

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ/MG

Pós-graduação em Ciências da Saúde

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

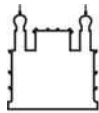
**Monitoramento da suscetibilidade ao piretróide Deltametrina
em populações de *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera:
Reduviidae).**

por

Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa

Belo Horizonte

Fevereiro / 2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ/MG

Pós-graduação em Ciências da Saúde

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Monitoramento da suscetibilidade ao piretróide Deltametrina em populações de *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae).

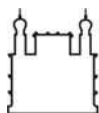
por

Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Pesquisa René Rachou como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Belo Horizonte

Fevereiro / 2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Centro de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ/MG

Pós-graduação em Ciências da Saúde

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Monitoramento da suscetibilidade ao piretróide Deltametrina em populações de *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae).

por

Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Liléia G. Diotaiuti (Presidente)

Dra Denise Valle

Dr. João Carlos Pinto Dias

Suplente: Dr. Álvaro E. Eiras

Dissertação defendida e aprovada em: 14 / 02 / 2008

A presente dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, sob a orientação da Dra. Liléia G. Diotaiuti.

Colaborações:

Dr. Alfredo Martins de Oliveira Filho - LPPN / UFRJ

Dr. Marcelo Carvalho de Resende - FUNASA

Dra. Denise Valle - Laficave / IOC / FIOCUZ

Msc Ivan V. Sonoda - LATEC / CPqRR / FIOCRUZ

À todos aqueles que investiram esforços na luta contra a doença de Chagas na busca de melhores condições de vida para a população marginalizada.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Liléia Diotaiuti, idealizadora deste projeto, pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

Ao Dr. Alfredo Martins de Oliveira Filho (NPPN/UFRJ), ao Dr. Marcelo Carvalho de Resende (FUNASA), à Dra. Denise Valle (LAFICAVE/IOC/FIOCRUZ) e ao Msc Ivan V. Sonoda (LATEC/CPqRR/FIOCRUZ), colaboradores deste projeto, pelo apoio, troca de conhecimentos, e suporte teórico-prático insubstituível.

Ao Dr. João Carlos Pinto Dias (LATEC/CPqRR/FIOCRUZ) e ao Dr. Marcelo Carvalho de Resende pela valiosa contribuição na qualificação deste trabalho.

Ao Dr. Evandro Marques de Menezes Machado (Lab.D.Chagas/UFOP) por dedicar seu tempo na revisão desta dissertação.

Ao Bernardino Vaz de Melo Azeredo, gerente do PCDCh da Secretaria Estadual da Saúde de Minas Gerais, e a todos os funcionários das Gerências Regionais de Saúde de Montes Claros e Sete Lagoas pela coleta dos triatomíneos.

À toda equipe do “Biotério de Criação e Experimentação Animal” (CPqRR/FIOCRUZ) pela prontidão e grande ajuda na manutenção dos camundongos utilizados neste projeto.

À Ana Carolina Lustosa Lima pelo auxílio nas análises estatísticas; ao Segemar Oliveira Magalhães por todo material bibliográfico obtido e pelos constantes incentivos; ao pessoal da informática e secretarias geral e de pós-graduação do CPqRR/FIOCRUZ que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Luciana Márcia de Oliveira, à Elisângela Monteiro Coser e ao Rômulo Lúcio Vale de Moraes do “Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular” (CPqRR/FIOCRUZ) pelo grande auxílio no sequenciamento do gene mtCytB.

Aos amigos do “Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas” (CPqRR/FIOCRUZ) pelo convívio diário, constantes ajudas e troca de experiências. Em especial, ao Ademilson e ao Fernando, pela imensurável ajuda com minhas colônias de triatomíneos, e à Letícia e ao Ivan pela troca de experiências e companhia durante a realização dos bioensaios na Sala de Inseticida.

Aos amigos do “Laboratório de Entomologia Médica” e da turma de Mestrado/2006 do CPqRR/FIOCRUZ pela amizade, troca de experiências e momentos de descontração.

Aos meus familiares e amigos, em especial aos meus pais, DÁvila e Fátima, à minha irmã, Flávia, à minha avó, Albanita pelas constantes orações e apoio incondicional, principalmente nos momentos em que me foi exigido estar ausente.

À FAPEMIG, CNPq, BAYER e CPqRR pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT	xx
INTRODUÇÃO	23
1.1 ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DE CHAGAS	24
1.2 CONTROLE VETORIAL DA DOENÇA DE CHAGAS NO BRASIL	24
1.3 USO DE INSETICIDAS NO CONTROLE VETORIAL DA DOENÇA DE CHAGAS NO BRASIL	26
1.4 RESISTÊNCIA DE TRIATOMÍNEOS A INSETICIDAS	29
1.5 VARIABILIDADE GENÉTICA DE TRIATOMÍNEOS	32
1.6 JUSTIFICATIVA	33
OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 INSETICIDA AVALIADO	39
3.2 TRIAATOMÍNEOS	39
3.2.1 <i>Espécie estudada</i>	39
3.2.2 <i>Coleta e Procedência dos triatomíneos</i>	40
3.2.3 <i>Manutenção dos triatomíneos</i>	41
3.2.4 <i>Codificação das populações estudadas</i>	42
3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS	43
3.3.1 <i>Determinação do local ideal de aplicação do inseticida nos triatomíneos em ensaios biológicos de monitoramento da resistência em laboratório</i>	43
3.3.2 <i>Determinação da geração ideal dos triatomíneos em ensaios biológicos de monitoramento de resistência a inseticidas em laboratório</i>	44
3.3.3 <i>Determinação da idade ideal dos triatomíneos em ensaios biológicos de monitoramento de resistência a inseticidas em laboratório</i>	44
3.3.4 <i>Determinação da linha base de suscetibilidade da linhagem referência de <i>Triatoma sordida</i> a Deltametrina</i>	44
3.3.5 <i>Determinação da dose diagnóstica (DD) ideal em ensaios biológicos de monitoramento de resistência de triatomíneos a inseticidas em laboratório</i>	45

3.3.6	<i>Caracterização do perfil de suscetibilidade das populações de campo de Triatoma sordida estudadas</i>	46
3.3.7	<i>Definição da taxa de recuperação do efeito knockdown das populações de Triatoma sordida estudadas</i>	46
3.4	ENSAIOS MOLECULARES: DEFINIÇÃO DOS PADRÕES GENÉTICOS DAS POPULAÇÕES DE TRIATOMA SORDIDA ESTUDADAS	47
3.4.1	<i>Extração de DNA</i>	47
3.4.2	<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Purificação do DNA</i>	47
3.4.3	<i>PCR de Sequenciamento</i>	48
3.4.4	<i>Genética de populações</i>	48
RESULTADOS	50
4.1	NÚMERO DE TRIATOMÍNEOS AMOSTRADOS NAS LOCALIDADES ESTUDADAS	51
4.2	DETERMINAÇÃO DO LOCAL IDEAL DE APLICAÇÃO DO INSETICIDA NOS TRIATOMÍNEOS EM ENSAIOS BIOLÓGICOS DE MONITORAMENTO DE RESISTÊNCIA EM LABORATÓRIO	52
4.3	DETERMINAÇÃO DA GERAÇÃO IDEAL DOS TRIATOMÍNEOS EM ENSAIOS BIOLÓGICOS DE MONITORAMENTO DE RESISTÊNCIA A INSETICIDAS EM LABORATÓRIO	53
4.4	DETERMINAÇÃO DA IDADE IDEAL DOS TRIATOMÍNEOS EM ENSAIOS BIOLÓGICOS DE MONITORAMENTO DE RESISTÊNCIA A INSETICIDAS EM LABORATÓRIO	54
4.5	DETERMINAÇÃO DA LINHA BASE DE SUSCETIBILIDADE DA LINHAGEM REFERÊNCIA DE TRIATOMA SORDIDA À DELTAMETRINA E CARACTERIZAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DAS POPULAÇÕES DE CAMPO ESTUDADAS	56
4.6	DETERMINAÇÃO DA DOSE DIAGNÓSTICA (DD) IDEAL EM ENSAIOS BIOLÓGICOS DE MONITORAMENTO DE RESISTÊNCIA DE TRIATOMÍNEOS A INSETICIDAS EM LABORATÓRIO	58
4.7	DEFINIÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO DO EFEITO KNOCKDOWN DAS POPULAÇÕES DE T. SORDIDA ESTUDADAS	60
4.8	VARIABILIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE T. SORDIDA ESTUDADAS	62
DISCUSSÃO	70
CONCLUSÕES	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AMOVA	Análise de Variância Molecular
°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
CPqRR	Centro de Pesquisa René Rachou
DD	Dose diagnóstica
DL	Dose letal
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfatos
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GRS	Gerência Regional de Saúde
g/m ²	Gramas por metro quadrado
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
LATEC	Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas
M	Molar
mg	Miligramas
min	Minuto
µl	Microlitro
mm	Milímetros
mtCytB	Gene mitocondrial do citocromo b
ng i.a./ ninfa	Nanogramas de ingrediente ativo por ninfa tratada
OPS	Organização Panamericana de Saúde
Pb	Pares de base
PCDCh	Programa Nacional do Controle da Doença de Chagas

PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmoles	Picomoles
pop	População
rpm	Rotações por minuto
RR	Razão de resistência
seg.	Segundo
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Macho (a) e fêmea(b) de <i>Triatoma sordida</i> Stal 1859.	40
Figura 2. Mapa político do Estado de Minas Gerais. Destacados os diferentes municípios de captura de <i>T. sordida</i> estudadas neste projeto.	40
Figura 3. DL50 e DL95 X <i>Slope</i> obtidos em ensaios biológicos, da população de <i>T. sordida</i> “TSCMBC”. Aplicação tópica de 0,2 µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso (d) ou no ventre (v) do abdômen de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg).Notação de mortalidade com 72 horas.	53
Figura 4. DL50 e DL95 X <i>Slope</i> obtidos em ensaios biológicos, da população de <i>T. sordida</i> “TSCMPJM”. Aplicação tópica de 0,2 µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso do abdômen de ninfas I das gerações F1 e F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 72 horas.	54
Figura 5. DL50, DL95 X <i>Slope</i> obtidos em ensaios biológicos, da população de <i>T. sordida</i> “TSCMMC”. Aplicação tópica de 0,2 µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso do abdômen de ninfas I da geração F2 (jejum - peso 1,2±0,2 mg) com um, três e cinco dias de idade. Notação de mortalidade com 72 horas.	55
Figura 6. RR50, RR95 X <i>Slope</i> das populações de <i>T. sordida</i> de Minas Gerais estudadas x <i>Slope</i> . Aplicação tópica de 0,2µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 72 horas.....	57
Figura 7. RR50 das populações de <i>T. sordida</i> estudadas de acordo com as localidades amostradas. Aplicação tópica de 0,2 µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso do abdômen de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 72 horas.	58
Figura 8. Percentual de recuperação do efeito <i>knockdown</i> nas populações de <i>T. sordida</i> estudadas X RR50. Aplicação tópica de 0,2µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso do abdômen de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 24 e 72 horas.	62

- Figura 9.** Populações geneticamente diferenciadas por meio do FST pareado para todas as localidades de coleta amostradas. AMOVA.....65
- Figura 10.** Dendrograma neighbor-joining construído a partir das distâncias genéticas pareadas observadas entre as populações de *Triatoma sordida* de Minas Gerais estudadas. *Panstrongylus megistus* foi utilizado como grupo externo, e *Triatoma infestans* como grupo irmão. A escala representa a distância genética68
- Figura 11.** Network dos haplótipos do gene mtCytB observados entre as populações de *Triatoma sordida* de Minas Gerais estudadas. Elipses brancas representam os haplótipos observados na pop. 1; vermelhas, os observados na pop. 2; azuis, os observados na pop. 3; verdes, os observados na pop. 4; e rosas, os observados na pop. 5. A área amarela representa a população 6 com apenas um haplótipo.69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Codificação das diferentes populações de <i>T. sordida</i> de Minas Gerais estudadas.....	43
Tabela 2. Populações de <i>T. sordida</i> de Minas Gerais estudadas, ecótopos de captura: Peridomicílio (P) e Intradomicílio (I), número de triatomíneos coletados de acordo com o estágio evolutivo. Capturas realizadas no segundo semestre de 2006 pela GRS de Sete Lagoas e de Montes Claros.....	51
Tabela 3. DL50, DL95 e <i>Slope</i> da população de <i>T. sordida</i> “TSCMBC”. Aplicação tópica de 0,2 µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso (d) ou no ventre (v) do abdômen de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 72 horas.....	52
Tabela 5. DL50, DL95 e <i>Slope</i> da população de <i>T. sordida</i> “TSCMMC”. Aplicação tópica de 0,2 µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso do abdômen de ninfas I da F2 (jejum - peso 1,2±0,2 mg) com um (1), três (3) e cinco (5) dias de idade. Notação de mortalidade com 72 horas.	55
Tabela 6. DL50, DL95, RR50, RR95 e <i>Slope</i> da linhagem referência de suscetibilidade e das populações de campo de <i>T. sordida</i> estudadas. Aplicação tópica de 0,2µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 72 horas.....	56
Tabela 7. Percentual de sobrevivência das populações de campo de <i>T. sordida</i> estudadas em resposta às doses diagnósticas (DD) 1xDL99 e 2xDL99 da linhagem referência de suscetibilidade. Aplicação tópica de 0,2µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 72 horas.	59
Tabela 8. Percentual de recuperação do efeito <i>knockdown</i> nas populações de <i>T. sordida</i> estudadas. Aplicação tópica de 0,2µl de solução de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso do abdômen de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 24 horas e 72 horas.	61

Tabela 9. Diferenciação genética das populações de <i>T. sordida</i> estudadas. A AMOVA foi realizada considerando três hierarquias: um único grupo (todas as amostras estudadas); três grupos: Uberaba, região Central Mineira e Norte do Estado; e seis grupos: (1) TSNMAB, TSNMAT, TSNBF, TSNBFI, TSNBC, TSNCJJC, TSNCJJT, TSCMBC, TSCMMT e TSCMPJM; (2) TSNCJJ; (3) TSNCJD; (4) TSNCJB; (5) TSCMMC e (6) TSUBREF.....	63
Tabela 10. FST pareado para todas as localidades de coleta de <i>T. sordida</i> estudadas.....	64
Tabela 11. Variabilidade genética das populações de <i>T. sordida</i> estudadas.	66
Tabela 12. Testes de neutralidade aplicados às populações de <i>T. sordida</i> estudadas: Teste D de Tajima, Teste D* e Teste F* de Fu & Li.....	67
Tabela 13. Distribuição e frequência dos haplótipos do gene mtCytB encontrados nas populações de <i>Triatoma sordida</i> estudadas.	67

RESUMO

A resistência de triatomíneos a inseticidas já foi relatada na Venezuela, Argentina e Bolívia, sendo possível a existência de outros focos em regiões ainda mais amplas. Deste modo, torna-se necessário desenvolver estudos que investiguem a dispersão geográfica desses vetores resistentes, bem como os mecanismos envolvidos, com vistas a elaborar estratégias adequadas às necessidades locais, ou até mesmo que impeçam o aparecimento deste fenômeno. O objetivo deste estudo foi padronizar ensaios biológicos para monitoramento de resistência de triatomíneos a inseticidas em laboratório e caracterizar a suscetibilidade de quatorze populações de *Triatoma sordida* Stal, 1859 de Minas Gerais (Sudeste do Brasil) ao piretróide Deltametrina. A área em que os triatomíneos foram coletados foi submetida ao controle químico por cerca de 30 anos. A linhagem referência de suscetibilidade é oriunda de Uberaba. A metodologia foi orientada pelas recomendações da WHO (1994) e OPS (2005), tendo sido redefinidos alguns detalhes técnicos (dose diagnóstica adequada para triagem de resistência em triatomíneos, local ideal de aplicação do inseticida nas ninfas I, idade e geração dos insetos utilizados). A linha base de suscetibilidade da linhagem referência foi inicialmente determinada. A Deltametrina, solubilizada em acetona, foi aplicada topicamente no dorso do abdômen de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum, \pm 1,2 mg. de peso) com auxílio de uma microseringa. Os resultados dos ensaios dose-resposta foram analisados com auxílio do programa PROBIT (Finney, 1971). Em seguida, as populações de campo foram submetidas a dose diagnóstica de 1XDL99 da linhagem referência de suscetibilidade e 2XDD99 da linhagem referência de suscetibilidade. Todas as populações apresentaram-se menos suscetíveis ao inseticida quando comparadas com a linhagem referência de suscetibilidade. As razões de resistência encontradas variaram de 2,6 a 6,8. A comparação de um fragmento de DNA de 317 pb do gene mitocondrial do citocromo b (mtCytB) foi usada para inferir sobre a variabilidade genética das quatorze populações de *T. sordida* estudadas. Inferências filogenéticas, usando *P. megistus* como grupo externo, não revelaram a formação de clados. Os 150 espécimes analisados apresentaram 50 haplótipos gerando uma diversidade (Hd) de 0,831. Foi possível distinguir seis populações geneticamente diferentes. Análise do *Network* revelou a presença de vários *loops*, demonstrando homoplasia e a ocorrência de mutações reversas/paralelas. Com o marcador genético utilizado não foi possível estabelecer correlação entre a variabilidade genética das populações estudadas e a resistência a Deltametrina. Giordano *et al.* (2005) sugerem que os microssatélites

podem ser uma ferramenta mais sensível e eficiente para este objetivo. A possível natureza bioquímica da resistência encontrada está sendo verificada.

Palavras-chaves: resistência a inseticidas, Deltametrina, mtCytB, variabilidade genética, triatomíneos, *Triatoma sordida*.

ABSTRACT

The resistance of triatomines to insecticide was reported in Venezuela, Argentina and Bolivia, being possible the existence of other focus in still more ample regions. In this way, it becomes necessary to realize studies to investigate the state of resistance of these vectors to insecticides, as well as its mechanisms, in order to develop adequate strategies to the local necessities, or even to prevent the emergence of this phenomenon. The objective of this study was standardized biological assays for monitoring the triatomines resistance to insecticide in laboratory, and to monitor the susceptibility of fourteen populations of *Triatoma sordida* Stal, 1859 of Minas Gerais State (Southeast Brazil) to the pirethroid Deltamethrin. The area where the triatomines were collected was submitted to chemical control for about 30 years. The susceptibility reference strain is the Uberaba. The methodology has been guided by the OPS recommendations (2005) and WHO (1994), being redefined some technical details (ideal diagnostic dose for resistance selection of triatomines, ideal place of application of the insecticide of nymphs I, age and generation of used insects). The baseline of the susceptibility of the reference strain was initially determined. Deltamethrin diluted in acetone was applied topically on the back of the abdomen of nymphs I of the F2 generation (five days of age, fasting, 1.0 ± 0.2 mg. of weight) with the aid of a microsyringe. The results of the dose-response tests were analyzed using the program PROBIT (Finney, 1971). After that, the field populations were submitted to the two diagnostic doses (1XDL99 and 2XDL99 of the susceptibility reference strain). All the populations were less susceptible to the insecticide when compared with the susceptibility reference strain. The resistance rate ranged from 2.6 to 6.8. The comparison of a DNA fragment of 317 pb of the DNA mitochondrial cytochrome b (mtCytB) gene has been used to infer the genetic variability of the fourteen *T. sordida* populations studied. Phylogenetics inferences, with *P. megistus* as external group, had not shown the formation of clades. The 150 specimens analyzed showed 50 haplotypes resulting a diversity (Hd) of 0,831. It was possible to distinguish six different genetic populations. Analysis of the Network revealed several *loops*, demonstrating homoplasia and the occurrence of reverses/parallels mutations. With the genetic marker used it was not possible to establish correlation between the genetic variability of the insects and the resistance to the Deltamethrin. Giordano *et al.* (2005) suggests that the microsatellites would be a more sensible and efficient tool to define this objective. The possible biochemical nature for the resistance ratios encountered is being verified.

keywords: insecticide resistance, Deltamethrin, mtCytB, genetic variability, triatomines, *Triatoma sordida*.

INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas

Endêmica da América Latina, a doença de Chagas (DC) é uma moléstia tropical causada pelo tripanossomatídeo *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909.

Trata-se de uma doença infecciosa parasitária com aproximadamente 10 milhões de pessoas infectadas no mundo e outras 40 milhões, vivendo em áreas de risco (Schofield, 2006). Os países mais afetados localizam-se na região neotropical entre as latitudes 42° norte e 46° sul (Jurberg *et al.*, 2004). No Brasil, a DC acomete cerca de três milhões de pessoas (Dias, 2001).

Segundo Silveira & Resende (1994) a transmissão vetorial é o mecanismo primário de difusão da enfermidade de Chagas, e dele dependem as outras formas de transmissão (transfusional, transplacentária).

Considerando o grande número de reservatórios animais, atrelado a ausência de drogas que possam ser utilizadas em larga escala, verifica-se a impossibilidade do controle na perspectiva do esgotamento das fontes de infecção. A inexistência de imunizantes não permite que se faça o controle pela proteção da população suscetível. Deste modo, resta como alternativa o controle do vetor por meio do emprego regular e sistematizado de inseticidas de ação residual nas habitações infestadas (controle químico) junto à melhoria das mesmas, de modo a tornar a unidade domiciliar refratária à colonização pelos triatomíneos (controle físico) (Villela *et al.*, 2005).

1.2 Controle vetorial da doença de Chagas no Brasil

O marco inicial do controle da doença de Chagas no Brasil foi a criação do “Centro de Estudos” da Fundação Oswaldo Cruz no ano de 1943 em Bambuí, Minas Gerais. Lá foram desenvolvidas as bases para o controle químico dos triatomíneos, com ensaio de um “novo inseticida”, o Gamexane, em localidades infestadas na região do Triângulo Mineiro (Dias & Pellegrino, 1948).

No final dos anos 40 foi utilizado pela primeira vez um inseticida de ação residual no combate a triatomíneos, que correspondeu ao BHC (hexacloro-benzeno) – inseticida organoclorado (*ib. idib.*).

Entre 1950 e 1975 atividades apenas pontuais e descontínuas de controle dos triatomíneos foram cumpridas em decorrência de um aporte insuficiente de recursos para dar atendimento a toda a extensa área com transmissão vetorial. Certamente muitos casos de doença de Chagas foram produzidos nesse período, e que contribuem significativamente para a alta prevalência de chagásicos crônicos que hoje demandam atendimento (Schofield *et al.*, 2006).

Em 1977/78 as ações de controle foram sistematizadas e estruturadas na forma de programa com alcance nacional (*ib. ibid.*).

Entre 1979 e 1985, com a priorização do Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh), foram atualizadas as informações sobre a distribuição dos triatomíneos e a prevalência da infecção humana. Foram promovidos inquéritos entomológicos e sorológicos, por amostragem, em todo o país. Com base nas informações colhidas foram redesenhadas as áreas endêmicas até então conhecidas, identificadas aquelas de maior risco e, a partir daí, priorizadas as ações de controle (*ib. ibid.*).

Em 1983 o PCDCh alcançou a totalidade das áreas com triatomíneos domiciliados e o controle vetorial foi exercido em caráter pleno. A partir de 1986, devido ao surgimento de epidemias de Dengue, observou-se uma redução nas atividades de combate aos triatomíneos, contudo, a borrifação foi mantida em algumas áreas do Brasil. Verificou-se neste momento a eficácia de vários piretróides com comprovada ação triatomicida, sendo a partir de então adotados no PCDCh (Diotaiuti *et al.*, 1994; Dias, 2002).

Paralelamente à eliminação dos focos intradomiciliares, a infestação peridomiciliar assumiu maior importância e se tornou o maior desafio a ser enfrentado no controle vetorial (Silva *et al.*, 1969).

No início da década de 80, no Estado de Minas Gerais, relatórios oficiais indicavam que *Triatoma infestans* Klug, 1834 era responsável por 64,6% dos triatomíneos capturados pelo PCDCh, seguido por *Triatoma sordida* Stal, 1859 e *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835. Em 1989, após nove anos de borrifação, verificou-se uma redução de 68% na quantidade de exemplares de *T. infestans* capturados e um aumento no índice de *T. sordida*, seguido por *P. megistus* (FUNASA, 1995).

Com a iniciativa dos países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) em 1991, áreas infestadas com *T. infestans* foram priorizadas para o controle (Dias *et al.*, 2002; WHO, 2002). Em seguida, a proposta se estendeu aos países Andinos e Centro Americanos, cujos principais vetores a serem controlados eram *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 e *Triatoma dimidiata* Latreille, 1811 (Zerba, 2002).

Os primeiros países a declararem-se livres da transmissão vetorial pelo *T. infestans* foram o Uruguai e o Chile em 1997 e 1999, respectivamente (WHO, 2002). Em 2006 o Brasil foi também certificado (Dias, 2006).

Após o controle do *T. infestans*, *T. sordida* se tornou a espécie de triatomíneo mais capturada no Estado de Minas Gerais, especialmente no peridomicílio, seguido por *P. megistus* e *Rhodnius neglectus* Lent, 1954. Experiências de campo demonstraram que apesar de *T. sordida* colonizar com facilidade os ecótopos peridomiciliares, onde a principal fonte alimentar são as galinhas, esta espécie apresenta dificuldade em formar grandes colônias intradomiciliares (Diotaiuti *et al.*, 1995).

As características das colônias de *T. sordida* não devem ser comparadas àquelas constituídas pelo *T. infestans* (altas taxas de infestação e infecção), contudo, poderão trazer risco de transmissão ativa da doença de Chagas à população (Diotaiuti *et al.*, 1988).

Apesar das dificuldades de borrifação e da pequena ação residual do inseticida no peridomicílio, a existência de apenas um ciclo anual de *T. sordida* e a lentidão na reconstituição da população original sugerem que uma borrifação anual é suficiente para controle desta espécie. Maior eficiência poderá ser obtida com a eliminação dos esconderijos, por meio da substituição do material utilizado na construção dos anexos atrelada à educação para saúde (Diotaiuti *et al.*, 1998).

1.3 Uso de inseticidas no controle vetorial da doença de Chagas no Brasil

O uso de inseticidas sintéticos durante a década de 1940 representou um grande avanço nas técnicas do controle vetorial da doença de Chagas (Dias *et al.*, 2002).

São consideradas inseticidas as substâncias químicas utilizadas para matar insetos, sendo sua descoberta, isolamento, síntese, avaliação toxicológica e quantificação de impacto ambiental um vasto tópico de pesquisas no mundo inteiro (Mariconi, 1963).

Os primeiros inseticidas utilizados no controle de triatomíneos no Brasil foram os organoclorados. Este grupo de inseticidas apresenta como sítio de ação as proteínas do canal de sódio. Apesar de seu uso estar hoje proibido, eles tiveram um papel muito importante no controle da doença de Chagas e da Malária no Brasil e no mundo (Pinchin *et al.*, 1980).

Em 1942 foram realizados os primeiros ensaios biológicos com DDT. Os resultados revelaram pequena ação tóxica deste inseticida para barbeiros (Busvine & Barnes, 1947).

Em 1947, Busvine & Barnes demonstraram a ação letal do BHC sobre os triatomíneos. Apesar de revelar bom efeito triatomicida, este inseticida apresentou pequena ação residual, exigindo repetidas borrifações.

Dias & Pellegrino (1948) realizaram ensaios de suscetibilidade de triatomíneos com o DDT aspergido em superfície de barro. Verificou-se a sua ineficiência para o controle destes insetos, não tendo sido, portanto, utilizado no controle vetorial da doença de Chagas.

Em 1949, frente à ineficiência do DDT e do BHC, sanitaristas venezuelanos iniciaram campanhas em larga escala contra os triatomíneos utilizando o Dieldrin. Contudo, o uso deste organoclorado no ambiente domiciliar apresentou uma grande inconveniência: a ocorrência de intoxicações graves em animais domésticos, conduzindo-os a morte. No Brasil, este produto não chegou a ser utilizado no controle triatomínico (Carrillo, 1954).

A partir da década de 50 iniciaram-se os testes biológicos com os organofosforados. Este grupo de inseticidas apresenta como sítio alvo a acetilcolinesterase. O Malation, além de sua baixa persistência no ambiente, exigia aplicações em dosagens mais altas do que as utilizadas para os organoclorados BHC e Dieldrin. Outros inseticidas do mesmo grupo de ação que foram testados para o controle de triatomíneos no Brasil, com sucesso, mas que não foram utilizados na prática são o Fenitrothion, o Clorpirifós e o Pirimifós-metila (Fox *et al.*, 1966).

Em 1959 os carbamatos foram introduzidos no Brasil. Este grupo de inseticidas, tal como os organofosforados, apresenta como sítio de ação a acetilcolinesterase. O Propoxur foi o único inseticida deste grupo que recebeu real atenção visando o controle de barbeiros. Sua ação tóxica contra triatomíneos foi investigada, tendo sido demonstrado sua eficácia, propriedades ovicidas além de ser inodoro e apresentar grande ação residual (Shenone *et al.*, 1972).

Outros carbamatos também foram estudados, merecendo destaque o Bendiocarbe, que associado ao Propoxur, foi recomendado no passado pela Organização Mundial de Saúde (WHO) para o combate dos triatomíneos (Pinchin *et al.*, 1984).

No início da década de 80 foi descoberta a ação triatômica dos piretróides. Este grupo de inseticidas apresenta como sítio de ação as proteínas do canal de sódio. Uma vez absorvido, o piretróide causa aumento da irritabilidade do inseto seguido de paralisia (efeito *Knockdown*) e, finalmente, a morte (Zerba, 2002).

Os piretróides apresentam como vantagens: toxicidade moderada (classificado pela WHO como classe II), rápida, não deixam resíduos nas paredes, são inodoros, protegem o domicílio por tempo prolongado, possuem alto poder de “*Knockdown*” e apresentam efeito inseticida / repelente. Além disso, o fato de serem menos tóxicos para os homens e para os animais domésticos, facilita sua aceitação pela população. Como desvantagens são fotossensíveis (inativados por radiação ultravioleta) e causam irritação momentânea (por menos de 24 horas) na pele e nos olhos (Hervé, 1982).

No Brasil os piretróides mais utilizados foram a Deltametrina, Ciflutrina, Lambdacialotrina e Cipermetrina (*ib. ibid.*). O inseticida atualmente utilizado no combate triatômica é a alfa-cipermetrina.

Considerando os casos de resistência de triatomíneos a inseticidas já reportados na literatura, é possível que o uso intensivo de inseticidas no Brasil por mais de 30 anos tenha favorecido o aparecimento novos focos em regiões ainda mais amplas.

1.4 Resistência de triatomíneos a inseticidas

A resistência a um inseticida se traduz em uma diminuição da mortalidade observada na população submetida a um tratamento constante. Este fenômeno se manifesta com o predomínio de indivíduos que toleram doses letais sobre indivíduos chamados sensíveis nas primeiras aplicações do produto, ocasionando pressão de seleção nas populações (Oliveira Filho, 1984).

A quantificação da resistência é expressa por meio da Razão de Resistência (RR). A RR informa quantas vezes a população estudada é mais resistente que a linhagem referência de suscetibilidade (WHO, 1994). A RR50 é obtida através do quociente da dose letal 50% (DL50) da população de campo pela DL50 da linhagem referência de suscetibilidade. O mesmo procedimento é adotado para o cálculo da RR95. A comparação entre ambas permite inferir sobre o grau de heterogeneidade da população estudada.

A primeira evidência bem documentada de resistência de triatomíneos a inseticida foi a de populações venezuelanas de *R. prolixus* ao Dieldrin, no Estado de Trujillo. Redução de suscetibilidade nos Estados de Yaracuy, Tachira, Cojedes e Portuguesa (González-Valdivieso *et al.*, 1971; Cockburn, 1972; Nocerino, 1976) também foi observada.

Nocerino (1975) selecionou em laboratório uma linhagem resistente de *R. prolixus* de Santo Domingo. Em 1969 essa população demonstrou 9% de mortalidade ao Dieldrin (papéis impregnados a 4%, 48 horas de exposição) e 47% de mortalidade (papéis impregnados a 4%, 120 horas de exposição). No ano de 1975, exposição de 600 horas não produzia nenhuma mortalidade nesta mesma população. Nelson e Colmenares (1979) selecionaram a mesma população com exposição a papéis impregnados com Dieldrin (papéis impregnados a 4%, 168 horas de exposição) com uma redução de mortalidade de 15% até 3% em seis gerações. Explicar melhor isso...o que é impregnado e o que é mortalidade.

Na Colômbia, Fox & Bayona (1966) expuseram ninfas V de uma colônia de *R. prolixus* a vários inseticidas em papéis impregnados pela WHO. Não houve mortalidade ao Dieldrin (papéis impregnados a 1,6%, 24 horas de exposição) o que seria indicativo de resistência. Tampouco se verificou mortalidade com Malation

(papéis impregnados a 12,8%, 24 horas de exposição) e somente 50% de mortalidade com Fenitrothion (papéis impregnados a 1,2%, 24 horas exposição).

Populações de *T. infestans* do sul do Peru demonstraram alta sobrevivência ao Dieldrin, enquanto que *Panstrongylus rufotuberculatus* Champion, 1899, também do sul do país, foi suscetível. *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky 1948, do norte do país, também foi suscetível ao Dieldrin (*ib. ibid.*).

Correa *et al.* (1968) demonstraram 100% de mortalidade em populações brasileiras de *T. infestans* expostas ao Lindano (papéis impregnados a 2%, 48 horas de exposição). Papéis impregnados pela WHO com Dieldrin (papéis impregnados a 4%, 48 horas de exposição) contra *T. infestans*, *P. megistus* e *T. sordida* resultaram em 30%, 85% e 100% de mortalidade, respectivamente.

Oliveira Filho *et al.* (1988^b) determinaram a linha base de suscetibilidade para populações brasileiras de *T. infestans* (0,33 g/m²), *P. megistus* (0,47 g/m²), *T. brasiliensis* (0,29 g/m²), *T. pseudomaculata* (0,11 g/m²) e *T. sordida* (0,29g/m²), utilizando papéis impregnados com Gama BHC.

Piccollo *et al.* (1976) testaram sete inseticidas diluídos em acetona e aplicados na superfície ventral de *T. infestans*. Simultaneamente expuseram ninfas a papéis impregnados com os mesmos inseticidas e nas mesmas concentrações. No final observaram não existir correlação entre os resultados dos ensaios por contato e aplicação tópica do inseticida.

Na Venezuela, Nelson & Colmenares (1979) utilizaram aplicação tópica de 22 inseticidas em ensaio de suscetibilidade com *R. prolixus* resistentes e suscetíveis ao Dieldrin das localidades de Santo Domingo (SD) e Cojedes (CJ), respectivamente. Foi confirmada a resistência da linhagem SD e a suscetibilidade da CJ ao Dieldrin. Verificou-se também resistência cruzada da linhagem SD ao BHC e redução de suscetibilidade da mesma a organofosforados e carbamatos quando comparados com a linhagem CJ. Maior suscetibilidade a piretróides foi verificada em SD.

No Brasil, Oliveira Filho *et al.* (1981) definiram a linha base de suscetibilidade de *P. megistus* para 23 inseticidas por aplicação tópica. No Peru, Maquera Lupaca (1980) aplicou DDT, Lindano, Propoxur e Malation topicamente em *T. infestans* e determinou a DL50 para cada um deles.

Ensaio de laboratório e de campo de monitoramento de resistência de triatomíneos a organoclorados, carbamatos, organofosforados e alguns piretróides têm revelado diferenças marcantes entre as espécies (Oliveira Filho 1980, 1988^a).

Oliveira Filho (1999) determinou, por aplicação tópica do inseticida, em ninfas V, as doses letais de quatro compostos não formulados (Lambdacialotrina, Alfacipermetrina, Ciflutrina e Deltametrina) para cinco espécies de triatomíneos (*T. infestans*, *T. brasiliensis*, *P. megistus*, *T. sordida* e *R. prolixus*). Seus resultados demonstraram que para todos os inseticidas *R. prolixus* é a espécie mais suscetível (exceto para Lambdacialotrina, na qual *T. infestans* é a mais sensível), seguido de *T. infestans* e *P. megistus*.

Ensaio de excito-repelência usando Deltametrina em condições laboratoriais revelaram intensa agitação dos triatomíneos em consequência da presença deste inseticida em regiões tratadas. Foi observado maior tolerância a Deltametrina em *T. sordida* e *T. infestans* e maior suscetibilidade de *P. megistus* e *R. prolixus* (Diotaiuti *et al.*, 2000).

Os mecanismos responsáveis pela resistência a inseticidas podem ter origem comportamental, fisiológica e/ou bioquímica (Brogdon & Mcallister, 1998).

A resistência de origem comportamental se refere à capacidade do inseto em evitar a presença do inseticida, por meio de modificações genéticas nos receptores periféricos dos estímulos e/ou nos sistemas centrais de processamento dos mesmos (Lines, 1987; Mbogo *et al.*, 1996; Mathenge *et al.*, 2001).

A resistência de origem fisiológica se relaciona com a redução da penetração do inseticida por alteração da cutícula do inseto e/ou na armazenagem / excreção do inseticida (Apperson & Georghiou, 1979).

Os mecanismos bioquímicos da resistência se fazem perceber em um significativo aumento da atividade de enzimas detoxificativas, em especial, oxidases de função mista, glutationa-S-transferase, acetilcolinesterases e esterases (Ranson *et al.*, 2002; Zerba, 2002; Hemingway *et al.*, 2004). Brogdon & Mcallister (1998) sugerem um maior envolvimento de oxidases de função mista na degradação de piretróides e organoclorados, de esterases na degradação de organofosforados e de acetilcolinesterase na degradação de carbamatos.

