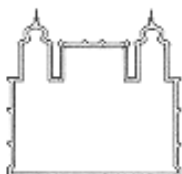


Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Investigações sobre os mecanismos de
resistência em larvas e adultos de *Aedes aegypti*,
Linnaeus, 1762**

Priscila Fernandes Viana Medeiros
Orientadora: Dr^a Denise Valle (IOC/Laficave)

Rio de Janeiro, maio de 2011



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Investigações sobre os mecanismos de resistência em larvas e adultos de *Aedes aegypti*, Linnaeus, 1762

Priscila Fernandes Viana Medeiros

**Dissertação apresentada como requisito a obtenção do título de Mestre
em Biologia Parasitária, com área de concentração em Genética e
Bioquímica**

Orientadora: **Dr^a Denise Valle** (IOC/Laficave)

Rio de Janeiro, maio de 2011

Viana-Medeiros, Priscila Fernandes

Investigações sobre os mecanismos de resistência em larvas e adultos de *Aedes aegypti*, Linnaeus, 1762

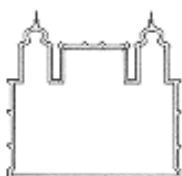
Dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária, área de concentração em Genética e Bioquímica

Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 2011

Número de páginas: viii + 140

Palavras-chave: 1. *Aedes aegypti*; 2. *Inseticidas*; 3. *Mecanismos de resistência*; 4. *Acetilcolinesterase*; 5. *Esterases*; 6. *Glutathione S-transferases*; 7. *Oxidases de Função Múltipla*; 8. *Desenvolvimento do vetor*.



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**Investigações sobre os mecanismos de resistência em larvas e adultos de
Aedes aegypti, Linnaeus, 1762**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção de grau em Mestre em Biologia Parasitária, área de concentração: Genética e Bioquímica.

Banca Examinadora

Dr Fernando Ariel Genta – Revisor e Presidente

FIOCRUZ / Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos

Dr Marcos Henrique Ferreira Sorgine

Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Bioquímica Médica

Dr^a Claudia Torres Codeço

FIOCRUZ / PROCC

Dr^a Patrícia Hessab Alvarenga

Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Bioquímica Médica

Dr^a Ima Aparecida Braga

Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, sediado no Laboratório de Entomologia do Centro de Pesquisa General Dr Ismael da Rocha, Instituto de Biologia do Exército. Foram utilizados recursos da Fundação Oswaldo Cruz, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (Faperj) e da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS-MS).

"O amor é a força mais sutil do mundo"
- Mahatma Gandhi.

Dedico esta dissertação às pessoas que muito têm e vêm contribuindo para o meu
melhoramento pessoal e profissional, minha família!
Ao meu Vovô Zizi (*in memoriam*), minha Vovó Cidinha e minha Mamãe Vanildinha.

Além disso...

***"Para fazer uma obra de arte não basta ter talento, não basta ter força, é preciso
também viver um grande amor"***
- Wolfgang Amadeus Mozart.

Dedico este manuscrito também ao meu estimado marido, Sandi.

Os quatro me ensinaram muito e são exemplos que eu pretendo seguir!

É difícil exprimir o quanto todos os meus sentiram a minha ausência nesses últimos
meses, exceto pelo meu Avô, que eu acredito que esteja sempre me protegendo,
mesmo que não presencialmente.

Só tenho a lhes dizer que valeu a pena todo o esforço, pois esta é uma vitória de todos
nós!

Muito obrigada por todo o amor proferido a mim!
Agradeço a Deus pela benção de tê-los como família!
Amo muito todos vocês!

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo que conquistei até agora, mas peço a Ele sabedoria para conquistar muito mais. Pois ***“O que sabemos é uma gota, e o que não sabemos é um oceano” - Isaac Newton.***

“Unir-se é um bom começo, manter a união é um progresso, e trabalhar em conjunto é a vitória” - Henry Ford.

Mosquiteiros Iaficavianos, parabéns a todos!

Esta é uma conquista de nossa equipe!

Muito obrigada Denise, Bento, Jutta, Ademir, Márcia, Isabela, Gustavo, Renata, Simone, Diogo, Mariana, Gilberto, Adriana, Luciana, Sandrine, Maria Ignez, Bianca, Nathália, Thiago, Luana, Luiz Paulo, Gabriela e Mariana David. Também não posso esquecer-me dos amigos que hoje fazem parte de outras equipes: Henrique, Rosi, Marcela, Aline, Camila, Diego, Údula, Ciroulo, Paty, Tânia, Eliane, Edna, Wilma e Laís.

A Denise, muito obrigada pelos conselhos, auxílios e críticas construtivas, que contribuíram em muito para a minha formação. Bom, é difícil falar da Denise. Creio que nos aproximamos muito ao longo deste trabalho, no desenho dos experimentos, a cada resultado alcançado, e também com as intempéries que experimentamos. Tudo isso contribuiu para o meu crescimento profissional.

A Isabela, que mesmo de longe, se manteve presente na minha vida. Meu agradecimento pela amizade e pelas sugestões e contribuições feitas em todas as etapas deste trabalho inclusive a este manuscrito. Obrigada também pela amizade e torcida de sempre!

Aos meus grandes amigos Di e Nat. Muito obrigada por todo o carinho e amizade. E amizades verdadeiras são como raras essências, perfumam os nossos dias, nos envolvem em carinho e suprem nossas carências. Obrigada simplesmente por existirem!

A Drica e Thi, muito obrigada pela ajuda na concretização dos ensaios! Se não fosse a dedicação de vocês, eu não teria finalizado os experimentos em dezembro, a tempo hábil de escrever este trabalho.

O Ademir também é uma pessoa a quem eu agradeço muito, porque ele sempre me apoiou e incentivou muito, além de ter me passado muitos ensinamentos. Acho que o mesmo vale para o seu pupilo Luiz, que também se mostrou uma pessoa ímpar.

A Jutta, muito obrigada pelas conversas e dicas, e por todo o apoio sempre dispensado a mim e ao meu trabalho. Obrigada também pela grande ajuda no preparo das aulas ministradas nos cursos do Laficave, principalmente no último curso de verão (quando eu estava desesperada com a confecção desta dissertação). Muito obrigada mesmo!

A Pós graduação em Biologia Parasitária, por ter possibilitado a minha ida ao curso internacional do qual eu participei em Belo Horizonte – MG.

A Mari, Di, Si e Luciane, por toda a pronta ajuda que vocês sempre me deram ao longo desses dois anos.

Ao revisor e professor Fernando Aryel Genta, e a banca, muito obrigada pelas sugestões construtivas feitas a esta dissertação.

Às minhas grandes amigas Bibinha, Guaíra, Lú, Gê, Camila, Tati, Thati, Lilica, Lidi e Pâmela. E aos meus amigos Di, Júnior, Clesinho, Marcelinho, César e Bruninho. Estas são pessoas que sempre me incentivaram e acreditaram em meu sucesso. Obrigada amigos, pela convivência que contribui muito para a minha vida ser tão maravilhosa!

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito” - Chico Xavier.

Índice

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	3
RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	7
1.2. A DENGUE	8
1.3. VETORES DA DENGUE.....	10
1.3.1. <i>Ciclo de vida</i>	11
1.3.2. <i>Regulação hormonal</i>	12
1.4. CONTROLE DE DENGUE.....	13
1.4.1. <i>Principais inseticidas usados no controle de A. aegypti</i>	14
1.4.2. <i>Resistência a inseticidas</i>	20
1.4.3. <i>Breve relato sobre o controle da dengue no Brasil</i>	21
1.5. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	23
1.6. ESTERASES.....	27
1.6.1. <i>Nomenclatura e classificação</i>	28
1.6.2. <i>Mecanismo de ação e relação com a resistência a inseticidas</i>	29
1.7. OXIDASES DE FUNÇÃO MÚLTIPLA (MFO)	31
1.7.1. <i>Classificação</i>	34
1.8. GLUTATIONA S-TRANSFERASES (GST).....	39
1.8.1. <i>Classificação e nomenclatura</i>	39
1.8.2. <i>GSTs citosólicas (cGSTs) em insetos</i>	42
1.8.3. <i>Mecanismo de ação das cGSTs</i>	43
1.8.4. <i>Relação de cGST com resistência a inseticidas</i>	45
1.9. ACETILCOLINESTERASE (ACE)	47
1.9.1. <i>Resistência a inseticidas mediada pela Ace</i>	52
1.10. CANAL DE SÓDIO REGULADO POR VOLTAGEM.....	55
1.11. EXPRESSÃO DAS ENZIMAS DETOXIFICADORAS AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DOS INSETOS ⁵⁷	
1.12. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	60
2. OBJETIVOS.....	61
3. MATERIAIS E MÉTODOS	62
3.1. COLETA DE OVOS	62
3.2. POPULAÇÕES DE CAMPO AVALIADAS.....	63
3.3. BIOENSAIOS	63
3.4. ENSAIOS MOLECULARES.....	65
3.5. ENSAIOS BIOQUÍMICOS	65
3.5.1. <i>Preparação de larvas e de mosquitos adultos</i>	65
3.5.2. <i>Quantificação das atividades enzimáticas em mosquitos adultos</i>	67
3.5.3. <i>Quantificação das atividades enzimáticas em larvas de A. aegypti</i>	68
3.5.4. <i>Análise dos resultados dos ensaios bioquímicos</i>	71
3.5.5. <i>Interpretação dos resultados bioquímicos</i>	72
3.6. DETALHAMENTO E AVALIAÇÃO DO ENSAIO PARA ACETILCOLINESTERASE	73
3.7. CORRELAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE ENSAIOS BIOQUÍMICOS E BIOLÓGICOS	73
4. RESULTADOS	75
4.1. ADAPTAÇÃO DOS ENSAIOS BIOQUÍMICOS PARA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i>	75
4.1.1. <i>Definição do momento da ecdise L3:L4, e L4:pupa</i>	75
4.1.2. <i>Tempo de incubação da enzima Acetilcolinesterase</i>	75
4.2. ESTUDOS SOBRE O ENSAIO DE ACETILCOLINESTERASE.....	78
4.2.1. <i>Racional do ensaio e problemas iniciais</i>	78

4.2.2.	<i>Curvas do tipo dose-resposta com o CB propoxur</i>	81
4.2.3.	<i>Mudança da concentração de propoxur usada nos ensaios</i>	83
4.2.4.	<i>Discussão e proposta de análise adicional do ensaio de Ace</i>	84
4.3.	ATIVIDADE DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS COM A RESISTÊNCIA A INSETICIDAS AO LONGO DO CICLO DE VIDA DE <i>Aedes aegypti</i>	87
4.3.1.	<i>Inibição de Acetilcolinesterase (AChI)</i>	89
4.3.2.	<i>Atividade de Acetilcolinesterase (AChE)</i>	91
4.3.3.	<i>Oxidases de Função Múltipla (MFO)</i>	93
4.3.4.	<i>Esterases que hidrolisam acetato de α-naftil (“α-EST”)</i>	95
4.3.5.	<i>Esterases que hidrolisam acetato de β-naftil (“β-EST”)</i>	97
4.3.6.	<i>Esterases que hidrolisam acetato de p-nitrofenil (“pNPA EST”)</i>	99
4.3.7.	<i>Glutathione S-transferases (GST)</i>	101
4.3.8.	<i>Discussão sobre os mecanismos de resistência ao longo do ciclo de vida do <i>A. aegypti</i></i> 103	
4.4.	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>A. AEGYPTI</i>	107
4.4.1.	<i>Avaliação de mosquitos adultos</i>	107
4.4.2.	<i>Avaliação de larvas</i>	110
4.4.3.	<i>Comparação dos resultados obtidos com larvas e adultos</i>	111
4.4.4.	<i>Populações naturais de <i>A. aegypti</i>: mecanismos de resistência</i>	115
5.	DISCUSSÃO	119
6.	CONCLUSÕES	123
7.	BIBLIOGRAFIAS	125

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- “ α -EST” - Esterases com atividade sobre o substrato acetato de α -naftil
- “ β -EST” - Esterases com atividade sobre o substrato acetato de β -naftil
- “ ρ NPA-EST” - Esterases com atividade sobre o substrato acetato de ρ -nitrofenil
- AaNa_v - canal de sódio regulado por voltagem de *Aedes aegypti*
- AaNa_v – gene que codifica o canal de sódio regulado por voltagem em *Aedes aegypti*
- Ace – Acetilcolinesterase
- ace – gene que codifica Acetilcolinesterase
- ace-1 – gene que codifica a Acetilcolinesterase 1 em insetos
- ace-2 – gene que codifica a Acetilcolinesterase 2 em insetos
- AChE – ensaio que mede atividade total da enzima Acetilcolinesterase
- AChI – ensaio que mede a inibição da enzima Acetilcolinesterase pelo carbamato proproxur
- BHC – hexaclorobenzeno
- Bti – *Bacillus thuringiensis israelensis*
- CB – inseticidas carbamatos
- CCE – Carboxilcolinesterases
- CDC – Centers for Disease Control
- CL – concentração letal
- DDT – dicloro-difenil-tricloroetano
- DVA – dias de vida adulta
- GST – Glutathione S-Transferases
- HAE - horas após a eclosão
- JHA – análogo de hormônio juvenil (do inglês “*Juvenile Hormone Analogue*”)
- JHE – Esterases de hormônio juvenil (do inglês “*Juvenile Hormone Esterases*”)
- Kdr – resistência tipo “*knock-down*”
- Laficave – Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores
- MFO – Oxidases de Função Múltipla (ou Mista)
- MS-SVS – Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde
- NCBI – Centro Nacional (Estados Unidos da América) de Informação Biotecnológica (do inglês “*National Center for Biotechnology Information*”).

OC – inseticidas organoclorados

OMS – Organização Mundial de Saúde

OP - inseticidas organofosforados

p99 – percentil 99

PBO - piperonil butóxido (sinergista de MFO)

PCR – reação em cadeia da Polimerase (do inglês “*Polymerase chain reaction*”)

PI – inseticidas piretróides

PNCD - Programa Nacional de Controle da Dengue

PTN – quantificação de proteínas totais em cada indivíduo

QTL – loci de caracteres quantitativos (do inglês “*quantitative trait loci*”)

Rede MoReNAa - Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas

SNC – Sistema Nervoso Central

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

Resumo

O uso de inseticidas neurotóxicos contra o mosquito *Aedes aegypti* ainda é um componente importante nos programas de controle de dengue. No Brasil, organofosforados (OP) e piretróides (PI) são usados para o controle de larvas e adultos de *A. aegypti*, respectivamente, desde 1967 e 2000. O uso frequente destes produtos selecionou populações resistentes do vetor, e motivou o Ministério da Saúde (MS) a coordenar, desde 1999, uma rede nacional de monitoramento da resistência de *A. aegypti* (MoReNAa), da qual nosso laboratório participa desde o início. A resistência é principalmente derivada de fatores metabólicos (enzimas que detoxificam o inseticida) ou de mutações nos sítios-alvo dos inseticidas, no Sistema Nervoso Central. Bioensaios com larvas revelaram a resistência de várias populações ao OP temephos, larvicida empregado há mais de 40 anos no país. A Rede MoReNAa conta também com bioensaios para adultos, com testes moleculares para avaliação de alteração no alvo de PI, o canal de sódio regulado por voltagem (AaNa_v) e com ensaios bioquímicos para quantificação, em mosquitos adultos, da atividade enzimática de Glutathione S-Transferases (GST), Esterases e Oxidases de Função Mista (MFO) (relacionadas à resistência metabólica), e de Acetilcolinesterase (Ace) (alvo de OP e carbamatos - CB). Além de serem usadas classes distintas de inseticidas contra larvas e adultos, as aplicações são feitas de maneira diferenciada: em 4-6 ciclos anuais sobre as larvas, e apenas em situações de emergência sobre os mosquitos adultos - procedimento que tem o potencial de elicitar mecanismos (e intensidades) de resistência diferentes. Além disso, bioensaios para quantificação da resistência a OP são feitos com larvas, enquanto os ensaios bioquímicos estavam disponíveis apenas para mosquitos adultos. Estes foram os principais motivos para adaptar, no âmbito desta dissertação, ensaios bioquímicos para o estágio larvar do vetor. Em relação ao ensaio da Ace, que conta com duas reações, uma na presença e a outra na ausência do CB propoxur verificamos, por meio de curvas do tipo dose-resposta, diferenças entre larvas e adultos. Além disto identificamos, em algumas populações do vetor resistentes a OP, alterações na atividade total desta enzima. Uma vez que algumas destas enzimas participam também de processos endógenos, que ocorrem naturalmente nos insetos, quantificamos sua atividade ao longo do desenvolvimento da cepa referência de suscetibilidade, Rockefeller, e de duas populações de campo. Nestes ensaios foram observadas quatro grandes “categorias” de perfis de atividade enzimática: 1) maiores atividades no estágio adulto (AChE); 2) maiores atividades no estágio larval (Esterases “ α -EST” e “ β -EST”); 3) atividades que aumentam no decorrer de cada estágio avaliado (MFO) e 4) atividades que tendem a aumentar no estágio larvar e a diminuir nos primeiros dias de vida adulta (DVA) (Esterase “ ρ NPA” e GST). Posteriormente, ensaios bioquímicos com larvas e adultos de populações de campo revelaram alterações de Ace e Esterases preferencialmente no estágio larvar, alterações de GST mais restritas ao estágio adulto, e alteração de MFO nos dois estágios do vetor. Estes ensaios possibilitam conhecer com detalhe os mecanismos de resistência em diferentes populações do vetor e podem contribuir com a definição de estratégias racionais para o controle de *A. aegypti*.

Abstract

The use of neurotoxic insecticides against the mosquito *Aedes aegypti* is still an important component in dengue control programs. In Brazil, organophosphates (OP) and pyrethroids (PI) are used for the control of *A. aegypti* larvae and adults since, respectively, 1967 and 2000. The frequent use of these products has selected resistant vector populations, and prompted the Ministry of Health (MS) to start the coordination, in 1999, of an *Aedes aegypti* insecticide resistance monitoring network (MoReNAa); our laboratory participates in the network since its beginning. Resistance is mainly derived from metabolic factors (enzymes detoxifying the insecticides) or from mutations at the target sites of insecticides (in the Central Nervous System). Bioassays with larvae disclosed resistance of various populations to the OP temephos, larvicide employed for over 40 years in the country. MoReNAa network also performs bioassays with adults, molecular tests to assess substitution at the PI target site, the voltage regulated sodium channel (AaNA_v), and biochemical assays that quantify, in adult mosquitoes, the activity of Glutathione S-Transferases (GST), Esterases and Mixed Function Oxidases (MFO) (related to metabolic resistance), and of Acetylcholinesterase (Ace) (target of OP and carbamates - CB). Besides using different insecticide classes against larvae and adults, the treatment are performed differently: in 4-6 times per year for larvae and only in emergency situations in the case of adult mosquitoes – a procedure that has the potential to elicit different mechanisms (and intensities) of resistance. Furthermore, bioassays for quantification of resistance to OP are made with larvae, while biochemical assays were available only for adult mosquitoes. These were the main reasons to adapt, in the context of this dissertation, biochemical assays for the larval stage of the vector. Considering the Ace test, consisting of two reactions, in the presence or in the absence of the CB propoxur, we identified - through the use of inhibition curves - differences between larvae and adults. We also detected, in some OP resistant vector populations, changes in the total activity of this enzyme. Since some of the enzymes of metabolic resistance are also involved in endogenous processes, that occur naturally in insects, we quantified their activity during the development of the reference strain of susceptibility, Rockefeller, and of two field populations. In these experiments we observed four major "categories" of enzyme activity profiles: 1) higher activity in the adult stage (AChE); 2) higher activity in the larval stage ("α-EST" and "β-EST" Esterases); 3) activities that increase during each stage evaluated (MFO) and 4) activities tending to increase in the end of the larval stage and to decrease in the first days of adult life (DVA) (Esterase "pNPA" and GST). Subsequently, biochemical assays with larvae and adults of field populations revealed main changes in Ace and Esterases in the larval stage, GST changes preferably in the adult stage, and MFO alterations on both vector stages. These assays enable the detailed knowledge of resistance mechanisms of different vector populations and can contribute to define rational strategies for *A. aegypti* control.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Apresentação da Dissertação

Aedes aegypti é um mosquito que vive intimamente relacionado ao homem. O crescimento urbano desorganizado, sem condições adequadas de saneamento básico, favorece a manutenção dos criadouros e a proliferação deste vetor, que atualmente tem distribuição mundial. O *A. aegypti* é o principal vetor de dengue, doença febril aguda que acomete cerca de 50 a 100 milhões de indivíduos por ano no mundo. Devido à falta de vacinas e de drogas antivirais eficazes, seu controle é feito principalmente por meio de estratégias que visam diminuir a densidade do vetor. Nesse sentido, são usados inseticidas químicos sobre os mosquitos adultos, em aplicações espaciais, e sobre os criadouros larvais. Entretanto, a exposição de populações de insetos a um mesmo composto inseticida, por muito tempo, pode resultar em seleção de indivíduos resistentes. É o que tem acontecido com várias populações brasileiras do vetor, hoje resistentes aos inseticidas OP e PI. Por isso, além da necessidade de dispor de compostos alternativos para o controle do *A. aegypti*, é também preciso conhecer os mecanismos de resistência presentes nas populações do vetor, para definir estratégias racionais de controle.

Esta dissertação está organizada como segue: na Introdução serão apresentadas as principais classes de inseticidas usadas no controle do *A. aegypti* no Brasil, assim como os potenciais mecanismos de resistência a inseticidas. Depois dos Objetivos, segue-se a seção de Materiais e Métodos onde apresentamos, entre outros, uma nova metodologia, para avaliação dos mecanismos de resistência em larvas individuais. A seção de Resultados está dividida em quatro capítulos que contêm, na sequência: algumas investigações que viabilizaram a adaptação dos ensaios bioquímicos para larvas do vetor; alguns estudos sobre o ensaio da Acetilcolinesterase; a dinâmica de atividade das enzimas envolvidas com a resistência a inseticidas ao longo do ciclo de vida do *A. aegypti* e; por fim, a avaliação dos mecanismos de resistência em

populações naturais do vetor. Em cada capítulo foram feitas considerações sobre os resultados específicos obtidos. Segue-se uma discussão geral, onde procuramos contextualizar todo o trabalho desenvolvido durante o período.

1.2. A Dengue

Dengue, ou febre do dengue, é a mais comum e disseminada infecção causada por arbovírus no mundo. É transmitida pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*. O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é o seu vetor primário, e o mosquito *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) é considerado vetor de importância secundária na Ásia (Braga e Valle 2007a, Ranson et al. 2009). A dengue é hoje endêmica em mais de 100 países, localizados nas regiões tropicais e subtropicais (Figura 1.1), predominando em áreas urbanas e suburbanas (OMS 2009a). Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas estejam atualmente em áreas sob risco de dengue, e que a doença infecte entre 50 e 100 milhões de indivíduos, sendo responsável por cerca de 500.000 internações hospitalares anualmente (Roriz-Cruz et al. 2010). O Brasil é o responsável pelo maior número de casos da doença notificados anualmente à OMS, tendo confirmado aproximadamente 3,5 milhões de casos entre 2000 e 2005 (Roriz-Cruz et al. 2010), o que evidencia uma situação bastante alarmante e preocupante, consequência, dentre outros fatores, da falta de controle efetivo do vetor.

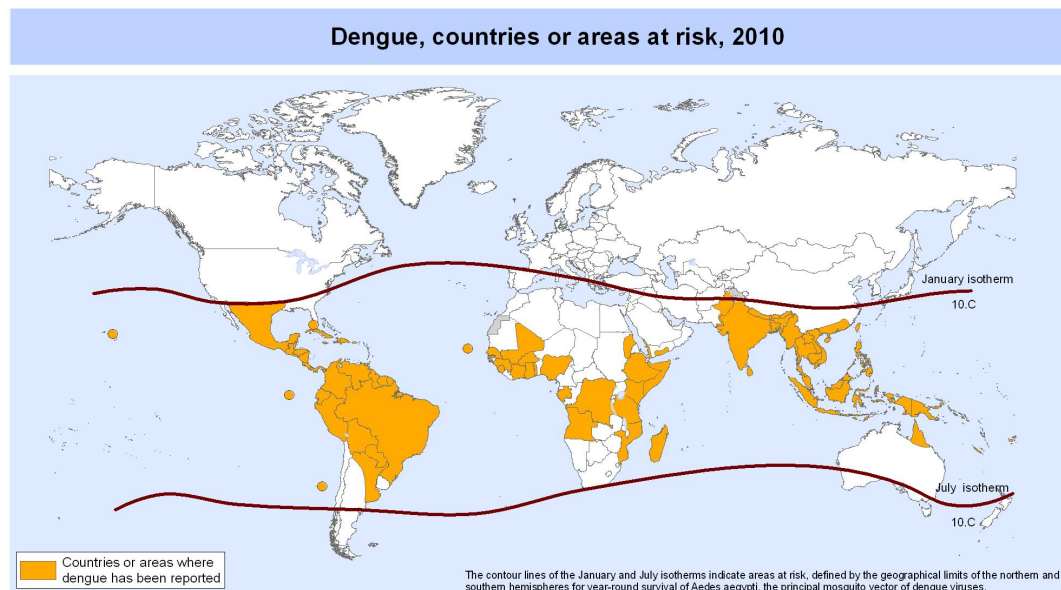


Figura 1.1: distribuição dos casos de dengue notificados em 2010. Figura extraída de http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png

O agente etiológico da dengue é um arbovírus de RNA fita simples positiva do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae* (San Martin et al. 2010). Estes vírus foram agrupados em quatro sorotipos relacionados, mas antigenicamente distintos, DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 (Gubler e Clark 1995, San Martin et al. 2010).

A infecção por estes arbovírus também pode levar à febre hemorrágica do dengue e/ou à síndrome do choque do dengue, que são formas mais graves e potencialmente fatais da doença (Braga e Valle 2007a, San Martin et al. 2010). Ainda não se sabe ao certo o que leva a infecção a se manifestar de forma hemorrágica. No entanto vários autores apontam como fatores de risco o sorotipo e cepa do vírus envolvido, se a infecção é secundária, assim como a idade, a condição do sistema imunológico e a predisposição genética do paciente (Gubler e Clark 1995, Gubler 2002).

Até o momento, não existem vacinas ou quimioterápicos efetivos contra a dengue (Ranson et al. 2009, San Martin et al. 2010). Por outro lado, a destruição de criadouros e o envolvimento da população, por meio de divulgação e esclarecimento sobre o combate à doença e ao vetor, não têm sido suficientes para impedir a disseminação do mosquito *A. aegypti*. Com isso, o combate à dengue é feito através de controle biológico e principalmente do uso de inseticidas químicos, tanto em aplicações espaciais quanto no uso de

larvicidas, que têm como objetivo principal a diminuição da densidade do vetor (Braga e Valle 2007a, OMS 2009a, San Martin et al. 2010).

1.3. Vetores da Dengue

O *A. aegypti* (Diptera: Culicidae) é um mosquito originário da África, mas que vem ampliando seu intervalo geográfico. Isso ocorre devido às mudanças demográficas e ao intenso fluxo migratório rural-urbano, os quais geraram um crescimento desordenado nas cidades e ausência de boas condições de saneamento básico. Como consequência, temos a proliferação do vetor (Braga e Valle 2007a, b, Ferreira e Chiaravalloti Neto 2007, Ranson et al. 2009). Atualmente, sua distribuição é considerada mundial (Braga e Valle 2007b).

O *A. aegypti* é uma espécie sinantrópica (que se beneficia das modificações promovidas pelo homem) de hábito diurno (com picos de atividade nos crepúsculos); devido ao elevado grau de endofilia e antropofilia, é considerado um mosquito agressivo e oportunista (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994, Lourenço-de-Oliveira 2004). Vive muito intimamente associado ao homem (Lourenço-de-Oliveira 2004, Ranson et al. 2009). Seus espécimes adultos repousam, preferencialmente, dentro das construções, e fazem sua oviposição em recipientes com água encontrados no próprio domicílio ou peridomicílio, como tanques de armazenamento de água e vasilhames temporários (Christophers 1960, Braga e Valle 2007b). Por isso, acredita-se que as modificações produzidas pelo homem no ambiente favorecem a proliferação destes artrópodes vetores e a transmissão do agente etiológico (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

O *A. albopictus*, originário da Ásia, foi introduzido na Europa, África e nas Américas nos últimos 40 anos. Geralmente, este mosquito é considerado um vetor de dengue menos eficiente, apesar de estar associado com a transmissão da doença em áreas rurais e suburbanas do Sudeste Asiático (Ranson et al. 2009). Nas Américas, o *A. albopictus* ainda não foi incriminado de maneira consistente como vetor de dengue, embora alguns estudos tenham

encontrado mosquitos naturalmente infectados (Serufo et al. 1993 *apud* Braga e Valle 2007b, Ibañez-Bernal et al. 1997 *apud* Braga e Valle 2007b).

1.3.1. Ciclo de vida

O *A. aegypti* pertence à família dos culicídeos. É um inseto holometábolo (apresenta metamorfose completa), possuindo um ciclo biológico composto por quatro estágios: ovo, quatro instares (ou estádios) larvais, pupa e imago, ou adulto (Christophers 1960; ver Figura 1.2). As fases larvais são aquáticas e se alimentam de matéria orgânica presente nos criadouros, enquanto os adultos são fitófagos, se alimentando de seiva elaborada. As fêmeas precisam de repasto sanguíneo para a maturação de seus ovos (Forattini 1996).

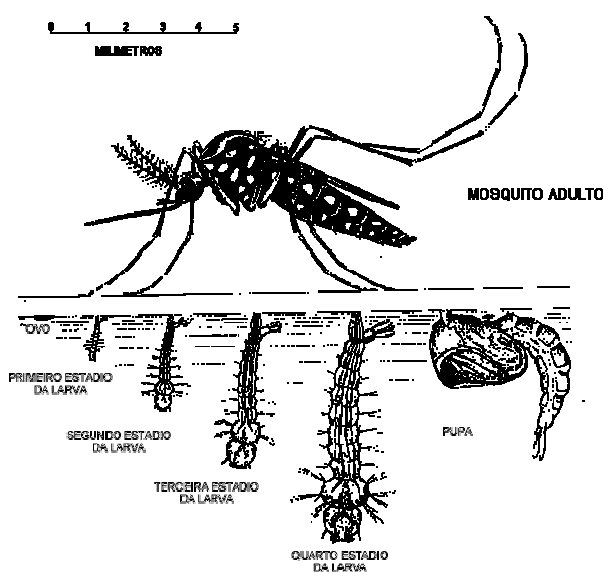


Figura 1.2: esquema do ciclo de vida do mosquito *A. aegypti*. Figura extraída de: http://joenckinsects.blogspot.com/2009_04_01_archive.html

Caso uma fêmea inseminada tenha feito repasto sanguíneo suficiente, depois da maturação dos ovos irá procurar por sítios sombreados para efetuar sua postura (Christophers 1960). Os ovos são depositados fora da água, nas paredes internas e úmidas dos recipientes (geralmente escuros) onde, após rápido desenvolvimento embrionário, são capazes de se manter viáveis por longos períodos, mesmo em condições desfavoráveis de

dessecação. Além disso, a água dos criadouros deve ser limpa, isto é, não turva, pobre em matéria orgânica em decomposição e em sais (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994).

1.3.2. Regulação hormonal

Devido à presença de exoesqueleto rígido, os insetos crescem em períodos bem definidos. O controle do crescimento e desenvolvimento é feito por uma série de hormônios (Rey 2001).

O hormônio responsável pelo crescimento e muda é um esteróide chamado ecdisona (Lourenço-de-Oliveira 2004). Após sua secreção pelas glândulas protorácicas, a ecdisona é convertida em 20-hidroxiecdisona, sua forma biologicamente ativa. Esta se liga a receptores nucleares e age como um fator de transcrição, induzindo a ativação de genes específicos nos períodos que precedem as ecdises. Dessa maneira, a ecdisona estimula o processo de muda desencadeando, nas células tegumentares, aumento no número das mitocôndrias, do retículo endoplasmático, do teor de ácidos nucléicos e da síntese de proteínas (Rey 2001, Iga e Sakurai 2009).

As ecdises larva-larva também sofrem ação de um terpenóide, o hormônio juvenil, cuja função é manter o *status* imaturo (Lourenço-de-Oliveira 2004). No final do último instar larvar, a produção de hormônio juvenil cessa, resultando na diminuição gradual de sua concentração; as larvas, sob ação da ecdisona, mudam para pupas que, posteriormente, se transformam em adultos. Depois deste processo, ecdisona e hormônio juvenil podem voltar à circulação (Figura 1.3; Rey 2001).

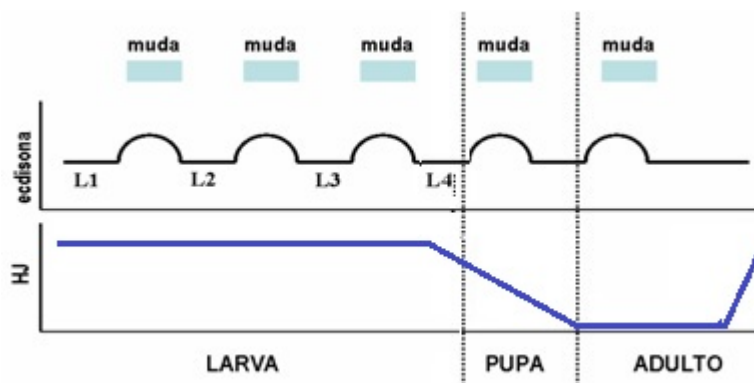


Figura 1.3: esquema que mostra os níveis de ecdisona (em preto) e hormônio juvenil (em azul) nos diferentes estágios do mosquito *A. aegypti*. Sempre que a ecdisona é produzida e seus títulos aumentam na hemolinfa, ocorre uma muda. Quando o hormônio juvenil está presente em altas concentrações, como ocorre em todo o estágio larvar, a muda dá origem a uma larva de outro instar, L₂, L₃ e L₄, consecutivamente. Quando os títulos de hormônio juvenil começam a declinar, a partir da segunda metade do quarto instar larvar, a muda dá origem a uma pupa. No estágio adulto, ecdisona e hormônio juvenil voltam a ser produzidos, pois ambos têm função na reprodução dos mosquitos.

Nas fêmeas adultas, tanto a ecdisona quanto o hormônio juvenil têm papel fundamental na produção de vitelogenina e, em consequência, na maturação dos ovos (Lourenço-de-Oliveira 2004, Braga e Valle 2007b).

1.4. Controle de Dengue

Em função da falta de vacinas e de drogas antivirais efetivas contra a dengue, a diminuição da densidade dos mosquitos é a única opção disponível para a prevenção e controle dessa doença. Assim sendo, o controle é idealmente realizado através da remoção de criadouros larvares e de campanhas educativas que estimulam a participação ativa da população; contudo, hoje a aplicação de compostos inseticidas sobre formas larvares e adultas do vetor ainda é um componente importante das ações de controle (MS-SVS 2009a e b, MS-SVS 2010).

A aplicação de inseticidas sobre os criadouros larvares geralmente é feita durante todo o ano, em ciclos que vão depender, dentre outros fatores, do efeito residual do produto usado. No Brasil o MS recomenda que, em municípios infestados, sejam feitas visitas domiciliares bimestrais; tratamento focal e/ou residual, com periodicidade mensal, deve ser feito em pontos considerados estratégicos, como cemitérios, borracharias, depósitos de sucata, depósitos de

materiais de construção, dentre outros (MS-SVS 2009a). Uma vez que o *A. aegypti* apresenta preferência por ovipor em locais onde haja água parada e limpa, e que suas larvas são frequentemente encontradas em caixas d'água e tambores de armazenamento de água (em locais com dificuldade de abastecimento), é necessário que os larvicidas tenham seu uso aprovado em água para consumo humano. Atualmente, existem cinco inseticidas, além de um biolarvicida, recomendados pela OMS para uso em água potável. Entretanto, durante muito tempo só um composto inseticida, o OP temephos, era recomendado (ver seção 1.4.1b) (FAO/OMS 1978, Braga e Valle 2007b).

Por outro lado, a aplicação de inseticidas sobre os mosquitos adultos somente tem sido recomendada em casos de surtos epidêmicos ou em locais onde haja grandes infestações do vetor, quando há iminência de epidemia, com o objetivo de diminuir rapidamente sua densidade em situações de emergência (Ranson et al. 2009, MS-SVS 2010).

Para alcançar os mosquitos adultos dispõe-se de um método de pulverização a “ultra baixo volume” (UBV), vulgarmente conhecido no Brasil como “fumacê”. Contudo, a eficiência dessas aplicações na redução da transmissão de dengue depende de alguns fatores, como o período do dia de maior atividade do vetor, as condições meteorológicas e a calibração dos equipamentos, entre outros (MS-SVS 2010). Isto faz com que alguns autores argumentem que campanhas de educação podem contribuir mais efetivamente para a redução da densidade do vetor do que o uso de UBV (Esu et al. 2010). Outros autores sugerem ainda que o uso do “fumacê” pode estar reduzindo o efeito benéfico dessas campanhas, por causar, na população, uma falsa sensação de segurança, fazendo com que as pessoas reduzam suas atividades relacionadas com a eliminação dos criadouros (Gubler e Clark 1995, Gubler 2002, Ranson et al. 2009, Esu et al. 2010).

1.4.1. Principais inseticidas usados no controle de *A. aegypti*

As principais classes de inseticidas neurotóxicos usados para controle de vetores de doenças são: organoclorados (OC), organofosforados (OP), carbamatos (CB) e piretróides (PI). Recentemente introduziu-se também o uso de reguladores do desenvolvimento dos insetos (IGRs do inglês “*Insect Growth Regulators*”), e de bioinseticidas, como o *Bacillus thuringiensis*

israelensis (Bti) nas campanhas de controle de dengue no Brasil (ver item 1.3.3). Todos os inseticidas neurotóxicos, mas não os IGRs ou biolarvicidas, têm como alvo diferentes moléculas do Sistema Nervoso Central (SNC) dos insetos. É importante frisar que os inseticidas temephos (OP – ver seção 1.4.1b) e spinosad; os IGRs diflubenzuron, novaluron e piriproxifen; além do biolarvicida Bti, foram aprovados, pela OMS, para uso em água potável, como é o caso dos principais criadouros larvares do *A. aegypti* (OMS 2008a, b, c, Hanson et al. 2009, OMS 2009b, OMS 2010). Na tabela abaixo são listados os alvos dos compostos citados; cada grupo de inseticida será brevemente apresentado.

Tabela 1.1: sítios de ação de alguns dos principais compostos inseticidas usados para controle de vetores de doenças.

