



Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Departamento de Saúde Coletiva



Mestrado em Saúde Pública

Monitoramento do gene, que codifica a esterase, envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil.

Mestrando: Marcelo Henrique Santos Paiva
Orientadora: Dra. Constância F. J. Ayres

Recife, 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública

Monitoramento do gene, que codifica a esterase,
envolvido na resistência a inseticidas organofosforados
em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil.

Marcelo Henrique Santos Paiva

Recife

2006

Dissertação de Mestrado

Monitoramento do gene da esterase, envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil.

Marcelo Henrique Santos Paiva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Recife

2006

CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES

“Monitoramento do gene da esterase, envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil”.

MARCELO HENRIQUE SANTOS PAIVA

Dissertação analisada e aprovada pela comissão examinadora em Março de 2006.

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres
(Orientadora) CPqAM – FIOCRUZ

EXAMINADORES

PhD. José Cândido de Souza Ferraz Junior (Titular)
CPqAM – FIOCRUZ

PhD. Maria Helena N. L. Silva Filha (Titular)
CPqAM – FIOCRUZ

PhD. Frederico C. G. Abath (Suplente)
CPqAM - FIOCRUZ

PhD. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura (Suplente)
UPE

“Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da ignorância que podemos solucioná-los” (**Isaac Asimov**)

AGRADECIMENTOS

À Dra. Constância Ayres (Tans), por acreditar em meu trabalho e lapidá-lo de todas as formas. Por representar a inteligência, perseverança e dedicação. Por praticar e ensinar ciência de forma correta. Por todos os “esporros”, obrigado.

Ao Dr. André Freire Furtado, por todo o apoio concedido, tenha sido financeiro, intelectual ou profissional. Chefe direta ou indiretamente, sempre presente. Fonte de comparação insubstituível.

À Dra. Leda Regis, por todo o conhecimento e calma compartilhados.

À Alice Varjal (Queridinha), por toda sua alegria, cooperação e detalhes sugeridos ao longo deste trabalho. Uma mistura de chefe, amiga e companheira de sala.

À Dra. Maria Helena (Chica), pelo seu senso crítico construtivo em todos os momentos deste trabalho: qualificação e defesa de dissertação.

À Dra. Patrícia Furtado, Dra. Nilma Leal e Dra. Cláudia Fontes, pela participação na qualificação deste trabalho.

Ao Dr. William G. Brogdon (Bill), por representar um ícone ao longo deste trabalho. Pela simplicidade, confiança, eficiência e apoio a esta nossa pesquisa.

Ao Departamento de Entomologia do CDC, por todo o convívio de laboratório ao longo dos dois meses de trabalho.

À Dra. Ellen Dotson, pela imensa ajuda oferecida em minha breve estadia em sua casa.

À Karen e André, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela ajuda indispensável na análise das seqüências obtidas neste trabalho.

À minha Duschinka (Nêga), por me amar dentro e fora do laboratório. Por ser uma companheira em todos os aspectos. Uma troca recíproca de queda de cabelos por cabelos brancos. Mais uma etapa vencida. Ao seu lado, virão muitas.

À minha família, especialmente ao meu pai Pedro, por me incentivar a sempre ir cada vez mais longe. Por representar um modelo de homem, pai e amigo. Por ser minha mãe-pai, meu herói da vida real e exemplo a ser seguido.

Aos “escravos” do laboratório de Entomologia, pela ajuda dada ao longo deste trabalho, seja em forma de conversas (nem sempre normais), conselhos, suporte técnico ou até mesmo aquele biscoito maizena após o expediente.

À equipe do Insetário e de campo, por ter tornado esse trabalho possível. Em especial a Julião e Taty, por sempre estarem presentes em meu dia-à-dia.

À Ana Lisa do Departamento de Imunologia, pelo apoio técnico e disponibilidade para ajudar em qualquer hora.

Ao Dr. Fred Abath, por disponibilizar o uso do termociclador de PCR em Tempo Real.

Ao amigo Fabrício da EMBRAPA-Algodão, pelo fácil convívio e longas conversas geneticamente viajadas.

Aos amigos Luís e Fábio do Departamento de Biologia Celular e Molecular, pelo carinho, amizade e eternos votos de sucesso. Pelas conversas amigas e de bastante incentivo.

A George, pelos cálculos estatísticos utilizados nos resultados deste trabalho.

A Édson, Socorro, Graça, Jorge, Rita e tantos outros que participaram do meu dia-à-dia. Cada um com uma parcela de contribuição.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz e ao Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC), pela infra-estrutura e apoio financeiro, que possibilitou a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta, influenciaram meu caminhar e produção científica.