Casabé & Zerba (1981) reportaram resistência de *T. infestans* a organofosforados devido ao aumento da atividade de esterases. Vassena *et al.* (2000) atribuíram a resistência de *T. infestans* à Deltametrina a um aumento da atividade detoxificativa de oxidases de função mista. Audino *et al.* (2004) atribuíram às esterases uma possível causa de resistência de *T. infestans* ao piretróide Deltametrina.

Alterações nos sítios alvo (canal de sódio, acetilcolinesterases e receptores GABA) foram relatadas como mecanismo causal de resistência a inseticidas (Devonshire & Moores, 1984; Brogdon & Mcallister, 1998).

O DDT, depois de poucos minutos de contato, provoca convulsões, seguidas de paralisia e morte, o que Milani (1954) chamou de efeito *knockdown*. Poucos anos após o início da utilização do DDT como inseticida foram descritas linhagens de moscas domésticas resistentes ao inseticida. Estes insetos, ao serem expostos ao DDT, ou não sofriam paralisia seguida de morte (*knockdown*) ou apresentavam uma paralisia momentânea seguida de total recuperação locomotora. Este fenótipo ficou conhecido como Kdr (do inglês, *knockdown resistance*) (Milani, 1954).

O entendimento da fisiologia e da bioquímica do fenômeno de resistência a inseticidas é útil na prevenção e/ou superação deste problema, bem como, na seleção ou desenvolvimento de novos “ativos químicos” para o controle de triatomíneos resistentes.

1.5 Variabilidade genética de triatomíneos

De modo geral, a análise de dados moleculares é útil no entendimento de aspectos evolutivos básicos, na correta identificação de espécies crípticas e no estabelecimento de relações sistemáticas/evolucionárias. Além disto, permitem a elaboração de inferências epidemiológicas e de tendências adaptativas relevantes para o controle destes vetores (Abad-Franch & Monteiro, 2005).

Vários são os estudos sobre variabilidade genética de triatomíneos que utilizam diferentes ferramentas moleculares tais como: isoenzimas, RAPD, microsatélites, sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares, dentre outros.

O estudo de fragmentos do DNA fornece informações sobre a dinâmica populacional dos espécimes estudados, possibilitando inferências sobre a sistemática e a evolução dos mesmos. Trata-se de uma ferramenta molecular extremamente sensível e capaz de detectar variações intra-específicas (Simon *et al.*, 1994).

O sequenciamento do DNA mitocondrial (mtDNA), em especial, é útil no estudo de populações de insetos. Este marcador apresenta algumas características que o faz próprio para este estudo: herança materna, genoma haplóide e facilidade na amplificação por PCR. Além disto, muitas regiões são conservadas o bastante de modo que os iniciadores possam ser utilizados em diferentes táxons de insetos (Behura, 2006).

Pelos motivos supracitados optou-se pelo sequenciamento do gene mtCytB para definir a variabilidade genética das populações de *T. sordida* estudadas.

1.6 Justificativa

O controle dos triatomíneos, vetores da doença de Chagas, tem sido realizado em toda América Latina, principalmente, mediante o uso de inseticidas. Considerando o programa de controle nos últimos 30 anos e os relatos de resistência a inseticidas em triatomíneos, é esperado o aparecimento de outros focos em regiões ainda mais amplas.

Deste modo, torna-se indispensável realizar o monitoramento da resistência destes vetores de modo a definir a freqüência com que os mecanismos de resistência vêm ocorrendo em diferentes regiões e com diferentes espécies de triatomíneos.

Na plenária do “I Seminário sobre técnicas e ferramentas de controle das doenças transmitidas por vetores (SVS-MS, 2003)” e do “II seminário internacional sobre técnicas e ferramentas de controle das doenças transmitidas por vetores – recomendações (SVS-MS, outubro 2006)” foi discutido que “em muitas localidades, programas de controle de diferentes agravos estão sendo executados de forma simultânea e sem articulação entre si, o que pode contribuir para o aumento indiscriminado e indesejado da resistência a inseticidas. Foi fortemente sugerida a

integração das decisões de manejo dos diferentes programas, de forma a garantir o controle racional das endemias/epidemias”.

Deste modo, o aprimoramento dos programas de avaliação do impacto das medidas de controle sobre as endemias/epidemias assume que:

- o monitoramento da resistência dos vetores aos inseticidas é componente importante, já uma preocupação do Ministério da Saúde e dos técnicos em geral, a ser encarado de maneira objetiva e continuada, de forma institucionalizada e com prioridade;

- o tema não deve ser considerado como uma atividade em separado, mas deve fazer parte do contexto e das macro políticas do controle dos vetores e das enfermidades pertinentes. Neste aspecto é prioridade reforçarem-se grupos de entomologia em geral, com formação e capacitação de massa crítica, treinamento em diferentes níveis, abertura e incentivo à investigação; e ainda: “os programas em curso não devem ser herméticos e isolados entre si, cada vez mais sendo oportuno e desejável que se integrem e possam compartilhar diferentes tarefas, insumos, informações e tecnologias”.

Dentro desta perspectiva, em 2005, foi realizada uma reunião em Brasília com alguns pesquisadores da área da doença de Chagas. Foi consolidado e aprovado um projeto, creditado por autoridades do setor nacional da saúde com amarras institucionais, com vistas ao monitoramento da resistência de triatomíneos a inseticidas. O estudo foi encaminhado e homologado, contudo não foi aprovado. O Ministério da Saúde justificou que esta atividade não é prioritária. Percebe-se claramente uma falta de articulação e de visão institucional política programática entre o Poder Público e o Ministério da Saúde.

O trabalho proposto é um estudo inédito no Estado de Minas Gerais, considerado por Rocha e Silva (1979) como medida estratégica para o controle destes insetos, podendo auxiliar o PCDCh na eleição de medidas factíveis e eficazes no controle da transmissão vetorial da enfermidade de Chagas.

Segundo a “Reunión Latino-americana de Monitoreo de Resistencia a Insecticidas em Triatomíneos” (OPS, 2005), realizada no Panamá, o monitoramento da resistência de triatomíneos a inseticida poderá ter desdobramentos importantes, tais como incentivar:

- a recuperação das atividades entomológicas de modo a avaliar as aplicações dos inseticidas nos programas de controle de vetores e, conseqüentemente otimizar as estratégias de controle químico;
 - a incorporação do monitoramento e manejo da resistência de triatomíneos a inseticidas, segundo metodologia descrita neste documento, como parte das atividades previstas nas iniciativas de interrupção da transmissão vetorial da enfermidade de Chagas;
 - a formação de recursos humanos a nível operativo e técnico que permitam implementar programas de monitoramento e manejo de resistência de triatomíneos a inseticidas segundo metodologia descrita neste documento;
 - o apoio e o fortalecimento dos centros regionais colaboradores da OPS/OMS para que atuem formando recursos humanos e validando os procedimentos de monitoramento e manejo de resistência a inseticidas descritos neste documento;
 - os governos dos países latino-americanos a incluir no custeio dos programas de controle de vetores de Chagas, recursos destinados a implementação de programas de monitoramento e manejo da resistência de triatomíneos a inseticidas (atividades de laboratório e de campo);
 - o fortalecimento dos grupos latino-americanos locais e regionais de entomologia, para interagir em rede, a fim de melhorar e desenvolver os programas de monitoramento e manejo de resistência de triatomíneos a inseticidas, com o apoio da OPS e outros organismos nacionais e internacionais;
 - a criação, com o apoio e colaboração da OPS/WHO de um comitê de pesquisadores para o seguimento e atualização dos programas de monitoramento e manejo de resistência a inseticidas, cujos resultados orientem as estratégias de controle na região;
 - a geração de documentos técnicos similares para o monitoramento e manejo da resistência a inseticidas em outros vetores de importância médica.
-

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Padronizar ensaios biológicos para o monitoramento da resistência de triatomíneos a inseticidas em laboratório e caracterizar a suscetibilidade de populações de *Triatoma sordida* Stal, 1859 ao piretróide Deltametrina.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o local ideal de aplicação do inseticida nos triatomíneos em ensaios biológicos de monitoramento de resistência em laboratório;
- Determinar a geração ideal dos triatomíneos em ensaios biológicos de monitoramento de resistência a inseticidas em laboratório;
- Determinar a idade ideal dos triatomíneos em ensaios biológicos de monitoramento de resistência a inseticidas em laboratório;
- Determinar a linha base de suscetibilidade da linhagem referência de *Triatoma sordida* a Deltametrina;
- Determinar a dose diagnóstica ideal em ensaios biológicos de monitoramento de resistência de triatomíneos a inseticidas em laboratório;
- Caracterizar o perfil de suscetibilidade das populações de *Triatoma sordida* estudadas;
- Definir a taxa de recuperação do efeito *knockdown* das populações de *Triatoma sordida* estudadas;
- Correlacionar a suscetibilidade à Deltametrina das populações de *Triatoma sordida* estudadas com seus padrões genéticos;

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Inseticida avaliado

O inseticida utilizado neste projeto foi o piretróide Deltametrina (á-ciano-m-fenoxibencil 1R, 3R)-3-(2,2 dibromovinilo)-2,2 (dimetil ciclopropano carboxilato) (grau de pureza de 99,1% - Bayer®, Brasil) – produto não formulado. A escolha deste inseticida foi embasada em suas propriedades químicas e modo de ação. Trata-se de um inseticida padrão, comumente utilizado em estudos de resistência.

3.2 Triatomíneos

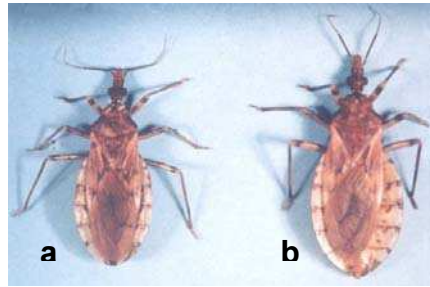
3.2.1 Espécie estudada

A espécie estudada neste projeto foi *Triatoma sordida* Stål, 1859. Atualmente, no Brasil é a espécie mais capturada em Minas Gerais, Goiás, Bahia e sul do Tocantins. No Brasil central é a espécie que representa maior risco para a transmissão natural da doença de Chagas (Silveira, 2000).

T. sordida apresenta porte mediano com tamanho aproximado de 14-19 mm nos machos e 15-20 mm nas fêmeas. Exibe coloração variando entre marrom-claro e escuro, com manchas amarelo-palha na cabeça, pronoto, escutelo, hemiélitros, patas e conexivo. Este último se apresenta claro com manchas escuras que se assemelham a notas musicais (Figura 1).

No ambiente natural *T. sordida* apresenta como centro de dispersão o cerrado. Pode ser capturado principalmente, sob as cascas secas de árvores (Forattini *et al.*, 1971; Diotaiuti *et al.*, 1994), apesar de também ser secundariamente encontrado na copa de palmeiras (Barretto *et al.*, 1969).

Trata-se de uma espécie nativa do país e, portanto, não erradicável. É comum em peridomicílios, freqüente em galinheiros, pombais, paióis, sendo, portanto, nestas situações, um transmissor secundário da doença de Chagas. Sua marcada ornitofilia o faz um vetor menos importante que *P. megistus* e *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1991 ainda que tanto quanto *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Silveira *et al.*, 1993).

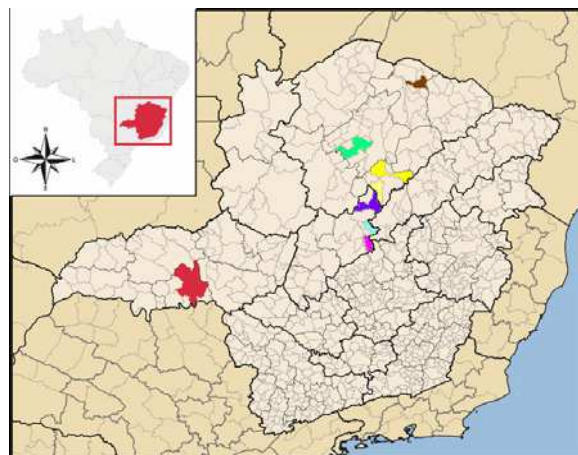


Fonte: www.sucen.sp.gov.br

Figura 1. Macho (a) e fêmea(b) de *Triatoma sordida* Stal 1859.

3.2.2 Coleta e Procedência dos triatomíneos

Os triatomíneos foram coletados nas unidades domiciliares de áreas endêmicas, das mesorregiões Central Mineira e Norte do Estado Minas Gerais, nas quais o PCDCh se manteve ininterrupto nos últimos 30 anos. As coletas foram realizadas no segundo semestre do ano de 2006 em colaboração com as Gerências Regionais de Saúde - GRS de Sete Lagoas e de Montes Claros (Figura 2). A captura dos insetos foi manual, sem utilização de desalojantes, antes da aplicação do inseticida. A intensidade de aplicação do inseticida respeita um ciclo de 12 meses.



Escala 1cm = 156.89 km

Fonte: Wikipédia, 2007 (modificado)

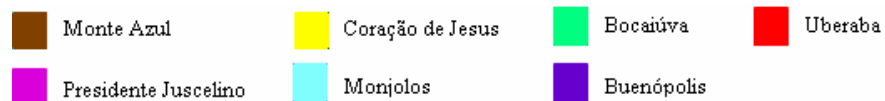


Figura 2. Mapa político do Estado de Minas Gerais. Destacados os diferentes municípios de captura de *T. sordida* estudadas neste projeto.

Minas Gerais (Sudeste do Brasil) está dividido em 12 mesorregiões, sendo as populações estudadas procedentes do Norte do Estado (municípios de Monte Azul, Coração de Jesus e Bocaiúva) e da região Central Mineira (municípios de Presidente Juscelino, Monjolos e Buenópolis).

Ambas as regiões são pobres, com vastas áreas de transição entre o cerrado e a caatinga sendo, portanto, muito suscetíveis à seca devido as chuvas escassas e as altas temperaturas. O Norte do Estado em especial, apresentou um processo de colonização desordenado resultando em intervenções ambientais descontroladas. A migração em massa de pessoas procedentes de áreas com alta ocorrência de Chagas foi responsável pela introdução do *T. infestans* na região (FUNASA, 1995).

Segundo a WHO (1994), considera-se linhagem suscetível a inseticida aquela colônia estabelecida em laboratório por pelo menos cinco gerações, sem acréscimo de material externo e/ou aquela colônia iniciada por insetos de campo em áreas onde não houve aplicação de inseticida nos últimos cinco anos. A linhagem referência de suscetibilidade utilizada neste trabalho é de Uberaba (MG); colônia estabelecida desde 1992 no LATEC, CPqRR / FIOCRUZ.

3.2.3 Manutenção dos triatomíneos

As populações de campo de *T. sordida*, bem como a linhagem referência de suscetibilidade, foram mantidas no insetário do LATEC, CPqRR / FIOCRUZ em condições de temperatura e umidade controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\% \pm 10\%$ UR).

Os triatomíneos foram agrupados por localidade. Cada população foi originada por no mínimo 10 espécimes coletados em campo conforme preconizado na “II Reunión técnica latinoamericana de monitoreo de resistencia a insecticidas en triatomíneos vectores de Chagas” (OPS, 2005) de modo a garantir que o número de insetos seja representativo da população estudada.

Os insetos foram acondicionados em frascos transparentes de polietileno, devidamente identificados (15 cm diâmetro e 20 cm de altura), com fundo recoberto com folhas de papel filtro para a retenção da umidade produzida pelas fezes e urina dos mesmos. Uma sanfona vertical de cartolina foi utilizada para aumentar a superfície interna do frasco de modo a permitir maior movimentação dos

triatomíneos e facilitar a sua alimentação. A abertura dos frascos foi vedada com pano de malha fina preso por esparadrapo e elástico.

A alimentação foi ofertada uma vez por semana utilizando camundongos (*Mus musculus*) anestesiados com Tionembutal.

3.2.4 Codificação das populações estudadas

A codificação das diferentes populações de *T. sordida* estudadas foi orientada pelas iniciais, em caixa alta, da espécie estudada (*T. sordida*: TS), seguida pela mesorregião de origem (Central Mineira: CM ou Norte:N), pelo município amostrado (Ex.: Presidente Juscelino - PJ; Monjolos - M) e pela localidade de captura (Ex.: Cipó - C; Monte Azul - MA), conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Codificação das diferentes populações de *T. sordida* de Minas Gerais estudadas.

Mesorregião de Origem	Município	Localidade	Código
---	Uberaba	---	TSUBREF
Central Mineira	Monjolos	F. Cipó	TSCMMC
Central Mineira	Monjolos	P. Tamboril	TSCMMT
Central Mineira	Presidente Juscelino	S. Mandioca	TSCMPJM
Central Mineira	Buenópolis	P. Cercado	TSCMBC
Norte	Monte Azul	F. Brejinho	TSNMAB
Norte	Monte Azul	F. Tábuas	TSNMAT
Norte	Coração de Jesus	F. Jatobá	TSNCJJ
Norte	Coração de Jesus	F. Jat. de Cima	TSNCJJC
Norte	Coração de Jesus	F. Jataí	TSNCJJT
Norte	Coração de Jesus	F. Domingada	TSNCJD
Norte	Coração de Jesus	F. Barriguda	TSNCJB
Norte	Bocaiúva	F. Félix	TSNBF
Norte	Bocaiúva	F. Félix I	TSNBFI
Norte	Bocaiúva	F. Chaves	TSNBC

Nota: (F) Fazenda, (P) Povoado e (S) Serra.

3.3 Ensaios Biológicos

3.3.1 Determinação do local ideal de aplicação do inseticida nos triatomíneos em ensaios biológicos de monitoramento da resistência em laboratório

Para uma das populações de campo de *T. sordida* estudadas, escolhida aleatoriamente, foram definidas as DL50 e DL95 utilizando metodologia apresentada no item 3.3.5. Entretanto, em um grupo o inseticida foi aplicado no dorso do

abdômen do inseto e no outro, no ventre. Foram utilizadas ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg).

3.3.2 Determinação da geração ideal dos triatomíneos em ensaios biológicos de monitoramento de resistência a inseticidas em laboratório

Para uma das populações de campo de *T. sordida* estudadas, escolhida aleatoriamente, foram definidas as DL50 e DL95 utilizando metodologia apresentada no item 3.3.5. Foram utilizadas ninfas I das gerações F1 e F2 (cinco dias de idade, jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg).

3.3.3 Determinação da idade ideal dos triatomíneos em ensaios biológicos de monitoramento de resistência a inseticidas em laboratório

Para uma das populações de campo de *T. sordida* estudadas, escolhida aleatoriamente, foram definidas as DL50 e DL95 utilizando metodologia apresentada no item 3.3.5. Foram utilizadas ninfas I da geração F2 (jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg) com um, três e cinco dias de idade.

3.3.4 Determinação da linha base de suscetibilidade da linhagem referência de *Triatoma sordida* a Deltametrina

Os ensaios biológicos foram realizados segundo protocolo definido pela WHO (1994).