Inseticida	Sítio de ação
Organoclorados (OC) do tipo DDT Piretróides (PI)	Canais de sódio (SNC)
Organoclorados (OC) do tipo Ciclodienos	Receptores GABA (SNC)
Organofosforados (OP) Carbamatos (CB)	Acetilcolinesterase (SNC)
Reguladores do desenvolvimento dos insetos (IGRs)	exemplos: interferência na síntese de quitina; análogos de hormônio juvenil
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> (Bti)	Promoção de lise do epitélio do intestino médio de larvas de mosquitos

SNC: Sistema Nervoso Central.

a) *Organoclorados (OC)*: esta classe pode ser subdividida em grupos: difenilalifáticos, cujo principal representante é o diclorodifeniltricloroetano (DDT); ciclodienos, como aldrin, dieldrin, endosulfan, dentre outros; os hexaclorocicloexanos (BHC), tendo como principal representante o lindano; e os policloroterpenos, que têm como representantes o toxaphene e estrobane (D'Amato et al. 2002, Ware e Whitacre 2004, Bloomquist 2009). A Figura 1.4 mostra alguns exemplos de estrutura química de OC. Os dois primeiros, difenilalifáticos e ciclodienos, são os principais grupos de OC usados para controle de vetores de doenças. Em particular o DDT, uma das substâncias sintéticas mais utilizadas e estudadas no século

XX, foi muito importante para as campanhas de controle de vetores feitas em meados do século passado, principalmente por apresentar alto efeito residual, além de capacidade de repelência (D'Amato et al. 2002). Devido a sua alta persistência, os OC podem se acumular ao longo das cadeias alimentares, e em tecidos de organismos expostos, inclusive de pessoas que vivem nas casas tratadas (OMS 2007). Por isso, desde a década de 1970 os inseticidas OC, de um modo geral, vêm tendo seu uso proibido em diversos países, inclusive no Brasil, onde tiveram seu uso descontinuado em 1994 (D'Amato et al. 2002). Entretanto, a grave situação da malária na África, aliada à falta de estudos conclusivos sobre a alta toxicidade do DDT em seres humanos, e à não disponibilidade de alternativas atuais economicamente viáveis naquele continente, motivaram a OMS a aprovar o uso de DDT, apenas para pulverização residual de interiores, no controle da malária na África (OMS 2007).

O modo de ação da maioria dos OC nunca foi claramente estabelecido, mas sabe-se que, de modo complexo, eles impedem o balanço de íons nos axônios dos neurônios, impedindo assim, a transmissão normal dos impulsos nervosos (Bloomquist 2009). No caso dos OC do tipo DDT e do tipo BHC, sabe-se que atuam sobre os canais de sódio, fazendo com que sua conformação permaneça aberta mesmo após a passagem de um impulso nervoso. Os OC ciclodienos, por sua vez, atuam sobre os receptores do neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA), impedindo a entrada de íons cloro no neurônio. Em todos os casos, são gerados impulsos repetitivos, que levam à contração muscular, convulsões, paralisia e eventual morte do inseto (D'Amato et al. 2002, Ware e Whitacre 2004).

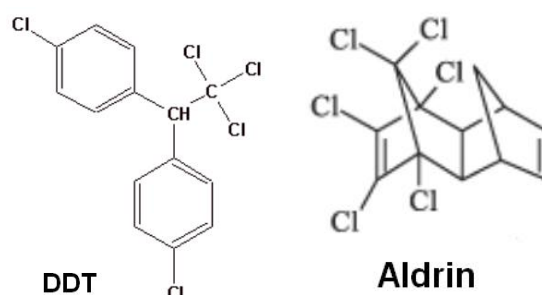


Figura 1.4: estrutura química de alguns OC.

b) *Organofosforados (OP)*: estes compostos variam muito em sua estrutura e propriedades químicas (Figura 1.5). Todos os OPs são ésteres de ácido fosfórico que, dependendo dos átomos diretamente ligados ao fósforo central, podem ser divididos em subclasses. As mais importantes são as subclasses dos fosfatos, que apresentam um oxigênio ligado ao átomo de fósforo, dos fosforotionatos (ou fosforoditioatos), que apresentam enxofre, fosforoamidotionatos, que têm um átomo de nitrogênio, e fosfonatos, que têm um átomo de carbono ligado ao fósforo central da molécula. É importante ressaltar que os compostos fosforotionatos (como o temephos, fenitrothion, parathion e chlorpiriphos, por exemplo) e os fosforoditioatos (como o malathion e dimetoato) precisam passar por uma etapa de bioativação, ou seja, são administrados na forma de pró-inseticidas. Neste caso, ocorre uma reação de oxidação por intermédio das Oxidases de Função Múltipla (MFO, ver item 1.8), que substitui o átomo de enxofre por um oxigênio; o metabólito gerado, um análogo oxon, possui toxicidade maior que o composto original (Fukuto 1990, Ware e Whitacre 2004, Bloomquist 2009).

Os compostos OP atuam sobre o sítio catalítico das enzimas Acetilcolinesterases (Ace), ligando-se de forma estável, considerada irreversível, e impedindo que estas degradem o neurotransmissor excitatório Acetilcolina; com isto, o impulso nervoso é transmitido continuamente, provocando rápidas contrações musculares, paralisia e a morte do inseto (Ware e Whitacre 2004, Bloomquist 2009).

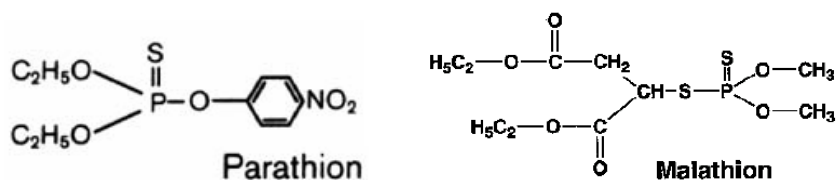


Figura 1.5: exemplos de inseticida OP: um fosforotionato e um fosforoditioato.

c) *Carbamatos (CB)*: estes compostos são ésteres de ácido carbâmico. Como exemplos, temos o carbaril, carbofuran, propoxur, dentre outros (Figura 1.6). O carbaril, por exemplo, apresenta toxicidade muito baixa

aos mamíferos (por ser mais prontamente detoxificado que nos insetos), além de ser efetivo contra muitas espécies de insetos (Ware e Whitacre 2004). Estes são compostos relativamente instáveis, rapidamente degradados no meio ambiente (Cecchine et al. 2000). Os CB estão entre os grupos de inseticidas de maior uso doméstico, seja para aplicação em interiores ou em jardins e gramados (Cecchine et al. 2000).

Assim como os OP, os CB atuam sobre as Ace. Nesse sentido, a inibição promovida também gera acúmulo de Acetilcolina nas sinapses, o que, por sua vez, irá ocasionar transmissões repetitivas dos impulsos nervosos, levando aos mesmos sintomas gerados por OP. Ao contrário dos OP, no entanto, a ligação de CB à Ace é reversível.

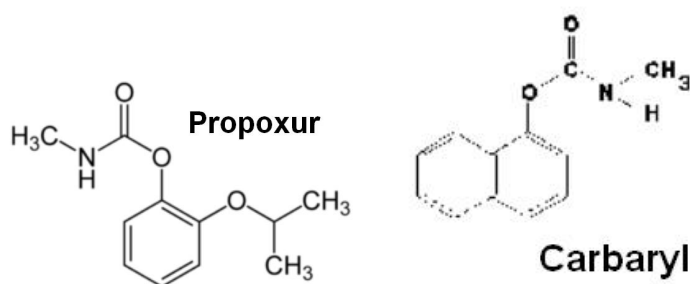


Figura 1.6: estrutura química de alguns CB.

d) *Piretróides*: estes são tipicamente ésteres de ácido crisantêmico (Figura 1.7); apresentam elevado grau de lipofilicidade (Bloomquist 2009). Estes compostos podem ser divididos em dois grupos: um que possui alto efeito “*Knockdown*” nos insetos (paralisa momentânea) e baixa toxicidade, como alletrina, pralletrina, metoflutrina, dentre outros, e um outro grupo que possui alta toxicidade, como por exemplo, permetrina, deltametrina e cipermetrina (Kawada et al. 2009). Em geral, compostos do primeiro grupo são pouco estáveis no meio ambiente. Os PI apresentam toxicidade muito baixa para mamíferos (Plimmer 2001). Esta é a única classe recomendada pela OMS para uso em mosquiteiros (principalmente no controle da malária): produzem também efeito de repelência e irritância (OMS 1999b).

O mecanismo de ação dos PI é o mesmo dos OC do tipo DDT. Atuam sobre os canais de sódio presentes nos axônios de neurônios, impedindo seu fechamento após a passagem do impulso nervoso. Com isso,

são geradas descargas elétricas contínuas, podendo levar à hiperexcitabilidade, convulsões, paralisia e morte (Bloomquist 2009).

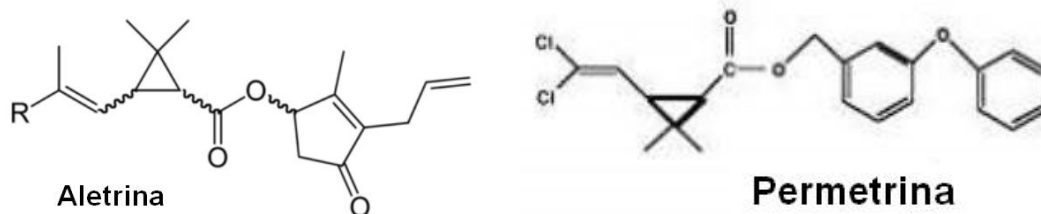


Figura 1.7: estrutura química de alguns PI.

e) *Reguladores do Desenvolvimento dos Insetos*: este grupo compreende uma classe de compostos ativos diferente dos outros inseticidas, que não ataca o SNC, mas que altera o crescimento e desenvolvimento normal dos insetos (Belinato 2007). Os IGRs mais utilizados no controle de mosquitos pertencem ao grupo das benzoil-feniluréias (inibidores da síntese de quitina) ou são análogos de hormônio juvenil (JHA do inglês “*Juvenile Hormone Analogue*”) (exemplos na Figura 1.8). A quitina é um polímero de N-acetilglicosamina, e um dos principais componentes do exoesqueleto dos artrópodes, ao passo que o hormônio juvenil (ver seção 1.3.2) é a substância que confere o caráter imaturo às mudas dos insetos. Uma vez que vertebrados não possuem quitina nem hormônio juvenil, espera-se que estes compostos não sejam prejudiciais aos seres humanos. Nesse sentido, após vários testes, a OMS aprovou o uso, em água para consumo humano, dos inibidores da síntese de quitina diflubenzuron e novaluron, e dos JHA e piriproxifen (OMS 2008a, b, c). Foi observado que a exposição de larvas de *A. aegypti* a inibidores da síntese de quitina e a JHA promoveu atraso no desenvolvimento e comprometeu alguns aspectos da viabilidade e/ou da reprodução deste inseto. Esses resultados apontam o uso dos IGRs em campo como uma alternativa viável e promissora (Braga et al. 2005a, Belinato et al. 2009).

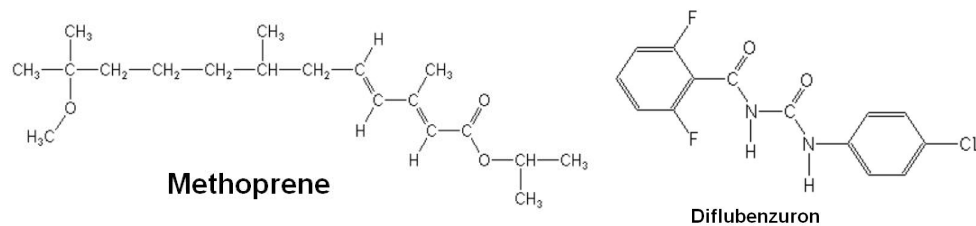


Figura 1.8: exemplos de um JHA e de um inibidor da síntese de quitina.

f) *Bacillus thuringiensis israelensis*: os esporos desta bactéria possuem cristais que apresentam três diferentes protoxinas Cry (cristal tóxico) e uma protoxina Cyt (com ação citolítica e hemolítica). Após a ingestão pelas larvas dos mosquitos, os cristais são dissolvidos no intestino e as protoxinas liberadas sofrem ação das proteases do intestino, gerando toxinas biologicamente ativas (Polanczyk et al. 2003). Estas toxinas se ligam a receptores específicos presentes no epitélio de mosquitos e moscas, formando poros que, posteriormente, induzem sua lise (OMS 1999a). A existência de várias toxinas reduz a possibilidade de desenvolvimento de resistência a este biolarvicida. Essas bactérias podem ser produzidas em massa, estocadas, transportadas e aplicadas nos criadouros larvais (Regis et al. 2000). Contudo, este biolarvicida tem sua aplicação limitada por ser pouco persistente (age por poucos dias) no ambiente, especialmente em países tropicais (Braga e Valle 2007c).

1.4.2. Resistência a inseticidas

É importante frisar que a exposição por longo prazo de populações de vetores ou pragas a um determinado inseticida pode selecionar características que conferem resistência a este agente tóxico (Poupardim et al. 2008). Conceitualmente, resistência é definida como a habilidade de uma linhagem de um organismo em sobreviver a doses de compostos tóxicos, que seriam letais para a maioria da população normal susceptível da mesma espécie (Beaty e Marquadt 1996). A resistência é hereditária, os inseticidas apenas selecionam aqueles indivíduos que sobrevivem à sua exposição.

Populações de mosquitos resistentes a inseticidas são uma ameaça ao sucesso dos programas de controle (Ranson et al. 2009). Idealmente,

programas racionais de controle de vetores devem estar articulados com o monitoramento do *status* de suscetibilidade/resistência a inseticidas, para acompanhar a dinâmica da resistência nas populações e definir alternativas antes que o uso de determinado produto alcance um limiar que impacte sobre as ações de controle em campo (Braga et al. 2004).

Neste contexto, bioensaios detectam e quantificam a resistência e ensaios bioquímicos e moleculares, complementares, permitem identificar, precocemente nas populações, o mecanismo envolvido. Este pode derivar, principalmente, de maior atividade das enzimas detoxificantes - Oxidases de função múltipla (MFO), Esterases e/ou Glutathione S-Transferases (GST) que caracterizam a chamada resistência metabólica, e/ou de mutação no sítio-alvo do inseticida. A participação de algumas enzimas na resistência pode ainda ser sugerida por meio de bioensaios; isto é feito com o uso de inibidores específicos para cada grupo de enzimas detoxificadoras, convencionalmente chamados de sinergistas (Perera et al. 2008, Bisset-Lazcano et al. 2009, Marcombe et al. 2009). Outra metodologia, bastante em foco nos últimos anos, é a técnica de microarranjo, ou “*microarray*”, como é mais conhecida (Strode et al. 2008, Marcombe et al. 2009): são utilizadas sondas de DNA (com as sequências pertinentes) fixadas sob uma superfície sólida (um “chip”). Esta técnica tem por objetivo verificar os níveis de expressão de transcritos que possuem sequências complementares no chip. Nesse sentido, foi relatada a produção de um chip contendo 235 sequências nucleotídicas de genes que codificam MFO, Esterases e GST presentes no mosquito *A. aegypti*, sendo este convencionalmente chamado de “*A. aegypti Detox Chip*” (Strode et al. 2008).

1.4.3. Breve relato sobre o controle da dengue no Brasil

No Brasil, em 1998, relatos dos aplicadores de campo sugeriram diminuição da persistência (tempo de ação do princípio ativo) do OP temephos, único inseticida usado no controle de larvas de *A. aegypti* desde 1967 (Lima et al. 2003, Braga et al. 2004, Pereira-da-Cunha et al. 2005). Esta suspeita de resistência levou o Ministério da Saúde (MS) a instituir, em 1999, a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti* a Inseticidas – MoReNAa, que confirmou, por meio de bioensaios, a disseminação de resistência em várias populações do vetor no país, estimulando a troca da

estratégia de controle usada. Uma vez que os ensaios bioquímicos, que identificam os mecanismos envolvidos nas populações do vetor, não estavam disponíveis na época, optou-se por aplicar, nas larvas e adultos do vetor, produtos com mecanismos de ação distintos. Com isto esperava-se postergar a seleção de indivíduos resistentes. Em função disto, passou-se a usar PI no controle dos mosquitos adultos (Braga e Valle 2007c).

Como já mencionado, no biênio 1999/2000, houve a confirmação da resistência ao larvicida OP temephos (Macoris et al. 1999, Lima et al. 2003, Braga e Valle 2007c), o que motivou sua substituição, a partir do mesmo ano, por Bti em áreas consideradas críticas (Regis et al. 2000, Braga e Valle 2007c). Contudo, as formulações de Bti existentes não eram persistentes em situação de campo.

Esta constatação apontou para a necessidade de encontrar alternativas viáveis para a substituição do temephos. Braga et al., em 2005, avaliaram, em laboratório, o efeito do JHA methoprene sobre várias populações de campo, com diferentes níveis de resistência ao temephos. Este trabalho indicou que todas as populações do vetor analisadas mostraram-se suscetíveis a este IGR, apesar de possuírem alteração em diferentes enzimas envolvidas com a resistência metabólica (Braga et al. 2005b). No entanto, o pyriproxifen, que também é um JHA, não foi bem aceito pelos agentes de campo, uma vez que seu efeito primário não era a indução da mortalidade, mas o atraso no desenvolvimento. Esta situação deixou evidente que a introdução de um novo composto no controle em campo deve ser precedida de trabalho de capacitação e esclarecimento dos agentes de controle de endemias.

Atualmente, o Brasil está utilizando, para o controle de larvas nas áreas onde a resistência ao OP temephos foi detectada, inibidores da síntese de quitina. Esta é considerada uma alternativa viável para o controle do *A. aegypti* no Brasil desde a aprovação pela OMS para uso destes compostos em água potável (OMS 2008a, b, c). Nesse sentido, a Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (SVS-MS), atualmente disponibiliza o IGR diflubenzuron para o controle do vetor da dengue nas referidas localidades do país (MS-SVS 2009c, MS-SVS 2010). Simultaneamente o uso de PI no controle de adultos está sendo substituído por malathion, nos casos em que resistência a PI é detectada (MS-SVS 2009b e d).

1.5. Mecanismos de Resistência

A resistência a inseticidas é o resultado de alguma mutação que pode afetar características fisiológicas ou comportamentais do inseto (Montella 2008). Os principais mecanismos que podem conferir resistência a inseticidas podem ser divididos em quatro categorias:

a) *Redução na penetração do inseticida*: em geral, os inseticidas penetram no organismo do inseto rapidamente; entretanto, um espessamento da cutícula, ou modificações de algumas de suas características físico-químicas, podem ocasionar uma diminuição de permeabilidade, o que leva a uma redução da taxa de penetração (Georghiou 1994). Este mecanismo em geral gera um baixo nível de resistência e frequentemente está associado a outros (Braga e Valle 2007 b). Uma das possíveis explicações seria a de que esta taxa mais lenta de absorção do inseticida pelo organismo do inseto resultaria em maior tempo para detoxificação (Plapp 1976). Nesse sentido, foi descrita relação entre resistência a malathion e a DDT com menor taxa de penetração em *A. aegypti*, dentre outras alterações (Plapp 1976).

b) *Comportamental*: neste caso, o inseto adquire habilidade de evitar contato com doses letais de inseticida. Compostos do tipo DDT e PI podem induzir mudanças comportamentais nos insetos como, por exemplo, redução da proporção de mosquitos que entra nas habitações e mudança no período de maior atividade dos mosquitos (Hemingway et al. 2004).

Um exemplo de mudança comportamental foi documentado para *Anopheles darlingi*, vetor de malária na Região Amazônica, em resposta à aplicação de DDT nas paredes das habitações. Este procedimento repeliu fortemente as populações deste vetor que tentavam entrar nas casas à procura de hospedeiros. Com isso, dois meses após a aplicação do DDT neste estudo, foi observada a seleção de fêmeas que entravam nas habitações, faziam repasto sanguíneo, e depois saíam rapidamente sem repousar nas paredes, ao contrário do que era habitual antes do uso de DDT pelos programas de controle (Roberts e Alecrim 1991).

c) *Insensibilidade do sítio alvo do inseticida*: mutações na região codificante dos sítios alvo dos inseticidas podem levar ao comprometimento da

interação entre a molécula inseticida e seu sítio de ação, reduzindo, ou mesmo abolindo, seu efeito tóxico (Braga e Valle 2007 b, Hemingway e Hanson 2000).

As principais classes de inseticidas neurotóxicos atuam sobre diferentes moléculas no SNC dos insetos. Inseticidas OP e CB, por exemplo, atuam sobre a Acetilcolinesterase (Ace), os PI e OC do tipo DDT atuam sobre os canais de sódio dependentes de voltagem, e os inseticidas OC do tipo ciclodienos atuam sobre os receptores de GABA (ver Tabela 1.1).

Uma mutação ao acaso que modifique a estrutura tridimensional destas moléculas pode resultar em insensibilidade aos compostos inseticidas. No entanto, para que esta mutação seja selecionada, a substituição de aminoácido deve reduzir a ligação ao inseticida sem causar uma perda da função primária destes alvos, já que estas são moléculas vitais para a transmissão regular dos impulsos nervosos (Hemingway e Hanson 2000). Este tipo de resistência é também chamado de “resistência por insensibilidade do sítio-alvo”.

d) *aumento da detoxificação do inseticida*: quando um xenobiótico qualquer, seja ele um inseticida ou não, entra em contato com um organismo, o processo de biotransformação é disparado (Figura 1.9). Este processo compreende a transformação enzimática do xenobiótico em outra substância, por meio de alterações químicas (Montella 2008). Neste caso, os metabólitos formados possuem propriedades diferentes das drogas originais, com características mais hidrofílicas, o que facilita sua excreção pelo organismo (Oshima-Franco e Franco 2003).

Metabolismo dos xenobióticos

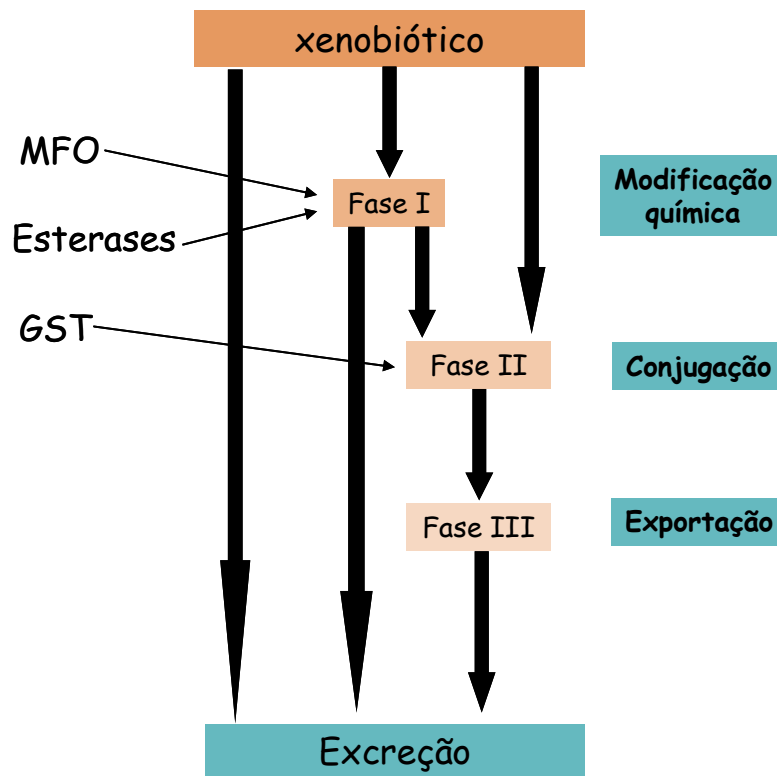


Figura 1.9: o processo de biotransformação. Este pode ocorrer em até três fases. Na Fase I, da qual participam Esterases e MFO, ocorre a modificação química da molécula xenobiótica; a enzima GST participa da Fase II, quando moléculas exógenas sofrem conjugação; a Fase III corresponde ao carregamento da molécula estranha para fora da célula (Montella 2008).

As reações de biotransformação são catalisadas por um sistema multi-enzimático. As principais superfamílias que participam deste processo são as Esterases, as MFO e as Glutathione S-transferases (GST) (Sheehan et al. 2001). Neste processo, existem três diferentes fases: a Fase I, de modificação química da molécula exógena, da qual participam as enzimas Esterases e MFO; a Fase II, de conjugação, mediada principalmente pelas GST, e a Fase III, que consiste de compartimentalização e/ou excreção dos metabólitos não-tóxicos gerados (Frova 2006). Todas essas enzimas agem de maneira integrada, diminuindo a quantidade e o tempo de permanência do xenobiótico no organismo do inseto (Sheehan et al. 2001). Quando o xenobiótico é um inseticida, aumento na atividade das enzimas detoxificadoras pode resultar em resistência, comumente chamada de “resistência metabólica”.

Aumento de atividade das enzimas detoxificadoras pode resultar de uma série de alterações (Hemingway e Ranson 2000, Hemingway et al. 2004, Li et al. 2007), que incluem:

1) Amplificação gênica: aumento do número de cópias de gene que codifica enzima envolvida no processo, em inseto resistente, em comparação com o suscetível, aumentando a quantidade de enzima produzida (principal alteração responsável por aumento de atividade de Esterases);

2) Expressão gênica alterada: decorre de alguma mutação na região promotora do gene, fazendo com que este seja mais (ou menos) expresso no inseto resistente. Esta alteração também irá acarretar em mudança na quantidade da enzima (principal alteração que concorre para aumento de atividade de GST e MFO);

3) Mudança estrutural: neste caso específico, determinada substituição na região codificante do gene pode acarretar em aumento na atividade da enzima detoxificadora, ou em sua afinidade pelo substrato. Neste caso, ocorre uma mudança qualitativa na enzima (principal alteração que promove insensibilidade do sítio alvo).

É importante salientar que estas alterações das enzimas detoxificadoras podem levar também a resistência a outras substâncias, como por exemplo, aleloquímicos produzidos por plantas, que podem estar presentes nos criadouros larvares (Li et al. 2007). Por outro lado, as alterações acima descritas podem ser responsáveis por outros mecanismos de resistência; este é o caso de amplificação gênica e mudança estrutural, em *Culex*, de Ace, sítio alvo de OP (Labbé et al 2007a, b).

Em insetos vetores, alterações do sítio alvo e resistência metabólica a inseticidas são os mecanismos mais relatados. Nesse sentido, esta dissertação se concentrou no estudo da enzima Acetilcolinesterase, alvo de OP, classe de inseticidas muito usada no controle de *A. aegypti* no Brasil, e no estudo das enzimas envolvidas com a resistência metabólica. Também serão apresentados, para várias populações avaliadas, alguns resultados obtidos, relativos ao alvo de PI, o canal de sódio regulado por voltagem.

1.6. Esterases

São enzimas da classe das Hidrolases, que agem sobre ligações do tipo éster. Todos os compostos que contêm ligações éster, sejam eles endógenos ou exógenos, são potencialmente suscetíveis à ação das Esterases, que catalisam a hidrólise dessas ligações, gerando como produtos um álcool e um carboxilato (Wheelock et al. 2005; Figura 1.10).

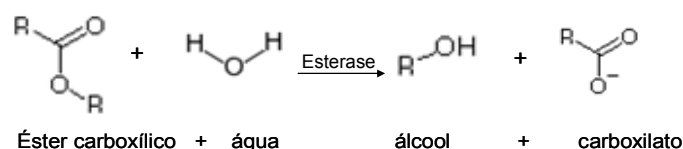


Figura 1.10: reação de hidrólise de uma ligação do tipo éster mediada pelas Esterases, na qual são formados um metabólito alcoólico e um ácido carboxílico.

Há indícios de que as Esterases participem de processos endógenos, que ocorrem naturalmente nos insetos, como por exemplo, o processamento de sinais relacionados com a recepção de caimônios e feromônios (Oakeshott et al. 2010). Além disso, é bem descrito o papel dessas enzimas na regulação dos títulos de hormônio juvenil nos estágios larvar e pupal dos insetos (Anspaugh e Roe 2005, Anand et al. 2008). Neste último caso, admite-se a existência de Esterases específicas, convencionalmente chamadas de Esterases de Hormônio Juvenil (JHE, do inglês “*Juvenile Hormone Esterase*”). No genoma de *A. aegypti*, 10 sequências potenciais de JHE foram anotadas. Entretanto, apenas três continham um “domínio” característico de JHE, e apenas duas apresentaram expressão em momento do ciclo de vida compatível com sua função fisiológica de degradação de hormônio juvenil, no final do estágio larvar e no estágio pupal (Bai et al. 2007).

Uma vez que inseticidas OP, CB e PI apresentam ligações éster em sua estrutura química, estão também suscetíveis à hidrólise mediada por Esterases, podendo este processo resultar em resistência.

1.6.1. Nomenclatura e classificação

Existem várias tentativas de classificação dessas enzimas nos registros bibliográficos (Montella 2008). A classificação das Esterases mais amplamente empregada é a do NC-IUBMB (do inglês “*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*”). De acordo com este Comitê, as enzimas são designadas por quatro números sequenciais, precedidos pelas letras EC (de “*Enzyme Commission number*”) que indicam, na ordem: o tipo de reação que catalisam, o grupo químico reconhecido e a natureza do substrato; o último número identifica a enzima. No caso das Esterases, os dois primeiros números definem: EC 3 – Hidrolases, enzimas que promovem reação de hidrólise, e, EC 3.1- Esterases, que são Hidrolases que atuam sobre ligações do tipo éster. As Esterases mais estudadas nesta dissertação pertencem às seguintes classes: EC 3.1.1, que atuam sobre substratos que possuem um éster carboxílico, como os inseticidas PI e CB, e EC 3.1.8, que atuam sobre substratos do tipo fosforotriester, como a maioria dos inseticidas OP.

No caso das Esterases EC 3.1.1, as mais interessantes, no contexto da resistência a inseticidas, são as Carboxilesterases, ou Ali Esterases (EC 3.1.1.1), que atuam preferencialmente sobre moléculas de cadeia aberta; as Arilesterases ou Esterases A (EC 3.1.1.2), que apresentam preferência por compostos aromáticos como o fenil acetato; Acetilcolinesterases (EC 3.1.1.7), que atuam sobre acetilcolina; e Butirilcolina Esterases, ou Pseudocolinesterases (EC 3.1.1.8), que atuam sobre acilcolina (precursora da Acetilcolina). Já as Esterases EC 3.1.8 atuam sobre compostos aril dialquilfosfatos, que possuem um fosforotriester, sendo identificadas como EC 3.1.8.1 e designadas de Fosfotriesterhidrolases, Paraoxonases ou ainda Esterases A (o que gera alguma confusão com as EC 3.1.1.2).

Apesar dessa classificação determinada pelo NC-IUBMB, outras nomenclaturas alternativas são encontradas na literatura. Este tema foi recentemente revisado em tese do laboratório (Montella 2008). É importante ressaltar que, em trabalhos que tratam do tema sobre resistência a inseticidas em insetos, a nomenclatura mais empregada ainda tem sido a mesma adotada para *Culex*: nestes trabalhos, de uma maneira geral, a classificação das Esterases se baseia em sua preferência por acetato de α -naftil ou de β -naftil,

em sua mobilidade em gel nativo de poli(acrilamida) ou em sua sequência nucleotídica (Hemingway e Karunaratne 1998).

1.6.2. Mecanismo de ação e relação com a resistência a inseticidas

Em geral, a atividade das Esterases depende de uma tríade catalítica (mostrada na figura 1.11) que consiste de um resíduo de serina, um de histidina e um resíduo ácido (glutamato ou aspartato).

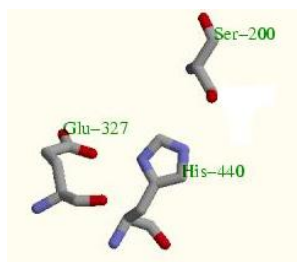


Figura 1.11: posição relativa da tríade catalítica no sítio ativo das Serina Esterases. Os números, não adjacentes, refletem a posição de cada resíduo, na sequência polipeptídica de uma Acetilcolinesterase de *T. californica*. Esta figura foi adaptada do site: <http://www.enzyme.chem.msu.ru/hcs/cgi/class.cgi?clsid=S.01.01>

O processo pelo qual as Esterases clivam ligações éster envolve a formação e a degradação de um complexo “acil – enzima” (em vermelho na Figura 1.12). Primeiramente, ocorre a formação de um intermediário enzima-substrato. A porção alcoólica do substrato é liberada deste intermediário, resultando na formação do complexo “acil - enzima”. A hidrólise posterior deste complexo libera a porção ácida do substrato e regenera a enzima (Glynn 1999, Wheelock et al. 2005, Satoh e Hosokawa 2006).

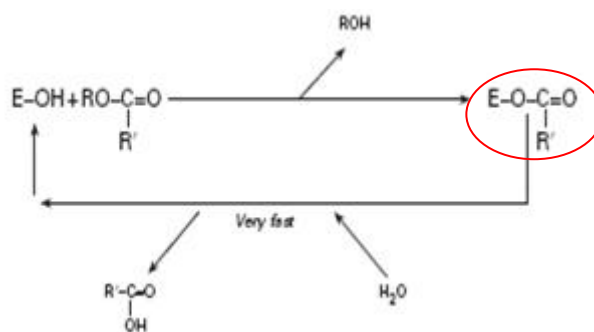


Figura 1.12: esquema simplificado da reação de hidrólise mediada pelas Esterases sobre substratos do tipo éster carboxílico. Inicialmente, um intermediário (não mostrado) se forma e colapsa, liberando a porção alcoólica do substrato e formando o complexo acil-enzima (mostrado em vermelho). Posteriormente, uma molécula de água reage com este complexo, liberando a porção ácida do substrato e regenerando a enzima. Figura extraída de Glynn 1999.

Para substratos como os inseticidas PI e CB, a reação se processa rapidamente, com hidrólise eficiente do substrato e regeneração da enzima livre. Para a maioria dos inseticidas OP (que são fosforotioatos com três ligações ésteres, em sua maioria), o intermediário enzima-substrato é estável (Hemingway e Karunaratne 1998). Isto acontece porque as Esterases de insetos são inibidas por OP; ou melhor, OP são considerados substratos pobres para estas enzimas (Ketterman et al. 1992). As Esterases possuem afinidade muito alta por estes compostos, e capacidade muito baixa de hidrolisá-los (Hemingway e Karunaratne 1998). Por isso diz-se que as Esterases de insetos “sequestram” inseticidas OP (Hemingway 2000). Em *Culex*, por exemplo, a taxa de regeneração da enzima é tão lenta que, para hidrolisar completamente uma molécula do OP paraoxon, uma molécula de Esterase gasta cerca de 32 h (Hemingway e Karunaratne 1998). Por isso, a resistência de insetos a OP, quando mediada por Esterases, em geral está associada à presença de maior número de moléculas dessas enzimas.

Este é o caso, por exemplo, das Esterases em *Culex*, o mais estudado gênero de mosquitos: resistência a OP por aumento na quantidade de Esterases resulta principalmente de amplificação gênica (Hemingway 2000). Neste gênero foram descritos eventos de co-amplificação (de pares de alelos) e de amplificação única (Hemingway et al. 2004). Ainda que a amplificação gênica seja o mecanismo genético mais comum em *Culex*, há também relatos de alteração na região promotora concorrendo para o aumento na quantidade de moléculas de Esterases nesses insetos (Li et al. 2007). Além disso, foi demonstrado que algumas enzimas possuem maior afinidade pelos OP em mosquitos resistentes; este mecanismo é inefetivo contra PI e fracamente efetivo contra CB (Hemingway e Karunaratne 1998).

Os casos descritos de resistência ao OP fosforoditioato malathion nos dípteros, em particular, não parecem estar relacionados com aumento na expressão de enzimas preexistentes, e sim com a presença de Esterases diferentes, que hidrolisam mais eficientemente este composto (Hemingway e Ranson 2000). Neste sentido, foi detectada uma mutação na região codificante de um gene de Esterase em cepas resistentes dos dípteros *M. domestica* e *Lucilia cuprina*, o que gerou alta atividade hidrolítica frente a OP e queda nas taxas de hidrólise de outros substratos do tipo éster carboxílico (Li et al. 2007).

Adicionalmente, há indícios de que um mecanismo parecido ocorra em *Anopheles arabiensis*, *Anopheles culicifacies*, *Anopheles stephensi* e *Culex tarsalis* (Hemingway e Karunaratne 1998, Hemingway e Ranson 2000, Li et al. 2007).

Nos dípteros, ampliações, aumentos de expressão e/ou mutações na região codificante de Esterases, até o momento, foram somente caracterizados em mosquitos do gênero *Culex* e em *Haematobia irritans*, *Chrysomya putoria*, *M. domestica* e *L. cuprina* (Li et al. 2007). No entanto, a frequente utilização de ensaios bioquímicos, como os utilizados nesta dissertação, para quantificar a atividade das Esterases, de forma coletiva, já foi capaz de relacionar maior atividade dessas enzimas com resistência a OP nos mosquitos *Anopheles albimanus* e *A. aegypti*, além de espécies do gênero *Culex*. Este é o caso, por exemplo, de populações de campo de *A. albimanus* da Guatemala (Brogdon et al. 1988), e de *A. aegypti* de Porto Rico (Mourya et al. 1993), Trinidad (Mourya et al. 1993, Vaughan et al. 1998, Polson et al. 2011), Tortola, nas Ilhas Virgens Britânicas (Wirth e Georghiou 1999), Cuba (Rodríguez et al. 1999, Rodríguez et al. 2004), Tailândia (Pethuan et al. 2007), Martinica (Marcombe et al. 2009), e do Brasil (Macoris et al. 2003, Montella et al. 2007), e de cepas de *C. tarsalis* e *C. quinquefasciatus* da Califórnia, selecionadas em laboratório com OP (Hemingway e Georghiou 1984). No entanto, é muito importante ressaltar que em nenhum destes trabalhos foi possível identificar as espécies moleculares associadas à resistência, ou seja, qual subgrupo das Esterases está sendo realmente responsável pela resistência naquela população.

1.7. Oxidases de Função Múltipla (MFO)

As Oxidases de Função Múltipla formam uma superfamília de enzimas complexa, presente em todos os organismos aeróbicos, inclusive os insetos (Scott 1999, Hemingway e Ranson 2000). As MFO podem ser encontradas no retículo endoplasmático (sendo chamadas de microssomais) e nas mitocôndrias (Feyereisen 1999, Scott 1999). Estas são enzimas bastante plásticas, estando envolvidas no metabolismo de compostos endógenos, como

hormônio juvenil e ecdisona, além do metabolismo de xenobióticos, como aleloquímicos e inseticidas (Bergé et al. 1998, Feyereisen 1999, Scott 1999, Hemingway e Ranson 2000, Li et al. 2007, Iga e Smagghe 2010). Há ainda indícios de que as MFO participem do processamento de sinais relacionados com a recepção e a biossíntese de odorantes (Bergé et al. 1998, Maïbèche-Coisne et al. 2005, Oakeshott et al. 2010).

Estudos apontam para o papel de uma MFO microsomal na síntese de hormônio juvenil, assim como a participação de outras enzimas microsomais na degradação deste hormônio (Feyereisen 1999). Foram também identificadas cinco enzimas MFO que atuam diretamente na biossíntese de 20-hidroxiecdisona a partir de colesterol (ou fitoesterol, no caso de insetos fitófagos) (Iga e Smagghe 2010), e há indícios da participação de MFOs também na degradação deste ecdisteróide (Feyereisen 1999). Foi sugerido que estas enzimas participem ainda da clivagem de odorantes, como feromônios, por exemplo, nas antenas do Lepidoptera *Mamestra brassicae*, ao mesmo tempo em que oferecem proteção aos seus neurônios sensoriais contra compostos potencialmente danosos (Maïbèche-Coisne et al. 2005).

Também há indícios de que as MFOs sejam importantes na resposta adaptativa dos insetos aos compostos tóxicos sintetizados por plantas hospedeiras (aleloquímicos) presentes nos criadouros (Bergé et al. 1998, Feyereisen 1999). Insetos herbívoros especialistas são frequentemente bem adaptados aos aleloquímicos encontrados em sua planta hospedeira, uma vez que possuem enzimas detoxificadoras específicas, ao passo que os herbívoros generalistas apresentam enzimas detoxificadoras menos específicas, que permitem sua adaptação a uma grande variedade de aleloquímicos encontrados no *habitat* em que vivem (Li et al. 2007). Nesse sentido, Ramsey et al., em 2010, sugeriram que a quantidade de genes que codificam as MFO do inseto generalista *M. persicae* é cerca de 40% maior que a do inseto especialista *Acyrtosiphon pisum*. De forma interessante, são frequentes os casos de indução da expressão de genes que codificam enzimas MFO microsomais relatados na literatura. Trabalhos realizados com *A. aegypti*, por exemplo, demonstraram que a exposição a doses subletais de aleloquímicos ou inseticidas é capaz de induzir aumento da atividade de MFO e da expressão dos genes que as codificam (David et al. 2006, Poupardin et al. 2008).

