado é mais robusto do que todas as estratégias de controle disponíveis. Tem como principal objetivo, além da mitigação da resistência, a redução do uso de inseticidas.

Esta estratégia é utilizada, principalmente, no controle de vetores de doenças. Parte da premissa que o controle de vetores não é de responsabilidade única dos órgãos de saúde, mas também de todas as

instituições públicas e privadas, além de toda a comunidade. Este é o método indicado pela Organização Mundial de Saúde para controle de dengue e malária (WHO 2009).

1.8.6) Uso de inseticidas de ação tardia

Diferente de todas as estratégias anteriores, o uso de inseticidas de ação tardia ainda é um modelo teórico. A principal ideia desse modelo é a eliminação preferencial dos indivíduos mais longevos da população, já que são esses que têm probabilidade de passar pelo período de incubação extrínseco dos patógenos que transmitem e, portanto, seriam os responsáveis por sua transmissão. Nesse caso, a pressão seletiva seria branda, já que a maioria dos indivíduos só seria eliminada depois de produzir seus descendentes. Ao contrário das estratégias anteriores, o uso de inseticidas de ação tardia é focado no controle da doença e não do vetor. Utilização de doses subletais de inseticidas convencionais ou de biopesticidas de ação lenta, como fungos, ou ainda de bactérias e vírus estão entre os produtos que poderiam ser utilizados com esta finalidade (Koella et al. 2009, Read et al. 2009)

1.9) Justificativa

Muitas doenças transmitidas por artrópodes constituem sérios problemas em Saúde Pública nos países onde são endêmicas. Somente a dengue, por exemplo, está presente em mais de 100 países e atinge mais de 50 milhões de pessoas anualmente. *Aedes aegypti*, vetor primário de dengue no Brasil, tem se expandido ao longo dos últimos 50 anos e está difundido principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo. Muitas populações brasileiras desse vetor se encontram resistentes aos inseticidas químicos tradicionalmente utilizados, como organofosforados (OP) e piretróides (PI). Nesse sentido, o estudo da eficácia de novos compostos contra populações de campo de *A. aegypti* é de extrema importância. Além disso, o conhecimento

dos mecanismos de resistência potencialmente relacionados aos principais inseticidas disponíveis é essencial para o controle racional do vetor.

Por tudo isso, foi verificada a eficácia e a evolução da resistência ao diflubenzuron, um CSI recém introduzido no país, em duas populações de campo de *A. aegypti* com diferentes níveis de resistência ao OP temephos. Adicionalmente, foi investigada uma série de parâmetros da tabela de vida antes e depois da seleção com esse composto. A avaliação da atividade de enzimas detoxificantes, em larvas expostas a doses parcialmente letais dos principais inseticidas utilizados atualmente, também foi realizada.

Esperamos, por meio desses resultados, contribuir para o conhecimento dos mecanismos de resistência e também antecipar, sob condições controladas, a dinâmica da resistência, situação que poderia resultar em eventuais falhas ou problemas de controle.

2) Objetivos

2.1) Objetivo geral

Investigar o custo da resistência a diflubenzuron e a dinâmica da ativação de enzimas detoxificantes, em resposta a doses parcialmente letais de inseticidas, em populações de *Aedes aegypti*.

2.2) Objetivos específicos

- a) Acompanhar a dinâmica e a intensidade de ativação das enzimas que conferem resistência metabólica em resposta a desafio com doses sub-letais de inseticidas em larvas;
- b) Avaliar parâmetros do *fitness* em populações de campo de *A. aegypti*, com diferentes níveis de resistência ao temephos.
- c) Selecionar populações de campo de *A. aegypti* com diflubenzuron, um inibidor da síntese de quitina;
- d) Investigar o custo biológico da resistência ao diflubenzuron;
- e) Avaliar ao longo das gerações a resistência ao OP temephos em populações de campo resistentes mantidas na ausência de inseticidas.

3) Resultados

3.1) Artigo 1: Avaliação da atividade de enzimas detoxificantes de larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) expostas a doses parcialmente letais de temephos, deltametrina e diflubenzuron

Resumo

O efeito de doses parcialmente letais do organofosforado (OP) temephos, do piretróide (PI) permetrina e do inibidor de síntese de quitina diflubenzuron sobre a resistência metabólica foi investigado em larvas de *Aedes aegypti*, da linhagem susceptível Rockefeller e de populações de campo. Foi quantificada, com metodologia utilizada na rotina do monitoramento dos mecanismos de resistência, a atividade das principais famílias de enzimas em larvas sobreviventes à exposição por 24 ou 48 horas, no terceiro estágio. Bioensaios prévios, realizados para determinação das doses efetivas, haviam revelado altos níveis de resistência aos inseticidas avaliados nas populações de campo, com exceção de diflubenzuron. Exposição de larvas Rockefeller e de Duque de Caxias (DQC) a temephos mostrou diminuição progressiva da atividade de acetilcolinesterase, alvo de OP, e de esterases, confirmando que essas enzimas sequestram, e não metabolizam OP em insetos. Diflubenzuron acarretou em alteração transitória das atividades de GST e MFO, detectadas depois de 24 horas de exposição, tanto na linhagem Rockefeller quanto em DQC. Por outro lado, exposição a permetrina, feita com a população de Santarém (STR), não resultou em alteração na atividade de nenhuma enzima avaliada. Adicionalmente, foi realizada comparação das atividades enzimáticas dos grupos controle, não expostos a inseticidas. Nesse caso, verificamos que a atividade das enzimas detoxificantes não refletiu o alto nível de resistência encontrado nas populações, sugerindo a participação de mecanismos adicionais de resistência.

Introdução

Grande parte do interesse acadêmico sobre mosquitos é consequência de sua importância na transmissão de uma série de doenças ao ser humano (Jansen & Beebe 2010, Imwong et al. 2011, Zeldenryk et al. 2011). No Brasil, o culicídeo *Aedes aegypti* (L., 1762) é vetor primário de dengue. Entretanto, esse mosquito também pode ser responsável pela transmissão dos vírus da febre amarela e chikungunya (Gardner & Ryman 2010, Presti et al. 2012).

Dentre as diversas metodologias empregadas no combate a esta espécie, o controle mecânico, realizado através da eliminação de criadouros, é o mais indicado. No entanto, o controle químico, com inseticidas, ainda é um componente majoritário das estratégias atuais (van den Berg et al. 2012). No Brasil, desde o início dos programas sistematizados de controle, este culicídeo chegou a ser erradicado em dois momentos. Entretanto, atualmente essa espécie está presente em todos os estados do país (Guzman & Couri 2003, Braga & Valle 2007a). Um dos motivos relacionados com a expansão de *A. aegypti* é a resistência a inseticidas, situação cada vez mais comum em populações de campo deste vetor (Macoris et al. 1999, Da-Cunha et al. 2005, Macoris et al. 2007).

Um dos principais mecanismos de resistência a inseticidas é o aumento da atividade de enzimas envolvidas com a biotransformação de xenobióticos que, em geral, pertencem às famílias das oxidases de função múltipla (MFO), esterases (EST) e glutathione-S-transferases (GST) (Hemingway & Ranson 2000, Hemingway et al. 2004). Todas essas famílias de enzimas estão naturalmente presentes em diversos organismos (Testa et al. 2012). Nos insetos, além de participar da detoxificação de xenobióticos, desempenham diversos papéis fisiológicos que envolvem a metabolização de compostos endógenos (Richmond et al. 1979, Kapin & Ahmad 1980, Scott 1999, Enayati et al. 2005).

A resistência metabólica, que ocorre quando as enzimas detoxificantes têm atividade alterada, tem sido frequentemente encontrada em populações de *A. aegypti* (Montella et al. 2007, Marcombe et al. 2009). Vale

ressaltar que, na maioria dos estudos onde foi encontrado aumento na atividade dessas enzimas, as populações estavam sujeitas a intensa pressão com inseticidas. Entretanto, alteração da atividade pode ser decorrente de outros fatores, já que além dos inseticidas utilizados nos programas de controle, as populações de campo estão expostas a uma grande diversidade de xenobióticos. Poluentes, toxinas de plantas e inseticidas provenientes de aplicações domésticas e da agricultura são considerados os principais exemplos (Poupardin et al. 2012). Todavia, provavelmente esses compostos chegam aos insetos em concentrações pequenas, não letais para os indivíduos. Situação semelhante também pode ocorrer com os inseticidas empregados no controle. Deficiências logísticas, falhas técnicas durante a aplicação e aumento nos níveis de precipitação são apenas alguns dos fatores que podem, em certos momentos, acarretar em exposição temporária das populações a concentrações não letais dos inseticidas empregados.

De acordo com Terriere (1984), o contato com compostos químicos é um estímulo que pode desencadear produção adicional de enzimas pelo sistema de detoxificação dos insetos. Nesse caso, é possível que indivíduos expostos a concentrações subletais ou parcialmente letais de xenobióticos apresentem maior tolerância a uma segunda exposição ao mesmo ou a outro composto. David et al. (2006), por exemplo, demonstraram que larvas de *A. aegypti* submetidas a doses subletais de toxinas de plantas ficam mais tolerantes a uma segunda exposição. Boyer et al. (2006) verificaram que larvas de *A. aegypti* expostas ao herbicida atrazina ficam mais tolerantes ao OP temephos. Nesses dois casos específicos, a tolerância foi correlacionada com o aumento de MFO. Outros trabalhos também indicam correlação entre tolerância a compostos tóxicos e aumento da atividade de enzimas detoxificantes, induzido por exposição prévia a concentrações subletais de diferentes xenobióticos (Poupardin et al. 2008, Riaz et al. 2009). Desse modo, é possível que a evolução da resistência a inseticidas em campo esteja relacionada, ao menos em parte, com as respostas adaptativas dos insetos frente à diversidade de xenobióticos presentes nos criadouros. Por esse motivo, entender as respostas bioquímicas elicidadas por compostos tóxicos,

em especial pelos inseticidas utilizados no controle, pode ser fundamental para compreender a evolução da resistência em campo.

Atualmente, poucos produtos estão disponíveis para controle de *A. aegypti*. Organofosforados (OP) e piretróides (PI) correspondem às principais classes de inseticidas utilizadas (Braga & Valle 2007). Entretanto, no Brasil, a resistência está hoje disseminada em populações de campo (Macoris et al. 1999, Lima et al. 2003, Braga et al. 2004, Da-Cunha et al. 2005), provavelmente em função do intenso uso de inseticidas pelos programas de controle de dengue, acrescido da falta de articulação com as iniciativas de controle de outros agravos à saúde e do uso doméstico de inseticidas, intensificado a cada novo surto epidêmico de dengue. Diflubenzuron, um inibidor da síntese de quitina (ISQ), foi recentemente introduzido no controle de *A. aegypti* no Brasil e é a alternativa de controle de larvas nas localidades onde as populações do vetor se encontram resistentes ao organofosforado temephos (Ministério da Saúde 2009). Manter esses produtos disponíveis para uso em campo por um longo período de tempo é o desafio atual dos programas de controle. Nesse sentido, a compreensão da dinâmica dos mecanismos de resistência a esses compostos é de extrema importância.

No presente estudo, foi investigado o efeito da exposição de larvas a doses parcialmente letais de temephos, permetrina e diflubenzuron sobre a atividade das principais enzimas classicamente envolvidas com a resistência metabólica e da acetilcolinesterase, alvo de organofosforados. Para isto, foi utilizada a metodologia empregada na rotina das atividades de monitoramento dos mecanismos de resistência em todo o mundo (Brogdon 1989, Hemingway 1998, Montella et al 2007). Esperamos, com esses resultados, contribuir para o detalhamento dos mecanismos bioquímicos de resistência possivelmente relacionados a esses compostos, representantes das principais classes de inseticidas empregados atualmente no controle de *A. aegypti* e, em consequência, com o desenho de estratégias racionais de controle.

Material e Métodos

Mosquitos

Foram utilizadas amostras de populações brasileiras de *A. aegypti*, provenientes de Duque de Caxias/RJ (DQC) e Santarém/PA (STR). Os ovos foram coletados em 2010 por meio de ovitrampas pelas Secretarias Municipais de Saúde. Em cada localidade foram instaladas 360 ovitrampas, distribuídas em três áreas de 1km². No laboratório, os ovos foram postos a eclodir e as larvas criadas por meio de procedimento padrão de rotina (POP-LAFICAVE-002). Os adultos de *Ae. aegypti* resultantes foram identificados, selecionados e utilizados para a obtenção de ovos da geração F1. Foram obtidos, aproximadamente, 2.300 adultos de DQC e 7.000 adultos de STR. Mosquitos da linhagem Rockefeller, referência de susceptibilidade e vigor, foram utilizados como controle experimental (Kuno 2010).

Criação de larvas para os bioensaios

Ovos da linhagem Rockefeller e das duas populações de campo foram colocados em pequenos copos plásticos com 20 mL de água de criação por uma hora, para eclosão sincronizada. Após esse período, as larvas foram transferidas, em grupos de aproximadamente 1.000, para bacias de plástico transparente (33 X 24 X 8 cm), contendo um litro de água desclorada e 1 g de ração para gatos (Friskies®, Purina, São Paulo/SP). Todas as bacias foram mantidas em estufas BOD (Biological Oxygen Demand) a 26 ± 1°C. Após três dias, quando a maioria das larvas estava no terceiro estágio (L3), os bioensaios foram realizados (POP-LAFICAVE-002).

Bioensaios: inseticidas e linhagens

Três inseticidas, pertencentes a três classes distintas, foram utilizados nos ensaios: o OP temephos, o PI permetrina e o ISQ diflubenzuron. Em todos os casos usou-se o produto padrão (PESTANAL® - Sigma-Aldrich). Ensaios dose resposta, com os três compostos, foram realizados para determinação das doses efetivas. Os ensaios com diflubenzuron e temephos foram realizados com a população de DQC enquanto que os ensaios com permetrina foram realizados com STR. Esta última população foi escolhida

devido à resistência a piretróides e à comprovada ausência de mutação *Kdr* na posição 1016, no sítio alvo de piretróides, o gene do canal de sódio. A escolha da população STR, neste caso, objetivou privilegiar a resistência metabólica, já que mutação na posição 1016 está associada a elevados níveis de resistência a piretróides (Martins & Valle 2012). DQC possuía alta frequência dessa mutação. A linhagem Rockefeller foi avaliada com os três compostos.

Em cada teste foram utilizadas larvas L3 e pelo menos 10 concentrações foram empregadas (WHO 1981). Todos os bioensaios, com cada inseticida, foram repetidos três vezes, em dias diferentes. As doses efetivas, para todos os compostos, foram calculadas através do *software* Polo PC via análise Probit (*software* Polo-PC, LeOra Software, Berkeley, CA; Raymond 1985). As razões de resistência (RR) foram obtidas através da divisão das doses efetivas das populações pelo valor das respectivas doses efetivas encontradas para Rockefeller.

Bioensaios dose resposta - temephos e permetrina

Temephos e permetrina são dois inseticidas que agem no sistema nervoso central (SNC) do inseto, tendo como efeito a morte. Desse modo, a leitura do ensaio, que é feita por meio da contagem do número de larvas mortas, foi realizada após 24 horas de exposição. Em cada concentração avaliada foram utilizadas quatro réplicas, cada qual com 20 larvas, em copos plásticos contendo 100 mL de solução. O procedimento foi realizado de acordo com as condições padrão do laboratório (POP-LAFICAVE-004).

Bioensaio dose resposta - diflubenzuron

Diferente dos OP e PI, os inibidores da síntese de quitina não têm como efeito primário a morte dos insetos. Por isso, a leitura dos ensaios é realizada até a emergência completa de adultos do grupo controle (Martins et al. 2008, Fontoura et al. 2012). Para tal, foi adicionado em cada copo 1 mL de solução a 1,5 % (p/v) de ração triturada, uma única vez. Para cada concentração avaliada foram usadas quatro réplicas, cada uma com 10 larvas, em copos plásticos transparentes contendo 150 mL de solução. A emergência dos adultos e a mortalidade dos espécimes foram verificadas pelo menos a cada dois dias.

Exposição a doses parcialmente letais de inseticidas

Após a realização dos bioensaios e obtenção das doses efetivas, as larvas foram expostas a cinco concentrações subletais ou parcialmente letais dos inseticidas. No caso de temephos e permetrina, a maior concentração utilizada correspondeu à dose letal para 50% das larvas (CL_{50}) (tabela 1). Para diflubenzuron, a maior concentração inibia a emergência de adultos em 90% (IE_{90}). Após 24 horas de exposição, as larvas foram coletadas e armazenadas em freezer -80°C até a realização dos ensaios bioquímicos. Como diflubenzuron não causa morte imediata, larvas expostas por 48 horas a esse composto também foram coletadas.

Ensaio bioquímico

A quantificação da atividade das principais classes de enzimas relacionadas com a resistência metabólica foi realizada, individualmente, em larvas de terceiro estágio expostas aos inseticidas. As larvas foram trituradas em água Milli-Q e frações do homogenato foram transferidas para microplacas de 96 poços. Foram avaliadas, através de protocolo estabelecido previamente, as atividades de glutathione-S-transferases (GST), esterases (EST) e oxidases de função mista (MFO), além da atividade de acetilcolinesterase (ACE), alvo de inseticidas OP (Valle et al. 2006, Montella et al. 2007, Viana-Medeiros 2012). A atividade de EST foi avaliada com três diferentes substratos: acetatos de alfa-naftil (alfa-EST), beta-naftil (beta-EST) e para-nitro-fenil (pNPA). Os valores de absorvância foram medidos por meio de um espectrofotômetro com um leitor de microplacas (Spectra MAX[®]).

A quantificação de proteínas totais de cada espécime (PTN) foi feita pelo método de Bradford e usada para corrigir o valor das atividades enzimáticas. No caso de acetilcolinesterase, calculou-se a diferença entre os valores de absorvância no intervalo de três horas. Para pNPA, este intervalo foi de dois minutos. Para comparação dos grupos controle, não expostos, além das medianas de atividade para cada linhagem e enzima, foram também calculados os valores de percentil 99 para Rockefeller (p_{99}) e a taxa de indivíduos acima deste valor nas populações de campo ($\%>p_{99}_{Rock}$). Estas últimas foram classificadas de acordo com o critério empregado no monitoramento dos mecanismos de resistência no Brasil: até 15% da

população acima de $p_{99_{Rock}}$ é indicativo de atividade normal, entre 15 e 50%, atividade alterada e acima de 50%, atividade muito alterada (Valle et al. 2006, Montella et al. 2007).

Análise estatística

Os valores de atividade enzimática nas larvas expostas às concentrações parcialmente letais dos inseticidas foram comparados por meio de Kruskal-Wallis, seguido de comparação múltipla de Dunn. Nesse caso, para cada enzima, foi comparado o valor da atividade do grupo controle com aquelas dos grupos expostos. Adicionalmente, também foi realizada comparação por meio do teste *Mann Whitney*, para cada enzima, entre o grupo controle da linhagem Rockefeller e das respectivas populações. O *software Graph-Pad Prism* versão 5.0 para Windows foi utilizado para realização dessas análises (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

Resultados

Atividade de temephos, deltametrina e diflubenzuron sobre A. aegypti

Todos os compostos mostraram, como esperado, efeito dose dependente sobre *A. aegypti* (painéis A das Figuras 1-4). As doses efetivas e os valores de razão de resistência (RR) para as populações avaliadas se encontram na Tabela 2. De modo geral, todos os compostos foram eficazes em concentrações da ordem de $\mu\text{g/L}$. As populações de DQC e STR apresentaram níveis elevados de resistência ao temephos e à permetrina, respectivamente, com razões de resistência (RR_{95}) acima de 10. O mesmo não foi observado para DQC quando avaliada com diflubenzuron.

Ensaio com doses parcialmente letais

Efeito de OP temephos sobre *A. aegypti*

Nestes experimentos, a mortalidade de larvas, em Rockefeller e DQC, para cada concentração estudada, encontra-se na Figura 1B,C e na Tabela 1. Em todos os casos, a mortalidade observada foi semelhante ao valor esperado.

A Figura 1D apresenta a quantificação do teor de proteínas totais e das atividades enzimáticas nas larvas sobreviventes. De maneira geral, larvas Rockefeller eram menores e mais homogêneas que larvas DQC, oriundas do campo. Em DQC, não houve diferença significativa (Kruskal-Wallis, $P > 0,05$) na quantidade de proteínas entre larvas do grupo controle e expostas às diferentes CL de temephos. Por outro lado, larvas Rockefeller expostas às três maiores doses de temephos (1,0; 2,0 e 3,0ug/L) diferiram significativamente (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$) das larvas controle.

Com exceção de GST, houve redução da atividade das enzimas avaliadas com o aumento das concentrações de temephos tanto na linhagem Rockefeller quanto em DQC. A atividade da acetilcolinesterase sofreu redução significativa nas três maiores doses avaliadas (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$) na linhagem Rockefeller e, em DQC, em todas as doses com exceção da menor (1,2ug/L). Doses parcialmente letais de temephos acarretaram também diminuição de atividade das esterases alfa, beta e pNPA. Na linhagem Rockefeller, houve redução significativa a partir de 0,5 ug/L (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$), enquanto em DQC diminuição foi observada em todas as concentrações testadas. As maiores concentrações de temephos utilizadas também provocaram diminuição da atividade das MFO em Rockefeller e em DQC (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$) (Figura 1D).

Também foi realizada comparação entre as medianas das atividades de cada enzima dos grupos controle Rockefeller e DQC (Figura 1E). Ao contrário do esperado, verificamos que a atividade da maioria das enzimas em Rockefeller foi significativamente maior (*Mann Whitney*, $P < 0,05$). As exceções foram apenas a atividade de GST, maior em DQC (*Mann Whitney*, $P < 0,05$) e da esterase pNPA, para a qual não houve diferença entre Rockefeller e DQC (*Mann Whitney*, $P > 0,05$). A aplicação do critério de classificação atualmente utilizado no Brasil, no âmbito da rotina do monitoramento dos mecanismos de resistência (Montela et al 2007), não revelou alteração de nenhum perfil enzimático nas populações utilizadas (Figura 1E, última coluna).

Efeito do PI permetrina sobre *A. aegypti*

A exemplo de temephos, a mortalidade das larvas expostas a concentrações parcialmente letais de permetrina foi, de maneira geral, semelhante aos valores esperados (Tabela 1, Figura 2B,C).

Do mesmo modo que em DQC, as larvas de STR foram maiores e mais heterogêneas do que as larvas Rockefeller (Figura 2D). Com exceção de larvas STR expostas a 0,5 ug/L de permetrina, não foram encontradas diferenças significativas entre a quantidade de proteínas das larvas do grupo controle e das larvas submetidas a doses parcialmente letais de permetrina (Kruskal-Wallis, $P > 0,05$).

Ao contrário do observado com temephos, a exposição a doses parcialmente letais de permetrina não acarretou nenhuma mudança na atividade das enzimas em Rockefeller (Kruskal-Wallis, $P > 0,05$). Em Santarém houve aumento significativo apenas de esterase alfa, e somente na maior dose administrada (2,5 ug/L) (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$) (Figura 2D).

A mediana da atividade nos grupos controle, para todas as enzimas, foi significativamente maior em Rockefeller do que em STR (*Mann Whitney*, $P < 0,05$) (Figura 2E). Este dado corrobora, ainda que indiretamente, a ausência de alteração em todas as atividades enzimáticas de STR quando o critério de classificação usado na rotina do monitoramento da resistência foi empregado (Figura 2E, última coluna).

Efeito do ISQ diflubenzuron sobre *A. aegypti*

A avaliação do efeito de doses parcialmente letais de diflubenzuron sobre a atividade enzimática de *A. aegypti* foi realizada depois de exposição por 24 h e 48 h. Vale ressaltar que nos bioensaios com este ISQ avalia-se a inibição da emergência dos adultos, o que necessita de alguns dias até a finalização. No primeiro momento, tanto em Rockefeller quanto em DQC, a mortalidade foi baixa, como esperado, ficando sempre abaixo de 5% (Figuras 3B,C, Tabela 1). Depois de 48 horas de exposição, a mortalidade aumentou consideravelmente, porém em nenhum caso ultrapassou 20% (Figuras 4B,C, Tabela S).

A quantidade de proteínas totais foi maior nas larvas de DQC do que nas larvas Rockefeller nos dois momentos avaliados. Entretanto, houve grande heterogeneidade nos tamanhos das larvas, em 24 e 48 horas, em Rockefeller e em DQC (Figuras 3D, 4D). As concentrações de diflubenzuron não afetaram, em nenhum dos momentos avaliados, a quantidade de proteínas em Rockefeller. Por outro lado, em DQC, houve diminuição significativa, em 24h e 48h, da quantidade de proteínas nas maiores concentrações de diflubenzuron (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$) (Figuras 3D, 4D).

De modo geral, as maiores alterações na atividade das enzimas foram observadas depois de 24 horas de exposição e em DQC (Figura 3D). Em Rockefeller, depois de 24 horas de exposição a diflubenzuron, apenas as atividades de GST e MFO foram alteradas, apresentando-se menores que o controle somente nas maiores doses (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). Nesta condição houve ainda diferença pontual na atividade da esterase beta, na concentração de 1,2 ug/L (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). A atividade de esterase alfa de larvas de DQC expostas por 24 horas diminuiu na menor dose avaliada, 0,6ug/L (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). Ao contrário do observado em Rockefeller, houve aumento significativo nas medianas de atividade de GST e MFO nas maiores concentrações em DQC (ANOVA, $P < 0,05$).

Depois de 48 horas de exposição, tanto em Rockefeller quanto em DQC, ocorreram alterações apenas na atividade das esterases (Figura 4D). Em DQC, de maneira geral, estas alterações, um pouco mais intensas, foram evidenciadas nas maiores concentrações com os três substratos utilizados.

Comparação entre as medianas de atividade dos grupos controle, Rockefeller e DQC, indicou aumento significativo das três classes de enzimas relacionadas à resistência metabólica, EST, GST e MFO em DQC, nos dois momentos avaliados (Figuras 3E, 4E, ANOVA, $p < 0,05$). Por outro lado, aplicação dos critérios de classificação usados no monitoramento da resistência, baseados no percentil 99 de Rockefeller, não revelaram alterações consistentes entre os dois momentos avaliados: foram detectadas alterações de A-EST depois de 24 horas de exposição e de GST e MFO depois de 48 horas (Figuras 3E, 4E).

Discussão

Mosquitos estão em contato frequente com grande diversidade de xenobióticos, como toxinas de plantas, poluentes e inseticidas (Poupardin et al. 2012). Como mecanismo de defesa, insetos e outros organismos possuem um sistema enzimático que metaboliza esses compostos tóxicos, desempenhando importante função na adaptação a diversos tipos de ambientes (Terriere 1984). A aplicação intensa de inseticidas durante um longo período de tempo é responsável pelo aumento, nas populações, da frequência de indivíduos naturalmente resistentes. Entretanto, alguns estudos indicam que quando insetos estão expostos a concentrações sub ou parcialmente letais de xenobióticos, incluindo inseticidas, pode ocorrer aumento transitório da expressão de genes ou da atividade de enzimas relacionadas com a resistência (Boyer et al. 2006, David et al. 2006, Poupardin et al. 2008, Riaz et al. 2009). Neste trabalho, foi feita avaliação do efeito de concentrações parcialmente letais de três inseticidas sobre as atividades das principais classes de enzimas envolvidas com a resistência, quantificadas por meio de metodologia classicamente utilizada no monitoramento de seus mecanismos (Brogdon 1989, Hemingway 1998, Montella et al. 2007).

O efeito do OP temephos, utilizado no Brasil para controle de *A. aegypti* desde 1967 (Braga & Valle 2007), foi avaliado sobre a linhagem Rockefeller e DQC, população do estado do Rio de Janeiro. Ensaio dose resposta indicou que DQC possui alto nível de resistência a este inseticida ($RR_{95} = 10,7$). Resistência ao temephos já foi encontrada em diversas populações de campo de *A. aegypti* e provavelmente resulta do uso intenso desse OP por um longo período de tempo (Macoris et al. 1999, Lima et al. 2003). Em muitos casos, a resistência a temephos é correlacionada com o aumento da atividade ou do número de moléculas de esterases (Bisset et al. 2004, Montella et al. 2007, Bisset et al. 2011, Polson et al. 2011). Este aumento é explicado em parte pelo fato de que, de acordo com uma série de autores, esterases de insetos não são capazes de metabolizar OP, limitando-se a sequestrar as moléculas do inseticida. Assim, estas enzimas são consumidas neste processo, impedindo que o OP alcance seu sítio de ação, a ACE

(Montella et al 2012). Contudo, há grande discussão sobre a classificação das esterases, tema para o qual ainda não existe consenso (para revisão ver Montella et al. 2012). Além disto, tem sido questionada a validade dos substratos classicamente empregados para a quantificação da atividade das esterases na rotina do monitoramento dos mecanismos de resistência. Isto porque, em geral, não há correlação entre razão de resistência a OP e níveis de alteração da atividade de esterases (Ranson et al. 2008), em diferentes populações avaliadas com esta metodologia.

De fato, verificamos que exposição de larvas Rockefeller e DQC a doses parcialmente letais de temephos resultou em depleção progressiva da atividade mensurável de esterases (Figura 1). Este resultado confirma reação, com OP, das enzimas quantificadas com os três substratos utilizados nas avaliações da rotina de monitoramento dos mecanismos de resistência. Outra observação interessante diz respeito à redução de atividade de ACE, que também se liga irreversivelmente aos OP: tanto em Rockefeller quanto em DQC, a diminuição significativa da atividade de ACE só ocorreu com exposição a doses de temephos maiores do que as que primeiro resultaram em diminuição da atividade de esterases. Este dado confirma que as esterases quantificadas retiram o temephos de circulação, protegendo a ACE, o sítio de ação dos OP. Neste sentido, a ACE só passou a ser afetada por temephos quando o inseticida estava presente em doses superiores àquelas que as esterases circulantes tiveram capacidade de neutralizar completamente.

Poupardin et al. (2008) realizaram exposição de larvas da linhagem Bora-Bora de *A. aegypti* susceptível a inseticidas, a doses sub letais de vários xenobióticos, incluindo temephos, por 24 horas. Neste trabalho, os autores avaliaram a atividade de esterases ('alfa' e 'beta'), GST e MFO, além de terem utilizado o *Aedes* detox chip e realizado PCR em tempo real para confirmação das alterações encontradas. Diferente dos resultados aqui mostrados, os autores não encontraram alteração, após exposição por 24 horas a temephos, de qualquer atividade enzimática ou da expressão diferencial dos genes avaliados nas larvas expostas. Provavelmente, a divergência de resultados está relacionada com as concentrações de temephos usadas nos dois trabalhos. Em Bora-Bora, na única concentração avaliada, a mortalidade foi

menor que 5%, enquanto o presente trabalho empregou uma série de cinco concentrações, que provocavam até 50% de mortalidade. No trabalho de Poupardin et al. (2008), embora os autores tenham concluído que temephos não é um indutor expressivo de genes CYP, os resultados obtidos com o *Aedes detox* chip e com a PCR em tempo real pareceram indicar, em algumas situações, diminuição da expressão de genes CYP após exposição a este OP. Em nossas condições experimentais, exposição de larvas Rock e DQC a temephos, principalmente nas maiores concentrações, resultou, além de menor atividade de esterases e de Ace, em redução da quantificação de MFO, o que merece ser investigado com maior detalhamento.