Inicialmente, foram definidas as doses letais 50% (DL50), 95% (DL95) e 99% (DL99) da linhagem referência de suscetibilidade. Diluições seriadas de Deltametrina foram preparadas e aplicadas no dorso do abdômen de cada inseto (volume de $0,2 \mu\text{l}$ de solução). O inseticida foi eluído em acetona na proporção de 1:10, totalizando quatro doses iniciais aplicadas com uma microseringa. O intervalo que apresentou mortalidade próxima a 50% foi fracionado em subdoses. Nos insetos do grupo

controle foi aplicado somente acetona. Três repetições, cada uma com 10 ninfas I (cinco dias de idade, jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg) foram realizadas para cada dose.

Após a aplicação do inseticida, os triatomíneos foram transferidos para placas de petri forradas com papel filtro e acondicionadas em ambiente com temperatura e umidade controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\% \pm 10\%$ UR).

Para qualificar os insetos afetados foi adotado o seguinte critério de mortalidade: considerou-se morto o inseto que colocado sobre um papel de filtro não apresentou atividade locomotora própria, evidenciando sinais de tombamento e/ou paralisia. A notação de mortalidade foi realizada com 72 horas, de modo que a leitura seja referência da mortalidade dos triatomíneos e não do efeito *knockdown*.

Os insetos foram classificados como normais, intoxicados, *knockdown* e mortos de acordo com o seguinte critério: 1. triatomíneos normais são aqueles que apresentam atividades de deslocamento inalteradas; 2. triatomíneos intoxicados revelam alterações comportamentais, contudo, sem interferências na atividade locomotora; 3. triatomíneos *Knockdown* evidenciam sinais de tombamento e paralisia no processo de deslocamento, não respondendo, em sua maioria, aos estímulos gerados por uma pinça; 4. triatomíneos mortos não respondem a nenhum tipo de estímulo externo (WHO, 1994; Pires *et al.*, 2000).

Os resultados dos ensaios dose-resposta foram então analisados com auxílio do programa PROBIT (Finney, 1971), definindo deste modo as concentrações letais da linhagem referência de suscetibilidade. As doses foram expressas em nanogramas de ingrediente ativo por ninfa tratada (ng i.a./ninfa).

Para definir a taxa de recuperação do efeito *knockdown*, considerando que o inseticida utilizado neste trabalho é um piretróide, uma outra notação de mortalidade foi realizada às 24 horas após o tratamento com o inseticida.

3.3.5 Determinação da dose diagnóstica (DD) ideal em ensaios biológicos de monitoramento de resistência de triatomíneos a inseticidas em laboratório

Segundo os critérios da WHO (1981) a dose diagnóstica é a combinação da concentração do inseticida e do tempo de exposição que mata 99,9% dos indivíduos

sensíveis, determinado por análise de regressão da dose versus mortalidade. Em ensaios biológicos com mosquitos a WHO (1981) preconiza uma DD de 1xDL99 da linhagem referência de suscetibilidade. Entretanto, para triatomíneos a WHO (1994) recomenda o uso 2xDL99 da linhagem referência de suscetibilidade.

Após definida a linha base de suscetibilidade da linhagem referência de *T. sordida*, as populações de campo foram submetidas a duas doses diagnósticas distintas (1xDL99 e 2xDL99 da linhagem referência de suscetibilidade) conforme metodologia apresentada no item 3.3.5. Foram utilizadas ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso $1.2 \pm 0,2$ mg).

Em todas as populações, para cada uma das doses diagnósticas testadas, foi definido o percentual de sobrevivência dos insetos.

3.3.6 Caracterização do perfil de suscetibilidade das populações de campo de *Triatoma sordida* estudadas

Para todas as populações de campo de *T. sordida* estudadas foram definidas DL50 e DL95 utilizando metodologia apresentada no item 3.3.5. Foram utilizadas ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg).

Em seguida, calculou-se a razão de resistência 50% (RR50) por meio do quociente da DL50 de cada população de campo pela DL50 da linhagem referência de suscetibilidade. O cálculo da RR95 seguiu o mesmo procedimento.

3.3.7 Definição da taxa de recuperação do efeito knockdown das populações de *Triatoma sordida* estudadas

Conforme descrito no item 3.3.5, todas as populações de *T. sordida* estudadas, bem como a linhagem de referência de suscetibilidade, tiveram notação de mortalidade realizada com 24 e 72 horas.

Por meio da diferença entre o número de insetos “*knockdown* + mortos” observado às 24 e às 72 horas após a exposição à Deltametrina, definiu-se o percentual de recuperação do efeito *knockdown* para cada população estudada.

3.4 Ensaios Moleculares: Definição dos padrões genéticos das populações de *Triatoma sordida* estudadas

3.4.1 Extração de DNA

Dez ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso $1.2 \pm 0,2$ mg) de cada população foram conservadas em freezer -20°C até o momento do uso. A extração do DNA foi realizada de acordo com De Queiroz Balbino *et al.* (2006) com algumas alterações.

Cada ninfa foi macerada individualmente com STE [1X] (NaCl 0,01M; Tris-HCl 0,1M e EDTA 1M) totalizando 50 μl . Em seguida, este material foi incubado a 90°C por 10min. Cada amostra foi, então, centrifugada a 13.000 rpm por 1min e o sobrenadante foi retirado, adicionado a água ultrapura, na proporção 1:1, em um novo tubo. Este material foi mantido a -20°C até o momento do seu uso em PCR.

3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Purificação do DNA

A PCR foi realizada segundo Lyman *et al.* (1999). Foram utilizados os iniciadores CITBF 5`-GGA CAA ATA TCA TGA GGA GCA ACA G-3` e CITBR 5`-ATT ACT CCT CCT AGC TTA TTA GGA ATT G-3` de acordo com Monteiro *et al.* (1999).

O volume final da reação foi de 25 μl : 1,5 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 3 mM de MgCl_2 , 200 μM *dNTP*, 10 pmol de cada iniciador e 1 μl da solução de DNA. Utilizou-se o termociclador Eppendorf mastercycler® na seguinte condição: $95^{\circ}\text{C}/5$ min; 30X ($95^{\circ}\text{C}/45$ seg, $50^{\circ}\text{C}/45$ seg e $72^{\circ}\text{C}/1$ min); $72^{\circ}\text{C}/10$ min.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio 10% e visualizados em transiluminador UV longo.

3.4.3 PCR de Sequenciamento

As bandas referentes ao fragmento estudado (~450 pb) foram cortadas do gel e purificadas utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), de acordo com recomendações do fabricante.

As amostras de DNA purificadas foram, então, submetidas à PCR de sequenciamento utilizando o kit DYEnamic™ ET dye terminator (MegaBace™) com os mesmos iniciadores supracitados. Foram realizadas duas reações por iniciador para cada inseto. Em cada 10 µl de reação utilizou-se 4 µl do Kit, 1 µl de iniciador (10pmoles) e 5 µl de DNA molde.

Utilizou-se o seqüenciador MegaBace 500. As seqüências produzidas foram avaliadas quanto à qualidade e unidas em seqüência consenso por meio do programa Phred (Ewing *et al.*, 1998), sendo considerados apenas os sítios que exibiram qualidade acima de 20.

As seqüências do gene mtCytB produzidas neste trabalho foram comparadas com a seqüência de número F045730 depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Trata-se da única seqüência disponível para *T. sordida* (insetos originários de Cochabamba, Bolívia) (Monteiro *et al.*, 1999).

3.4.4 Genética de populações

As seqüências dos haplótipos foram alinhadas usando o programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) integrada ao pacote Seqtools v. 8.2.085 (<http://www.seqtools.dk>). Os parâmetros adotados para avaliar o nível de polimorfismo nos haplótipos estudados foram: diversidade de nucleotídeos (Pi), número médio de diferenças de nucleotídeos (k), número de *singletons* (η_s), número de haplótipos (H), diversidade de haplótipos (Hd) e número de sítios segregantes (S). A hipótese da evolução neutra (Kimura, 1968) foi avaliada por meio de três testes de neutralidade: teste D de Tajima (1989), teste D* e teste F* de Fu & Li (1993). Todos estes parâmetros foram calculados por meio do programa DnaSP v.4 (Rozas *et al.*, 2003).

A diferenciação genética entre as populações foi avaliada por meio do método de análise de variância molecular – AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) utilizando o programa Arlequin v. 2.000 (Schneider *et al.*, 2000). O estudo filogenético foi realizado por meio do programa MEGA v.3.1 (Kumar *et al.*, 2004), baseado no modelo Kimura 2-Parâmetros (K2-P) para efetuar os cálculos das distâncias genéticas e no algoritmo de neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) para a construção do dendograma.

As relações entre os haplótipos de *T. sordida* observados em Minas Gerais foi demonstrada em um *network* adotando o critério de 95% de parcimônia por meio do programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000).

RESULTADOS

4.1 Número de triatomíneos amostrados nas localidades estudadas

Um total de 297 insetos foi coletado nas 14 localidades amostradas. O estágio de desenvolvimento mais capturado foi adulto (35%), seguido de ninfas de primeiro estágio (29,1%), quinto estágio (15,5%), quarto estágio (8,4%), terceiro estágio (6,8%) e segundo estágio (5,2%) (Tabela 2).

Tabela 2. Populações de *T. sordida* de Minas Gerais estudadas, ecótopos de captura: Peridomicílio (P) e Intradomicílio (I), número de triatomíneos coletados de acordo com o estágio evolutivo. Capturas realizadas no segundo semestre de 2006 pela GRS de Sete Lagoas e de Montes Claros.

POPULAÇÕES	ECÓTOPOS DE CAPTURA	NINFAS					ADULTOS	OVOS
		N1 / N2 / N3 / N4 / N5	♀ / ♂					
TSCMMC	P (galinheiro)	2					01 / 02	60
TSCMMT	P (galinheiro, chiqueiro)	1					03 / 01	259
TSCMPJM	P (galinheiro e curral)	1	2	4	7	2	01 / 02	43
TSCMBC	I (quarto)						01 / 01	
	P (galinheiro, chiqueiro)	2						135
TSNMAB	Não informado	6	5	5	18		12 / 07	350
TSNMAT	Não informado	1					07 / 06	10
TSNCJJ	P (não especificado)	1			1		01 / 04	115
TSNCJJC	P (não especificado)				2		05 / 08	74
TSNCJJT	P (não especificado)	1	7	8	10		01 / 13	75
TSNCJD	P (não especificado)	1			2		01 / 09	84
TSNCJB	P (não especificado)	3	3	2	6		01 /	---
TSNBF	Não informado						03 / 00	189
TSNBFI	Não informado	88						---
TSNBC	Não informado	1	2			7	05 / 01	122
TSUBREF*	P (Não especificado)							---
TOTAL		90	16	21	26	48	43 / 54	297/1516

* Linhagem referência de suscetibilidade.

4.2 Determinação do local ideal de aplicação do inseticida nos triatomíneos em ensaios biológicos de monitoramento de resistência em laboratório

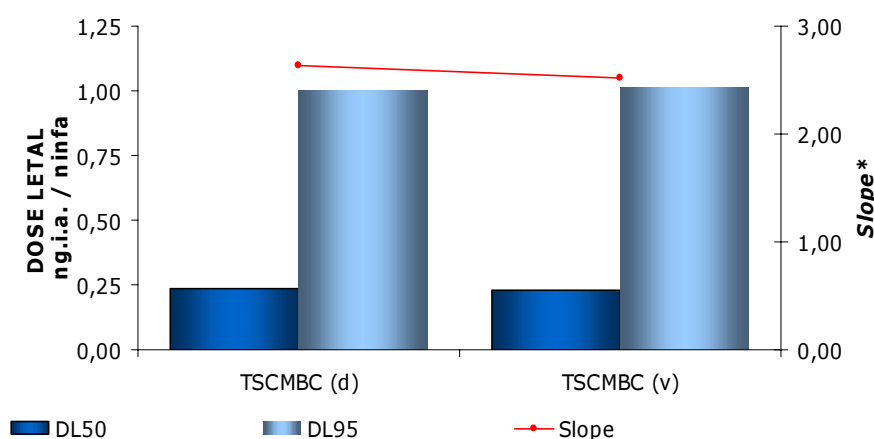
Os resultados dos ensaios biológicos comparando a aplicação do inseticida no dorso ou no ventre do abdômen de ninfas I de *T. sordida*, realizados com triatomíneos da população “TSCMBC”, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. DL50, DL95 e *Slope* da população de *T. sordida* “TSCMBC”. Aplicação tópica de 0,2 µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso (d) ou no ventre (v) do abdômen de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 72 horas.

Populações	DL50 (IC 95%)	DL95 (IC 95%)	<i>Slope</i> *
TSCMBC (d)	0,2372 (0,1912 – 0,3083)	0,9967 (0,5976 – 3,8236)	2,6392 +/- ,6236
TSCMBC (v)	0,2269 (0,1827 – 0,2919)	1,0148 (0,6294 – 2,8134)	2,5290 +/- ,4900

* Coeficiente angular da reta dose resposta.

A análise do Intervalo de Confiança de 95% (IC 95%) das DL50 e DL95 não revelou diferenças entre insetos cuja aplicação do inseticida foi realizada no dorso ou no ventre do abdômen (Figura 3).



*Coeficiente angular da reta dose resposta.

Figura 3. DL50 e DL95 X *Slope* obtidos em ensaios biológicos, da população de *T. sordida* “TSCMBC”. Aplicação tópica de 0,2 µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso (d) ou no ventre (v) do abdômen de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 72 horas.

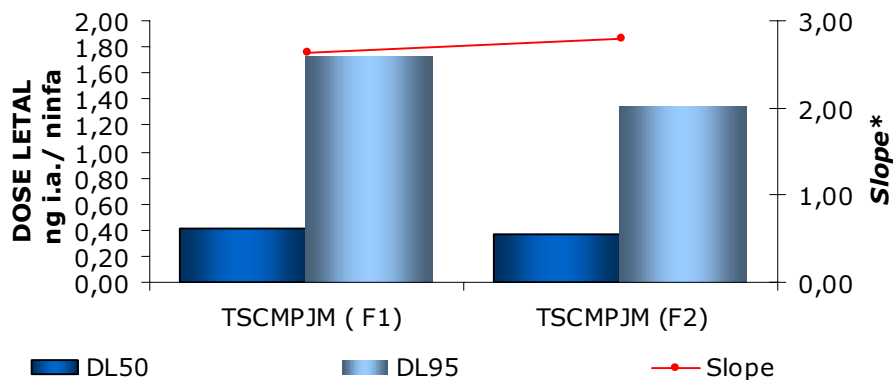
4.3 Determinação da geração ideal dos triatomíneos em ensaios biológicos de monitoramento de resistência a inseticidas em laboratório

Os resultados dos ensaios biológicos comparando a aplicação do inseticida em ninfas I de *T. sordida* de geração F1 ou F2, realizado com triatomíneos da população “TSCMPJM”, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. DL50, DL95 e *Slope* da população de *T. sordida* “TSCMPJM”. Aplicação tópica de 0,2 µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso do abdômen de ninfas I (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg) das gerações F1 e F2. Notação de mortalidade com 72 horas.

Populações	DL50 (IC 95%)	DL95 (IC 95%)	<i>Slope</i> *
TSCMPJM (F1)	0,4101 (0,3167 – 0,5149)	1,7258 (1,1885 – 3,3719)	2,6363 +/- ,4297
TSCMPJM (F2)	0,3609 (0,2984 – 0,4385)	1,3503 (0,9490 – 2,5303)	2,8714 +/- ,4465

A análise do IC 95% das DL50 e DL95 não revelou diferenças entre insetos da geração F1 e F2 (Figura 4).



*Coeficiente angular da reta dose resposta.

Figura 4. DL50 e DL95 X Slope obtidos em ensaios biológicos, da população de *T. sordida* “TSCMPJM”. Aplicação tópica de 0,2 µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso do abdômen de ninfas I das gerações F1 e F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 72 horas.

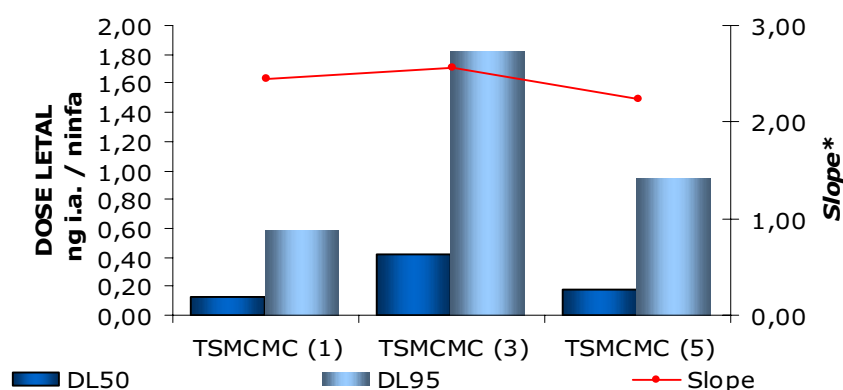
4.4 Determinação da idade ideal dos triatomíneos em ensaios biológicos de monitoramento de resistência a inseticidas em laboratório

A Tabela 5 apresenta os resultados dos ensaios biológicos, realizados com triatomíneos da população “TSCMPJM” com um, três e cinco dias de idade.

Tabela 5. DL50, DL95 e *Slope* da população de *T. sordida* “TSCMMC”. Aplicação tópica de 0,2 µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso do abdômen de ninfas I da F2 (jejum - peso 1,2±0,2 mg) com um (1), três (3) e cinco (5) dias de idade. Notação de mortalidade com 72 horas.

Populações	DL50 (IC 95%)	DL95 (I C 95%)	Slope*
TSCMMC (1)	0,1267 (0,0996 – 0,1616)	0,5922 (0,3940 – 1,2394)	2,4572 +/- ,4030
TSCMMC (3)	0,4171 (0,3425 – 0,5066)	1,8196 (1,2789 – 3,2579)	2,5719 +/- ,3546
TSCMMC (5)	0,1731 (0,1379 – 0,2254)	0,9439 (0,5598 – 2,7776)	2,2334 +/- ,4147

A análise do IC 95% das DL50 e DL95 não revelou diferenças entre os resultados obtidos com ninfas de um e cinco dias de vida. Contudo, ambas se diferenciam de triatomíneos com três dias de idade (Figura 5).



*Coeficiente angular da reta dose resposta.

Figura 5. DL50, DL95 X *Slope* obtidos em ensaios biológicos, da população de *T. sordida* “TSCMMC”. Aplicação tópica de 0,2 µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso do abdômen de ninfas I da geração F2 (jejum - peso 1,2±0,2 mg) com um, três e cinco dias de idade. Notação de mortalidade com 72 horas.

4.5 Determinação da linha base de suscetibilidade da linhagem referência de *Triatoma sordida* à Deltametrina e caracterização da suscetibilidade das populações de campo estudadas

As análises dos ensaios dose-resposta utilizando o programa PROBIT (Finney, 1971) revelaram que todas as quatorze populações de *T. sordida* estudadas apresentaram-se menos suscetíveis ao inseticida quando comparadas com a linhagem referência de suscetibilidade (Tabela 6; Figura 6).