Além da capacidade das MFO promoverem resistência e tolerância a inseticidas e aleloquímicos, esta superfamília enzimática está também envolvida com a bioativação de alguns inseticidas OP (ver item 1.4.1b), administrados na forma de pró-inseticidas. No caso dos fosforotionatos e fosforoditioatos, as MFO retiram o átomo de enxofre, ao mesmo tempo em que introduzem um átomo de oxigênio, em reação que resulta em substancial aumento da atividade destes agentes anticolinesterásicos (Fukuto 1990). Entretanto, o processo parece ser bastante complexo, e a ação das MFO pode levar simultaneamente à ativação e à detoxificação dos compostos OP (Feyereisen 1999).

As MFO contêm heme como seu grupamento prostético (constituído por uma parte orgânica denominada de protoporfirina IX e por um átomo de ferro) e, por isso, são consideradas hemoproteínas (Hemingway et al. 2004). São codificadas pelos genes *CYP* (de “*Cytochrome P450*”) e podem ser designadas na literatura por uma variedade de nomes, que incluem, além de MFO, enzima citocromo P450, citocromo P450 Monooxigenases, Monooxigenases poli-substrato, dentre outros (Feyereisen 1999, Scott 1999). O termo “P450” se refere ao comportamento do grupo heme das MFO, que tem pico de absorção em 450 nm, quando reduzido e saturado com monóxido de carbono (Omura e Sato 1964). Esta diversidade de nomes é reflexo da plasticidade da família MFO, que catalisa numerosas reações oxidativas, revelando, muitas vezes, sua falta de especificidade: uma MFO consegue metabolizar mais de 20 diferentes substratos, ao passo que um único composto xenobiótico pode ser metabolizado por múltiplas enzimas MFO (Bergé et al. 1998, Feyereisen 1999, Scott 1999, Maïbèche-Coisne et al. 2005).

As MFO se ligam ao oxigênio molecular e recebem elétrons do agente redutor nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para introduzir um átomo de oxigênio no substrato e reduzir o outro átomo à molécula de água, como mostrado na Figura 1.13 (Bergé et al. 1998). Esta transferência de elétrons é principalmente mediada pela enzima citocromo P450 redutase, ou pelo citocromo *b*₅ (Bergé et al. 1998, Feyereisen 1999, Scott 1999).

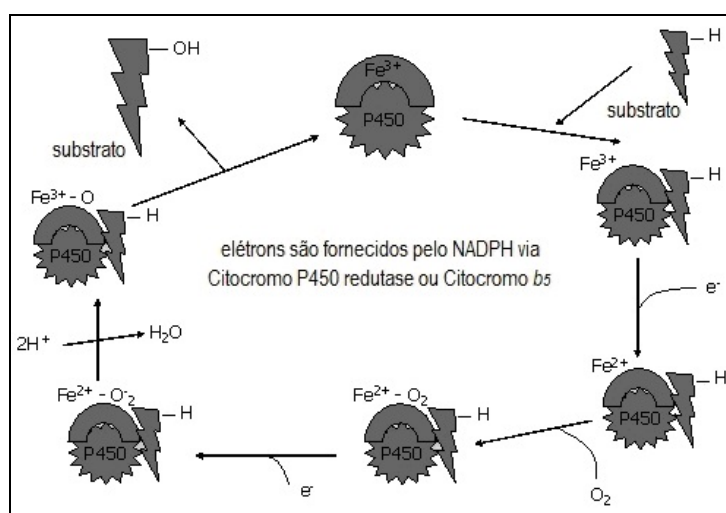


Figura 1.13. Esquema da reação mediada pelas MFO. Inicialmente, o grupamento heme, na sua forma oxidada (Fe^{3+}), se liga ao substrato. Este complexo recebe um elétron do NADPH, promovendo a redução do átomo de ferro a Fe^{2+} . A molécula de oxigênio, por sua vez, se liga ao ferro em seu estado ferroso. Após uma segunda transferência de elétrons, ocorre a clivagem do oxigênio molecular, e o substrato sofre oxidação: um átomo de oxigênio é reduzido à molécula de água, e o outro é incorporado ao substrato. Esta figura foi adaptada do site: http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=6&materia_id=40&materiaver=1

1.7.1. Classificação

A nomenclatura introduzida por Nerbert (Nerbert et al. 1987 *apud* Nerbert 1993), e agora universalmente aceita (Bergé et al. 1998, Feyereisen 1999, Scott 1999), designa todos os genes pertencentes à superfamília das MFO com o prefixo *CYP*, seguido por um numeral para a família, uma letra (em maiúsculo) para a subfamília, e um outro numeral para o gene individual. Os produtos do gene, o RNAm e a enzima, são identificados pelo mesmo prefixo, porém não em itálico (*CYP*). Os membros de uma mesma família apresentam pelo menos 40% de identidade em suas sequências de aminoácidos, ao passo que uma subfamília compartilha no mínimo 55% de identidade em suas sequências peptídicas.

Até o ano de 2010, 710 genes *CYP* validados haviam sido anotados nos genomas dos Diptera *D. melanogaster*, *A. gambiae* e *A. aegypti*, dos Hymenopteras *Apis mellifera* e *N. vitripennis*, do Coleoptera *Tribolium castaneum*, e do Lepidoptera *Bombyx mori* (Oakeshott et al. 2010). Deste total, 164 genes foram encontrados em *A. aegypti*, número bastante elevado em relação a outros dípteros. Todos estes genes de insetos pertencem a quatro

grandes clados que, de acordo com sua origem evolutiva, são denominados CYP2, CYP3, CYP4 (microssomais), e CYP mitocondrial (Feyereisen 2006). A Tabela 1.2 mostra as famílias de CYP pertencentes a cada clado. As CYP mitocondriais são restritas a animais, enquanto as outras CYP, microssomais, estão presentes também em plantas e fungos (Feyereisen 2006, Omura 2010). Os membros do grupo CYP2 parecem estar envolvidos com funções essencialmente fisiológicas, ao passo que os genes dos outros grupos apresentam maior diversidade de funções, sendo inclusive relacionados com o metabolismo de xenobióticos (Feyereisen 2006, Oakeshott et al. 2010).

Tabela 1.2. Famílias de genes CYP presentes nos quatro clados de MFO de insetos.

Clados	CYP 2	CYP 3	CYP 4	CYP mitocondrial
Famílias gênicas CYP	1, 2, 7, 8, 15, 17, 18, 21, 26, 51, 303-307, 342 e 343	6, 9, 28, 308-310, 317, 321, 324, 329, 332, 336-338, 345-348	4, 311-313, 316, 318, 325, 340, 341, 349-352	11, 12, 24, 27, 49, 301, 302, 314, 333, 334, 339, 353

Informação extraída de Feyereisen 2006.

1.7.2. Resistência a inseticidas mediada por MFO

Por conta de sua diversidade genética, especificidade por ampla gama de substratos e versatilidade catalítica, as MFO constituem o único sistema metabólico capaz de mediar, ao menos em teoria, resistência a todas as classes de inseticidas (Bergé et al. 1998, Hemingway e Ranson 2000, Li et al. 2007). Entretanto, a maioria dos estudos relaciona a alteração na atividade dessas enzimas com a resistência a PI, DDT e OP (Hemingway et al. 2004, Li et al. 2007, Molina e Figueiroa 2009, Miyo e Oguma 2010), apesar de também haver relatos de relação com a resistência a IGR (Plapp 1976, Brogdon e McAllister 1998, Daborn et al. 2007, Ghanim e Ishaaya 2010).

A maioria dos estudos aponta que o mecanismo genético mais comumente encontrado nos insetos resistentes a inseticidas é o aumento de expressão dos genes *CYP* (Hemingway et al. 1998). Nesse sentido, usando a análise de microarranjo e RT-PCR quantitativo, Müller et al. (2008) correlacionaram a resistência a PI com aumento na expressão do gene *CYP6P3* de populações naturais de *A. gambiae*. Além disso, foi demonstrado que o produto deste gene é, de fato, capaz de metabolizar PI.

Em 2004, Ranson et al. verificaram, em uma cepa de *A. gambiae* selecionada em laboratório com o PI permetrina, por meio de marcadores microsátélites e da técnica de QTL (“*quantitative trait loci*”), que a resistência estava relacionada a três posições específicas do genoma deste vetor, uma das quais localizada no cromossomo 3, próxima a um grande *cluster* de genes *CYP*. Neste trabalho, os autores relataram aumento de expressão do gene *CYP6Z1* na população selecionada.

Expressão aumentada dos genes *CYP4D4v2*, *CYP6A38* e *CYP4G2* em resposta a exposição ao PI permetrina foi descrita em cepa resistente de *M. domestica* selecionada em laboratório, mas não em cepa suscetível da mesma espécie (Zhu et al. 2008). Em 2010, o mesmo grupo verificou que o gene *CYP6BQ9*, de *T. castaneum*, é capaz de metabolizar PI, e que sua expressão estava aumentada em mais de 200 vezes em uma cepa resistente (QTC279), em relação à expressão em linhagem suscetível. Uma vez que a expressão deste gene foi detectada predominantemente no cérebro, foi sugerido que poderia consistir de proteção do sítio alvo dos PI (Zhu et al. 2010).

Dois estudos recentes com PCR quantitativo relacionaram aumento na expressão do gene *CYP6P9* de *Anopheles funestus* com a resistência a PI, em populações de campo (Cuamba et al. 2010) e na cepa FUM0Z-R (Matambo et al. 2010), ambas coletadas em Moçambique, África.

Foi relatado para *A. aegypti* um maior número de genes *CYP*, principalmente das famílias *CYP6* e *CYP9*, normalmente relacionadas com a resistência a inseticidas, em comparação com o genoma de *D. melanogaster* e *A. gambiae* (Strode et al. 2008). Neste estudo, os autores produziram um “*detox chip*”, a ser usado em análises de microarranjos, contendo sondas de 235 membros de famílias gênicas como Esterases, GST e MFO. Aplicação deste “*A. aegypti detox chip*” a duas cepas selecionadas em laboratório com PI, identificou aumento na expressão de nove genes da família *CYP9* (*CYP9J26*, *CYP9J10*, *CYP9J27*, *CYP9J32*, *CYP9M6*, *CYP9J8*, *CYP9J28*, *CYP9J24*, e *CYP9J19*), em conjunto com aumento na expressão de GST. A mesma metodologia identificou correlação entre resistência a PI e aumento na expressão dos genes *CYP6M6*, *CYP6Z6*, *CYP9J23* e *CYP9J22*, em cepa de *A. aegypti* da Martinica (Marcombe et al. 2009).

Ainda que a maioria dos registros de aumento na atividade de MFO esteja relacionada com aumento de expressão dos genes *CYP*, foi relatado, além de aumento na expressão do gene *CYP6A2* de *D. melanogaster*, a presença de três substituições de aminoácidos, capazes de interferir com a catálise desta enzima. É interessante notar que estas substituições não afetaram a atividade da enzima frente a compostos endógenos, mas aumentaram sua atividade sobre aleloquímicos e sobre DDT (Bergé et al. 1998).

Devido, em parte, ao grande número de genes *CYP* presentes no genoma dos insetos já sequenciados (Feyereisen 2006, Li et al. 2007, Oakeshott et al. 2010), a identificação e caracterização dos poucos genes que podem estar relacionados com a resistência se mostram bastante dificultadas (Hemingway et al. 2004, Daborn et al. 2007). Vários trabalhos relatam aumento de atividade e/ou quantidade de MFO em mosquitos resistentes a inseticidas, frequentemente em conjunto com alteração na atividade de outras enzimas (Hemingway e Ranson 2000, Hemingway et al. 2004). Quantificou-se, por exemplo, aumento de MFO, em conjunto com aumento na atividade de Esterases, em cepas de *A. aegypti* selecionadas em laboratório com PI (Paeporn et al. 2004), em populações de campo desta espécie resistentes a PI, provenientes da Tailândia (Pethuan et al. 2007), e ainda em populações da Colômbia resistentes a DDT e PI (Varón et al. 2010). Aumento de MFO, em conjunto com maior atividade de Esterases e de GST, foi descrito em populações naturais de *A. culicifacies* e de *A. subpictus* do Sri Lanka, com diferentes níveis de resistência a PI e a OP (Perera et al. 2008). Usando sinergistas e ensaios bioquímicos, Matowo et al. (2010) também correlacionaram a resistência a PI de uma população de campo de *A. arabiensis* da Tanzânia com alteração nas enzimas MFO e Esterases.

Como mencionado anteriormente, as MFO também são capazes de detoxificar outras classes de inseticidas. Em diferentes insetos, como *M. domestica* e *L. cuprina*, foi relatada resistência a JHA em cepas com altos níveis de MFO; cepas com alteração em outros mecanismos eram suscetíveis aos JHA (Plapp 1976, Brogdon e McAllister 1998). Foi também documentada relação entre aumento de atividade de MFO e resistência ao JHA piriproxifeno em moscas *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Ghanim e Ishaaya 2010), e relação

entre aumento de expressão dos genes CYP6g1 e CYP12d1, e resistência ao inibidor da síntese de quitina dicyclanil, em *D. melanogaster* (Daborn et al. 2007).

Embora a resistência ao JHA methoprene já tenha sido objeto de registro em algumas linhagens de mosquitos (Dame et al. 1998 *apud* Braga e Valle 2007c, Kadri 1974 *apud* Braga e Valle 2007c), populações brasileiras de *A. aegypti*, sensíveis e resistentes ao OP temephos, mostraram-se suscetíveis a este IGR, apesar de possuírem alteração em diferentes mecanismos de resistência metabólica, incluindo MFO (Braga et al. 2005b). Posteriormente foi sugerida potencial resistência cruzada entre o OP temephos e o JHA piriproxifeno em populações de campo brasileiras de *A. aegypti* que, no entanto, não apresentavam alteração na atividade de MFO (Andrighetti et al. 2008).

Quantificou-se também aumento de MFO e Esterases em populações de campo de *Anopheles aquasalis* originárias da Venezuela resistentes a OP mas não a PI (Molina e Figueiroa 2009). Posteriormente, foi demonstrado, através do uso do sinergista PBO (butóxido de piperonil), relação entre a atividade de MFO e resistência a OP em uma população natural de *D. melanogaster*, que, no entanto, também apresentava alterações em seu gene *ace-2* (Miyo e Oguma 2010).

No Brasil, foi detectada alteração na atividade de GST, Esterases, e em menor grau, de MFO, em uma cepa de *A. aegypti*, selecionada em laboratório com o larvicida OP temephos, que não apresentava resistência cruzada com PI (Melo-Santos et al. 2010).

Nas populações brasileiras do vetor avaliadas, alteração de MFO não parecia ser um mecanismo importante na detoxificação dos inseticidas usados em campo, uma vez que esta havia sido detectada apenas em uma população avaliada em 2005 (Braga et al. 2005b). No entanto, a partir de 2009 a maioria das populações avaliadas evidenciou alteração nestas enzimas (seção 4.4).

1.8. Glutathione S-transferases (GST)

Glutathione S-transferases, ou simplesmente Glutathione Transferases (EC 2.5.1.18), são uma superfamília de proteínas multifuncionais com papéis fundamentais na detoxificação celular de uma ampla gama de compostos endógenos e exógenos. Em plantas e animais, são as principais enzimas da Fase II dos processos de detoxificação metabólica, atuando inclusive na detoxificação de inseticidas (Enayati et al. 2005, Frova 2006, Kasai et al. 2009). Por essa razão, vários trabalhos têm investigado o papel da GST na resistência a inseticidas (Rodriguez et al. 1999, Ding et al. 2003, Lumjuan et al. 2007, Strode et al. 2008). Também têm sido muito estudadas em mamíferos, porque são importantes na epidemiologia do câncer e na resistência a drogas (Enayati et al. 2005, Hayes et al. 2005).

Adicionalmente, outras funções biológicas foram atribuídas a este grupo de enzimas, como a biossíntese de hormônios esteróides e a degradação de aminoácidos aromáticos (Hayes et al. 2005, Frova 2006, da-Fonseca et al. 2010). Já foi também descrita a capacidade de uma GST em se ligar à hematina, o que sugere função protetora no intestino médio do mosquito *A. aegypti*, por meio da redução da toxicidade do heme ingerido com o repasto sanguíneo (Lumjuan et al. 2007).

Alguns autores sugerem ainda que a GST possa ter um papel na resposta adaptativa ao estresse celular (Hunaiti et al. 1995, Singh et al. 2000, Pongjaroenkit et al. 2001, Frova 2006, da-Fonseca et al. 2010). De fato, já foi documentada indução de atividade de enzimas GST frente a mudanças no *habitat* dos insetos, como, por exemplo, a presença de algum agente aleloquímico ou inseticida nos criadouros larvares (Li et al. 2007).

1.8.1. Classificação e nomenclatura

A maioria dos autores, como Sheehan et al. (2001), Enayati et al. (2005), e Frova (2006), aponta a existência de duas subfamílias principais de GST (classificadas de acordo com a localização celular), cada uma codificada por distintas famílias multigênicas:

- 1) GSTs solúveis ou citosólicas; e

2) GSTs microssomais, atualmente chamadas de MAPEG (do inglês “*membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism*”).

Uma terceira subfamília, codificada por plasmídeos de bactérias resistentes a fosfomicina, foi proposta. Adicionalmente, sugeriu-se que as GSTs Kappa, previamente consideradas como uma classe de GSTs citosólicas, podem constituir uma quarta subfamília de GSTs, tipicamente encontradas nas mitocôndrias; em humanos, foram encontradas também nos peroxissomos (Sheehan et al. 2001, Frova 2006).

Nos insetos, até a presente data, foram identificadas apenas GSTs citosólicas (cGSTs) e microssomais, sendo as primeiras as mais importantes no contexto desta dissertação, uma vez que concentram a maioria das GSTs capazes de detoxificar xenobióticos, dentre eles os inseticidas. Esta subfamília de GST é encontrada em todos os organismos aeróbicos e é a maior descrita até o momento (Frova 2006, Kasai et al. 2009, da-Fonseca et al. 2010).

A classificação inicial de cGSTs de insetos distinguiu, imunologicamente, três classes, denominadas I, II e III (Ranson et al. 2001, Li et al. 2007). Posteriormente, com os genomas de insetos sendo cada vez mais rapidamente publicados, foi revelada enorme diversidade de sequências. Com isso, o sistema de classificação de cGSTs de mamíferos foi adotado (Enayati et al. 2005, Li et al. 2007). Esse sistema subdivide as cGSTs com base em uma variedade de critérios, que incluem a organização no genoma, a identidade de sequências de nucleotídeos e aminoácidos; a estrutura tridimensional das enzimas; sua cinética enzimática e características imunoreativas (Frova 2006, Sheehan et al. 2001, Frova 2006). Comparações filogenéticas demonstraram que a classe II dos insetos é ortóloga à classe Sigma dos mamíferos, e que as classes I e III eram exclusivas de insetos; estas foram renomeadas como classes Delta e Epsilon, respectivamente (Li et al. 2007). Atualmente são apontadas 15 classes de cGST em eucariotos e procariotos (Tabela 1.2); no entanto, este número tende a crescer à medida em que o genoma de mais organismos é sequenciado (Sheehan et al. 2001).

Tabela 1.3: distribuição das classes de GST citosólicas em diferentes táxons, segundo Frova 2006 e da-Fonseca et al. 2010.

	Mu	Pi	Alpha	Sigma	Theta	Zeta	Omega	Phi	Tau	Lambda	DHAR	Rho	Delta	Epsilon	Beta	Xi*	Iota*
Mamíferos	x	x	x	x	x	x	x										
Aves	x		x	x	x	x	x										
Anfíbios	x	x	x	x													
Peixes	x	x	x		x	x	x					x					
Moluscos	x	x		x													
Insetos				x	x	x	x						x	x		x	x
Plantas					x	x		x	x	x	x						
Bactérias			x	x	x	x	x								x		

Em negrito são apontadas as classes de cGSTs presentes nos insetos.

* Novas classes recém descritas em mosquitos.

As GST citosólicas em geral são cataliticamente ativas na forma de dímeros, que podem ser homo ou heterodímeros, como ilustrado na Figura 1.14 (Sheehan 2001, Enayati et al. 2005, Frova 2006, Lumjuan et al. 2007).

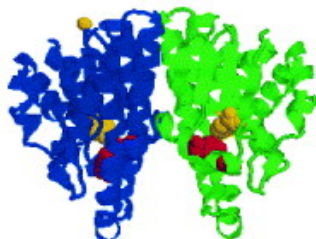


Figura 1.14: estrutura de uma cGST humana da classe Pi. As subunidades são distinguidas pela cor (azul e verde). O sítio ativo da enzima é mostrado em amarelo, no qual um ligante é destacado em vermelho. Esta figura foi adaptada de Sheehan et al. 2001.

Cada subunidade de cGST possui dois sítios de ligação, em domínios distintos: um no domínio I, N-terminal, específico para a ligação à glutationa, também chamado de sítio G; e outro no domínio II, C-terminal, formado primariamente por resíduos com cadeias laterais não-polares, com afinidade por substratos hidrofóbicos (sítio H). O sítio G é bastante conservado, pois, além de conter os resíduos críticos para a ligação à glutationa, responde pela atividade catalítica da enzima. O sítio H se mostra bastante variável, tanto em sequência quanto em topologia, e é esta diversidade que determina a especificidade por distintos substratos hidrofóbicos observada nas diferentes enzimas cGSTs. Com isso, cada subunidade de cGST dimérica é

cataliticamente independente, pois possui seus próprios sítios G e H (Sheehan 2001, Enayati et al. 2005, Frova 2006).

A nomenclatura adotada para designar cada gene ou subunidade de cGST segue as recomendações do “*Committee for Human Gene Nomenclature*” (Frova 2006). Assim sendo, a espécie de origem deve ser indicada por um prefixo de três letras, seguido de “GST”, uma letra de referência à classe e um número que aponta a ordem de descoberta nesta espécie. A composição de subunidades também pode ser indicada. Por exemplo, *AaeGSTD1* define o primeiro gene da classe Delta relatado em *A. aegypti*; *AaeGSTD1-2* se refere a uma GST heterodimérica com as subunidades Delta-1 e Delta-2 de *A. aegypti* (Enayati et al. 2005, Frova 2006).

1.8.2. GSTs citosólicas (cGSTs) em insetos

Nos insetos, as classes de cGST mais abundantes são Delta e Epsilon, exclusivas desses organismos. Juntas, são responsáveis por cerca de 65% do conteúdo total de cGST em *A. gambiae* e *D. melanogaster*, sendo este percentual um pouco menor para *A. aegypti*. Adicionalmente, são essas duas classes que contêm a maioria das GSTs implicadas na resistência a inseticidas (Lumjuan et al. 2007, Ramsey et al. 2010, Oakeshott et al. 2010).

Geralmente, os genes que codificam as cGSTs de insetos estão agrupados em *clusters*, sendo observado um *cluster* para cada classe (Sheehan et al. 2001, Frova 2006, Oakeshott et al. 2010). Este mesmo padrão de organização em *clusters* se repete no genoma de plantas e de outros animais (Frova 2006). Um processo que favorece a diversidade e que tem se mostrado relativamente comum nesta família gênica é a ocorrência de “*splicing*” alternativo, observado em genes da classe Delta de vários insetos (Sheehan et al. 2001), já tendo sido descrito para as seguintes espécies de mosquitos: *A. aegypti* (Lumjuan et al. 2007); *A. gambiae* (Ranson et al. 1998, Ding et al. 2003); *Anopheles dirus* (Pongjaroenkit et al. 2001) e *C. quinquefasciatus* (Kasai et al. 2009). Nestas três últimas espécies, são produzidos quatro transcritos diferentes por “*splicing*” alternativo, enquanto que em *A. aegypti*, três. Adicionalmente, Kasai et al., em 2009, demonstraram que os padrões de expressão em *C. quinquefasciatus* diferem para os quatro

transcritos gerados pelo gene *CquGSTD1*, o que fornece indícios não só de que múltiplos mecanismos regulam a expressão desse gene, mas também de que estas enzimas desempenham diferentes funções.

Em 2007, Lumjuan et al. relataram a identificação de 26 genes que codificam cGSTs de *A. aegypti*, dois dos quais sofrem “*splicings*” alternativos, gerando um total de 29 transcritos. Embora três destes genes não pertencessem a nenhuma classe de cGST previamente descrita; genes ortólogos já haviam sido identificados em *A. gambiae* (Ding et al. 2003). Por isso, foi proposta uma classificação para esses genes, antes designados como *GSTu1*, *GSTu2* e *GSTu3* (“u” do inglês “*unclassified*”); *GSTu2* e *GSTu3* foram agrupados na classe Xi (ou X); e o *GSTu1*, na classe Iota (Lumjuan et al 2007, Strode et al. 2008).

Apesar da divergência nas sequências de nucleotídeos, todas as proteínas GST apresentam níveis impressionantes de conservação estrutural, exibindo uma organização dimérica e de dobramento em 3D comum (Frova 2006).

1.8.3. Mecanismo de ação das cGSTs

A função primária da GST consiste na catálise da conjugação de glutationa, um tripeptídeo endógeno (Figura 1.15), com algum substrato lipofílico, formando um produto mais solúvel e não-tóxico, de maneira que este seja mais facilmente excretado ou compartimentalizado pelas enzimas da Fase III da biotransformação (Frova 2006).

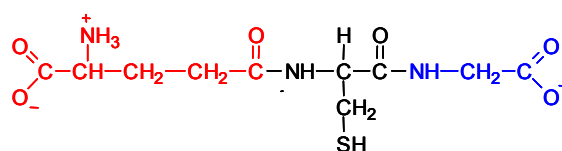


Figura 1.15: representação química do tripeptídeo glutationa, formado por glutamato (em vermelho), cisteína (em preto) e glicina (em azul).

Na reação de conjugação catalisada por GST, o sítio H (domínio C-terminal, hidrofóbico – ver item 1.8.1) se liga ao substrato lipofílico, enquanto o resíduo catalítico do sítio G, na porção N-terminal, interage e ativa o grupo

sulfidril da glutatona (mostrado em vermelho na figura 1.16), reduzindo-a (gerando um ânion tiolato). O ânion tiolato da glutatona tem potencial de reagir com o substrato hidrofóbico ligado ao sítio H da enzima. Essa reação de conjugação neutraliza os domínios eletrofílicos do substrato conferindo-lhe caráter mais solúvel, e facilitando sua eliminação do organismo (Hemingway et al. 2004, Enayati et al. 2005, Montella 2008).

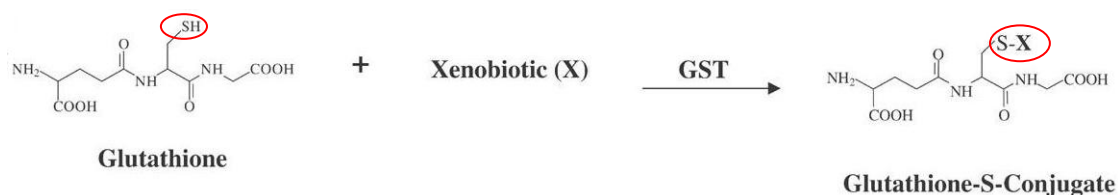


Figura 1.16: reação de conjugação mediada por GST. O composto lipofílico é representado por “X”. O grupo sulfidril da glutatona é mostrado em vermelho, assim como a ligação do enxofre da glutatona ao xenobiótico para formar o conjugado. Esta figura foi adaptada de Townsend e Tew 2003.

As GST podem ainda apresentar atividade de dehidroclorinase, também conhecida como atividade DDTase. Na reação (Figura 1.17), a GST remove um átomo de hidrogênio da molécula de DDT, resultando na eliminação de um cloro e gerando DDE, metabólito não tóxico (Hemingway et al. 2004). Embora o conjugado de glutatona e DDT nunca tenha sido identificado, sabe-se que este tripeptídeo é um cofator essencial na reação de dehidroclorinação (Hemingway 2000, Sheehan et al. 2001, Vontas et al. 2001, Enayati et al. 2005, Frova 2006, Li et al. 2007, Lumjuan et al. 2007).

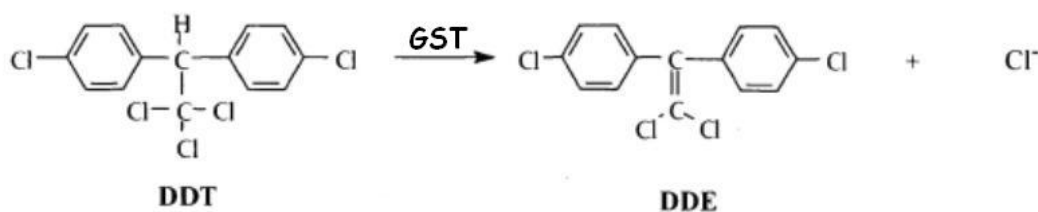


Figura 1.17: reação de dehidroclorinação do DDT mediada por GST. Note que o tripeptídeo glutatona não aparece no produto final desta reação. Figura adaptada do site: http://cfpub.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.abstractDetail/abstract/370/report/F

Apesar de enzimas GST não terem ainda sido implicadas no metabolismo direto de inseticidas PI (Hemingway et al. 2004), seu papel na detoxificação dos produtos da peroxidação lipídica já foi demonstrado (Sheehan et al. 2001, Enayati et al. 2005, Frova 2006, Li et al. 2007). Também já foi descrito o sequestro de moléculas de PI, mediado por uma GST, no coleóptero *Tenebrio molitor* (Kostaropoulos et al. 2001). Vários trabalhos relacionam a maior atividade de GST, de forma generalizada, com a resistência a PI (Rodriguez et al. 1999, Rodriguez et al. 2005, Li et al. 2007, Montella et al. 2007, Cuamba et al. 2010, Polson et al. 2011), enquanto outros associam a atividade peroxidásica de GST com resistência a PI (Vontas et al. 2001, Costin et al. 2007, Li et al. 2007).

1.8.4. Relação de cGST com resistência a inseticidas

Em mosquitos, a GST tem sido apontada como a principal enzima relacionada com a resistência ao DDT e a PI (Hemingway 2000, Hemingway et al. 2004, Enayati et al. 2005). Nesse sentido, foi descrito, por exemplo, em *A. gambiae* e *A. aegypti*, relação entre aumento na expressão da GSTE2, enzima altamente eficiente na metabolização de DDT, e resistência a este composto (Lumjuan et al. 2001, 2007).

Com relação ao metabolismo de PI, foi também demonstrada, em uma cepa de *Nilaparvata lugens* selecionada em laboratório, resistência associada com fração de enzimas GST com atividade de Peroxidase, aumentada em função de amplificação gênica. Aumento de atividade resultou em atenuação da peroxidação de lipídeos e conseqüentemente, em redução da mortalidade desta cepa (Vontas et al. 2001, Li et al. 2007). Não é só em insetos que GSTs têm papel relevante na detoxificação de inseticidas: em 2007, Costin et al. verificaram que a exposição do peixe de água doce *Carassius auratus gibelio* a uma dose única de deltametrina gerou um importante estresse oxidativo, gradativamente neutralizado pelo aumento dos níveis de glutathione e da atividade Peroxidásica da GST.

Resistência de *A. aegypti* a PI foi relacionada ao aumento na atividade das GSTs em populações do Brasil (Montella et al. 2007) e de Trinidad (Polson et al. 2011). Adicionalmente, Lumjuan et al., em 2011,

relataram que todas as enzimas cGST da classe Epsilon de *A. aegypti* apresentam atividade Peroxidásica. Contudo, no caso da AaGSTE7 e da AaGSTE2, repetidas vezes superexpressas em populações resistentes a PI (Strode et al. 2008, Lumjuan et al. 2011), a atividade Peroxidásica não é significativamente maior do que em populações suscetíveis. Em outras palavras, foi possível correlacionar estas isoformas com a resistência a PI, embora seu mecanismo não tenha sido decifrado. Foi ainda proposto o “sequestro” de piretróides por GST (Kostaropoulos et al. 2001). Estes autores foram os primeiros a demonstrar a ligação de uma molécula de PI ao sítio ativo de uma GST, e sugeriram que esta ligação contribuísse para a detoxificação destes inseticidas, através da diminuição do número de moléculas livres de PI livres ou da facilitação de sua ligação a outras enzimas detoxificadoras, capazes de processá-los.

A atividade de conjugação da GST pode ainda conferir resistência aos inseticidas OP. Este mecanismo foi descrito por Hollingworth em 1969. Embora este estudo não nomeasse a GST, a atividade dependente de glutathione desta enzima foi demonstrada. Posteriormente, foram descritos vários casos de resistência a OP mediada pela capacidade de conjugação das GSTs (Sheehan et al. 2001, Enayati et al. 2005, Li et al. 2007).

Em muitos casos de resistência a inseticidas, no entanto, as isoformas de GST especificamente envolvidas neste fenômeno não são identificadas. Insetos possuem, tipicamente, muitas isoformas de GST, o que frequentemente dificulta a identificação daquelas que geralmente participam da resistência (Wei et al. 2001). Nos casos em que as observações estão baseadas em estudos moleculares, a resistência tem sido principalmente atribuída a aumentos na quantidade de uma ou mais enzimas GST, seja por aumento de transcrição, mecanismo mais frequente, ou por amplificação gênica (Enayati et al. 2005).

Nesse sentido, foi demonstrado, em vários insetos, que a maior atividade de enzimas GST, de maneira geral, parece possuir papel importante na resistência a diferentes classes de inseticidas, como por exemplo, OP (Plapp 1976, Rodriguez et al. 1999, Wei et al. 2001, Li et al. 2007), OC do tipo DDT (Ding et al. 2003, Li et al. 2007, Lumjuan et al. 2007, Polson et al. 2011), e

PI (Rodriguez et al. 1999, Rodriguez et al. 2005, Li et al. 2007, Montella et al. 2007, Cuamba et al. 2010, Polson et al. 2011).

1.9. Acetilcolinesterase (Ace)

Acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) é uma enzima essencial no sistema nervoso de todos os animais (Revueña et al. 2009). Esta enzima está presente nas membranas pós-sinápticas, e seu principal papel é interromper a transmissão nervosa, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina (Figura 1.18a). Esta reação envolve ataque nucleofílico da serina, do sítio catalítico da Ace, ao carbono acil da acetilcolina, gerando um intermediário tetraédrico, estabilizado por ligações de hidrogênio, que resulta em colina livre e serina acetilada (Figura 1.18b). Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina pela água recupera o sítio catalítico da enzima (Soreq e Seidman, 2001). Os produtos finais desta reação são ácido acético e colina (Nabeshima et al. 2003, Wu et al. 2010).

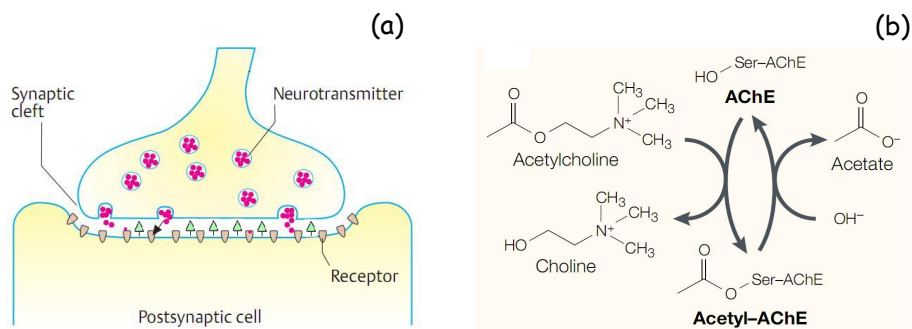


Figura 1.18: (a) Esquema da transmissão nervosa em uma junção sináptica. Quando um impulso nervoso alcança o final de um neurônio pré sináptico, a acetilcolina (círculos rosa) estocada em vesículas é liberada na fenda sináptica e interage com seu receptor na membrana pós sináptica, causando estimulação da fibra nervosa ou músculo. A enzima Acetilcolinesterase (triângulos verdes) atua como um agente regulador da transmissão nervosa, reduzindo a concentração de acetilcolina na fenda sináptica, hidrolisando-a em colina e acetato, produtos que não mais estimulam o neurônio pós sináptico. Esta figura foi adaptada de Koolman e Roehm, 2005. (b) Reação mediada pela Ace. Primeiramente há a formação do complexo enzima-substrato (não mostrado). Então, a porção alcoólica do substrato (colina) é expelida deste intermediário, e forma-se complexo “acetil-enzima”. Posteriormente, hidrólise deste complexo libera a porção ácida do substrato (acetato) e regenera a enzima. Esta figura foi extraída de Soreq e Seidman, 2001.

A Ace faz parte da superfamília das Serina Esterases. Estas enzimas exibem em seu sítio catalítico uma tríade formada por resíduos de serina, histidina e um aminoácido ácido. Uma particularidade da Ace é que, enquanto em muitas Serina Esterases o grupo ácido é um aspartato, na Ace é um glutamato (Soreq e Seidman 2001). A reação catalisada pela Ace é extraordinariamente rápida: uma única enzima hidrolisa cerca de 10^4 moléculas de substrato por segundo (Soreq e Seidman 2001, Huchard et al. 2006). Seu sítio ativo reside no fundo de uma fenda profunda e estreita, conforme mostrado nas Figuras 1.19 e 1.20.

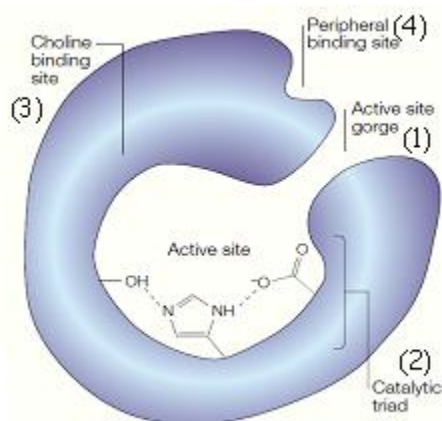


Figura 1.19: estrutura da enzima Ace. Cristalografia por raios-X identificou o sítio ativo no fundo de uma fenda (“gorge”) estreita (1), circundada por aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas. Ao fundo, encontra-se a tríade catalítica (2), composta pelas cadeias laterais de resíduos de serina, histidina e glutamato. Há um sítio de ligação a colina (3). Foi também identificado, por ensaios de mutagênese, um sítio de ligação periférico (4). Esta figura foi adaptada de Soreq e Seidman, 2001.

A maior parte das Acetilcolinesterases é ativa na forma de dímeros. Cada subunidade possui um domínio catalítico de cerca de 500 resíduos de aminoácidos, que precisa ser glicosilado e corretamente dobrado para adquirir sua conformação cataliticamente ativa, além de um pequeno peptídeo C-terminal, de cerca de 30-40 aminoácidos, que determina sua oligomerização pós-traducional e ancoramento à membrana (Kakani et al. 2011).