RESUMO

A resistência aos inseticidas químicos tem sido descrita em uma série de ordens de insetos e representa um dos maiores obstáculos para o sucesso dos programas de controle de vetores de doenças. Os mecanismos de resistência aos inseticidas químicos podem ser divididos em categorias, dentre elas a insensibilidade do sítio-alvo e mecanismos metabólicos, através da superexpressão de enzimas de detoxificação, como as esterases. Até o momento, as esterases foram identificadas como o principal mecanismo que confere resistência aos organofosforados em *Aedes aegypti*. O objetivo principal deste trabalho foi analisar o polimorfismo genético do gene da esterase e, avaliar o seu papel em possíveis mecanismos de resistência ao temephos em populações deste mosquito. Com este propósito, foram utilizadas duas linhagens de laboratório: a Rockefeller (padrão de susceptibilidade a todas as classes de inseticidas) e a Recife-Resistente (mantida sob forte pressão de seleção pelo temephos durante cinco gerações); e nove populações naturais: oito provenientes da região metropolitana do Recife e uma de Araripe (CE). Estas populações naturais foram coletadas em forma de ovos, durante os anos de 2004 e 2005. Foram realizados ensaios bioquímicos, eletroforese de isoenzimas, PCR e seqüenciamento de parte do gene, e PCR em Tempo Real para comparar a quantidade de cópias do gene na linhagem resistente e susceptível, e em populações naturais. Testes bioquímicos realizados apenas na linhagem Recife-Resistente demonstraram a presença do mecanismo de resistência metabólica através de uma alta atividade esterásica. O padrão das esterases foi observado em nove populações, em géis de poliacrilamida 6%, corados com substratos específicos para as enzimas α e β -esterase. Os valores de heterozigosidade observada (H_o) variaram de 0,278 a 0,533 em 2004, e em 2005, de 0,388 a 0,608. Estes géis ainda apresentaram um loco de alta atividade esterásica, denominado de loco 1. Neste loco, o alelo responsável pela maior atividade esterásica foi chamado de 3. Sua frequência variou em 2004 de 0,100 em Dois Irmãos a 0,191 em Alto José do Pinho, e em 2005, caiu para 0,071 e 0,107 respectivamente. Na linhagem Recife-Resistente, a frequência deste alelo foi de 0,214. O seqüenciamento de parte do exon 4 do gene da α -esterase, mostrou que o fragmento analisado, de aproximadamente 180 pb, é relativamente conservado, apresentando somente quatro sítios polimórficos em seis populações estudadas. Os resultados da PCR em Tempo Real indicaram que as populações estudadas não apresentam amplificação gênica para o gene da α -esterase, quando comparadas à linhagem Rockefeller, com exceção das populações de Engenho do Meio e Araripe. Apesar do maior número de moléculas apresentado por estas populações, estes resultados ainda precisam de maiores comprovações a fim de se assegurar que a superexpressão dos genes é a possível causa da resistência. A frequência do alelo superexpresso pode ser monitorada ao longo do tempo e auxiliar no manejo da resistência ao inseticida químico em populações tratadas.

ABSTRACT

Resistance to chemical insecticides has been described to a vast order of insects and represents one of the greatest challenges for obtaining success in control programs of disease vectors. Resistance mechanisms to chemical insecticides can be divided in categories, including target-site insensitivity and metabolic mechanisms, through the expression of the organism detoxifying enzymes, such as esterases. At the moment, esterases have been identified as the main mechanism conferring resistance to organophosphates in *Aedes aegypti*. The main objective of this study was the analysis of the esterase genetic polymorphism and, to evaluate its role in possible mechanisms of resistance to temephos in natural populations of this mosquito. To answer these questions, we used two laboratory strains: Rockefeller (susceptibility model for all the insecticides groups) and the Recife-Resistente (kept under strong selective pressure by temephos for five generations), and nine natural populations: eight from the metropolitan area of Recife and one from Araripe (CE). These populations were collected as eggs, during the years 2004 and 2005. It was performed techniques such as biochemical assays, isozymes electrophoresis, PCR and sequencing of part of the gene, and Real-Time PCR to compare the amount of gene copies of the gene in a resistant and a susceptible strain, and in natural populations. Biochemical assays were run only in Recife-Resistente strain and, the results showed the presence of the metabolic mechanism of resistance, through high esterase activity. The esterases pattern was observed in nine populations, in 6% polyacrylamide gel stained with specific substrates to α and β -esterase enzymes. The observed heterozygosity values (H_o) varied from 0,278 to 0,533 in 2004, and in 2005, from 0,388 to 0,608. The gels also showed a region of high esterase activity, denominated locus 1. In this locus, the allele responsible for the higher esterase activity was called 3. Its frequency varied in 2004 from 0,100 in Dois Irmãos to 0,191 in Alto José do Pinho, and in 2005, dropped to 0,071 and 0,107 respectively. In the Recife-Resistente strain, the frequency of this allele was 0,214. The sequencing of part of exon 4 from the α -esterase gene showed that the analyzed fragment, approximately 180 pb long, is quite conserved, presenting only four polymorphic sites. The results obtained by Real-Time PCR indicated that the populations submitted to the study did not present gene amplification to the α -esterase gene, when compared to Rockefeller strain, except the populations from Engenho do Meio e Araripe. In spite of the higher number of molecules presented by these two populations, the results still need more proofs to guarantee that the superexpression of the gene is the possible cause of the resistance. The frequency of the superexpressed allele can be monitored through time and help the management of resistance to chemical insecticides in field projects