Tabela 6. DL50, DL95, RR50, RR95 e *Slope* da linhagem referência de suscetibilidade e das populações de campo de *T. sordida* estudadas. Aplicação tópica de 0,2µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 72 horas.

Populações	DL50 (C 95%)	DL95 (IC 95%)	RR		Slope*
			50	95	
TSUBREF	0,0654 (0,0528 – 0,0813)	0,2508 (0,1640 – 0,6529)	1,0	1,0	2,8200 ± ,1227
TSCMMC	0,1731 (0,1379 – 0,2254)	0,9439 (0,5598 – 2,7776)	2,6	3,8	2,2334 +/- ,4147
TSCMMT	0,2991 (0,2518 – 0,3689)	1,1725 (0,7760 – 2,6465)	4,6	4,7	2,7729 +/- ,1054
TSCMPJM	0,3609 (0,2984 – 0,4385)	1,3503 (0,9490 – 2,5303)	5,5	5,4	2,8714 +/- ,4465
TSCMBC	0,2372 (0,1912 – 0,3083)	0,9967 (0,5976 – 3,8236)	3,6	4,0	2,6392 +/- ,6236
TSNMAB	0,2188 (0,1447 – 0,2784)	0,9222 (0,6529 – 1,9127)	3,3	3,7	2,6334 +/- ,5402
TSNMAT	0,2279 (0,2043 – 0,2546)	0,4509 (0,3680 – 0,6797)	3,5	1,8	5,5534 +/- 1,0243
TSNCJJ	0,2644 (0,2206 – 0,3367)	1,0316 (0,6602 – 2,6186)	4,0	4,1	2,7825 +/- ,5205
TSNCJJC	0,2369 (0,1827 – 0,2926)	1,1121 (0,7681 – 2,1670)	3,6	4,4	2,4502 +/- ,3957
TSNCJJT	0,1905 (0,1495 – 0,2491)	1,0575 (0,6329 – 2,9591)	2,9	4,2	2,2105 +/- ,3984
TSNCJD	0,3551 (0,2972 – 0,4563)	1,3123 (0,8415 – 3,3835)	5,4	5,2	2,8982 +/- ,5548
TSNCJB	0,4442 (0,3814 – 0,5252)	1,2470 (0,9206 – 2,2255)	6,8	5,0	3,6700 +/- ,6259
TSNBF	0,2908 (0,2385 – 0,3426)	0,9758 (0,7217 – 1,7132)	4,4	3,9	3,1295 +/- ,5261
TSNBFI	0,4034 (0,3228 – 0,4975)	1,5462 (1,0086 – 4,2811)	6,2	6,2	2,8195 +/- ,6155
TSNBC	0,3814 (0,3318 – 0,4543)	0,9723 (0,7354- 1,5629)	5,8	3,9	4,0480 +/- ,5782

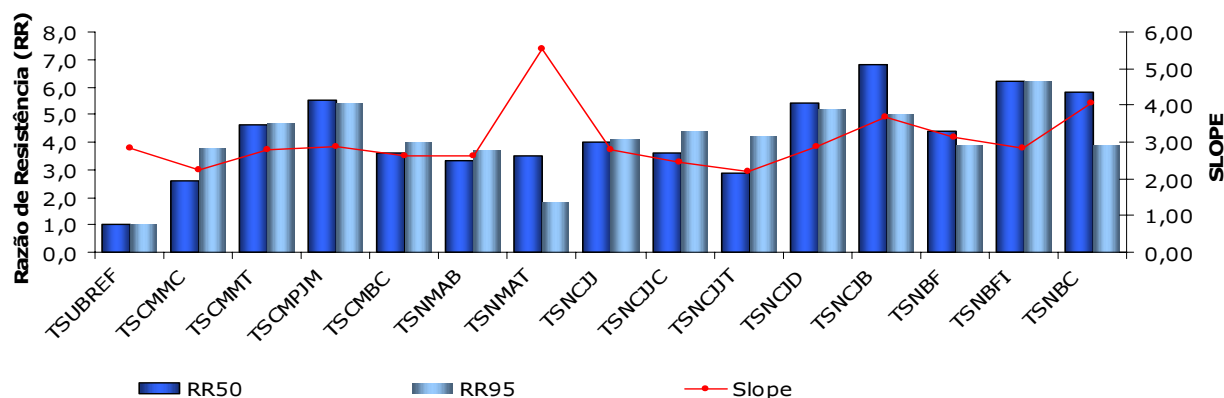
* Coeficiente angular da reta dose resposta.

Os valores calculados para as DL50 e DL95 da linhagem referência de suscetibilidade, “TSUBREF”, foram de 0,0654 ng i.a./ninfa e 0,2508 ng i.a./ninfa, respectivamente.

Nas populações coletadas na região Central Mineira as RR50 variaram de 2,6 a 5,5. Nas populações coletadas no Norte do Estado as RR50 variaram de 2,9 a 6,8 (Figuras 6 e 7).

Das quatorze populações de campo estudadas, apenas três (TSNMAT, TSNCJB e TSNBC) apresentaram *Slope* maior que o da linhagem referência de suscetibilidade, refletindo deste modo, menor variabilidade genética destas três em relação à mesma (Figura 7).

Comparações da DL50 e da DL95 das populações de campo estudadas revelaram não existir diferença estatística significativa entre as populações da região Central Mineira e Norte do Estado (Teste t). Contudo, ambas se diferenciam estatisticamente da linhagem referência de suscetibilidade.



* Coeficiente angular da reta dose resposta.

Figura 6. RR50, RR95 X *Slope* das populações de *T. sordida* de Minas Gerais estudadas x *Slope*. Aplicação tópica de 0,2µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 72 horas.

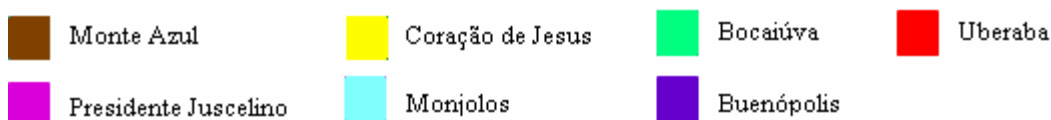
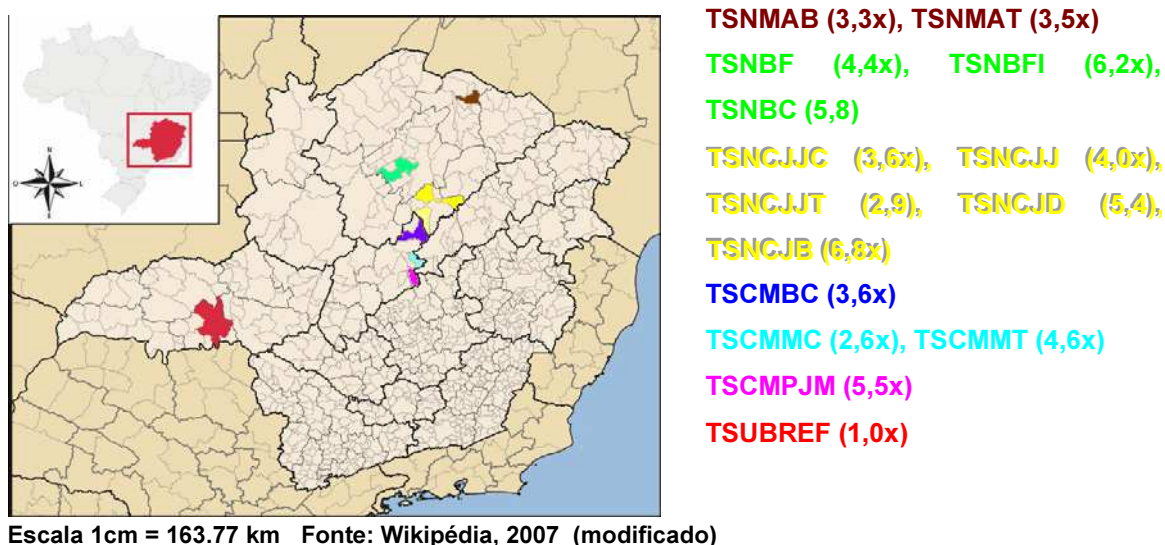


Figura 7. RR50 das populações de *T. sordida* estudadas de acordo com as localidades amostradas. Aplicação tópica de 0,2 µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso do abdômen de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 72 horas.

4.6 Determinação da dose diagnóstica (DD) ideal em ensaios biológicos de monitoramento de resistência de triatomíneos a inseticidas em laboratório

O percentual de sobrevivência de ninfas I de *T. sordida* em resposta às duas doses diagnósticas (DD) testadas, 1xDL99 e 2xDL99 da linhagem referência de suscetibilidade, está apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Percentual de sobrevivência das populações de campo de *T. sordida* estudadas em resposta às doses diagnósticas (DD) 1xDL99 e 2xDL99 da linhagem referência de suscetibilidade. Aplicação tópica de 0,2µl de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 72 horas.

Populações	DD = 1xDL99 (0,4375 ng i.a./ninfa)			DD = 2xDL99 (0,875 ng i.a./ninfa)		
	N TOTAL	sobrevivência		N TOTAL	sobrevivência	
		N	%		N	%
TSCMMC	30	2	6.6	30	0	0
TSCMMT	30	9	30.0	30	0	0
TSCMPJM	30	14	46.6	30	0	0
TSCMBC	30	13	43.3	30	0	0
TSNMAB	30	9	30.0	30	0	0
TSNMAT	30	0	0.0	30	0	0
TSNCJJ	30	8	26.6	30	0	0
TSNCJJC	30	6	20.0	30	0	0
TSNCJJT	30	3	10.0	30	0	0
TSNCJD	30	13	43.3	30	0	0
TSNCJB	30	19	63.3	30	0	0
TSNBF	30	7	23.3	30	0	0
TSNBFI	30	17	56.6	30	2	6.6
TSNBC	30	3	10.0	30	0	0

A taxa de sobrevivência à DD 1xDL99 da linhagem referência de suscetibilidade variou de 6,6% (dois espécimes sobreviventes) a 63,3% (19 espécimes sobreviventes). Apenas a população “TSNMAT” não apresentou nenhum sobrevivente a DD 1xDL99 testada.

Nenhuma população, exceto “TSNBFI”, apresentou indivíduos sobreviventes a DD 2xDL99 da linhagem referência de suscetibilidade. Na população “TSNBFI” a taxa de sobrevivência foi de 6,6% (dois espécimes sobreviventes).

4.7 Definição da taxa de recuperação do efeito Knockdown das populações de *T. sordida* estudadas

O percentual de recuperação do efeito *knockdown* a DL50 foi de 17% na linhagem referência de suscetibilidade. Nas populações de campo estudadas este percentual variou de 24,4% a 70% (Tabela 8).

Tabela 8. Percentual de recuperação do efeito *knockdown* nas populações de *T. sordida* estudadas. Aplicação tópica de 0,2µl de solução de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso do abdômen de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg). Notação de mortalidade com 24 horas e 72 horas.

Populações Estudadas	RR 50	Triatomíneos <i>Knockdown</i>		
		Notação de mortalidade		% recuperação
		24 horas	72 horas	
TSUBREF	1,0	146	121	17,0
TSCMMC	2,6	143	49	34,3
TSCMMT	4,6	144	82	57,0
TSCMPJM	5,5	157	110	70,0
TSCMBC	3,6	145	48	33,1
TSNMAB	3,3	131	32	24,4
TSNMAT	3,5	153	43	28,1
TSNCJJ	4,0	171	81	47,4
TSNCJJC	3,6	172	51	29,7
TSNCJJT	2,9	175	57	31,4
TSNCJD	5,4	178	104	58,4
TSNCJB	6,8	161	112	69,5
TSNBF	4,4	160	83	51,9
TSNBFI	6,2	146	75	51,4
TSNBC	5,8	132	80	60,6

Observa-se que a porcentagem de recuperação *knockdown* apresenta relação diretamente proporcional com a razão de resistência da população, de modo que a população que apresentou menor recuperação foi a linhagem referência de suscetibilidade, sendo as maiores para “TSCMPJM” (RR 5,5) e “TSNCJB” (RR 6,8) (Figura 8).



Figura 8. Percentual de recuperação do efeito *knockdown* nas populações de *T. sordida* estudadas X RR50. Aplicação tópica de 0,2 μ l de Deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso do abdômen de ninfas I da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso 1,2 \pm 0,2 mg). Notação de mortalidade com 24 e 72 horas.

4.8 Variabilidade genética das populações de *T. sordida* estudadas

Para avaliar a variabilidade genética das amostras de *T. sordida* de Minas Gerais aqui estudadas foi realizada inicialmente AMOVA para identificar e agrupar as localidades em populações geneticamente diferenciadas (Tabela 9).

Tabela 9. Diferenciação genética das populações de *T. sordida* estudadas. A AMOVA foi realizada considerando três hierarquias: um único grupo (todas as amostras estudadas); três grupos: Uberaba, região Central Mineira e Norte do Estado; e seis grupos: (1) TSNMAB, TSNMAT, TSNBF, TSNBFI, TSNBC, TSNCJJC, TSNCJJT, TSCMBC, TSCMMT e TSCMPJM; (2) TSNCJJ; (3) TSNCJD; (4) TSNCJB; (5) TSCMMC e (6) TSubREF.

Hierarquia	Categoria	% de Variação	Índice de Fixação
Um Grupo	Entre populações	21,18	Fst = 0,212
	Dentro das populações	78,82	
Três Grupos	Entre os grupos	3,04	Fsc = 0,199
	Entre as populações de cada grupo	19,31	Fst = 0,223
	Dentro das populações	77,65	Fct = 0,030
Seis Grupos	Entre os grupos	24,27	Fsc = 0,068
	Entre as populações de cada grupo	5,12	Fst = 0,294
	Dentro das populações	70,62	Fct = 0,243

Nota: Fst = Índice de endocruzamento entre a população total e as subpopulações ; Fsc = Índice de endocruzamento entre as subpopulações e os indivíduos; Fct = Índice de endocruzamento entre a população total e os indivíduos.

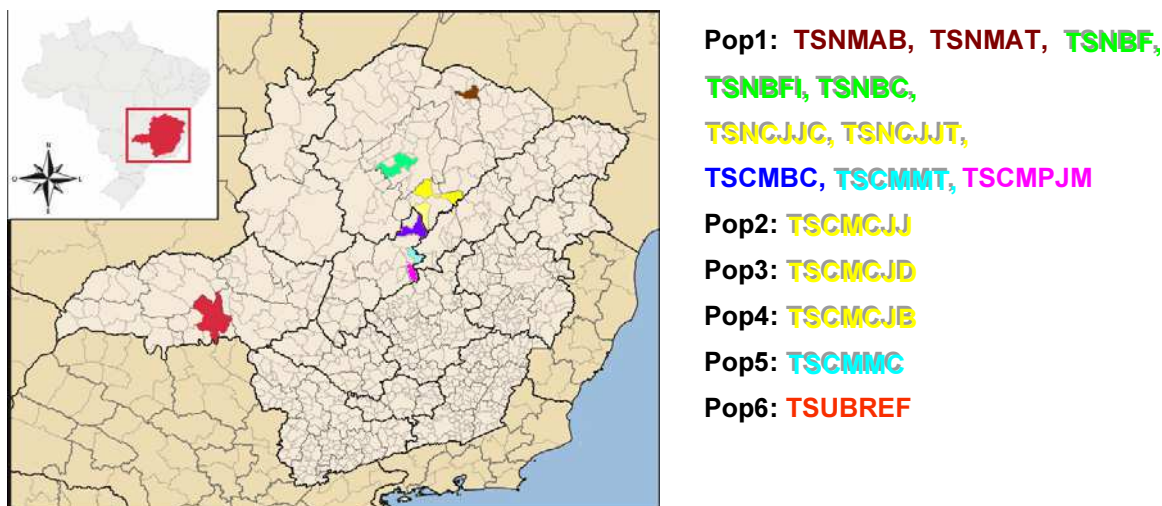
Inicialmente, as amostras foram consideradas como pertencentes a um único grupo. Para esta hierarquia a maior proporção de variação foi verificada dentro das populações (78,82%), sendo observado 21,18% entre as populações. Foi gerado um Fst de 0,212. O cálculo do Fst pareado para todas as localidades amostradas está apresentado na Tabela 10.

Tabela 10. Fst pareado para todas as localidades de coleta de *T. sordida* estudadas.

	TS NMAB	TS NMAT	TS NBF	TS NBF1	TS NBC	TS NCJJ	TS NCJJC	TS NCJJT	TS NCJD	TS NCJB	TS CMBC	TS CMMC	TS CMMT	TS CMPJM	TS UBREF
<i>TSNMAB</i>	-														
<i>TSNMAT</i>	0,076	-													
<i>TSNBF</i>	0,037	0,260*	-												
<i>TSNBF1</i>	-0,032	0,129*	-0,004	-											
<i>TSNBC</i>	0,064	0,025	0,246*	0,116*	-										
<i>TSNCJJ</i>	0,278*	0,233*	0,478*	0,333*	0,222*	-									
<i>TSNCJJC</i>	-0,014	0,070	0,101	0,006	0,058	0,244*	-								
<i>TSNCJJT</i>	-0,026	0,062	0,118	0,021	0,070	0,256*	0,008	-							
<i>TSNCJD</i>	0,191*	0,170*	0,456*	0,311*	0,176*	0,311*	0,222*	0,148*	-						
<i>TSNCJB</i>	0,178*	0,133*	0,378*	0,233*	0,122*	0,233*	0,144*	0,156*	0,211*	-					
<i>TSCMBC</i>	-0,032	0,129*	-0,004	-0,042	0,116*	0,333*	0,006	0,021	0,311*	0,233*	-				
<i>TSCMMC</i>	0,289*	0,244*	0,489*	0,344*	0,233*	0,344*	0,256*	0,267*	0,322*	0,244*	0,317*	-			
<i>TSCMMT</i>	-0,007	0,190*	-0,010	-0,015	0,186*	0,411*	0,059	0,048	0,357*	0,311*	-0,015	0,422*	-		
<i>TSCMPJM</i>	-0,016	0,141*	0,017	-0,024	0,129*	0,344*	0,021	0,035	0,322*	0,244*	-0,024	0,356*	0,004	-	
<i>TSUBREF</i>	0,222*	0,458*	0,056	0,167	0,444*	0,667*	0,296*	0,315*	0,644*	0,567*	0,167	0,678*	0,148	0,194	-

Nota: Fst = Índice de endocruzamento; * P<0,05 (3024 permutações).