Comparação dos grupos controle, não expostos a temephos, indicou que, em DQC, GST foi a única enzima com níveis de atividade acima do controle de susceptibilidade, Rockefeller (Figura 1E). Alteração na atividade de GST já foi detectada em populações de campo de *A. aegypti* resistentes ao temephos. Entretanto, na maioria das vezes, estas alterações foram concomitantes com alterações de esterases, e provavelmente também com resistência a outras classes de inseticidas (Montella et al. 2007, Polson et al. 2011). Mesmo podendo estar envolvida com a resistência a OP, o aumento de atividade de GST é, de maneira geral, correlacionado com resistência a piretróides (Enayati et al. 2005, Montella et al. 2007, Li et al. 2007). Apesar de alteração da atividade dessa enzima em DQC, utilização do critério atualmente utilizado para classificação das populações, na rotina do monitoramento no Brasil, não revelou nenhuma alteração do perfil enzimático nessa população (Figura 1E, última coluna).

A quantidade de proteínas totais foi mais heterogênea em DQC, situação provavelmente relacionada com a maior variabilidade intrínseca das populações de campo. A maior variabilidade das populações de campo poderiam explicar ainda a diferença nos valores absolutos de proteínas observados, menores nas larvas Rockefeller, tanto em relação a DQC quanto a STR. Em Rockefeller, porém, a quantidade de proteínas totais das larvas expostas às três últimas concentrações de temephos, foi significativamente maior que no grupo controle, não exposto ao OP. Isto poderia ser o reflexo da mortalidade preferencial dos espécimes de tamanho reduzido,

proporcionalmente expostos a doses funcionalmente mais elevadas. Contudo, vale notar que não foram encontradas diferenças estatísticas na quantidade de proteínas nas larvas Rockefeller expostas a diferentes concentrações de permetrina, mesmo naquelas em que houve mortalidade.

A população de DQC também foi avaliada com diflubenzuron. Entretanto, ao contrário do observado com temephos, a RR_{95} para este composto foi baixa, em torno de 2,5. Apesar de ter sido documentada maior tolerância a alguns inibidores da síntese de quitina em populações com altos níveis de resistência a temephos (Martins et al. 2008, Belinato et al. 2012, Belinato et al. - dados não publicados), até o presente momento nenhuma população de campo no Brasil apresentou valores altos de RR para essa classe de compostos.

Com relação à atividade enzimática dos grupos controle, não expostos a inseticidas, vale notar a diferença, inesperada, verificada entre os painéis 1E e 3E. Em princípio, nos dois casos estão sendo comparadas situações equivalentes: atividade enzimática de larvas Rockefeller e DQC não expostas a nenhum inseticida. Porém, enquanto no primeiro caso (controles do experimento com temephos) Rockefeller exibiu medianas maiores que DQC para praticamente todas as enzimas, nos controles da exposição a diflubenzuron, a mediana da maioria das enzimas foi significativamente maior em DQC. Esta situação se repetiu na avaliação com 48 horas (painel 4E). Além disso, utilização do critério de classificação baseado no percentil 99 de Rockefeller (última coluna dos painéis E das figuras 1, 3 e 4) indicou alteração, na população de campo, da atividade de esterase alfa em 24 horas e, em 48 horas, de GST e MFO. Utilização do mesmo critério no experimento com o OP não havia revelado qualquer alteração do controle DQC em relação ao controle Rockefeller. A única diferença entre as duas condições experimentais foi a adição de alimento para as larvas, no ensaio com diflubenzuron, mas não com temephos. Esses resultados parecem sugerir que variações nas condições ambientais podem exercer grande influência na atividade dessas enzimas, o que corrobora a necessidade de cuidados na interpretação dos resultados.

As maiores doses de diflubenzuron acarretaram em diminuição significativa da quantidade de proteínas em DQC, o que pode ter relação com o

mecanismo de ação deste regulador do crescimento de insetos, que de modo indireto, retarda o desenvolvimento das larvas. Entretanto, inesperadamente, em Rockefeller a quantidade de proteínas não diferiu nos grupos expostos, embora concentrações fisiologicamente equivalentes tenham sido usadas.

Concentrações parcialmente letais de diflubenzuron provocaram alterações na atividade das enzimas, principalmente após 24 horas de exposição. Este resultado aponta para efeito transiente deste ISQ sobre as enzimas envolvidas com a resistência metabólica. GST e MFO foram as enzimas mais afetadas, tanto em Rockefeller quanto em DQC. Em Rockefeller, ocorreu diminuição nas medianas de atividade dessas enzimas nas concentrações mais elevadas, enquanto em DQC observou-se o inverso, aumento das medianas. Por outro lado, comparação visual dos perfis de GST e MFO indicou manutenção da homogeneidade em Rockefeller e, em oposição, maior heterogeneidade no padrão de resposta ao aumento de concentração de diflubenzuron em DQC. Este aspecto pode refletir, em parte, a maior plasticidade de resposta das populações de campo quando comparadas com linhagens de laboratório. Depois de 48 h, a alteração nas enzimas permaneceu mais expressiva em DQC do que em Rockefeller, embora o efeito sobre GST e MFO tenha desaparecido. Neste caso, foram notadas diferenças principalmente nas esterases, embora as alterações tenham sido apenas pontuais, sem qualquer tendência aparente.

Embora poucos trabalhos investiguem os potenciais mecanismos de resistência a CSI, aparentemente as MFO parecem ter participação em sua metabolização. Tolerância a diflubenzuron, por exemplo, já foi associada a aumento de MFO em moscas (Kotze et al. 1997). Nossos resultados sugerem que GSTs também podem estar envolvidas com a tolerância a esses compostos, já que houve aumento consistente da atividade destas enzimas na população avaliada, em 24 horas. Estes resultados corroboram com recente detecção de aumento da atividade de GST em duas populações de campo selecionadas com diflubenzuron (Belinato et al. dados não publicados).

O desafio com o PI permetrina foi feito com Rockefeller e Santarém, outra população de campo. A escolha de STR foi condicionada ao alto nível de resistência à permetrina e à ausência da mutação *Kdr* na posição 1016 no

gene do canal de sódio que, comprovadamente, confere resistência a piretróides (Martins & Valle 2012). A população de DQC não foi usada, deliberadamente, por causa da frequência alta de mutação nesta posição, que poderia se sobrepôr à resistência metabólica (Azambuja-Garcia 2012, Saavedra-Rodriguez et al. 2012). No entanto, ao contrário do esperado, exposição de STR a concentrações parcialmente letais de permetrina não promoveu alteração em nenhuma das enzimas avaliadas, sugerindo a participação de outros mecanismos de resistência. De fato, análises posteriores mostraram que STR possui, em alta frequência, uma mutação em outra posição no gene do canal de sódio (1534), também relacionada com resistência a PI (Harris et al. 2010). Porém, a exemplo de STR, também não encontramos alteração nas atividades enzimáticas avaliadas nas larvas Rockefeller expostas ao PI, embora esta seja a linhagem susceptível de referência, sugerindo limitação da metodologia clássica usada no monitoramento para detalhamento dos mecanismos de resistência. Alguns trabalhos indicam que exposição de *Musca domestica* e *Culex quinquefasciatus* a permetrina acarreta em aumento da expressão de genes CYP (Poupardin et al. 2008, Zhu et al. 2008, Liu et al. 2011). Poupardin et al. (2008) detectaram aumento de atividade e de expressão de vários genes CYP em larvas Bora-Bora expostas por 24 horas a uma dose subletal desse PI, embora não tenham encontrado alteração em GST, uma das principais enzimas geralmente relacionadas à resistência a PI (Hemingway 2000, Enayati et al. 2005, Montella et al. 2007).

Neste trabalho, verificamos o *status* de resistência de populações de *A. aegypti* de campo a três inseticidas, pertencentes às principais classes utilizadas atualmente no controle do vetor no Brasil. Apesar do alto nível de resistência encontrado para temephos e permetrina, a ausência de alterações enzimáticas expressivas nos grupos controle, não expostos, das populações de campo, sugere a participação de outros mecanismos de resistência. Alternativamente, os resultados poderiam sinalizar a limitação desta metodologia, atualmente empregada na rotina do monitoramento dos mecanismos de resistência. Com relação a temephos, confirmamos que as esterases quantificadas com este ensaio de fato sequestram inseticidas OP. De

modo geral, alterações enzimáticas nas larvas expostas a inseticidas ocorreram de modo mais expressivo nas populações de campo. Este fato pode estar relacionado, além do perfil susceptível da linhagem mantida em laboratório, com sua menor diversidade genotípica, o que ocasionaria respostas de menor intensidade quando comparadas com populações de campo. Além de contribuir para a melhor compreensão da resistência aos inseticidas químicos clássicos, estes resultados representam a primeira investigação sobre a possibilidade de participação de enzimas detoxificantes na metabolização dos inibidores da síntese de quitina em mosquitos. Estes dados podem ser relevantes para o controle racional de *A. aegypti*, já que o ISQ diflubenzuron é, atualmente, o principal composto utilizado no Brasil contra populações de campo resistentes aos inseticidas tradicionais.

Referências Bibliográficas

- Azambuja-Garcia G 2012. Dinâmica da resistência a inseticidas de populações de *A. aegypti* de quatro regiões do Brasil. Dissertação de mestrado. Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ.
- Belinato TA, Martins AJ, Valle D 2012. Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. No prelo.
- Bisset JA, Rodríguez MM, Fernández D, Pérez O 2004. Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del municipio Playa, colectadas durante la etapa intensiva contra el *Aedes aegypti* en Ciudad de La Habana, 2001-2002. *Rev Cubana Med Trop* 56: 61-66.
- Bisset JA, Rodríguez MM, Ricardo Y, Ranson H, Pérez O, Moya M, Vázquez A 2011. Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008. *Med Vet Entomol* 25: 233-239
- Boyer S, David, JP, Rey D, Lemperiere G, Ravanel P 2006. Response of *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) larvae to three xenobiotic exposures: larval tolerance and detoxifying enzymes activities. *Environ Tox Chem* 25: 470-476.
- Braga IA, Valle D 2007a. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 279-293.
- Braga IA, Valle D 2007b. *Aedes aegypti*: Histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 113-118.
- Braga IA, Lima JBP, Cunha SP, Soares SS, Melo RCGM, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas States, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 199-203.
- Brogdon WG 1989. Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. *Parasitol Today* 5: 56-60.
- Da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti*

- (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444.
- David JP, Boyer S, Mesneau A, Ball A, Ranson H, C. Dauphin-Villemant C 2006. Involvement of cytochrome P450 monooxygenases in the response of mosquito larvae to dietary plant xenobiotics. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 410-420.
- Enayati A, Ranson H, Hemingway J 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol* 14: 3-8.
- Fontoura NG, Bellinato DF, Valle D, Lima JBP 2012. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 387-395.
- Gardner CL, Ryman KD 2010. Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clin Lab Med* 30: 237-260.
- Guzman M, Couri G 2003. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 27: 1-13.
- Harris AF, Rajatileka S, Ranson H 2010. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83: 277-84.
- Hemingway J, 1998. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (Field and Laboratory Manual). Geneva: World Health Organization.
- Hemingway J, Ranson H 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann Rev Entomol* 45: 371-391.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Molec Biol* 34: 653-665.
- Jansen CC, Beebe NW 2010. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect* 12: 272-279.
- Kapin M, Ahmad S 1980. Esterases in larval tissues of gypsy moth *Lymantria dispar* (L.): Optimum assay conditions, quantification and characterization. *Insect Biochem* 10: 331-337.
- Kotze AC, Sales N, Barchia IM 1997. Diflubenzuron tolerance associated with monooxygenase activity in field strain larvae of the Australian sheep blowfly (Diptera: Calliphoridae). *J Econ Entomol* 90: 15-20.

- Kuno G 2010. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J Med Entomol* 47: 957-971.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR 2007. Molecular mechanisms of metabolic Resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52: 231-53.
- Liu N, Li T, Reid WR, Yang T, Zhang L 2011. Multiple cytochrome P450 genes: Their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *PLoS ONE* 6: e23403.
- Lima JBP, da-Cunha MP, Silva-Jr RC, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D 2003. *Aedes aegypti* resistance to organophosphates in several localities in Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68: 329-333.
- Macoris M, Andrighetti MT, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VC 1999. Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the State of São Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica* 33: 521-522.
- Macoris MLG, Andrighetti MTM, Otrera VCG, Carvalho LR, Caldas Júnior AL, Brogdon WG 2007. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 895-900.
- Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, Brengues C, Yébakima A, Ranson H, Corbel V, David JP 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics* 10: 494.
- Martins AJ, Belinato TA, Lima JBP, Valle D 2008 Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Pest Manag Sci* 68: 676-80.
- Martins AJ, Valle D 2012. The pyrethroid knockdown resistance. In: Larramendy M, Soloneski S, editors. *Insecticides / Book 2*. La Plata.
- Ministério da Saúde 2009. Uso do larvicida diflubenzuron (PM25%) para controle de *Aedes aegypti*. Nota técnica N° 15/2009 CGPNDC/DIGES/SVS/MS.

- Montella IR, Martins-Jr AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle D 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467-477.
- Montella I, Schama R, Valle D 2012. Classification of Esterases: An important gene family involved in insecticide resistance. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. No prelo.
- Polson KA, Rawlins SC, Brogdon WG, Chadee DD 2011. Characterisation of DDT and pyrethroid resistance in Trinidad and Tobago populations of *Aedes aegypti*. *Bull Entomol Res* 101: 435-44.
- Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 540-55.
- POP-LAFICAVE-002. Manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório – rev 00.
- POP-LAFICAVE-004. Bioensaios dose-resposta de temephos sobre larvas de *Aedes aegypti* – ver 00.
- Poupardin R, Riaz MA, Jones CM, Chandor-Prousta A, Reynaud S, David JP 2012. Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. *Aquat Toxicol* 114-115: 49-57.
- Presti AL, Ciccozzi M, Cella E, Lai A, Simonetti FR, Galli M, Zehender G, Rezza G 2012. Origin, evolution, and phylogeography of recent epidemic CHIKV strains. *Infect Genet Evol* 12(2): 392- 398.
- Ranson H, Burhani J, Lumjuan N, Black 4th WC 2008. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net Journal*:1-12.
- Raymond M 1985 Presentation d'une programme d'analyse logprobit pour microordinateur cahiers Orstrom. *Sér Ent Med Parasitol* 22: 117-121.
- Riaz MA, Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, David JP 2009. Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquat Toxicol* 93: 61-69.
- Richmond RC, Gilbert DG, Sheehan KB 1979. Esterase 6 and reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Science* 207: 1483-1485.

- Saavedra-Rodriguez K, Suarez AF, Salas IF, Strode C, Ranson H, Hemingway J, Black WC 4th 2012. Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 21(1): 61-77.
- Scott J 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol*. 29: 757-777.
- Terriere LC 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. *Ann Rev Entomol* 29: 71-88.
- Testa B, Pedretti A, Vistoli G 2012. Foundation review: reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Drug Discov Today* 28.
- Valle D, Montella IR, Ribeiro RA, Medeiros PFV, Martins-Júnior AJ, Lima JBP 2006. Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência metabólica em *Aedes aegypti*. Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz – Brasília/DF.
- van den Berg H, Zaim M, Yadav RS, Soares A, Ameneshewa B, Mnzava A, Hii J, Dash AP, Ejov M 2012. Global trends in the use of insecticides for vector-borne disease control. *Environ Health Perspect* 120: 577-82.
- Viana-Medeiros P 2012. Investigações sobre os mecanismos de resistência em larvas de *Aedes aegypti*, Linnaeus, 1762. Dissertação de mestrado. Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, 140pp.
- World Health Organization 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva: WHO Press.
- Zeldenryk LM, Gray M, Speare R, Gordon S, Melrose W 2011. The emerging story of disability associated with lymphatic filariasis: A critical review. *PLoS Negl Trop Dis*. 5(12): e1366.
- Zhu F, Li T, Zhang L, Liu N 2008. Co-up-regulation of three P450 genes in response to permethrin exposure in permethrin resistant house flies, *Musca domestica*. *BMC Physiol* 8:18.

Figura 1: efeito da exposição de larvas de *Aedes aegypti* a doses parcialmente letais de temephos sobre a atividade de enzimas relacionadas com a resistência. A) bioensaio dose resposta com temephos da linhagem susceptível Rockefeller (Rock, azul) e da população de Duque de Caxias, RJ (DQC, vermelho). As setas sobre o eixo-x indicam as concentrações de temephos usadas nos ensaios de exposição por 24 horas indicados nos painéis restantes; B) mortalidade obtida após exposição de Rock a temephos por 24 horas; C) idem, DQC; D) gráficos de pontos indicando atividade enzimática, quantificada depois de 24 horas de exposição, às diferentes concentrações de temephos indicadas em A-C. Cada ponto corresponde à atividade de um espécime individual. PTN: quantificação de proteínas totais; ACE: atividade total de acetilcolinesterase; A-EST: atividade de esterases revelada com alfa-naftil acetato; B-EST: idem, beta-naftil acetato; PNPA-EST: idem, para-nitro-fenil acetato; GST: atividade de glutathione-S-transferases; MFO: atividade de oxidases de função múltipla. Os asteriscos vermelhos sobre os conjuntos de pontos indicam diferença significativa em relação ao controle, não exposto, da mesma linhagem ou população. E) detalhamento das atividades enzimáticas obtidas. Med: Mediana de cada distribuição; p99: valor de atividade do percentil 99 de Rockefeller; %>p99_{Rock}: percentual de indivíduos da população avaliada com atividade maior que o percentil 99 de Rockefeller. Os valores de atividade das enzimas estão expressos como segue: ACE, Δ Abs/mg ptn; A-EST e B-EST, nmol/mg ptn/min; PNPA-EST, Δ Abs/mg ptn/min; GST, mmol/mg ptn/min; MFO, nmoles cit/mg ptn. Diferenças estatisticamente significativas entre as medianas de Rock e de DQC estão indicadas por asteriscos. As cores na última coluna estão de acordo com a classificação adotada na rotina do monitoramento da resistência de *A. aegypti* a inseticidas no Brasil: %>p99_{Rock} até 15 indica atividade normal (células verdes), entre 15 e 50, atividade alterada (células amarelas).

Figura 2: efeito da exposição de larvas de *Aedes aegypti* a doses parcialmente letais de permetrina sobre a atividade de enzimas relacionadas com a resistência. Os ensaios, feitos com Rockefeller e com a população de Santarém, PA (STR), consistiram de exposição por 24 horas. Legendas como na Figura 1.

Figura 3: efeito da exposição, por 24 horas, de larvas de *Aedes aegypti* a doses parcialmente letais de diflubenzuron sobre a atividade de enzimas relacionadas com a resistência. Os ensaios foram feitos com Rockefeller e com a população de Duque de Caxias, RJ (DQC). Legendas como na Figura 1.

Figura 4: efeito da exposição, por 48 horas, de larvas de *Aedes aegypti* a doses parcialmente letais de diflubenzuron sobre a atividade de enzimas relacionadas com a resistência. Os ensaios foram feitos com Rockefeller e com a população de Duque de Caxias, RJ (DQC). Legendas como na Figura 1.

Tabela 1: Mortalidade esperada e observada nas doses parcialmente letais utilizadas

Temephos					
Rock			DQC		
Concentrações (ug/L)	Mort. Esp. (%)	Mort. Obs. (%)	Concentrações (ug/L)	Mort. Esp. (%)	Mort. Obs. (%)
Cont	0	0	Cont	0	0
0,1	0	0	1,2	1	0
0,5	1	1,3 ± 1,2	6,0	5	0
1,0	5	0,8 ± 0,7	12,0	20	7,0 ± 4,7
2,0	20	9,5 ± 2,6	18,0	30	27,5 ± 17,3
3,0	50	53,3 ± 13,4	24,0	50	52,9 ± 30,5

Permetrina					
Rock			STR		
Concentrações (ug/L)	Mort. Esp. (%)	Mort. Obs. (%)	Concentrações (ug/L)	Mort. Esp. (%)	Mort. Obs. (%)
Cont	0	0,4 ± 0,7	Cont	0	0
0,05	1	3,8 ± 2,5	0,5	1	0,4 ± 0,7
0,10	5	10,4 ± 5,0	1,0	10	2,9 ± 0,7
0,15	10	21,3 ± 7,6	1,5	20	2,9 ± 1,4
0,20	25	23,7 ± 2,5	2,0	35	12,0 ± 4,3
0,30	50	52,9 ± 5,0	2,5	50	30,8 ± 5,2

Diflubenzuron - 24h					
Rock			DQC		
Concentrações (ug/L)	Mort. Esp. (%)*	Mort. Obs. (%)	Concentrações (ug/L)	Mort. Esp. (%)*	Mort. Obs. (%)
Cont	0	0	Cont	0	0
0,3	1	0	0,5	1	0,8 ± 1,4
0,6	15	0	1,0	5	0
0,9	50	0,8 ± 1,4	2,0	50	0,8 ± 1,4
1,2	75	0,8 ± 1,4	3,0	75	2,5 ± 2,5
1,5	90	0	4,0	90	3,3 ± 1,4

Diflubenzuron - 48h					
Rock			DQC		
Concentrações (ug/L)	Mort. Esp. (%)*	Mort. Obs. (%)*	Concentrações (ug/L)	Mort. Esp. (%)	Mort. Obs. (%)
Cont	0	0	Cont	0	0
0,3	1	0,8 ± 1,4	0,5	1	1,6 ± 2,8
0,6	15	0,8 ± 1,4	1,0	5	0,8 ± 1,4
0,9	50	0	2,0	50	4,1 ± 7,2
1,2	75	3,3 ± 2,8	3,0	75	10,0 ± 2,5
1,5	90	18,3 ± 12,3	4,0	90	19,16 ± 1,4

*Mortalidade esperada quando 100% dos indivíduos do grupo controle emergem

Tabela 2: Doses efetivas de temephos, permetrina e diflubenzuron (ug/L) sobre Rockefeller e duas populações de campo, Duque de Caxias (DQC) e Santarém (STR).

Inseticida	linhagem/pop	CL ₅₀	CL ₉₅	RR ₅₀	RR ₉₅	slope
Temephos	Rock	2,88	5,32	1,0	1,0	6,2
	DQC	23,67	56,97	8,2	10,7	4,3
Permetrina	Rock	0,27	0,61	1,0	1,0	4,7
	STR	2,44	7,00	9,0	11,5	3,6
		IE ₅₀	IE ₉₅	RR ₅₀	RR ₉₅	slope
Diflubenzuron	Rock	0,90	1,70	1,0	1,0	5,9
	DQC	2,20	4,20	2,4	2,5	5,8