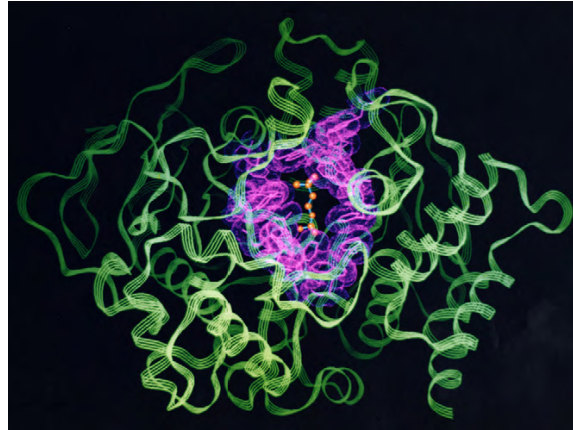


Figura 1.20: estrutura 3D da Ace de *Torpedo californica*, disposta como um diagrama de Richardson (em fitas). Os resíduos aromáticos conservados são mostrados em roxo. Acetilcolina é mostrada (em formato de bolas e bastões) no fundo da fenda (“gorge”) do sítio ativo, ligada a ele. Esta figura foi extraída de Dvir et al. 2010.

Em 1988, Hass et al. documentaram a existência de uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI) na porção C-terminal da proteína Ace de *Drosophila melanogaster*. Atualmente sabe-se que a Ace de todos os insetos estudados permanece ligada às membranas celulares por esta âncora GPI (Kakani et al. 2011).

A Ace vem sendo muito estudada por ser o alvo dos inseticidas OP e CB. A inibição da Ace por estes inseticidas (Figura 1.21) faz com que a enzima perca a capacidade de hidrolisar a Acetilcolina e, com isso, a concentração do neurotransmissor permanece alta nas junções nervosas, causando excitação excessiva, o que eventualmente culmina na morte do inseto (Fukuto 1990, Walsh et al. 2001, Nabeshima et al. 2003, Wu et al. 2010).

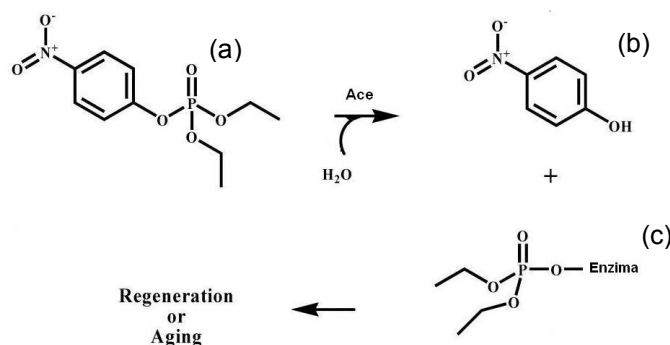


Figura 1.21: mecanismo de inibição da hidrólise da Ace por um inseticida OP. O inseticida (a), previamente ativado por uma MFO, se liga à Ace, e é hidrolisado em processo que requer a adição de uma molécula de água, liberando *p*-nitrofenol (b). A Ace fosforilada (c) pode tanto liberar o grupo fosfato e retomar sua atividade catalítica, quanto ficar permanentemente ligada ao fosfato (*aging*). Figura adaptada de Wheelock et al. 2005.

A reação com inseticidas CB é relativamente rápida, com hidrólise do substrato e regeneração da enzima livre. No caso de OP, embora a formação do complexo fosforilado com a enzima seja rápida, este intermediário é estável ou sua taxa de hidrólise é muito lenta, se tornando, por vezes, uma etapa limitante (Hemingway e Karunaratne 1998). A meia-vida da regeneração espontânea de uma Ace inibida por um CB é de aproximadamente 30 minutos, enquanto a de uma Ace inibida por um OP pode levar de muitas horas a dias. Há ainda casos em que a Ace é inibida irreversivelmente por OP, ou seja, a etapa de regeneração espontânea não ocorre (Fukuto 1990).

Além da função hidrolítica da Ace, atualmente discute-se seu papel em outras atividades, “não clássicas”. Algumas dessas atividades são ainda sugestões como, por exemplo, atividade proteolítica intrínseca (Soreq e Seidman 2001). A presença de Ace em células e tecidos não neuronais e não colinérgicos, juntamente com a diversidade das suas isoformas, estimulam pesquisas sobre suas outras potenciais funções biológicas, não catalíticas.

Existem três isoformas de Acetilcolinesterase em humanos, produzidas por *splicing* alternativo, bem estabelecidas: a isoforma tetraédrica Ace-S (“S” do inglês “*synaptic*”), a isoforma dimérica Ace-E (“E” de “*erythrocytic*”), ancorada por GPI (expressa no sangue), e a variante Ace-R, (do inglês “*read-through*”). Todas apresentam a mesma atividade enzimática, mas diferem na especificidade de tecido (já tendo sido encontradas em tecido hematopoiético, em osteoblastos, leucócitos, entre outros), composição multimérica (“*multimeric assembly*”), e localização celular - secretada, citoplasmática, nuclear, ou associada à membrana (Paraoanu e Layer 2008).

Alguns estudos apontam papel não catalítico da Ace na adesão celular, na ligação com laminina-1 (proteína predominantemente de matriz extracelular), e na diferenciação e crescimento de células neurais (Soreq e Seidman 2001, Paraoanu e Layer 2008). Em humanos, existe relação entre diminuição gradual nos níveis de acetilcolina (derivada de atividade excessiva da Ace) com doenças degenerativas do cérebro, e com deficiências cognitivas e neuromotoras progressivas (Balasubramanian e Bhanumathy 1993, Grisaru 1999, Soreq e Seidman 2001). Foi inclusive demonstrado que inibição parcial da atividade colinesterásica no cérebro se mostra útil no tratamento dos sintomas da doença de Alzheimer, por exemplo (Auletta et al. 2010, Bartolucci

et al. 2010). No entanto, de nosso conhecimento, com relação a insetos, apesar de que há relato de envolvimento da Ace na neurogênese em *D. melanogaster* (Huchard et al. 2006), estes papéis da enzima são pouco documentados.

Comparação de sequências e análises filogenéticas indicam que a maioria dos insetos apresenta dois genes *ace* (Jiang et al. 2009b), denominados *ace-1* e *ace-2* (Weill et al. 2002, Benting e Nauen 2004, Jiang et al. 2009b, Kakani et al. 2011, Wu et al. 2010). Há indícios que *ace-1*, que está relacionado com a resistência a inseticidas na maior parte dos insetos, inclusive em mosquitos (Weill et al. 2002, Cassanelli et al. 2006), seja o gene ancestral (Huchard et al. 2006). Os Diptera Cyclorrapha (moscas), no entanto, constituem exceção, uma vez que perderam o gene *ace-1* ao longo de sua evolução (Weill et al. 2002, Huchard et al. 2006). Moscas têm apenas um gene *ace*, que desempenha a função colinérgica – e, portanto, tem relação com resistência neste grupo (Fournier et al. 1993, Mutero et al. 1994, Zhu et al. 1996, Vontas et al. 2002). Durante algum tempo, o fato de ter sido da mosca *D. melanogaster* o primeiro gene *ace* a ser isolado em insetos (Hall e Spiere 1986), gerou alguma confusão na literatura, com a nomenclatura (exemplos em Pang et al. 2009, Nabeshima et al. 2003 e Nabeshima et al. 2004). Hoje, porém, o único gene *ace* de moscas é denominado *ace-2* (Huchard et al. 2006).

O primeiro indício de que o gene *ace* de *Drosophila* codificava uma Ace funcional nas sinapses colinérgicas foi a identificação de mutações pontuais que geravam insensibilidade frente a OP e CB (Fournier et al. 1993, Mutero et al. 1994). Posteriormente, foram caracterizadas mutações envolvidas com a resistência a inseticidas em genes ortólogos ao *ace* de *D. melanogaster* nos insetos *Musca domestica*, *Leptinotarsa decemlineata* e *Bactrocera oleae* (Zhu et al. 1996, Walsh et al. 2001, Vontas et al. 2002).

O papel fisiológico de cada uma das duas Acetilcolinesterases em alguns insetos ainda não está claro. No entanto, Revuelta et al. (2009), analisando os dois genes *ace* de *Blattella germanica* por meio de RNA de interferência e PCR quantitativo, demonstraram que o produto do gene *ace-1* é o principal responsável pela hidrólise fisiológica de acetilcolina: cerca de 65-75% de toda a atividade colinesterásica neste modelo. A contribuição da Ace-2

nesta reação foi moderada, mas significativa, o que sugere uma atividade baixa ou restrita a alguns poucos tecidos. Em *C. pipiens*, ensaios enzimáticos com Ace recombinantes e acetilcolina também não foram capazes de detectar atividade hidrolítica de Ace-2, sugerindo atividade enzimática muito baixa ou muito localizada desta espécie molecular; foi proposto que em *C. pipiens* o papel de Ace-2 na atividade colinesterásica das sinapses seja muito pequeno (Huchard et al. 2006), o que está em consonância com os achados de Revuelta et al. (2009).

Em *A. aegypti*, nosso modelo de estudo, a clonagem e caracterização do gene *ace-1* foi publicada recentemente, tendo apresentado identidade maior do que 90% com *Culex spp*, e de cerca de 80% com *A. gambiae* (Mori et al. 2007).

Recentemente, foi proposto um critério para facilitar a tipagem dos genes *ace-1* e *ace-2* em insetos, baseado na comparação de sequências peptídicas únicas de cada gene. A aplicação deste critério sobre 18 espécies de insetos revelou menor conservação do *ace-1*, provavelmente por ser o gene ancestral; alternativamente, a maior conservação de *ace-2* pode sugerir função biológica relevante, ainda desconhecida (Li et al. 2010). Estes resultados estão de acordo com Huchard et al. (2006).

1.9.1. Resistência a inseticidas mediada pela Ace

Fournier et al., em 1992 e 1993, mostraram que tanto mudanças qualitativas quanto quantitativas na atividade da Ace poderiam gerar cepas de *D. melanogaster* resistentes a inseticidas. Nesta espécie, no entanto, mutações qualitativas individuais de seu gene *ace-2* produzem baixo grau de resistência, enquanto razões de resistência altas só são observadas quando as substituições estão combinadas (Mutero et al. 1994, Miyo e Oguma 2010). Por outro lado, em mosquitos, mutações individuais na região codificante do gene *ace-1* são capazes de reduzir muito a sensibilidade desta enzima aos inseticidas (Weill et al. 2003, 2004, Nabeshima et al. 2004, Alout et al. 2008, Mori et al. 2007).

A mutação “clássica” de *ace-1* de mosquitos que confere resistência a inseticidas é a G119S (as posições deste gene são dadas sempre de acordo

com nomenclatura de *Torpedo californica*), que consiste de substituição de glicina por serina (Weill et al. 2003). Embora não tenha sido detectada no gênero *Aedes*, está presente em várias populações de pelo menos duas espécies do gênero *Anopheles* e duas do gênero *Culex* (Weill et al. 2004, Labbé et al. 2007b). A relação entre resistência e uma mesma mutação em diferentes gêneros de mosquitos sugere grande conservação de estrutura e função (Huchard et al. 2006). Modelagem tridimensional confirmou localização deste resíduo, 119, no interior da fenda do sítio ativo da enzima, próximo ao sítio catalítico (Weill et al. 2003).

Acompanhamento de populações de mosquitos *C. pipiens* da região de Montpellier, França, indicou que a substituição G119S do gene *ace-1* era vantajosa apenas nas áreas tratadas com inseticidas, e apenas nas épocas do ano em que havia aplicação. Uma série de trabalhos sobre esta região relaciona a presença da mutação G119S com diminuição do “fitness” desses mosquitos, referida pelos autores como um “custo” da resistência, quando na ausência de inseticida (Lenormand et al. 1999, Lenormand e Raymond 2000, Labbé et al. 2007a). Corrobora estas observações a detecção de duplicação do gene *ace-1*, associada à substituição G119S em heterozigose, o que contribui para diminuir os efeitos colaterais deletérios deste alelo; esta duplicação se espalhou pela população estudada (Labbé et al. 2007a, b).

As outras substituições no gene *ace-1* associadas com resistência a inseticidas em mosquitos são: a F331W, em *Culex tritaeniorhynchus*, que consiste de substituição de fenilalanina por triptofano (Hemingway et al. 2004, Nabeshima et al. 2004), e a substituição de fenilalanina por valina na posição 290 de *C. pipiens* da Ilha de Chipre, no Mar Mediterrâneo (Alout et al. 2008). Nos dois casos, há indícios de que os resíduos substituídos estejam localizados em região próxima ao sítio ativo da enzima (Hemingway et al. 2004, Cassanelli et al. 2006).

Há dois relatos de substituições de aminoácidos em posição homóloga a F331W em outros artrópodes, pragas de diferentes culturas: no afídeo *Mysus persicae* (Nabeshima et al. 2003) e no ácaro *Tetranychus urticae* (Anazawa et al. 2003). A substituição F290V também foi descrita em outro inseto, neste caso uma cepa da mariposa *Cydia pomonella* selecionada em laboratório com o OP azinphos-metil (Cassanelli et al. 2006).

A presença, em populações de mosquitos de todo o mundo, de apenas três mutações no gene *ace-1* que apresentam relação com a resistência a inseticidas, sugere grandes restrições conformacionais na enzima. A substituição G119S, por exemplo, presente nas populações de *Culex* e *Anopheles*, se disseminou globalmente. No entanto, é interessante notar que, de nosso conhecimento, em *A. aegypti* nunca houve relato desta mutação (Weill et al. 2004, Labbé et al. 2007b, Mori et al. 2007). Weill et al. (2004) documentaram que a glicina 119 da Ace-1 de 26 populações de *A. aegypti*, coletadas em 12 países, é codificada pelo códon GGA, enquanto um códon GGC foi encontrado na maioria das espécies de mosquitos *Culex* e *Anopheles* analisadas. Como o códon para serina mais próximo é o AGC, seriam necessárias duas mutações, a partir do códon GGA, para substituir glicina por serina nesta espécie. O mesmo códon GGA se repete para todas as espécies do gênero *Aedes*, com exceção de *A. albopictus*. O mesmo tipo de “restrição” ocorre na posição 331 do gene *ace-1* de *A. aegypti*, tornando menos provável a ocorrência da substituição F331W, mas não na substituição F290V, que requer apenas um evento de mutação (TTT para GTT) (Mori et al. 2007).

Substituições no gene *ace-1* de diferentes insetos, pragas da agricultura, relacionadas com resistência, foram descritas, como as substituições S431F e A302S em *Aphis gossypii* (Benting e Nauen 2004), associadas com a resistência ao OP ometoato e ao CB pirimicarb, ou a substituição A201S, no lepidóptera *Chilo suppressalis*, fortemente correlacionada com a resistência ao OP triazophos (Jiang et al. 2009a).

Recentemente, a resistência a inseticidas também foi associada à deleção de três glutaminas na região C-terminal da cadeia peptídica da enzima Ace, longe de seu sítio catalítico. Kakani et al. (2011) demonstraram que esta alteração aumentou a eficiência das modificações pós-traducionais que levam ao ancoramento via GPI da Ace, acarretando em maior número de moléculas de Ace nas membranas celulares e, em consequência, redução da sensibilidade a inseticidas. Este estudo foi feito em *Bactrocera oleae*, inseto que apresenta apenas o gene *ace-2*. Ainda assim, aponta para a importância potencial de mutações fora do sítio catalítico das Acetilcolinesterases. Em outro estudo, Wu et al. (2010) correlacionaram aumento na expressão do gene *ace-1*

com maior pressão de seleção com inseticidas OP, em populações selvagens do psocóptera *Liposcelis paeta*.

Foi demonstrado ainda que as mutações presentes na Ace de *D. melanogaster* conferem níveis similares de insensibilidade ao OP, quando introduzidas, através de mutação sítio-dirigida, no gene *ace-2* do mosquito *A. aegypti*, clonado em baculovírus e expresso em células Sf21 (Vaughan et al. 1997). Em 2006, foi descrita insensibilidade da Ace de uma cepa de *A. aegypti* selecionada em laboratório, com o CB propoxur, por 13 gerações. Neste trabalho os autores observaram correlação entre o processo de seleção e o aumento na frequência de indivíduos com Ace alterada, verificada através de ensaio bioquímico (Bisset et al. 2006). Intriga que neste trabalho, sem desdobramentos posteriores, não se observou resistência cruzada a outros OP. Recente relato de insensibilidade da Ace, detectada por meio de ensaios bioquímicos realizados com a metodologia de nossa equipe, em quatro populações de campo de *A. aegypti* de Trinidad, resistentes a OP (Polson et al. 2011), será discutido no item 4.2.

Na presente dissertação não foi observada qualquer alteração na sensibilidade da Ace, quando na presença de inibidor, o CB propoxur, nas populações brasileiras de *A. aegypti* analisadas. Por outro lado, nossas investigações apontaram para uma maior atividade da Ace, em seis das 15 populações analisadas.

1.10. Canal de Sódio Regulado por Voltagem

O canal de sódio é uma proteína transmembranar que consiste de quatro domínios homólogos (I – IV), cada qual com seis segmentos hidrofóbicos (S1 – S6). Em insetos, existe apenas um gene que codifica esta proteína, comumente referido como gene *para* ou Na_v (Martins et al. 2009).

Na fisiologia normal da transmissão de um impulso nervoso, os canais de sódio se abrem e fecham, gradualmente ao longo do axônio, o que permite o influxo de íons sódio para o citosol do neurônio e faz com que o impulso seja transmitido (Figura 1.22).

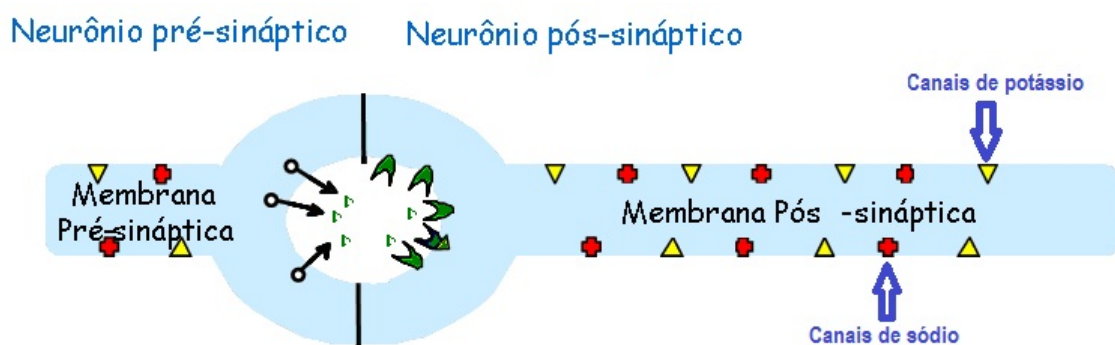


Figura 1.22: esquema da transmissão nervosa. Na passagem do impulso nervoso de um neurônio a outro são produzidas vesículas sinápticas (círculos brancos), que liberam o neurotransmissor excitatório acetilcolina (triângulos verdes) para a fenda sináptica. A acetilcolina, por sua vez, se liga a um receptor próprio no neurônio pós-sináptico (em verde). Ao ser estimulado, uma pequena região da membrana do neurônio pós-sináptico se torna permeável ao sódio (que tem carga positiva), pois ocorre a abertura dos canais de sódio. Como a concentração deste íon é maior fora da célula, ocorre um influxo do mesmo. A entrada do sódio é acompanhada pela saída de alguns (poucos) íons potássio (que tem carga negativa). Esta inversão de cargas vai sendo transmitida ao longo do axônio, promovendo também, a transmissão do impulso. Posteriormente, ocorre o fechamento ou inativação dos canais de sódio, sendo estes íons bombeados ativamente para fora da célula nervosa através da bomba de sódio e potássio, fazendo com que o meio intracelular volte a ficar com mais íons potássio (eletronegativo), em processo denominado de repolarização. Nesse ponto diz-se que o neurônio se encontra em repouso.

Os canais de sódio são alvo de inseticidas PI e de OC do tipo DDT. Estes compostos se ligam à cavidade hidrofóbica do domínio II, fazendo com que o canal permaneça na conformação aberta, o que, por sua vez, faz com que a transmissão do impulso não cesse. Esta hiperestimulação do sistema nervoso promove excitação e convulsões, podendo ainda culminar em paralisia instantânea e queda (“*knock-down*”) do inseto (Garcia et al. 2009).

Vários casos de resistência a PI em insetos têm sido relatados na literatura (Hemingway e Ranson 2000, Hemingway et al. 2004, Pereira-da-Cunha et al. 2005, Montella et al. 2007, Martins et al. 2009). Nos casos em que a resistência é causada por algum tipo de mutação no gene Na_V , é comumente referida como “resistência *knock-down*” (kdr). No entanto, este é um termo genérico que deve ser apenas aplicado aos insetos que não sofrem paralisia momentânea (Garcia et al. 2009). É típico, no caso da “resistência *knock-down*”, que a mesma não seja afetada pelo uso de sinergistas que inibem as enzimas detoxificadoras Esterases ou MFO.

Acredita-se que o fenótipo kdr mais comum em insetos seja consequência da substituição de uma isoleucina, na posição 1014 (a numeração é sempre definida de acordo com a sequência primária do Na_v de *M. domestica*), por uma fenilalanina (Wondji et al. 2008, Kawada et al. 2009, Martins et al. 2009). Esta mutação se localiza no segmento S6 do domínio II, e está relacionada com resistência a PI (Wondji et al. 2008). Entretanto, mutação nesta posição ainda não foi encontrada em *A. aegypti* (Garcia et al. 2009, Kawada et al. 2009, Martins et al. 2009). Por outro lado, foi encontrada substituição de uma valina por uma isoleucina na posição 1016, que também contribui para a resistência a PI, em populações de *A. aegypti* do México (Garcia et al. 2009) e do Brasil (Martins et al. 2009). Recentemente, foi descrita também outra substituição, F1534C, fortemente relacionada à resistência a PI em *A. aegypti* das Ilhas Cayman (Harris et al. 2010) e da Tailândia (Yanola et al. 2011). Há indícios que esta mutação também esteja presente nas populações brasileiras (Laficave, dados não publicados).

1.11. Expressão das Enzimas Detoxificadoras ao Longo do Desenvolvimento dos Insetos

Um dos objetivos desta dissertação foi averiguar os mecanismos de resistência metabólica durante o desenvolvimento do *A. aegypti*. Por isso, fizemos levantamento bibliográfico sobre o tema, em *A. aegypti* e nos mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles*.

Contudo, dos 43 artigos encontrados que relataram, através de diferentes abordagens experimentais, a atividade e/ou quantificação de Esterases, GST e MFO em mosquitos, apenas oito utilizaram mais do que um ponto do desenvolvimento de seus modelos. Destes, detalhados na Tabela 1.3, um utilizou espécimes apenas do estágio adulto (Mourya et al. 2003), outro empregou espécimes do 4º instar larvar e do estágio pupal (Bai et al. 2007), dois usaram espécimes do 4º instar larvar e do estágio adulto (Strode et al. 2008, Marcombe et al. 2009), e os outros quatro usaram espécimes dos estágios larvar, pupal e adulto (Lima-Castelani et al. 2004, Souza-Polezzi e Bicudo 2005, Kasai et al. 2009, Lumjuan et al. 2011).

Tabela 1.4: dinâmica da resistência metabólica ao longo do desenvolvimento em mosquitos. Apresentação de oito artigos que utilizaram mais de um ponto do ciclo de vida de seus modelos de estudo.

artigo	enzima(s) avaliada(s)	ponto fisiológico testado	modelo de estudo	pool ou individual
Mourya et al. 2003	ESTs α , β , GST e Ace	♀ de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 DVA	<i>A. aegypti</i>	individual
Lima-Castelani et al. 2004	ESTs α , β e Ace	L2, 3 e 4, P e As	<i>A. aegypti</i>	ind + pool
Souza-Polezzi e Bicudo 2005	ESTs α , β e Ace	L4, P e As	<i>A. aegypti</i>	individual
Bai et al. 2007	JH-EST	L4 inicial e pupas, de 3 em 3h	<i>A. aegypti</i>	pool
Strode et al. 2008	MFO, GST e CCE *	L4 e As de 2 ou 3 DVA	<i>A. aegypti</i>	pool
Marcombe et al. 2009	MFO, GST e CCE *	L4 e As de 3 DVA	<i>A. aegypti</i>	pool
Kasai et al. 2009	GST	L1, 2, 3 e 4, P, As (1, 3 e 7 DVA)	<i>C. quinquefasciatus</i>	??
Lumjuan et al. 2011	GST	L4, P e As 1DVA	<i>A. aegypti</i>	pool

JH-EST: Esterase de hormônio juvenil. EST α , β : Esterases quantificadas com os substratos α -e β -naftil; Ace: Acetilcolinesterase, CCE: Carboxicolinesterases. (*) avaliação de genes que codificam as enzimas relacionadas. L₂, L₃, L₄, P, As e ♀: 2º, 3º e 4º instares larvais, pupas, mosquitos adultos de ambos os sexos, e fêmeas. DVA: dias de vida adulta. ind: individual. “??”: sem informação sobre o uso de espécimes individuais ou em *pool*.

Bai et al. (2007) demonstraram, usando hormônio juvenil III como substrato, que os níveis de atividade de JH-EST de *A. aegypti* crescem gradualmente durante o 4º instar larvar, alcançando pico de atividade 42 h após a ecdise L3:L4, mantido até a pupação. Lima-Castelani et al. (2004) e Souza-Polezzi e Bicudo (2005), do mesmo grupo de pesquisa, relataram, por meio de géis de poliacrilamida de atividade, maior número de isoenzimas de Esterases no estágio larvar do que nos estágios pupal e adulto de *A. aegypti*. Mourya et al. (1993), por sua vez demonstraram, com fêmeas adultas de quatro cepas de *A. aegypti* mantidas em laboratório, que a atividade de GST, mas não de Esterases ou da Ace, declina com a idade. Lumjuan et al. (2011) indicaram, através de PCR quantitativo e imunoblotting, que a expressão dos genes GSTE2 e GSTE7, apesar de aumentada nas cepas de *A. aegypti* resistentes a PI e DDT em relação ao controle susceptível, não sofreu mudanças ao longo do desenvolvimento. Em 2009, Kasai et al. sugeriram regulação diferenciada para quatro transcritos alternativos de GSTD1, em *C. quinquefasciatus*. Os autores demonstraram, através de microarranjo e PCR quantitativo, que os transcritos CqGSTD1-1 e CqGSTD1-4 são constitutiva e altamente expressos em larvas (L4), pupas e adultos, enquanto os transcritos CqGSTD1-2 e CqGSTD1-3 só são expressos em pupas. Strode et al. (2008), por sua vez, identificaram, através de um *microarray* que usou o “*A. aegypti detox chip*”,

genes CYP e GST significativamente mais expressos na cepa IM (Isla Mujeres, México), resistente a PI, que na cepa suscetível NO (New Orleans). Estes genes apresentaram expressão diferencial, quantitativa e qualitativamente, entre larvas e adultos, sendo a expressão maior em adultos. Marcombe et al. (2009), usando o mesmo “*A. aegypti detox chip*” (atualizado para um total de 290 genes) e PCR em tempo real quantitativo, também detectaram expressão diferencial de genes CCE, GST e principalmente CYP entre larvas e adultos de outra população resistente a PI (proveniente da Martinica). Contudo, neste caso, maior expressão foi detectada em larvas. Os autores sugerem que enzimas particulares podem estar mais especificamente envolvidas com a resistência a PI nos diferentes estágios de vida do vetor.

As análises mostradas no capítulo 4.2 desta dissertação buscaram comparar larvas e adultos, em vários pontos do desenvolvimento. Além disso, foi usada a cepa padrão de suscetibilidade Rockefeller, e duas populações de campo, resistentes a OP e PI.

1.12. Justificativa do Trabalho

No âmbito do monitoramento da resistência de populações de *A. aegypti* no Brasil, é possível detectar relação entre a variação temporal dos mecanismos de resistência metabólica e o histórico de utilização de inseticidas. Contudo, quando populações individuais são analisadas, pontualmente, as correlações entre os resultados dos bioensaios (que quantificam a resistência) e os ensaios bioquímicos (que quantificam os mecanismos de resistência) são menos evidentes (Montella et al. 2007). Na maior parte destes casos não parecia haver alterações individuais que pudessem ser usadas como um “diagnóstico” da resistência. Até então os ensaios quantitativos eram, realizados com larvas, enquanto os ensaios bioquímicos, com adultos. Uma possível explicação foi a de que diferenças na atividade enzimática ao longo do desenvolvimento de *A. aegypti* poderiam ter contribuído, ao menos parcialmente, para esta falta de correlação. Além disso, no campo, são aplicados inseticidas de classes diferentes sobre larvas e adultos, potencialmente elicitando mecanismos distintos durante esses dois momentos do ciclo de vida do vetor. Por isso, a comparação dessas duas abordagens metodológicas, num mesmo estágio do vetor, era uma questão significativa, não apenas em termos acadêmicos, mas também para a Rede MoReNAa, que o Laficave lidera.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar o padrão temporal de atividade de enzimas relacionadas com a resistência de populações brasileiras de *Aedes aegypti* a inseticidas, durante o desenvolvimento do vetor.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a atividade das enzimas Esterases, GST, MFO e ACE, relacionadas com a resistência a inseticidas, durante o ciclo de vida de populações naturais do vetor.
 - 1.1) Finalizar a padronização dos ensaios bioquímicos de quantificação de tais enzimas para larvas, usando a cepa Rockefeller, padrão internacional de suscetibilidade a inseticidas.
 - 1.2) Quantificar a atividade das enzimas mencionadas durante o ciclo de vida do *A. aegypti*, na cepa Rockefeller e em duas populações naturais resistentes a inseticidas.
- 2) Detalhar, na metodologia Laficave de quantificação das enzimas envolvidas com a resistência, o ensaio para a Acetilcolinesterase, de forma a avaliar a sensibilidade do teste.
- 3) Quantificar os principais mecanismos de resistência em larvas e adultos das populações naturais brasileiras do vetor, e correlacionar com o *status* de resistência obtido com os bioensaios.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental desta dissertação se concentrou nos ensaios bioquímicos para quantificação da atividade de enzimas classicamente envolvidas com a resistência a inseticidas. No entanto, também são apresentados outros aspectos do perfil de resistência das populações investigadas, o que inclui ensaios biológicos, que quantificam a resistência das populações frente aos inseticidas usados no controle de *Aedes aegypti* no Brasil, e também ensaios moleculares, que detectam a presença de mutação na posição 1016 do gene que codifica o canal de sódio – alvo de inseticidas PI usados no controle de mosquitos adultos. Tanto os ensaios biológicos quanto os moleculares foram executados pela equipe do laboratório, de acordo com procedimentos padrão, e serão descritos apenas brevemente.

3.1. Coleta de Ovos

A coleta de ovos de *A. aegypti* é feita por meio de ovitrampas (Braga et al. 2000), seguindo o protocolo definido para coleta no campo das populações do vetor que são submetidas ao monitoramento da resistência a inseticidas (Lima et al. 2003, MS-SVS 2008), por solicitação da Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (SVS-MS) à Secretaria de Saúde de cada Estado. Os ovos provenientes destas coletas são então colocados para eclodir no laboratório, e as larvas, criadas para obtenção de adultos (F0). Após triagem dos mosquitos da espécie *A. aegypti*, são feitas alimentações sucessivas para obtenção de ovos (F1), com os quais os ensaios são realizados.

A cepa Rockefeller, mantida continuamente em laboratório, é usada para calibração dos testes e como controle interno de todos os ensaios. Essa cepa foi originalmente estabelecida em 1959 e é padrão de susceptibilidade a inseticidas para a espécie *A. aegypti* em todo o mundo (Hartberg e Craig 1970).

3.2. Populações de Campo Avaliadas

Nesta dissertação foram utilizadas 17 populações brasileiras de *A. aegypti*, coletadas de 2008 a 2010 (Tabela 3.1). Serão apresentados três tipos de resultados: 1) detalhamento do ensaio com a Acetilcolinesterase; 2) quantificação enzimática ao longo do ciclo de vida do *A. aegypti*; e 3) monitoramento da resistência a inseticidas em populações de campo do vetor. Em função de acordo de confidencialidade com a SVS-MS, os nomes das populações foram substituídos por letras, indicadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: codificação das populações de campo de *A. aegypti* utilizadas na dissertação.

região	ano coleta	codificação	ensaio		
			AChE	ciclo de vida	pop. naturais
N	2010	A		x	x
	2009	B			x
	2010	C			x
	2008	D	x		x
NE	2009	E			x
	2009	F	x		x
	2010	G			x
	2009	H			x
	2009	I			x
	2010	J		x	
CO	2009	L			x
	2008	M	x		
SE	2009	N			x
	2009	O			x
	2008	P			x
	2008	Q			x
	2008	R	x		x

Regiões: Norte (N); Nordeste (NE); Centro Oeste (CO); e Sudeste (SE).

AChE: detalhamento do ensaio de Acetilcolinesterase (seção 4.1).

Ciclo de vida: atividade das enzimas envolvidas com a resistência ao longo do ciclo de vida do *A. aegypti* (seção 4.2).

Pop. naturais: mecanismos de resistência em populações naturais de *A. aegypti* (seção 4.3).

3.3. Bioensaios

No laboratório, a geração F1 das populações de campo é analisada por meio de bioensaios que quantificam a resistência aos inseticidas OP e PI empregados no campo. Os bioensaios com OP seguem os parâmetros e

procedimentos descritos pela OMS (1981), enquanto os testes com PI estão sendo atualmente realizados de acordo com modificação, pelo Laficave, de metodologia que usa papéis impregnados com inseticidas (OMS 1998). Para cada população são feitos de três a quatro testes, em dias diferentes. Cada bioensaio consiste na exposição dos espécimes a um espectro de concentrações (no mínimo oito) de determinado inseticida, de modo a obter os valores das doses efetivas (concentrações letais - CLs). Após a realização dos ensaios, as doses efetivas (CL₅₀, CL₉₀ e CL₉₉) são calculadas com o auxílio do software Polo - PC via análise probit (Raymond, 1985).

As populações de *A. aegypti* de diferentes localidades do Brasil investigadas neste trabalho foram submetidas aos testes dose-resposta para monitoramento da resistência ao inseticida OP temephos, no estágio larval, e ao PI deltametrina no estágio adulto. Os resultados dos ensaios quantitativos são expressos como a razão de resistência (RR) da população sob teste em comparação com Rockefeller. Para o cálculo, divide-se a CL da população pela CL equivalente da cepa-referência de suscetibilidade. Nesta dissertação serão apresentados os valores das RR₅₀, RR₉₅ e RR₉₉. Além disso, foram atribuídas cores a estes resultados: verde, que indica suscetibilidade (RR até 3); amarelo, que indica resistência moderada (RR entre 3 e 10); e vermelho, que indica resistência alta (RR maior que 10).

Para algumas populações, apenas ensaios qualitativos com adultos foram feitos: os espécimes foram expostos a uma dose diagnóstica que, neste ensaio específico, corresponde a duas vezes a CL₉₉ para a cepa Rockefeller, concentração letal que mata 99% dos indivíduos. Os resultados dos bioensaios qualitativos são expressos em percentual de mortalidade. As populações submetidas a estes ensaios foram classificadas, de acordo com critério proposto por Mazzari e Georghiou (1995), como suscetíveis, com resistência incipiente, ou resistentes, quando o percentual de mortalidade era superior a 98%, entre 80 e 98%, ou abaixo de 80%, respectivamente.

3.4. Ensaio Molecular

As populações estudadas nesta dissertação foram submetidas a ensaios para detecção de alteração em uma posição específica do gene que codifica o canal de sódio regulado por voltagem de *A. aegypti* (AaNa_V) - posição 1016, que resulta em substituição de uma valina por uma isoleucina. Esta mutação, Val1016Ile, foi previamente relacionada com resistência a inseticidas piretróides e será por vezes nomeada aqui como mutação *kdr* (“*knock-down resistance*”). O procedimento foi feito como descrito por Saavedra-Rodriguez et al. 2007 e Martins et al. 2009.

A genotipagem foi feita com DNA genômico extraído de mosquitos adultos (preferencialmente machos) de cada população. O racional da técnica é o uso não de um, mas de dois “*primers*” reversos, um específico para o aminoácido Valina e o outro para Isoleucina. Estes possuem extensões de suas caudas GC de tamanhos variados. Com isso, os produtos da PCR diferem em 20 pb, e a eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) permite a identificação de cada genótipo individual, seja ele homo ou heterozigoto.

Uma vez que esta mutação tem caráter recessivo (Saavedra-Rodriguez et al. 2007), e que portanto, para se manifestar (promover resistência a PI), precisa estar em homozigose, é relevante que se conheça, nas populações, a frequência do alelo 1016Ile e dos indivíduos com genótipo 1016Ile/Ile. Para tanto, os resultados são expressos em frequências alélica e genotípica.

Com relação ao número de amostras, cerca de 30 indivíduos (60 alelos) são analisados. Contudo, quando o alelo mutante não é detectado, um número maior de amostras é processado, para garantir maior confiabilidade estatística.

3.5. Ensaio Bioquímico

3.5.1. Preparação de larvas e de mosquitos adultos

Ovos de *Aedes aegypti* foram postos para eclodir por no máximo uma hora, em estufa do tipo BOD (“*Biological Oxygen Demand*”) a 28 °C. Os

espécimes foram mantidos em temperatura controlada ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), à densidade de 1.000 larvas por bacia em 1 L de água desclorada. A cada três dias, de acordo com critérios de criação previamente definidos no laboratório (Ribeiro 2006), 1 g de comida (ração para gatos, marca Purina Friskies) era adicionado às bacias.

Para a obtenção de adultos, os espécimes eram mantidos nas bacias até a pupação, sendo então colocados em copinhos com capacidade para 50 mL, e transferidos diariamente para gaiolas de papelão (16,5 cm de diâmetro por 17,5 cm de altura), onde permaneciam até que os adultos emergissem e pudessem ser separados para avaliação. Para os adultos era oferecida solução de açúcar comercial a 10% (p/v) *ad libitum*. Em todos os casos os espécimes eram acondicionados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes da avaliação.

Para o monitoramento das populações de campo, foram analisadas larvas, de 72 horas após a eclosão (L3 finais ou L4 iniciais), e fêmeas, de um dia de vida adulta. Devido a problemas técnicos, para oito populações apenas ensaios com adultos foram realizados.

3.5.1.1. Definição dos pontos para avaliação durante o desenvolvimento

Para a realização destes ensaios, a criação das larvas seguiu as recomendações acima, com duas alterações, para garantir maior sincronia: a contagem de larvas para a formação das bacias começou 20 minutos após o início da eclosão, e foi utilizada densidade de 500 larvas por bacia.

Foram usados intervalos de seis horas para as coletas do 3º instar, e de 12 horas no 4º instar (Figura 3.1). No 3º instar foi feita coleta do ponto 54 horas após a eclosão (HAE), quando há larvas L3 intermediárias; e dos pontos 60, 66 e 72 HAE. Foram coletados os pontos 80 e 84 HAE, quando ocorre a transição L3/L4, e também os pontos 96, 108, 120, 132 e 144 HAE, já correspondentes ao 4º instar larvar.

Para as coletas no estágio adulto, as pupas eram transferidas para gaiolas de papelão. Em cada gaiola, eram mantidos apenas os adultos que tivessem emergido em intervalo de 24 horas. Os adultos eram mantidos dentro do insetário, a $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 70-75%. Mosquitos machos e fêmeas foram coletados diariamente, até o 5º dia de vida adulta (DVA). Coletas subsequentes foram feitas, a cada três dias, até o 29º DVA.

Com este procedimento, foram coletados, no total, 11 pontos no estágio larvar e 13 de cada gênero no estágio adulto (Figura 3.1).