A análise do Fst pareado identificou seis populações geneticamente diferenciadas: (pop. 1) TSNMAB, TSNMAT, TSNBF, TSNBF1, TSNBC, TSNCJJC, TSNCJJT, TSCMBC, TSMT e TSCMPJM; (pop.2) TSNCJJ; (pop.3) TSNCJD; (pop.4) TSNCJB; (pop.5) TSCMMC e (pop.6) TSUBREF (Figura 11). A maior proporção de variação foi observada dentro das populações (70,62%), enquanto que entre as populações dentro dos grupos foi observada apenas 5,12% de variação. Entre os grupos foram observados 24,27% de variação. O Fst foi de 0,294.



Escala 1cm = 163.77 km Fonte: Wikipédia, 2007 (modificado)

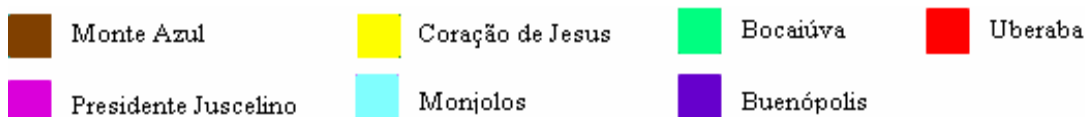


Figura 9. Populações geneticamente diferenciadas por meio do FST pareado para todas as localidades de coleta amostradas. AMOVA.

Outra hierarquia testada na análise AMOVA comparou as populações da mesorregião norte, central mineira e a linhagem de referência de suscetibilidade de Uberaba (Tabela 9). Verificou-se 77,65% de variação dentro das populações, 19,31% entre populações dentro dos grupos e 3,04% entre os grupos.

Após os resultados obtidos através da AMOVA, a variabilidade genética foi estudada para as seis populações diferenciadas geneticamente. O maior número de sítios polimórficos foi observado na pop1 ($S = 47$), dos quais 25 foram singletons. O maior valor de P_i (0,0089) e de K (2,82) foi observado na pop. 2. O maior número de haplótipos foi observado na pop. 1 ($H = 34$), e a maior diversidade de haplótipos foi observada na pop.4 ($H_d = 0,867$). A pop. 6, composta pelos insetos da linhagem referência de suscetibilidade, não apresentou variabilidade sendo constituída por um único haplótipo. Deste modo, foram gerados valores nulos para todos os demais parâmetros (Tabela 11).

Tabela 11. Variabilidade genética das populações de *T. sordida* estudadas.

Populações	n	k	Pi	S	ηS	H	Hd
Pop1	100	2,06	0,0065	47	25	34	0,746
Pop2	10	2,82	0,0089	11	7	5	0,667
Pop3	10	1,51	0,0048	4	2	4	0,711
Pop4	10	1,96	0,0062	9	8	7	0,867
Pop5	10	0,76	0,0024	2	1	3	0,644
Pop6	10	0,00	0,0000	0	0	1	0,000
TOTAL	150	2,45	0,0077	54	26	50	0,831

Nota: Pop. 1: TSNMAB, TSNMAT, TSNBF, TSNBFI, TSNBC, TSNCJJC, TSNCJJT, TSCMBC, TSCMMT e TSCMPJM; Pop.2: TSNCJJ; Pop.3: TSNCJD; Pop.4: TSNCJB; Pop.5: TSCMMC e Pop.6: TSUBREF.

Nos 150 espécimes de *T. sordida* analisados (seqüências ainda não depositadas no GenBank) foram detectados 50 haplótipos, gerando uma diversidade de 0,831 (Tabela 13).

A análise dos haplótipos demonstrou que 54 dos 317 sítios eram polimórficos (17,03 %) sendo 28 parsimônio-informativos e 26 singletons. As substituições do tipo transição e transversão ocorreram em 20 e 26 das mutações, respectivamente. Também ocorreram oito substituições mistas, aquelas onde eram encontradas substituições dos dois tipos. Estes dados geraram uma taxa transição/transversão de 0,77. Na análise das seqüências de aminoácidos preditas, correspondentes aos haplótipos, foram observadas 27 substituições nos 105 aminoácidos (25,71 %).

Os valores obtidos por meio dos três testes de neutralidade (teste D de Tajima, teste D* e teste F* de Fu & Li) demonstraram que a variabilidade genética das populações 2, 3, 4 e 5 se mantêm estatisticamente dentro da neutralidade. Na população 1 estes testes apresentaram valores estatisticamente fora da neutralidade, negativos, evidenciando a ocorrência de expansão populacional (Tabela 12).

Tabela 12. Testes de neutralidade aplicados às populações de *T. sordida* estudadas: Teste D de Tajima, Teste D* e Teste F* de Fu & Li.

Populações	Teste D de Tajima	Teste D* de Fu e Li	Teste F* de Fu e Li
Pop1	-2,44428*	-3,71030**	-3,83625**
Pop2	-1,22774	-0,91303	-1,11483
Pop3	0,26384	-0,33833	-0,21425
Pop4	-1,68719	-1,81276	-2,00290
Pop5	0,22171	-0,28020	-0,17736
Pop6	n/c	n/c	n/c
TOTAL	-2,29109*	-4,09645**	-3,98998**

Nota: Pop.1: TSNMAB, TSNMAT, TSNBF, TSNBFI, TSNBC, TSNCJJC, TSNCJJT, TSCMBC, TSCMMT e TSCMPJM; Pop.2: TSNCJJ; Pop.3: TSNCJD; Pop.4: TSNCJB; Pop.5: TSCMMC e Pop.6: TSUBREF.; Valores estatisticamente significantes: * P<0,01 e **P<0,02.

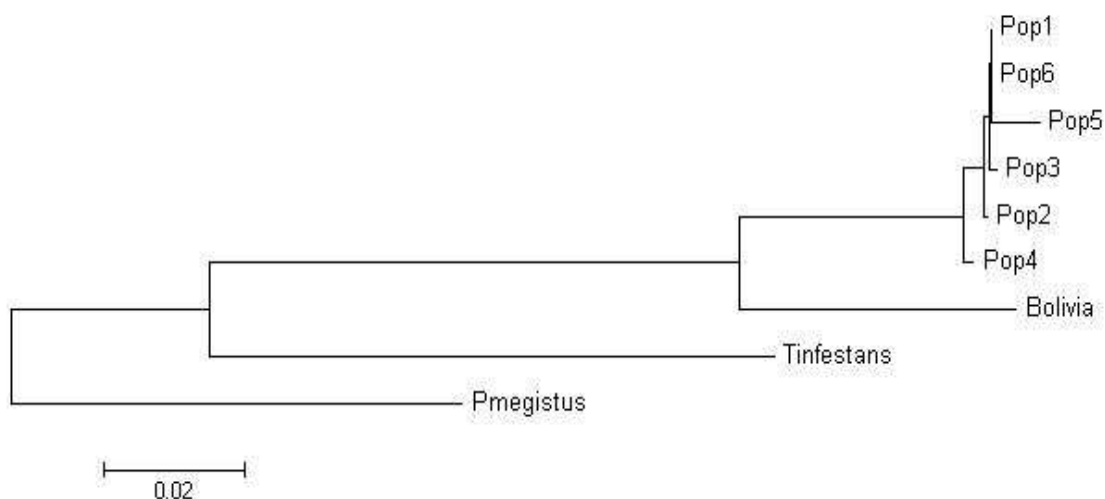
As freqüências dos haplótipos, de acordo com as populações estudadas, estão descritas na Tabela 13. O haplótipo mais freqüente foi do número 1. Ele foi compartilhado entre as populações 1 e 6. Os haplótipos de número 2, 5 e 7 também foram compartilhados entre duas localidades. Na pop. 1 o haplótipo mais freqüente foi o de número 1. Na pop. 2 o haplótipo mais freqüente foi o de número 3, na pop.3 foi o de número 2, na pop.4 foi o de número 8 e na pop.5 foi o de número 6. Os demais haplótipos foram encontrados em baixas freqüências.

Tabela 13. Distribuição e freqüência dos haplótipos do gene mtCytB encontrados nas populações de *Triatoma sordida* estudadas.

	Pop.1	Pop.2	Pop.3	Pop.4	Pop.5	Pop.6
1 (0,5)	-	-	-	-	-	1 (1)
2 (0,05)	-	-	2 (0,5)	-	-	-
5 (0,01)	-	-	-	-	5 (0,4)	-
7 (0,02)	-	-	7 (0,3)	-	-	-
4 (0,05)	16 (0,01)	24 (0,01)	36 (0,01)	3 (0,6)	37 (0,1)	8 (0,4)
9 (0,03)	17 (0,01)	25 (0,01)	45 (0,01)	27 (0,1)	38 (0,1)	39 (0,1)
10 (0,02)	18 (0,01)	26 (0,01)	46 (0,01)	28 (0,1)	-	40 (0,1)
11 (0,02)	19 (0,01)	31 (0,01)	47 (0,01)	29 (0,1)	-	41 (0,1)
12 (0,02)	20 (0,01)	32 (0,01)	49 (0,01)	30 (0,1)	-	42 (0,1)
13 (0,02)	21 (0,01)	33 (0,01)	50 (0,01)	-	-	43 (0,1)
14 (0,02)	22 (0,01)	34 (0,01)	-	-	-	44 (0,1)
15 (0,02)	23 (0,01)	35 (0,01)	-	-	-	-

Nota: Pop.1: TSNMAB, TSNMAT, TSNBF, TSNBFI, TSNBC, TSNCJJC, TSNCJJT, TSCMBC, TSCMMT e TSCMPJM; Pop.2: TSNCJJ; Pop.3: TSNCJD; Pop.4: TSNCJB; Pop.5: TSCMMC e Pop.6: TSUBREF.

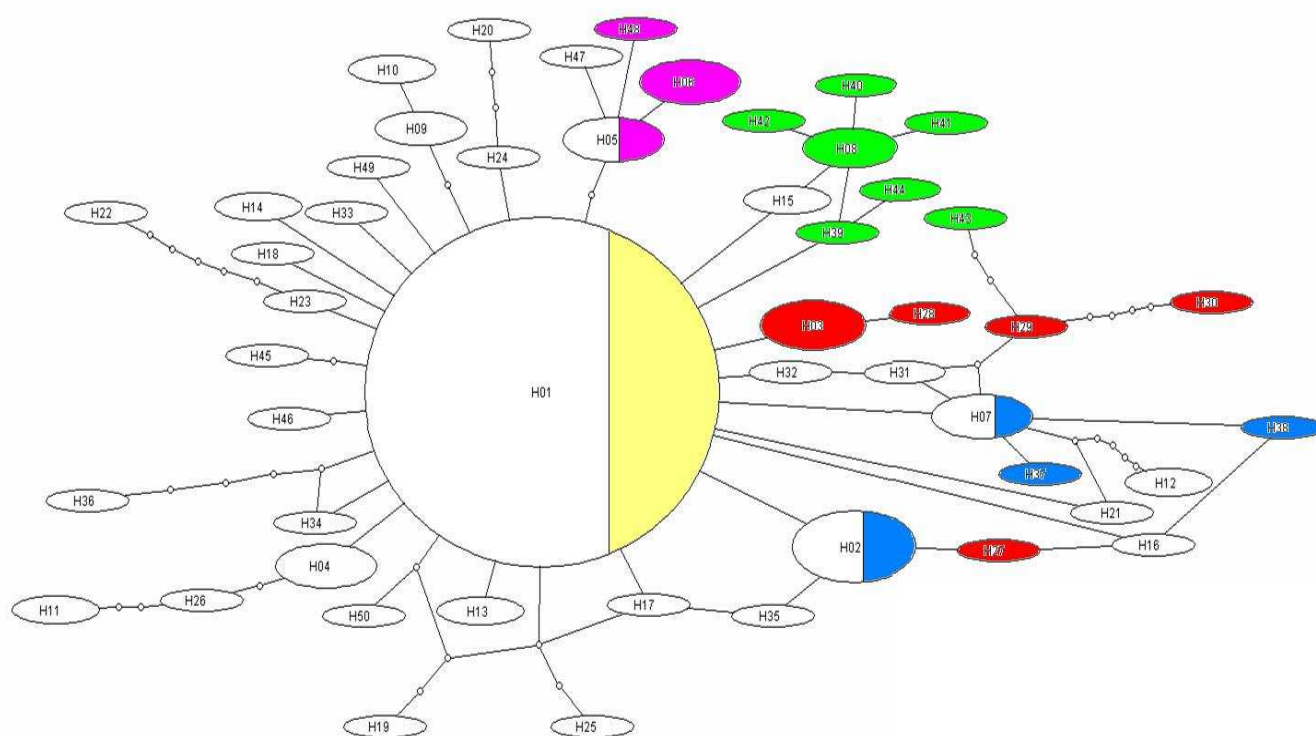
As amostras de Minas Gerais foram agrupadas separadas do espécime da Bolívia (única seqüência de mtCyTB de *T. sordida* disponível no GenBank). *P. megistus* foi utilizado como grupo externo e *T. infestans* como grupo irmão. Não foi observada a formação de clados. (Figura 10).



Nota: Pop.1: TSNMAB, TSNMAT, TSNBF, TSNBFI, TSNBC, TSNCJJC, TSNCJJT, TSCMBC, TSCMMT e TSCMPJM; Pop.2: TSNCJJ; Pop.3: TSNCJD; Pop.4: TSNCJB; Pop.5: TSCMMC e Pop.6: TSUBREF.

Figura 10. Dendrograma neighbor-joining construído a partir das distâncias genéticas pareadas observadas entre as populações de *Triatoma sordida* de Minas Gerais estudadas. *Panstrongylus megistus* foi utilizado como grupo externo, e *Triatoma infestans* como grupo irmão. A escala representa a distância genética

Na representação Network verificam-se vários *loops*, indicando homoplasia e ocorrência de mutações reversas/paralelas (Posada & Crandall, 2001). Em todo network são observados poucos haplótipos perdidos/não amostrados e não existe a formação de nenhum grupo isolado. Existem quatro haplótipos compartilhados entre as populações sendo o de número 1 o mais freqüente (Figura 11).



Nota: Pop.1: TSNMAB, TSNMAT, TSNBF, TSNBFI, TSNBC, TSNCJJC, TSNCJJT, TSCMBC, TSCMMT e TSCMPJM; Pop.2: TSNCJJ; Pop.3: TSNCJD; Pop.4: TSNCJB; Pop.5: TSCMMC e Pop.6: TSUBREF.

Figura 11. Network dos haplótipos do gene mtCytB observados entre as populações de *Triatoma sordida* de Minas Gerais estudadas. Elipses brancas representam os haplótipos observados na pop. 1; vermelhas, os observados na pop. 2; azuis, os observados na pop. 3; verdes, os observados na pop. 4; e rosas, os observados na pop. 5. A área amarela representa a população 6 com apenas um haplótipo.

DISCUSSÃO

Até recentemente, a resistência de triatomíneos a inseticida era considerada pontual e com pouca chance de ocorrer, já que o ciclo destes insetos é bastante longo, apresentando menor oportunidade de selecionar indivíduos resistentes (Brown & Paul, 1971; Champ & Dyte, 1976; Pacheco *et al.*, 1990).

Considerando tal pressuposto, o encontro de populações de *T. infestans* com RR>100 na Argentina (Picollo *et al.*, 2005) causou grande impacto, desafiando cientistas e sanitaristas na busca de novas alternativas para o controle vetorial. A resistência a inseticidas assumiu prioridade no contexto da doença de Chagas demandando ser mais bem caracterizada e delimitada.

O presente trabalho foi suscitado pelo encontro de populações brasileiras de *T. infestans* resistentes a Deltametrina (Vassena *et al.*, 2000), e representa a primeira iniciativa de caracterização da suscetibilidade de populações brasileiras de *T. sordida* aos piretróides.

A necessidade de padronização das metodologias para estudo de resistência a inseticida é etapa fundamental para implementação do monitoramento de rotina das populações triatomínicas, e deve ser considerada estratégica para o programa de controle. Em 2005, no Panamá, foi realizada a “II Reunion técnica latinoamericana de monitoreo de resistencia a insecticidas en triatominos vectores de Chagas” com o propósito de padronizar os ensaios biológicos de monitoramento de resistência de triatomíneos a inseticidas em laboratório.

Frente a grande diversidade de metodologias utilizadas e aqui exemplificadas, optamos neste trabalho em conduzir nossos estudos de acordo com WHO (1994) e (OPS, 2005), redefinindo os seguintes detalhes técnicos: dose diagnóstica ideal para triagem de resistência em triatomíneos, local ideal de aplicação do inseticida nas ninfas I, idade e geração dos insetos utilizados.

Com relação à escolha da dose diagnóstica ideal a ser utilizada em ensaios de monitoramento de resistência de triatomíneos a inseticidas em laboratório, a WHO (1994) e OPS (2005) preconizam o uso de uma dose diagnóstico (DD) referente à 1xDL99 da linhagem referência de suscetibilidade. A sobrevivência, em resposta a essa DD, de no mínimo um inseto em dois dos três ensaios com 10 ninfas I deve ser interpretado como indicativo de resistência justificando a necessidade do

estabelecimento das concentrações letais para esta população, e conseqüente, razões de resistência.

A metodologia preconizada para triatomíneos é diferente da utilizada no monitoramento de resistência a inseticidas com mosquitos. Nesse caso, a dose diagnóstica utilizada é de 2xDL99 da linhagem referência de suscetibilidade. Mortalidade superior a 98% e inferior a 80% indicam suscetibilidade e resistência estabelecida, respectivamente. Mortalidade entre 80 e 98% sugere resistência incipiente, apontando para a necessidade de vigilância entomológica e monitoramento da resistência desta população (WHO, 1981).

Hemingway *et al.* (2004) acreditam que a eleição de uma dose diagnóstica de 2xDL99 da população referência de suscetibilidade elimina mais de 50% dos indivíduos resistentes, comprometendo, deste modo a eficiência dos bioensaios. Nestes casos o melhor método de monitoramento para detectar resistência é o uso de uma dose que mate 99% dos suscetíveis, que é um compromisso entre a baixa sobrevivência dos suscetíveis e a baixa mortalidade dos resistentes. O aumento da dose discriminante para duas ou três vezes a DL99 representa risco de alta mortalidade dos resistentes, como verificado em estudos feitos por Dennehy *et al.* (1983).

Comparando as duas doses diagnósticas aqui testadas (1xDL99 e 2xDL99) observou-se que a DD 2xDL99 respondeu de forma inadequada, mascarando a alteração de suscetibilidade em todas as populações e a conseqüente necessidade de monitoramento da resistência das mesmas. A mortalidade foi de 100% para todas as populações estudadas, excetuando "TSNBFI" (6,6%).

Deste modo, nossos resultados corroboram com WHO (1994), OPS (2005) e Dennehy *et al.* (1983) sendo acertada o uso da DD 1xDL99 da linhagem referência de suscetibilidade na triagem inicial de populações de campo de triatomíneos em estudos de resistência a inseticida.