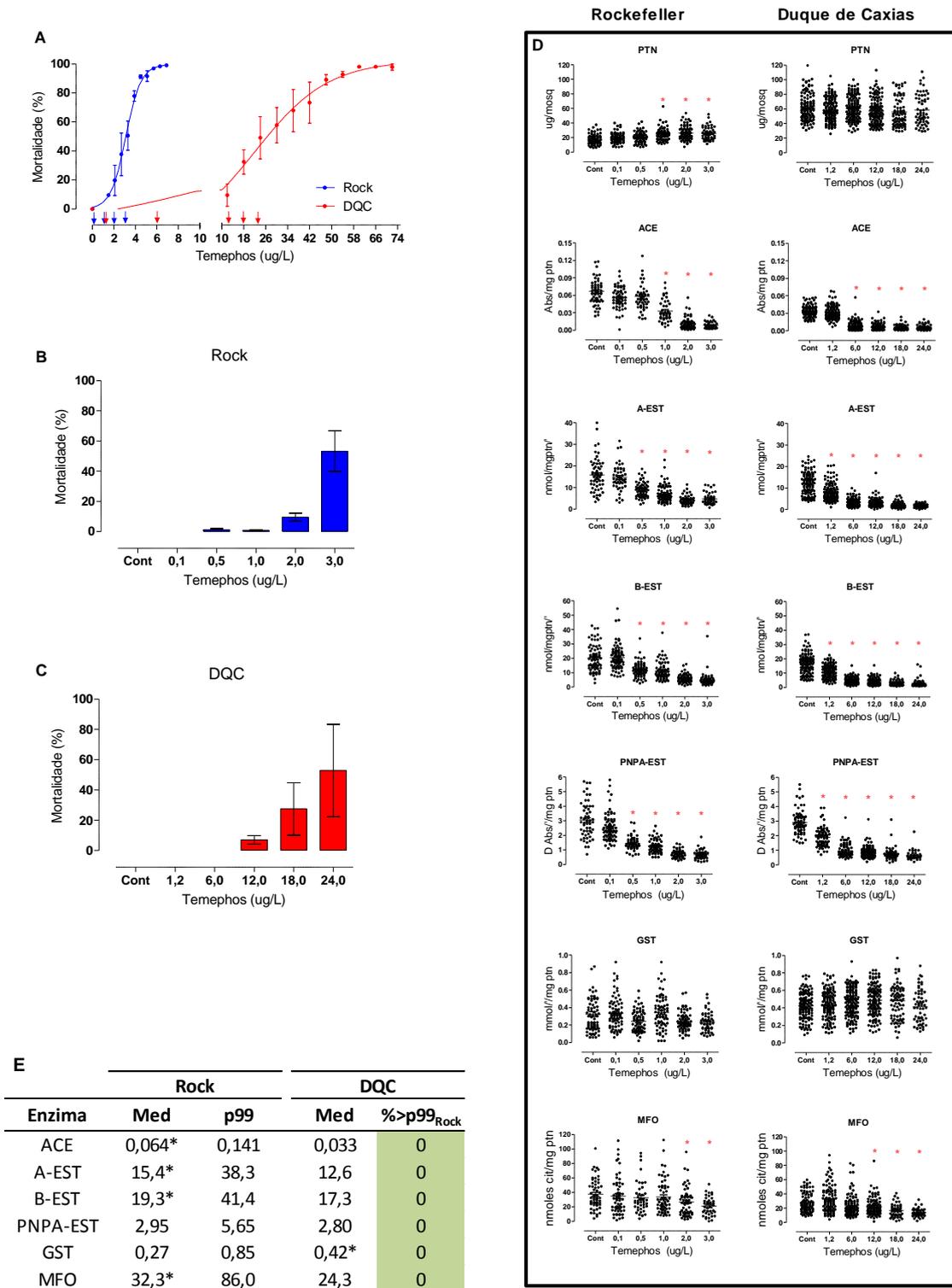


Figura 1

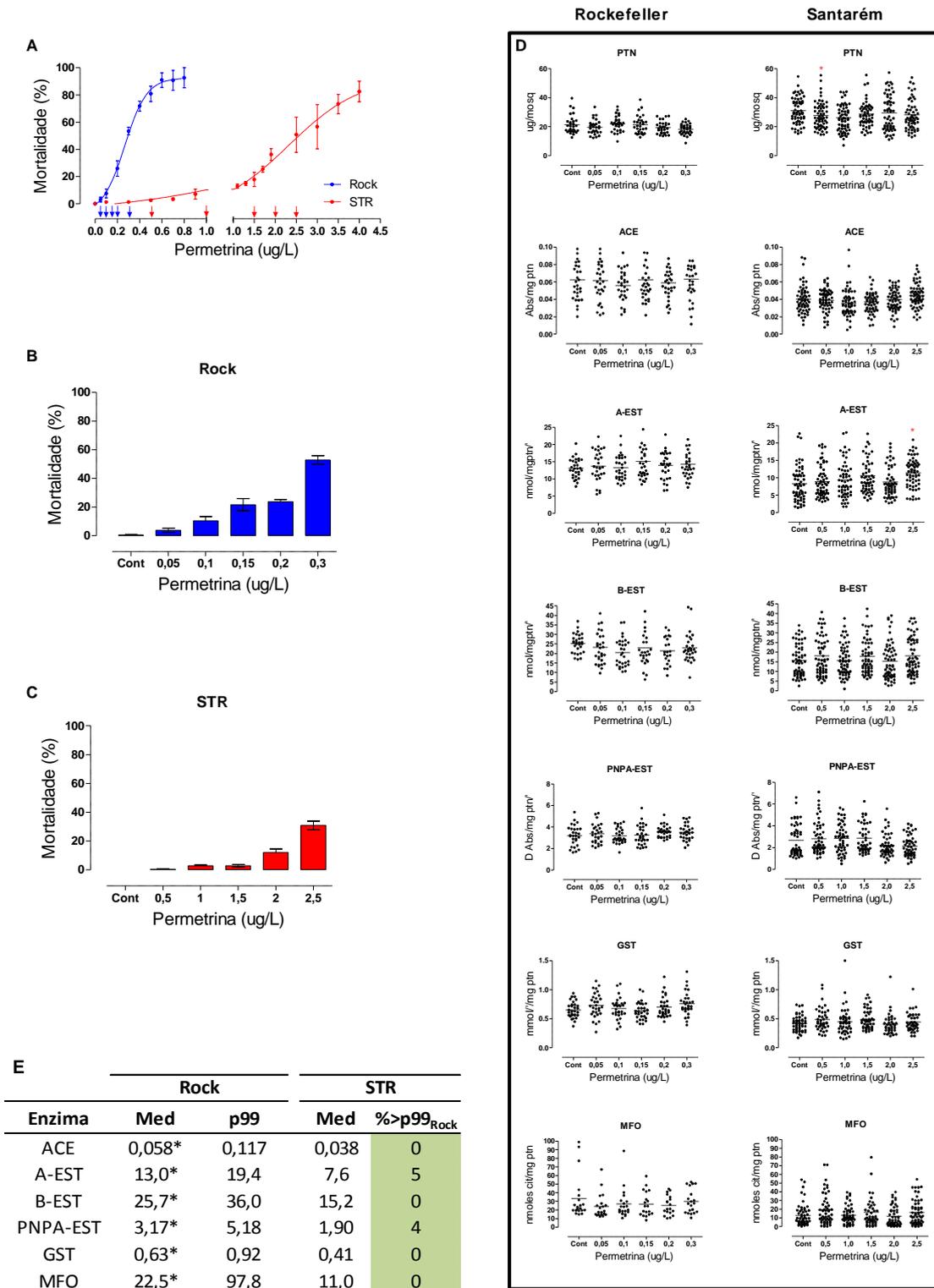


Figura 2

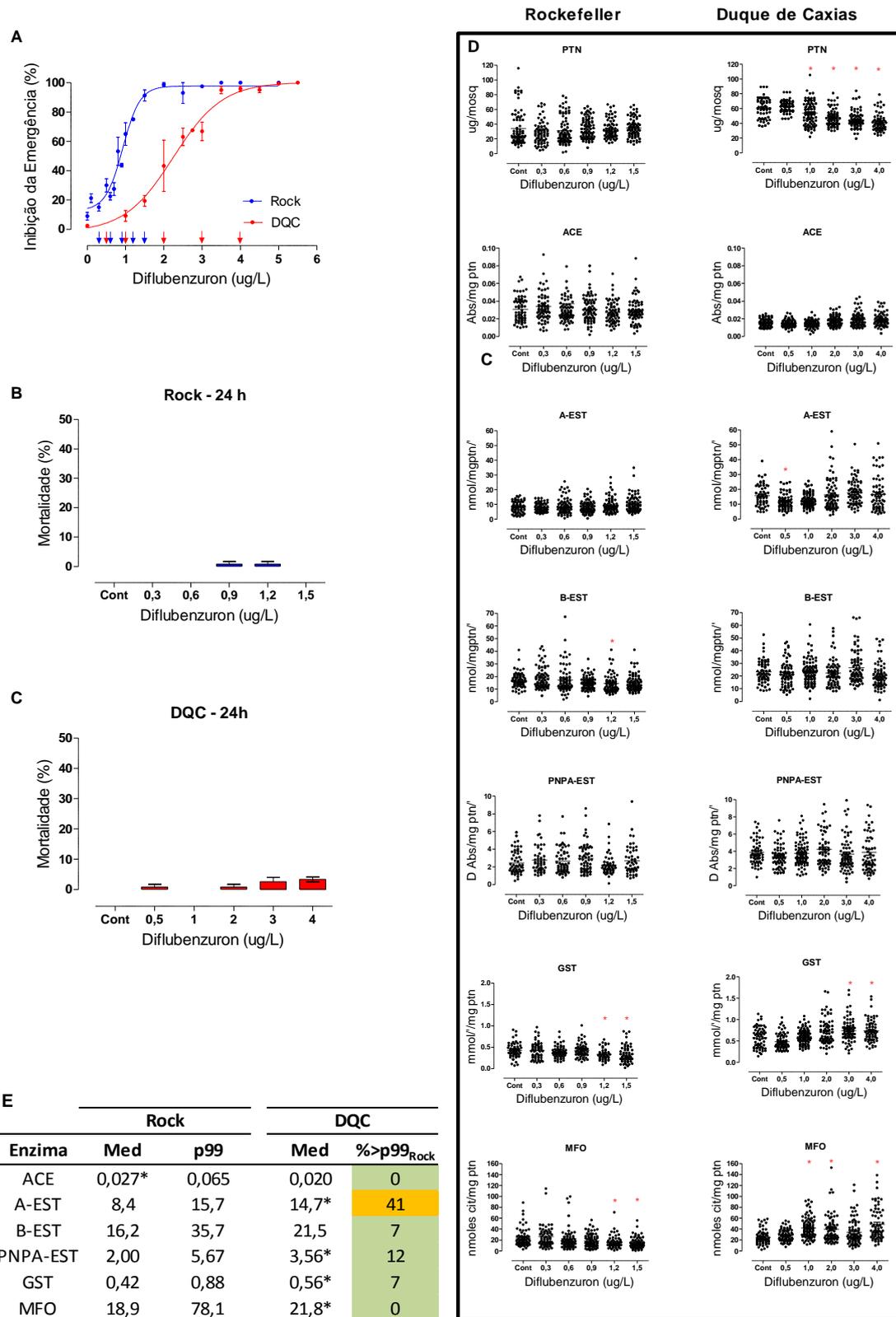


Figura 3

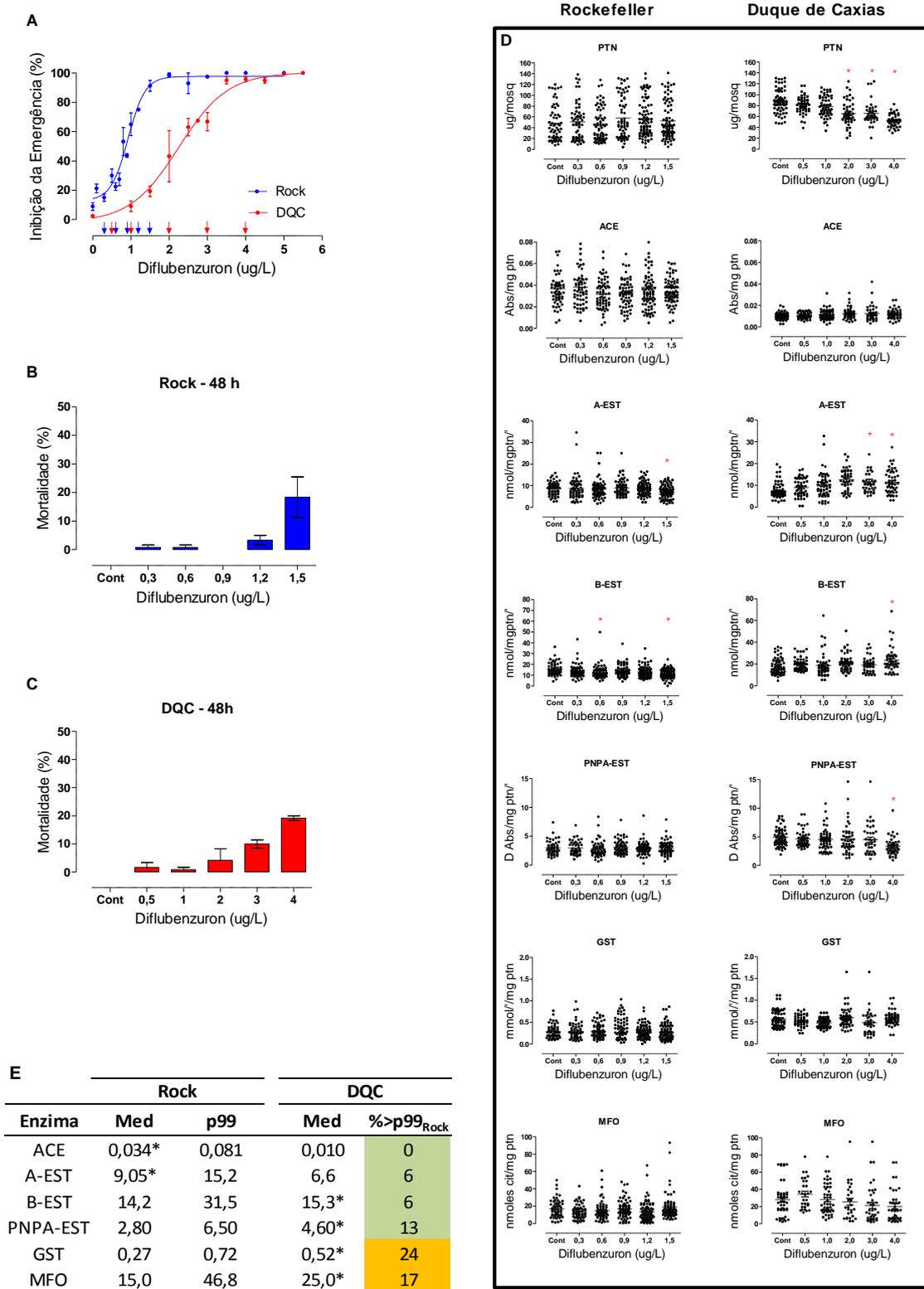


Figura 4

3.2) Artigo 2 Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos

(Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, no prelo)

Running title: *Aedes aegypti* resistance and fitness

Title: Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos

Authors:

Thiago Affonso Belinato^{1,2}, Ademir Jesus Martins^{1,2}, Denise Valle^{1,2,3/+}

¹ Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

² Laboratório de Entomologia, Instituto de Biologia do Exército, Rua Francisco Manuel, 102, 20911-270 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ³ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM)

+Corresponding author: dvalle@ioc.fiocruz.br

Abstract

In Brazil, decades of dengue vector control with organophosphates and pyrethroids has led to resistance dissemination. Although these insecticides have been employed for decades against *A. aegypti* in the country, knowledge of the impact of temephos resistance on vector viability is limited. We evaluated several fitness parameters in two Brazilian *A. aegypti* populations, both classified as deltamethrin resistant but with distinct resistant ratios (RR) for temephos. The insecticide susceptible Rockefeller strain was adopted as an experimental control. Aparecida de Goiânia/GO (RR₉₅ of 19.2), the population with the higher temephos resistance level, exhibited deficiency in four parameters: blood meal acceptance, amount of ingested blood, number of eggs and frequency of inseminated females. Mosquitoes from Boa Vista/RR, the population with lower temephos resistance level (RR₉₅ of 7.4), presented impairment in only two parameters, blood meal acceptance and frequency of inseminated females. These results indicate that the overall fitness handicap was proportional to temephos resistance levels. However, it is unlikely that these disabilities can be attributed only to temephos resistance, since both populations are also resistant to deltamethrin and harbor the *kdr* allele, which

indicates resistance to pyrethroids. The effects of reduced fitness in resistant populations are discussed.

Key words: *Aedes aegypti* - insecticide resistance – temephos - fitness

Financial support:

Instituto Oswaldo Cruz – IOC, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde, Pronex - Rede Dengue, Ministério da Ciência e Tecnologia – MCT, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Ministério da Saúde / Departamento de Ciência e Tecnologia / Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos - DECIT/SCTIE/MS, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ.

Introduction

Aedes aegypti (L., 1762) is a mosquito with wide geographic distribution, predominantly in tropical and subtropical regions (Jansen & Beebe 2010). The females feed preferentially on man and are strongly associated with the urban environment (Gubler 2002, Ponlawat & Harrington 2005, Siriyasatien et al. 2010). This species is considered the main dengue vector, both its global distribution and the number of dengue cases having expanded since the 1950s (Mackenzie et al. 2004).

Insecticides still play a major role in the control of this mosquito, especially the organophosphate (OP) temephos which was the sole larvicide recommended for drinking water for a long period (Chavasse & Yap 1997). In Brazil this pesticide has been employed since 1967 against *A. aegypti* larvae, and its use was intensified after the 1986 dengue outbreak (Braga & Valle 2007a). Control of *A. aegypti* in the country was accomplished with organophosphates until 2000-2001, when pyrethroids were introduced (Da-Cunha et al. 2005, Montella et al. 2007).

Vector control strategies based on intense and frequent insecticide applications result in increased frequency of resistance in a given population, a

situation that culminates with the impairment or even complete failure of vector control. Temephos resistance, as well as resistance to other insecticide classes, like pyrethroids, has already been detected in several *A. aegypti* Brazilian field populations (Macoris et al. 1999, Lima et al. 2003, Braga et al. 2004, Da-Cunha et al. 2005, Montella et al. 2007). Both insecticide classes, organophosphates and pyrethroids, act on the insect central nervous system. Organophosphates bind to the enzyme acetylcholinesterase while pyrethroids act on voltage gated sodium channels.

Main resistance mechanisms include modifications in the insecticide target site, which can hamper or prevent insecticide binding. Pyrethroids, for example, keep the sodium channels across axons in the open conformation, resulting in repetitive nerve impulses leading to paralysis, an effect known as "knockdown". Pyrethroid resistant insects have modified sodium channels and are called "knockdown resistant" or "kdr" (Martins & Valle 2012). Acetylcholinesterase hydrolyses the neurotransmitter acetylcholine, removing it from the synapse and interrupting the impulse propagation. In susceptible insects, organophosphate binding to this enzyme impedes its function, and the result is a continuous nerve impulse transmission (Hemingway & Ranson 2000, Ranson et al. 2004).

Another major resistance mechanism is the activation of the insect xenobiotic detoxification pathways, also known as metabolic resistance. Three groups of enzymes are involved in this process: esterases (EST), glutathion-S-transferases (GST) and mixed function oxidases (MFO) (Hemingway & Ranson 2000).

Resistant insects are supposed to exhibit a great adaptive advantage in an environment exposed to frequent or continuous insecticide pressure. Nevertheless, insecticide resistance is related to an energetic cost that can influence mosquito biology in the field. According to Roush & McKenzie (1987), fitness costs can be considered a consequence of trade-offs between the allocation of energy underlying insecticide resistance mechanisms and insect fitness. As a consequence, when the insecticide use is interrupted, resistant individuals tend to be less competitive when compared to susceptible individuals leading to decreasing frequency over time. However, in some

particular situations, resistance can be unrelated to development or reproduction. Moreover, resistance can even display a positive effect, resulting in an adaptive advantage under field conditions (Rivero et al. 2010).

Several parameters of insect biology can be affected by pesticide resistance, such as development time, adult longevity, behavior, reproduction and immune system (Berticat et al. 2002, 2004, Rivero et al. 2010). Once altered, these aspects have the potential to influence both the dynamics of insecticide resistance dissemination as well as the relationship among vectors and parasites they transmit. In order to address this correlation, the present study evaluated a series of life table parameters in two *A. aegypti* natural populations with distinct levels of resistance to OP temephos.

Materials and Methods

Mosquitoes

Two populations of Brazilian *A. aegypti* (Figure 1), Boa Vista/RR and Aparecida de Goiânia/GO, were chosen according to their levels of resistance to OP temephos, a major larvicide adopted for the control of this mosquito. Boa Vista (BVT) F2 and Aparecida de Goiânia (APG) F1 mosquitoes in the assays were derived from eggs collected in 2007 and 2008, respectively. Mosquitoes from the Rockefeller (Rock) strain, reference lineage for both susceptibility and vigor, were also analyzed as the control group (Kuno et al. 2010).

Mosquito rearing

In order to synchronize development, eggs were allowed to hatch during one hour. Groups of 1,000 first instar larvae were then transferred to plastic basins (33 X 24 X 8 cm) containing 1 L of dechlorinated water and 1 g of cat food (Friskies®, Purina, São Paulo/SP) and kept in a biological oxygen demand incubator (BOD) at 26°C. When rearing proceeded until the adult stage, food was replaced every three days. Adult mosquitoes were maintained in an insectary at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ and $80 \pm 10\%$ rh.

Bioassays

Temephos resistance levels were evaluated in larvae from both populations through dose response bioassays (WHO 1981). In each assay ten insecticide concentrations, prepared with Temephos PESTANAL® (Sigma-Aldrich), were tested. For each concentration, there were four replicas, each with 20 third instar larvae in 100 mL solution. Lethal concentrations were calculated with the Probit analysis (software Polo-PC, LeOra Software, Berkeley, CA; Raymond 1985). Resistance Ratios (RR₅₀ and RR₉₅) were obtained by dividing the lethal concentration (LC) of the field population (BVT or APG) by the equivalent LC from the Rockefeller strain.

Deltamethrin resistance was also evaluated through slight modifications of the WHO (1998) protocol with impregnated papers. Adult females, one to three days old, non blood fed, were exposed to a deltamethrin diagnostic dose (3.65 mg/m²), previously calibrated with Rockefeller. It corresponded to twice the minimal dose resulting in total mortality of Rockefeller strain after a 1 hour exposure and 24 hour recovery, as recommended for this assay. Each test consisted of three replicates with deltamethrin impregnated paper plus one control, without the insecticide. For each replica, 15-20 females were used.

Molecular assays

The allele-specific PCR-based genotyping strategy was applied to investigate the frequency of the Val1016Ile kdr substitution in the *A. aegypti* voltage gated sodium channel gene (*AaNa_v*) in BVT and APG populations. The genomic DNA extraction, PCR conditions and analysis were performed according to Martins et al. (2009).

Adult longevity

Groups of 15 males and 15 females of each field population and the Rockefeller strain were transferred to small carton cages (8.5 cm diameter and

8.5 cm high) and fed *ad libitum* with 10% sugar solution. Mortality of each gender was recorded daily.

Blood meal acceptance and amount of ingested blood

Adult females, collected in a cage containing males, three to five days old post-emergence, were put in contact with a ketamine anesthetized guinea pig (Hawk & Leary 1995) for 30 minutes. Afterwards, the number of females that successfully blood fed were recorded. To check the amount of blood ingested, we calculated the difference between the average of three groups each of 10 non-fed and 10 blood-fed females, weighed on an analytical balance (APX-200, Denver instrument) as performed elsewhere (Belinato et al., 2009).

Egg laying

Three days after the blood meal, individual females were placed in inverted Petri dishes with the lid internally lined with a filter paper soaked with dechlorinated water (Valencia et al. 1996) and kept at 26°C in a BOD incubator. After 24 hours, females were removed and three parameters were recorded: the number of ovipositing females, the number and viability of eggs.

Frequency of inseminated females

For each population, fifteen groups of three females and one male, two to three days old, were kept together in transparent 50 mL Falcon tubes. All the specimens employed in this assay were reared individually since the pupa stage, in order to ensure the virginity of the adults. After three days, female spermathecae were dissected, and the presence of spermatozooids was assessed with the aid of an optic microscope (Nikon Biophot, 200X).

Statistical analysis

All the experiments described here were repeated at least three times. Data obtained for each parameter evaluated were compared by *t* test or χ^2 analysis as indicated in the results, except for longevity data that were performed with Kruskal-Wallis, followed by Dunn's Multiple Comparison Test. Graph-Pad Prism version 5.0 for Windows was adopted for all analyses (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

Results

Insecticide resistance status of field populations

Temephos produced a dose-response effect over the Rockefeller strain and the two evaluated field populations. Table I shows lethal concentrations and resistance ratios obtained by the probit analysis. The APG population demonstrated both higher temephos resistance ratio and higher heterogeneity. Nevertheless, both APG and BVT mosquitoes presented a high resistance status against this OP. In Brazil, *A. aegypti* populations with temephos RR₉₅ above 3.0 are already considered resistant and are subject to insecticide substitution (Ministério da Saúde 2006).

Resistance to the pyrethroid deltamethrin was also evaluated. Qualitative assays, performed with the deltamethrin diagnostic dose, detected 11.7% mortality in APG mosquitoes and 37.6% in BVT. According to WHO (Davidson & Zahar 1973), mortality levels below 80% in these assays are indicative of resistance. Additionally, the *kdr* mutation Val1016Ile was detected in both populations, as depicted in Table II.

Adult longevity

Statistical comparisons of female and male survivorship were performed arbitrarily on the 30th and 40th days after adult emergence. When each gender was compared, no differences in the longevity were noted among

APG, BVT and the Rockefeller strain on both days (Kruskal-Wallis followed by Dunn's Multiple Comparison Test, $p > 0.05$). In all cases, including Rockefeller strain, females survived slightly longer, male attaining total mortality when 4.5% of females was alive (Figure 2A,B).

Blood meal

Blood meal acceptance was significantly different between field populations and the Rockefeller strain (Figure 3A). In the latter, 96% (86/90) of the females were able to feed. Significantly fewer insects from BVT (73/90) ($\chi^2_{0.05,1} = 9.11$; $p = 0.0013$) and APG (69/90) ($\chi^2_{0.05,1} = 13.42$; $p = 0.0001$) accepted the blood meal. However, no differences between field populations were noted ($\chi^2_{0.05,1} = 0.53$; $p = 0.2325$).

When the amount of ingested blood was compared, the APG population, with a higher level of temephos resistance, was significantly lower (roughly 15%), when compared to the Rockefeller strain ($t_{0.05(1),11}$; $p = 0.008$) or even with BVT ($t_{0.05(1),16}$; $p = 0.0087$) (Figure 3B). Although not significant, the amount of blood ingested by BVT females was on average 5% less than that of Rockefeller females ($t_{0.05(1),11} = 1.253$; $p = 0.1181$).

Number and viability of oviposited eggs

A relationship was observed between volume of blood ingested by each population and the amount of eggs. APG females laid a significantly lower amount of eggs (81 ± 30) than Rockefeller (103 ± 19 , $t_{0.05(1),79} = 4.096$; $p < 0.0001$) and BVT females (104 ± 17 , $t_{0.05(1),79} = 4.393$; $p < 0.0001$) (Figure 4). The average number of eggs per APG female was 21% less than of Rockefeller. By contrast, no significant differences were found between the quantity of eggs laid by Rockefeller and BVT females ($t_{0.05(1),114} = 0.2226$; $p = 0.4121$). The viability of eggs was comparable for the three strains evaluated, hatching greater than 90% ($t_{0.05(1)}$; $p > 0.05$).

Frequency of inseminated females

At the end of the three day mating period, 98% of the Rockefeller males each inseminated their three available females (Figure 5). The remaining 2% inseminated only two. In contrast, there was a great reduction in the amount of females inseminated by field males. Only 54% of the BVT males successfully inseminated their three females, 7% not inseminating any female. The plight was even more pronounced with the APG males, only 7% successfully inseminating their three females and majority (68%) not inseminating any female.

Discussion

Presently the main *A. aegypti* control strategy relies upon chemical insecticides. In Brazil, organophosphates were widely adopted in the control of both larvae and adults of this mosquito, resulting in resistance dissemination throughout the country. In 2001, pyrethroids started to be employed against adults by the Brazilian dengue control program (Braga & Valle 2007b). However, the dissemination of pyrethroid resistance was soon verified (Da-Cunha et al. 2005), initially as a consequence of metabolic resistance (Montella et al. 2007), and later as mutation in the target site (Martins et al. 2009). It is well known that in many cases one of the effects of insecticide resistance is the impairment of a series of mosquito fitness parameters. We investigated, in two field *A. aegypti* Brazilian populations, several viability parameters in order to evaluate the effect of resistance on vector fitness.

In our study a discrete longevity difference could only be noted between males and females within each strain. There is a great diversity among reports concerning insecticide resistance and longevity, both when the insecticide class or the culicid species are taken into account. This may be partially explained by differences in methodology. Deltamethrin selection of *A. aegypti* and *Culex pipiens pallens* under laboratory conditions for respectively nine (Martins et al. 2012) or 12 (Li et al. 2002) generations resulted in decreased longevity. In both cases, survival assays were performed with sugar

solution *ad libitum*. In contrast, Hardstone et al. (2010) verified that *Culex quinquefasciatus* female adults resistant to the pyrethroid permethrin survived longer than susceptible ones when sustained with sugar. However the authors did not find differences in survival neither among males and females nor between susceptible or resistant strains when adults were kept with water. In this latter case, the parameter evaluated was not longevity but tolerance to starvation, with deprivation of energy resources derived from the immature stages. Agnew et al. (2004) reported greater vulnerability to starvation for three *C. quinquefasciatus* strains, homozygous for the alleles *ester*¹, *ester*⁴ and *Ace-1*^R, all of them related to resistance to organophosphates. Adult starvation tolerance was also evaluated in an *A. aegypti* strain selected with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins. In this case, no differences were apparent between the selected group and the control group (Paris et al. 2011).

Under our experimental conditions, fewer field population females accepted the blood meal when compared to the Rockefeller strain. Additionally, females from Aparecida de Goiânia, the population with a higher temephos resistance level, ingested 15% less blood than Rock females, consequently laying 21% fewer eggs. This is a consistent result, since in culicids the amount of ingested blood is directly related to the number of eggs deposited (Clements 1992). A similar situation was observed by Martins et al. (2012) working with females after pyrethroid selection. To our knowledge there are no reports for culicids dealing specifically with insecticide resistance influence over the acceptance of blood meal.

Kumar et al. (2009) studied the effect of deltamethrin selection on the fitness of an *A. aegypti* field population, with both larvae and adults. The number and viability of eggs laid per female was evaluated in the course of three gonotrophic cycles. A similar project was conducted by Kumar & Pillai (2011) with *C. quinquefasciatus*. In any case, no significant differences were noted in the number of blood fed females, between control and insecticide selected groups. However, in all cases, when compared to controls, a higher number of pyrethroid selected females accepted the blood meal upon the first offer. Nevertheless, pyrethroid selected females from both species laid fewer eggs than control females. Although the amount of ingested blood was not

evaluated, the number of laid eggs is an indirect measurement of this parameter (Clements 1992), and it is likely that pyrethroid selected females took lower amounts of blood. In all cases, viability of eggs laid by deltamethrin selected females was also lower when compared to susceptible females. Accordingly, deltamethrin resistant *C. pipiens pallens* females laid fewer eggs than susceptible females, though in this case viability differences were not noted (Li et al. 2002). Likewise, we did not find differences in egg viability for APG or BVT populations when compared to the Rockefeller strain.

One of the most affected parameters was the mating efficiency of each population. After three days, almost all Rockefeller males (98%) successfully inseminated their three available females. In contrast, the performance of males from field populations was much lower: only 54% BVT and 7% APG males inseminated the three females. Mating efficiency was inversely proportional to the temephos resistance ratio. Using a different approach, Berticat et al. (2002) demonstrated that OP resistance significantly affects the insemination rate of *Culex pipiens*, resistant males being less competitive. Therefore, the majority of females were inseminated by susceptible males.

Although organophosphates and pyrethroids have been adopted in Brazil for the control of *A. aegypti* for more than four decades, there are few studies regarding the effects on vectorial capacity, especially of field populations. Different aspects of insect biology, like development, reproduction or longevity, among others, can be affected by insecticide resistance, and the extent of these effects can depend not only upon the type, amount and frequency of insecticide use but also on the resistance mechanism involved. Field populations can be exposed to different insecticides as a result of domestic or agricultural applications. Insect field populations can also be submitted to an eventual non integrated insecticide use in public health, when different disease vectors coexist in a given locality. Hence, perturbation of a given vector biology parameter can result from different selected mechanisms operating simultaneously. Therefore, the fitness cost related to resistance will ultimately depend upon the previous insecticide exposure of each vector population.

Although it is certain that insecticide resistance can alter vector biology, evaluation of individual parameters by different authors can reveal conflicting results. This may be attributed to peculiarities of the various vector species to different effects elicited by distinct insecticides or insecticide classes, to differences in the genetic background of field populations leading to the activation of a variety of potential resistance mechanisms or even to variations in the methodologies adopted in the evaluation of these effects. Moreover, it is important to take into account that insect fitness aspects are generally evaluated under optimal laboratory conditions. Therefore, it is expected that the extent of the effects analyzed are underestimated in the laboratory, where insects are not exposed to more stringent situations, such as abrupt temperature changes, limited nutrition and predation. Contrastingly, in the field insecticide resistance fitness trade-offs can meet more severe consequences (Kishony & Leibler 2003, Hardstone et al. 2009). Additionally, different alleles related to resistance can affect fitness positively or negatively, depending upon interaction and the environment to which insects are subjected (Berticat et al. 2008).

One must be aware that both populations evaluated here were also resistant to the pyrethroid deltamethrin and that *kdr* mutations in the target site, the voltage gated sodium channel, were detected. Previous reports suggest that these mutations spread rapidly among insect field populations (Garcia et al. 2009, Martins et al. 2009). In *A. aegypti*, this is probably related to the small impact of *kdr* on fitness, when evaluations were conducted in an insecticide-free environment under optimal laboratory conditions (Luiz Paulo de Brito Oliveira Souza, personal communication). According to our results, resistance to the OP temephos is directly related to the decreased viability and reproductive performance of the field populations when compared to the Rockefeller control strain. However, since the strains tested originated from the field, it is likely that other mechanisms involved in resistance to insecticides and *kdr* mutation may be contributing to the effects observed on fitness.

Since the application of chemical insecticides still plays an important role in the control of several insect vectors, a detailed analysis of the effect of resistance on the biology of these species can directly contribute to the development of

novel control strategies as well as to resistance management in natural vector populations.

Acknowledgements

To Gilberto Couto Alcântara, for technical assistance, and Heloisa Maria Nogueira Diniz (Serviço de Produção e Tratamento de Imagem/IOC) for help with the figures. To Dr José Bento Pereira Lima for critical evaluation of the bioassays. English review and revision by Mitchell Raymond Lishon, native of Chicago Illinois, U.S.A – UCLA 1969.

References

- Agnew P, Berticat C, Bedhomme S, Sidobre C, Michalakis Y 2004. Parasitism increases and decreases the costs of insecticide resistance in mosquitoes. *Evolution* 58(3): 579-586.
- Belinato TA, Martins AJ, Lima JBP, Lima-Camara TN, Peixoto AA, Valle D 2009. Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(1): 43-47.
- Berticat C, Bonnet J, Duchon S, Agnew P, Weill M, Corbel V 2008. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC Evol Biol* 8:104.
- Berticat C, Boquien G, Raymond M, Chevillon C 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res* 79: 41-47.
- Berticat C, Duron O, Heyse D, Raymond M 2004. Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*. *Genet Res* 83: 189-196.
- Braga IA, Lima JBP, Cunha SP, Soares SS, Melo RCGM, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas States, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 199-203.

- Braga IA, Valle D 2007a. *Aedes aegypti*: Histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 113-118.
- Braga IA, Valle D 2007b. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 295-302.
- Chavasse DC, Yap HH 1997. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneve: WHO. WHO/CTD/WHOPES/97.2.
- Clements AN 1992. The biology of mosquitoes. Vol. 1 development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall, London, 509 pp.
- Da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444.
- Davidson G, Zahar AR 1973. The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. *Bull WHO* 49: 475-483.
- García PG, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, Bond JG, Casas-Martínez M, Ramsey JM, García-Rejón J, Domínguez-Galera M, Ranson H, Hemingway J, Eisen L, William C. Black WC 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e53.
- Gubler DJ 2002. Epidemic dengue/ dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Tr Microbiol* 10: 100-103.
- Hardstone MC, Huang X, Harrington LC, Scott JG 2010. Differences in development, glycogen, and lipid content associated with cytochrome P450-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 47: 188-198.
- Hardstone MC, Lazzaro BP, Scott JG 2009. The effect of three environmental conditions on the fitness of cytochrome P450 monooxygenase-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus*. *BMC Evol Biol* 9: 42.

- Hawk CT, Leary SL 1995. Formulary for laboratory animals. Iowa State University Press. Iowa, 101 pp.
- Hemingway J, Ranson H 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann Rev Entomol* 45: 371-391.
- Jansen CC, Beebe NW 2010. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect* 12: 272-279.
- Kishony R, Leibler S 2003. Environmental stresses can alleviate the average deleterious effect of mutations. *J Biol* 2:14.
- Kumar S, Thomas A, Samuel T, Sahgal A, Verma A, Pillai MKK 2009. Diminished reproductive fitness associated with the deltamethrin resistance in an Indian strain of dengue vector mosquito, *Aedes aegypti* L. *Trop Biomed* 26: 155-164.
- Kumar S, Pillai MKK 2011. Correlation between the reproductive potential and the pyrethroid resistance in an Indian strain of filarial vector, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res* 101: 25-31.
- Kuno G 2010. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J Med Entomol* 47: 957-971.
- Li X, Ma L, Sun L, Zhu C 2002. Biotic characteristics in the deltamethrin-susceptible and resistant strains of *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae) in China. *Appl Entomol Zool* 37: 305-308.
- Lima JBP, da-Cunha MP, Silva-Jr RC, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D 2003. *Aedes aegypti* resistance to organophosphates in several localities in Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68: 329-333.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 10(12 Suppl): S98-109.
- Macoris M, Andrighetti MT, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VC 1999. Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the State of São Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica* 33: 521-522.

- Martins AJ, Lima JBP, Peixoto AA, Valle D 2009. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Trop Med Int Health* 14: 1351-1355.
- Martins AJ, Valle D 2012. The pyrethroid knockdown resistance. In: Larramendy M, Soloneski S, editors. *Insecticides / Book 2*. La Plata.
- Martins AJ, Ribeiro CDM, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D Lima JBP 2012. Effect of insecticide resistance on development longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PloS One*, 7: e31889.
- Ministério da Saúde 2006. Reunião técnica para discutir *status* de resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas. Coordenação Geral do Programa Nacional do Controle da Dengue. Relatório final, unpublished document, 27-29 March, Rio de Janeiro/RJ.
- Montella IR, Martins-Jr AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle D 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467-477.
- Paris M, David J, Despres L 2011. Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology* 20: 1184-1194.
- Ponlawat A, Harrington LC 2005. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *J Med Entomol* 42: 844-849.
- Ranson H, N'Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V 2004. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol* 27: 91-98.
- Raymond M 1985. Presentation d'une programme d'analyse logprobit pour microordinateur cahiers Orstrom. *Sér Ent Med Parasitol* 22: 117-121.
- Rivero A, Vézilier J, Weill M, Read AF, Gandon S 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog* 6(8): e1001000.
- Roush RT, McKenzie JA 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu Rev Entomol* 32: 361-380.
- Siriyasatien P, 2010. Identification of blood meal of field caught *Aedes aegypti* (L.) by multiplex PCR. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 41: 43-47.

- Valencia MDP, Miller LH, Mazur P 1996. Permeability of intact and dechorionated eggs of the *Anopheles* mosquito to water vapor and liquid water: A comparison with *Drosophila*. *Cryobiol* 33: 142-148.
- WHO 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. *WHO/VBC/81.807.1981*. World Health Organization, Geneva.
- WHO 1998. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. *WHO/CDS/CPC/MAL/98.12*. World Health Organization, Geneva.

Table 1: Susceptibility status of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations, Boa Vista (BVT) and Aparecida de Goiânia (APG), to the organophosphate temephos, the sole larvicide employed in the country since 1967. The reference strain Rockefeller (Rock) was used as the susceptibility control.