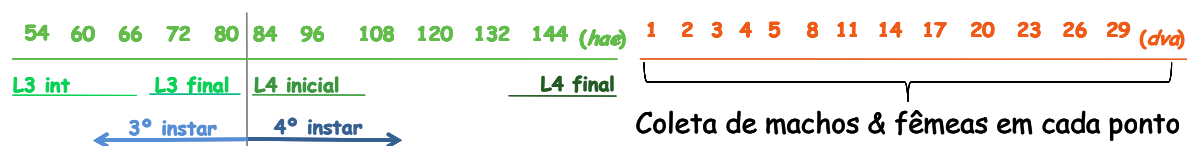


Figura 3.1. Detalhamento dos pontos de coleta de *A. aegypti* ao longo do desenvolvimento e durante a fase adulta, para os ensaios bioquímicos.

3.5.2. Quantificação das atividades enzimáticas em mosquitos adultos

A metodologia de avaliação bioquímica dos mecanismos de resistência em mosquitos adultos padronizada no laboratório resultou da comparação entre os métodos recomendados pelo Centers for Disease Control (CDC) (Insecticide Resistance Workshop 1998) e pela OMS (Hemingway 1998) e foi tema de um livro (Valle et al. 2006), publicado pela Fiocruz em parceria com a SVS-MS.

De cada população são analisados, em média, 80 a 120 mosquitos individuais. Em cada ensaio são usadas 45 fêmeas (40 da população a ser testada e cinco da cepa Rockefeller, como controle interno dos ensaios), não alimentadas, de um dia de idade adulta. Cada mosquito é homogeneizado em 300 μ L de água deionizada (Milli Q) e o teste para cada enzima é feito em duplicata. As reações são feitas em microplacas de 96 poços, e a absorbância é lida em leitor de microplacas modelo VersaMax e/ou SpectraMax (Molecular Devices). O homogenato de cada fêmea é submetido à quantificação simultânea da atividade das enzimas: Esterases, com os substratos acetato de α -naftil (" α -EST"), de β -naftil (" β -EST"), e de p -nitrofenil (" p NPA-EST"); Oxidases de função mista (MFO); Glutathiona-S-transferases (GST); Acetilcolinesterase (Ace). Todas participam da detoxificação de inseticidas, com exceção de Ace, que é alvo de OP e CB. Dosagem de proteínas totais (PTN) de cada indivíduo também é realizada, para normalização das atividades.

Os valores de atividade enzimática das populações são comparados com a cepa Rockefeller.

3.5.3. Quantificação das atividades enzimáticas em larvas de *A. aegypti*

Adaptamos, para larvas, o protocolo descrito originalmente para adultos (Valle et al. 2006). Vários parâmetros foram analisados, como indicado abaixo.

3.5.3.1. Parâmetros modificados

a) Criação sincronizada e congelamento dos espécimes

O procedimento de eclosão dos ovos e criação das larvas segue as recomendações descritas no item 3.5.1. O congelamento das larvas é feito 72 HAE, quando existem, na bacia, larvas L3 finais e algumas L4 iniciais, as mesmas usadas nos bioensaios. Grupos de 10 larvas são acondicionados em pedaços de papel-filtro medindo 20 x 5 mm, e estes são colocados em microtubos com capacidade para 1,5 mL, sendo depois congelados a – 80 °C.

b) Volume de trituração e de homogeneização das larvas

A trituração dos mosquitos adultos é feita com auxílio de um pistilo para microtubos acoplado a um homogeneizador mecânico (marca Freedom), fora do gelo, em 30 uL de água deionizada (Milli Q), durante aproximadamente 10 segundos. Ao triturar as primeiras larvas nas mesmas condições, percebemos que restavam ainda alguns pedaços no homogenato. Obtivemos homogenatos adequados usando o volume de 20 uL, e triturando pelo mesmo período de tempo.

O volume de homogenato de mosquitos adultos, depois da trituração, é elevado a 300 ul – e a partir daí são retiradas alíquotas para todos os ensaios. No caso das larvas, o volume inicial de homogenato é completado até 50 ul. Depois de retirada de alíquotas para os ensaios de Ace, MFO e “ ρ NPA-EST”, o volume restante é duplicado e são retiradas alíquotas para dosagem de GST e para quantificação de proteínas totais (PTN); o volume restante é novamente duplicado e são então retiradas alíquotas para dosagem de atividade de Esterases com os outros dois substratos (“ α -EST” e “ β -EST”). Com isto, o volume de homogenato de larvas é “variável”, sendo equivalente a 50, 100 ou 200 ul por espécime.

c) Tempo de incubação da enzima Acetilcolinesterase

Após a investigação deste parâmetro, descrita na seção 4.1b, optou-se por utilizar o tempo de incubação de 180 minutos, no ensaio da Ace.

d) Percentuais de homogenato para cada enzima

Foi necessário, para os ensaios com larvas, aumentar os percentuais de homogenato usados para a quantificação de todas as enzimas avaliadas, em relação aos testes com adultos, em função do menor tamanho das larvas.

A Tabela 3.2 sintetiza as principais modificações realizadas. Com a definição do percentual mínimo de homogenato suficiente para cada dosagem, verificamos ser inviável, com larvas individuais, avaliar todas as enzimas com réplicas, como é feito para adultos. A solução encontrada foi a realização dos ensaios em duas etapas: a primeira, “diagnóstica”, destinada a traçar perfil inicial da população, se basearia em testes com aproximadamente 90 larvas, sem réplicas. Na segunda etapa, de “detalhamento”, apenas as enzimas alteradas (a definição dos critérios de classificação usados está no item 3.5.5) seriam avaliadas, também em larvas individuais, mas desta vez em duplicata para cada enzima.

Tabela 3.2: comparação de alguns parâmetros usados nos protocolos para larvas (L) e adultos (A) de *A. aegypti*.

Ensaio	Vol. homog		Vol. final reação		% homog/ réplica*		Tempo incubação	
	(uL)		(uL)				(min)	
	L	A	L	A	L	A	L	A
AChE**	5	25	185	205	10	8,3	180	60
AChI**	5	25	185	205	10	8,3	180	60
MFO**	5	20	290	305	10	6,7	90	90
“ ρ NPA-EST”	10	10	210	210	20	3,3	¥	¥
PTN	10	10	310	310	10	3,3	5	5
GST	25	15	220	210	25	5	¥	¥
“ α -EST”	8	10	258	260	4	3,3	15 + 5§	15 + 5§
“ β -EST”	8	10	258	260	4	3,3	15 + 5§	15 + 5§
	Total				93%	41,5%		

* Adultos são homogeneizados em 300 ul de água. O homogenato de larvas é feito, inicialmente, em 50 ul e sequencialmente diluído (até o correspondente a 200 ul), à medida que são retiradas alíquotas para as diferentes enzimas, em ordem definida (ver seção 3.5.3.1 b).

**Reações feitas com homogenato antes da centrifugação.

¥ Ensaio lido imediatamente após a pipetagem dos reagentes. Leitura em cinética por dois minutos, com intervalos de 15 segundos, para “ ρ NPA-EST”, e por 20 minutos, com intervalos de um minuto, para GST.

§15 minutos de reação com a solução de trabalho seguidos de 5 minutos de incubação com dianisidina (Fast Blue), que interrompe a reação.

3.5.3.2. Etapa “diagnóstica”

Na prática, esta etapa consiste na avaliação, em placas de 96 poços, de um total de 85 larvas (L3 finais/ L4 iniciais) experimentais, junto com cinco larvas Rockefeller. Cada população é analisada em três ensaios (30, 30 e 25 espécimes), em dias distintos, para minimizar eventuais problemas experimentais. Com isto, avalia-se três populações simultaneamente.

3.5.3.3. Etapa de “detalhamento”

Para a etapa de detalhamento, o ensaio é desenhado contemplando apenas as enzimas alteradas (ver seção 3.5.5). As amostras são avaliadas em duplicata, e em cada ensaio são usadas 40 larvas da população de campo, além de cinco larvas da cepa Rockefeller.

3.5.4. Análise dos resultados dos ensaios bioquímicos

O protocolo original utilizado para adultos (Valle et al. 2006) disponibiliza planilhas, elaboradas em Excel, que permitem: 1) a verificação e validação dos resultados obtidos com as duplicatas; 2) a transformação dos valores de absorvância em atividade enzimática; 3) a correção dos valores de atividade pela quantidade de proteínas totais em cada mosquito e 4) a confecção automática de histogramas com o perfil das populações, para cada enzima avaliada.

Posteriormente, foram incluídos, na rotina de avaliação das populações, gráficos de dispersão, elaborados no programa Graph Pad Prism versão 4, nos quais todos os indivíduos testados são visualizados. Estes gráficos também permitem comparação direta dos perfis populacionais com a cepa Rockefeller.

Mais recentemente, as modificações realizadas para a avaliação de larvas também foram incorporadas às planilhas originais. Foram alterados parâmetros referentes ao tempo de incubação, no caso do ensaio para Acetilcolinesterase, e aos percentuais de homogenato para os cálculos de atividade enzimática de todas as enzimas avaliadas e das proteínas totais de cada indivíduo. Além disso, como estes ensaios foram feitos em duas etapas, foram gerados conjuntos de planilhas, com e sem duplicatas, adequados para cada momento de avaliação.

3.5.4.1. Critérios para validação de mosquitos e larvas individuais

No caso dos mosquitos adultos, as dosagens feitas em duplicatas permitem que se faça um controle de qualidade da manipulação. Para estes ensaios, definiu-se como critério arbitrário rejeitar as amostras cujo desvio padrão entre as réplicas seja maior que 30% de sua média.

Na etapa “diagnóstica” do ensaio com larvas esse controle de qualidade fica impossibilitado pela falta de réplicas. Neste caso, a validação dos resultados da etapa inicial é feita por comparação com a etapa de “detalhamento”, que tem as amostras avaliadas em duplicata.

O ensaio de “ ρ NPA-EST”, feito (em larvas e adultos) com leitura de absorvância em vários momentos de reação, tem critério adicional para validação de amostras. Na planilha para análise deste grupo de enzimas são

produzidos, automaticamente, gráficos com as atividades obtidas para cada indivíduo. O coeficiente de correlação linear (R^2) também é calculado. Neste caso, optou-se pelo descarte dos espécimes com R^2 menor que 90%.

Vale ainda mencionar que, no início de cada rodada de monitoramento, são feitos pelo menos três ensaios completos com a cepa referência de susceptibilidade a inseticidas, Rockefeller, com os quais os resultados das populações de campo são comparados. Além disso, a presença de cinco espécimes da cepa Rockefeller inseridos em todas as placas funcionam como controle interno de cada ensaio.

3.5.5. Interpretação dos resultados bioquímicos

Inicialmente a classificação das populações era feita através de comparação visual entre seus perfis e o perfil de Rockefeller, para cada enzima, em histogramas que mostravam o número (ou a frequência) de indivíduos em diferentes faixas de atividade enzimática. Cada enzima de cada população correspondia a um gráfico. No entanto, a aplicação deste método de classificação, além de laboriosa, era subjetiva, uma vez que pessoas diferentes podiam classificar as populações de forma distinta.

A equipe do Laficave aplicou vários tipos de testes estatísticos, paramétricos e não paramétricos, na tentativa de definir um modo mais eficiente e preciso de classificação. Contudo, nenhum teste parecia fornecer resultados consistentes. Optou-se pelo uso de medidas (e não testes) não-paramétricas, e decidiu-se estabelecer um critério arbitrário, que fosse coerente com um critério funcional proposto anteriormente pela OMS (Hemingway 1998). Este critério funcional, disponível apenas para a análise de inibição da enzima Ace (AChI), preconiza que Ace com atividade remanescente maior que 30% na presença do inibidor está “alterada”, sendo classificada como resistente.

Com isso, propusemos um critério, aplicável a todas as enzimas avaliadas e não somente à AChI. Esse critério usa um ponto de corte, que é o percentil 99 da cepa referência de susceptibilidade a inseticidas, Rockefeller (p99). A categorização dos resultados é feita empregando o percentual das populações que possui atividade superior ao ponto de corte utilizado. A definição deste ponto de corte levou em consideração os valores de percentual

acima do p99 naquelas populações classificadas como suscetíveis pelo critério OMS para Acetilcolinesterase. Na prática, na época da definição de nosso critério, a atividade de Ace de todas as populações avaliadas era classificada como “inalterada” pelo critério da OMS. E, nestas mesmas populações, encontramos no máximo 11 % de indivíduos acima de p99. Deste modo, foi arbitrada a seguinte categorização, válida para todas as enzimas: se até 15 % dos indivíduos da população tiver atividade acima do percentil 99 da cepa Rockefeller, a população é classificada como tendo atividade normal; entre 15 e 50 %, a atividade da população é considerada alterada; com mais de 50 %, a população é categorizada como tendo atividade muito alterada (Valle et al. 2006, Montella et al. 2007).

Além de aplicar o critério de classificação “Laficave”, são produzidos gráficos de dispersão com os resultados obtidos em cada população analisada. Nesses gráficos, cada indivíduo tem sua atividade representada por um ponto. Adicionalmente, são marcadas as medianas do perfil de cada população.

3.6. Detalhamento e Avaliação do Ensaio para Acetilcolinesterase

Foram feitas curvas do tipo dose resposta com espécimes individuais (larvas ou adultos) da cepa suscetível Rockefeller (Hartberg e Craig 1970) e de várias populações de campo (ver Tabela 3.1, coluna “AChE”), usando como inibidor o CB propoxur (marca Sigma, número de catálogo: 45644). Para as curvas com mosquitos adultos, foram usadas concentrações de 2 a 200 uM do inibidor. Para as larvas, foram usadas concentrações de 10 a 100 uM de propoxur. Cada ensaio utilizou 10 espécimes por população. As curvas com adultos foram repetidas quatro vezes e, com larvas, três vezes.

3.7. Correlações Entre os Resultados de Ensaios Bioquímicos e Biológicos

Após obter os resultados dos ensaios bioquímicos, tentou-se correlacioná-los com os resultados dos bioensaios com PI e OP. Em todos os

casos, os bioensaios foram comparados com os testes bioquímicos do mesmo estágio de desenvolvimento. Foram feitas análises de correlação (Spearman) para avaliar se alteração em alguma das enzimas investigadas acompanhava o nível de resistência da população. Para tanto, utilizamos os valores de RR_{50} ou RR_{95} (para ambos PI e OP) como parâmetros para o nível de resistência. Para o parâmetro “atividade enzimática”, consideramos a mediana da distribuição ou a taxa de indivíduos acima do p99 de Rockefeller, para cada enzima avaliada. Estas análises foram feitas no software GraphPad Prism versão 4.0.

4. RESULTADOS

4.1. Adaptação dos Ensaios Bioquímicos para Larvas de *Aedes aegypti*

De início, tentamos aplicar, diretamente, o protocolo descrito para adultos (Valle et al. 2006) a larvas L3 do vetor. Contudo, ao contrário dos adultos, essas larvas, individualmente, não apresentam quantidade de material suficiente para permitir a avaliação de todas as enzimas. Por essa razão, foram feitas adaptações da metodologia original. Parâmetros como volume de trituração das larvas, percentual de extratos usados em cada ensaio, existência de réplicas, dentre outros detalhes, foram analisados e apresentados na seção 3.5.3. Além desses, outros parâmetros foram avaliados, tendo gerado resultados que serão descritos adiante. Esse estudo resultou na elaboração de um protocolo alternativo, empregado nesta dissertação.

4.1.1. Definição do momento da ecdise L3:L4, e L4:pupa

Nossa preocupação inicial, quanto aos ensaios feitos ao longo do ciclo de vida do vetor (seção 4.3), foi a de estipularmos uma condição de criação viável e que garantisse o congelamento de espécimes de tamanhos similares, do terceiro e quarto instares larvais (ver pontos experimentais usados na seção 3.5.1.1). Por isso a contagem de larvas começou 20 minutos após o início da eclosão dos ovos, e foi utilizada densidade de 500 larvas por bacia. Nestas condições, verificou-se que a transição L3:L4 se deu em torno de 80 a 84 HAE. Verificamos que o 4º instar larvar é mais longo e muito mais heterogêneo que o L3: a ecdise L4:pupa ocorre de 115 até 150 HAE.

4.1.2. Tempo de incubação da enzima Acetilcolinesterase

Na adaptação dos ensaios para larvas, se mostrou necessária a modificação do tempo de incubação da enzima Ace. Neste ensaio, quantifica-se a atividade remanescente da enzima após a adição de um inibidor, que é o

CB propoxur. Para isto, calcula-se a diferença entre as leituras de dois testes: AChE (atividade total da enzima) e AChI (atividade na presença do CB). O tempo de incubação definido para adultos, de uma hora, não resultou, quando aplicado a larvas, em valores de absorvância, descontados do “branco” (BR) da reação (todos os reagentes, exceto o homogenato), significativamente diferentes de zero na placa AChI. Por isso, tempos de incubação maiores foram avaliados (Figura 4.1.1).

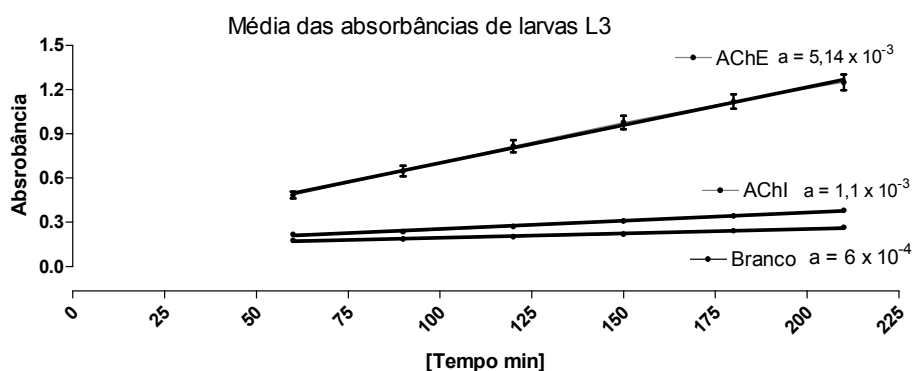


Figura 4.1.1: valores de absorvância dos ensaios AChE e AChI, e dos brancos das reações. São apresentadas as médias e desvios-padrão das absorvâncias de 10 larvas L3 individuais de *A. aegypti*, cepa Rockefeller, em crescentes tempos de incubação. O valor do coeficiente angular de cada curva também é mostrado.

Na curva de “Abs – BR” (Figura 4.1.2), comparação dos coeficientes angulares dos ensaios AChE e AChI mostra que este último cresce a uma taxa 10 vezes menor. Outro aspecto importante é a proximidade do “zero” de “Abs – BR” que os valores de AChI apresentam. Este foi, inclusive, o fator preponderante para a escolha do tempo de incubação usado para larvas: ensaios AChI com larvas exibiam cerca de metade dos espécimes com valores negativos no ponto 60 minutos, o que resultava no descarte destas amostras. Optou-se então por usar o tempo de incubação de 180 minutos, no ensaio para Acetilcolinesterase de larvas.

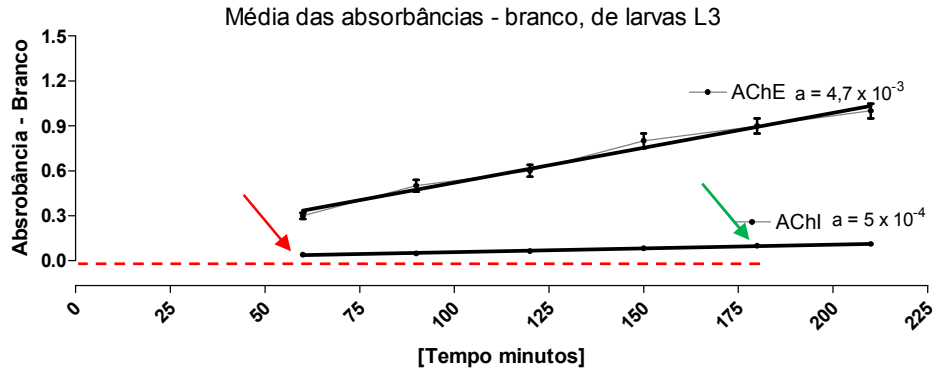


Figura 4.1.2: valores de absorvância subtraída do branco (Abs – BR), no ensaio AChE e AChI apresentado na Figura 4.1.1. O valor do coeficiente angular (a) de cada curva também é mostrado. As setas indicam a proximidade do “zero” de Abs do ponto de 60’ (vermelha) e de 180’ (verde) de AChI.

4.2. Estudos Sobre o Ensaio de Acetilcolinesterase

4.2.1. Racional do ensaio e problemas iniciais

Este teste quantifica a sensibilidade da enzima Acetilcolinesterase (Ace) aos inseticidas OP e CB, que nela atuam. Esta quantificação é feita utilizando-se o CB propoxur como inibidor. No ensaio, o substrato é Acetiltiocolina, apontada por Ellman, autor da técnica original, como um substituto satisfatório para o substrato natural da enzima (Ellman et al. 1961). São feitas duas placas, uma com a atividade total da Ace (AChE) e a outra com a atividade da enzima na presença do inibidor (AChI). Um esquema com as reações que ocorrem no ensaio é mostrado na figura 4.2.1.

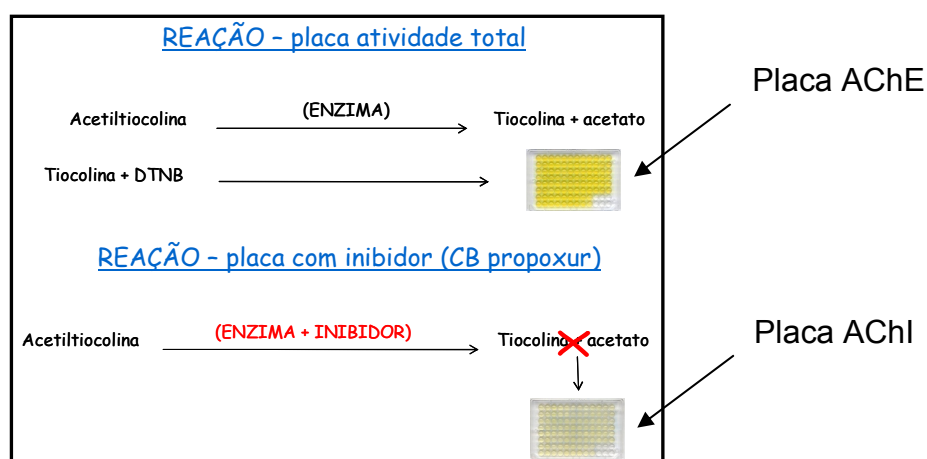


Figura 4.2.1. Esquema simplificado das reações do ensaio para quantificação da atividade e da inibição de Ace com propoxur. DTNB: 5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico).

O resultado (AChI), gerado pela diferença entre as duas placas, pode ser expresso em percentual de inibição da atividade ou em percentual de atividade remanescente, que são unidades complementares.

Para classificar alteração na Ace, podem ser usados dois diferentes critérios, como já mencionado anteriormente: da OMS, que aponta como alterados indivíduos com mais de 30 % de atividade remanescente (Hemingway 1998), e o critério do Laficave, que classifica uma população como alterada se mais do que 15 % de seus espécimes apresentarem atividade remanescente superior ao percentil 99 da cepa Rockefeller, padrão de suscetibilidade (Valle et al. 2006, Montella et al. 2007). No entanto, como a definição do critério Laficave levou em conta a classificação da OMS para

várias populações do país submetidas ao ensaio (vide item 3.5.5), verificou-se posteriormente, de forma esperada, concordância na classificação das populações avaliadas com os dois critérios.

Todavia, no ano de 2008, detectamos pela primeira vez discrepância entre os dois critérios para algumas localidades do Brasil. Essas populações foram classificadas como alteradas segundo o critério Laficave. Contudo, de acordo com o critério da OMS, a atividade das mesmas populações era considerada normal: a inibição com propoxur foi superior a 70 % para todas elas.

Vale ressaltar que, em mosquitos *Anopheles*, *Culex*, e em inúmeros outros insetos, há descrição de mutações e/ou ampliações do gene *ace-1*, que codifica a Acetilcolinesterase relacionada à resistência a OP e CB (Walsh et al. 2001, Vontas et al. 2002, Weill et al. 2003, Benting e Nauen 2004, Weill et al. 2004, Labbe et al. 2007, Jiang et al. 2009, Revuelta et al. 2009).

Uma vez que até então, de nosso conhecimento, não havia nenhum relato de alteração no gene da *ace-1* de *A. aegypti* (Vaughan et al. 1998, Weill et al. 2004, Mori et al. 2007), optamos por fazer uma avaliação crítica deste ensaio, de maneira a verificar, ou descartar, a ocorrência de algum problema na metodologia.

Como o critério de classificação do Laficave compara as populações de campo com a cepa Rockefeller (Rock), decidimos inicialmente confrontar os perfis desta cepa, obtidos nos diferentes anos de avaliação (Figura 4.2.2).

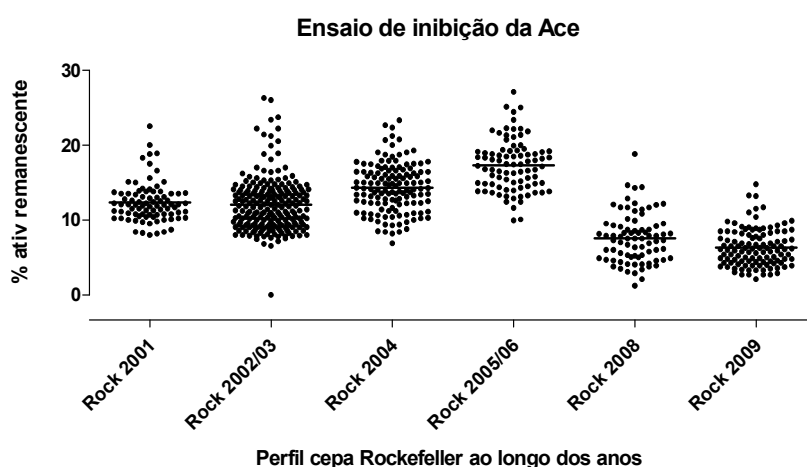


Figura 4.2.2. Percentual de atividade remanescente do ensaio de inibição da Ace com a cepa Rockefeller ao longo dos anos. Cada ponto representa um indivíduo testado.

Confirmamos que o perfil de atividade remanescente de Rockefeller na presença de propoxur havia mudado, a partir de 2008, o ano em que detectamos as primeiras discrepâncias entre os dois critérios de avaliação. Neste momento, pensou-se em comparar também os valores indicativos da “atividade total” da Ace ao longo dos anos, numa tentativa de verificar se o problema estava no ensaio AChI ou, de fato, na cepa Rockefeller. Para isso, trabalhamos apenas com os dados gerados pela placa AChE. Neste caso, foi feita correção pela quantidade de proteínas totais de cada indivíduo (Figura 4.2.3).

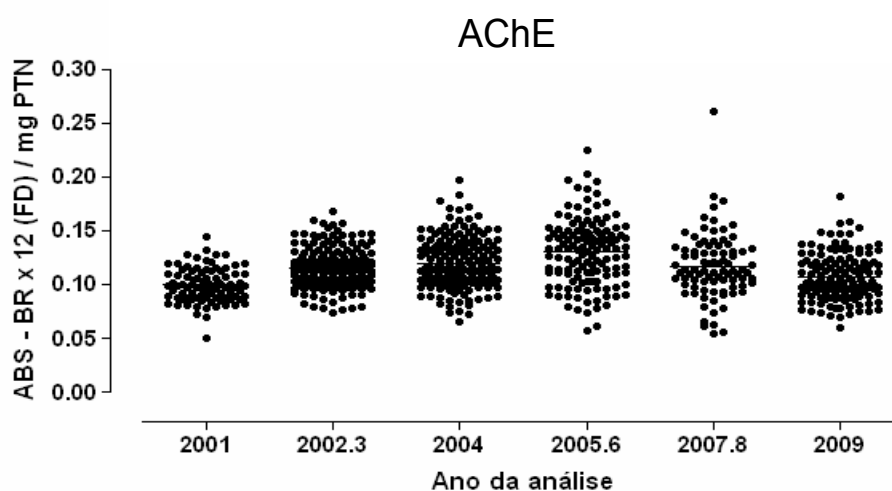


Figura 4.2.3. valores de “atividade total” da Ace obtidos com a cepa Rockefeller ao longo dos anos. ABS: absorbância. BR: branco da reação. FD: fator de diluição (25 de 300 uL de homogenato total). PTN: proteínas totais.

Estes dados indicavam mudança no ensaio AChI, de inibição, e não na cepa Rockefeller. Posteriormente, detectamos problema com o diluente do inibidor usado neste ensaio. A partir de 2008, com o diluente novo, todos os espécimes passaram a apresentar inibição maior.

Além disto, visto que Rockefeller é mantida em laboratório desde 1959 (Hartberg e Craig 1970), esta é uma cepa mais homogênea que as populações de campo ensaiadas. Esta homogeneidade ficava ainda mais acentuada com os maiores valores de inibição obtidos a partir de 2008, da ordem de 90 a 95%. Assim sendo, e considerando que o critério de classificação do Laficave leva em conta o percentil 99 de Rockefeller, qualquer pequena diferença de atividade remanescente entre Rockefeller e as

populações de campo, de variabilidade naturalmente maior, as classificava como alteradas. Uma vez que, na época, não dispúnhamos de espécimes destas populações em quantidade suficiente para permitir a repetição destes ensaios com o diluente novo, aqueles resultados de inibição de atividade foram descartados.

De fato, com a troca do diluente usado no ensaio AChI, a cepa Rockefeller apresentou perfil de inibição de atividade compatível com os perfis observados até 2006 (dados não mostrados).

4.2.2. Curvas do tipo dose-resposta com o CB propoxur

Durante a adaptação do protocolo de quantificação enzimática para adultos (Valle et al. 2006), um dos poucos parâmetros não testados havia sido a concentração do CB propoxur recomendada pela OMS para o ensaio de Ace – que incluímos como objetivo desta dissertação. Para isto foram feitas curvas do tipo dose resposta, com diferentes concentrações deste inibidor, utilizando a cepa Rockefeller e duas populações de campo, uma das quais havia sido classificada como tendo Ace alterada, segundo o critério Laficave. O objetivo era saber se o propoxur estava inibindo Rockefeller e as populações de campo de maneira diferenciada.

Ensaio preliminares, apenas com fêmeas adultas da cepa Rockefeller, mostraram que a inibição de atividade de Ace com 200 uM de propoxur - concentração do CB recomendada pela OMS (Figura 4.2.4) - era máxima nesta faixa de concentração.

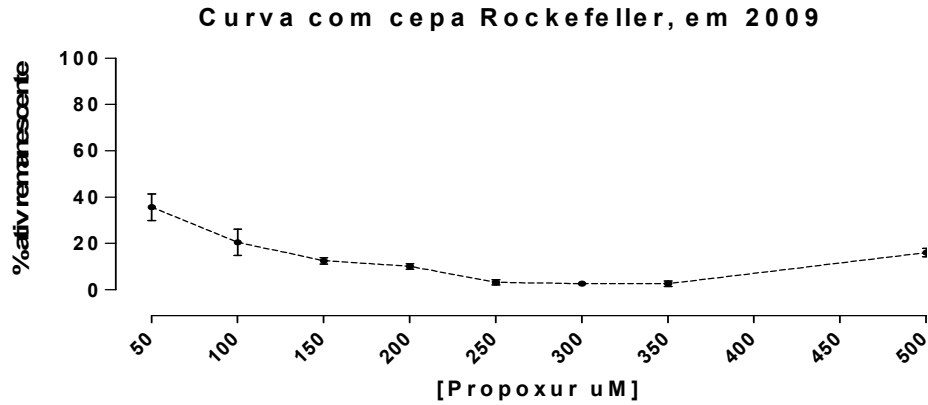


Figura 4.2.4. média dos percentuais de atividade remanescente da Ace em extratos individuais de 45 fêmeas da cepa Rockefeller expostos a crescentes concentrações do inibidor CB propoxur.

O ensaio seguinte, também com fêmeas adultas de populações de campo expostas a concentrações que variaram de 2 a 200 uM (Figura 4.2.5), mostrou perfil de inibição da Ace semelhante àquele da cepa Rockefeller.

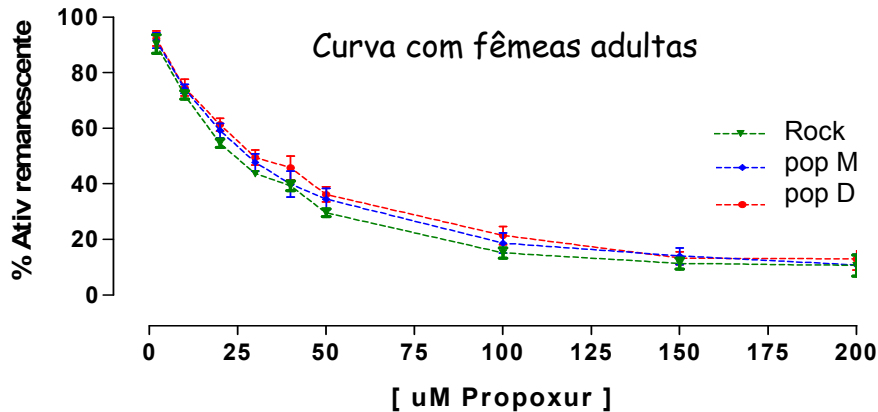


Figura 4.2.5. Média do percentual de atividade remanescente da Ace de fêmeas adultas de *A. aegypti* na presença de diferentes concentrações de propoxur. Para cada população (pop), estão indicados os desvios-padrão de 40 indivíduos. As populações M e D haviam apresentado, respectivamente, 1 e 46 % de seus indivíduos com atividade remanescente acima do percentil 99 da cepa Rockefeller. Estes valores classificavam a atividade de Ace da população M como normal, e da população D como alterada, de acordo com o critério Laficave.

Este ensaio foi feito também com larvas Rockefeller (Figura 4.2.6), resultando em maior inibição quando comparado com fêmeas adultas (Figura

4.2.5). Por isso, os testes com as larvas das populações de campo foram feitos com concentrações até 100 μM , correspondente à metade do recomendado pela OMS para adultos (Hemingway 1998). Uma vez que não havia espécimes larvares das populações mostradas na Figura 4.2.5 disponíveis para estes ensaios, foram usadas as populações F e R. No entanto, também não houve disponibilidade de espécimes larvares destas últimas populações para realizar o ensaio de rotina (item 3.5.3) e aplicar nosso critério de classificação. Apesar das dificuldades, também nos ensaios com larvas a inibição por propoxur das populações de campo parece equivalente à da cepa Rockefeller. Além disto, o padrão de inibição distinto entre larvas e adultos, com maior inibição das primeiras, fica evidente na comparação das Figuras 4.2.5 e 4.2.6. É importante salientar que todas essas curvas foram feitas utilizando diluente novo, distinto daquele usado antes do ano de 2008.

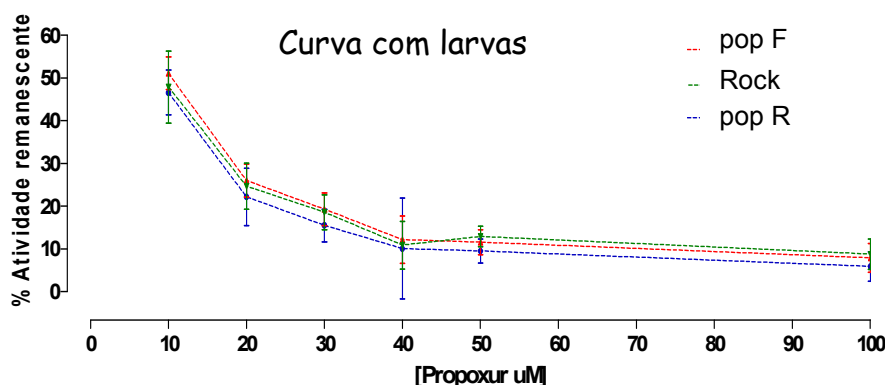


Figura 4.2.6. Média do percentual de atividade remanescente da Ace de larvas de *A. aegypti* na presença de diferentes concentrações de propoxur. Para cada população (pop), estão indicados os desvios-padrão de 30 indivíduos.

4.2.3. Mudança da concentração de propoxur usada nos ensaios

Os resultados indicaram inibição da atividade de Ace de Rockefeller na faixa de 95 %, com 200 μM de propoxur, a dose recomendada pela OMS. Nestas condições, a inibição da atividade das populações de campo era sempre superior a 80 %. Esta observação, aliada aos problemas já mencionados, nos levou a modificar a concentração de inibidor usada nos ensaios: passou-se a utilizar 150 μM de propoxur para mosquitos adultos e

75 uM para larvas do vetor. Esta troca de concentração foi feita levando-se em consideração que a dose recomendada pela OMS havia sido escolhida de maneira a inibir pelo menos 70% da atividade da Ace nas cepas suscetíveis (Hemingway 1998).

Cabe ainda mencionar que todos os demais resultados apresentados nesta dissertação foram obtidos com estas concentrações, cuja adequação será discutida à frente.

4.2.4. Discussão e proposta de análise adicional do ensaio de Ace

Em mosquitos *Culex* e *Anopheles*, há relatos na literatura que correlacionam as mutações G119S, F331W e F290V (nomenclatura de acordo com estrutura da Ace-1 de *T. californica*) em seus genes *ace-1*, com a alta insensibilidade apresentada pela Acetilcolinesterase em cepas resistentes (Hemingway et al. 2004, Nabeshima et al. 2004, Weill et al. 2004, Alout et al. 2007). Apesar de terem sido realizados alguns estudos com o gene *ace-1* de *A. aegypti*, até a presente data, de nosso conhecimento, nenhum dado que sugerisse mutação ou amplificação do gene foi relatado (Weill et al. 2004, Labbé et al. 2007b, Mori et al. 2007). Weill et al. (2004) e Mori et al. (2007) argumentaram que para as substituições citadas nos códons 119 e 331 ocorrerem no gene *ace-1* do *A. aegypti*, seriam necessárias duas mutações. Contudo, a substituição de fenilalanina por valina, no códon 290, também não detectada neste vetor, necessitaria de apenas um evento de mutação para ocorrer em *A. aegypti* (Mori et al. 2007).

Nesse sentido, foi sugerida, em trabalho recente, alteração no perfil de inibição da Ace (AChI) em quatro populações de *A. aegypti* de Trinidad, três classificadas como alteradas e uma como muito alterada (Polson et al. 2011). No entanto, estas alterações foram apontadas através do critério de classificação Laficave, do mesmo modo como obtivemos populações classificadas como tendo AChI alterada no biênio 2008/2009. Neste trabalho, os autores utilizaram a concentração do inibidor recomendada pela OMS, que tende a inibir praticamente toda a atividade da Ace na cepa suscetível, fazendo com que as pequenas diferenças entre o perfil desta cepa e os perfis das

populações de campo fossem aumentadas quando da aplicação do critério de classificação Laficave. Além disso, os autores usaram como referência de suscetibilidade a cepa local CAREC (apesar de terem usado a cepa Rockefeller em seus ensaios). Comparando a atividade remanescente das duas cepas suscetíveis, observou-se que Rockefeller mostrou perfil mais heterogêneo e que foi similar ao perfil da população classificada como muito alterada. Ou seja, se Rockefeller tivesse sido usada como cepa controle, como recomendado no protocolo Laficave, a atividade de todas as populações seria classificada como normal – o que levanta questionamento sobre a significância biológica das diferenças observadas naquele trabalho.