LISTA DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Estrutura molecular do DDT.	06
Figura 2. Estrutura molecular do Propoxur.	07
Figura 3. Estrutura molecular do malathion.	09
Figura 4. Representação esquemática da comparação dos espaçadores intergênicos entre a <i>estα</i> e <i>estβ</i> de linhagens resistentes (Pel RR) e linhagens susceptíveis (Pel SS) de <i>Culex quinquefasciatus</i> . Modificações realizadas na figura pertencente ao trabalho de HEMINGWAY e HAWKES, 2001.	18
Figura 5. Organograma representativo da metodologia utilizada no trabalho.	25
Figura 6. Sítios de coleta de ovos de <i>Ae. aegypti</i> . A. Bairros da cidade de Recife, em destaque as localidades de Morro da Conceição, Alto José do Pinho, Casa Forte, Parnamirim, Brasília Teimosa, Engenho do Meio e Dois Irmãos. B. Região Metropolitana de Recife, destacando o bairro de Nossa Senhora de Fátima no município de Moreno.	27
Figura 7. Representação da placa utilizada nos ensaios bioquímicos	29
Figura 8. Localização dos <i>primers</i> utilizados no gene da α -esterase, exon 4 do mosquito <i>Ae. aegypti</i> .	33
Figura 9. Distribuição das frequências de absorbância em larvas de <i>Ae. aegypti</i> para o ensaio bioquímico da α -esterase, em um total de 54 indivíduos da linhagem Recife-Resistente.	37
Figura 10. Distribuição das frequências de absorbância em larvas de <i>Ae. aegypti</i> para o ensaio bioquímico da β -esterase, em um total de 62 indivíduos da linhagem Recife-Resistente.	38
Figura 11. Distribuição das frequências de absorbância em larvas de <i>Ae. aegypti</i> para o ensaio bioquímico da iAChE, em um total de 50 indivíduos da linhagem Recife-Resistente.	39
Figura 12. Gel de poliacrilamida 6% mostrando diferentes frequências do alelo superexpresso, na população de Engenho do Meio. Seta vermelha indicando alelo normal e seta azul, o alelo superexpresso.	43

Figura 13. Gel de agarose 0,8%. M. marcador de peso molecular Ladder 100 pb. Poços 1 a 20: 5 µl de produto de PCR de indivíduos de *Ae. aegypti* provenientes de Araripina amplificados com o set 3 de primers. 44

Figura 14. Gráfico representativo da PCR em Tempo Real. Abcissa x representando o número de moléculas ($\times 10^{10}$) e abcissa y, nº de moléculas encontradas em cada população comparada a referência Rockefeller. **A.** Engenho do Meio, **B.** Alto José do Pinho, **C.** Casa Forte, **D.** Dois Irmãos e **E.** Araripina e Araripe. 47
* Indivíduo com *Ct* maior que o controle negativo.

Figura 15: Curva de dissociação representativa das amostras de Araripina, Rockefeller e do controle negativo. 50

LISTA DE TABELAS	PÁGINA
Tabela 1. Diferentes classes de inseticidas, enzimas e sítios alvos envolvidos nos mecanismos de resistência já relatados em mosquitos.	19
Tabela 2. Status das populações utilizadas neste estudo, diante de bioensaios dose-diagnóstica.	27
Tabela 3. Valores de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) nas amostras de <i>Ae. aegypti</i> coletadas nos anos de 2004 e 2005.	41
Tabela 4. Freqüência do alelo superexpresso 3 entre as populações estudadas. N: tamanho da amostra.	42
Tabela 5. Resultados obtidos pela PCR em Tempo Real, através do ciclo limiar (<i>Ct</i>) e nº de moléculas.	46