Population	LC₅₀ (ug/L)	RR₅₀	LC₉₅ (ug/L)	RR₉₅	slope
Rock	2.1	-	4.1	-	6.2
BVT	8.6	4.1	30.4	7.4	4.4
APG	32.9	15.7	78.7	19.2	3.1

Table 2: Frequency of *AaNa_v* Val1016Ile *kdr* mutation in two Brazilian *A. aegypti* populations.

Population	APG (F2)	BVT (F3)
1016 Ile allelic frequency (*)	0.293	0.067
1016 Ile/Ile genotypic frequency (*)	0.103	0.033

(*) 29 and 30 individuals from respectively APG and BVT were evaluated.

Figures



Figure 1: Brazilian map indicating regions, States and the geographical location of *Aedes aegypti* populations under evaluation. The municipality of Boa Vista is located in the State of Roraima (RR), in the North (N), and Aparecida de Goiânia in the State of Goiás (GO), in the Central West (CW) of Brazil.

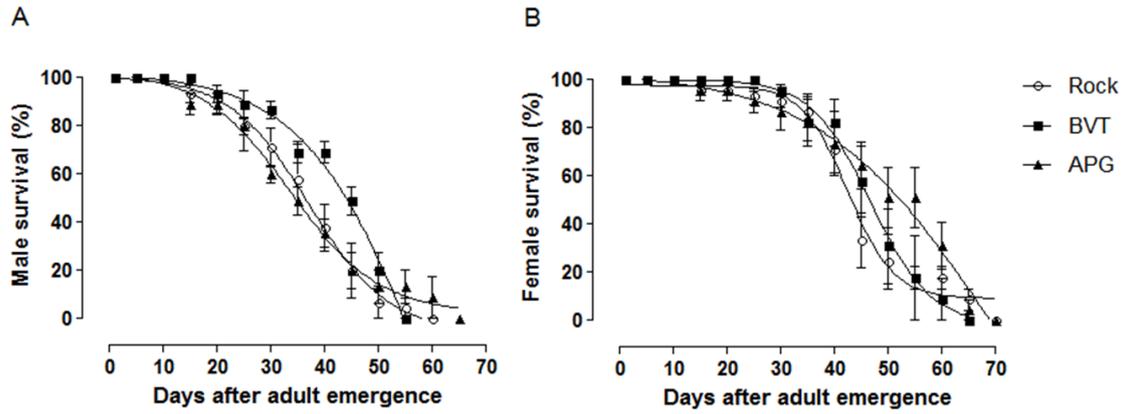


Figure 2: Non linear regression curves showing the longevity, registered every five days, of males (A) and females (B) from Rockefeller strain and two field populations, APG and BVT.

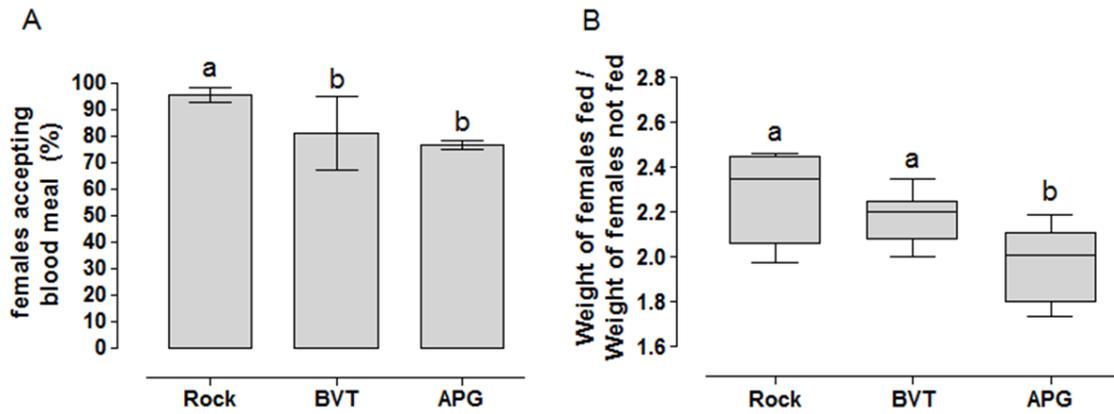


Figure 3: Rate of blood meal acceptance (A) and amount of ingested blood (B) by Rockefeller, APG and BVT *Aedes aegypti* females. Different letters above columns indicate significant differences ($p < 0.05$).

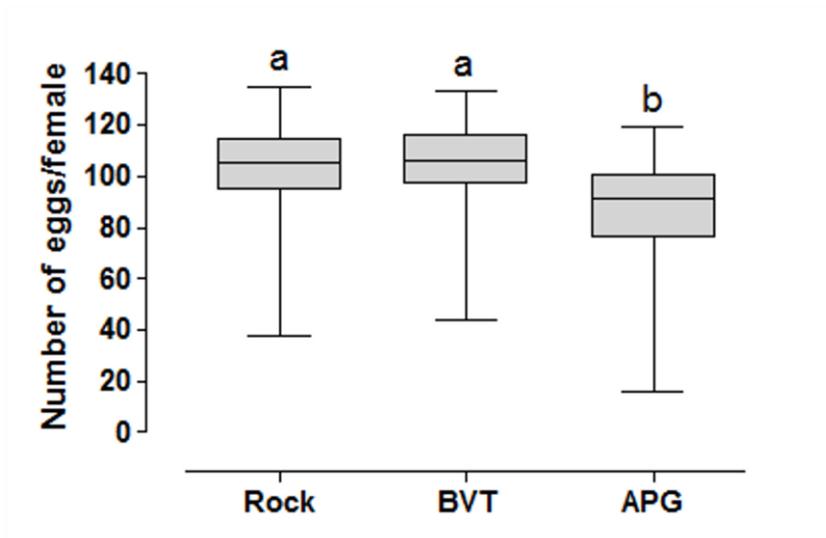


Figure 4: Median number of eggs laid by Rockefeller, APG and BVT females. (*) indicates significant differences ($p < 0.05$). Different letters above columns indicate significant differences ($p < 0.05$).

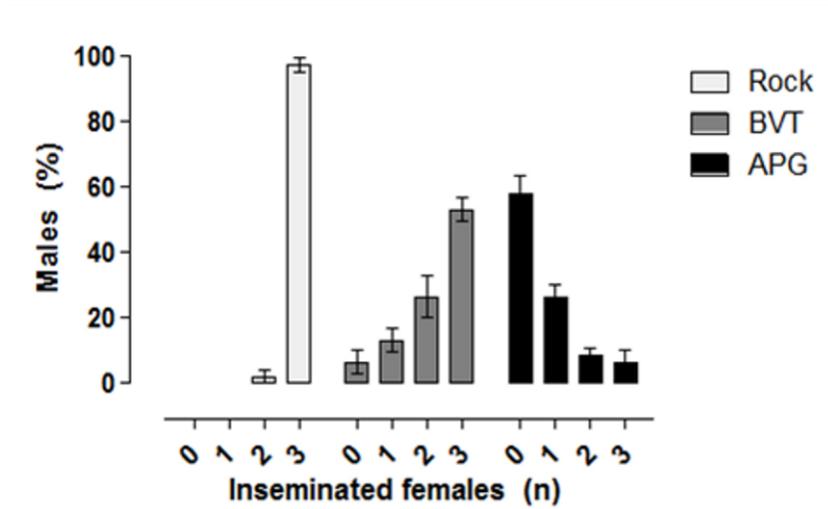


Figure 5: Mating effectiveness of Rockefeller, APG and BVT specimens under confined conditions. In all cases, tubes containing one virgin male and 3 virgin females were kept for 3 days. Spermathecae of all females were then examined for the presence of sperm.

3.3) Artigo 3: Populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) selecionadas com diflubenzuron, um inibidor da síntese de quitina, apresentam comprometimento de sua viabilidade

Título: Populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) selecionadas com diflubenzuron, um inibidor da síntese de quitina, apresentam comprometimento de sua viabilidade

Autores: Thiago Affonso Belinato^{1,2}, Denise Valle^{1,2,3,*}

1 Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, **2** Laboratório de Entomologia, Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, **3** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM)

* E-mail: dvalle@ioc.fiocruz.br

Resumo

Antecedentes: Diversas populações de *Aedes aegypti* encontram-se resistentes aos inseticidas clássicos. Diflubenzuron, um inibidor da síntese de quitina (ISQ), foi recentemente aprovado para uso em água potável e, por isso, vem sendo utilizado para controle de *A. aegypti* no Brasil. Desse modo, uma avaliação da eficiência desse composto em populações de campo e o conhecimento da dinâmica e do custo da resistência podem ser fundamentais para o controle eficaz e racional de populações de *A. aegypti*.

Métodos: Avaliou-se a eficácia de diflubenzuron sobre duas populações brasileiras de *A. aegypti* de campo, resistentes ao piretróide deltametrina e com diferentes níveis de resistência ao temephos. As populações foram selecionadas em laboratório por várias gerações com uma dose fixa, que inibia em 80% (IE₈₀) a emergência da primeira geração. Ao final da seleção, a influência da resistência sobre diversos parâmetros do *fitness*, como longevidade, aceitação de repasto sanguíneo, quantidade de sangue ingerido, número de ovos e capacidade reprodutiva, foi investigada.

Resultados: Diflubenzuron foi eficaz contra as duas populações avaliadas. Depois de seis ou setes gerações, a emergência de adultos nos grupos selecionados foi equivalente a dos grupos não expostos. Indivíduos selecionados apresentaram comprometimento de diversos parâmetros do *fitness*. Houve redução na taxa de aceitação do repasto sanguíneo, quantidade

de sangue ingerido, número de ovos e quantidade de fêmeas inseminadas. A longevidade dos adultos foi o parâmetro menos afetado.

Conclusão: Diflubenzuron pode ser considerado uma importante ferramenta no controle de populações resistentes aos inseticidas clássicos. Seleção com este ISQ aumentou o *status* de resistência das populações em poucas gerações. Entretanto, verificamos que a resistência a este composto está associada a um custo de viabilidade e de capacidade reprodutiva.

Sumário do autor

O uso indiscriminado de inseticidas, como organofosforados e piretróides, culminou com a disseminação de resistência em diversas populações de vetores. Os inibidores do crescimento dos insetos representam, atualmente, uma das poucas alternativas viáveis de controle químico de larvas de *Aedes aegypti*, vetor da dengue. No Brasil, o uso de diflubenzuron, um inibidor da síntese de quitina, foi recentemente introduzido nos locais onde as populações de *A. aegypti* encontram-se resistentes aos inseticidas tradicionais. Duas populações de campo, Boa Vista, RR (BVT) e Aparecida de Goiânia, GO (APG), resistentes ao organofosforado temephos e ao piretróide deltametrina, foram selecionadas, em laboratório, com diflubenzuron. O efeito da seleção sobre a resistência ao diflubenzuron e sobre o *fitness* do mosquito foi investigado nas populações. Ao final do processo, diversos parâmetros da biologia, em ambas as populações estudadas, foram afetados, indicando que aquisição de resistência ao diflubenzuron gera um custo, quando avaliada sob condições de laboratório. Esperamos, com esses resultados, contribuir para o desenho de estratégias racionais de controle do vetor em campo.

Introdução

Mosquitos são responsáveis pela transmissão de uma série de doenças ao ser humano (Clements 1992). *Aedes aegypti* (L., 1762), por exemplo, é capaz de transmitir diversas arboviroses, como febre amarela, chikungunya e dengue (Barrett & Higgs 2007, Pialoux et al. 2007, Jansen &

Beebe 2010). Esse mosquito se adaptou perfeitamente ao *habitat* urbano e, por esse motivo, a distribuição global dessa espécie tem aumentado ao longo dos anos (Mackenzie et al. 2004). Esse fato está diretamente relacionado com o aumento do número de casos de dengue, que acomete, anualmente, cerca de 50 milhões de pessoas, tornando-a uma das principais arboviroses transmitidas por mosquitos (WHO 2009).

Nos últimos 50 anos, grandes esforços têm sido concentrados no desenvolvimento de uma vacina contra o vírus da dengue. Entretanto, a construção de uma vacina eficaz contra os quatro sorotipos do vírus tem se mostrado um objetivo extremamente desafiador (Thomas & Andy 2011). Por esse motivo, a única estratégia de combate à doença, atualmente, é o controle do vetor. O meio mais efetivo de combate ao *A. aegypti* é o controle mecânico, ou seja, a remoção dos possíveis criadouros do mosquito. Entretanto, o controle químico, com inseticidas, ainda é importante. Os inseticidas podem ser empregados contra adultos, em tratamentos de ação residual, em aplicação espacial ou ainda como larvicidas.

Atualmente, dois grandes grupos de inseticidas têm destaque no controle de vetores: organofosforados (OP) e piretróides (PI) (Braga & Valle 2007a). Todos os compostos pertencentes a estas classes agem no sistema nervoso central dos insetos (Beaty & Marquardt 1996, WHO 2006). Contudo, sua aplicação indiscriminada culminou com a disseminação de resistência de diversas populações de vetores, inviabilizando em muitas localidades o uso destas classes de inseticidas (Macoris et al. 1999, Lima et al. 2003, Braga et al. 2004, da-Cunha et al. 2005, Macoris et al. 2007). No Brasil, por exemplo, diversas populações de campo exibem elevados níveis de resistência ao OP temephos, utilizado há mais de 40 anos no país no combate às larvas de *A. aegypti* (Braga & Valle 2007b).

Um importante mecanismo de resistência a inseticidas são as alterações nos sítios-alvo, que impedem ou dificultam a ligação dos agentes químicos. Outro mecanismo importante é conhecido como resistência metabólica, e se baseia na alteração dos níveis e/ou atividade de enzimas envolvidas com a detoxificação de xenobióticos, tais como as glutathione-S-transferases (GST), monooxigenases P450 e esterases. A resistência

metabólica garante a eliminação ou a diminuição do inseticida circulante, impedindo que alcance seu sítio final de ação (French-Constant et al. 1998, Hemingway & Ranson 2000). Sozinhos ou combinados estes mecanismos conferem resistência, muitas vezes em altos níveis, a todas as classes de inseticidas químicos disponíveis (Hemingway et al. 2004).

Uma alternativa para o controle das populações de campo resistentes aos inseticidas tradicionais é a utilização de compostos com mecanismos de ação completamente distintos. Nesse contexto, têm destaque os Reguladores do Desenvolvimento de Insetos (IGR, sigla do termo em inglês: "Insect Growth Regulators"), grupo que tem sido utilizado para o controle de mosquitos vetores de doenças em Saúde Pública (WHO 2006). Diflubenzuron, um IGR que inibe a síntese de quitina, foi o primeiro composto dessa classe utilizado comercialmente. A princípio foi empregado no controle de pragas na agricultura e, logo após, passou a ser utilizado em medicina veterinária para o controle de moscas (Graf 1993). Diversos estudos mostram a eficácia de diflubenzuron sobre mosquitos (Ansari et al. 2005, Chen et al. 2008, Suman et al. 2010, Msangi et al. 2011). Em 2003, seu uso em água potável foi recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO 2012). Em função disto, no Brasil, diflubenzuron foi recentemente introduzido no âmbito do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) para combate de populações de *A. aegypti*, principalmente aquelas resistentes aos inseticidas químicos tradicionais (Ministério da Saúde 2009).

Embora a resistência a inseticidas seja um grande problema para os programas de controle de vetores, em geral indivíduos resistentes só possuem vantagem adaptativa na presença do inseticida. Isso ocorre porque a resistência tem um custo energético que pode influenciar negativamente parâmetros básicos da biologia do inseto (Roush & McKenzie 1987, Rivero et al. 2010, Rivero et al. 2011). Por esse motivo, em geral é esperado que na ausência de inseticidas a vantagem de insetos susceptíveis seja maior, e que a frequência de indivíduos resistentes diminua ao longo das gerações (Roush & McKenzie 1987). Desse modo, a dinâmica da resistência está diretamente relacionada com a frequência do uso de inseticidas e com o impacto da resistência sobre o *fitness* do inseto.

Diversos estudos mostram que a resistência aos inseticidas clássicos causa efeitos negativos no *fitness* de mosquitos (Berticat et al. 2002, Li et al. 2002, Paris et al. 2011, Belinato et al. 2012). Entretanto, trabalhos que avaliam o impacto da resistência a IGR na biologia de insetos são escassos. No presente estudo, duas populações brasileiras de *A. aegypti* foram selecionadas em laboratório com este ISQ. Foram avaliados a evolução da resistência e seu impacto em diversos parâmetros da biologia das populações, depois de seis ou sete gerações.

Métodos

Mosquitos

Foram utilizadas amostras de duas populações brasileiras de *A. aegypti*: Boa Vista/RR (BVT) (F2), localizada na Região Norte do Brasil e Aparecida de Goiânia/GO (APG) (F1), na Região Centro Oeste. A coleta das duas populações foi realizada em 2008, por meio de ovitrampas, pelas Secretarias Municipais de Saúde. No laboratório, os ovos foram postos a eclodir e as larvas criadas por meio de procedimento padrão rotineiramente utilizado (POP-LAFICAVE-002). Foi realizada identificação e triagem de adultos de *Ae. aegypti* para obtenção das gerações utilizadas nos ensaios. Testes qualitativos indicaram que ambas são resistentes ao piretróide deltametrina, e que mutação no sítio alvo, o canal de sódio regulado por voltagem, está relacionada, pelo menos parcialmente, com a resistência. As duas populações também são resistentes ao OP temephos, com razões de resistência 7,4 (BVT) e 19,2 (APG) (Belinato et al. 2012). A linhagem Rockefeller, padrão internacional de vigor e susceptibilidade a inseticidas (Kuno 2010), foi utilizada como controle experimental, não tendo sido selecionada com diflubenzuron. As avaliações nessa linhagem foram feitas simultaneamente com as populações de campo, antes (Rock A) e após (Rock B) seleção com diflubenzuron.

Criação das larvas para realização dos bioensaios

Ovos das duas populações e da linhagem Rockefeller foram postos a eclodir de forma sincronizada. Após uma hora, aproximadamente 1.000

larvas foram transferidas para bacias de plástico transparente (33 X 24 X 8 cm) contendo um litro de água desclorada e 1 g de ração para gatos (Friskies®, Purina, São Paulo/SP). As bacias foram mantidas a 26 ± 1 °C e, após três dias, quando a maioria das larvas alcançam o terceiro estágio, os ensaios foram realizados (WHO 1981).

Quantificação da susceptibilidade das populações ao diflubenzuron

Em cada ensaio, pelo menos nove concentrações de diflubenzuron PESTANAL® (Sigma-Aldrich) foram utilizadas. Para cada concentração foram usadas quatro réplicas, cada qual contendo 10 larvas de terceiro estágio, em copos plásticos transparentes, com 150 mL de solução. Uma vez que inibidores da síntese de quitina não têm como efeito primário a mortalidade, e sim o comprometimento do desenvolvimento, os espécimes foram avaliados até a emergência completa de adultos do grupo controle, como definido anteriormente para esta classe de compostos (Martins et al. 2008). Em cada copo adicionou-se, apenas uma vez, 1 mL de uma solução a 1,5 % (p/v) de ração triturada. A cada dois dias, a mortalidade por estágio foi verificada.

As doses efetivas que inibem a emergência dos adultos (IEs) foram calculadas através do *software* Polo PC via análise Probit (*software* Polo-PC, LeOra Software, Berkeley, CA; Raymond 1985). As Razões de Resistência (RR₅₀ e RR₉₅) das populações foram obtidas dividindo-se as concentrações que inibem a emergência em 50 % e 95 % (IE₅₀ e IE₉₅) pelos respectivos valores encontrados para a linhagem Rockefeller.

Seleção com diflubenzuron

As duas populações, BVT e APG, foram expostas a cada geração a uma concentração fixa de diflubenzuron. Todo o processo foi feito com dose de diflubenzuron correspondente àquela que inibia a emergência dos adultos em 80 % (IE₈₀) na geração inicial. Embora com este procedimento a pressão de seleção não seja funcionalmente equivalente em todas as gerações, a fixação de uma dose tem paralelo com o controle em campo, além de ter permitido maior agilidade na obtenção de espécimes resistentes, prescindindo da realização de testes dose-resposta a cada geração. Os valores das doses para BVT e APG foram 1,8 µg/L e 3,2 µg/L, respectivamente (Tabela 1).

Grupos de 1.000 larvas de terceiro estágio foram colocados em bacias plásticas (33 X 24 X 8 cm), onde havia sido adicionada solução com o IGR, um litro de água desclorada e 1 g de ração para gatos (Friskies®, Purina, São Paulo/SP). Para cada população, dois e três grupos foram mantidos, respectivamente, na ausência e na presença de diflubenzuron. Não houve, durante o processo, troca de indivíduos entre estes grupos. As pupas eram retiradas diariamente das bacias e transferidas para gaiolas, com solução açucarada a 10 %, para emergência dos adultos, mantidas em insetário com temperatura e umidade controladas ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ e $80 \pm 10\%$ rh). As fêmeas eram alimentadas semanalmente em cobaios para a obtenção de ovos, de acordo com procedimento aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA - Fiocruz). A população de BVT foi selecionada com diflubenzuron por seis gerações e a de APG, por sete gerações. Nesse momento, foram realizados novos ensaios dose-resposta com o IGR e experimentos para avaliação de diferentes aspectos da viabilidade e reprodução, como já descrito para as populações originais, antes da seleção (Belinato et al. 2012).

Avaliação do fitness dos mosquitos selecionados

Após seleção com diflubenzuron, vários aspectos da biologia das populações foram avaliados. Os mesmos ensaios foram realizados com os grupos mantidos na ausência de diflubenzuron e também, paralelamente, com a linhagem Rockefeller.

Longevidade dos adultos

Grupos de 15 machos e 15 fêmeas foram colocados em gaiolas (8,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura) e alimentados continuamente com solução açucarada a 10 %. A mortalidade foi registrada a cada dois ou três dias em todos os grupos. Comparações estatísticas da sobrevivência foram realizadas arbitrariamente nos dias 30 e 40 após a emergência dos adultos, períodos nos quais as diferenças entre os grupos pareciam maiores.

Aceitação do repasto sanguíneo e quantidade de sangue ingerido

Fêmeas de três a cinco dias de vida adulta, sem acesso à solução de água açucarada por 24 horas, foram expostas a um cobaio anestesiado por 30 minutos. Avaliou-se então o número de fêmeas que se alimentaram e a quantidade de sangue ingerido. Para isto, grupos de 10 fêmeas alimentadas ou não alimentadas foram pesados em uma balança analítica (APX-200, Denver Instrument). A quantidade de sangue ingerido foi calculada pela subtração da média do grupo alimentado pela do grupo não alimentado.

Postura de ovos

Três dias depois da alimentação sanguínea, as fêmeas foram colocadas individualmente em placas de Petri invertidas, sobre tampas revestidas internamente com papel de filtro umedecido com água desclorada (Valencia et al.1996). Posteriormente, as placas foram transferidas para estufa a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Foram então registrados: a) o número de fêmeas que conseguiu realizar a postura de ovos, b) o número e c) a viabilidade dos ovos.

Taxa de fêmeas inseminadas

Quinze grupos, cada qual constituído por três fêmeas e um macho, todos com dois a três dias de vida adulta, criados em tubos individuais a partir do estágio de pupa e, portanto, todos virgens, foram colocados em tubos plásticos transparentes de 50 mL por três dias. Após esse período, foi verificado o número de fêmeas inseminadas em cada grupo por meio de detecção de espermatozóides nas espermatecas, com o auxílio de um microscópio óptico (Nikon Biophot, 200X). Para facilitar a avaliação da capacidade reprodutiva dos machos, procedeu-se, para cada condição, ao somatório do produto de cada número de fêmeas inseminadas (0, 1, 2 ou 3) pela porcentagem de machos que inseminou cada grupo de fêmeas:

$$(\sum(\text{♀}_{0-3} * \% \text{♂}))$$

Com este procedimento, os números obtidos podiam variar entre zero (caso 100% dos machos não inseminassem fêmea alguma) e 300 (se 100% dos machos inseminassem as 3 fêmeas disponíveis).

Análise estatística

Os bioensaios com diflubenzuron e todos os ensaios referentes às avaliações de aspectos da biologia das populações selecionadas com este composto foram repetidos três vezes, em dias diferentes. A análise dos resultados foi realizada através do teste *t-Student* e qui-quadrado (χ^2). Os dados de longevidade foram comparados através de Kruskal-Wallis, seguida de comparação múltipla de Dunn's. O software Graph-Pad Prism versão 5.0 para Windows foi utilizado para realização dessas análises (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

Resultados

Efeito de diflubenzuron sobre A. aegypti

Pré-seleção

Ensaio dose-resposta foram realizados para obtenção das doses efetivas deste IGR para a linhagem Rockefeller e para as populações de campo. Foi verificado que diflubenzuron apresentou efeito dose-dependente sobre a inibição da emergência em *A. aegypti* (Figura S1). Os valores das doses efetivas que inibiram a emergência em 50, 80 e 95 %, e as Razões de Resistência (RR) das duas populações, encontram-se na Tabela 1.

A Figura 1A mostra a mortalidade por estágio em cada dose utilizada. Pode ser observado que a proporção de mortalidade no estágio de larva aumenta com o aumento das concentrações desse IGR. Também foi avaliada a proporção de machos e fêmeas nas doses em que houve emergência de adultos viáveis. Apesar do baixo número de adultos viáveis nas maiores concentrações, a quantidade relativa de machos foi sempre superior em altas doses de diflubenzuron (Figura 2A). Apenas para APG, a população com maior nível de resistência inicial ao diflubenzuron, ocorreu emergência de adultos viáveis até a maior dose utilizada (Figura 1).

Seleção com diflubenzuron

As duas populações avaliadas, APG e BVT, foram expostas a cada geração com uma dose que, inicialmente, inibia a emergência de adultos em 80 % (IE80). Para cada população também foram mantidos grupos em paralelo, na ausência do IGR. A mortalidade dos grupos expostos ao diflubenzuron foi progressivamente menor, indicando seleção de resistência, ao longo das gerações avaliadas (Figura 3). Entretanto, a evolução da resistência nas duas populações a esse composto foi diferente. Para BVT (Figura 3A), na geração F2 a média da emergência de adultos viáveis nos três grupos experimentais já havia ultrapassado 50 %. No caso de APG (Figura 3B), a taxa de 50 % de emergência nos três grupos experimentais só foi alcançada na geração F4. A média de emergência de adultos, ao longo das gerações, nos grupos controle de BVT, foi $92,2 \pm 2,3\%$. Nos grupos controle de APG, os valores foram semelhantes: emergiram, em média, cerca de $93,2 \pm 2,5\%$ de adultos. Nos grupos experimentais a média de emergência de adultos, na última geração avaliada, foi equivalente a dos grupos controle. Em BVT a emergência foi de $91,7 \pm 3,7\%$ e, em APG, $88,7 \pm 0,7\%$.

Nas duas populações, a proporção entre machos e fêmeas oscilou ao longo das gerações tendo permanecido, em geral, próxima da relação 1:1 entre os dois sexos (Figura S2).

Pós-seleção

Todos os grupos, expostos ou não expostos a diflubenzuron, foram submetidos a novos ensaios dose-resposta, na geração F6, no caso de BVT ou F7, para APG. A linhagem Rockefeller (Rock B) foi usada como controle interno de todos os ensaios. Da mesma maneira que nas gerações iniciais, o efeito de diflubenzuron foi dose-dependente em todos os casos (Figura 4). A Figura 4A mostra o efeito de diflubenzuron nos grupos não expostos e a Figura 4B, nos grupos expostos a esse IGR. Nos grupos não expostos, a concentração de 5 ug/L inibe totalmente a formação de adultos. Comparativamente, nos grupos selecionados, cerca de $27 \pm 15\%$ de adultos são viáveis nessa concentração.

As RRs de BVT nos grupos mantidos sem diflubenzuron permaneceram abaixo de 2 (Tabela 1, "BVT F6 cont"). A mesma situação

aconteceu com os grupos controle de APG (Tabela 1, “APG F7 cont”), população que inicialmente tinha valores de RR acima de 2 (Tabela 1). Por outro lado, nos grupos expostos ao IGR, as RR alcançaram valores acima de 3, com exceção da RR₉₅ de BVT (Tabela 1).

Também foi avaliada, em todos os grupos, a mortalidade por estágio (Figura 1B). Em todos os casos, a mortalidade em larvas aumentou nas concentrações mais altas de diflubenzuron, assim como evidenciado na geração inicial. Nos grupos mantidos na ausência de diflubenzuron, a proporção de larvas mortas nas diferentes concentrações foi maior quando comparados com a geração inicial (Figura 1). Situação oposta foi verificada nos grupos expostos ao diflubenzuron, quando houve formação de adultos viáveis em concentrações do IGR letais para a totalidade dos espécimes nas populações originais (Figura 1B, Tabela 1).

Assim como para as gerações iniciais, foi verificada a proporção de machos e fêmeas resultantes, nos grupos selecionados ou não com diflubenzuron. Também neste caso, nas maiores concentrações do IGR, a quantidade de indivíduos resultantes foi extremamente pequena e composta por maior proporção de machos (Figura 2B).

Avaliação de aspectos da viabilidade e reprodução nas populações selecionadas

Longevidade dos adultos

A Figura 5 mostra o percentual de machos ou fêmeas sobreviventes em cada situação experimental, para cada população e para a linhagem referência, Rockefeller. Comparação, nos dias 30 e 40 após a emergência dos adultos, não revelou qualquer diferença significativa entre Rockefeller e as populações de campo, ou entre os grupos controle e aqueles expostos ao diflubenzuron, ou entre machos e fêmeas ou ainda entre BVT e APG (Kruskal-Wallis; $p > 0.05$). A única exceção foi o grupo de fêmeas APG expostas ao diflubenzuron, em relação às fêmeas Rockefeller e às fêmeas APG do grupo controle, mantido sem o IGR, no dia 40 (Kruskal-Wallis; $p < 0.05$).

Aceitação do repasto sanguíneo

Cerca de 96 % dos indivíduos da linhagem Rockefeller realizou o repasto sanguíneo (87/90) (Figura 6). Situação semelhante ocorreu com os grupos controle de BVT, dos quais 95 % dos indivíduos se alimentaram (173/181) ($\chi^2_{0.05,1} = 0,1822$; $p = 0.3347$). Por outro lado, menor proporção de fêmeas dos grupos controle de APG foi eficaz na ingestão de sangue (84%, ou 152/180) ($\chi^2_{0.05,1} = 13,57$; $p = 0.0001$). A seleção com diflubenzuron afetou significativamente a capacidade das duas populações de realizar repasto sanguíneo. Apenas 62 % (168/275) e 49 % (146/270) dos indivíduos selecionados de BVT e APG, ingeriram sangue, respectivamente. Estes percentuais são significativamente menores quando comparadas com a linhagem Rockefeller (BVT: $\chi^2_{0.05,1} = 40,76$; $p < 0.0001$; APG: $\chi^2_{0.05,1} = 64,67$; $p < 0.0001$). Comparações entre os grupos expostos a diflubenzuron e os grupos controle de cada população também revelaram diferenças significativas (BVT: $\chi^2_{0.05,1} = 68,85$; $p < 0.0001$; APG: $\chi^2_{0.05,1} = 45,70$; $p < 0.0001$). Vale ainda mencionar que, a exemplo dos grupos controle de BVT e APG, a diferença entre os grupos expostos a diflubenzuron também foi significativa entre as duas populações ($\chi^2_{0.05,1} = 8,19$; $p = 0.0021$).