Como comentado anteriormente, foi feita análise dos dados de “atividade total” da enzima Ace para a investigação dos perfis da cepa Rockefeller ao longo dos diferentes anos de avaliação. Uma vez que não foi ainda relatado nenhum caso de mutação na Ace-1 de *A. aegypti*, e também que, com estas análises, mais informações sobre a enzima Ace das populações seriam conhecidas em um único teste, decidimos aplicá-las a todas as populações de campo avaliadas (ver itens 4.3 e 4.4). Esta seria uma análise adicional à avaliação do percentual de inibição da enzima pelo inseticida (AChI), que é feita por todos os trabalhos que aplicam este tipo de técnica (Raymond et al. 1985, Hemingway e Smith 1986, Brogdon e Barber 1987, Brogdon 1988, Brogdon et al. 1988, Moores et al. 1988, French-Constant e Bonning 1989, Peiris e Hemingway 1990, Polson et al. 2011). Neste caso foi necessário corrigir as variações de absorvância observadas, contemplando o conteúdo protéico de cada mosquito individual (ver Materiais e Métodos) - etapa desnecessária na avaliação de inibição de atividade, que compara duas leituras do mesmo espécime, e na mesma proporção. Os valores resultantes são chamados de “atividade total da Acetilcolinesterase” e serão aqui referenciados como AChE. A unidade usada nestes resultados foi: Absorvância / hora / mg PTN.

Assim como os valores de atividade remanescente obtidos nas curvas do tipo dose-resposta previamente mostradas, os resultados de AChE em cada estágio avaliado, foram semelhantes. Contudo, este novo método de análise, de fato, evidenciou informações interessantes sobre as populações de campo avaliadas em 2009 e 2010. Foram observadas diferenças importantes

na análise de AChE entre os estágios (larvas ou adultos) e entre as populações e Rockefeller. Essas diferenças serão apresentadas nas duas próximas seções.

4.3. Atividade das Enzimas Envolvidas com a Resistência a Inseticidas ao Longo do Ciclo de Vida de *Aedes aegypti*

Existem fortes indícios de que as enzimas que participam da resistência metabólica a inseticidas - Esterases, GSTs e (principalmente) MFOs - sejam induzidas e que também produzam tolerância a aleloquímicos, metabólitos secundários de alguns organismos que influenciam o crescimento, a sobrevivência ou a reprodução de outros (Hunaiti et al. 1995, Li et al. 2007). Em alguns casos, os autores demonstram, inclusive, a participação de uma mesma enzima detoxificadora, como ocorre para GST e MFO, na tolerância a aleloquímicos e a inseticidas (Li et al. 2007).

No Brasil, a rotina de controle de *A. aegypti* consiste de aplicação de larvicidas em 4 a 6 ciclos anuais, ao passo que as aplicações espaciais e residuais, sobre mosquitos adultos, são (ou deveriam ser) realizadas apenas em pontos estratégicos - áreas com potencial de produzir muitos mosquitos ou que apresentam muita convergência de pessoas (aplicação residual nestes pontos é feita mensalmente e as visitas ocorrem de 15 em 15 dias) ou em situações de emergência, como nos períodos epidêmicos. Nas aplicações espaciais é usado o PI deltametrina, e nas aplicações residuais, o PI alfacipermetrina. Contudo, nas localidades onde a resistência a PI é detectada, são usados os inseticidas OP malathion e fenitrothion para as aplicações espaciais e residuais, respectivamente (MS-SVS 2009d). Contudo, de maneira geral, classes distintas de inseticidas são aplicadas nos dois estágios, potencialmente elicitando mecanismos de resistência diferentes. Adicionalmente, a literatura sugere, por exemplo, que as EST participem, dentre outras reações, de alguns processos fisiológicos nas larvas, o que contribuiria para um aumento de sua atividade neste estágio (Oakeshott et al. 2010). Um exemplo seria a hidrólise de hormônio juvenil, composto essencial para o desenvolvimento e reprodução dos insetos. Para isso, existe uma Esterase específica, chamada de Esterase de hormônio juvenil (JHE), que participa da regulação de sua concentração (Bai et al. 2007, Anand et al. 2008, Schafellner et al. 2008). Adicionalmente, outros autores sugerem que as enzimas MFO e GST também participem de processos endógenos inerentes ao metabolismo de ecdisona e de hormônio

juvenil (Scott 1999, Hemingway e Ranson 2000, Bai et al. 2007, da-Fonseca et al. 2010). Uma vez que o hormônio juvenil, que está presente em altas concentrações nos indivíduos imaturos, precisa ser clivado ao final do estágio larvar (vide seção 1.3.2), espera-se que a atividade dessas enzimas aumente no 4° instar larvar.

Em função destas observações, decidimos investigar a dinâmica de atividade de todas as principais famílias de enzimas envolvidas com a resistência metabólica, e da Acetilcolinesterase – alvo de OP e CB, durante o ciclo de vida da cepa Rockefeller (Hartberg e Craig 1970), e de duas populações naturais, com diferentes *status* de resistência a inseticidas, selecionadas dentre aquelas que o laboratório avalia na rotina de suas atividades de monitoramento.

Para essas análises foram escolhidas as populações A e J, coletadas em 2010. A primeira, da Região Norte, foi escolhida por ter apresentado razões de resistência altas frente a OP e PI - homogêneas para OP (larvas) e heterogêneas para PI (adultos). Além disso, não foi detectada a substituição Val1016Ile no *AaNa_v*, o que indica que a resistência a PI deve ter relação com uma maior detoxificação destes inseticidas; de fato, os ensaios bioquímicos detectaram alteração na atividade de todas as enzimas avaliadas (ver capítulo 4.4). A outra população, da Região Nordeste, aqui designada como J, foi escolhida por ser, na época do congelamento dos espécimes, a única, dentre aquelas provenientes de estado distinto da primeira, com ovos viáveis, e em quantidade suficiente para as avaliações. De fato, não havia informação sobre as razões de resistência nem sobre alterações bioquímicas no momento da escolha. No entanto, a população J já havia sido avaliada pela equipe do Laficave em 2001, 2002/3, 2005/6 e 2007/8, tendo apresentado, nestas rodadas de monitoramento, razões de resistência altas para o OP temephos e alteração na atividade de “ α -EST”, “ p NPA-EST” e GST. Some-se a isto a ausência de alterações no *AaNa_v* na Região NE, na ocasião da escolha da população de campo (Laficave, dados não publicados).

Para cada enzima e para cada população foram feitos três gráficos de atividade: um gráfico com larvas, um com fêmeas, e o terceiro com machos adultos. Em todos os casos, com exceção de AChE, os valores de atividade obtidos foram corrigidos pelo total de proteínas de cada indivíduo. De maneira

geral, observamos maior quantidade de proteínas em adultos do que em larvas, assim como maiores quantidades em fêmeas do que em machos; e, como esperado, em larvas L4 do que L3 (dados não mostrados). Cada uma das próximas figuras (4.3.1 até 4.3.7) exhibe os resultados com uma enzima. Até o momento apenas comparações visuais dos perfis foram realizadas, e serão brevemente descritas.

Nesta análise foram observadas quatro grandes “categorias” de perfis de atividade enzimática: 1) atividades maiores no estágio adulto do que no estágio larvar (AChE); 2) atividades maiores no estágio larvar do que no estágio adulto (Esterases “ α -EST” e “ β -EST”); 3) atividades que aumentam no decorrer de cada estágio avaliado (MFO) e 4) atividades que tendem a aumentar no estágio larvar e a diminuir nos primeiros DVA (Esterase “ ρ NPA” e GST).

4.3.1. Inibição de Acetilcolinesterase (AChI)

Especificamente para a análise de inibição da enzima Ace (AChI), mostrada na Figura 4.3.1, existe um critério de classificação, proposto pela OMS, que considera a Ace alterada quando a atividade remanescente, na presença de propoxur, é maior do que 30% (ver item 3.5.5). De acordo com este critério, a Ace da cepa Rockefeller e das duas populações avaliadas é considerada “normal”. Adicionalmente, o critério adotado no laboratório utiliza como ponto de corte o p99 de Rockefeller (ver item 3.5.5). Contudo, a inibição da Ace, nestes ensaios, foi muito grande, e qualquer pequena diferença poderia ser exacerbada ao aplicarmos o critério Laficave. Além disso, as diferenças observadas não pareceram ter significância biológica, e por isso, optamos em não aplicar este critério na análise AChI desta avaliação.

Vale ainda ressaltar que não se verificou padrão aparente que diferenciasse a cepa de laboratório das populações de campo ou mesmo os distintos estágios de desenvolvimento.

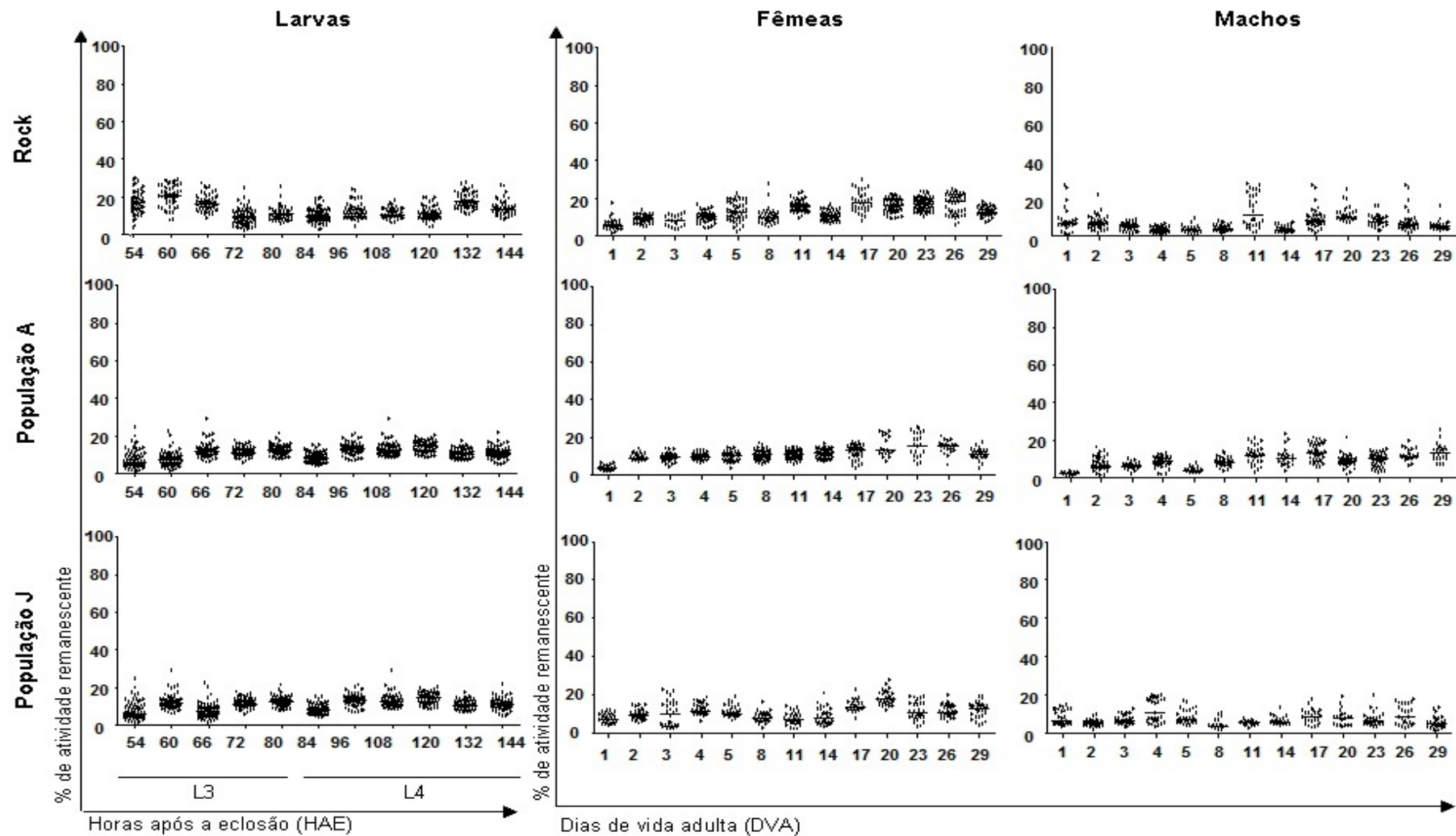


Figura 4.3.1: perfis de atividade remanescente da enzima Acetilcolinesterase (**AChE**) da cepa Rockefeller e de duas populações naturais, ao longo de diferentes horas após a eclosão das larvas (1ª coluna), e de diferentes dias de vida adulta para fêmeas (2ª coluna) e machos (3ª coluna).

4.3.2. Atividade de Acetilcolinesterase (AChE)

A Figura 4.3.2 mostra a comparação da atividade total da enzima Ace nos pontos avaliados. Em todos os casos a atividade foi corrigida pelo conteúdo total de proteínas de cada espécime.

Foi verificado, na cepa Rockefeller, que a atividade de Ace é da ordem de dez vezes maior nos adultos do que nas larvas (note que as escalas são diferentes nas larvas e adultos, na Figura 4.3.2). O mesmo padrão de aumento de atividade no estágio adulto, em comparação com as larvas, é observado nas populações de campo, porém não tão acentuado (em torno de cinco vezes).

Outro ponto em destaque é que as atividades da Ace nas larvas das populações de campo são de três a seis vezes maiores do que as atividades das larvas de Rockefeller. Esta diferença não se propagou para o estágio adulto.

Adicionalmente, foi observado um padrão, somente nas populações de campo, de aumento da AChE no quarto instar larvar. Além disso, as larvas das populações de campo apresentaram, em todo estágio larvar, maior heterogeneidade que as larvas da cepa Rockefeller. Os adultos não exibiram padrão consistente de atividade.

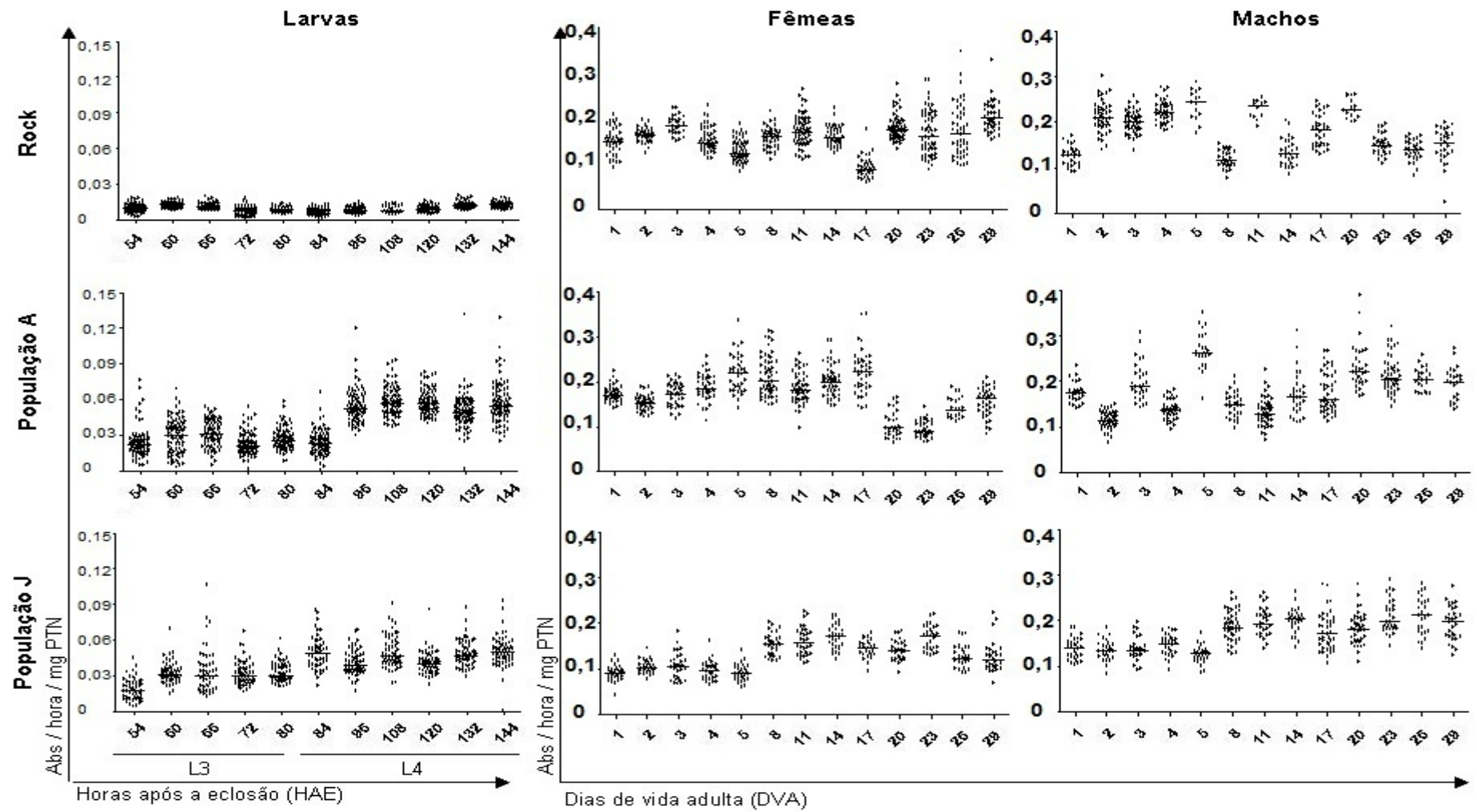


Figura 4.3.2: perfis de atividade total da enzima Acetilcolinesterase (**AChE**) da cepa Rockefeller e de duas populações naturais, ao longo de diferentes horas após a eclosão das larvas (1ª coluna), e de diferentes dias de vida adulta para fêmeas (2ª coluna) e machos (3ª coluna).

4.3.3. Oxidases de Função Múltipla (MFO)

É necessário lembrar que no caso de MFO, a metodologia empregada não detecta atividade enzimática, mas quantifica o grupamento prostético, heme, desta classe de enzimas. De maneira geral, as quantificações dos adultos foram maiores que as das larvas e observou-se tendência de aumento de MFO ao final dos estágios avaliados. Esta tendência foi mais marcada nas larvas das populações de campo e nas fêmeas de todas as populações avaliadas (Figura 4.3.3).

No estágio larvar, as populações de campo apresentaram de uma a duas vezes mais MFO que a cepa Rockefeller. Além disso, foi observado um aparente padrão de aumento de intensidade e heterogeneidade no quarto instar larvar, apenas nas populações de campo.

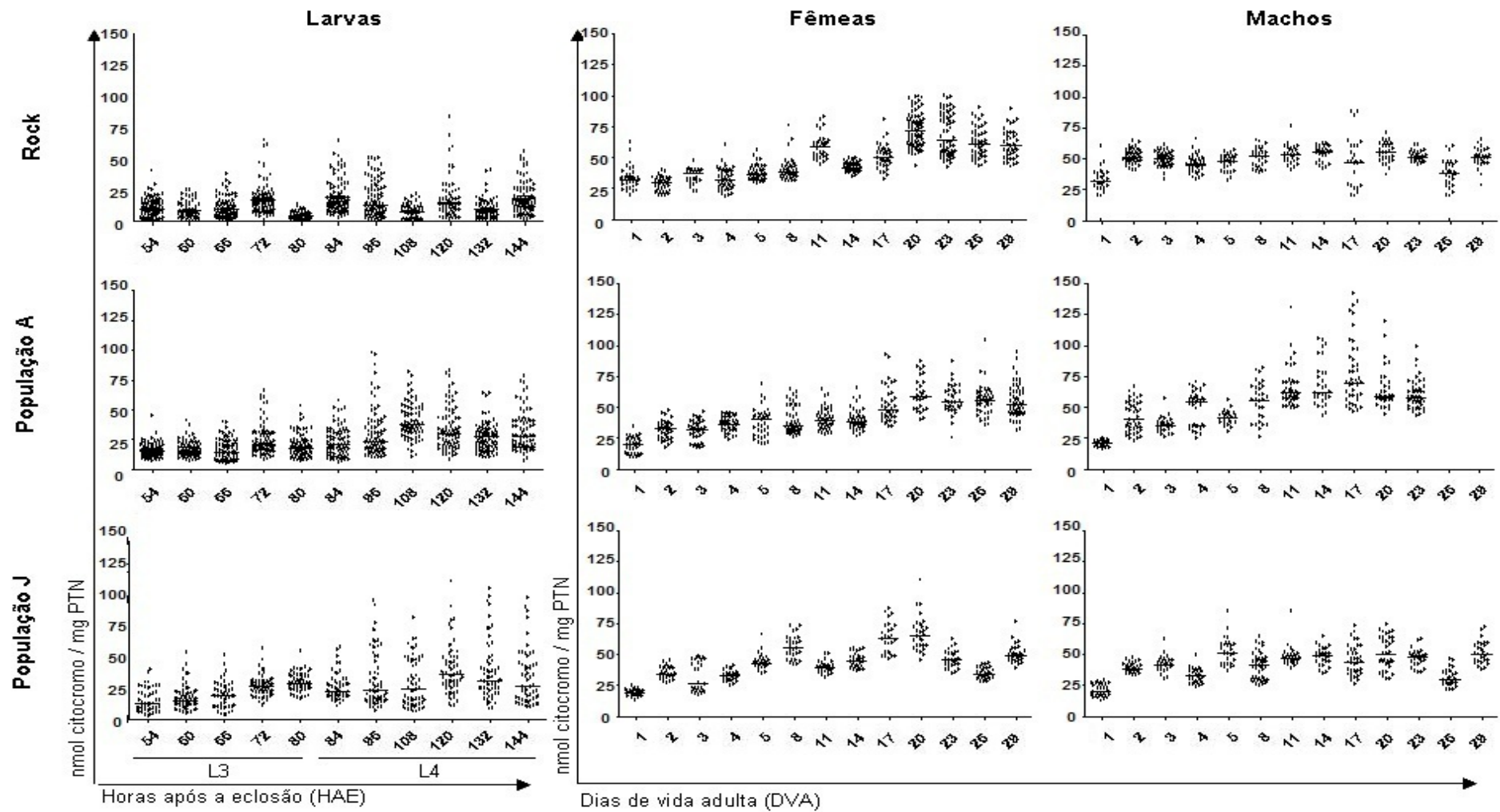


Figura 4.3.3: perfis de atividade das enzimas Oxidases de função múltipla (**MFO**) da cepa Rockefeller e de duas populações naturais, ao longo de diferentes horas após a eclosão das larvas (1ª coluna), e de diferentes dias de vida adulta para fêmeas (2ª coluna) e machos (3ª coluna).

4.3.4. Esterases que hidrolisam acetato de α -naftil (“ α -EST”)

A atividade da “ α -EST” no estágio larvar é da ordem de duas a três vezes maior que a obtida no estágio adulto (Figura 4.3.4; observar escalas diferenciadas).

Notou-se também que as atividades em larvas das populações de campo são ligeiramente maiores que as atividades em larvas da cepa Rockefeller; a mesma diferença, contudo, não foi detectada no estágio adulto.

Adicionalmente, as atividades nas populações de campo foram mais heterogêneas que na cepa Rockefeller, em todos os estágios. As atividades em machos e fêmeas adultos foram comparáveis e não exibiram alterações consistentes nos perfis temporais.

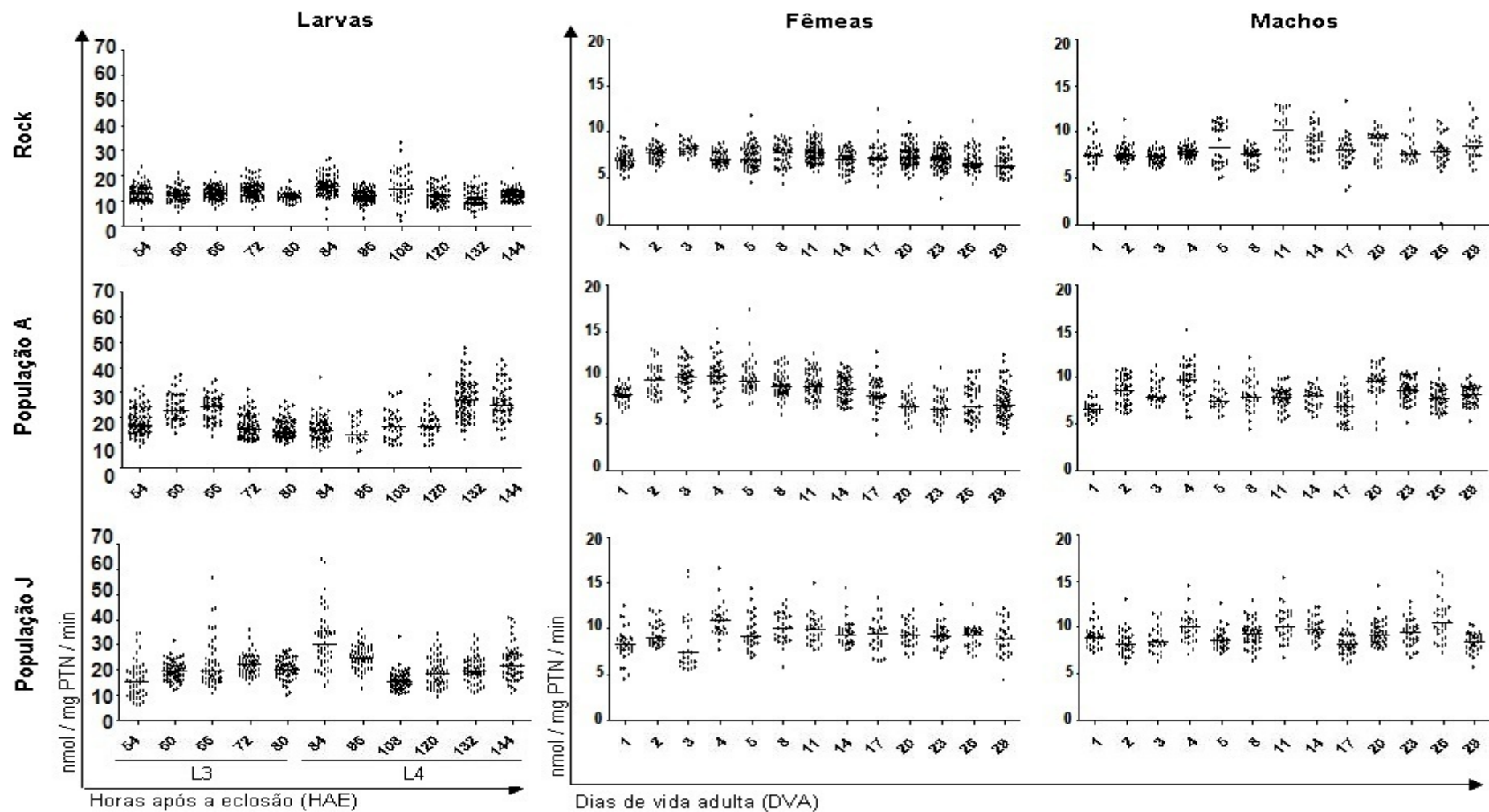


Figura 4.3.4: perfis de atividade das enzimas Esterases com substrato acetato de alfa nafil (**ALFA**) da cepa Rockefeller e de duas populações naturais, ao longo de diferentes horas após a eclosão das larvas (1ª coluna), e de diferentes dias de vida adulta para fêmeas (2ª coluna) e machos (3ª coluna).

4.3.5. Esterases que hidrolisam acetato de β -naftil (“ β -EST”)

Assim como para “ α -EST”, a atividade das “ β -EST” é maior no estágio larvar do que no adulto (de três a quatro vezes maior, observar escalas diferenciadas na Figura 4.3.5).

No estágio larvar, observou-se que o perfil de atividade da cepa Rockefeller é mais homogêneo e da ordem de duas a cinco vezes menor que os perfis de atividade das populações de campo.

Adicionalmente, parece que a população A é mais heterogênea do que a J, o que é evidenciado principalmente no estágio adulto.

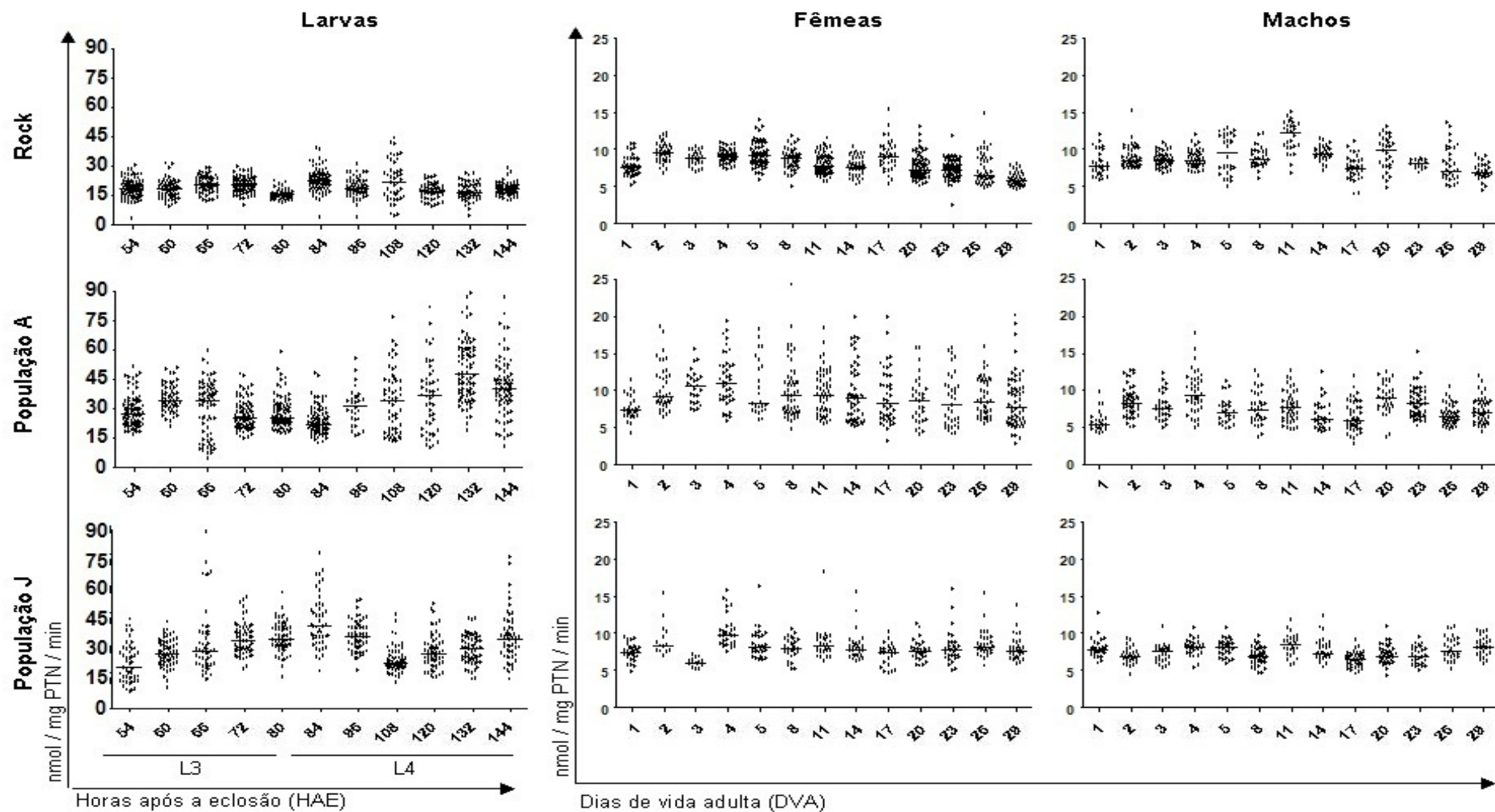


Figura 4.3.5: perfis de atividade das enzimas Esterases quantificadas com o substrato acetato de beta naftil ("β-EST") da cepa Rockefeller e de duas populações naturais, ao longo de diferentes horas após a eclosão das larvas (1ª coluna), e de diferentes dias de vida adulta para fêmeas (2ª coluna) e machos (3ª coluna).

4.3.6. Esterases que hidrolisam acetato de ρ -nitrofenil (“ ρ NPA EST”)

Foi observado, na cepa Rockefeller e nas duas populações avaliadas, perfil temporal semelhante: aumento da atividade enzimática no final do estágio larvar e diminuição durante o estágio adulto (Figura 4.3.6).

De maneira geral, a cepa Rockefeller apresentou atividades ligeiramente menores que as populações de campo, principalmente no final do estágio larvar e início do estágio adulto.

A atividade e heterogeneidade observadas no quarto instar larvar foram superiores às observadas em L3, ambas mais exacerbadas nas populações de campo. Além disso, também no estágio adulto a heterogeneidade das populações de campo foi maior que a da cepa Rockefeller.

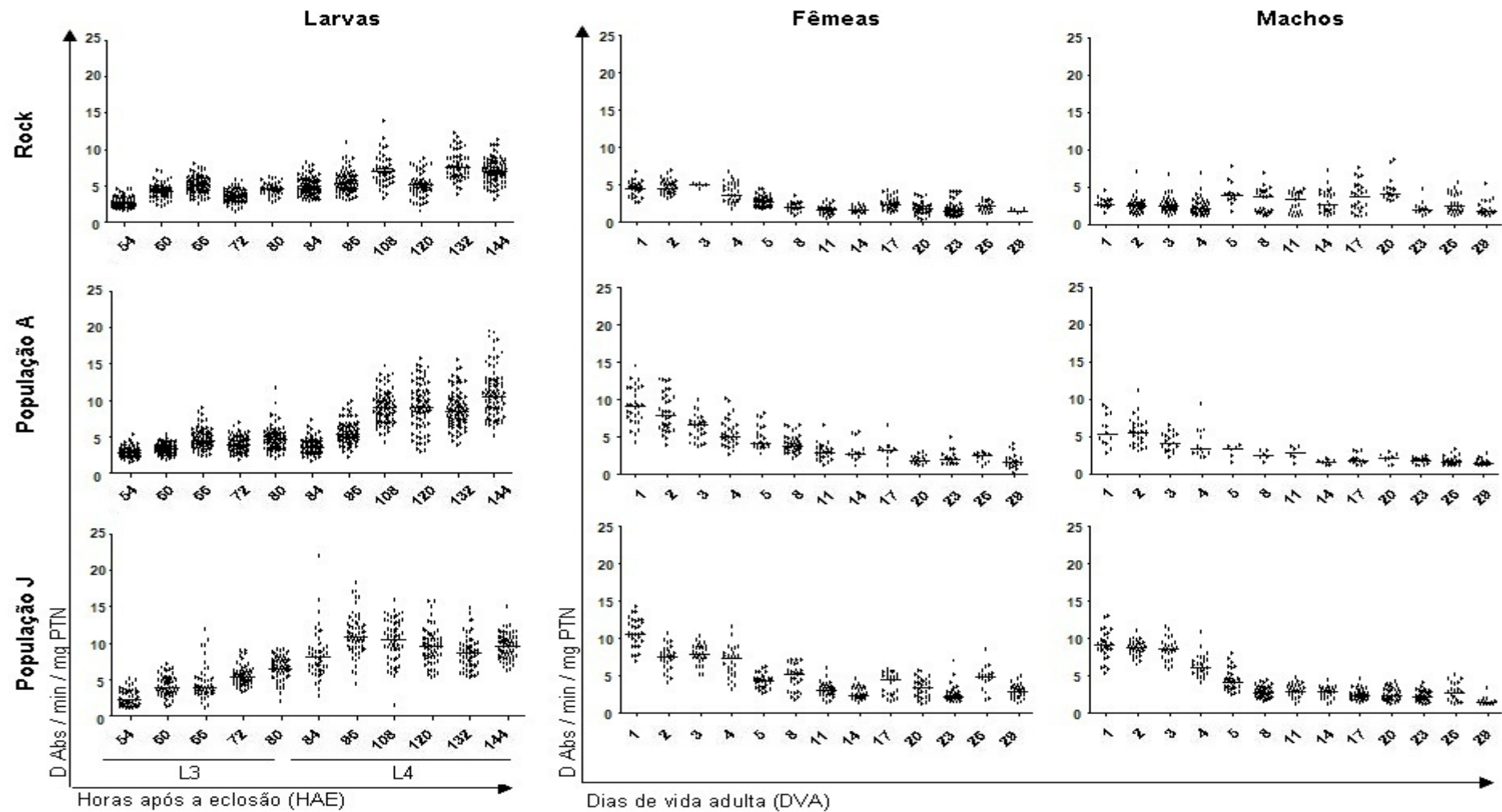


Figura 4.3.6: perfis de atividade das enzimas Esterases quantificadas com o substrato acetato de *p*-nitrofenil ("*p*NPA-EST") da cepa Rockefeller e de duas populações naturais, ao longo de diferentes horas após a eclosão das larvas (1ª coluna), e de diferentes dias de vida adulta para fêmeas (2ª coluna) e machos (3ª coluna).

4.3.7. Glutathione S-transferases (GST)

Assim como para Esterase “ ρ NPA”, foi observado aumento da atividade de GST ao longo do estágio larvar, seguido de diminuição a partir dos primeiros dias do estágio adulto (Figura 4.3.7). Este perfil foi mais evidente nas populações de campo do que na cepa Rockefeller (com exceção dos machos da população A). O aumento de atividade no estágio larvar fica mais evidente por comparação das medianas, principalmente nas populações de campo.

Foi observado que a atividade das populações de campo tende a ser ligeiramente maior que a da cepa Rockefeller. Adicionalmente, houve tendência de maior heterogeneidade nas populações de campo, principalmente no estágio larvar.

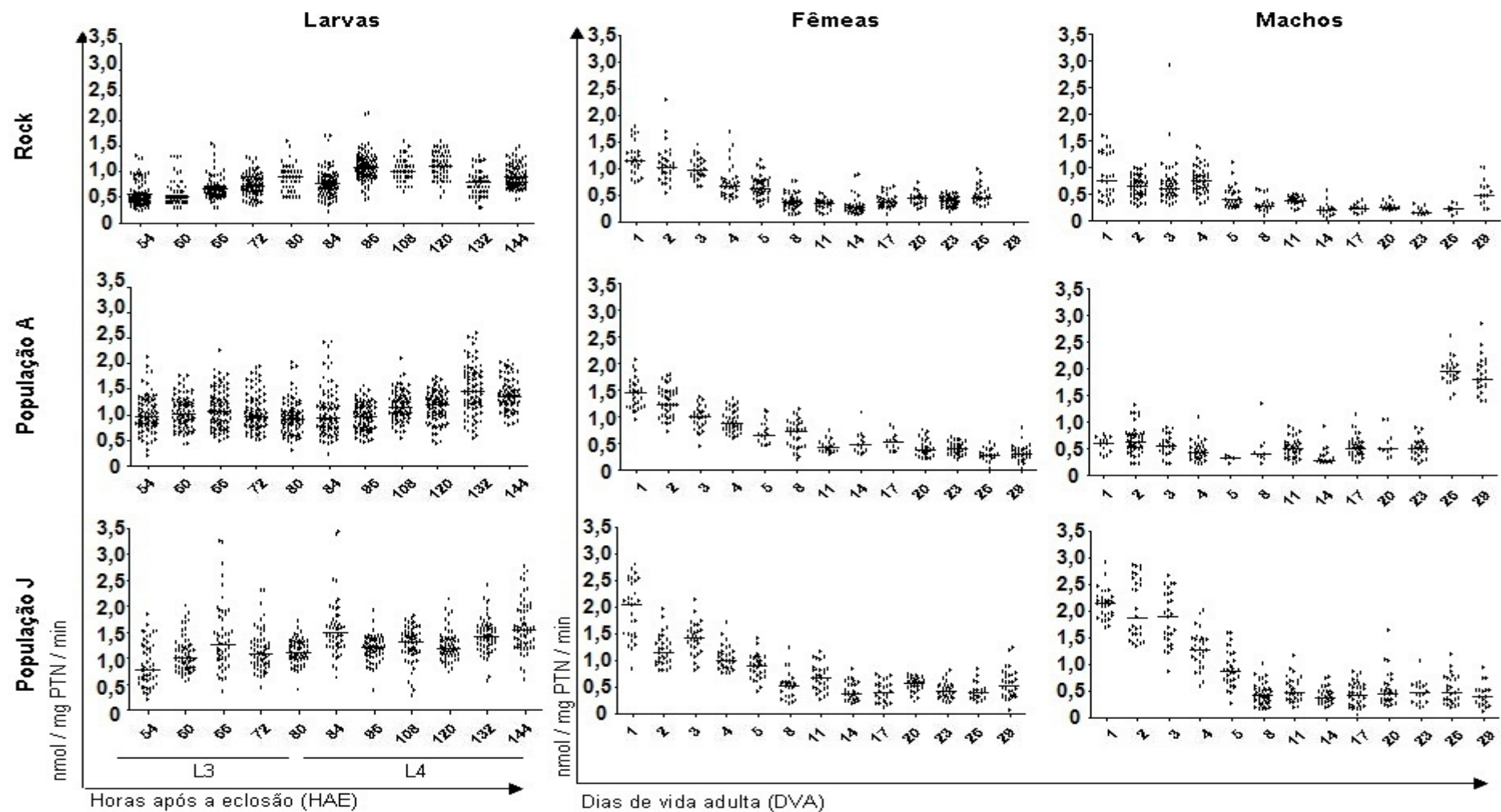


Figura 4.3.7: perfis de atividade das enzimas glutationa-S-transferases (GST) da cepa Rockefeller e de duas populações naturais, ao longo de diferentes horas após a eclosão das larvas (1ª coluna), e de diferentes dias de vida adulta para fêmeas (2ª coluna) e machos (3ª coluna).