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABI	Applied Biosystems
a.C	Antes de Cristo
ACh	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterase
Ae.	<i>Aedes</i>
An.	<i>Anopheles</i>
Ar	Araripina
AR	Araripe
ATCH	Acetilcolina iodada
BT	Brasília Teimosa
Bti	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Centro de Controle de Doenças e Prevenção)
ChE	Colinesterase
CF	Casa Forte
CL ₅₀	Concentração letal para 50% dos organismos tratados
Ct	<i>Cycle threshold</i> (Ciclo limiar)
Cx.	<i>Culex</i>
DDT	diclorodifeniltricloreto
DL ₅₀	Dose letal para 50% dos organismos tratados
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucléico)
DNTB	Ácido ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas)
EM	Engenho do Meio
<i>estα1</i>	Esterase α 1
<i>estα2</i>	Esterase α 2
<i>estα3</i>	Esterase α 3

<i>estβ1</i>	Esterase β 1
<i>estβ2</i>	Esterase β 2
EUA	Estados Unidos da América
Fst	Índice de diferenciação genética
GA	Georgia
GABA	Ácido gama amino butírico
GST	Glutathiona S-transferase
H	Heterozigosidade
Ho	Heterozigosidade observada
He	Heterozigosidade esperada
iAChE	Acetilcolinesterase insensível
IGRs	Insect Growth Regulators (Reguladores do Crescimento de Inseto)
Kb	quilobase
L4	Larva em quarto estágio
MC	Morro da Conceição
m _t	número total de nucleotídeos na análise
NSF	Nossa Senhora de Fátima
PAHO	Pan American Health Organization (Organização Pan-Americana de Saúde)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeira da DNA Polimerase)
PCRq	Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da DNA Polimerase quantitativa)
PEAa	Programa de Erradicação do <i>Aedes aegypti</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
Pn	Número de sítios nucleotídicos polimórficos
PN	Parnamirim
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
PEL SS	Linhagem susceptível de <i>Culex quinquefasciatus</i>
PEL RR	Linhagem resistente de <i>Culex quinquefasciatus</i>
P450	Citocromo P450

RNA	Ribonucleic acid (Ácido Ribonucleico)
RNA _m	Ribonucleic acid messenger (Ácido Ribonucléico mensageiro)
rpm	Rotações por minuto
RR	Razão de Resistência
SE	Standard Error (Erro padrão)
Sn	número de sítios polimórficos por seqüência
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismos de sítio único)
T.E.	Tris EDTA
TFPGA	<i>Tools for Population Genetic Analyses</i>
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i> (Instituto para Pesquisa Genômica)
UBV	Ultra Baixo Volume
U	Unidade
V	Voltagem

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIações E SIGLAS	xii
I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. Controle químico – uma “prática” milenar	04
2.2. Inseticidas	05
2.2.1 Organoclorados	05
2.2.2 Carbamatos	06
2.2.3 Piretróides	07
2.2.4 Organofosforados	08
2.3 A resistência aos inseticidas químicos	09
2.3.1 Métodos de detecção da resistência	10
2.3.1.1 Abordagens tradicionais no estudo da resistência	10
2.3.1.2 Abordagens moleculares no estudo da resistência	12
2.4 Mecanismos de resistência em mosquitos	13
2.5 Situação atual do Programa de controle do vetor da dengue	20
III. JUSTIFICATIVA	22
IV. PERGUNTA CONDUTORA	23
V. OBJETIVOS	24
VI. MATERIAIS E MÉTODOS	25
6.1. Linhagens de populações de <i>Aedes aegypti</i>	26
6.1.1 Linhagens de laboratório	26
6.1.2 Populações naturais	26
6.2. Ensaios bioquímicos	28
6.3 Isoenzimas de esterases	31

6.4 Extração de DNA	32
6.5 PCR	32
6.6 Seqüenciamento	34
6.7 PCR em Tempo Real	35
VII. RESULTADOS	37
7.1. Ensaio bioquímico	37
7.2. Isoenzimas de esterases	40
7.3. PCR	44
7.4. Seqüenciamento	44
7.5 PCR em Tempo-Real	45
VIII. DISCUSSÃO	51
IX. CONCLUSÕES	56
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
XI. ANEXOS	67

I. INTRODUÇÃO

Em 1939 um inseticida do grupo dos hidrocarbonetos clorados, o diclorodifeniltricloroetano, amplamente conhecido como DDT, foi apresentado como a grande solução para a eliminação dos insetos. A descoberta do DDT passou a representar um marco histórico, de grandes investimentos econômicos no desenvolvimento de compostos inseticidas. Este acontecimento foi logo seguido pelo desenvolvimento dos organofosforados, os quais tinham sido descobertos desde a década de 30. Em seguida, nos anos 50 os carbamatos e, entre os anos 60 e 70 os piretróides (BECKER et al., 2003).

Desde então, os inseticidas químicos desempenham um importante papel no controle de insetos vetores. Infelizmente, a habilidade notável de populações destes invertebrados desenvolverem resistência à todas as classes de inseticidas disponíveis, pode levar ao fracasso o controle populacional.