Quantidade de sangue ingerido

O volume de sangue ingerido também foi comparado entre a linhagem Rockefeller e os grupos experimentais. Aparentemente as fêmeas da linhagem Rockefeller foram as que ingeriram maior volume de sangue em relação ao peso corporal. Cada fêmea ingeriu, em média, $2,5 \pm 0,3$ vezes seu peso em sangue (Figura 7). Apenas o grupo controle de BVT não diferiu significativamente de Rockefeller ($t_{0.05(1),22} = 1.119$; $p = 0.1377$). As fêmeas controle de APG ingeriram cerca de 25 % menos sangue ($t_{0.05(1),19} = 4.960$; $p < 0.0001$) que Rockefeller. O volume de sangue ingerido pelas fêmeas de BVT selecionadas com diflubenzuron foi 18 % inferior ao volume ingerido por Rockefeller ($t_{0.05(1),21} = 3.612$; $p = 0.0008$) e 11 % inferior ao grupo não selecionado ($t_{0.05(1),29} = 2.465$; $p = 0.0099$). O mesmo ocorreu com as fêmeas de APG selecionadas, cujo volume foi 26 % menor que Rockefeller ($t_{0.05(1),18} = 4.379$; $p = 0.0002$). Entretanto, no caso dessa população, não houve diferença

significativa entre o volume de sangue ingerido entre os grupos expostos ou não ao diflubenzuron ($t_{0.05(1),18} = 0.1872$; $p = 0.4285$). Houve diferença significativa entre os grupos controle das duas populações ($t_{0.05(1),27} = 3.885$; $p = 0.0003$), mas não entre os grupos expostos ($t_{0.05(1),25} = 1.693$; $p = 0.0515$).

Postura de ovos

Fêmeas da linhagem Rockefeller colocaram, em média, 81 ± 19 ovos (Figura 8). Quantidade semelhante (77 ± 19) foi colocada pelos indivíduos de BVT não selecionados com diflubenzuron ($t_{0.05(1),234} = 1.642$; $p = 0.0510$). Por outro lado, os indivíduos selecionados de BVT colocaram 21 % (64 ± 21) e 16 % menos ovos quando comparados com Rockefeller ($t_{0.05(1),234} = 5.930$; $p < 0.0001$) e com o grupo não exposto ao IGR ($t_{0.05(1),310} = 5.410$; $p < 0.0001$), respectivamente.

As fêmeas de APG crescidas na ausência de diflubenzuron colocaram 20 % (65 ± 22) menos ovos do que a linhagem Rockefeller ($t_{0.05(1),224} = 5.432$; $p < 0.0001$). Do mesmo modo, os indivíduos selecionados com diflubenzuron colocaram 26% menos ovos (60 ± 18) que fêmeas Rockefeller ($t_{0.05(1),287} = 8.719$; $p < 0.0001$) e 8% menos ovos em relação ao grupo não exposto ao IGR ($t_{0.05(1),353} = 2.392$; $p = 0.0086$). Também foi encontrada diferença significativa entre o número de ovos colocados entre os grupos expostos ($t_{0.05(1),363} = 1.964$; $p = 0.0251$) e não expostos das duas populações ($t_{0.05(1),300} = 4.836$; $p < 0.0001$).

Taxa de fêmeas inseminadas

Cerca de 97 % dos machos Rockefeller inseminaram, com sucesso, depois de três dias, as três fêmeas disponibilizadas (Figura 9 e Tabela S1). A maioria dos machos (83 %) do grupo BVT controle também inseminou as três fêmeas disponíveis. Por outro lado, apenas 50 % dos machos de BVT selecionados com diflubenzuron foram eficazes na cópula das três fêmeas; neste grupo, 12 % dos machos não foram capazes de inseminar fêmea alguma. A maioria dos machos de APG, expostos ou não ao diflubenzuron, não conseguiu inseminar as três fêmeas: apenas 21 % dos machos controle e 14 % daqueles expostos ao IGR foram bem sucedidos (Tabela S1). Neste último

grupo, a maior parte (37 %) não inseminou nenhuma das três fêmeas disponibilizadas, enquanto 24 % dos machos APG mantidos na ausência de diflubenzuron também não inseminaram fêmea alguma.

Os percentuais de machos que inseminaram diferentes números de fêmeas disponíveis foram usados para gerar índices, para facilitar a comparação (ver Materiais e Métodos). Estes números, apresentados na Tabela 2, foram usados para calcular a redução da capacidade de inseminação de machos em cada condição avaliada. De modo geral, houve aumento da eficácia da cópula nos grupos controle, mantidos por seis ou sete gerações no laboratório, em relação às populações originais (F1): por exemplo, a redução de BVT F1 em relação a Rockefeller, de 24% diminuiu para 8% (BVT F6 cont). Nos grupos equivalentes de APG, a redução de 78% na geração F1 decaiu para 50% (APG F7 cont). Por outro lado, o processo de seleção no laboratório reduziu em aproximadamente 29 e 22%, respectivamente, a capacidade de inseminação de machos BVT e APG, quando grupos controle e expostos foram comparados. No entanto, a seleção com diflubenzuron em laboratório não resultou em redução adicional da habilidade de cópula dos machos em relação às populações originais: machos BVT F1 tiveram redução de 24% em relação a Rockefeller, enquanto este índice foi de 29% para machos BVT F6 dfb; para APG, estes valores foram de 78 e 61%, respectivamente.

Discussão

Um dos fatores responsáveis pela expansão da distribuição de *A. aegypti* é a falha em seu controle, em parte, resultado da resistência aos inseticidas tradicionalmente utilizados, como organofosforados e piretróides (Macoris et al. 1995, Macoris et al. 1999, Lima et al. 2003, Braga et al. 2004, da-Cunha et al. 2005, Macoris et al. 2007, Montella et al. 2007). Por esse motivo, inibidores do crescimento de insetos, que possuem mecanismos de ação distintos dos inseticidas tradicionais têm sido empregados, principalmente nos locais onde as populações apresentam níveis elevados de resistência.

Diflubenzuron, um ISQ, foi recentemente aprovado para uso em água potável e introduzido no Brasil para controle de *A. aegypti* (Ministério da

Saúde 2009). Vários estudos mostram a eficácia desse composto sobre mosquitos. Entretanto, há pouca informação sobre os efeitos de diflubenzuron e a dinâmica da resistência em *A. aegypti*, mesmo em condições de laboratório. Nesse trabalho, a susceptibilidade a diflubenzuron foi avaliada em duas populações de *A. aegypti* de campo. As populações foram selecionadas com este ISQ e a dinâmica da resistência, ao longo da seleção, assim como seus efeitos no *fitness*, ao final do processo, foram investigados.

O esperado efeito dose-dependente de diflubenzuron, a exemplo de outros ISQ, foi confirmado (Martins et al. 2008, Belinato et al. 2012, Fontoura et al. 2012). Também foi observado que, quanto maior a dose administrada, mais precoce foi a mortalidade. Este padrão de mortalidade estágio-específica é bastante comum entre os inibidores de síntese de quitina. Novaluron provoca efeitos semelhantes em *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Mulla et al. 2003, Su et al. 2006, Fontoura et al. 2012). O mesmo ocorre com *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus* e *A. albopictus* quando expostos a triflumuron (Martins et al. 2008, Belinato et al. dados não publicados). Além disso, verificou-se que, nas concentrações mais altas de diflubenzuron, a proporção de machos resultantes é maior. Estes resultados corroboram Belinato et al. (2009) e Farnesi et al. (2012) e são atribuídos à cinética do desenvolvimento da espécie, na qual os machos emergem antes das fêmeas (Clements 1992) e, portanto, ficam menos tempo expostos ao IGR, sofrendo seus efeitos em menor grau.

Resultados prévios do grupo (Belinato et al. 2012) indicam que as duas populações aqui avaliadas são resistentes ao OP temephos, com diferentes razões de resistência (RR_{95} para BVT = 7,4 e para APG = 19,2). As doses efetivas encontradas para diflubenzuron foram maiores em APG quando em comparação com BVT e a linhagem Rockefeller, sugerindo a possibilidade de maior tolerância a diflubenzuron estar associado a populações com maior nível de resistência a organofosforados. Martins et al. (2008) e Belinato et al. (dados não publicados) encontraram resultados semelhantes quando avaliaram triflumuron em populações de campo. Entretanto, Fontoura et al. (2012) não encontraram relação entre o nível de resistência ao temephos e tolerância a novaluron, outro ISQ. A tolerância aos ISQs pode, ao menos em parte, ser função do aumento da atividade de enzimas relacionadas à resistência

metabólica, já detectado em uma série de populações brasileiras de *A. aegypti* (Montella et al. 2007). Tolerância a diflubenzuron, por exemplo, já foi associada a oxidases de função mista em moscas (Kotze et al. 1997).

Durante o processo de seleção com diflubenzuron em laboratório, foi verificado que a dinâmica da resistência foi diferente para as duas populações. Nos dois casos optou-se por fazer a seleção com uma concentração fixa do composto, que inibia inicialmente em 80% a emergência dos adultos. Apesar disto, em BVT, a partir da F2 mais da metade dos indivíduos já havia alcançado a fase adulta nesta concentração de ISQ. Em APG, a disseminação da resistência ocorreu mais lentamente. Entretanto, ao final de seis (BVT) ou sete (APG) gerações, a emergência de adultos nos grupos tratados já era equivalente aos grupos controle, não expostos ao diflubenzuron, sugerindo rápida aquisição de resistência a este ISQ.

Existem trabalhos que indicam que a resistência ao OP temephos pode interferir com a viabilidade de mosquitos (Agnew et al. 2004, Belinato et al. 2012). Assim, é possível que este caráter influencie a sobrevivência dos indivíduos quando expostos ao estresse representado pelo contato com outros xenobióticos. Nesse sentido, poderia-se esperar que indivíduos resistentes a temephos fossem mais vulneráveis ao diflubenzuron, já que, além dos problemas no *fitness* associados à resistência, estariam enfrentando exposição a outro inseticida. Desse modo, a disseminação da resistência ao diflubenzuron seria, provavelmente, mais rápida em populações de campo susceptíveis a temephos do que naquelas resistentes a este OP.

A proporção entre machos e fêmeas foi registrada em cada geração durante a seleção. Ao contrário do esperado, a maior taxa de machos, nas gerações iniciais, quando a inibição da emergência de adultos foi maior, não foi encontrada em APG. Outros trabalhos do grupo mostram que a maior parte dos adultos resultantes em doses elevadas de ISQ é constituída por machos (Belinato et al. 2009, Fontoura et al. 2012). Inesperadamente, nas duas populações a proporção sexual oscilou pouco ao longo do processo de seleção, se mantendo em torno de 1:1, não tendo sido verificada qualquer tendência de alteração.

Ao final da seleção, novas curvas-dose resposta foram realizadas nas duas categorias de grupos, controle e expostos ao diflubenzuron. Nestes últimos, houve aumento de todas as doses efetivas (IE_{50} , IE_{80} e IE_{95}), indicando que a seleção foi, de fato, bem sucedida. Situação inversa ocorreu com os grupos controle, não expostos: manutenção dos insetos na ausência de diflubenzuron resultou em aumento de susceptibilidade a este ISQ (Tabela 1), sugerindo algum custo, em termos de viabilidade, associado ao nível de resistência das populações, quando comparadas com Rockefeller. A mortalidade por estágio também foi verificada. Nos grupos controle houve maior mortalidade de larvas na maioria das doses utilizadas, quando em comparação com a situação inicial, confirmando, de forma indireta, aumento progressivo de susceptibilidade ao longo das gerações.

Para investigar se a resistência a diflubenzuron acarreta problemas no *fitness*, vários parâmetros da biologia foram investigados nos grupos expostos e não expostos ao ISQ, ao final do processo de seleção. Um resumo dos resultados encontrados, com exceção dos dados de eficiência de cópula, está apresentado na Tabela 3. De acordo com Rivero et al. (2010), a longevidade dos vetores é um parâmetro fundamental para a dinâmica da transmissão de doenças, já que os patógenos possuem um tempo específico de incubação antes de serem transmitidos a um novo hospedeiro. Desse modo, resistência a inseticidas pode influenciar, positiva ou negativamente, a transmissão de patógenos. Poucos estudos tratam do efeito da resistência a inseticidas na longevidade dos insetos. Alguns trabalhos mostram que linhagens resistentes possuem longevidade reduzida, em condições de laboratório, em relação às susceptíveis. Li et al (2002) e Martins et al. (2012) verificaram que *Culex pipiens pallens* e *A. aegypti* selecionados com piretróides possuem longevidade prejudicada. Entretanto, Hardstone et al. (2010) observaram que fêmeas de *C. quinquefasciatus*, também resistentes a piretróides, tinham maior longevidade. Não houve diferença na longevidade das duas populações aqui avaliadas, antes da seleção com diflubenzuron, apesar de ambas as populações apresentarem resistência a organofosforados e piretróides (Belinato et al. 2012). Depois da seleção com diflubenzuron em laboratório, a alteração na longevidade de BVT e APG foi discreta. Apenas a

longevidade das fêmeas APG do grupo controle diferiu significativamente quando comparada com a longevidade das fêmeas APG expostas ao diflubenzuron e das fêmeas Rockefeller. Entretanto, pareceu haver tendência ao aumento de longevidade das populações de campo mantidas em laboratório sem pressão de seleção, quando comparadas com os grupos expostos. Esses resultados sugerem que resistência a diflubenzuron pode afetar a longevidade de *A. aegypti*; provavelmente este efeito será melhor evidenciado quando populações com maiores razões de resistência a este ISQ estiverem disponíveis.

A taxa de fêmeas selecionadas com diflubenzuron que recusou o repasto sanguíneo foi significativamente menor quando comparada com as fêmeas Rockefeller e mesmo com os grupos controle, mantidos no laboratório por igual número de gerações na ausência do ISQ. Redução da taxa de aceitação da alimentação sanguínea já havia sido notada nas populações BVT e APG originais, antes da seleção em laboratório. Esta redução havia sido atribuída à resistência ao temephos exibida pelas populações (Belinato et al. 2012, ver também Tabela 3). A recuperação da capacidade de aceitação do repasto dos grupos controle de ambas populações aqui avaliadas pode estar relacionada com o aumento da susceptibilidade ao temephos (Belinato, comunicação pessoal; ver capítulo 4 da seção Resultados), ou ao próprio diflubenzuron. De maneira geral, esta recuperação pode ser vista como uma realocação de recursos energéticos, na ausência de pressão de seleção.

Fêmeas APG, mas não BVT, das populações originais ingeriam menor quantidade de sangue e, conseqüentemente, colocavam menor número médio de ovos, quando comparadas com Rockefeller (Belinato et al 2012, Tabela 3). Depois de 6-7 gerações no laboratório, todos os grupos, com exceção de BVT controle, continuavam com valores inferiores a Rockefeller para os dois parâmetros avaliados. Comparação entre os grupos selecionados e controle de cada população, mantidos no laboratório, aponta para redução do número médio de ovos nas duas populações. No caso de BVT, esta redução é explicada por menor ingestão de sangue. Contudo, fêmeas APG selecionadas com diflubenzuron ingeriram quantidade de sangue equivalente às fêmeas controle (Figura 7). Este resultado sugere redução da habilidade de digerir o

sangue ingerido, o que pode estar relacionado com a manutenção de nível elevado de resistência ao temephos (Belinato, comunicação pessoal; ver capítulo 4 da seção Resultados), associado à pressão adicional com diflubenzuron em laboratório. Diversos trabalhos mostram que a resistência a inseticidas acarreta diminuição da quantidade de ovos em mosquitos (Kumar & Pillai 2011, Li et al. 2002, Kumar et al. 2009, Martins et al. 2012). Embora na maioria deles a quantidade de sangue ingerido não tenha sido avaliada, é possível que este parâmetro também tenha sido reduzido, uma vez que em culicídeos a quantidade de sangue está diretamente relacionada com a produção de ovos (Clements 1992).

Com relação à eficácia dos machos na cópula, foi sugerido, nas populações originais, que este aspecto era inversamente proporcional à razão de resistência ao OP temephos (Belinato et al. 2012). Depois de seis ou sete gerações, verificamos que houve recuperação, proporcionalmente mais expressiva em BVT do que em APG, da eficácia da cópula nos dois grupos controle (Tabelas S1 e 3). Os grupos sob seleção mantiveram baixa eficácia na cópula em comparação com Rockefeller e com os grupos controle, sugerindo que resistência a diflubenzuron também pode acarretar deficiência na cópula. É provável que a menor recuperação dos grupos controle de APG também esteja relacionada com a manutenção de resistência ao OP temephos, que ainda se mantém alta nessa população (Belinato, comunicação pessoal; ver capítulo 4 da seção Resultados). Dentre todos os parâmetros do *fitness* avaliados em populações resistentes, a eficácia de cópula é o menos estudado. Apenas um grupo verificou que resistência a inseticidas afeta a cópula em mosquitos (Berticat et al. 2002).

Neste trabalho, verificamos que diflubenzuron foi eficaz contra duas populações de *A. aegypti* de campo, com diferentes níveis de resistência ao OP temephos. Contudo, exposição em laboratório a este ISQ promoveu rápida seleção de resistência, em poucas gerações. Diversos parâmetros da biologia dessas populações foram afetados nos grupos selecionados confirmando, no caso de diflubenzuron, a relação entre resistência e custo em termos de viabilidade e capacidade reprodutiva.

Diflubenzuron foi recentemente introduzido no Brasil para controle de populações de *A. aegypti* resistentes aos inseticidas tradicionais. Nesse sentido, entender a eficácia desse composto nas populações de campo do vetor é fundamental. Seleção com inseticidas pode ser uma importante ferramenta para investigação do custo da resistência em laboratório. Entretanto, é provável que os valores do *fitness* dos mosquitos resistentes sejam subestimados, já que a criação e manutenção dos insetos em laboratório são realizadas em condições ideais. No campo, as populações estão expostas a outros fatores deletérios além da exposição aos inseticidas usados no controle. Por esse motivo, diferentes mecanismos de resistência ou vias de detoxificação podem atuar em conjunto, tornando a evolução da resistência diferente da que ocorre em laboratório.

As RRs de *A. aegypti* a diflubenzuron em todas as populações brasileiras investigadas por nós até agora são inferiores a 3,0 (Martins et al. 2008, Belinato et al. - dados não publicados). Este é o ponto de corte acima do qual o Ministério da Saúde recomenda interrupção do uso de outro inseticida, o organofosforado temephos (Montella et al. 2007). Entretanto, no caso dos ISQs, não há estudos de campo que mostrem o significado funcional dos níveis de resistência das populações. Aparentemente, populações com RR abaixo de 2,0 para novaluron, outro ISQ, são igualmente susceptíveis em condições de campo (Fontoura et al. 2012). Ensaio simulados de campo com populações com níveis mais altos de resistência poderiam contribuir significativamente para elucidar essa questão. Pretendemos, desse modo, averiguar em simulados de campo a susceptibilidade das populações aqui selecionadas, com intuito de aumentar a compreensão sobre o significado funcional dos valores de RR para ISQs. Esperamos, com esses resultados, contribuir para a definição de estratégias racionais de controle, não só de *A. aegypti*, mas também de outros vetores de importância médica.

Agradecimentos

A Gilberto Couto Alcântara, Luciana dos Santos Dias, Adriana dos Santos Dias, Carina Souza, Ingrid Alves, Edna Gomes pela assistência técnica.

Suporte financeiro

Fiocruz, Pronex - Rede Dengue, CNPq.

Referências Bibliográficas

- Agnew P, Berticat C, Bedhomme S, Sidobre C, Michalakis Y (2004) Parasitism increases and decreases the costs of insecticide resistance in mosquitoes. *Evolution* 58: 579-586.
- Ansari MA, Razdan RK, Sreehari U (2005) Laboratory and field evaluation of himilin against mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 21: 432-436.
- Barret ADT, Higgs S (2007) Yellow fever: A disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol* 52: 209-229.
- Beaty BJ, Marquardt WC (1996) The biology of disease vectors. University Press of Colorado. 632 pp.
- Belinato TA, Martins AJ, Lima JBP, Lima-Camara TN, Peixoto AA, Valle D (2009) Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 43-47.
- Belinato TA, Martins AJ, Valle D (2012) Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. Submitted.
- Berticat C, Boquien G, Raymond M, Chevillon C (2002) Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res* 79: 41-47.
- Braga IA, Valle D (2007a) *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 279-293.
- Braga IA, Valle D (2007b). *Aedes aegypti*: Histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 113-118.
- Braga IA, Lima JBP, Cunha SP, Soares SS, Melo RCGM, Valle D (2004) *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas States, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 199-203.

- Chen CD, Seleena B, Chiang YF, Lee HL (2008) Field evaluation of the bioefficacy of diflubenzuron (Dimilin®) against container-breeding *Aedes* sp. Mosquitoes. *Trop Biomed* 25: 80-86.
- Clements AN (1992) The biology of mosquitoes. Vol. 1 development, nutrition and reproduction. London: Chapman & Hall. 509 p.
- Da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D (2005) Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444.
- Farnesi LC, Brito JM, Linss JG, Pelajo-Machado M, Valle D, Rezende GL (2012) Physiological and morphological aspects of *Aedes aegypti* developing larvae: effects of the chitin synthesis inhibitor novaluron. *PLoS One* 7:e30363.
- French-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A, Anthony N (1998) Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 1685-1693.
- Fontoura NG, Bellinato DF, Valle D, Lima JBP (2012) The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 387-395.
- Graf JF (1993) The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasitol Today* 9: 471-474.
- Hardstone MC, Huang X, Harrington LC, Scott JG (2010) Differences in development, glycogen, and lipid content associated with cytochrome P450-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 47: 188-198.
- Hemingway J, Ranson H (2000) Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann Rev Entomol* 45: 371-391.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Molec Biol* 34: 653-665.
- Jansen CC, Beebe NW (2010) The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect* 12: 272-279.

- Kotze AC, Sales N, Barchia IM (1997) Diflubenzuron tolerance associated with monooxygenase activity in field strain larvae of the Australian sheep blowfly (Diptera: Calliphoridae). *J Econ Entomol* 90: 15-20.
- Kumar S, Pillai MKK (2011) Correlation between the reproductive potential and the pyrethroid resistance in an Indian strain of filarial vector, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res* 101: 25-31.
- Kumar S, Thomas A, Samuel T, Sahgal A, Verma A, Pillai MKK (2009) Diminished reproductive fitness associated with the deltamethrin resistance in an Indian strain of dengue vector mosquito, *Aedes aegypti* L. *Trop Biomed* 26: 155-164.
- Kuno G (2010) Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *J Med Entomol* 47: 957-971.
- Li X, Ma L, Sun L, Zhu C (2002) Biotic characteristics in the deltamethrin-susceptible and resistant strains of *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae) in China. *Appl Entomol Zool* 37: 305-308.
- Lima JBP, da-Cunha MP, Silva-Jr RC, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D (2003) *Aedes aegypti* resistance to organophosphates in several localities in Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68: 329-333.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR (2004) Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 10(12 Suppl): S98-109.
- Macoris ML, Andrighetti MT, Takaku L (1995) The residual effect of temephos on *Aedes aegypti* larvae. *Rev Soc Bras Med Trop* 28: 375-377.
- Macoris M, Andrighetti MT, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VC (1999) Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the State of São Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pública* 33: 521-522.
- Macoris MLG, Andrighetti MTM, Otrera VCG, Carvalho LR, Caldas Júnior AL, Brogdon WG (2007). Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 895-900.

- Martins AJ, Belinato TA, Lima JBP, Valle D (2008) Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Pest Manag Sci* 68: 676-80.
- Martins AJ, Ribeiro CD, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D, Lima JB (2012) Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS One* 7:e31889.
- Ministério da Saúde (2009) Uso do larvicida diflubenzuron (PM25%) para controle de *Aedes aegypti*. Nota técnica N° 15/2009 CGPNDC/DIGES/SVS/MS.
- Montella IR, Martins-Jr AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle D (2007) Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467-477.
- Msangi S, Lyatuu E, Kweka EJ (2011) Field and laboratory evaluation of bioefficacy of an insect growth regulator (Dimilin) as a larvicide against mosquito and housefly larvae. *J Trop Med* 394541.
- Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, Chompoosri J, Zaim M, Su T (2003) Laboratory and field evaluation of novaluron, a new acylurea insect growth regulator, against *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *J Vec Ecol* 28: 241-254.
- Paris M, David J, Despres L (2011) Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology* 20: 1184-1194.
- Pialoux G, Gaüzère B, Jauréguiberry S, Strobel M (2007) Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis* 7: 319-327.
- POP-LAFICAVE-002. Manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório – rev 00.
- Raymond M (1985) Presentation d'une programme d'analyse logprobit pour microordinateur cahiers Orstrom. *Sér Ent Med Parasitol* 22: 117-121.
- Rivero A, Vézilier J, Weill M, Read AF, Gandon S (2010) Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog* 6: e1001000.
- Rivero A, Magaud A, Nicot A, Vézilier J (2011) Energetic cost of insecticide resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *J Med Entomol* 48: 694-700.

- Roush RT, McKenzie JA (1987) Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu Rev Entomol* 32: 361-380.
- Su T, Mulla MS, Zaim M (2006) Laboratory and field evaluations of novaluron, a new insect growth regulator (IGR), against *Culex* mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 19: 408-418.
- Suman DS, Parashar BD, Prakash S (2010) Effect of sublethal dose of diflubenzuron and azadirachtin on various life table attributes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 47: 996-1002.
- Thomas SJ, Andy TP (2011) Critical issues in dengue vaccine development. *Curr Opin Infect Dis* 24: 442-450.
- Valencia MDP, Miller LH, Mazur P (1996) Permeability of intact and dechorionated eggs of the *Anopheles* mosquito to water vapor and liquid water: A comparison with *Drosophila*. *Cryobiol* 33: 142-148.
- World Health Organization (1981) Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva: WHO Press.
- World Health Organization (2006) Pesticides and their application. Geneva: WHO Press.
- World Health Organization (2009) Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO Press.
- World Health Organization (2012) Chemical hazards in drinking-water - diflubenzuron. Disponível em: <http://www.who.int/whopes/en/>. Acessado em 25/03/2012.

Figuras:

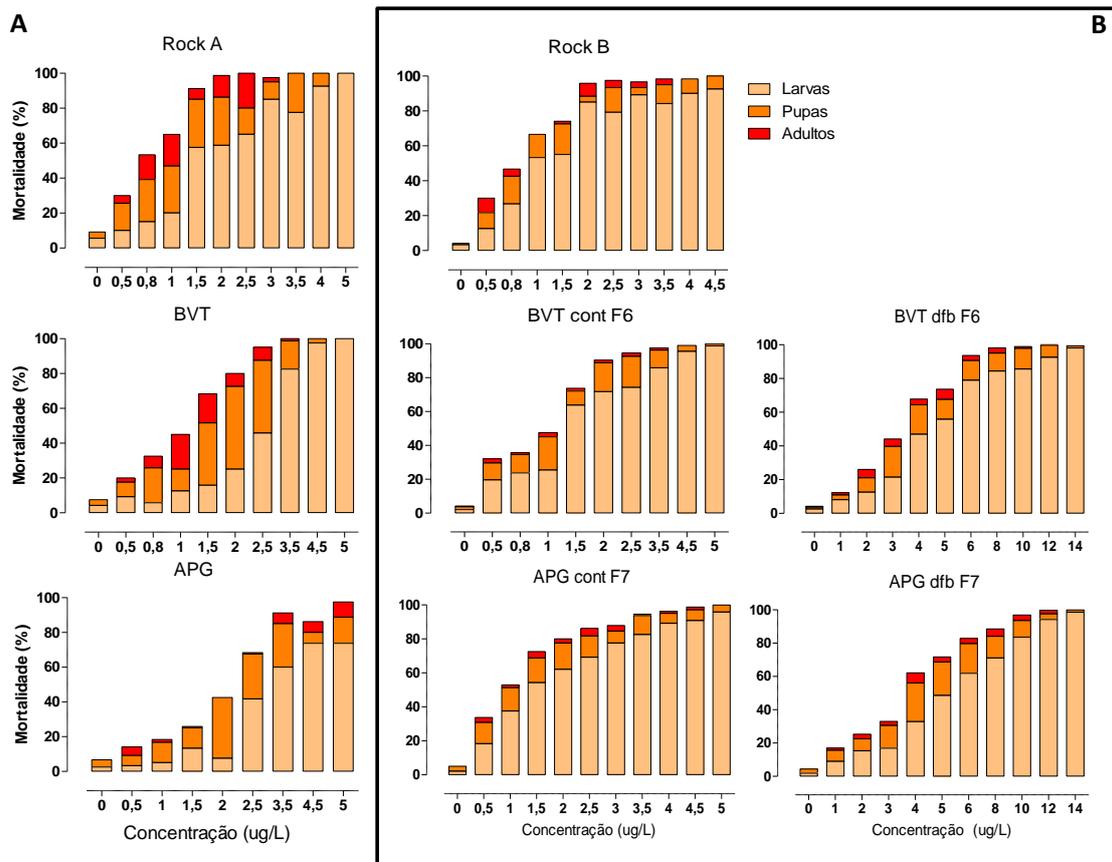


Figura 1: Mortalidade por estágio de *A. aegypti* em cada concentração de diflubenzuron avaliada. Painel (A): populações antes da seleção; painel (B): populações expostas (dfb) e não expostas (cont) ao diflubenzuron depois de seis ou sete gerações, como indicado (F6, F7). BVT: Boa Vista; APG: Aparecida de Goiânia. Note que a faixa de concentrações nos painéis da direita, depois da exposição ao diflubenzuron, é diferente dos outros gráficos. A linhagem Rockefeller foi utilizada com controle experimental antes (Rock A) e após a seleção (Rock B).

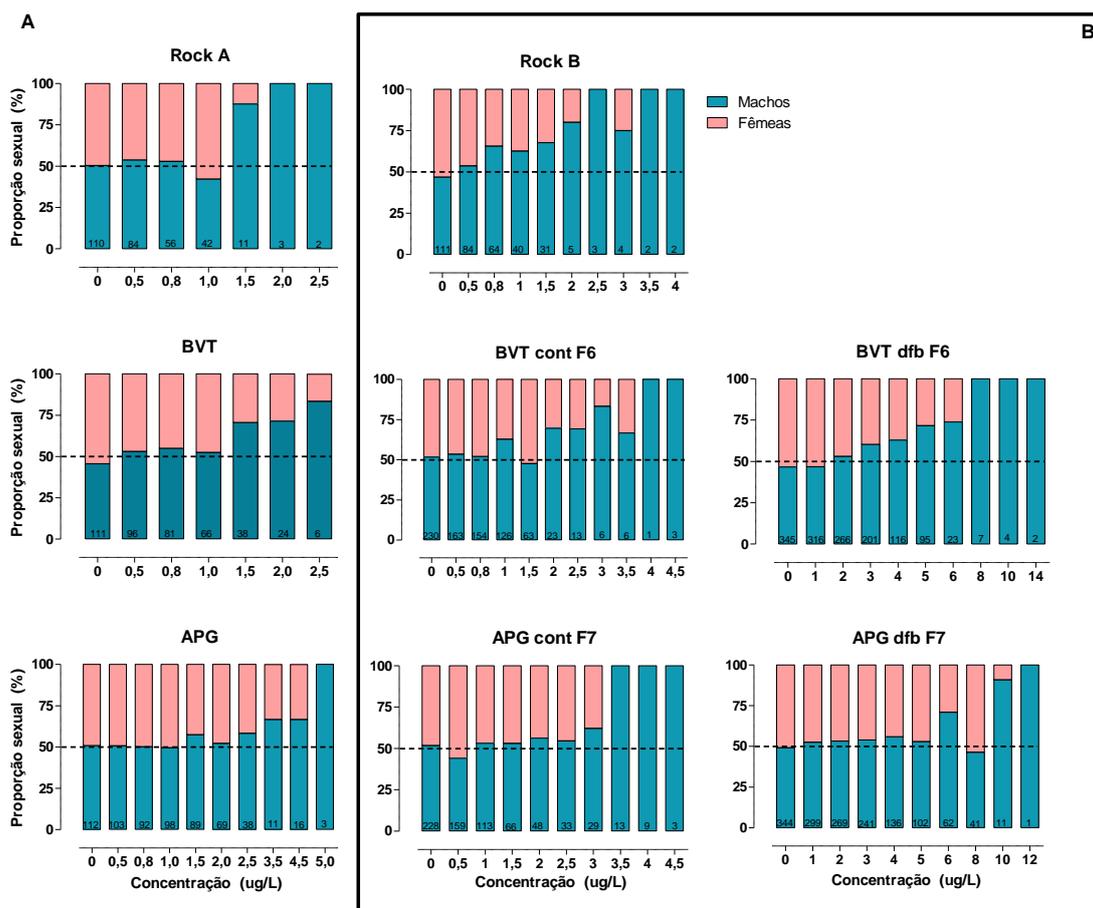


Figura 2: Proporção de machos (azul) e fêmeas (rosa) de *A. aegypti* nas concentrações de diflubenzuron nas quais ocorreu emergência de adultos. Painel (A): populações antes da seleção; painel (B): populações expostas (dfb) e não expostas (cont) ao diflubenzuron depois de seis ou sete gerações, como indicado (F6, F7). BVT: Boa Vista; APG: Aparecida de Goiânia. Valores dentro de cada barra representam o número de adultos resultantes em cada concentração.