4.3.8. Discussão sobre os mecanismos de resistência ao longo do ciclo de vida do *A. aegypti*

De maneira geral, as duas populações de campo avaliadas nos ensaios ao longo do desenvolvimento apresentaram atividade e heterogeneidade maior que Rockefeller para todas as enzimas, em pelo menos um dos estágios avaliados.

A análise de AChE evidenciou atividades muito maiores no estágio adulto em todos os casos, o que pode refletir simplesmente o maior tamanho de seu sistema nervoso, quando comparado com as larvas. Isto é, além de interessante do ponto de vista acadêmico, conveniente para o PNCD, uma vez que os inseticidas OP, usados no controle de larvas do *A. aegypti* desde 1967 no Brasil, teriam, se considerarmos somente este parâmetro, um maior potencial de atuar sobre larvas do vetor. Além disso, a maior atividade de Ace das populações de campo usadas em nosso estudo, em relação a Rockefeller, sugere contribuição, ao menos parcial, para a resistência a OP nessas populações.

De uma maneira geral, quando interpretamos os resultados de AChI (Figura 4.3.1) usando o critério de classificação da OMS, concluímos que não há indivíduos alterados em nenhuma das populações ou condições avaliadas. No entanto, quando comparamos AChI com AChE, observamos que as atividades totais de larvas das populações A e J - que são maiores que as da cepa Rockefeller - não influenciaram os resultados com o CB inibidor (AChI), sugerindo que o aumento de atividade total de Ace (AChE), nas populações avaliadas, seja proveniente de um maior número de moléculas da enzima – e não de alteração em suas propriedades catalíticas, ou pelo menos de sensibilidade aos inseticidas CB e OP.

As enzimas MFO apresentam papel importante na biossíntese de 20-hidroxiecdisona; também contribuem para sua degradação e para a diminuição dos títulos de hormônio juvenil (Bergé et al. 1998, Feyereisen 1999, Scott 1999, Iga e Smagghe 2010). Nesse contexto, a tendência de aumento na quantificação de MFO observada no final do estágio larvar do *A. aegypti* (Figura 4.3.3), pode ter relação com a degradação do hormônio juvenil que ocorre neste ponto do desenvolvimento dos insetos (Lourenço-de-Oliveira

2004). Por outro lado, a quantificação de MFO nos adultos revela maiores valores naqueles mais velhos (Figura 4.3.3). Este aumento poderia estar relacionado com o papel das MFO na resposta adaptativa dos insetos aos compostos tóxicos que podem entrar em contato com eles (Bergé et al. 1998, Feyereisen 1999, Li et al. 2007). Vale lembrar que o monitoramento dos mecanismos de resistência nas populações brasileiras do vetor, em sua rotina, usa fêmeas não alimentadas de um DVA, o que garante representatividade de toda a população de campo.

Tendência de aumento de MFO no final dos estágios avaliados foi observado principalmente nas larvas das populações de campo e em fêmeas adultas. Strobe et al. (2008) e Marcombe et al. (2009), detalhados no item 1.11 usaram a técnica do *microarray* (“*detox chip*”) para estudar diferentes estágios de populações de campo de *A. aegypti*. Ambos também detectaram expressão diferencial de MFOs, quantitativa e qualitativamente, entre populações resistentes e susceptíveis a inseticidas, e entre larvas e adultos, embora só tenham trabalhado com um ponto em cada estágio.

Embora tenhamos tentado explorar ao máximo a metodologia disponível de quantificação dos mecanismos de resistência, o ensaio para MFO não é capaz de medir diretamente a atividade dessas enzimas. É necessário que este ensaio, que quantifica o conteúdo do grupamento prostético, heme, das MFO (Hemingway 1998), seja substituído por metodologia mais direta, uma vez que este é um mecanismo de resistência que começa a se disseminar nas populações brasileiras do vetor.

Quanto às enzimas GST, o declínio de atividade observado nos primeiros DVA está em consonância com os achados de Mouria et al. (1993), que mostraram o mesmo perfil para fêmeas adultas de quatro cepas de *A. aegypti*, mantidas em laboratório. Nossos resultados também estão de acordo com o trabalho de Lumjuan et al. (2011), que não observou alterações na expressão de dois genes GST, entre larvas de 4º instar e adultos de 1 DVA de duas cepas de *A. aegypti* resistentes a DDT e a PI. Vale lembrar que estes autores utilizaram apenas um ponto (não especificado) do 4º instar larvar (ver item 1.11).

Encontramos maior atividade para as Esterases “ α -EST” e “ β -EST” no estágio larvar, em consonância com Lima-Castelani et al. (2004) e Souza-

Polezzi e Bicudo (2005), usando os mesmos substratos com o mosquito *A. aegypti*. Por outro lado, os achados de Bai et al. (2007), que indicaram níveis crescentes de atividade de Esterases de hormônio juvenil durante o 4º instar deste vetor, assemelham-se ao perfil obtido para Esterases “ ρ NPA” em nosso trabalho.

Em 2007, Montella et al observaram que o perfil das Esterases “ ρ NPA” era diferente do perfil apresentado pelas Esterases “ α -EST” e “ β -EST”, em populações de campo coletadas entre 2001 e 2005. Na ocasião, levantou-se a hipótese de que as Esterases “ ρ NPA” estariam relacionadas com resistência a PI, enquanto as Esterases “ α -EST” e “ β -EST” contribuiriam para a resistência a OP, nas populações analisadas. A detecção, durante o desenvolvimento do vetor, de perfil distinto de Esterases “ ρ NPA” em relação a “ α -EST” e “ β -EST”, que, por sua vez, foram semelhantes, corrobora a idéia de que estamos lidando com espécies moleculares e funções fisiológicas distintas. Por outro lado, estas observações estão em desacordo com a afirmativa da OMS de que o acetato de ρ -nitrofenil seria um substrato mais genérico, capaz de abranger as enzimas quantificadas com os substratos acetato de α - e β -naftil (Hemingway 1998).

Alguns autores não consideram que estes substratos (acetato de α - ou β -naftil) sejam os mais adequados para revelar Esterases potencialmente envolvidas com a resistência metabólica a OP, uma vez que são substratos gerais para várias outras Hidrolases, como Colinesterases, por exemplo (Brown e Brogdon 1987). Nossos resultados, no entanto, sugerem que a quantificação com acetato de α - ou β -naftil não é fortemente influenciada pelas Acetilcolinesterases: detectamos maior atividade de Ace no estágio adulto, ao passo que as atividades de “ α -EST” e “ β -EST”, ao contrário, são maiores no estágio larvar. Além disso, ainda que os acetatos de α - e β -naftil sejam considerados substratos gerais, experimentos realizados no laboratório, usando espécimes da cepa Rockefeller pré-expostos a OP, sugerem que estes sejam substratos de enzimas capazes de responder ao estímulo com OP, de fato (Belinato 2011, em preparação).

A OMS recomenda que os ensaios bioquímicos sejam feitos com larvas de 4º instar ou com fêmeas de um dia de vida adulta. Contudo, os resultados aqui obtidos ao longo do desenvolvimento do *A. aegypti* apontam

para revisão deste procedimento, com menor restrição, uma vez que os pontos de um e dois DVA parecem equivalentes. Neste sentido, pretendemos ainda realizar, em paralelo, bioensaios e ensaios bioquímicos em espécimes de 1, 2, 3, 4 e 5 DVA, de cerca de 10 populações de campo (OMS 1981, 1998, Hemingway 1998).

4.4. Mecanismos de Resistência em Populações Naturais de *A. aegypti*

A fim de obter comparação mais direta entre os resultados de ensaios biológicos e bioquímicos, um protocolo de ensaios bioquímicos para larvas do vetor foi adaptado (ver seção 3.5.3), a partir do protocolo para adultos descrito anteriormente (Valle et al. 2006). Concomitantemente, a equipe do laboratório padronizou um bioensaio quantitativo com o inseticida PI deltametrina, para aplicação em espécimes adultos do vetor (dados do Laboratório não publicados), além de ensaios moleculares que detectam a alteração Val1016Ile no *AaNa_v*, previamente correlacionada com resistência a PI em *A. aegypti* (Martins et al. 2009). Com isso, atualmente dispomos de bioensaios quantitativos e de ensaios bioquímicos para larvas e adultos do mosquito *A. aegypti*.

Nesse contexto, foram analisados, por meio de ensaios bioquímicos, mosquitos adultos e larvas de 15 e sete populações do vetor, respectivamente, pertencentes a quatro regiões do país (ver Tabela 3.1).

4.4.1. Avaliação de mosquitos adultos

Na tabela 4.4.1 são mostrados, para mosquitos adultos das populações do vetor avaliadas, as razões de resistência frente a inseticidas PI, e os resultados de ensaios bioquímicos e moleculares. Bioensaios de larvas com o OP temephos também são mostrados, a título de comparação.

Tabela 4.4.1: quantificação da resistência e avaliação dos mecanismos envolvidos em populações naturais de *A. aegypti* do Brasil

Parâmetro	Rock	A	B	C	D	E	F	G	H	I	L	N	O	P	Q	R		
Ensaio	RR ₅₀	1,0	7,6	7,5	8,9	8,4	10,6	9,8	7,6	7,2	11,7	8,6	10,0	9,8	6,4	9,4	7,5	
	RR ₉₅	1,0	12,7	8,7	16,3	20,9	17,2	17,5	14,9	12,5	11,8	16,0	25,9	22,8	11,3	15,0	12,0	
	RR ₉₉	1,0	15,9	9,3	21,0	30,5	21,1	22,3	19,7	15,6	11,8	20,8	38,4	32,4	14,3	19,3	14,6	
Biológicos	RR ₅₀	1,0	6,8	7,3	9,3		8,0	8,4	2,6	5,9	12,9	10,0	34,6	9,0			5,4	
	RR ₉₅	1,0	8,5	11,3	14,2	R	R	21,4	12,9	3,4	7,6	21,3	51,3	13,0	R		10,8	
	RR ₉₉	1,0	9,2	13,6	17,0		32,2	15,5	3,8	8,6	26,9	29,0	60,2	15,2			14,4	
Ensaio	ACHe	0	0	0	45	1	2	0	64	3	0	8	0	3	8	11		
	ACHl	0	3	0		11	0	0	0	3	11	0	3	0	6	3		
	% acima do	MFO	17	5	4	59	9	54	19	65	2	17	9	26	0	29	1	
		"α-EST"	68	65	71	31	44	49	45	3	23	22	86	46	45	8	0	
	Bioquímicos	perc 99 de	47	55	25	7	32	60	8	0	12	36	43	12	37	0	0	
		Rockefeller	59	45	52	3	9	42	8	0	18	13	57	20	29	43	8	
	"pNPA-EST"	14	23	21	0	80	88	49	31	74	62	70	60	76	80	65		
	GST	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Molecular	frequência 1016 lle	0	0	0	0	0	0	0	0,01	0,03	0,03	0,30	0,28	0,70	0,30	0,59	0,63
		frequência 1016 lle/lle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,33	0,18	0,60	0,42	0,53	0,07	

Resultados de bioensaios dose-resposta feitos com o OP temephos e com o PI deltametrina, de ensaios bioquímicos com espécimes adultos (ver seções 3.3 e 3.5.5 para definição dos critérios de classificação) e de ensaios moleculares. Em relação a este último ensaio, entre parênteses estão os números de espécimes utilizados para cada população. As populações D, E e Q, para as quais foram feitos bioensaios qualitativos com PI, foram classificadas como resistentes ("R"), devido a problemas no ensaio, o resultado de AChI da população D foi descartado.

Todas as populações avaliadas se mostraram resistentes a PI e OP. Foram observados, nas populações avaliadas por ensaios quantitativos, variados graus de heterogeneidade, o que pode ser deduzido pelas diferenças entre as RR_{50} , RR_{95} e RR_{99} .

Há indícios de que a mutação Val1016Ile no AaNa_v esteja fortemente relacionada com a resistência a PI (Garcia et al. 2009, Martins et al. 2009). Uma vez que esta mutação tem caráter recessivo, a Tabela 4.4.1 mostra as frequências alélica e genotípica para cada população. Nas populações L a R foram detectados indivíduos homozigotos para a mutação. Para todas estas seis populações, os ensaios bioquímicos detectaram forte alteração nas enzimas GST; e, com exceção da população R, foram também detectados níveis variados de alteração em pelo menos dois outros grupos de enzimas que participam da resistência metabólica. Neste sentido, vale lembrar que GST, “*pNPA-EST*” e/ou MFO já foram correlacionadas com a resistência a PI em outros estudos (Hemingway e Ranson 2000, Li et al. 2007, Montella et al. 2007, Cuamba et al. 2010). Portanto, parece que nessas populações múltiplos mecanismos contribuem para a resistência a PI: alteração no alvo, o AaNa_v, e as enzimas GST, além de outras enzimas detoxificadoras, cuja relação com a resistência é mais complexo avaliar. Convém ressaltar que, enquanto é possível que alterações nas enzimas “*pNPA-EST*” ou MFO indiquem relação com resistência a PI, alterações verificadas nas enzimas “ α -EST” e “ β -EST” podem refletir resistência de larvas a inseticidas OP, como previamente observado em *A. aegypti* de diferentes origens (Mourya et al. 1993, Wirth e Georghiou 1999, Macoris et al. 2003, Montella et al. 2007).

Entre as nove populações para as quais não foram identificados homozigotos para a mutação 1016Ile no AaNa_v, os ensaios bioquímicos detectaram alteração de pelo menos duas enzimas relacionadas com a resistência metabólica, para cada população. Em particular, a enzima GST, de acordo com o critério utilizado, estava significativamente alterada em todos os casos avaliados, com exceção das populações A e D. Na população A, em contrapartida, detectamos forte alteração de atividade de “*pNPA-EST*”, além de alteração de MFO; na população D, encontramos grande alteração da MFO. Ainda nestas populações, e em praticamente todas as outras, encontramos alterações nas enzimas “ α -EST” e/ou “ β -EST”, que acreditamos serem reflexo

de resistência a OP. A alteração da atividade total de Acetilcolinesterase, alvo de OP, em adultos de duas populações (D e H) também pode indicar resistência a esta classe de inseticidas. É importante frisar que esta é a primeira vez que alterações de atividade da enzima Ace, visualizadas por meio da análise de atividade total (AChE), são detectadas em populações brasileiras de *A. aegypti*.

Das 15 populações analisadas, 13 apresentaram atividade de GST alterada no estágio adulto. Destas, oito apresentaram também alteração de “ ρ NPA-EST”. Com relação a estes dois grupos de enzimas, com exceção da população A, nenhuma das populações aqui analisadas apresentou alteração na atividade de “ ρ NPA-EST” isoladamente, ao contrário de GST, cuja alteração de atividade não foi acompanhada por “ ρ NPA-EST” em cinco populações. Além disso, 12 das populações analisadas apresentaram alteração na atividade de “ α -EST” e/ou “ β -EST”.

Não foi possível visualizar, em tentativas preliminares, nenhuma correlação entre as RR para PI e alterações de atividade de classes individuais de enzimas nos adultos.

4.4.2. Avaliação de larvas

Estas análises foram feitas com sete populações, como mostra a tabela 4.4.2 que inclui ainda as razões de resistência de larvas frente ao OP temephos.

Tabela 4.4.2: quantificação da resistência a OP e avaliação dos mecanismos envolvidos em larvas de populações naturais de *A. aegypti* do Brasil.

Parâmetro			Rock	A	B	C	E	G	I	O
Ensaio Biológicos	OP larvas	RR50	1,0	7,6	7,5	8,9	10,6	7,6	11,7	9,8
		RR95	1,0	12,7	8,7	16,3	17,2	14,9	11,8	22,8
		RR99	1,0	15,9	9,3	21,0	21,1	19,7	11,8	32,4
Ensaio Bioquímicos com larvas	% acima do perc 99 de Rockefeller larva	AChE (Abs/h/mg ptn)		46	79	3	75	6	6	74
		AChI (% ativ. remanescente)		0	0	0	0	0	12	1
		MFO (nmoles cit/mg ptn)		0	19	2	14	16	4	26
		" α -EST" (nmol/mgptn/min)		90	37	68	58	26	15	85
		" β -EST" (nmol/mgptn/min)		89	40	80	70	41	22	84
		" ρ NPA-EST" (D Abs/min/mg ptn)		69	16	43	6	1	6	19
		GST (nmol/mg ptn)		16	18	9	14	13	15	11

Resultados de bioensaios feitos com o OP temephos, e de ensaios bioquímicos (ver seções 3.3 e 3.5.5 para definição dos critérios de classificação).

De maneira geral, foi observado que as alterações de atividade obtidas pelos ensaios bioquímicos parecem contribuir para as altas razões de resistência a OP encontradas nos bioensaios, através principalmente de alteração das enzimas “ α -EST” e “ β -EST”, enzimas detoxificadoras previamente relacionadas com resistência a OP (Hemingway e Ranson 2000, Montella et al. 2007, Molina e Figueiroa 2009, Miyo e Oguma 2010), pois todas as populações apresentaram alteração significativa de atividade destas enzimas. Além destas, alterações de cada uma das enzimas MFO, “ p NPA-EST” ou GST também foram detectadas, em três, quatro e três populações, respectivamente. Em especial, observamos forte alteração na atividade total da enzima Acetilcolinesterase, alvo de OP, em quatro das sete populações avaliadas.

Também para larvas não foi possível obter, em tentativas preliminares, correlação entre as RR para OP e os níveis de alteração de atividade de classes individuais de enzimas. Neste caso, coincidentemente, verificamos que as populações que mostraram maiores RR_{95} para OP foram aquelas com menores alterações de atividade de GST, o que enfraquece argumento de participação destas enzimas na resistência a OP.

4.4.3. Comparação dos resultados obtidos com larvas e adultos

Para sete populações foi possível realizar ensaios bioquímicos com larvas e adultos (Tabela 4.4.3); com exceção da população O, não foram detectados indivíduos homocigotos para a mutação Val1016Ile no AaN_v (comparar com Tabela 4.4.1).

Tabela 4.4.3: quantificação da resistência e comparação dos mecanismos envolvidos em larvas e adultos, por meio de ensaios bioquímicos, de populações naturais de *A. aegypti*.

Parâmetro		A	B	C	E	G	I	O
Ensaio biológico	OP larvas RR ₉₅	12,7	8,7	16,3	17,2	14,9	11,8	22,8
	PI adultos RR ₉₅	8,5	11,3	14,2	R	12,9	7,6	51,3
Comparação ensaios bioquímicos	larvas AChE	46	79	3	75	6	6	74
	adultos AChE	0	0	0	1	0	3	0
	larvas AChI	0	0	0	0	0	12	1
	adultos AChI	0	3	0	11	0	3	3
	larvas MFO	0	19	2	14	16	4	26
	adultos MFO	17	5	4	9	19	2	26
	larvas "α-EST"	90	37	68	58	26	15	85
	adultos "α-EST"	68	65	71	44	45	23	46
	larvas "β- EST"	89	40	80	70	41	22	84
	adultos "β- EST"	47	55	25	32	8	12	12
	larvas "ρ NPA-EST"	69	16	43	6	1	6	19
	adultos "ρ NPA-EST"	59	45	52	9	8	18	20
	larvas GST	16	18	9	14	13	15	11
	adultos GST	14	23	21	80	49	74	60

Ver seção 3.5.5 para definição do critério de classificação adotado para os resultados dos ensaios bioquímicos.

Em nenhum caso foi observada alteração de atividade remanescente de Acetilcolinesterase, após adição do CB inibidor (ensaio "AChI"). Entre as populações apresentadas na Tabela 4.4.3, alterações de atividade total de Ace ocorreram apenas no estágio larvar, ao passo que as alterações da enzima GST ocorreram com muito maior intensidade no estágio adulto. As outras enzimas avaliadas parecem sofrer variações em maior ou menor grau, entre os dois estágios.

Como mencionado nos itens anteriores, avaliações preliminares não permitiram estabelecer relação entre RR e os níveis de alteração de nenhuma classe individual de enzimas. Da mesma forma, não foi possível observar qualquer padrão, avaliando as sete populações, entre os dados de larvas e adultos, o que aponta para soluções locais, com relação ao manejo da resistência observada.

Uma observação interessante refere-se à Ace. Verificamos anteriormente que a atividade total desta enzima é maior em adultos que em

larvas (capítulo 4.2). Este resultado foi confirmado por comparação das medianas das atividades específicas das sete populações aqui avaliadas entre os dois estágios (dados não mostrados). Apesar disto, nestas populações, somente em larvas do vetor foram encontradas alterações significativas de atividade (ensaio “AChE”) em relação à cepa susceptível (Tabela 4.4.3).

Um de nossos objetivos originais era elucidar a participação de cada classe de enzimas na resistência, por meio da correlação entre susceptibilidade/ resistência ao inseticida e atividade enzimática nas populações naturais. Para tanto, procedemos às análises de correlação (Spearman) entre as razões de resistência obtidas nos bioensaios e as medianas das atividades enzimáticas ou os percentuais acima do p99 de Rockefeller, de cada população, para tentar inferir a relação entre estas variáveis. Nas análises, feitas com auxílio do programa GraphPadPrism 4.0, foram usadas somente as sete populações mostradas na Tabela 4.4.3, para as quais dispúnhamos dos resultados bioquímicos em larvas e adultos. Também aqui não verificamos correlação significativa entre RR e atividade de classes específicas de enzimas. Admite-se que deva existir uma série de particularidades que dificultem este tipo de análise, e que talvez seja necessário olhar as populações caso a caso.

Ainda que correlações diretas não tenham sido alcançadas, de uma maneira geral, as alterações enzimáticas mostradas pelos ensaios bioquímicos parecem contribuir para as altas RR obtidas nos bioensaios. Nesse sentido, a Figura 4.4.1 apresenta, em ordem decrescente de resistência a PI (RR₉₉), as sete populações da tabela anterior, assim como a classificação do aumento de atividade de enzimas previamente relacionadas com a resistência a PI. Vale lembrar que destas, apenas a população “O” apresenta homozigotos AaNa_v 1016Ile/Ile. Em todos os casos, com exceção da população “E”, para a qual apenas dados qualitativos de resistência a PI estão disponíveis, pelo menos duas classes enzimáticas estão alteradas.

RR ₉₉ PI	população	alterações de atividade		
		GST	" ρ NPA-EST"	MFO
60,2	O	Amarelo	Amarelo	Amarelo
17,1	C	Amarelo	Vermelho	Amarelo
15,5	G	Amarelo	Amarelo	Amarelo
13,6	B	Amarelo	Amarelo	Amarelo
9,2	A	Amarelo	Vermelho	Amarelo
8,6	I	Vermelho	Amarelo	Amarelo
R (DD)	E	Vermelho	Amarelo	Amarelo

Figura 4.4.1: comparação entre as RR a PI de adultos de sete populações de *A. aegypti*, apresentadas em ordem decrescente de resistência, e alteração de atividade de GST, " ρ NPA-EST", e MFO. Estas enzimas foram previamente relacionadas à resistência a PI. No caso da população E, apenas ensaios com a dose diagnóstica (DD), que a classificaram como resistente (R), estavam disponíveis. Alterações de atividade foram classificadas de acordo com o critério Laficave (ver seção 3.1.5). Em vermelho estão as atividades enzimáticas consideradas muito alteradas e, em amarelo, as alteradas.

De maneira similar, a Figura 4.4.2 apresenta, agora para larvas, as populações em ordem decrescente de resistência a OP e a classificação do aumento de atividade de enzimas previamente descritas como tendo relação com a resistência a OP. Como verificado para adultos, em larvas a atividade de pelo menos duas classes enzimáticas estava alterada nas populações resistentes a OP. Em especial, verificou-se maior atividade das " α -EST" e " β -EST" em praticamente todas as populações avaliadas, com tendência de relação entre maior alteração destas enzimas e maior RR.

RR ₉₉ OP	população	alterações de atividade			
		" α -EST"	" β -EST"	MFO	AChE
32,4	O	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Vermelho
21,1	E	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Vermelho
21,0	C	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Amarelo
19,7	G	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
15,9	A	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Amarelo
11,8	I	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo
9,3	B	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Vermelho

Figura 4.4.2: comparação entre as RR a OP de larvas de sete populações de *A. aegypti*, apresentadas em ordem decrescente de resistência, e alteração de atividade de " α -EST", " β -EST", MFO, e AChE. Todas estas enzimas foram previamente relacionadas à resistência a OP. Alterações de atividade foram classificadas de acordo com o critério Laficave (ver seção 3.1.5). Em vermelho estão as atividades enzimáticas consideradas muito alteradas e, em amarelo, as alteradas.

É importante observar que estes esquemas buscaram relações entre grupos de enzimas previamente reportados como tendo papel importante na

manifestação da resistência a PI ou a OP, em vários organismos. Procurou-se, com isto, simplificar os resultados apresentados nas Tabelas 4.4.1, 4.4.2 e 4.4.3. Admite-se, no entanto, que estes esquemas possam criar um viés de interpretação ao deixar de contemplar as outras alterações observadas e sua possível relação com a resistência a PI e OP.

4.4.4. Populações naturais de *A. aegypti*: mecanismos de resistência

As 15 populações avaliadas em 2009 e 2010 apresentaram resistência aos inseticidas OP e PI, de acordo com os bioensaios. Ensaios moleculares, para detecção de alteração no alvo de PI, o AaNa_v, e ensaios bioquímicos, foram feitos com adultos de todas as populações. Para sete populações também foram feitos ensaios bioquímicos para avaliação dos mecanismos de resistência em larvas.

Com relação à Ace, alvo de OP, embora a atividade específica desta enzima seja maior no estágio adulto, as maiores alterações relativas a Rockefeller foram detectadas em larvas (Figura 4.3.2 e Tabelas 4.4.1 – 4.4.3), o que mostra que a expressão desta enzima pode ser modulada ao longo do desenvolvimento ou em função da população. Esta alteração na atividade total da enzima Ace (AChE), nunca antes relatada em populações brasileiras do vetor, é um fato que deve ser considerado na escolha dos larvicidas usados no país, visto que o OP temephos ainda é utilizado como larvicida em vários municípios (MS-SVS 2009b). Em adição, recentemente, nas localidades onde foi detectada resistência a PI, o PNCD recomendou, no combate às formas adultas do mosquito *A. aegypti*, o uso dos inseticidas OP malathion e fenitrothion, que têm como alvo a enzima Ace (MS-SVS 2009b, d). Admite-se que não temos compostos disponíveis, além de PI e OP, para aplicação como adulticidas. Contudo, recomendamos a descontinuação do uso do OP temephos como inseticida de primeira escolha no combate às larvas de *A. aegypti* no país, além da continuação de sua troca por IGRs, que são compostos para os quais ainda não se detectou resistência.

Por outro lado, a análise de inibição da atividade de Ace (AChI) não evidenciou qualquer alteração das populações em relação ao controle suscetível. Vale lembrar que havíamos suspeitado da adequação das concentrações do inibidor CB empregadas no ensaio AChI. Fizemos curvas do

tipo dose-resposta para larvas e adultos (item 4.2.2) e mudamos as concentrações de inibidor nos ensaios aqui apresentados (item 4.2.3). No entanto, a definição da concentração do inibidor nos ensaios de rotina deve considerar que provavelmente o racional da metodologia original foi que mutações da enzima que restringissem sua afinidade pelo CB (Weill et al. 2004, Cassanelli et al. 2006, Mori et al. 2007) seriam rapidamente detectadas com altas doses de propoxur.

O conjunto de nossos resultados, AChE e AChI, fornecem indícios de um potencial aumento quantitativo (e não qualitativo) de Ace nas populações avaliadas. Entretanto, para confirmar esta hipótese, seria interessante o estudo da expressão dos genes *ace* do *A. aegypti*.

Encontramos, em larvas e adultos das populações avaliadas, alteração na quantificação das MFO, o que não havia sido identificado anteriormente no contexto do monitoramento dos mecanismos de resistência das populações brasileiras do vetor da dengue, com a metodologia atual (Montella et al. 2007). Vale mencionar que havíamos detectado uma população com alteração nesta classe de enzimas anteriormente (Braga et al. 2005), quando o critério ainda era a comparação visual de perfis de atividade das populações. Desde então, alteração na quantificação desse grupo de enzimas foi vista somente nas populações coletadas em 2009 e 2010, mostradas neste capítulo. Este fato foi particularmente preocupante, visto que esta superfamília de proteínas catalisa numerosas reações oxidativas, com pouca especificidade por substrato (Bergé et al. 1998, Hemingway e Ranson 2000, Li et al. 2007). Em função disto, estão virtualmente envolvidas com a metabolização de todas as classes de inseticidas, o que pode limitar ainda mais o número de compostos inseticidas disponível para o controle de *A. aegypti* no Brasil.

Com exceção de adultos da população R, encontramos alteração em mais de uma atividade enzimática da “resistência metabólica” em todas as populações. Todas as sete populações analisadas nos dois estágios apresentaram alteração de “ α -EST” e “ β -EST” no estágio larvar, ao passo que as alterações de GST foram mais exacerbadas no estágio adulto.

Vários grupos sugerem que GSTs desempenhem papel importante na resistência a PI em *A. aegypti* (Li et al. 2007, Montella et al. 2007, Marcombe et al. 2009). Nossos resultados com adultos corroboram estas

evidências. Por outro lado, não encontramos associação aparente desta família de enzimas com resistência a OP.

Em trabalho anterior do nosso grupo, de análise de populações coletadas em três biênios consecutivos, foi sugerido, de maneira geral, que a dinâmica de atividade dos mecanismos de resistência refletia o histórico de uso de inseticidas no controle do vetor, no Brasil (Montella et al. 2007). Observou-se ligeira diminuição das atividades “ α -EST” e “ β -EST” ao longo dos biênios, e foi proposta relação destas enzimas com resistência a OP nas populações brasileiras de *A. aegypti* (Macoris et al. 2003, Montella et al. 2007), uma vez que em 2001 teve início a substituição desta classe de inseticidas para o controle de larvas, em municípios resistentes. Além disto, observamos progressivo aumento de atividade para GST e “ ρ NPA-EST” após a introdução de inseticidas PI no controle do estágio adulto do vetor (Montella et al. 2007). Comparação com os resultados aqui mostrados sugere que, enquanto a dinâmica de “ ρ NPA-EST” não é facilmente interpretada, as alterações de GST parecem manter tendência de aumento. Por outro lado, a queda nas atividades “ α -EST” e “ β -EST” não se consolidou. Há relatos de importante papel de “ α -EST” na detoxificação de PI, em diferentes populações de *A. aegypti* do México e da Tailândia (Flores et al. 2006, Pethuan et al. 2007), o que poderia também estar ocorrendo com as populações do Brasil. Contudo, verificamos que as razões de resistência para temephos, no caso das populações para as quais dispúnhamos de avaliações anteriores, também não parecem ter diminuído, o que pode justificar a persistência das alterações de “ α -EST” e “ β -EST”- e é consistente com o fato de que vários municípios ainda não substituíram temephos por outro larvicida (MS-SVS 2009b).

Apesar destas tentativas de correlação, até agora a quantidade de populações investigadas nos dois estágios foi pequena. Por isso, pretendemos proceder aos ensaios em mais populações naturais do vetor, de forma a tentar confirmar as relações aqui levantadas, ou evidenciar novas. Por outro lado, no contexto do monitoramento da resistência, é necessário ter foco em cada população, acompanhando as alterações ao longo do tempo e procurando, de forma localizada, relação entre as resistências encontradas e seus mecanismos.

Curiosamente, nossas observações apontaram ainda que, dentre as populações que apresentaram indivíduos homocigotos para a mutação Val1016Ile no *AaNa_V*, todas, sem exceção, apresentaram a atividade de enzimas GST classificadas como muito alteradas. Uma possível explicação seria a de que estas duas características poderiam estar, ao menos em parte no caso dos genes GST, localizadas dentro de um mesmo grupo de ligação, em um mesmo cromossomo. Sabe-se que, em *A. gambiae*, o gene *Na_V* está localizado no cromossomo 2 (Ranson et al. 2004), enquanto um *cluster* de genes de GST da classe Epsilon, previamente descrita como capaz de metabolizar inseticidas, localiza-se no cromossomo 3 (Ranson et al. 2001). Em *A. aegypti*, no entanto, o gene *Na_V* está também localizado no cromossomo 3 (Severson et al. 1997), o que, em teoria, tornaria esta hipótese viável. Resta verificar se o cromossomo 3 desta espécie tem *clusters* de GST.

A análise de nossos dados sob diferentes perspectivas mostrou que não existe, nas populações avaliadas neste trabalho, uma regra geral que relacione resistência a uma classe de inseticidas à alteração de uma família específica de enzimas. Apesar disto, os dados indicam que alteração na atividade de GST concorre para a resistência a PI nos adultos, ao passo que alterações nas atividades de “ α -EST”, “ β -EST” e/ou Ace, parecem contribuir para a resistência de larvas a OP. No entanto, não temos ainda elementos para apontar o grau de contribuição de cada uma dessas alterações para o fenótipo da resistência. Nossos dados revelaram que a resistência a PI e OP, nas populações naturais de *Aedes aegypti* avaliadas, se mostra complexa, resultando da combinação de vários mecanismos. Para compreender este quadro, tem ficado evidente a necessidade de análises que contemplem vários fatores simultaneamente; que permitam trabalhar de forma mais precisa com a relação entre a resistência a inseticidas e seus mecanismos metabólicos.

Além destas dificuldades metodológicas, há ainda uma série de fatores, sobre os quais não temos controle, que podem influenciar os mecanismos de resistência nas populações brasileiras: o potencial uso de inseticidas distintos em cada município no contexto de programas de controle de outros vetores; a qualidade dos compostos aplicados, e das aplicações; o impacto do uso doméstico de inseticidas; dentre outros. Estas particularidades, aliadas ao fato de a resistência a OP e PI e dos mecanismos de resistência

serem frequentemente muito focais (Ranson et al. 2010), apontam para a necessidade de olhar as populações caso a caso.

5. DISCUSSÃO

O manejo da resistência a inseticidas requer a aplicação de técnicas rápidas, capazes de detectá-la em seus estágios iniciais nas populações de vetores (Brown e Brogdon 1987). Os bioensaios, que detectam e quantificam a resistência, são metodologias importantes para os programas de controle e de monitoramento da resistência de vetores. Mudanças no perfil de suscetibilidade das populações de campo avaliadas podem implicar na troca do inseticida utilizado em campo (Braga e Valle 2007c, MS-SVS 2009a, b, c, d). O estudo dos mecanismos que geram resistência a inseticidas também tem importância porque alteração de um mesmo mecanismo pode ocasionar resistência a inseticidas de classes diferentes e, sendo assim, este estudo poderia indicar meios mais sustentáveis e racionais de troca de inseticidas no campo.

Na rotina do monitoramento da resistência de *A. aegypti* a inseticidas, no escopo da Rede MoReNAa, o Laficave identifica e quantifica, por meio de bioensaios, a resistência aos inseticidas OP (Lima et al. 2003, Braga et al. 2004, Montella et al. 2007) e PI (Pereira-da-Cunha et al. 2005, Montella et al. 2007) nas populações do vetor avaliadas. Também adaptamos, a partir de ensaios recomendados pela OMS e pelo CDC, metodologia que permite avaliação sistemática de todas as principais enzimas envolvidas com a resistência metabólica e da Acetilcolinesterase (Ace), sítio-alvo dos inseticidas OP e CB, em espécimes adultos do *A. aegypti* (Valle et al. 2006). Resultados desses ensaios auxiliam a subsidiar as ações de manejo de inseticidas no campo. Mais recentemente, foi incluída nas metodologias da Rede MoReNAa a avaliação de alteração no canal de sódio regulado por voltagem, alvo dos inseticidas PI (Saavedra-Rodriguez et al. 2007, Martins et al. 2009).

No presente trabalho, foi adaptada uma metodologia que permitiu a avaliação de enzimas relacionadas com a resistência metabólica e da Acetilcolinesterase (Ace) – alvo de OP, em larvas do vetor (capítulo 4.1). Com isso, conseguimos comparar resultados de ensaios biológicos para OP e de ensaios bioquímicos, ambos feitos com larvas, além de compararmos os resultados de bioensaios para PI, feitos com mosquitos adultos, e de ensaios

bioquímicos também aplicados sobre esta fase evolutiva do vetor (capítulo 4.4). Este estudo revelou alterações de determinados mecanismos de resistência que foram mais restritas ao estágio larvar (AChE), e outras, mais intensas no estágio adulto (GST) das populações de *A. aegypti* analisadas. No entanto, não foi observada relação diagnóstica entre a resistência a um determinado composto e a alteração de um mecanismo de resistência apenas, o que confirmou o caráter multifatorial da resistência a OP e a PI nas populações brasileiras do vetor analisadas, com diferentes mecanismos contribuindo, em conjunto, para a manifestação da resistência.

Realização dos ensaios bioquímicos ao longo do desenvolvimento da cepa suscetível Rockefeller e de duas populações naturais de *A. aegypti*, ambas resistentes a OP e PI (capítulo 4.3), revelou quatro diferentes padrões para as enzimas avaliadas: atividades que são superiores no estágio adulto (atividade total da Ace); atividades maiores no estágio larvar (Esterases “ α -EST” e “ β -EST”); atividades que aumentam no decorrer de cada estágio avaliado (MFO) e atividades que tendem a aumentar ao longo do estágio larvar e a diminuir nos primeiros dias de vida adulta (Esterase “ ρ NPA-EST” e GST). Nestes ensaios também foi confirmado o dado sugerido por Montella et al., em 2007, de que as enzimas quantificadas no ensaio “ ρ NPA-EST” são diferentes das enzimas quantificadas nos ensaios “ α -EST” e “ β -EST” – o que contradiz a afirmativa da OMS de que o substrato acetato de ρ -nitrofenil, usado no ensaio “ ρ NPA-EST” seria mais generalista e capaz de abranger as enzimas mensuradas nos ensaios “ α -EST” e “ β -EST” (Hemingway 1998).