A resistência aos inseticidas químicos afeta direta e profundamente a reemergência de doenças transmitidas por vetores, principalmente aquelas em que não é possível a cobertura vacinal para garantir a proteção da população humana. O mosquito *Aedes aegypti*, vetor implicado na transmissão da dengue no Brasil, apresenta um ciclo biológico curto (média 8-12 dias), as fêmeas depositam ovos de um mesmo ciclo gonadotrófico em vários recipientes, estes ovos em condições adversas, podem entrar em diapausa por períodos prolongados (aproximadamente um ano). Estes e outros fatores tornam o combate ao *Ae. aegypti* uma difícil tarefa, no entanto, este combate apresenta-se como ferramenta primordial para o controle da doença (REY, 2002).

Apesar de todos os esforços para mudar as estratégias no atual programa de controle do *Ae. aegypti* perante o desenvolvimento da resistência aos químicos, a hegemonia da prática de utilização dos inseticidas químicos pelos gestores de saúde pública nos leva a perceber uma tendência do uso prolongado de tais estratégias. Esta situação aponta para a necessidade de elaboração de medidas que viabilizem o uso racional destes inseticidas.

O Programa de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa), atual Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), recentemente reavaliou suas estratégias de controle vetorial e enfatizou a necessidade de um monitoramento contínuo da susceptibilidade das populações de mosquitos expostas aos inseticidas químicos empregados. As primeiras evidências de modificação na susceptibilidade de populações brasileiras de *Ae. aegypti* ao organofosforado temephos foram detectadas em amostras procedentes de Goiás, tratadas com este larvicida desde 1986 (MACORIS et al., 1995). Novos registros de alterações na susceptibilidade ao temephos foram feitos para populações de nove municípios de São Paulo (MACORIS et al., 1999). Em relatórios divulgados pelo Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde, nos anos de 2000 e 2002, a resistência do *Ae. aegypti* ao temephos foi confirmada em grande parte dos municípios investigados. Populações provenientes de Recife e Jaboatão dos Guararapes foram classificados, em ambos os relatórios, como resistentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2000). Estudos recentes sobre a progressão da resistência em municípios que não são considerados sentinela mostraram que o fenômeno está amplamente disseminado em populações brasileiras de *Ae. aegypti* (ANASTACIO, 2003; LIMA et al., 2003; MACORIS et al., 2003). Diante desse quadro, foram estabelecidos critérios para direcionar melhor as estratégias de controle, e paralelamente realizar o monitoramento da resistência através de bioensaios com a dose-diagnóstica dos inseticidas e testes bioquímicos.

Os mecanismos comumente associados à resistência aos inseticidas químicos estão divididos em várias categorias, entre elas o mecanismo metabólico, através da superexpressão de enzimas de detoxificação do organismo como as esterases, oxidases e Glutathione S-transferase (GST). As esterases compreendem um grupo de enzimas não-específicas que estão envolvidas, principalmente, na resistência aos inseticidas organofosforados. Mesmo já tendo sido descrito o mecanismo molecular de resistência mediado por esterases, de algumas linhagens resistentes do gênero *Culex*, até o momento, pouco se sabe

sobre esses mecanismos no *Ae. aegypti* (KARUNARATNE et al., 1998; MOUCHES et al., 1986; SMALL; HEMINGWAY, 2000b).

Este trabalho se propõe a avaliar o polimorfismo do gene da esterase e o seu papel no mecanismo de resistência ao organofosforado temephos em populações naturais de *Ae. aegypti*.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Controle químico – uma “prática” milenar

O uso de inseticidas químicos é, seguramente, uma prática de caráter secular. Relatos do uso de compostos químicos datam desde antes do ano 2.500 a.C., em que os sumérios aparentemente utilizavam compostos sulfúricos para o controle de insetos. Os chineses, em 1.200 a.C., utilizavam compostos arsênicos e mercúrio como inseticidas (RETNAKARAN et al., 1985). Em *Historia Naturalis*, de Plínio – o Ancião, há uma descrição que inclui um resumo de práticas de controle de pragas, extraídas da literatura grega, as quais datam do ano 70 a.C. (BECKER et al., 2003).

Registros de uso de um pó básico à base de flores de piretro datam de 1697, quando asiáticos sabiam do poder inseticida de espécies do gênero *Pyrethrum* (*Pyrethrum carneum* e *Pyrethrum roseum*) (RUIGT, 1985). O uso do arsênico verde de Paris e soluções de querosene deram início à era da aplicação em larga escala de inseticidas químicos como controle de insetos e pragas.