Ressaltamos que a dose diagnóstica permite discriminar o vigor da linhagem referência de suscetibilidade (laboratorial) e o da população de campo. A dificuldade está em se definir qual o limiar de risco acima do qual há comprometimento do controle em campo. Observando as razões de resistência obtidas neste trabalho e considerando que, segundo OPS (2005), somente $RR > 5$ indica resistência, uma possibilidade operacional seria usar 1xDL99 como DD e considerar percentuais de

sobrevivência diferentes dos preconizados pela WHO(1994) como indicativo de resistência.

Segundo a WHO (1994) a sobrevivência de um inseto em um total de trinta submetidos a DD 1XDL99 da linhagem referência de suscetibilidade, indica possibilidade de resistência a inseticida, justificando o monitoramento. Considerando as razões de resistência obtidas neste trabalho, quando a sobrevivência for igual ou superior a 10% justifica-se a necessidade de monitoramento da resistência em laboratório.

Segundo protocolo da WHO (1994), o monitoramento de resistência a inseticidas em laboratório deve ser realizado com triatomíneos preferencialmente da geração F1 do material coletado em campo, uma vez que isto permite avaliar se a resistência detectada possui origem genética. A aplicação do inseticida deve ser do tipo tópica, no dorso do abdômen de ninfas I, com cinco a sete dias de idade e em jejum (peso de 1,2 +/- 0,2 g).

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram não existir diferenças estatísticas significativas em ensaios biológicos realizados com insetos da geração F1 ou F2. Isto se torna pertinente e aplicável na prática do monitoramento em laboratório, considerando que o número dos insetos coletados em campo geralmente se apresenta reduzido, dificultando ou até mesmo inviabilizando a geração de ninfas I em número suficiente para a realização de ensaios biológicos.

A aplicação tópica do inseticida no dorso ou no ventre do abdômen de ninfas I, mantendo-se as demais condições experimentais inalteradas, não resultou em diferenças estatísticas significativas. Este resultado representa praticidade operacional durante a aplicação do inseticida, pois algumas ninfas, no decorrer do experimento, provavelmente afetadas pelo odor da acetona na qual foi eluída o inseticida, voltam a parte ventral do abdômen para cima de modo a permitir maior ventilação em seus espiráculos. Este comportamento obriga o experimentador a desvirá-la para, em seguida, fazer a aplicação do inseticida.

Os ensaios biológicos com ninfas I de um, três e cinco dias de idade, não revelaram diferenças estatísticas entre ninfas com um e cinco dias de vida. Contudo, ambas se diferenciaram de ninfas com três dias de idade, na qual as DL50 e DL95 apresentaram-se maiores, revelando maior resistência destas ao inseticida.

A maior suscetibilidade das ninfas I de um dia de vida ao inseticida pode estar relacionada à uma maior penetração do inseticida na cutícula do inseto que ainda se encontra em formação, estando conseqüentemente mais suscetível a fatores externos. É possível que ninfas I de 1 dia de idade não sejam conduzidas à morte devido a uma maior reserva energética oriunda dos ovos, que pode ser alocada na produção de enzimas detoxificativas. Nosso grupo já está estudando esta hipótese.

A partir do terceiro dia de idade as ninfas apresentam um exoesqueleto já definido além de uma reserva energética ainda considerável, oriunda ainda dos ovos, o que justifica sua maior resistência ao inseticida. No quinto dia de vida, a ninfa apesar de apresentar seu exoesqueleto já definido, apresenta pouca ou nenhuma reserva energética, justificando sua maior fragilidade frente ao inseticida.

Mougabure Cueto *et al.* (2005) investigaram a atividade inseticida de 1-dodecanol sobre o desenvolvimento da cutícula em *R. prolixus* e *T. infestans*. As ninfas I recém eclodidas (1-3 horas de idade) foram mais sensíveis que as mais velhas (24-36 horas de idade) indicando a cutícula como uma importante variável na intoxicação dos triatomíneos e uma primeira barreira a ser vencida pelo inseticida para o encontro do mesmo com seu sítio alvo. Ensaio realizados com adultos não revelaram diferenças da atividade inseticida quando o efeito da barreira da cutícula foi anulado.

Nossos resultados demonstraram que todas as populações de *T. sordida* estudadas apresentaram-se menos suscetíveis ao inseticida quando comparadas com a linhagem referência de suscetibilidade, com razão de resistência variando de 2,6 a 6,8. Contudo, é importante ter em mente que os resultados de laboratório são bons indicadores, às vezes essenciais, para os ensaios de campo, mas não devem substituí-los.

Foi possível observar que a porcentagem de recuperação do efeito *knockdown* apresenta relação diretamente proporcional com a razão de resistência da população. Deste modo, a população que menor apresentou recuperação foi à linhagem referência de suscetibilidade e as que maior apresentaram foram as “TSCMPJM” (RR 5,5) e “TSNCJB” (RR 6,8). Trata-se de um dado, até então, não reportado na literatura.

Uma possível causa das RRs aqui verificadas pode ser atribuída ao uso contínuo de piretróides no Brasil, como descrito por Vassena *et al.* (2000), em

estudo realizado com populações brasileiras de *T. infestans* do Rio Grande do Sul e em populações venezuelanas de *R. prolixus*. Testes de suscetibilidade em laboratório foram realizados com os piretróides β -cipermetrina, Deltametrina, β -ciflutrina, Cipermetrina e Lambdacialotina. *T. infestans* apresentou RR variando de 1,7 a 7,0, atribuídas ao uso intensivo de Deltametrina (RR 7,0), Cipermetrina (RR 3,3) e a um menor uso de Lambda-cialotrina (RR1,7) pelo PCDCh no Brasil desde 1982. *R. prolixus* apresentou RR variando de 3,0 a 12,4. Considerando que o controle vetorial dos triatomíneos na Venezuela foi realizado utilizando organoclorados, a resistência a piretróides encontrada pode ser atribuída ao uso intensivo deste grupo de inseticida na agricultura.

As RRs aqui obtidas podem também ser explicadas por inseticidas anteriormente utilizados, como o DDT, que apresenta o mesmo mecanismo de ação dos piretróides. Estudos com *Blatella germânica* (Dyctioptera, Blattellidae) têm comprovado a presença de resistência cruzada entre piretróides e DDT por meio do mecanismo de resistência do tipo *Knockdown resistance* - kdr (insensibilidade do sítio de ação) (Siegfried & Scott, 1992).

Outra possível causa das RRs verificadas neste trabalho pode ser atribuída às falhas de controle realizado pelo PCDCh no Brasil desde o início da década de 40.

As falhas de controle segundo OPS (2005), podem ser ocasionadas pela ausência de eficácia do inseticida, por falhas operacionais e/ou por condicionantes ambientais. A ausência de eficácia do inseticida está relacionada a má qualidade do ingrediente ativo e/ou formulação inadequada. As falhas operacionais abrangem erros de diluição do inseticida, falhas nas aplicações bem como, problemas com as máquinas de borrifação. As condicionantes ambientais dizem respeito ao efeito da radiação ultravioleta, da chuva, da excessiva salinidade da solução, das características do substrato na qual o inseticida é aplicado e/ou nas condições físicas da habitação favoráveis a permanência do inseto.

Piccollo *et al.* (2005) relataram em 2002 populações argentinas de *T. infestans* de El Chorro, La Toma, El Sauzal e Salvador Mazza com razões de resistência para deltametrina de 99.0, 89.6, 50.5 e 133.1, respectivamente. Comparações da RR de insetos de mesma localidade obtidas em 1999 sugerem falhas de controle no campo como possível causa da resistência encontrada.

A OPS (2005) propõe a estratégia abaixo como suporte para tomada de decisões na interpretação das razões de resistência encontrados em ensaios de monitoramento de resistência de triatomíneos a inseticidas em laboratório:

- Para $RR \leq 5$ se considera que a alteração de suscetibilidade encontrada é produzida por variações individuais e que não justificam falhas no controle. Recomenda-se, então, continuar o controle com o mesmo inseticida utilizado e manter o monitoramento da resistência.
- Para $RR > 5$ se considera que existe resistência em progresso, sendo necessário avaliar as falhas de controle no campo. Caso confirmadas as falhas de controle, é necessário trocar o inseticida para outro com modo de ação distinto. Caso não se confirmem as falhas no campo deve-se permanecer com o mesmo inseticida e intensificar o monitoramento da resistência realizando avaliações entomológicas com um mês e doze meses após a borrifração.
- Para $RR \geq 20$ se considera que a resistência está estabelecida sendo recomendada a troca do inseticida por outro de modo de ação distinto.

Considerando que o tempo médio de um ciclo de barbeiros é de 1 ano atrelado ao período de borrifração respeitando o intervalo de 12 meses, para fins operacionais acreditamos na necessidade de monitoramento das populações a cada 2 anos de modo a avaliar a dinâmica da resistência.

Segundo o método de categorização proposto pela OPS (2005), das quatorze populações aqui estudadas, nove apresentaram $RR < 5$, ou seja, os resultados refletiram variações individuais de suscetibilidade. As outras cinco populações apresentaram $RR \geq 5$, indicando resistência incipiente e apontando para a necessidade em se verificar possíveis falhas operacionais em campo. Contudo, ambas as situações, refletem a necessidade do monitoramento da suscetibilidade dos triatomíneos de modo a acompanhar possíveis alterações ao longo do tempo.

Para se utilizar o critério de categorização da resistência proposto pela OPS (2005) torna-se necessário a padronização e adoção de um formulário a ser utilizado em campo, de modo a informar sobre possíveis falhas de controle verificadas desde a diluição do inseticida até a borrifração. Essa informação auxiliará o PCDCh não só no monitoramento da resistência de triatomíneos a inseticidas como também na otimização dos recursos fomentados pelo programa.

Referindo-se ainda a falhas de controle em campo, Diotaiuti & Pinto (1991) sugerem que a resistência de *T. sordida* pode ser atribuída a aspectos comportamentais deste triatomíneo. Sua predominância em complexos peridomicílios como em montes de lenha, galinheiros, etc, cujas superfícies não podem ser totalmente recobertas pelo inseticida, permitem a permanência de exemplares livres de contato com o produto químico e/ou em contato com sub-doses favorecendo a sua multiplicação nestes ecótopos, ou mesmo permitindo reinfestação por exemplares de procedência silvestre (Diotaiuti *et al.*, 1988; Diotaiuti & Dias, 1988).

Devem-se considerar ainda como possíveis mecanismos causais das razões de resistência aqui encontradas uma maior metabolização do inseticida pelo triatomíneo por meio de uma superatividade de enzimas detoxificativas conforme estudos de Audino *et al.* (2004) e Vassena *et al.* (2000) e/ou ainda alterações no sítio de ação dos inseticidas utilizados (Yu, 1987,1988).

Vassena *et al.* (2000) atribuíram ao aumento da atividade de oxidases como possível causa de resistência a Deltametrina em populações brasileiras de *T. infestans* e venezuelas de *R. prolixus*. Audino *et al.* (2004) observaram o mesmo em populações argentinas de *T. infestans*.

Com o objetivo de se obter um melhor entendimento da natureza bioquímica das RRs encontradas nas populações de *T. sordida* estudadas, nosso grupo iniciou estudos referentes a quantificação das enzimas detoxificativas esterases, glutational-s-transferase e oxidases de função mista.

Ainda neste trabalho procuramos verificar a relação entre as razões de resistência encontradas e o perfil genético das populações de *T. sordida* estudadas.

A variabilidade genética de uma população quando associada à sua razão de resistência, possibilita inferências sobre futuras alterações da suscetibilidade desta população em relação aos inseticidas utilizados. Deste modo, uma população que apresenta pequena variabilidade genética revela reduzidas chances de alterar sua RR ao inseticida utilizado ao longo do tempo. Ao contrário, uma população com grande variabilidade genética apresenta maiores chances de alterar sua RR, justificando ainda mais a necessidade de monitoramento da resistência da mesma. A interpretação do *slope* possibilita inferir sobre o grau de variabilidade genética de certa população (Brongdon & Mcallister, 1998).

O *slope* se refere ao coeficiente angular da reta formada entre as doses de inseticida aplicadas na população e sua conseqüente taxa de mortalidade. O *slope* da população de campo, quando comparado ao *Slope* da linhagem referência de suscetibilidade, fornece informações sobre o grau de variabilidade genética da população estudada para esta característica específica (*ib. ibid.*).

Das quatorze populações de *T. sordida* estudadas, apenas três (TSNMAT RR3,5, TSNCJB RR6,8 e TSNBC RR5,8) apresentaram *Slope* maior que o da linhagem referência de suscetibilidade, refletindo deste modo, menor variabilidade genética destas três populações em relação à linhagem referência. Todas as demais populações revelaram *slope* igual ou inferior ao da linhagem referência de suscetibilidade, revelando variabilidade genética semelhante ou superior ao da linhagem referência (*ib. ibid.*).

Comparações entre as razões de resistência 50% e 95% de uma população também fornecem informações sobre a variabilidade genética da mesma. Quanto maior for a diferença entre a RR50 e a RR95 da população, maior será a variabilidade genética desta população (*ib. ibid.*).

Deste modo, a interpretação das razões de resistência 50% e 95% das populações de *T. sordida* estudadas possibilitaram inferir que cinco populações estudadas (TSCMMC, TSCMBC, TSNMAT, TSNCJJC e TSNCJJT) são mais variáveis geneticamente. Estas populações ($RR50 < RR95$) apresentaram os menores níveis de resistência justificando, portanto, frente a sua variabilidade interna a pertinência do monitoramento da resistência das mesmas ao longo do tempo.

Por meio ainda de comparações entre as RRs 50 e 95 outras cinco populações estudadas (TSMCMT, TSMCPJM, TSNCJJ, TSNCJD e TSNBFI) apresentaram variabilidade genética semelhante a da linhagem referência de suscetibilidade. Estas populações ($RR50 = RR95$), devido à alta homogeneidade revelada, apresentam a razão de resistência próxima ao seu limiar máximo.

Comparações entre as RRs 50 e 95 de outras quatro populações ($RR50 > RR95$) não possibilitaram inferências.

Visando definir os padrões genéticos das populações estudadas, ensaios moleculares por sequenciamento do gene mtCytB foram realizados. Trata-se de um estudo inédito realizado com populações de *Triatoma sordida* brasileiras.

Monteiro *et al.* (1999) estudaram a diversidade genética de populações de *T. infestans* provenientes de Cochabamba e região sul do Chaco, Bolívia. Suas análises revelaram que os espécimes silvestres e domésticos de Cochabamba e sul do Chaco compartilham um único haplótipo, ou seja, nenhuma variabilidade genética.

Giordano *et al.* (2005) usaram a técnica do sequenciamento do gene mtCytB para definir a variabilidade genética e estrutura populacional de *T. infestans* de Chuquisaca, Bolívia. Foram analisados 62 espécimes de regiões rurais e periurbanas. Os sete haplótipos encontrados refletiram altos índices de diversidade genética estruturados dentre as localidades amostradas. Contudo, o número amostral foi reduzido, justificando a necessidade de outros estudos. Eles sugerem que a discrepância entre seus resultados e os obtidos por Monteiro *et al.* (1999) pode ser um indicativo que a diversidade genética do *T. infestans* em diferentes regiões da Bolívia seja influenciada pelo local de origem geográfica das populações, bem como características ecológicas e evolutivas das mesmas.

Neste trabalho o sequenciamento do gene mtCytB em 150 espécimes de *T. sordida* de Minas Gerais estudadas revelou um total de 50 haplótipos. A AMOVA diferenciou seis populações geneticamente distintas: (pop. 1) TSNMAB, TSNMAT, TSNBF, TSNBFI, TSNBC, TSNCJJC, TSNCJJT, TSCMBC, TSCMMT e TSCMPJM; (pop.2) TSNCJJ; (pop.3) TSNCJD; (pop.4) TSNCJB; (pop.5) TSCMMC e (pop.6) TSUBREF. Foi observada uma variação dentro das populações de 70,62%, entre as populações dentro dos grupos de 5,12%. Entre os grupos foram observados 24,27% de variação. Nesta hierarquia verificou-se um F_{st} de 0,294.

Os valores obtidos por meio dos três testes de neutralidade (teste D de Tajima, teste D^* e teste F^* de Fu & Li) demonstraram que a variabilidade genética de todas as populações estudadas se mostrou dentro da neutralidade. Somente na pop. 1 foi evidenciada a ocorrência de expansão populacional. A expansão populacional está relacionada com seleção de variações genéticas. Aquelas favoráveis à sobrevivência da população determinam uma expansão, enquanto aquelas desfavoráveis promovem uma seleção balanceadora, onde a população tende a ficar menos variável geneticamente.

Apesar de ser esperado que o nível de variabilidade genética fosse reduzido devido a grande redução da população submetida ao tratamento químico, nosso trabalho encontrou alta variabilidade genética.

Contudo, o sequenciamento do mtCytB, apesar de revelar alta diversidade genética entre as populações de *T. sordida* de Minas Gerais estudadas, não apresentou sensibilidade suficiente a ponto de possibilitar correlações entre os padrões genéticos das populações e as razões de resistência encontradas. É possível que gene de resistência tenha sido selecionado anterior ao gene mtCytB.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que correlacionem a resistência a inseticidas com a variabilidade genética das populações. Giordano *et al.* (2005) sugerem que os microssatélites podem ser uma ferramenta mais sensível e eficaz para discernir a estrutura genética das populações e fornecer informações sobre re-infestações subseqüentes às borrifações do inseticida. Contudo, ressalta-se que não existe tal ferramenta molecular padronizada para estudos com *T. sordida*.

Finalmente, consideramos que este trabalho permitiu a incorporação de metodologias de identificação / monitoramento da suscetibilidade/resistência de triatomíneos a inseticidas, que, complementadas com as técnicas de caracterização bioquímica da resistência, permitirão ao LATEC o desenvolvimento destas atividades como referência ao nível nacional.

Várias perguntas e questionamentos surgiram com este trabalho no que se refere ao estabelecimento de uma rotina de monitoramento de suscetibilidade/resistência em laboratório, revelando real demanda do desenvolvimento de técnicas e políticas a serem assumidas pelas gestões e políticos deste país. Nesse contexto, verifica-se a necessidade da avaliação dinâmica da resistência aos inseticidas no tempo, e da importância de se acumular dados de mesmas localidades em anos sucessivos.