Além disso, observou-se que a enzima Acetilcolinesterase é mais inibida em larvas que em adultos, para uma dada concentração de carbamato (capítulo 4.2), reflexo da maior atividade enzimática no estágio adulto. Verificamos ainda, nas análises ao longo do desenvolvimento e das populações naturais do vetor (capítulos 4.3 e 4.4), que alterações na atividade total da Acetilcolinesterase das populações de campo (em relação à cepa suscetível) no estágio larvar, não se propagam para o estágio adulto. Por outro lado, não foi detectada nenhuma alteração de inibição da Ace (AChI), até então a única análise empregada na rotina de avaliação, baseada na técnica descrita por Ellman, em 1961. Por isso, reiteramos sugestão de incluir análise de atividade total da Ace (análise AChE) na rotina da Rede MoReNAa.

A adaptação dos ensaios bioquímicos para larvas, aqui apresentada, foi importante pois permitiu um maior detalhamento do perfil das populações de campo avaliadas e, em especial, possibilitou a comparação direta com os bioensaios realizados nesta etapa do desenvolvimento. Ao iniciarmos a adaptação do protocolo, encontramos muita dificuldade para tornar viável a avaliação de todas as enzimas em cada espécime individual. A solução encontrada foi a de procedermos a um ensaio que quantificasse todas as enzimas avaliadas nos adultos, porém sem duplicatas. Decidimos fazer o ensaio com larvas em duas etapas, uma diagnóstica, sem duplicatas, e a outra que promoveria um detalhamento das alterações detectadas na primeira, contemplando apenas as enzimas alteradas, com duplicatas. A segunda etapa depende dos resultados da primeira, e pode envolver a avaliação de grupos distintos de enzimas em cada população - justamente porque, de acordo com nossa experiência, é comum que populações diferentes do vetor encontrem soluções diferentes para resistir aos inseticidas que lhes são aplicados. Além disto, foram observados, no caso de algumas enzimas, perfis diferenciados para larvas e adultos de uma mesma população, o que pode resultar em ações diferentes para o manejo local da resistência das mesmas. Vale ainda ressaltar que há perspectiva de incorporar esta nova ferramenta na rotina do monitoramento, no contexto dos outros laboratórios da Rede MoReNAa.

No caso do ensaio com a enzima Ace, avaliou-se a concentração de inibidor usada. A concentração, indicada no manual da OMS, de 200 μM (final) de propoxur, adotada por inibir **pelo menos 70%** da atividade total da Ace nos mosquitos susceptíveis (Hemingway 1998), parece ter sido escolhida, de maneira arbitrária, a partir de curvas feitas com mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Culex*, nos estudos referenciados por este manual (Raymond et al. 1985, Hemingway e Smith 1986, Brogdon e Barber 1987, Brown e Brogdon 1987, Brogdon et al. 1988, Moores et al. 1988, French-Constant e Bonning 1989). Nas curvas mostradas nestes trabalhos, a concentração sugerida permitia uma distinção bastante clara entre os indivíduos que apresentavam alteração na sensibilidade da Ace e os que não apresentavam. Nesse contexto, as curvas mostradas no capítulo 4.2 revelaram perfis de inibição das populações de campo, resistentes a temephos, similares ao da cepa Rockefeller; estas curvas também mostraram padrão de inibição distinto entre

larvas e adultos, com maior inibição da Ace de larvas. É importante também ressaltar que, apesar de ausência de alteração no perfil de inibição por CB em todas as populações avaliadas, identificamos, em algumas populações do vetor resistentes a OP, alterações na atividade total de Ace, o que não tem sido avaliado em populações de *A. aegypti* até então.

Dentre as 15 populações de campo avaliadas por ensaios biológicos, bioquímicos e moleculares no capítulo 4.4, todas foram consideradas resistentes a OP e PI. Destas, seis apresentaram indivíduos homozigotos para a mutação Val1016Ile no AaNa_V, relacionada com resistência a PI (Martins et al. 2009). Ensaio bioquímico foram realizados com adultos das 15 populações, e com espécimes larvares de sete. De maneira geral, os resultados dos ensaios bioquímicos revelaram alterações de Ace e Esterases preferencialmente no estágio larvar, alterações de GST mais restritas ao estágio adulto, e alteração de MFO nos dois estágios do vetor avaliados. Nossos resultados corroboram a natureza multifatorial da resistência a PI e OP, nas populações naturais brasileiras de *Aedes aegypti*. Além disto, dependendo da população considerada, distintas combinações de mecanismos parecem contribuir para a resistência.

6. CONCLUSÕES

- Adaptamos, para larvas, metodologia de quantificação, em *A. aegypti* adultos, da atividade de enzimas relacionadas com a resistência metabólica e com Ace, alvo de OP e CB. Esta metodologia permite avaliar rapidamente, com espécimes individuais, o perfil dos mecanismos de resistência em populações do vetor.
- Foi demonstrada a existência de um perfil de inibição, por CB, diferenciado para a Ace de larvas e de adultos, sendo larvas mais inibidas que adultos. Em consonância, verificou-se que a atividade total de Ace em larvas é menor que em adultos.
- Em função deste perfil diferenciado de inibição, passamos a adotar, para os ensaios bioquímicos com larvas e adultos, concentrações de 75 uM e 150 uM (final) do CB propoxur, respectivamente, ao invés da concentração de 200 uM sugerida pela OMS.
- A análise, em 15 populações de campo, da atividade total de Ace, proposta nesta dissertação, revelou alteração em adultos de duas populações, e em larvas de quatro populações. Por outro lado, análise de inibição da Ace com o CB propoxur, das mesmas populações, não mostrou alteração alguma de susceptibilidade da enzima ao inseticida.
- Quantificamos as enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas, ao longo do ciclo de vida do *A. aegypti*, e observamos quatro perfis distintos:
 - maior atividade no estágio adulto - AChE;
 - maior atividade no estágio larvar - Esterases “ α -EST” e “ β -EST”;
 - atividade que aumenta no decorrer de cada estágio avaliado - MFO;
 - atividade que tende a aumentar no estágio larvar e a diminuir nos primeiros dias de vida adulta - Esterase “ ρ NPA” e GST.
- Os perfis de atividade enzimática das Esterases “ α -EST” e “ β -EST”, ao longo do desenvolvimento da cepa susceptível e das duas populações avaliadas, foram completamente diferentes do perfil de Esterase “ ρ NPA”, o que contradiz recomendação da OMS, de uso deste substrato para detecção de Esterases genéricas, a serem posteriormente detalhadas com os substratos “ α -EST” e “ β -EST”.

- As duas populações de campo analisadas ao longo de seu ciclo de vida, apresentaram AChE cerca de três a seis vezes maior que a cepa Rockefeller, apenas no estágio larvar. Curiosamente, esta grande diferença não se propagou para o estágio adulto.
- Nas populações de campo avaliadas, confirmamos o caráter multifatorial da resistência a OP e PI, com a contribuição de diferentes mecanismos.
- Não foi visualizada, em nossos ensaios, nenhuma associação “diagnóstica” entre a resistência a uma classe específica de inseticida e a alteração de uma determinada família de enzimas.
- Apesar disto, o conjunto dos dados aqui mostrados sugere que alterações de GST estejam concorrendo para a resistência a PI nos adultos, e que alterações de Esterases “ α -EST” e “ β -EST”, e de AChE, contribuam para a resistência a OP observada nas larvas das populações de *A. aegypti* avaliadas.

7. BIBLIOGRAFIAS

- Alout H, Djogbénu L, Berticat C, Chandre F, Weill M 2008. Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetylcholinesterase 1 biochemical properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, Part B* 150(3):271-7.
- Anand A, Crone EJ, Zera AJ 2008. Tissue and stage-specific juvenile hormone esterase (JHE) and epoxide hydrolase (JHEH) enzyme activities and Jhe transcript abundance in lines of the cricket *Gryllus assimilis* artificially selected for plasma JHE activity: implications for JHE microevolution. *J Insect Physiol* 54(9):1323-31.
- Anazawa Y, Tomita T, Aiki Y, Kozaki T, Kono Y 2003. Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Insect Biochem Mol Biol* 33(5):509-14.
- Andrighetti MTM, Cerone F, Rigueti M, Galvani KC e Macoris MLG 2008. Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. *Dengue Bull* 32:186-198.
- Anspaugh DD e Roe RM 2005. Regulation of JH epoxide hydrolase versus JH esterase activity in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, by juvenile hormone and xenobiotics. *J Insect Physiol* 51(5):523-35.
- Auletta JT, Johnson JL, Rosenberry TL 2010. Molecular basis of inhibition of substrate hydrolysis by a ligand bound to the peripheral site of acetylcholinesterase. *Chem Biol Interact* 187(1-3):135-41.
- Bai H, Ramaseshadri P, Palli SR 2007. Identification and characterization of juvenile hormone esterase gene from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 37 (8): 829-37.
- Balasubramanian AS e Bhanumathy CD 1993. Noncholinergic functions of acetylcholinesterase. *The FASEB journal* 7(14):1354-8.
- Bartolucci C, Haller LA, Jordis U, Fels G, Lamba D 2010. Probing *Torpedo californica* Acetylcholinesterase Catalytic Gorge with Two Novel Bis-functional Galanthamine Derivatives. *J Med Chem* 53:745–751.
- Beaty BJ e Maquardt WC 1996. *The biology of disease vectors*. Colorado: University Press of Colorado. xv + 632p.
- Belinato TA 2007. efeito de triflumuron – um inibidor da síntese de quitina – sobre o desenvolvimento e a reprodução de culicídeos vetores de doenças. Dissertação de mestrado. Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, 92 pp.
- Belinato TA, Martins AJ, Lima JBP, Lima-Camara TN, Peixoto AA e Valle D 2009. Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(1):43-47.
- Benting J, Nauen R 2004. Biochemical evidence that an S431F mutation in acetylcholinesterase-1 of *Aphis gossypii* mediates resistance to pirimicarb and omethoate. *Pest Manag Sci* 60(11):1051-5.

- Bergé JB, Feyereisen R e Amichot M 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353(1376):1701–5.
- Bisset J, Rodríguez MM, Fernández D 2006. Selection of insensitive acetylcholinesterase as a resistance mechanism in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Santiago de Cuba. *J Med Entomol* 43(6):1185-9.
- Bisset-Lazcano JA, Rodríguez MM, San Martín JL, Romero JE e Montoya R 2009. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Rev. Panam. Salud Pública* 26(3):229-234.
- Bloomquist JR 2009. Insecticides: Chemistries and Characteristics. Em “University of Minnesota's electronic textbook of Integrated Pest Management”. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>
- Braga IA, Gomes Ade C, Nelson M, Mello Rde C, Bergamaschi DP, de Souza JM 2000. Comparative study between larval surveys and ovitraps to monitor populations of *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop* 33(4):347-53.
- Braga IA, Lima JB, Soares S da S, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99 (2): 199-203.
- Braga IA, Mello CB, Peixoto AA e Valle D 2005a. Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) development in laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100(4):435-440.
- Braga IA, Mello CB, Reis I, Lima JBP, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Valle D 2005b. Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. *J Med Entomol* 42(5): 830-837.
- Braga IA, Valle D 2007a. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 16(2):113-118.
- Braga IA, Valle D 2007b. *Aedes aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. *Epidemiol. serv. saúde*; 16(4):295-302.
- Braga IA, Valle D 2007c. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol. serv. saúde*;16(4):295-302.
- Brogdon WG e Barber AM 1987. Microplate assay of acetylcholinesterase inhibition kinetics in single- mosquito homogenates. *Pestic Biochem Physiol* 29(3):252-259.
- Brogdon WG e McAllister JC 1998. Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases* 4(4):605-613.
- Brogdon WG, Beach RF, Stewart JM, Castanaza L 1988. Microplate assay analysis of the distribution of organophosphate and carbamate resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Bull World Health Organ* 66(3):339-46.
- Cassanelli S, Reyes M, Rault M, Carlo Manicardi G, Sauphanor B 2006. Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochem Mol Biol* 36(8):642-53.

- CDC 1998. Insecticide Resistance Workshop 1998. "Microplate assays of CDC", Centers for Disease Control, Atlanta, GAS.
- Cecchine, G., Golomb, B. A., Hilborne, L. H., Spektor, D. M. e Anthony, C. R. 2000. Pesticides. A review of the scientific literature as it pertains to Gulf War illnesses, Rand Corp Santa Monica CA. 8. Disponível em: http://www.gulflink.osd.mil/library/randrep/pesticides_paper/index.html
- Christophers SR 1960. *Aedes Aegypti* (L), The Yellow Fever Mosquito. Its life history, bionomics and structure. London and New York: Cambridge University Press, 739 p.
- Clements AN 1992. Metamorphosis. Em: The Biology of Mosquitoes: Vol. 1 – Development, nutrition and reproduction. London: Chapman & Hall, 509p.
- Consoli, R e Lourenço-de-Oliveira R 1994. Principais Mosquitos de Importância Sanitária No Brasil. 1. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ. Vol.1, 228 p.
- Costin D, Staicu A, Huculeci R, Stoian G, Costache M e Dinischiotu A 2007. Renal effects of deltamethrin induced intoxication in *Carassius auratus gibelio* (Pisces cyprinidae). *Biotechnol in Animal Husband* 23(5-6):399-404.
- Cuamba N, Morgan JC, Irving H, Steven A, Wondji CS 2010. High level of pyrethroid resistance in an *Anopheles funestus* population of the Chokwe District in Mozambique. *PLoS One* 5(6):e11010.
- D'Amato C, Torres JPM e Malm O 2002. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. *Química Nova* 25(6):995-1002.
- Daborn PJ, Lumb C, Boey A, Wong W, Ffrench-Constant RH, Batterham P 2007. Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect Biochem Mol Biol* 37(5):512-9.
- da-Fonseca RR, Johnson WE, O'Brien SJ, Vasconcelos V, Antunes A 2010. Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases. *BMC Evol Biol* 10:281.
- Dame DA, Wichterman GJ, Hornby JA 1998. Mosquito (*Aedes taeniorhynchus*) resistance to methoprene in an isolated habitat. *J Am Mosq Control Assoc* 14(2):200-3.
- David JP, Boyer S, Mesneau A, Ball A, Ranson H, Dauphin-Villemant C 2006. Involvement of cytochrome P450 monooxygenases in the response of mosquito larvae to dietary plant xenobiotics. *Insect Biochem Mol Biol* 36(5):410-20.
- Ding Y, Ortelli F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics* 4(1):35.
- Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL 2010. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chem Biol Interact* 187(1-3):10-22.

- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95.
- Enayati AA, Ranson H, Hemingway J 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol* 14(1):3-8. Review.
- Esu E, Lenhart A, Smith L, Horstick O 2010. Effectiveness of peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission; systematic review. *Trop Med Int Health* 15(5):619-31.
- FAO/OMS 1978. Temephos. Food and Agriculture Organization of the United Nations; Geneva, World Health Organization (Data Sheets on Pesticides, No. 8 Rev. 1; VBC/DS/75.8 (Rev.1). Disponível em: http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest8_e.htm).
- Ferreira AC, Chiaravalloti Neto F 2007. Infestation of an urban area by *Aedes aegypti* and relation with socioeconomic levels. *Rev. Saúde Pública* 41(6):915-922.
- Feyereisen R 1999. Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol* 44:507-533.
- Feyereisen R 2006. Evolution of insect P450. *Biochem Soc Trans* 34(6):1252-5.
- French-Constant RH, Bonning BC 1989. Rapid microtitre plate test distinguishes insecticide resistant acetylcholinesterase genotypes in the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *An. nigerrimus* and *Culex pipiens*. *Med Vet Entomol* 3(1):9-16.
- French-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A, Anthony N 1998. Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353(1376):1685-93. Review.
- Flores AE, Grajales JS, Salas IF, Garcia GP, Becerra MHL, Lozano S, Brogdon WG, Black IV WC e Beaty B 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 22:672-677.
- Forattini OP 1996. *Culicidologia médica*. Vol. 1. São Paulo: EDUSP, 546 p.
- Fournier D, Bride JM, Hoffmann F, Karch F. Acetylcholinesterase 1992. Two types of modifications confer resistance to insecticide. *J Biol Chem* 267(20):14270-4.
- Fournier D, Mutero A, Pralavorio M, Bride JM 1993. *Drosophila* acetylcholinesterase: mechanisms of resistance to organophosphates. *Chem Biol Interact* 87(1-3):233-8. Review.
- Frova C 2006. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol Eng* 23(4):149-69.
- Fukuto TR 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect* 87: 245-254.
- Garcia GP, Flores AE, Fernandez-Salas I, Saavedra-Rodriguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, Guillermo Bond J, Casas-Martinez M, Ramsey JM, Garcia-Rejon J, Domínguez-Galera M, Ranson H, Hemingway J, Eisen L, Black 4th WC 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 3:531.

- Georghiou GP 1994. Principles of insecticide resistance management. *Phytoprotection* 75(4):51-59.
- Ghanim M e Ishaaya I 2010. Insecticides with Novel Modes of Action: Mechanism and Resistance Management. Em Amiard-Triquet C, Rainbow PS e Romeo M. "Tolerance to Environmental Contaminants", 1^a Ed, CRC Press, Inglaterra, 464 p (2011).
- Glynn P 1999. Neuropathy target esterase. *Biochem J* 344:625-631.
- Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H 1999. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem* 264(3):672-86. Review.
- Gubler DJ 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 10(2):100-3.
- Gubler DJ, Clark GG 1995. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1(2):55-7.
- Haas R, Marshall TL, Rosenberry TL 1988. *Drosophila* acetylcholinesterase: demonstration of a glycoinositol phospholipid anchor and an endogenous proteolytic cleavage. *Biochemistry* 27(17):6453-7.
- Hall LM e Spierer P 1986. The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO J* 5(11):2949-2954.
- Harris AF, Rajatileka S e Ranson H. 2010. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg* 83(2):277–284
- Hartberg WK, Craig GB Jr 1970. Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitoes. II. Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. *Evol* 24: 692-703.
- Hayes JD, Flanagan JU e Jowsey IR 2005. Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51–88.
- Hemingway J 1998. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (Field and laboratory manual). WHO/CDC/CPC/MAL/98.6.
- Hemingway J 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 30(11):1009-15. Review.
- Hemingway J e Georghiou GP 1984. Baseline esterase levels for Anopheline and Culicine mosquitoes. *Mosq News* 44:33-5.
- Hemingway J, Hawkes N, Prapanthadara L, Jayawardenal KG, Ranson H 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353(1376):1695-9.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34:653-665.

- Hemingway J, Karunaratne SH 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12(1):1-12. Review.
- Hemingway J, Ranson H 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 45: 371-91.
- Hemingway J, Smith C, Jayawardena KGI e Herath PRJ 1986. Field and laboratory detection of the altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res* 76:559-565.
- Hollingworth RM 1969. Dealkylation of Organophosphorus Esters by Mouse Liver Enzymes in Vitro and in Vivo. *J Agric Food Chem* 17(5):987-996.
- Huchard E, Martinez M, Alout H, Douzery EJ, Lutfalla G, Berthomieu A, Berticat C, Raymond M, Weill M 2006. Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proc Biol Sci* 273(1601):2595-604.
- Hunaiti AA, Elbetieha AM, Obeidat MA, Owais WM 1995. Developmental studies on *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase and its induction by oxadiazolone. *Insect Biochem Mol Biol* 25(10):1115-9.
- Ibáñez-Bernal S, Briseño B, Mutebi JP, Argot E, Rodríguez G, Martínez-Campos C, Paz R, Román PDLFS, Tapia-Conyer R e Flisser A 1997. First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology* 11: 305–309.
- Iga e Sakurai 2009. Genomic and non genomic actions of 20-hydroxyecdysone in programmed cell death. No livro *Ecdysone: structures and functions*. Editado por Guy Smagghe. Capturado em: http://books.google.com.br/books?id=EUmShHTfIH0C&pg=PA411&lpg=PA411&dq=ecdysone+act+nuclei&source=bl&ots=Cd6ZlGdi5Z&sig=fnjI9-QHzr5boHdYf7QZsjWbl78&hl=pt-BR&ei=Q7GITeLfHOMN0QGokdXxDQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3&ved=0CC4Q6AEwAg#v=onepage&q&f=false
- Iga M, Smagghe G 2010. Identification and expression profile of Halloween genes involved in ecdysteroid biosynthesis in *Spodoptera littoralis*. *Peptides* 31(3):456-67.
- Jiang H, Liu S, Zhao P, Pope C 2009b. Recombinant expression and biochemical characterization of the catalytic domain of acetylcholinesterase-1 from the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* 39(9):646-53.
- Jiang X, Qu M, Denholm I, Fang J, Jiang W, Han Z 2009a. Mutation in acetylcholinesterase1 associated with triazophos resistance in rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochem Biophys Res Commun* 378 (2): 269-72.
- Kadri AB 1975. Cross-resistance to an insect juvenile hormone analogue in a species of the *Anopheles gambiae* complex resistant to insecticides. *J Med Entomol* 12(1):10-2.

- Kakani EG, Bon S, Massoulié J, Mathiopoulos KD 2011. Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 41(3):150-8.
- Kasai S, Komagata O, Okamura Y e Tomita T 2009. Alternative splicing and developmental regulation of glutathione transferases in *Culex quinquefasciatus* Say. *Pest Biochem Physiol* 94(1):21-9.
- Kawada H, Higa Y, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Nguyen Thi Yen, Luu Lee Loan, Rodrigo A. P. Sánchez, Masahiro Takagi 2009. Widespread Distribution of a Newly Found Point Mutation in Voltage-Gated Sodium Channel in Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* Populations in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis* 3(10):527.
- Ketterman AJ, Jayawardena KG, Hemingway J 1992. Purification and characterization of a carboxylesterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem J* 287(2):355-60.
- Koolman J e Roehm KH, 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. 2ª edição, Thieme, Stuttgart, New York.
- Kostaropoulos I, Papadopoulos AI, Metaxakis A, Boukouvala E, Papadopoulou-Mourkidou E 2001. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem Mol Biol* 31(4-5):313-9.
- Labbé P, Berthomieu A, Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T, Weill M 2007b. Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol* 24 (4): 1056-67.
- Labbé P, Berticat C, Berthomieu A, Unal S, Bernard C, Weill M, Lenormand T 2007a. Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*. *PLoS Genet* 3(11):e205.
- Lenormand T, Bourguet D, Guillemaud T, Raymond M 1999. Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Nature* 400(6747):861-4.
- Lenormand T, Raymond M 2000. Analysis of clines with variable selection and variable migration. *Am Nat* 155(1):70-82.
- Li B, Wang YH, Liu HT, Xu YX, Wei ZG, Chen YH e Shen WD 2010. Genotyping of acetylcholinesterase in insects. *Pest Biochem Physiol* 98(1):19–25.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52:231-53. Review.
- Lima JB, Da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AK, Soares Sda S, Braga IA, Ramos RP, Valle D 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68 (3): 329-33.
- Lima-Catelani AR, Ceron CR, Bicudo HE 2004. Variation of genetic expression during development, revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Biochem Genet* 42(3-4):69-84.

- Lourenço-de-Oliveira R 2004. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. Em Coura JR. Dinâmica das Doenças Parasitárias. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Vol. 2, 2025 p.
- Lumjuan N, Stevenson BJ, Prapanthadara LA, Somboon P, Brophy PM, Loftus BJ, Severson DW e Ranson H 2007. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem Mol Biol* 37, 1026–1035.
- Macoris ML, Andrighetti MT, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of Sao Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:703-708.
- Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VCB 1999. Alteration in susceptibility response of *Aedes aegypti* to organophosphates in cities in the state of S. Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pú* 33: 521-522.
- Maïbèche-Coisne M, Merlin C, François MC, Porcheron P, Jacquin-Joly E 2005. P450 and P450 reductase cDNAs from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male antennae. *Gene* 346:195-203.
- Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, Brengues C, Yébakima A, Ranson H, Corbel V e David JP 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics* 10:494.
- Martins AJ, Lima JB, Peixoto AA, Valle D 2009. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Trop Med Int Health* 14:1351-1355.
- Matambo TS, Paine MJ, Coetzee M, Koekemoer LL 2010. Sequence characterization of cytochrome P450 CYP6P9 in pyrethroid resistant and susceptible *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Genet Mol Res* 9(1):554-64.
- Matowo J, Kulkarni MA, Mosha FW, Oxborough RM, Kitau JA, Tenu F, Rowland M 2010. Biochemical basis of permethrin resistance in *Anopheles arabiensis* from Lower Moshi, north-eastern Tanzania. *Malar J* 9:193.
- Mazzarri MB, Georghiou GP 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc* 11:315-322.
- Melo-Santos MAV, Varjal-Melo JJ, Araújo AP, Gomes TCS, Paiva MH, Regis LN, Furtado AF, Magalhaes T, Macoris ML, Andrighetti MT, Ayres CFJ 2010. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Trop* 113:180-189.
- Miyo T e Oguma Y 2010. Contributions of three-site mutations in Acetylcholinesterase and cytochrome P450 to genetic variation in susceptibility to organophosphate insecticides within a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Pop Ecol* 52(1):159-169.

- Molina D e Figueiroa LE 2009. Resistencia metabólica a insecticidas organofosforados en *Anopheles aquasalis* Curry 1932, municipio Libertador, estado Sucre, Venezuela. *Biomédica* 29:604-615.
- Montella IR 2008. Estudos dos mecanismos bioquímicos da resistência a inseticidas em diferentes populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) do Brasil. PhD Thesis, Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, 92 pp.
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA, Valle D 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77 (3): 467-77.
- Moore GD, Devonshire AL e Denholm I 1988. A microtitre plate assay for characterizing insensitive acetylcholinesterase genotypes of insecticide-resistant insects. *Bull ent Res* 78, 537-544.
- Mori A, Lobo NF, Bruyn B, Severson DW 2007. Molecular cloning and characterization of the complete acetylcholinesterase gene (Ace 1) from the mosquito *Aedes aegypti* with implications for comparative genome analyses. *Insect Biochem Mol Biol* 39: 667-674.
- Mourya DT, Hemingway J, Leake CJ 1993. Changes in enzyme titres with age in four geographical strains of *Aedes aegypti* and their association with insecticide resistance. *Med Vet Entomol* 7(1):11-6.
- MS-SVS 2008. Metodologia de amostragem de *Aedes aegypti* por meio de armadilhas de postura (ovitrampas). Documento da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti* a Inseticidas (MoReNAa). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, agosto de 2008.
- MS-SVS 2009a. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Série A. Normas e Manuais Técnicos, 1ª edição, Brasília / DF.
- MS-SVS 2009b. Manejo da resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica nº 013/2009 CGPNCD/DIGES/SVS/MS.
- MS-SVS 2009c. Uso do larvicida Diflubenzuron (PM25%) para controle de *Aedes aegypti*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica nº 015/2009 CGPNCD/DIGES/SVS/MS.
- MS-SVS 2009d. Informa mudança de uso de inseticidas larvicidas e adulticidas na rotina do Programa Nacional de Controle da Dengue. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica nº 146/2009 CGPNCD/DIGES/SVS/MS.
- MS-SVS 2010. Nota técnica N.º 109/ 2010 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS. O uso racional de inseticidas no controle do *Aedes aegypti* e sua utilização oportuna em áreas com transmissão de dengue. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.
- Müller P, Warr E, Stevenson BJ, Pignatelli PM, Morgan JC, Steven A, Yawson AE, Mitchell SN, Ranson H, Hemingway J, Paine MJ e Donnelly MJ 2008. Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genet* 4(11):e1000286.

- Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, Fournier D 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(13):5922-6.
- Nabeshima T, Kozaki T, Tomita T, Kono Y 2003. An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochem Biophys Res Commun* 307(1):15-22.
- Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, Harada S, Kasai S, Severson DW, Kono Y, Tomita T 2004. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochem Biophys Res Commun* 313(3):794-801.
- NC – IUBMB: Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology [online] [Capturado em 02 de fevereiro de 2011] Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, et al 1987. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 6(1):1-11.
- Nerbert DW 1993. Naming Related P450 Genes, Based on Divergent Evolution. *Current contents* 1993; 36:9-10 (letter).
- Oakeshott JG, Johnson RM, Berenbaum MR, Ranson H, Cristino AS, Claudianos C 2010. Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol Biol* 19 Suppl 1:147-63.
- OMS 1981. World Health Organization: Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva, World Health Organization (WHO/VBC/81.807).
- OMS 1998. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. Organização Mundial de Saúde. WHO/CDS/CPC/MAL 98.12.
- OMS 1999a. Microbial Pest Control Agent: *Bacillus thurindiensis*. World Health Organization, Geneva.
- OMS 1999b. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. Fact sheet WHO/CDS/CPE/WHOPES/99.5
- OMS 2007. The use of DDT in malaria control. WHO position statement, World Health Organization, Geneva.
- OMS 2008a. Diflubenzuron in drinking-water: Use for vector control in drinking-water sources and containers. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/HSE/AMR/08.03/6).
- OMS 2008b. Pyriproxyfen in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, World Health Organization (WHO/HSE/AMR/08.03/9).

- OMS 2008c. Novaluron in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, World Health Organization (WHO/HSE/AMR/08.03/11).
- OMS 2009a. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet N°117, março de 2009. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1). Disponível on line em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- OMS 2009b. *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, World Health Organization (WHO/HSE/WSH/09.01/8).
- OMS 2010. Spinosad DT in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, World Health Organization (WHO/HSE/WSH/10.01/12).
- Omura T 2010. Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *J Biochem* 147(3):297-306.
- Omura T e Sato R 1964. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239(7):2370-8.
- Oshima-Franco e Franco 2003. Biotransformação: importância e toxicidade. *Saúde em Revista*, Piracicaba, 5(9): 69-76.
- Paeporn P, Supaphathom K, Srisawat R, Komalamisra N, Deesin V, Yaumphan P, Leeming Sawat S 2004. Biochemical detection of pyrethroid resistance mechanism in *Aedes aegypti* in Ratchaburi province, Thailand. *Trop Biomed* 21(2):145-51.
- Pang YP, Ekström F, Polsinelli GA, Gao Y, Rana S, Hua DH, Andersson B, Andersson PO, Peng L, Singh SK, Mishra RK, Zhu KY, Fallon AM, Ragsdale DW, Brimijoin S 2009. Selective and irreversible inhibitors of mosquito acetylcholinesterases for controlling malaria and other mosquito-borne diseases. *PLoS One* 4(8):e6851.
- Paraoanu LE e Layer PG 2008. Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation. *FEBS Journal* 275:618–624.
- Peiris, H. T. R.; Hemingway, J 1990. Mechanisms of insecticide resistance in a temephos selected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) strain from Sri Lanka. *Bull Entomol Res* 80(4):453-457.
- Pereira-da-Cunha M, Lima JB, Brogdon WG, Moya GE, Valle D 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 (4): 441-4.
- Perera MDB, Hemingway J e Karunaratne SHPP 2008. Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected in anopheline vectors of malaria in Sri Lanka. *Malar J* Vol 7:168.

- Pethuan S, Jirakanjanakit N, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Kaewpa D, Rongnoparut P 2007. Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Trop Biomed* 24 (1): 7-15.
- Plapp FW 1976. Biochemical genetics of insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol* 21:179-197.
- Plimmer JR 2001. Chemistry of pesticides. No livro: Handbook of pesticide toxicology, principles. Editado por Krieger R. Disponível em: http://books.google.com.br/books?id=ib8Qhju9EQEC&pg=PA346&lpg=PA346&dq=Bloomquist+insecticides&source=bl&ots=DeJxs4Gpni&sig=Q9TBXh1bu4r5k4DBbTkHln66JDs&hl=pt-BR&ei=VpB7TceYO6Kx0QH437juAw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=5&ved=0CEIQ6AEwBA#v=onepage&q=Bloomquist%20insecticides&f=false
- Polanczyk RA, Garcia MO e Alves SB 2003. Potencial de *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner no controle de *Aedes aegypti*. *Rev. Saúde Pública* 37(6):813-816.
- Polson KA, Brogdon WG, Rawlins SC, Chadee DD 2011. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Trop.* 117(1):31-8.
- Pongjaroenkit S, Jirajaroenrat K, Boonchaay C, Chanama U, Leetachewa S, Prapanthadara L, Ketterman AJ 2001. Genomic organization and putative promoters of highly conserved glutathione S-transferases originating by alternative splicing in *Anopheles dirus*. *Insect Biochem Mol Biol* 31(1):75-85.
- Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 540-551.
- Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 540-551.
- Ramsey JS, Rider DS, Walsh TK, De Vos M, Gordon KH, Ponnala L, Macmill SL, Roe BA, Jander G 2010. Comparative analysis of detoxification enzymes in *Acyrtosiphon pisum* and *Myzus persicae*. *Insect Mol Biol* 19 Suppl 2:155-64.
- Ranson H, Burhani J, Lumjuan N, Black WC 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net Journal*; 1(1).
- Ranson H, Collins F e Hemingway J 1998. The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the *Anopheles gambiae* class I glutathione S-transferase family. *Proc Natl Acad Sci* 95:14284-14289.
- Ranson H, Paton MG, Jensen B, McCarroll L, Vaughan A, Hogan JR, Hemingway J, Collins FH 2004. Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 13(4):379-86.

- Ranson H, Rossiter L, Ortelli F, Jensen B, Wang X, Roth CW, Collins FH, Hemingway J 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J* 359(Pt 2):295-304.
- Raymond M 1985. Presentation d'une programme d'analyse logprobit pour microordinateur. *Cahiers Orstrom Sér Ent Med Parasitol*, 22: 117-121.
- Raymond M, Fournier D, Berge J, Cuany A, Bride JM, Pasteur N 1985. Single-mosquito test to determine genotypes with an acetylcholinesterase insensitive to inhibition to propoxur insecticide. *J Am Mosq Control Assoc* 1(4):425-7.
- Regis L, Silva SB e Melo-Santos MAV 2000. The use of bacterial larvicides in mosquito and black fly control programmes in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95(1):207-210.
- Revuelta L, Piulachs MD, Bellés X, Castañera P, Ortego F, Díaz-Ruiz JR, Hernández-Crespo P, Tenllado F 2009. RNAi of *ace1* and *ace2* in *Blattella germanica* reveals their differential contribution to acetylcholinesterase activity and sensitivity to insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 39(12):913-9.
- Rey, L 2001. *Parasitologia*. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 856 p.
- Ribeiro CDEM 2006. *Padronização das condições para criação de larvas de Aedes aegypti* (Linnaeus, 1962) visando aprimorar o monitoramento da resistência do vetor de dengue a inseticidas. Trabalho de conclusão de curso (graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.
- Roberts DR, Alecrim WD 1991. Response of *Anopheles darlingi* to spraying with DDT in Amazonas, Brazil. *Bol Oficina Sanit Panam* 110(6):480-8.
- Rodríguez MM, Bisset JA, De Armas Y, Ramos F 2005. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *J Am Mosq Control Assoc* 21(4): 437-445.
- Rodríguez MM, Bisset JA, Mila LH, Calvo E, Diaz C, Soca LA 1999. Levels of insecticide resistance and its mechanisms in a strain of *Aedes aegypti* of Santiago de Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 51:83-88.
- Rodríguez, María Magdalena; Bisset, Juan A; Fernández, Ditter; Pérez, Omayda 2004. Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. *Rev cuba med trop* 56(1):54-60.
- Roriz-Cruz M, Sprinz E, Rosset I, Goldani L e Teixeira MG 2010. Dengue and primary care: a tale of two cities. *Bulletin of the World Health Organization* 88:244-244.
- Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black 4th WC (2007). A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 16:785-798.

- San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckenooghe A, Dayan GH, Guzmán MG 2010. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg* 82(1):128-35.
- Satoh T e Hosokawa M 2006. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chem Biol Interact* 162(3):195-211.
- Scott JG 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 29(9):757-77. Review.
- Serufo JC, de Oca HM, Tavares VA, Souza AM, Rosa RV, Jamal MC, Lemos JR, Oliveira MA, Nogueira RM, Schatzmayr HG 1993. Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88(3):503-4.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360(1):1-16. Review.
- Singh M, Silva E, Schulze S, Sinclair DA, Fitzpatrick KA, Honda BM 2000. Cloning and characterization of a new theta-class glutathione-S-transferase (GST) gene, *gst-3*, from *Drosophila melanogaster*. *Gene* 247(1-2):167-73.
- Soreq H, Seidman S 2001. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2(4):294-302. Review.
- Souza-Polezzi RC, Bicudo HEMC 2005. Genetic variation along time in a Brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), detected by changes in the esterase patterns. *Genetica* 125: 43-53.
- Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne S, Hemingway J, Black WC 4th e Ranson H 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 38(1):113-123.
- Townsend DM e Tew KD 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22:7369-7375.
- Valle D, Montella IR, Ribeiro RA, Viana-Medeiros PF, Martins AJ, Lima JBP 2006. Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* / Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Publicação em parceria entre Fundação Oswaldo Cruz e Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro e Distrito Federal, Brasil, 128p.
- Varón LS, Bernardo Chaves Córdoba BC e Brochero HL 2010. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. *Rev Panam Salud Publica* 27(1):66-73.
- Vaughan A, Chadee DD e French-Constant R 1998. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. *Med Vet Entomol* 12(3):318-21.

- Vaughan A, Rocheleau T e ffrench-Constant R 1997. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. *Exp Parasitol* 87(3):237-44.
- Vontas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmidis N, Loukas M, Janes RW, Hemingway J 2002. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Mol Biol* 11(4):329-36.
- Vontas JG, Small GJ e Hemingway J 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J* 357:65-72.
- Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M, Lewis T, Devonshire AL, Williamson MS 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J* 359(1):175-81.
- Ware GW e Whitacre DM 2004. An introduction to insecticides [online]; Minnesota. disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>
- Wei SH, Clark AG, Syvanen M 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem Mol Biol* 31(12):1145-53.
- Weill M, Berthomieu A, Berticat C, Lutfalla G, Nègre V, Pasteur N, Philips A, Leonetti JP, Fort P, Raymond M 2004. Insecticide resistance: a silent base prediction. *Curr Biol* 14(14):R552-3.
- Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc Biol Sci* 269(1504):2007-16.
- Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M 2004. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423(6936):136-7.
- Wheelock CE, Shan G e Ottea J 2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *J Pest Sci* 30: 75–83.
- Wirth MC, Georghiou GP 1999. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *J Am Mosq Control Assoc* 15:315-320.
- Wondji CS, Priyanka De Silva WA, Hemingway J, Ranson H, Parakrama Karunaratne SH 2008. Characterization of knockdown resistance in DDT- and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* populations from Sri Lanka. *Trop Med Int Health* 13:548-555.
- Wu S, Li M, Tang PA, Felton GW, Wang JJ 2010. Cloning and characterization of acetylcholinesterase 1 genes from insecticide-resistant field populations of *Liposcelis paeta* Pearman (Psocoptera: Liposcelididae). *Insect Biochem Mol Biol* 40(5):415-24.
- Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Prapanthadara L 2010. A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated

sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96:127-131.

Zhu F, Li T, Zhang L, Liu N 2008. Co-up-regulation of three P450 genes in response to permethrin exposure in permethrin resistant house flies, *Musca domestica*. *BMC Physiol* 8:18.

Zhu F, Parthasarathy R, Bai H, Woithe K, Kausmann M, Nauen R, Harrison DA, Palli SR 2010. A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of deltamethrin resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(19):8557-62.

Zhu KY, Lee SH, Clark JM 1996. A Point Mutation of Acetylcholinesterase Associated with Azinphosmethyl Resistance and Reduced Fitness in Colorado Potato Beetle. *Pestic Biochem Physiol* 55(2):100-8.