Entre 1920 e 1930, uma ampla variedade de compostos sintéticos foi descoberta como potencial arma para o controle de mosquitos, levando a uma massiva utilização desses produtos em todo o mundo (CREMLYN, 1978).

Os anos seguintes foram marcados, principalmente, pelo começo da Segunda Guerra Mundial e pela necessidade de se controlar piolhos que assolavam as trincheiras. Cientistas procuraram avidamente novos produtos que pudessem ser aplicados em roupas e no corpo, e mais do que isso prevenisse re-infestações do inseto por longos períodos. Vários compostos foram testados em vão. Em 1939 um inseticida do grupo dos hidrocarbonetos clorados, o diclorodifeniltricloroetano, amplamente conhecido como DDT, foi apresentado pelo químico suíço Paul Müller, como a grande promessa de eliminação dos insetos. O DDT tornou-se o composto químico mais famoso e mais utilizado do século 20, levando o Dr. Müller ao Prêmio Nobel de Medicina em 1948. Logo em seguida, os organofosfatos foram sintetizados na Alemanha. No início da década de 50, os carbamatos na Suíça e, entre 1960-1970, os piretróides foram descobertos no Japão e no Reino Unido (BECKER et al., 2003).

Efeitos adversos, principalmente pelo uso indiscriminado e excessivo de compostos químicos, levaram os cientistas a procurar novas alternativas para controlar vetores. Compostos alternativos, tais como reguladores de crescimento (IGRs), inibidores de quitina e modificadores de comportamento de insetos foram sintetizados e até hoje ainda são testados. Pesquisas extensivas também foram direcionadas ao uso de inseticidas biológicos à base de vírus, bactérias, fungos, parasitos, entre outros. Entretanto, até o momento apenas os inseticidas à base de bactérias entomopatogênicas tornaram-se amplamente utilizados no controle de vetores (MULLA; DARWAZEH; ZGOMBA, 1990).

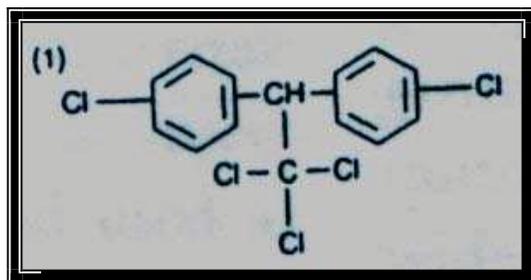
2.2 Inseticidas

Inseticidas químicos podem ser classificados de várias maneiras. A primeira delas é de acordo com o grupo químico ao qual pertencem, sendo conhecidos os hidrocarbonetos clorados ou organoclorados, carbamatos, piretróides e organofosforados. A segunda forma de classificação está de acordo com o modo de ação: a primeira geração de inseticidas é caracterizada por compostos que acometem o aparelho digestivo, como o arsênico; a segunda geração é composta pelos inseticidas de contato, como os organoclorados, carbamatos, piretróides e organofosforados; a terceira geração é composta por compostos de ação fisiológica, como os hormônios juvenis e seus análogos (WHO, 2005).

2.2.1 Organoclorados

Carbono, hidrogênio e cloro são os três elementos que caracterizam esta classe de inseticida. Os organoclorados possuem estabilidade química, baixa solubilidade em água, estabilidade moderada em solventes orgânicos e uma baixa pressão de vapor. Por tais características, esta classe de inseticida é altamente persistente, podendo ocasionar contaminações em longo prazo do meio ambiente e bioacumulação gradual em animais (HILL; WALLER, 1982). O DDT (Figura 1), o principal representante do grupo dos organoclorados, é caracterizado por possuir amplo espectro de atividade tóxica, alta persistência, risco ao meio

ambiente/humanos. Devido a estas características, o DDT passou de inseticida mais utilizado no século 20 para o mais inapropriado no século 21.



Fonte: Becker et al., 2003.

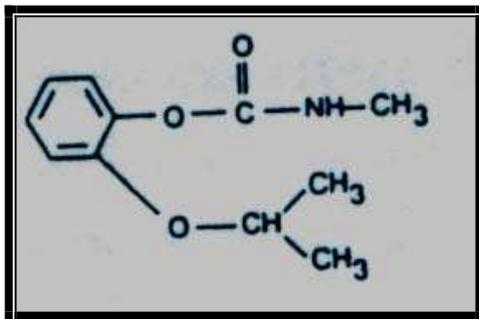
Figura 1: Estrutura molecular do DDT

Insetos susceptíveis expostos ao DDT costumam apresentar tremores por todo o corpo, hiperexcitabilidade e consequente perda do movimento, também chamada de ataxia. Ao agir no sistema nervoso do inseto, o DDT age no equilíbrio dos íons potássio dos neurônios sensoriais, causando os disparos aleatórios e impedindo a passagem normal do impulso nervoso. O efeito pós-potencial em gerar disparos repetitivos, depende das propriedades do canal de sódio da fibra nervosa. O DDT interfere na atividade estabilizadora dos íons Ca^{2+} presentes na superfície axonal dos insetos, interferindo assim no processo de estabilização membranar (BECKER et al., 2003). Essa cadeia de acontecimentos é transmitida para o resto do sistema nervoso, causando contorsão muscular, a qual é geralmente procedida por convulsão e morte do indivíduo.