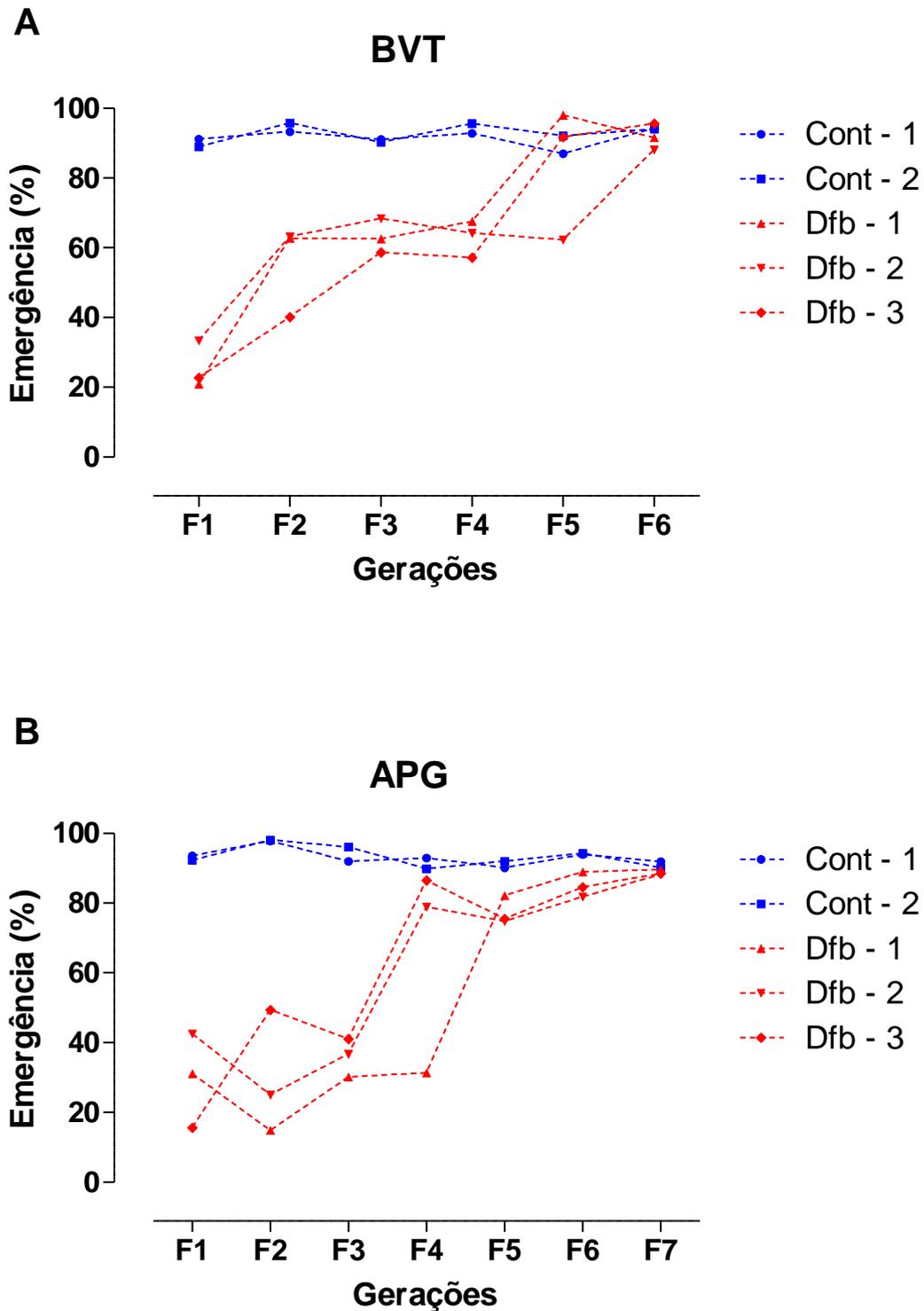


Figura 3: Dinâmica da resistência a diflubenzuron de duas populações de *A. aegypti*, de Boa vista (A) e Aparecida de Goiânia (B) ao longo de seis ou sete gerações, respectivamente. Os grupos controle (“cont”, em azul) foram mantidos no laboratório por igual número de gerações, na ausência de diflubenzuron.

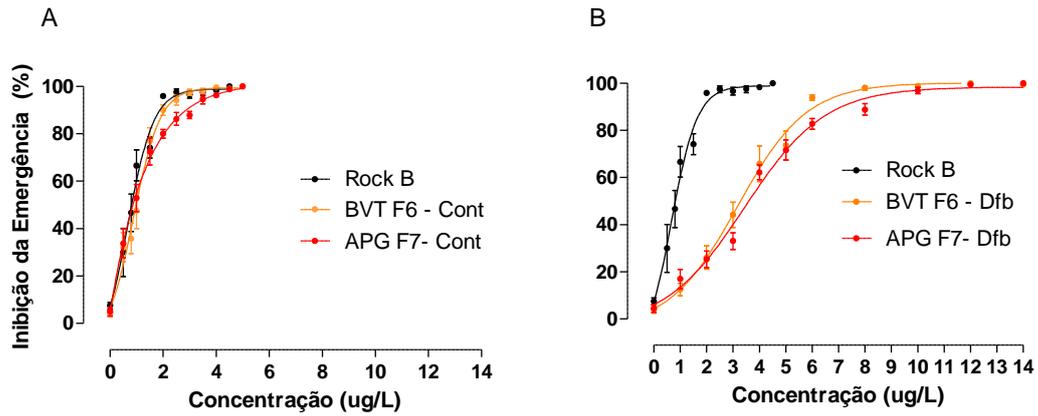


Figura 4: Curvas de regressão não linear da inibição da emergência de adultos *A. aegypti* da linhagem Rockefeller e das duas populações, Boa Vista e Aparecida de Goiânia, dos grupos controle (Painel A) e expostos ao diflubenzuron (Painel B) ($R^2 > 0,9$).

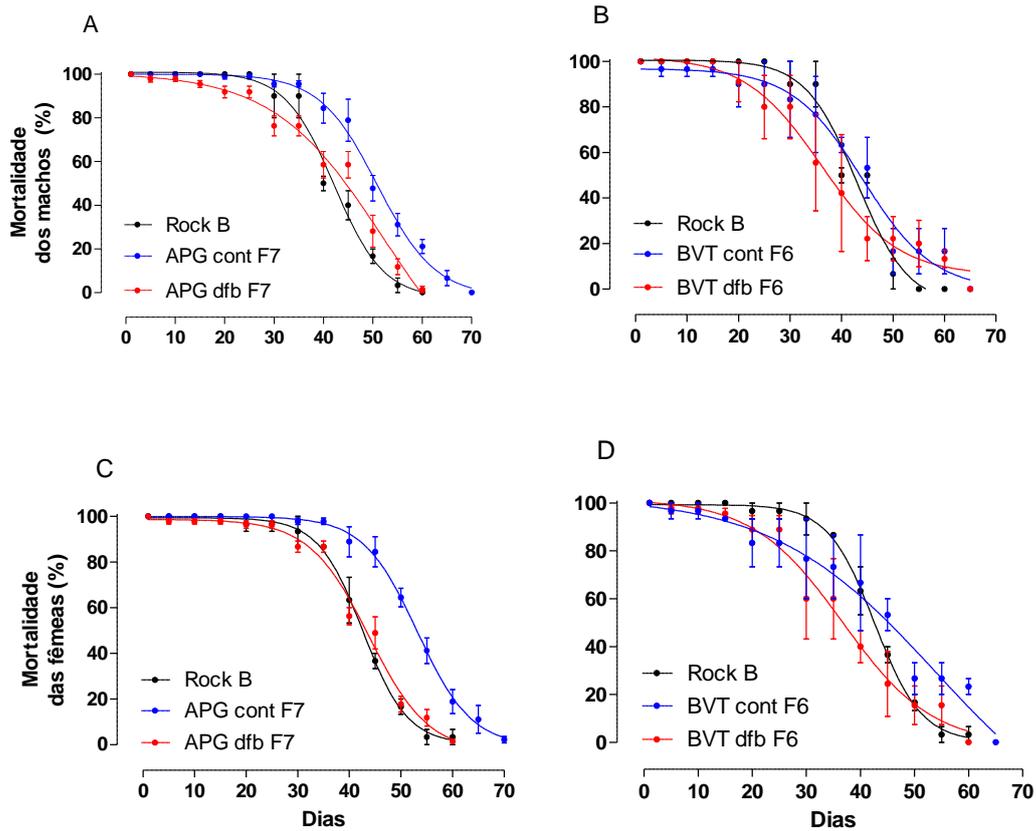


Figura 5: Curvas de regressão não linear da sobrevivência de adultos *A. aegypti* da linhagem Rockefeller e das duas populações, Boa Vista e Aparecida de Goiânia, dos grupos controle e expostos ao diflubenzuron ($R^2 > 0,9$). Os painéis A e B apresentam longevidade dos machos, enquanto que os painéis C e D, a longevidade das fêmeas.

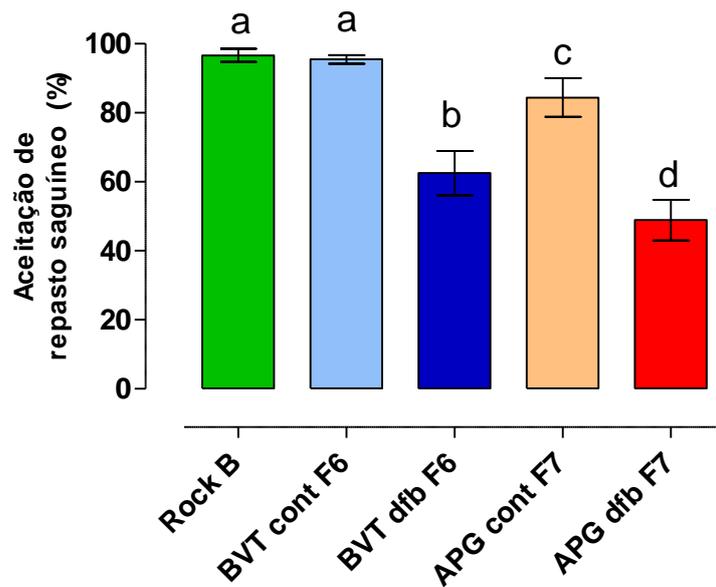


Figura 6: Taxa de fêmeas de *A. aegypti* que realizou repasto sanguíneo das populações de Boa Vista (BVT) e Aparecida de Goiânia (APG) mantidas na ausência de diflubenzuron (cont) ou selecionadas com este IGR (dfb). F6, F7: geração avaliada. Rock: linhagem Rockefeller, susceptível, usada como controle interno dos ensaios. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (χ^2 ; $p < 0.05$). Apenas a comparação entre grupos controle e expostos de diferentes populações não foi realizada.

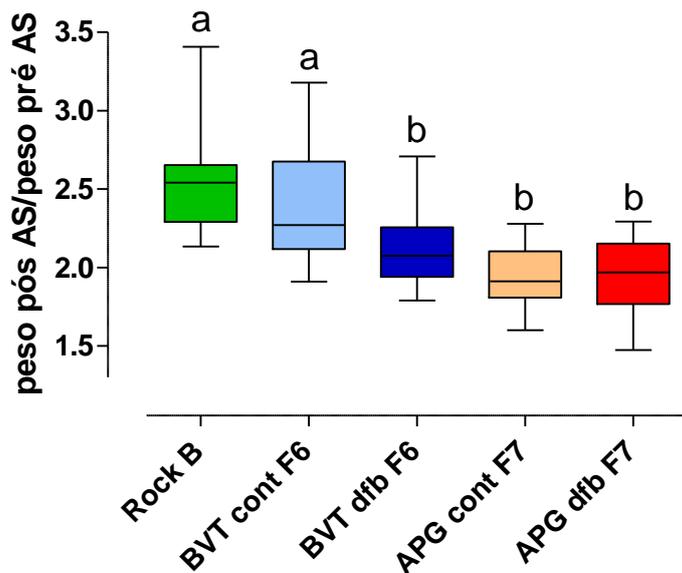


Figura 7: Volume de sangue ingerido por fêmeas Rockefeller e das populações de Boa Vista (BVT) e Aparecida de Goiânia (APG) mantidas na ausência de diflubenzuron (cont) ou selecionadas com este IGR (dfb). Em cada *Box-plot* estão representados a mediana, os quartis e a menor e maior proporções de sangue ingerido. F6, F7: geração avaliada. Rock: linhagem Rockefeller, susceptível, usada como controle interno dos ensaios. Letras diferentes indicam diferença significativa (teste t; $p < 0.05$). Comparações entre todos os grupos foram realizadas, com exceção dos grupos expostos e não expostos de diferentes populações.

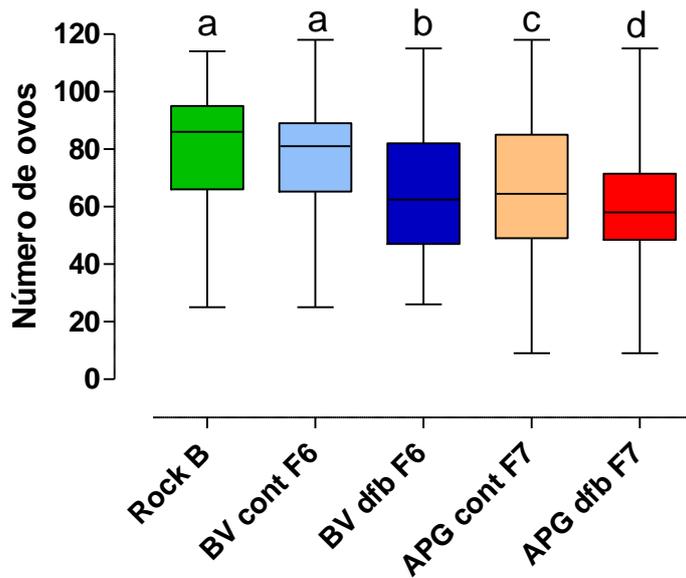


Figura 8: Número de ovos colocados por fêmeas Rockefeller e das populações de Boa Vista (BVT) e Aparecida de Goiânia (APG) mantidas na ausência (cont) ou selecionadas com diflubenzuron (dfb). Em cada *Box-plot* estão representados a mediana, os quartis e os números mínimo e máximo de ovos. F6, F7: geração avaliada. Rock: linhagem Rockefeller, susceptível, usada como controle interno dos ensaios. Letras diferentes indicam diferença significativa (teste t; $p < 0.05$). Todas as comparações foram realizadas, com exceção dos grupos expostos e não expostos de diferentes populações.

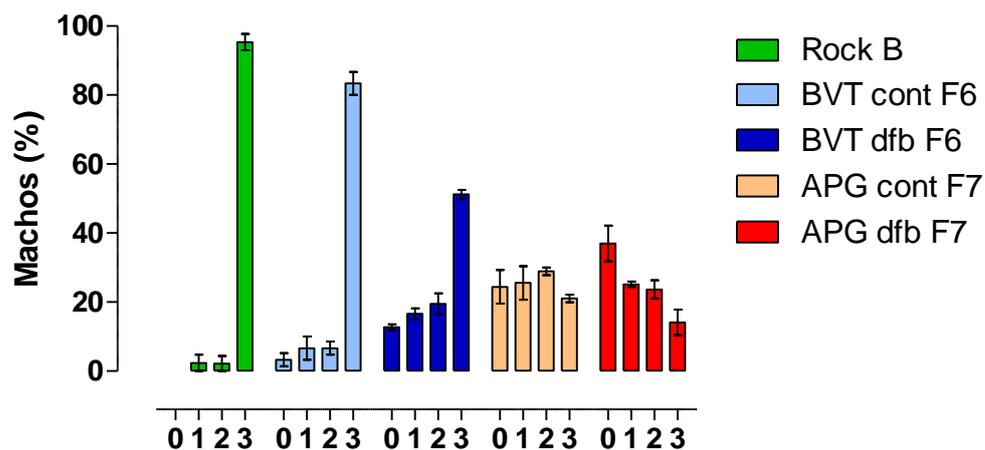


Figura 9: Eficácia de machos em inseminar fêmeas. Estão mostradas a linhagem Rockefeller e das populações de Boa Vista (BVT) e Aparecida de Goiânia (APG), estas mantidas na ausência de diflubenzuron (cont) ou selecionadas com este IGR (dfb). F6, F7: geração avaliada. Rock: linhagem Rockefeller, susceptível, usada como controle interno dos ensaios. Em cada grupo, um macho ficou em contato com três fêmeas por três dias. Posteriormente avaliou-se o número de fêmeas inseminadas. Os resultados estão expressos em percentual de machos capazes de inseminar uma, duas ou três fêmeas ao final do período.

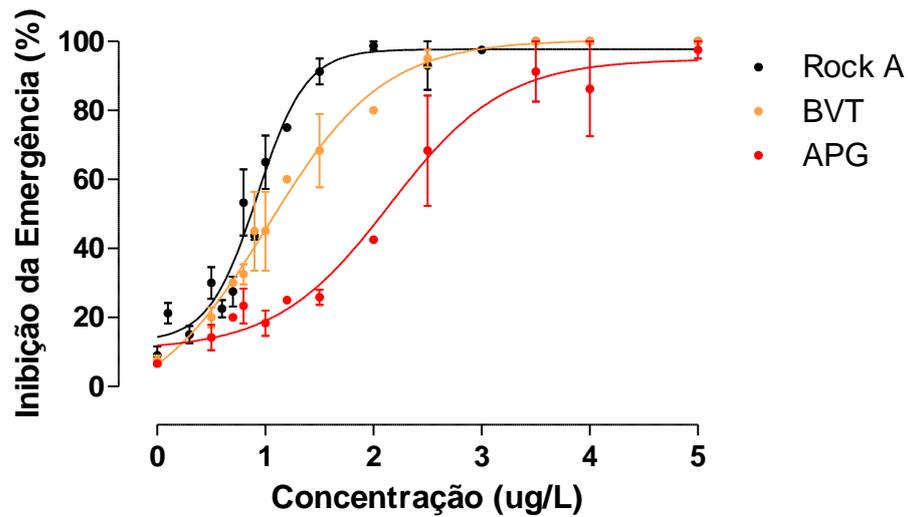


Figura S1: Curvas de regressão não-linear da inibição da emergência de adultos *A. aegypti* da linhagem Rockefeller (Rock), e das populações de Boa Vista (BVT) e de Aparecida de Goiânia (APG) ($R^2 > 0.9$) na presença do inibidor de síntese de quitina diflubenzuron.

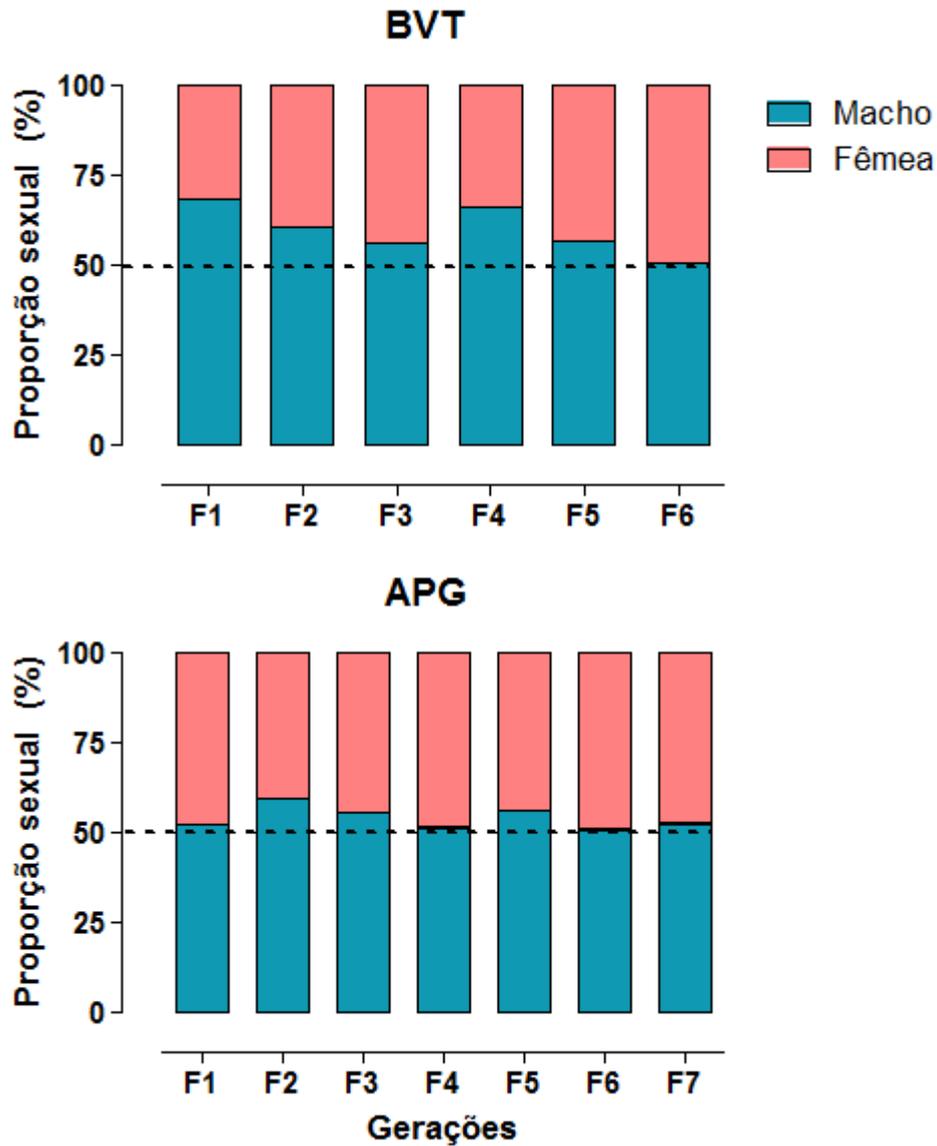


Figura S2: Proporção de machos (azul) e fêmeas (rosa) *A. aegypti* durante a seleção com diflubenzuron ao longo das gerações em Boa Vista (BVT) e Aparecida de Goiânia (APG).

Tabela 1: Doses efetivas de diflubenzuron (ug/L) sobre Boa Vista (BVT) e Aparecida de Goiânia (APG) antes e após a seleção com diflubenzuron. A linhagem Rockefeller foi utilizada como controle experimental antes (Rock A) e após o processo (Rock B).

	IE ₅₀	IE ₈₀	IE ₉₅	RR ₅₀	RR ₈₀	RR ₉₅	slope
Rock A	0,903	1,251	1,708	1,0	1,0	1,0	5,9
BVT	1,119	1,861	3,023	1,2	1,5	1,7	3,8
APG	2,104	3,202	4,780	2,3	2,6	2,8	4,6
Rock B	0,845	1,488	2,555	1,0	1,0	1,0	3,4
BVT F6 cont	1,031	1,656	2,604	1,2	1,1	1,0	4,0
BVT F6 dfb	3,311	4,773	6,768	3,9	3,2	2,6	5,3
APG F7 cont	0,902	2,024	4,381	1,0	1,4	1,7	2,4
APG F7 dfb	3,407	5,779	9,571	4,0	3,9	3,7	3,6

Tabela 2: Quantificação da capacidade reprodutiva nos machos antes (Belinato et al. 2012) e após a seleção.

		$\Sigma(f0-3*\%M)$	Redução (%)
Pré seleção	Rock A	297,5	
	BVT F1	226,4	
	APG F1	64,3	
	BVT F1/Rock A		23,9
	APG F1/Rock A		78,4
Pós seleção	Rock B	292,6	
	BVT F6 cont	269,7	
	BVT F6 dfb	208,9	
	APG F7 cont	146,4	
	APG F7 dfb	114,5	
	BVT F6 cont/Rock B		7,8
	BVT F6 dfb/Rock B		28,6
	APG F7 cont/Rock B		50,0
	APG F7 dfb/Rock B		60,9
	BVT F6 dfb/cont		29,1
APG F7 dfb/cont		21,8	

Tabela 3: Valores do *fitness* das populações antes da seleção (dados obtidos de Belinato et al. 2012) e nas populações após seis ou sete gerações na presença (dfb) ou ausência de diflubenzuron (cont).

População/linhagem	Parâmetros do <i>fitness</i>			
	Longevidade ¹	Aceitação de repasto sanguíneo ²	Quantidade de sangue ingerido ³	Número de ovos ⁴
Rock A	71,1 ± 9,6	95,5 ± 5,0 ^a	2,2 ± 0,2 ^a	103,2 ± 18,6 ^a
BVT F1	82,2 ± 16,7	81,1 ± 24,1 ^b	2,3 ± 0,1 ^a	104,0 ± 17,2 ^a
APG F1	73,3 ± 13,3	76,6 ± 3,3 ^b	1,9 ± 0,1 ^b	80,9 ± 29,4 ^b
% redução:				
BVT/Rock A ⁵	–	15	–	–
APG/Rock A ⁵	–	19,7	13,6	21,6
Rock B	63,3 ± 10,0	96,6 ± 3,3 ^a	2,5 ± 0,3 ^a	81,4 ± 19,5 ^a
BVT F6 cont	66,6 ± 20,0	95,4 ± 2,9 ^a	2,4 ± 0,3 ^a	77,0 ± 19,7 ^a
BVT F6 dfb	40,0 ± 11,5	62,5 ± 19,2 ^b	2,1 ± 0,2 ^b	64,2 ± 21,9 ^b
APG F7 cont	88,9 ± 16,1	84,4 ± 13,7 ^c	1,9 ± 0,2 ^b	65,2 ± 22,3 ^c
APG F7 dfb	56,3 ± 11,1	48,9 ± 17,7 ^d	1,9 ± 0,2 ^b	60,0 ± 18,2 ^d
% redução:				
BVTF6 cont/Rock B ⁵	–	1,2	4,0	5,4
BVT F6 dfb/Rock B ⁵	36,8	35,3	16,0	21,1
BVT F6 dfb/cont ⁶	39,9	34,4	12,5	16,6
APG F7 cont/Rock B ⁵	–	12,6	24,0	19,9
APG F7 dfb/Rock B ⁵	11,0	49,3	24,0	26,2
APG F7 dfb/cont ⁶	36,6	42,0	0,0	7,9

¹ percentual de fêmeas sobreviventes no 40º dia de vida adulta

² percentual de fêmeas que realizou o repasto sanguíneo

³ quantidade média de sangue ingerido em relação ao peso médio das fêmeas

⁴ número médio de ovos por fêmea que fez postura

⁵ redução média, em relação a Rockefeller

⁶ redução média, grupo selecionado (dfb) em relação ao grupo controle (cont) de cada população

* Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$)

Tabela S1: Eficiência de machos *A. aegypti* na cópula (%), antes (Belinato et al. 2012) e após a seleção com diflubenzuron.

Pré-seleção					
Fêmeas					
inseminadas (n)	Rock A	BVT F1	APG F1		
0	0	6,6 ± 6,7	57,7 ± 10,2		
1	0	13,3 ± 6,7	26,6 ± 6,7		
2	2,2 ± 3,8	26,6 ± 11,5	8,8 ± 3,8		
3	97,7 ± 3,8	53,3 ± 6,7	6,7 ± 6,7		
Pós seleção					
Fêmeas					
inseminadas (n)	Rock B	BVT F6 cont	BVT F6 dfb	APG F7 cont	APG F7 dfb
0	0,0	3,3 ± 3,3	12,7 ± 1,4	24,4 ± 8,4	37,0 ± 9,0
1	2,3 ± 4,1	6,6 ± 5,8	16,5 ± 2,9	25,5 ± 8,4	25,1 ± 1,3
2	2,2 ± 3,8	6,6 ± 3,3	19,4 ± 5,2	28,8 ± 1,9	23,7 ± 4,6
3	95,3 ± 4,0	83,3 ± 5,8	51,2 ± 2,4	21,1 ± 1,9	14,0 ± 6,4

3.4) Avaliação da reversão da resistência ao OP temephos nos grupos não expostos ao diflubenzuron e análise da atividade das enzimas detoxificantes nos grupos selecionados com o ISQ

3.4.1) Reversão da resistência ao organofosforado temephos em duas populações de campo de *A. aegypti* mantidas no laboratório na ausência do inseticida

Níveis elevados de resistência ao OP temephos haviam sido detectados em duas populações de campo de *Aedes aegypti*, Boa Vista/RR (BVT) e Aparecida de Goiânia/GO (APG). De acordo com bioensaios tipo dose resposta, os valores da RR_{95} na geração F2 em BVT e F1 em APG foram, respectivamente, 7,4 e 19,2 (Belinato et al. 2012b; ver capítulo 2 da seção Resultados).

As doses efetivas de diflubenzuron, um CSI, sobre as duas populações também foram determinadas. Posteriormente, ambas foram selecionadas, em laboratório, durante seis ou sete gerações com este ISQ (Belinato et al. 2012c, ver capítulo 3 da seção Resultados). Durante esse processo, para cada população, três grupos de 1.000 larvas, mantidos separadamente durante todo o procedimento, foram expostos, em todas as gerações, a uma concentração fixa do ISQ. Para as duas populações, BVT e APG, foi usada a dose de diflubenzuron que inibia em 80% (IE_{80}) a emergência de adultos da geração inicial. Paralelamente, dois grupos controle, também com 1.000 larvas, foram mantidos durante o mesmo número de gerações na ausência de qualquer inseticida. Foi avaliado nesses grupos, em cada geração, por meio de ensaios dose resposta, o nível de resistência ao OP temephos.