CONCLUSÕES

- Para a realização de ensaios biológicos de monitoramento de resistência de triatomíneos a inseticidas em laboratório, foi observado que para *Triatoma sordida*: (a) a dose diagnóstica adequada para triagem de resistência em triatomíneos corresponde a 1xDL99 da linhagem referência de suscetibilidade, contudo, somente acima de 45% de sobrevivência deve ser considerado indicador de resistência; (b) os resultados dos bioensaios não são influenciados pelo local de aplicação do inseticida no abdomen da ninfa I (dorso ou ventre) e nem pela geração da mesma (F1 ou F2), (c) a idade da ninfa influencia na resposta ao inseticida, de modo que ninfas com 3 dias de vida são mais resistentes e as ninfas de 1 e 5 dias, mais suscetíveis.
- A linha base de suscetibilidade da linhagem referência de *T. sordida* a Deltametrina, revelou DL50 e DL95 de 0,0654 ng i.a./ninfa e de 0,2508 ng i.a./ninfa, respectivamente.
- Os ensaios biológicos revelaram que todas as quatorze populações de *T. sordida* estudadas apresentaram-se menos suscetíveis à Deltametrina quando comparadas com a linhagem referência de suscetibilidade. As razões de resistência variaram de 2,6 a 6,8.
- O percentual de recuperação do efeito *knockdown* na linhagem referência de suscetibilidade foi de 17%. Nas populações de *T. sordida* estudadas a recuperação variou de 24,4% a 70%.
- O estudo do gene mtCytB, por meio do método de análise de variância molecular – AMOVA, identificou seis populações geneticamente diferenciadas. Nos 150 espécimes de *T. sordida* analisados foram detectados 50 haplótipos, entretanto, não foi possível estabelecer correlação entre os padrões genéticos das populações estudadas e as razões de resistência encontradas.
- A conclusão deste projeto permitiu a incorporação de metodologias de identificação / monitoramento da suscetibilidade/resistência de triatomíneos a inseticidas, que, complementadas com as técnicas de caracterização bioquímica da resistência, permitirão ao LATEC o desenvolvimento destas atividades como referência ao nível nacional.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inquestionavelmente, os inseticidas utilizados no controle de enfermidades transmitidas por insetos vetores devem ser considerados ferramentas sanitárias necessárias.

Considerando tal pressuposto, nossos resultados indicam que a resistência de *T. sordida* de Minas Gerais a piretróides ainda não é um problema grave. Contudo, a detecção desta resistência, mesmo que incipiente, evidencia a necessidade de implementação de estratégias de manejo de modo a preservar a vida útil dos produtos utilizados na área domissanitária e garantir todo o sucesso do controle vetorial adquirido desde o início do PCDCh.

Neste contexto, torna-se mais do que necessária a implementação/aperfeiçoamento da vigilância entomológica dentro da estrutura do SUS contemplando as nuances sociais, ambientais e eco-epidemiológicas da saúde. Somado a isto ressalta-se também a necessidade da avaliação das atividades técnicas, operacionais e de gestão desenvolvidas em relação às normas técnicas já definidas por parte dos municípios que fazem o controle dos triatomíneos.

As atividades do monitoramento de suscetibilidade/resistência a inseticidas proporcionarão ao SUS informações relevantes que auxiliarão no controle racional dos vetores da doença de Chagas no país.

Os dados obtidos nesta dissertação podem esclarecer a situação de populações mineiras de *T. sordida* em relação à resistência a inseticidas, servindo de referência para outros trabalhos e ampliando os conhecimentos na área de resistência a inseticidas em triatomíneos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad-Franch F, Monteiro AF. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An Acad Bras Cienc* 2005; 77(3):437-454.

Apperson CS, Georghiou GP. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. *J Econ Biochem* 1979; 68: 63-781.

Audino PG, Vassena C, Barrios S, Zerba E, Picollo M. Role of enhanced detoxification in a deltamethrin-resistant population of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(3): 335-339.

Barretto MP, Albuquerque RDR, Funayama GK. Estudos sobre os reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi* In: XXXVI Investigações sobre triatomíneos de palmeiras no município de Uberaba, MG, Brasil. *Rev Brasil Biol* 1969. 29 (4): 577-588.

Behura SK. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Mol Ecol* 2006; 15: 3087–3113.

Brogdon WG, Mcallister JC. Insecticide resistance and vector control. Center for disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. *Emerg Infec Diseases* 1998; 4:4.

Brow AQ, Paul R. Insecticide resistance in arthropods. World Health Organization, WHO Monogr Geneva 1971; Ser 38.

BusvineJ, Barnes M. Observations on mortality among insects exposed to dry insecticidal films. *Bull Ent Res* 1947; 38:81-90.

Casabe N, Zerba E. Esterases of *Triatoma infestans* and its relationship with the metabolism of organophosphorous insecticides. *Comp Biochem Physiol* 1981; 68: 255-258.

Carrilo SJ. El empleo del Dieldrin en Venezuela. *Bol Of San Panam* 1954; 37:76-81.

Champ BR, Dyte K. FAO global survey of pesticide susceptibility of Stored Grain Pests. FAO/UN, Rome, 1976.

Clement M, Posada D, Crandall KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 2000; 9(10):1657-1659.

Cockburn JM. Laboratory investigations bearing on possible insecticide resistance in triatomines bugs. WHO/72.359. 1972.

Correa RR, De Lima AR, Da Rocha e Silva, EO. Resistência e suscetibilidade do *Triatoma infestans* e de outros triatomíneos transmissores da doença de Chagas, ao Dieldrin e ao Lindane. Anais XVII Congresso Brasileiro de Higiene, Salvador, Bahia 1968; 45-46.

De Queiroz Balbino V, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Melo MA, De Andrade PP, De Castro JA, Rebelo JM, Carvalho SM & Ramalho-Ortigao M. Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. Acta Trop 2006; 98(1): 15-24.

Dennehy TJ, Granett J, Leigh TF. Relevance of slide-dip and residual bioassay comparisons to detection of resistance in spider mites. J Entomol 1983; 76: 1225-1230.

Devonshire AL, Moores GD. Characterization of the insecticide insensitive acetylcholinesterase: microcomputer-based analysis of enzyme inhibition in homogenates of individual house-fly (*Musca domestica*) heads. Pestic Biochem Physiol 1984; 21:341-348.

Dias E, Pellegrino J. Alguns ensaios com o Gammexane no combate aos transmissores da doença de Chagas. Brasil Med 1948; 62: 85-191.

Dias JCP. Doença de Chagas: ambiente, participação e Estado. Cad Saúde Pública 2001; 17 (suppl): 165-169.

Dias JCP. O controle da doença de Chagas no Brasil. In: Silveira AC. O controle da Doença de Chagas nos países do Cone Sul da América: uma iniciativa internacional. Organização Pan-Americana da Saúde / Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. 316p, 2002.

Dias JCP. Chagas`Disease: Successes and Challenges. Cad Saúde Pública 2006; 22(10): 2020-2021.

Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas` disease control in Latin America: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97 (5): 603-612.

Diotaiuti L, Pinto CT. Suscetibilidade biológica do *Triatoma sordida* e *Triatoma infestans* a Deltametrina e Lambdacyalotrina em condições de campo. Ver Soc Bras Med Trop 1991; 24(3): 151-155.

Diotaiuti L, Azeredo BVM, Busek SCU, Fernandes AJ. Controle do *Triatoma sordida* no peridomicílio rural do município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 1998; 3(1).

Diotaiuti L, Carneiro M, Loiola CCP, Silveira Neto HV, Coutinho RM, Dias JCP. Alternativa de controle do *Triatoma sordida* no triângulo mineiro. I. Borrifação parcial (intradomicílio) no município de Douradoquara, MG, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1988; 21 (4): 199-203.

Diotaiuti L, Penido CM, Araújo HS, Schofield CJ, Pinto CT. Excito-repellency effect of Deltamethrin on triatomines under laboratory conditions. Rev Soc Bras Med Trop 2000; 33 (3): 247-252.

Diotaiuti L, Penido CM, Pires HR, Dias JCP. Dinâmica de alimentação e dejeção do *Triatoma sordida*. Rev Soc Bras Med Trop 1995; 28(3): 195-198.

Diotaiuti L, Ribeiro De Paula O, Falcão PL, Dias JC. Evaluation of the Chagas' disease vector control program in Minas Gerais, Brazil, with special reference to *Triatoma sordida*. Bull Pan Am Health Organ 1994; 28 (3): 211-219.

Diotaiuti L, Dias JCP. O peridomicílio no controle vetorial da doença de Chagas, com especial referência ao *Triatoma sordida* em Minas Gerais. In: Resumos da V Reunião de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas, Araxá 1988; p.79.

Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. Genetics 1992; 131: 479-491.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred: I. Accuracy assessment. Genome Research 1998; 8:175-185.

Finney DJ. Probit analysis. Ann Appl Biol 1971; 36:187-195.

Forattini OP, Silva EOR, Ferreira AO, Rabello EX, Pattoli DGB. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase Americana III-Dispersão local de triatomíneos com especial referência ao *Triatoma sordida*. Rev Saúde Pub 1971; 5: 193-205.

Fox I, Bayona IG, Orozco HI. The toxicity of DDT, Dieldrin, Malathion, and Fenthion to *Rhodnius prolixus* in the laboratory. Bull Wld Hlt Org 1966; 35: 974-976.

Fu Y-X, Li W-H. Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics 1993; 133: 693-709.

Fundação Nacional de Saúde, Coordenação de Minas Gerais. Relatório Técnico. 1995.

Giordano R, Cortez JCP, Paulk S, Stevens L. Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolívia base don the mitochondrial cytochrome b gene. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(7): 753-760.

González-Valdivieso FE, Diaz BS, Nocerino F. Susceptibility of *R. prolixus* to chlorinated hydrocarbon insecticides in Venezuela. WHO/VBC/71.264. 1971.

Hemingway J, Hawkes LM, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochemistry and Molecular Biology 2004; 34: 653-665.

Hervé, JJ. Mode of action of pyrethroids and resistance of these compounds. In. NOMINÉ G. Deltamethrin: monograph. Russel Uclaf. 412p,1982.

Jurberg J, Galvão C, Noireau F, Carcavallo RU, Rocha DS, LENT H. Uma iconografia dos triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae). Entomol Vect 2004; 11(3): 457 – 494.

Kimura M.. Evolutionary rate at the molecular level. Nature 1968; 217: 624-626.

Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 2004; 5:150-163.

Lines JD, Myamba J, Curtis CF. Experimental hut trials of Permethrin-impregnated mosquito nets and curtains against Malaria vectors in Tanzania. Med Vet Entomol 1987; 1: 37-51.

Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin JP, Beard CB. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomines vectors of Chagas` disease. *AM J Med Hyg* 1999; 60(3): 377-386.

Maquera Lupaca DA. Susceptibilidad de machos y hembras de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Triatominae) hacia el DDT, Lindano, Propoxur y Malation. Tesis para optar el grado de Magíster Scientiae, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Peru. 1980.

Mariconi FA. Inseticidas e seu emprego no combate às pragas. Agron Ceres Ltda. 2ed, São Paulo, 1963.

Mathenge EM, Gimning JE, Dolczak M, Ombok M, Irungu LW, Hawley WA. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behaviour, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. *J Med Entomol* 2001; 38, 531-536.

Mbogo CNM, Baya NM, Ofulla AVO, Githure JI, Snow RW. The impact of permethrin-impregnated bednets on Malaria vectors of the Kenyan coast. *Med Vet Entomol* 1996; 10, 251-259.

Milani R. Comportamento mendeliano della resistenza alta azione abbattante del DDT: correlazione abbattimento e mortalità in *Musca domestica*. *L Riv Parasitol* 1954; 15: 513-542.

Monteiro FA, Pérez R, Panzera F, Dujardin JP, Galvão C, Rocha D, Noireau F, Schofield C, Beard CB. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem Inst Osw Cruz* 1999; 94(I): 229-238.

Mouganbure Cueto G, Zerba E, Picollo MI. Biological effect of 1-dodecanol in teneral and post-teneral *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(1): 59-61.

Nelson MJ, Colmenares P. Topical application of insecticides to *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae) a Chagas` disease vector. WHO/VBC/79.737. 1979.

Nocerino F. Insecticide susceptibility of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma maculata* in Venezuela. WHO/VBC/75.565. 1975.

Nocerino F. Susceptibilidad de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata* a los insecticidas en Venezuela. Bol Inf Malar Saneam Amb 1976; 16: 276-283.

Oliveira Filho AM, Pinchin R, Melo MTV, Silva WS, Santos CE, Henny MA, Figueiredo MJ. Laboratory screening of 23 insecticides for triatomine control – Determination of LC50 and LC95 for *Panstrongylus megistus*. Ciencia e Cultura. 32 (supl), 1981.

Oliveira Filho AM, Pinghein R, Silva WS, Melo MTV, Santos CE, Henny MAS, Antunes MM. Toxicidade de inseticidas aos vetores da doença de Chagas. Ciência e Cultura. 32 (supl), 1980.

Oliveira Filho AM. Field tests of 3 formulations of Deltamethrin in houses colonized by *Triatoma infestans*. Proceedings of XI by Annual Meeting on Basic Research in Chagas` Disease, Caxambu, MG, Brazil.1984.

Oliveira Filho AM, Nelson TV, Santos CE, Figueiredo MJ, Silveira AC. Determinação das linhas básicas de suscetibilidade dos principais vetores da doença de Chagas no Brasil ao isômero Gama BHC. Pesquisa Básica em doença de Chagas. X Reunião Anual, Caxambu, MG, Brasil. 1988^a.

Oliveira Filho AM. Differences of susceptibility of five triatomine species to pyrethroid insecticides – implications of Chagas Disease vector control. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94(1): 425-428.

Oliveira Filho AM, Santos CE, Figueiredo MJ. Ensaio preliminares de suscetibilidade a BHC de triatomíneos brasileiros por meio da técnica de papéis impregnados. Ciências da Vida, Genética e Evolução, Ciência e Cultura. suppl: 728, 1988^b.

Organização Panamericana de Saúde. II Reunion técnica latinoamericana de monitoreo de resistencia a insecticidas en triatomíneos vectores de Chagas, Panamá, 11 al 13 de abril de 2005.

Pacheco IA, Sartori MR, Bolonhezi I. Resistance to Malathion, Pirimiphos-methyl and Fenitrothion in coleoptera from stored grains. Proceedings of the 5th International

Working Conference on Stored Product Protection (Ed. By Working Conference on Stored Product). 1990; p.1029-1037.

Picollo MI, Wood E, Zerba E, Licastro SA, Ruveda MA. Métodos de laboratório para medir la actividad de insecticidas en *Triatoma infestans*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 1976; 2: 67-71.

Picollo MI, Wood EJ, Zerba EN. Posibles factores de resistencia a mercaptotión en *Triatoma infestans*. VI Reunión Nacional de Investigadores de la Enfermedad de Chagas, E 16, Buenos Aires, Argentina. 1983.

Picollo MI, Vassena C, Orihuela PS, Barrios S, Zaidemberg M, Zerba E. High Resistance to Pyrethroid Insecticides Associated with Ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. J Med Entomol 2005; 42 :4637-642.

Pinchin R, Fanara DM, Oliveira Filho AM. A village scale trial of Pirimiphos-methyl (OMS 1424), wettable power and slow-release formulations, in comparison with HCH for the control of *Triatoma infestans* in Brazil. World Health Org., VBC/82.840, 8ps. 1984.

Pinchin R, Oliveira Filho AM, Pereira ACB. The flushing-out activity of pyrethrum and synthetic pyrethroids on *Panstrongylus megistus*. Trans. Roy. Soc Trop Med Hyg 1980; 74:801-803.

Pires HHR, Barbosa SE, Diotaiuti L. Comparative developmental and susceptibility to insecticide of bolivian and brazilian populations of *Triatoma infestans*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2000; 95(6): 883-888.

Posada D, Crandall KA. Selecting the Best-Fit Model of Nucleotide Substitution. In: Systematic Biology 2001; 50 (4): 580-601.

Ranson H, Clauydivanos C, Ortelli F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. Science 2002; 298:179-181.

Rocha & Silva EO. Profilaxia. In: Brener Z, Andrade Z. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, Guanabara Koogan.1979; 463 pp

Rozas J, Sánchez-Delbarrio, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 2003; 19: 2496-2497.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987; 4:406-425.

Schaeferd CW. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): systematic questions and some others. *Neotrop Entomol* 2003; 32: 1-9.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *TRENDS in parasitology* 2006; 22(12): 583-588.

Shenone H, Zomosa E, Villarroel F, Rojas A, Alfaro E, Queiroz M. Acción de 7 formulaciones de insecticidas sobre *Triatoma infestans* criados em laboratório. *Bol. Chileno Parasit* 1972; 27:14-22.

Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin ver 2.01: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry laboratory, University of Geneva, Switzerland. 2000.

Siegfried BD, Scott JG. Insecticide resistance mechanisms in the German Cockroach , *Blattella germanica* (L.): 219-230. In: Mullin CA & Scott JG. Molecular mechanisms of insecticide resistance: diversity among insects. New York, American Chemical Society. 1992.

Silva EOR, Dias JR, Guarita OF. Suspensão do rociado no combate ao *Triatoma infestans* em áreas do estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1969; 3: 173-18.

Silveira AC. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. *Cadernos de Saúde Pública* 2000; 16 (2).

Silveira AC, Rezende DF. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994; 27(3): 11-22.

Silveira AC, Souza PC, Silveira Neto HV. Importância de espécies secundárias de triatomíneos na transmissão domiciliar da doença de Chagas no Triângulo Mineiro e

Alto Paranaíba. In: XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Fortaleza. 1993; p.200.

Simon C, Fratti F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 1994; 87:651-701.

Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 1989; 123: 585-595.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997; 24:4876-4882.

Vassena CV; Picollo MI, Zerba EN. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med Vet Entomol* 2000; 14(1): 51-55.

Villela MM, Souza JB, Mello VP, Azeredo BVM, Dias JCP. Vigilância Entomológica da doença de Chagas na região centro-oeste de Minas Gerais, Brasil, entre os anos de 2000 e 2003. *Cad Saúde Pública* 2005; 21(3):1-14.

www.ncbi.nlm.nih.gov. Acessado em 24/03/2006.

www.sucen.sp.gov.br/.../chagas/t_sordida_gde.jpg. Acessado em 25/05/06.

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Uberaba>. Acessado em 26/12/2007

www.seqtools.dk. Acessado em 24/03/2006.

Wood EJ, Picollo DE, Villar MI, Melgar F, Zerba EN. Mode of action of organophosphorus insecticides in *Triatoma infestans*. *An Assoc Quim Argent* 1982; 70: 801.

World Health Organization. Criteria and meaning of tests for determining the susceptibility or resistance of insects to insecticides. *VBC/81.6*. 1981.

World Health Organization. Taller sobre la evaluación de efecto insecticida sobre triatomíneos. In: Workshop on the insecticide effect evaluation in triatomíneos. Buenos Aires, Argentina. *Acta Toxicol Argentina* 1994; 2 (1):29-33.

World Health Organization. Insects' vectors and human health: report of the Scientific Working Group meeting. Geneva. 2002.

Yu SJ. Selectivity of insecticides to the spined bug (Heteroptera: Pentatomidae) and its lepidopterous prey. *Journal of Economic Entomology* 1988; 81(1):119-122.

Yu SJK. Biochemical defense capacity in the spined soldier bug (*Podisus maculiventris*) and its lepidopterous prey. *Pesticide Biochemistry Physiology* 1987; 28 (3):216-233.

Zerba EN. Evolución del control químico y resistencia a insecticidas en triatominos vectores de la enfermedad de Chagas In: XI Reunión de INCOSUR/ Chagas, Asunción, Paraguay. 2002.