2.2.2 Carbamatos

Os inseticidas da classe dos carbamatos são derivados do ácido carbâmico, tendo sua introdução no mercado em 1951, pelas Indústrias Químicas Geigy da Suíça. O primeiro carbamato natural foi descoberto em uvas africanas, em meados do século 19, entretanto, por apresentar instabilidade química, o seu análogo sintético veio a ser produzido (AESCHLIMANN; REINERT, 1931). Possuem um amplo espectro de atividade inseticida, agindo por contato ou nas paredes do estômago, e seu uso é efetivo em populações resistentes aos organoclorados e organofosforados.

Seu modo de ação é através da inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima que cataliza a hidrólise da acetilcolina (ACh) – um neurotransmissor atuante nas sinapses neuronais do sistema nervoso central. Com a inibição da AChE, a acetilcolina fica acumulada, prolongando a sua ação. Em insetos, o resultado é uma hiperexcitabilidade do sistema nervoso, seguido de convulsão, paralisia e conseqüente morte do inseto tratado (ELDEFRAWI, 1985). O Propoxur (Figura 2) é o inseticida mais comum entre os carbamatos.



Fonte: Becker et al., 2003.

Figura 2: Estrutura molecular do Propoxur

2.2.3 Piretróides

Os piretróides representam uma nova geração de inseticidas sintéticos. Naturalmente extraídos do ápice da flor do *Chrysanthemum sp.*. A primeira produção comercial do produto foi feita em Dalmatia (Croácia) em 1840 (CASIDA, 1980). Devido a sua baixa toxicidade em humanos, são geralmente utilizados sob a forma de sprays residuais – seja em telas, cortinas ou paredes. Os piretróides praticamente substituíram/suplementaram o uso das outras três classes de inseticidas em diversas áreas de controle de pragas e hoje, representam aproximadamente 25% do mercado de inseticidas químicos no mundo (HEMINGWAY et al., 2004). Nos últimos anos um grande número de compostos piretróides foi sintetizado, sendo alguns destes extremamente potentes.

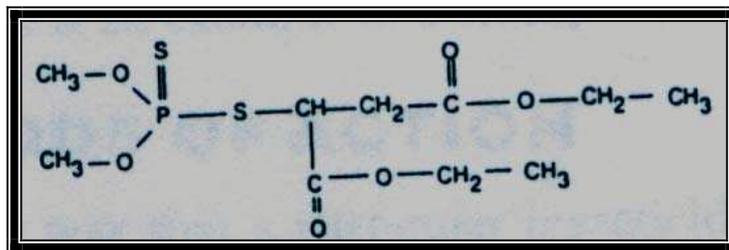
Piretróides são neurotóxicos para os insetos. Mosquitos tratados com piretróides apresentam um quadro de hiperexcitabilidade, descoordenação e paralisia; insetos alados são rapidamente nocauteados. Os sintomas exatos nos insetos vão depender da dose utilizada. Ao agir na membrana nervosa, os

piretróides modificam canais de sódio, provavelmente obstruindo mudanças conformacionais protéicas na interface lipídio-proteína da membrana. Tipicamente, o inseto apresenta disparos repetitivos e bloqueio da transmissão neuromuscular. A ação letal dos piretróides provavelmente envolve neurônios periféricos e centrais, enquanto que o efeito *knockdown* (nocaute) é produzido por efeitos de intoxicação periférica (HEMINGWAY et al., 2004).

2.2.4 Organofosforados

Os organofosforados também são conhecidos por fosforados orgânicos, inseticidas fosforados, ésters fosfóricos ou ésteres de ácido fosfórico. Organofosforados são comumente utilizados como um termo genérico, pois inclui todos os inseticidas que contenham fósforo. Possuem duas características marcantes: uma baixa estabilidade química e uma maior toxicidade a vertebrados do que os organoclorados (BECKER et al., 2003). Por possuírem baixa persistência, foram bastante utilizados como método alternativo aos persistentes organoclorados, particularmente o DDT. Esta classe de inseticidas é conhecida por produzir grande acúmulo da acetilcolina (ACh) nas terminações nervosas. A acetilcolina é um importante neurotransmissor que em condições normais, o organismo a destrói, pela ação da colinesterase (ChE). Em insetos expostos a esses compostos, a colinesterase é inibida, fazendo com que os níveis de acetilcolina se elevem. Essa inibição é praticamente irreversível, o que difere da ação dos carbamatos, que mesmo tendo o mesmo alvo, a inibição é reversível com o tempo (TAYLOR, 1980). Com a inibição da ChE, há um acúmulo de acetilcolina no organismo produzindo sinapses aleatórias, distorção muscular e paralisia do inseto (MADDRELL, 1980).