Os procedimentos de criação das larvas e dos ensaios dose resposta foram os mesmos utilizados por Belinato et al. (2012 b, c), como indicado nos capítulos 2 e 3 da seção Resultados. Em cada geração, foram realizados pelo menos três testes, em dias diferentes, com *pools* de larvas provenientes dos grupos controle. Verificamos que, nas duas populações, houve uma queda progressiva nos níveis de resistência ao temephos (Figuras 1 e 2). A RR_{95} de APG na F7 foi 6,3 (Figura 2B), o que corresponde a uma queda aproximada de 67% em relação à RR_{95} da geração F1. A RR_{50} , do mesmo modo, sofreu redução de 69%. Em BVT, população com menor nível de resistência inicial, a redução das RR também foi expressiva. Na última

geração avaliada, os valores da RR_{50} e da RR_{95} foram 2,1 e 2,2 (Figura 2B), uma redução de 48% e 70%, respectivamente. Vale ressaltar que em BVT as RR ficaram abaixo de 3,0, valor que é atualmente o ponto de corte acima do qual o Ministério da Saúde recomenda a interrupção do uso do inseticida (Montella et al. 2007). Em APG, apesar da redução, os valores de RR ainda não se encontram abaixo desse limiar, provavelmente devido ao elevado nível de resistência inicial.

O aumento gradual da susceptibilidade ao temephos, observado quando as duas populações foram mantidas sem qualquer pressão de seleção com inseticidas, provavelmente ocorre devido ao custo no *fitness* associado à resistência inicial. Havíamos verificado, originalmente, correlação entre o nível de resistência ao temephos e os efeitos negativos no *fitness* nestas duas populações, BVT e APG (Belinato et al. 2012b; ver também capítulo 2 da seção Resultados). De modo geral, parâmetros como aceitação do repasto sanguíneo, quantidade de sangue ingerido, número de ovos e quantidade de fêmeas inseminadas haviam sido afetados. Esses mesmos parâmetros foram avaliados após seis ou sete gerações (Belinato et al. 2012c; capítulo 3 da seção Resultados). Nos grupos controle, não expostos (os mesmos cuja progressão das RR a temephos está mostrada aqui), houve recuperação da maioria dos parâmetros nas duas populações. Desse modo, a resistência ao temephos seria vantajosa apenas na presença do inseticida. Na ausência de seleção, indivíduos susceptíveis teriam vantagem adaptativa e aumentariam em frequência ao longo das gerações, o que foi verificado de forma indireta com a reversão da resistência a temephos aqui observada.

É bastante provável que a maioria das populações de campo de mosquitos vetores, naturalmente expostas a uma série de xenobióticos além dos inseticidas usados diretamente para controlá-las, possua mais de um mecanismo de resistência a inseticidas, o que resultaria em efeitos diferentes no *fitness*. Por outro lado, a reversão da resistência ao OP temephos, aqui apresentada para as duas populações, BVT e APG, foi concomitante à recuperação dos efeitos negativos no *fitness* (Belinato et al. 2012c; capítulo 3 da seção Resultados). Este é mais um indício de que os mecanismos de

resistência originalmente selecionados pelo OP temephos foram responsáveis, em grande parte, pelo comprometimento do *fitness* das gerações iniciais.

Pretendemos realizar as mesmas avaliações com temephos na última geração dos grupos selecionados com diflubenzuron. Além disso, será investigada, por meio de ensaios bioquímicos, a possibilidade de participação das enzimas detoxificantes na resistência a CSI.

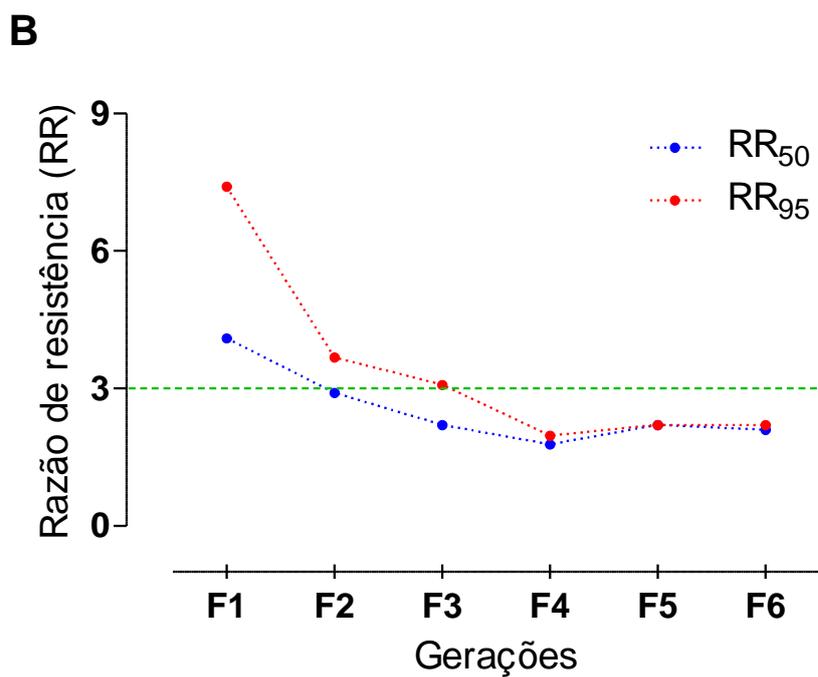
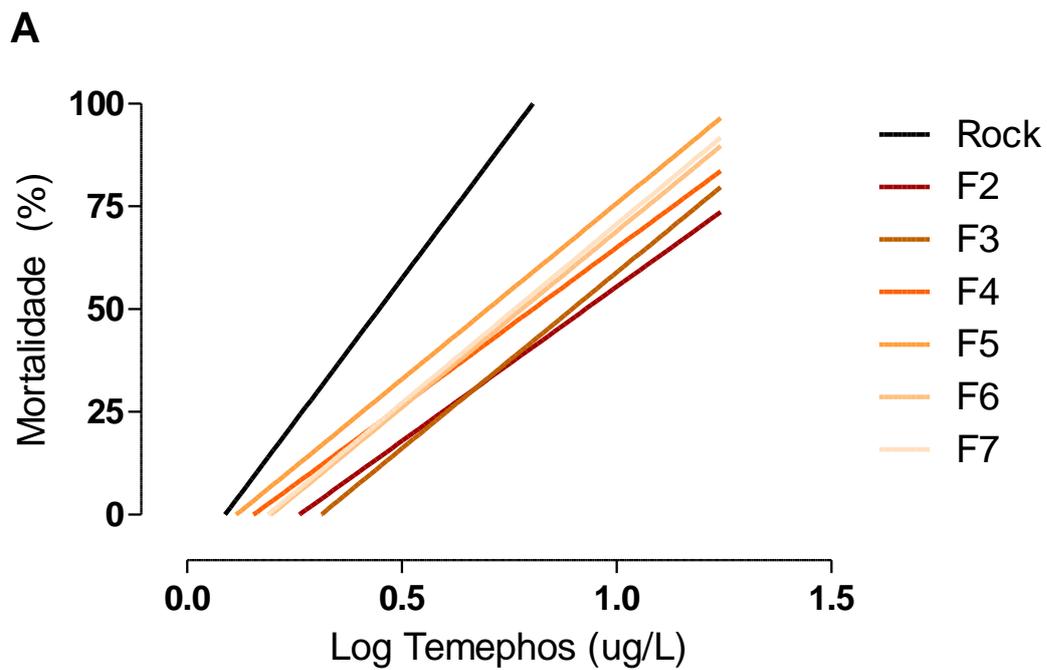


Figura 1: A) Curvas de regressão linear da mortalidade de Boa Vista (BVT) após 24 horas de exposição ao temephos. B) Valores de RR₅₀ e RR₉₅ ao longo de seis gerações mantidas na ausência de inseticidas.

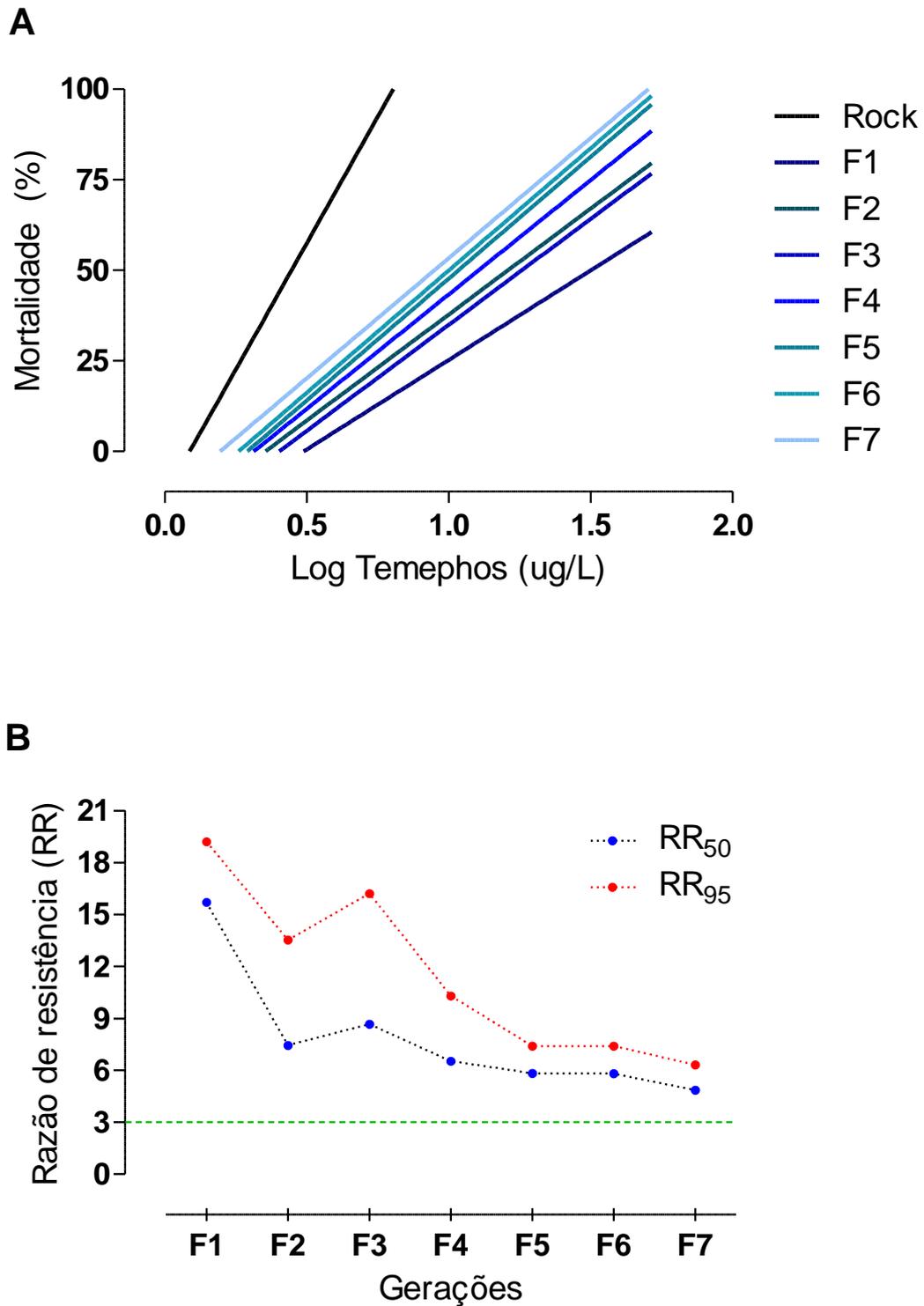


Figura 2: A) Curvas de regressão linear da mortalidade de Aparecida de Goiânia (APG) após 24 horas de exposição ao temephos. B) Valores de RR_{50} e RR_{95} ao longo de seis gerações mantidas na ausência de inseticidas.

3.4.2) Avaliação da atividade das principais enzimas detoxificantes em duas populações de campo de *A. aegypti* selecionadas com diflubenzuron

A atividade das principais classes de enzimas relacionadas com a resistência foi quantificada em Boa Vista/RR (BVT) e Aparecida de Goiânia/GO (APG), antes e depois de sua manutenção por 6-7 gerações em laboratório na ausência ou na presença de diflubenzuron. Em todos os casos, os testes foram feitos por meio de protocolo previamente estabelecido (Valle et al. 2006, Montella et al. 2007, Viana-Medeiros 2012). Foram avaliadas as enzimas glutationa-S-transferases (GST), esterases (EST) e oxidases de função mista (MFO), além da atividade de acetilcolinesterase (ACE), alvo de inseticidas OP. Atividade de EST foi avaliada com três substratos: acetatos de alfa-naftil (alfa-EST), beta-naftil (beta-EST) e para-nitro-fenil (pNPA).

Durante a seleção com diflubenzuron, para cada população, cinco grupos independentes foram formados: três expostos e dois não expostos ao ISQ. Os ensaios bioquímicos foram feitos com, pelo menos, 60 larvas de terceiro estágio de cada grupo. A mesma quantidade de larvas foi utilizada para os ensaios realizados com as gerações iniciais de cada população. Para análise dos dados, os três grupos expostos ao diflubenzuron foram tratados como um único grupo. O mesmo processo foi realizado com os grupos controle, não expostos ao ISQ.

Os valores de atividade enzimática foram comparados por meio de Kruskal-Wallis, seguida de comparação múltipla de Dunn. Adicionalmente, foi realizado o cálculo dos valores de percentil 99 (p99) da linhagem Rockefeller, controle susceptível, e a taxa de indivíduos acima deste valor nas populações selecionadas ou não (%>p99) foi determinada. Com isto, procedeu-se à classificação de acordo com o critério empregado na rotina do monitoramento dos mecanismos de resistência no Brasil: até 15% da população acima de p99 de Rockefeller é indicativo de atividade normal, entre 15 e 50%, atividade alterada e acima de 50%, atividade muito alterada (Valle et al. 2006, Montella et al. 2007).

Verificamos que as populações originais, antes da seleção com diflubenzuron em laboratório, já apresentavam aumento significativo da atividade de GST em comparação com Rockefeller (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). Entretanto, a aplicação do critério de classificação da rotina do monitoramento não revelou alteração de nenhum perfil enzimático (Tabela 1). Por outro lado, depois de 6-7 gerações em laboratório, detectamos mudanças no perfil de atividade das enzimas, tanto nos grupos controle quanto nos grupos selecionados com diflubenzuron. De modo geral, foram encontradas alterações apenas em GST e MFO (Tabela 2). Nos grupos controle das duas populações ('BVT cont F6' e 'APG cont F7'), as medianas de GST se mantiveram significativamente distintas de Rockefeller (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). No grupo controle de APG, além deste aumento significativo, o critério de classificação usado no monitoramento da resistência, baseado no percentil 99 de Rockefeller, também revelou alteração de GST. Nos dois grupos selecionados com diflubenzuron as variações de GST foram ainda mais expressivas: houve aumento significativo das medianas (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$), além de alteração segundo o critério de classificação do monitoramento. Além disto, depois de 6-7 gerações no laboratório, com exceção do grupo controle APG, foi detectado aumento significativo de MFO em todos os casos (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). No caso de MFO, no entanto, o critério de classificação da rotina do monitoramento não revelou qualquer alteração.

Também foi realizada comparação, para cada população, entre a geração inicial e os grupos mantidos no laboratório, expostos ou não ao ISQ. Novamente, diferenças em GST e MFO foram as principais alterações encontradas. Em BVT, no grupo selecionado, ocorreu aumento significativo de GST (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$) e o perfil dessa enzima foi classificado como "alterado", segundo o critério usado no monitoramento da resistência, baseado no percentil 99 de BVT F1. Para MFO, as alterações de BVT foram detectadas com ambos os critérios nos dois grupos, controle ou expostos ao diflubenzuron (Tabela 3). Em APG, nos grupos controle foi observado aumento significativo de atividade de GST (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$), enquanto o perfil, de acordo com o critério de classificação usado no monitoramento, se manteve inalterado para todas as enzimas (Tabela 4). Por outro lado, no grupo de APG exposto a

diflubenzuron, foi encontrado aumento da atividade de GST e MFO com os dois critérios utilizados (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$ e % >p99 APG cont F1).

Apesar da necessidade de maior investigação sobre os mecanismos de resistência a ISQs, nossos resultados apontam para a possibilidade de participação destas duas classes enzimáticas, MFO e GST, em sua detoxificação. Aumento da atividade de MFO já foi, em estudos prévios, correlacionada com tolerância a diflubenzuron em insetos (Kotze et al. 1997). Entretanto, este é o primeiro registro da possibilidade de participação de GST na metabolização de diflubenzuron.

Tabelas 1-4: Comparação da atividade das principais enzimas detoxificantes e de acetilcolinesterase na linhagem Rockefeller (Rock) e em populações de *Aedes aegypti* provenientes de Boa Vista (BVT) e de Aparecida de Goiânia (APG) antes (F1) e depois da manutenção por 6-7 gerações em laboratório (F6, F7), na ausência ('cont') ou na presença ('dfb') de diflubenzuron.

Legenda:

Med: Mediana de cada distribuição;

p99: valor de atividade do percentil 99 de Rockefeller (Tabelas 1, 2) ou de BVT F1 (Tabela 3) ou ainda de APG F1 (Tabela 4);

%>p99_{Rock} (Tabelas 1 e 2): percentual de indivíduos da população avaliada com atividade maior que o percentil 99 de Rockefeller;

%>p99_{BVTcontF1} (Tabela 3) ou %>p99_{APGcontF1} (Tabela 4): percentual de indivíduos da população mantida no laboratório com atividade maior que a geração F1 da população correspondente.

Os valores de atividade das enzimas estão expressos como segue: ACE, Δ Abs/mg ptn; A-EST e B-EST, nmol/mg ptn/min; PNPA-EST, Δ Abs/mg ptn/min; GST, mmol/mg ptn/min; MFO, nmoles cit/mg ptn.

Diferenças estatisticamente significativas entre as medianas do grupo apresentado nas primeiras colunas e os demais estão indicadas por asteriscos.

As cores nas colunas estão de acordo com a classificação adotada na rotina do monitoramento da resistência de *A. aegypti* a inseticidas no Brasil: %>p99_{Rock} até 15 indica atividade normal (células verdes), entre 15 e 50, atividade alterada (células amarelas).

Tabela 1: Comparação das atividades enzimáticas das populações originais com a linhagem Rockefeller, susceptível.

Enzima	Rock		BVT F1		APG F1	
	Med	p99	Med	%>p99 _{Rock}	Med	%>p99 _{Rock}
ACE	0,03	0,05	0,02	8	0,02	13
A-EST	18,8	32,84	18,7	4	17,9	1
B-EST	32,45	51,54	29,05	9	25,1	1
PNPA-EST	3,33	9,64	2,99	0	2,7	0
GST	0,57	1,33	0,74*	4	0,86*	13
MFO	17,71	42,64	13,47	1	17,16	0

Tabela 2: Comparação das atividades enzimáticas entre a linhagem Rockefeller e os grupos mantidos por 6-7 gerações em laboratório, na ausência ou presença de diflubenzuron.

Enzima	Rock		BVT cont F6		BVT dfb F6		APG cont F7		APG dfb F7	
	Med	p99	Med	%>p99 _{Rock}	Med	%>p99 _{Rock}	Med	%>p99 _{Rock}	Med	%>p99 _{Rock}
ACE	0,03	0,05	0,03*	11	0,03	5	0,03	8	0,02	0
A-EST	18,8	32,84	16,9	3	14,4	0	16,35	4	18,1	3
B-EST	32,45	51,54	29,2	3	24,5	1	25,25	1	27	0
PNPA-EST	3,33	9,64	3,4	1	3	0	3	0	3,32	0
GST	0,57	1,33	0,74*	14	0,98*	25	0,97*	18	1,23*	28
MFO	17,71	42,64	21,51*	14	20,75*	11	15,14	5	26,79*	11

Tabela 3: Comparação das atividades enzimáticas de BVT, entre a geração inicial (F1) e os grupos mantidos em laboratório por seis gerações, selecionados ou não com diflubenzuron.

Enzima	BVT F1		BVT cont F6		BVT dfb F6	
	Med	p99	Med	%>p99 BVT contF1	Med	%>p99 BVT contF1
ACE	0,02	0,06	0,03*	5	0,03	3
A-EST	18,7	36,9	16,9	3	14,4	0
B-EST	29,05	67,06	29,2	2	24,5	0
PNPA-EST	2,99	6,51	3,4	5	3	0
GST	0,74	1,43	0,74	12	0,98*	21
MFO	13,47	38,63	21,51*	18	20,75*	18

Tabela 4: Comparação das atividades enzimáticas de APG, entre a geração inicial (F1) e os grupos mantidos em laboratório por sete gerações, selecionados ou não com diflubenzuron.

Enzima	APG cont F1		APG cont F7		APG dfb F7	
	Med	p99	Med	%>p99 APG contF1	Med	%>p99APG contF1
ACE	0,02	0,06	0,03	0	0,02	0
A-EST	17,9	32,33	16,35	4	18,1	8
B-EST	25,1	51,29	25,25	1	27	8
PNPA-EST	2,7	6,88	3	0	3,32	3
GST	0,86	1,89	0,97*	3	1,23*	19
MFO	17,16	33,39	15,14	13	26,79*	52

4) Discussão geral

Aedes aegypti é um mosquito bastante difundido pelo território brasileiro. Sua presença é preocupante, pois além de ser vetor primário de dengue no Brasil, tem o potencial de participar da transmissão de febre amarela e do vírus chikungunya (Barret & Higgs 2007, Pialoux et al. 2007, Jansen & Beebe 2010). A distribuição de *A. aegypti* pelo globo tem aumentado e está diretamente relacionada com o crescimento do número de casos de dengue e de outras arboviroses (Weaver & Reisen 2010). Aumento da população humana, ocupação urbana desordenada com deficiência no saneamento e no abastecimento de água, e grande fluxo populacional, são fatores associados à expansão do vetor (Gubler & Clark 1996).

O controle mecânico é uma das metodologias mais indicadas para o combate a este inseto visto que as larvas desse mosquito são encontradas, principalmente, em criadouros de origem artificial (Villegas-Trejo et al. 2011). Vale ressaltar que o sucesso dessa metodologia está atrelado ao comprometimento contínuo de todos os setores da sociedade civil, incluindo os gestores, a população e a mídia (Gubler & Clark 1996). Entretanto, apesar de ser a metodologia mais eficaz, o controle mecânico ainda é, comparativamente, pouco representativo em relação aos outros métodos.

No Brasil, o controle químico, por meio do uso de inseticidas, representa hoje componente muito significativo na estratégia de combate ao *A. aegypti*. Todavia, os inseticidas químicos tradicionais podem não ser eficazes em campo, já que o número de registros de populações resistentes tem crescido continuamente (Macoris et al. 1999, Lima et al. 2003, Braga et al. 2004, Da-Cunha et al. 2005, Montella et al. 2007, Belinato et al. 2012). A aplicação intensa de inseticidas durante um longo período de tempo tem grande participação no aumento da frequência de indivíduos resistentes nas populações. A resistência a inseticidas, além de estar relacionada com falhas no controle, é responsável pela diminuição do número de compostos disponíveis para uso em campo. No caso de *A. aegypti*, essa é uma situação particularmente preocupante, já que os inseticidas contra a fase imatura desse vetor devem ter uso aprovado em água potável. Nesse sentido, o

conhecimento sobre os mecanismos de resistência e seus efeitos na biologia dos vetores é essencial para o desenho de novas estratégias de controle, além de promover o aumento da vida útil dos inseticidas atualmente disponíveis, principal desafio dos programas de controle.

No estudo aqui apresentado, foi avaliada a atividade de enzimas detoxificantes em resposta a doses parcialmente letais de inseticidas, na linhagem Rockefeller e em populações de campo de *Aedes aegypti*. Além disso, também foi realizada seleção com diflubenzuron em duas populações de campo de *A. aegypti*, com diferentes níveis de resistência ao OP temephos. Diversos parâmetros da biologia dessas populações foram investigados, antes e depois da seleção com o ISQ.

Todas as populações estudadas apresentaram altos níveis de resistência aos inseticidas químicos tradicionais (capítulos 3.1 e 3.2 da seção Resultados). Entretanto, o nível de resistência encontrado não foi correlacionado com alteração expressiva das enzimas detoxificantes (capítulo 3.1 da seção Resultados), sugerindo que outros mecanismos participam da resistência nas populações avaliadas ou que, alternativamente, há limitações na atual metodologia de avaliação da resistência metabólica.

Com relação a diflubenzuron, não foram encontrados, em nenhuma das populações avaliadas, altos níveis de resistência (capítulos 3.1 e 3.3 da seção Resultados). Este dado corrobora resultados prévios do grupo com outras populações de *A. aegypti* e com outros inibidores de síntese de quitina (Martins et al. 2008, Belinato et al. dados não publicados). Apesar disto, ainda não existem estudos de campo que mostrem o significado funcional dos níveis de resistência encontrados até agora para essa classe de compostos. Neste sentido, ensaios simulados de campo com populações com os maiores valores de RR detectados até então são necessários para auxiliar a validação funcional da resistência aos ISQ e, em consequência, para subsidiar o controle de vetores envolvendo esses compostos.

Assim como observado em outros trabalhos do grupo (Martins et al. 2008, Belinato et. al., dados não publicados), foi verificado que populações com maiores níveis de resistência ao OP temephos apresentavam maior tolerância a CSI (capítulos 3.1 e 3.3 da seção Resultados). Entretanto, avaliação de populações com o CSI novaluron não mostraram a mesma relação (Fontoura et

al. 2012). É provável que a resistência a estes compostos esteja relacionada, pelo menos em parte, com alteração da atividade de enzimas que participam da resistência metabólica. Nossos resultados mostram que a exposição a doses parcialmente letais de diflubenzuron acarretaram alteração das atividades de MFO e GST (capítulo 3.1 da seção Resultados). Além disso, também foram encontradas, nas populações selecionadas com diflubenzuron, alterações nessas mesmas enzimas (capítulo 3.4.2 da seção Resultados). Aumento da atividade de MFO já foi correlacionada com tolerância a diflubenzuron (Kotze et al. 1997). Entretanto, nosso estudo indica que GSTs também podem estar envolvidas na metabolização desse ISQ. Esse resultado representa a primeira suspeita de participação dessa classe de enzimas na tolerância a diflubenzuron.

Avaliou-se também o efeito de doses parcialmente letais do PI permetrina e do OP temephos sobre a atividade das principais enzimas detoxificantes (capítulo 3.1 da seção Resultados). Nas larvas expostas a temephos houve, como esperado, diminuição da atividade da acetilcolinesterase, alvo de OP. Além disso, a atividade de esterases, com os três substratos utilizados, diminuiu com o aumento das concentrações de temephos. Este resultado foi extremamente relevante, pois confirmou que os três substratos utilizados nas avaliações empregadas na rotina do monitoramento dos mecanismos de resistência de *A. aegypti* reagem de fato com OP. Além disso, evidenciou, como indicado por outros autores, que as esterases de insetos se ligam de modo irreversível e não processam OP (Hemingway & Karunaratne 1998). A exposição da linhagem Rockefeller, referência de susceptibilidade a inseticidas e de uma população de campo, STR, a concentrações parcialmente letais de permetrina, não promoveu alteração significativa e consistente em nenhuma das enzimas avaliadas, ao contrário do esperado. Análises posteriores revelaram que STR possui, em alta frequência, mutação no alvo de PI, o gene que codifica o canal de sódio (na posição 1534), relacionada com resistência a PI (Harris et al. 2010). É provável que esse fato esteja diretamente relacionado com a ausência de alteração nas enzimas detoxificantes nessa população. Saavedra-Rodriguez et al. (2012), por exemplo, verificaram correlação negativa entre o número de genes detoxificantes transcritos e a frequência da mutação 1016. Por outro lado, a

ausência de alterações na linhagem Rockefeller depois de exposição a deltametrina pode ser reflexo da limitação da metodologia da rotina do monitoramento na detecção dos mecanismos de resistência.

Verificamos que indivíduos de duas populações de campo, resistentes a OP e PI, apresentam uma série de problemas em aspectos de sua biologia (capítulo 3.2 da seção Resultados). Quanto maior o nível de resistência ao OP temephos, mais aspectos da tabela de vida foram afetados. De modo geral, parâmetros como taxa de fêmeas que aceitam o repasto sanguíneo, quantidade de sangue ingerido, número de ovos e capacidade reprodutiva, foram prejudicados. É provável que grande parte dos problemas encontrados no *fitness* esteja relacionado ao custo associado ao mecanismo de resistência ao OP temephos. Os resultados mostrados nos capítulos 3.3 e 3.4.1 da seção Resultados reforçam essa hipótese: ocorre reversão da resistência ao temephos e recuperação dos problemas no *fitness* quando as populações são mantidas na ausência do inseticida ao longo de seis ou sete gerações.

Por fim, foi realizada seleção com diflubenzuron em duas populações de *A. aegypti* (capítulo 3.3 da seção Resultados). Foi utilizada, durante todo o processo, uma concentração fixa, que inibia a emergência das populações iniciais em 80% (IE₈₀). Após seis ou sete gerações, a emergência de adultos foi similar à dos grupos controle, não expostos. Nesse momento, foi feita nova avaliação de vários parâmetros da tabela de vida dos mosquitos, para comparação com os dados obtidos para as populações originais (capítulo 3.2 da seção Resultados). Nos grupos selecionados com diflubenzuron foi encontrado comprometimento de diversos parâmetros do *fitness* em comparação com os grupos controle e com a linhagem Rockefeller. Esse resultado indica que a aquisição de resistência a diflubenzuron, a exemplo de temephos, também possui um custo em termos de viabilidade e capacidade reprodutiva. Esses resultados sugerem ainda que diflubenzuron representa uma boa alternativa contra populações de campo, resistentes ou não aos inseticidas tradicionais. Todavia, também mostram que estratégias baseadas no uso de apenas um composto químico podem acarretar em rápida seleção de resistência, prejudicando o controle em campo.

De modo geral, nossos resultados apontam o caráter multifatorial da resistência em populações de campo. Dependendo da localidade, populações de *A. aegypti* podem estar em contato com diferentes tipos de xenobióticos, além dos inseticidas usados especificamente em seu controle. Este contato pode acarretar na seleção de diferentes mecanismos de resistência, que provavelmente interferem com o sucesso do controle, além de provocar efeitos diversos no *fitness* dos mosquitos. Por esse motivo, antes do emprego de qualquer estratégia de controle, o estudo da possibilidade de resistência cruzada entre diferentes compostos é extremamente importante. Esperamos, com os resultados aqui apresentados, contribuir para o desenho de estratégias de controle diferenciadas e racionais de *A. aegypti*.

5) Conclusões

- Encontramos altos níveis de resistência a OP e/ou PI em quatro populações de campo de *A. aegypti* do Brasil.
- Nenhuma das populações de *A. aegypti* avaliadas apresentou alto nível de resistência ao ISQ diflubenzuron, independente do nível de resistência ao OP temephos. Entretanto, a população com maior nível de resistência ao temephos foi mais tolerante ao diflubenzuron, sugerindo a possibilidade de mecanismos de resistência parcialmente redundantes.
- Aparentemente, populações de campo possuem maior heterogeneidade de resposta metabólica quando comparadas com linhagens de laboratório.
- Verificamos, na linhagem Rockefeller e em DQC, que concentrações parcialmente letais do OP temephos provocaram diminuição progressiva da atividade mensurável de acetilcolinesterase e de esterases. Este resultado confirma que as esterases quantificadas com os três substratos utilizados nas avaliações do monitoramento dos mecanismos de resistência reagem com OP.
- De modo geral, não foram encontradas, na linhagem Rockefeller e em STR, diferenças na atividade das enzimas detoxificantes, quando larvas foram expostas ao PI permetrina. É provável que a presença da mutação *kdr* nessa população esteja relacionada com a não detecção de alteração de atividade enzimática, com a metodologia empregada.
- GST e MFO estão provavelmente envolvidas na metabolização de diflubenzuron em *A. aegypti*: Larvas de DQC expostas a doses parcialmente letais do ISQ apresentam aumento da atividade das duas classes de enzimas; além disso, alterações na atividade destas mesmas enzimas foram verificadas nas larvas de duas populações selecionadas com o ISQ.

- Resistência ao OP temephos foi correlacionada com comprometimento do *fitness* em duas populações de campo de *A. aegypti*.
- Reversão da resistência ao OP temephos foi observada em duas populações de campo de *A. aegypti* quando mantidas na ausência de inseticida. Nessas mesmas populações, verificamos recuperação de vários aspectos do *fitness*.
- Exposição de duas populações de campo de *A. aegypti* a uma dose fixa de diflubenzuron, correspondente à IE_{80} da primeira geração, acarretou, depois de seis ou sete gerações, em populações com maiores níveis de resistência ao ISQ.
- Verificamos que a resistência a diflubenzuron em *A. aegypti* está associada a um custo de viabilidade e de capacidade reprodutiva.

6) Referências Bibliográficas

- Abo-Elghar GE, Fujiyoshi P, Matsumura F 2004. Significance of the sulfonylurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 743-752.
- Agnew P, Berticat C, Bedhomme S, Sidobre C, Michalakis Y 2004. Parasitism increases and decreases the costs of insecticide resistance in mosquitoes. *Evolution* 58: 579-586.
- Ahoua Alou LP, Koffi AA, Adja MA, Tia E, Kouassi PK, Koné M, Chandre F 2010. Distribution of ace-1R and resistance to carbamates and organophosphates in *Anopheles gambiae* s.s. populations from Côte d'Ivoire. *Malar J* 9: 167.
- Ali A, Nayar JK, Rui-de Xue 1995. Comparative toxicity of selected larvicides and insect growth regulators to a Florida laboratory population of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc* 11: 72-76.
- Alout H, Labbé P, Pasteur N, Weill M 2011. High incidence of ace-1 duplicated haplotypes in resistant *Culex pipiens* mosquitoes from Algeria. *Insect Biochem Mol Biol* 41: 29-35.
- Ansari MA, Razdan RK, Sreehari U 2005. Laboratory and field evaluation of himilin against mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 21: 432-436.
- Arias JR, Mulla MS 1975. Postemergence effects of two insect growth regulators on the mosquito *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 12: 317-322.
- Aurade RM, Jayalakshmi SK, Sreeramulu K 2010. P-glycoprotein ATPase from the resistant pest, *Helicoverpa armigera*: purification, characterization and effect of various insecticides on its transport function. *Biochem Biophys Acta* 1798: 1135-1143.
- Axtell RC, Dukes JC, Edwards TD 1979. Field tests of diflubenzuron, methoprene, flit MLO[®] and chlorpyrifos for the control of *Aedes taeniorhynchus* larvae in diked dredged spoil areas. *Mosq News* 39: 520-526.

- Bai H, Gelman DB, Pallia SR 2010. Mode of action of methoprene in affecting female reproduction in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Pest Manag Sci* 66: 936-943.
- Barret ADT, Higgs S 2007. Yellow fever: A disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol* 52: 209-229.
- Barrett ADT, Teuwen DE 2009. Yellow fever vaccine —how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Curr Opin Immunol* 21: 308-313.
- Bass C Field LM 2011. Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Manag Sci* 67: 886-890.
- Beaty BJ, Marquardt WC 1996. The biology of disease vectors. University Press of Colorado. 632 p.
- Becnel JJ, White S 2007. Mosquito pathogenic viruses – the last 20 years. *J Am Mosq Control Assoc* 23(sp2): 36-49.
- Belinato TA, Martins AJ, Lima JBP, Lima-Camara TN, Peixoto AA, Valle D 2009. Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 43-47.
- Belinato TA, Martins AJ, Valle D 2012. Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. No prelo.
- Bermudez I, Hawkins CA, Taylor AM, Beadle DJ. 1991. Actions of insecticides on the insect GABA receptor complex. *J Recept Res* 11: 221-232.
- Berticat C, Bonnet J, Duchon S, Agnew P, Weill M, Corbel V 2008. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC Evol Biol* 8: 104.
- Berticat C, Boquien G, Raymond M, Chevillon C 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res* 79: 41-47.
- Berticat C, Duron O, Heyse D, Raymond M 2004. Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*. *Genet Res* 83: 189-196.

- Biemans-Oldehinkel E, Doeven MK, Poolman B 2006. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett* 580: 1023-1035.
- Bisset JA, Rodríguez MM, Ricardo Y, Ranson H, Pérez O, Moya M, Vázquez A 2011. Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008. *Med Vet Entomol* 25: 233-239.
- Bollenbacher WE, Granger NA, Katahira EJ, O'Brien A 1987. Developmental endocrinology of larval moulting in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J exp Biol* 128, 175-192.
- Braga IA, Lima JBP, Cunha SP, Soares SS, Melo RCGM, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas States, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 199-203.
- Braga IA, Mello CB, Montella IR, Lima JBP, Martins-Jr AJ, Medeiros PFV, Valle D 2005. Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities under laboratory conditions. *J Med Entomol* 42: 830-837.
- Braga IA, Valle D 2007a. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 279-293.
- Braga IA, Valle D 2007b. *Aedes aegypti*: Histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 113-118.
- Bryant J, Wang H, Cabezas C, Ramirez G, Watts D, Russell K, Barrett A 2003. Enzootic transmission of yellow fever virus in Peru. *Emerg Infect Dis* 9: 926-933.
- Bryant JE, Holmes EC, Barrett ADT 2007. Out of Africa: A molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog* 3:e75.
- Busvine, JR 1951. Mechanism of resistance to insecticides in housefly. *Nature* 168: 193-195.
- Cavados CFG, Fonseca RN, Chaves JQ, Araújo-Coutinho CJPC, Rabinovitch L 2005. A new black fly isolate of *Bacillus thuringiensis* autoagglutinating strain highly toxic to *Simulium pertinax* (Kollar) (Diptera, Simuliidae) larvae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 795-797.

- Carlson JR, Benthey D 1977. Ecdysis: neural orchestration of a complex behavioral performance. *Science* 195: 1006-1008.
- Chapman RF 1998. The Insects: structure and function. 4th edition, Cambridge University Press.
- Ching Ng L, Hapuarachchi HC 2010. Tracing the path of chikungunya virus- evolution and adaptation. *Infect Genet Evol* 10: 876-885.
- Clarke BS, Jewess PJ 1990. The inhibition of chitin synthesis in *Spodoptera littoralis* larvae by flufenoxuron, teflubenzuron and diflubenzuron. *Pestic Sci* 28: 377-388.
- Clements AN 1992. The biology of mosquitoes. Vol. 1 development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall, London, 509 pp.
- Cohen E, Casida JE 1980. Inhibition of *Tribolium* Gut Chitin Synthetase. *Pestic Biochem Physiol* 13: 129-136.
- Comins HN 1986. Tactics for resistance management using multiple pesticides. *Agric Ecosyst Environ* 3: 129-148.
- Consoli R, Lourenço-de-Oliveira R 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. 225p.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 807-813.
- Cuamba N, Morgan JC, Irving H, Steven A, Wondji CS 2010. High level of pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population of the chokwe district in mozambique. *PLoS One* 5: e11010.
- Curtis CF 1985. Theoretical models of the use of insecticide mixtures for themanagement of resistance. *Bull Entomol Res* 75: 259-265.
- Da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 441-444.
- Dame DA, Wichterman GJ, Horby JA 1998. Mosquito (*Aedes taeniorhynchus*) resistance to methoprene in an isolated habitat. *J Am Mosq Control Assoc* 14: 200-203.

- David JP, Boyer S, Mesneau A, Ball A, Ranson H, C. Dauphin-Villemant C 2006. Involvement of cytochrome P450 monooxygenases in the response of mosquito larvae to dietary plant xenobiotics. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 410-420.
- Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I 2005. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem Rev* 105: 2253-2277.
- Denholm I, Rowland MW 1992. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annu Rev Entomol* 37: 91-112.
- Divakar BJ, Rao BK 1975. Induced changes in oviposition by juvenile hormone analogue in the mosquito, *Anopheles stephensi*. *Curr Sci* 44: 555-556.
- Eck WHV 1979 Mode of action of two benzoylphenyl ureas as inhibitors of chitin synthesis in insects. *Insect Biochem* 9: 295-300.
- Enayati A, Ranson H, Hemingway J 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol* 14: 3-8.
- Endy TP, Weaver SC, Hanley KA 2010. Dengue Virus: past, present and future, in: *Frontiers in Dengue Virus Research*. Caister Academic Press Texas, USA.
- Feyereisen R 1999. Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol* 44: 507-533.
- French-Constant RH 2006. Which came first: insecticides or resistance? *Trends Gen* 23: 1-4.
- French-Constant RH, Daborn PJ, Le Goff G 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet* 20: 163-170.
- French-Constant RH, Rocheleau TA, Steichen JC, Chalmers AE 1993. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363: 449-451.
- Floore TG 2006. Mosquito Larval Control Practices: Past and Present. *J Am Mosq Control Assoc* 22: 527-533.
- Fonseca-González I, Quinones ML, Lenhart A, Brogdon WG 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Manag Sci* 67: 430-437.
- Fontoura NG, Bellinato DF, Valle D, Lima JBP 2012. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 387-395.

- Friedman R 2011. Genomic organization of the glutathione S-transferase family in insects. *Mol Phylogenet Evol* 61: 924-932.
- Frova C 2006. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomol Eng* 23: 149-169.
- Fukuto R 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect* 87: 245-254.
- Gahan LJ, Pauchet Y, Vogel H, Heckel DG 2010. An ABC transporter mutation is correlated with Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin. *PLoS Genet* 6: e1001248.
- García PG, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, Bond JG, Casas-Martínez M, Ramsey JM, García-Rejón J, Domínguez-Galera M, Ranson H, Hemingway J, Eisen L, William C. Black WC 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e53.
- Gardner CL, Ryman KD 2010. Yellow Fever: A reemerging threat. *Clin Lab Med* 30: 237-260.
- Ghosh SK, Tiwari SN, Sathyanarayan TS, Sampath TRR, Sharma VP, Nanda N, Joshi H, Adak T, Subbarao SK 2005. Larvivorous fish in wells target the malaria vector sibling species of the *Anopheles culicifacies* complex in villages in Karnataka, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 101-105.
- Gómez A, Seccacini E, Zerba E, Licastro S 2011. Comparison of the insecticide susceptibilities of laboratory strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 993-996.
- Gosh SK, Dash AP 2007. Larvivorous fish against malaria vectors: a new outlook. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 1063-1064.
- Gottesman MM, Ambudkar SV 2001. Overview: ABC transporters and human disease. *J Bioenerg Biomemb* 33: 453-458.
- Graf JF 1993. The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasitol Today* 9: 471-474.
- Gubler DJ, Clark GG 1996. Community involvement in the control of *Aedes aegypti*. *Acta Tropica* 61: 169-179.
- Guimarães RM, Asmus CIRF, Meyer F 2007. DDT reintroduction for malaria control: the cost-benefit debate for public health. *Cad Saúde Pública* 23: 2835-2844.

- Guzman M, Couri G 2003. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 27: 1-13.
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* S7-S16.
- Hajjar NP, Casida JE 1978. Insecticidal benzoylphenyl ureas: structure-activity relationships as chitin synthesis inhibitors. *Science* 200: 1499-1500.
- Halstead SB 2007. Dengue. *Lancet* 370: 1644-1652.
- Hardstone MC, Huang X, Harrington LC, Scott JG 2010. Differences in development, glycogen, and lipid content associated with cytochrome P450-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 47: 188-198.
- Henchal EA, Putnak JR 1990. The Dengue Viruses. *Clin Microbiol Rev* 3: 376-396.
- Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu Rev Entomol* 54: 285-302.
- Hemingway J 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Molec Biol* 30: 1009-1015.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Molec Biol* 34: 653-665.
- Hemingway J, Karunaratne HPP 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12: 1-12.
- Hemingway J, Ranson H 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann Rev Entomol* 45: 371-391.
- Henrick CA 2007. Methoprene. *J Am Mosq Control Assoc* 23(sp2): 225-239.
- Hofte H, Whiteley HR 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53: 242-255.
- Hoodle MS 2004. Restoring balance: using exotic species to control invasive exotic species. *Conserv Biol* 18: 38-49.

- Hoy MA 1998. Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. *Phil Trans R Soc Lond* 353: 1787-1795.
- IRAC-BR 2012. Comitê Brasileiro de Ação à Resistência a Inseticida. [capturado em janeiro de 2012]. Disponível em: <http://www.illac-br.org.br>.
- Ishida Y, Leal WS 2005. Rapid inactivation of a moth pheromone. *PNAS* 27: 14075-14079.
- Jansen CC, Beebe NW 2010. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect* 12: 272-279.
- Jupp PG, McIntosh BM 1990. *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. *J Am Mosq Control Assoc* 6: 415-420.
- Jupp PG, McIntosh BM, Dos Santos I, DeMoor P 1981. Laboratory vector studies on six mosquito and one tick species with chikungunya virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 15-19.
- Kamita SG, Samra AI, Liu J, Cornel AJ, Bruce D, Hammock BD 2011. Juvenile Hormone (JH) Esterase of the mosquito *Culex quinquefasciatus* is not a target of the JH analog insecticide methoprene. *PLoS One* 6: e28392.
- Kapin M, Ahmad S 1980. Esterases in larval tissues of gypsy moth *Lymantria dispar* (L.): Optimum assay conditions, quantification and characterization. *Insect Biochem* 10: 331-337.
- Kasai S, Shono T, Komagata O, Tsuda Y, Kobayashi M, Motoki M 2007. Insecticide resistance in potential vector mosquitoes for West Nile virus in Japan. *J Med Entomol* 44: 822-829.
- Ketterman AJ, Jayawardena KGI, Hemingway J 1992. Purification and characterization of a carboxylesterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem J* 287: 355-360.
- Koella JC, Lynch PA, Thomas MB, Read AF 2009. Towards evolution-proof malaria control with insecticides. *Evol App* 2: 469-480.
- Kostaropoulos I, Papadopoulos AI, Metaxakis A, Boukouvala E, Papadopoulou-Morurkidou E 2001. Glutathione S-transferase in the defense against pyrethroids in insects. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 313-319.
- Kotze AC, Sales N, Barchia IM 1997. Diflubenzuron tolerance associated with monooxygenase activity in field strain larvae of the Australian sheep blowfly (Diptera: Calliphoridae). *J Econ Entomol* 90: 15-20.

- Kumar S, Pillai MKK 2011. Correlation between the reproductive potential and the pyrethroid resistance in an Indian strain of filarial vector, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res* 101: 25-31.
- Kumar S, Thomas A, Samuel T, Sahgal A, Verma A, Pillai MKK 2009. Diminished reproductive fitness associated with the deltamethrin resistance in an Indian strain of dengue vector mosquito, *Aedes aegypti* L. *Trop Biomed* 26: 155-164.
- Lacey LA 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* 23(sp2): 133-163.
- Lanning CL, Ayadb HM, Abou-Donia MB 1996. P-Glycoprotein involvement in cuticular penetration of [14C] thiodicarb in resistant tobacco budworms. *Toxicol Lett* 85: 127-133.
- Lehane MJ 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol* 42: 525-550.
- Li X, Ma L, Sun L, Zhu C 2002. Biotic characteristics in the deltamethrin-susceptible and resistant strains of *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae) in China. *Appl Entomol Zool* 37: 305-308.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR 2007. Molecular mechanisms of metabolic Resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52: 231-253.
- Lima JBP, da-Cunha MP, Silva-Jr RC, Galardo AKR, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D 2003. *Aedes aegypti* resistance to organophosphates in several localities in Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68: 329-333.
- Lima JBP, Melo NV and Valle D 2005. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop SP* 47: 125-130.
- Lima JWO, Cavalcanti LPG, Pontes RJS, Heukelbach J 2010. Survival of Betta splendens fish (Regan, 1910) in domestic water containers and its effectiveness in controlling *Aedes aegypti* larvae (Linnaeus, 1762) in Northeast Brazil. *Trop Med Int Health* 15: 1525-1532.

- Lima-Camara TN, Bruno RV, Luz PM, Castro MG, Lourenco-de-Oliveira R, Sorgine MHF, Peixoto AA 2011. Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PLoS One* 6: e17690.
- Liu Z, Li X, Prasifka JR, Jurenka R, Bryony C, Bonning BC 2008. Overexpression of *Drosophila* juvenile hormone esterase binding protein results in anti-JH effects and reduced pheromone abundance. *Gen Comp Endocrinol* 156: 164-172.
- Locher KP 2009. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Phil Trans R. Soc B* 364: 239-245.
- Lumjuan N, Stevenson BJ, Prapanthadara L, Somboon P, Brophy PM, Loftus BJ, Severson DW, Hilary Ranson H 2007. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 1026-1035.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 10(12 Suppl): S98-109.
- Macoris M, Andrighetti MT, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VC 1999. Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the State of São Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica* 33: 521-522.
- Macoris MLG, Andrighetti MTM, Otrera VCG, Carvalho LR, Caldas Júnior AL, Brogdon WG 2007. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 895-900.
- Mairuhu ATA, Wagenaar J, Brandjes DPM, van Gorp ECM 2004. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 425-433.
- Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, Brengues C, André Yébakima A, Ranson H, Corbel V, David JP 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics* 10: 494.
- Martins AJ, Belinato TA, Lima JBP, Valle D 2008. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Pest Manag Sci* 68: 676-680.

- Martins AJ, Lima JBP, Peixoto AA, Valle D 2009. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Trop Med Int Health* 14: 1351-1355.
- Martins AJ, Ribeiro CDM, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D Lima JBP 2012. Effect of insecticide resistance on development longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PloS One* 7: e31889.
- Martins AJ, Valle D 2012. The pyrethroid knockdown resistance. In: Larramendy M, Soloneski S, editors. *Insecticides / Book 2*. La Plata.
- Matsumura F 2010. Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. *Pestic Biochem Physiol* 97: 133-139.
- Mayer R T, Meola S, DeLoach J R 1981. Chitin synthesis inhibiting insect growth regulators do not inhibit chitin synthetase. *EXS* 37: 337-338.
- McElwee JJ, Schuster E, Blanc E, Piper MD, Thomas JH, Patel DS, Selman C, Withers DJ, Thornton JM, Partridge L, Gems D 2007. Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genome Biol* 8: R132.
- McKenzie JA, Batterham P 1994. The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. *Tree* 9: 166-169.
- McLaughlin LA, David JP, Vontas J, Niazi U, Bibby J, Sutcliffe MJ, Hemingway J, Ranson H, Paine MJ 2008. Characterization of *Anopheles gambiae* CYP6Z2: role in xenobiotic metabolism and insecticide resistance. *Insect Mol Biol* 17: 125-135.
- Merzendorfer 2011. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. *Eur J Cell Biol* 90: 759-769.
- Merzendorfer H, Zimoch L 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol* 206: 4393-4412.
- Meyer UA 1996. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* 24: 449-459.

- Mian LS, Mulla MS 1982. Biological and environmental dynamics of insect growth regulators (IGRs) as used against Diptera of public health importance. *Res Rev* 84: 27-112.
- Ministério da Saúde 2009. Uso do larvicida diflubenzuron (PM25%) para controle de *Aedes aegypti*. Nota técnica N° 15/2009 CGPNDC/DIGES/SVS/MS.
- Misra JR, Horner MA, Lam G, Thummel CS 2011. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. *Genes Dev* 25: 1796-1806.
- Miura T, Schaefer CH, Takahashi RM, Mulligan FS 1976. Effects of the Insect Growth inhibitor, Dimilin, on hatching of mosquito eggs. *J Econ Entomol* 69: 655-658.
- Montella I, Schama R, Valle D 2012. Classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 437-449.
- Montella IR, Martins-Jr AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle D 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467-477.
- Müller P, Warr E, Stevenson BJ, Pignatelli PM, Morgan JC, Steven A, Yawson AE2, Mitchell SN, Ranson H, Hemingway J, Paine MJI, Donnelly MJ 2008. Field-Caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genet* 4: e1000286.
- Mulla MS, Darwazeh HA, Ede L, Kennedy B 1985. Laboratory and field evaluation of the IGR fenoxycarb against mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 1: 442-448.
- Mulla MS, Thavara U, Tawatsin A, Chomposri J, Zaim M, Su T 2003. Laboratory and field evaluation of novaluron, a new acylurea insect growth regulator, against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Vec Ecol* 28: 241-254.
- Nasonkin I, Alikasifoglu A, Ambrosei C, Cahilli P, Cheng M, Sarniaki A, Egani M, and Pamela M. Thomas PM 1999. A novel sulfonylurea receptor family member expressed in the embryonic *Drosophila* dorsal vessel and tracheal system. *J Biol Chem* 274: 29420-29425.
- Nelson MJ 1986. *Aedes aegypti*: biologia y ecologia. Organización Panamericana de la Salud, Washington, DC.

- Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM 2001. *Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu Biblioteca Biomedica.
- Nielsen-Leroux C, Pasteur N, Prêtre J, Charles J-F, Ben Sheik H, Chevillon C 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of West Mediterranean countries. *J Med Entomol* 39: 729-735.
- Nogueira RMR, Araújo JMG, Schatzmayr HG 2007. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica* 22: 358-363.
- Noriega FG 2004. Nutritional regulation of JH synthesis: a mechanism to control reproductive maturation in mosquitoes? *Insect Biochem Mol Biol* 34: 687-693.
- Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J, Brogdon W 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Trop* 118: 37-44.
- Paeporn P, Supaphathom K, Srisawat R, Komalamisra N, Deesin V, Yamphan P, Leeming SS 2004. Biochemical detection of pyrethroid resistance mechanism in *Aedes aegypti* in Ratchaburi province, Thailand. *Trop Biomed* 21: 145-151.
- Pan American Health Organization (PAHO) 1994. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Scientific Publication N° 548. 104 pp.
- Paris M, David J, Despres L 2011. Fitness costs of resistance to Bti toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicol* 20: 1184-1194.
- Parthasarathy R, Tan A, Sun Z, Chen Z, Rankin M, Palli SR 2009. Juvenile hormone regulation of male accessory gland activity in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mech Dev* 126: 563-579.
- Patel NH, Rothenberg ML 1994. Multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Invest New Drugs* 12: 1-13.
- Paton MG, Karunaratne SHPP, Giakoumaki E, Roberts N, Hemingway J 2000. Quantitative analysis of gene amplification in insecticide-resistant *Culex* mosquitoes. *Biochem J* 346: 17-24.
- Pérez D, Lefèvre P, L. Sánchez L, Sánchez LM, Boelaert M, Kourí G, Van der Stuyft P 2007. Community participation in *Aedes aegypti* control: a

- sociological perspective on five years of research in the health area “26 de Julio”, Havana, Cuba. *Trop Med Int Health* 12: 664-672.
- Perry T, Batterham P, Daborn PJ 2011. The biology of insecticidal activity and resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 41: 411-422.
- Pethuan S, Jirakanjanakit N, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Kaewpa D, Rongnoparut P 2007. Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Trop Biomed* 24: 7-15.
- Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis* 7: 319-327.
- Plapp FW 1976. Biochemical genetics of insecticide resistance. *Annu Rev Entomol* 21: 179-197.
- Polson KA, Rawlins SC, Brogdon WG, Chadee DD 2011. Characterisation of DDT and pyrethroid resistance in Trinidad and Tobago populations of *Aedes aegypti*. *Bull Entomol Res* 101: 435-444.
- Ponlawat A, Harrington LC 2005. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *J Med Entomol* 42: 844-849.
- Porreta DM, Bellini GR, Medici A, Punelli F, Urbanelli S 2008. Defence mechanisms against insecticides temephos and diflubenzuron in the mosquito *Aedes caspius*: the P-glycoprotein efflux pumps. *Med Vet Entomol* 22: 48-54.
- Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 540-555.
- Price NR 1991. Insect resistance to insecticides: Mechanisms and diagnosis. *Comp Biochem Physiol* 100c: 319-326.
- Ranson H, N’Guessan R, Lines J, Moiroux N, Nkuni Z, Corbel V 2011. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol* 27: 91-98.
- Rao DR, Mani TR, Rajendran R, Joseph AS, Gajanana A, Reuben R 1995. Development of high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. *J Am Mosq Control Assoc* 11: 1-5.

- Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, Crickmore N 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology* 18: 189-194.
- Read AF, Lynch PA, Thomas MB 2009. How to make evolution-proof insecticides for malaria control. *PLoS Biol* 7: e1000058.
- Retnakaran A, Granett J, Ennis T 1985. Insect Growth regulators. In: Comprehensive insect biochemistry, physiology and pharmacology, Vol 12. Ed By Kerkut, GA, Gilbert, LI Oxford, Pergamon Press.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370: 1840-1846.
- Riaz MA, Poupardin R, Reynauda S, Strode C, Ranson H, David JP 2009. Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquat Toxicol* 93: 61-69.
- Richmond RC, Gilbert DG, Sheehan KB 1979. Esterase 6 and reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Science* 207: 1483-1485.
- Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 352: 971-977.
- Ritchie SA, Asnicar M, Kay BH 1997. Acute and sublethal effects of (S)-Methoprene on some Australian mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 13: 153-155.
- Rivero A, Vézilier J, Weill M, Read AF, Gandon S 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog* 6(8): e1001000.
- Robinson MC 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 49: 28-32.
- Rodriguez MM, Bisset J, Ruiz M, Soca A 2002. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J Med Entomol* 39: 882-888.

- Roush RT, McKenzie JA 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu Rev Entomol* 32: 361-380.
- Rozendaal JA 1997. Vector control: methods for use by individuals and communities. World Health Organization, Geneva.
- Sáenz-de-Cabezón FJ, Pérez-moreno I, Zalom FG, Marco V 2006. Effects of lufenorun on *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) egg, larval, and adult stages. *J Econ Entomol* 99: 427-431.
- Sanders HR, Evans AM, Ross LS, Gill SS 2003. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 1105-1122.
- Sawby R, Klowden MJ, Sjogren D 1992. Sublethal effects of larval methoprene exposure on adult mosquito longevity. *J Am Mosq Control Assoc* 8: 290-292.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol mol Biol Rev* 62: 775-806.
- Schuler MA 2011. P450s in plant-insect interactions. *Biochim Biophys Acta* 1814: 36-45.
- Scott J 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 757-777.
- Service M 2008. Medical entomology for medical students. Cambridge University Press. Edinburgh, 275pp.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360: 1-16.
- Siddal JB 1976. Insect growth regulators and insect control: A critical appraisal. *Env Health Pers* 14: 119-126.
- Silva AX, Jander G, Samaniego H, Ramsey JS, Figueroa CC 2012. Insecticide resistance mechanisms in the green peach *Aphid myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: a transcriptomic survey. *PLoS One* 7: e36366.
- Simon F, Savini H, Parola P 2008. Chikungunya: A paradigm of emergence and globalization of vector-borne diseases. *Med Clin N Am* 92: 1323-1343.

- Sithiprasasna R, Luepromchai E, Linthicum KJ 1996. Effects of sublethal dosages of methoprene on *Anopheles dirus* species A and B. *J Am Mosq Control Assoc* 12: 483-486.
- Soreq H, Seidman 2001. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2: 294-302.
- Srinivas R, Udikeri SS, Jayalakshmi SK, Sreeramulu K 2004. Identification of factors responsible for insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* *Comp Biochem Physiol* 137: 261-269.
- Staal GB 1975. Insect growth regulators with juvenile hormone activity. *Ann Rev Entomol* 20: 417-460.
- Stevenson BJ, Bibby J, Pignatelli P, Muangnoicharoen S, O'Neill PM, Lian LY, Müller P, Nikou D, Steven A, Hemingway J, Sutcliffe MJ, Paine MJI 2011. Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: Sequential metabolism of deltamethrin revealed. *Insect Biochem Mol Biol* 41: 492-502.
- Suman DS, Parashar BD, Prakash S 2010. Effect of sublethal dose of diflubenzuron and azadirachtin on various life table attributes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 47: 996-1002.
- Testa B, Pedretti A, Vistoli G 2012. Foundation review: reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Drug Discov Today* 28.
- Thomas SJ, Andy TP 2011. Critical issues in dengue vaccine development. *Curr Opin Infect Dis* 24: 442-450.
- van den Berg H, Zaim M, Yadav RS, Soares A, Ameneshewa B, Mnzava A, Hii J, Dash AP, Ejov M 2012. Global trends in the use of insecticides for vector-borne disease control. *Environ Health Perspect* 120: 577-582.
- Vasquez MI, Violaris M, Hadjivassilis A, Wirth MC 2009. Susceptibility of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) field populations in Cyprus to conventional organic insecticides, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and methoprene. *J Med Entomol* 46: 881-887.
- Vasuki V 1992. Adult longevity of certain mosquito species after larval and pupal exposure to sublethal concentration of an insect growth regulator hexaflumuron. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 23: 121-124.

- Vasuki V 1999. Influence of IGR treatment on oviposition of three species of vector mosquitoes at sublethal concentrations. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 30: 200-203.
- Vasuki V, Rajavel R 1992. Influence of short time exposure to an insect growth regulator, hexaflumuron, on mortality and adult emergence of vector mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 275-283.
- Villegas-Trejo A, Che-Mendoza A, González-Fernández M, Guillermo-May G, González-Bejarano H, Dzul-Manzanilla F, Ulloa-García A, Danis-Lozano R, Manrique-Saide P. 2011. Control enfocado de *Aedes aegypti* en localidades de alto riesgo de transmisión de dengue en Morelos, México. *Salud Publica Mex* 53: 141-151.
- Vontas JG, Small GJ, Hemingway 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J* 357: 65-72.
- Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M, Lewis T, Devonshire AL, Williamson MS 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J* 359: 175-181.
- Walton WE 2007. Larvivorous fish including *Gambusia*. *J Am Mosq Control Assoc* 23(sp2): 184-220.
- Ware GW, Whitacre DM 2004. The Pesticide Book, 6th Ed. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio.
- Weaver SC, Reisen WK 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 85: 328.
- Wei SH, Clark AG, Syvanen M 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 1145-1153.
- Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc R Soc Lond B* 269: 2007-2016.

- Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M 2003. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423: 136-137.
- Werk-Reichhart D, Feyereisen R 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 1:3003.1–3003.9.
- Wheelock CE, Shan G, Ottea J, 2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *J Pestic Sci* 30: 75-83.
- Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA, Devonshire AL 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet* 252: 51-60.
- Wilson TG, Cryan JR 1997. Lufenuron, a chitin-synthesis inhibitor, interrupts development of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Zool* 278: 37-44.
- Wirth MC, Georghiou GP, Malik JI, Abro GH. 2000. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from California, USA. *J Med Entomol* 37: 534–540.
- World Health Organization 1998. Yellow Fever. WHO/EPI/GEN/98.11 Geneva: WHO Press.
- World Health Organization 2007. Monitoring of insecticide resistance in malaria vectors. World Health Organization, Eastern Mediterranean Region, Cairo-Egypt.
- World Health Organization 2009. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO Press.
- Xu C, Li CYT, Kong ANT 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics *Arch Pharm Res* 28: 249-268.
- Yiallourous M, Storch V, Becker N 1999. Impact of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on larvae of *Chironomus thummi thummi* and *Psectrocladius psilopterus* (Diptera: Chironomidae). *J Invertebr Pathol* 74: 39-47.
- Yuan Z, Zhang Y, Cai Q, Liu EY 2000. High-level field resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Culex quinquefasciatus* from Southern China. *Biocontrol Sci Technol* 10: 41-49.
- Zimoch L, Hogenkamp DG, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Merzendorfer H 2005. Regulation of chitin synthesis in the larval midgut of *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 515-527.