Com o seu uso bastante difundido na saúde pública, o malathion (Figura 3) é amplamente utilizado como adulticida, aplicado em ultrabaixo volume (UBV), para o controle de populações de mosquitos. O temephos também tem sido bastante utilizado em programas de controle, porém como larvicidas.



Fonte: Becker et al., 2003.

Figura 3: Estrutura molecular do malathion

2.3 A resistência aos inseticidas químicos

Inseticidas químicos desempenham um papel fundamental em programas de controle de vetores desde o início do século 20. A resistência aos inseticidas químicos já se encontra documentada em mais de 504 espécies de artrópodes. Infelizmente, a grande maioria desses registros foi realizada após falhas ao tentar controlar determinado inseto, e não como um estudo prévio antecipando-se a tais erros (GEORGHIOU; LAGUNES-TEJEDA; BAKER, 1983).

A resistência é uma característica hereditária, e sendo assim, uma outra definição de resistência dentro de um contexto genético é a de Crow (1957) que define a resistência como "o marco na mudança da composição genética de uma determinada população em resposta à pressão de seleção". O processo determinante no desenvolvimento da resistência é a pressão contínua de seleção, ou seja, o uso freqüente de um determinado pesticida. Trata-se de um caso típico de evolução Darwiniana; ou seja, a aplicação constante de um mesmo produto químico aumenta a freqüência relativa de alguns indivíduos "pré-adaptados" presentes em uma população.

Dentre as conseqüências drásticas da evolução da resistência estão a aplicação mais freqüente de pesticidas; aumento na dosagem do produto; e substituição por um outro produto, geralmente de maior toxicidade (GEORGHIOU, 1983). Estes fatores comprometem os programas de controle de vetores em vista da maior contaminação do meio ambiente com pesticidas, destruição de organismos benéficos, e elevação nos custos para obter os níveis aceitáveis de controle. Sabe-se também que a descoberta e o desenvolvimento de novos

compostos está se tornando cada vez mais difícil e caro (ZAIM; GUILLET, 2002). Associado a estes fatores, existe a possibilidade das populações alvo apresentarem resistência cruzada para os novos compostos. Sendo assim, o manejo da resistência de artrópodes aos produtos químicos tem se tornado um importante componente do controle vetorial (GEORGHIOU, 1983; SAWICKI, 1987; CROFT, 1990; DENHOLM; ROWLAND, 1992).

2.3.1 Métodos de detecção da resistência

Quanto mais precocemente detectada e monitorada a resistência, maior a chance de programas de controle terem sucesso. A resistência aos inseticidas químicos pode ser estudada em vários níveis: desde o ensaio biológico, e caracterização molecular dos genes que conferem resistência, até a análise bioquímica da expressão de genes respondendo à pressão de seleção imposta pelos inseticidas.

As técnicas tradicionais de detecção/quantificação da resistência utilizadas em programas de vigilância epidemiológica em todo o mundo podem ser divididas em: bioensaios, para a determinação da dose diagnóstica ou quantificação do nível de resistência, e os ensaios bioquímicos em microplacas com a finalidade de determinar qual o mecanismo envolvido. Além dessas técnicas consideradas “universais”, a análise molecular de genes de resistência também oferece um campo bastante promissor na busca de novos métodos para compreender a dinâmica desses genes.

2.3.1.1 Abordagens tradicionais no estudo da resistência

Bioensaios dose-diagnóstica

Dose-diagnóstica é a dose predeterminada de um inseticida, que apresenta efeito letal para a maioria dos indivíduos susceptíveis, mas que não afeta a maioria de indivíduos resistentes (FERRARI, 1996). Este é considerado o método mais simples de detecção da resistência, já que a OMS oferece uma lista de

doses-diagnósticas de vários inseticidas, para uma variedade de espécies de artrópodes transmissores de doenças (WHO, 1991).

Quando o inseticida em questão age em formas aquáticas (larvas/pupa), a dose é aplicada na água. Bioensaios em garrafas são utilizados quando o inseticida testado age nas formas adultas, sendo a dose aplicada à superfície do recipiente (BROGDON; McALLISTER, 1998).

Bioensaios dose-resposta

Este tipo de ensaio é a ferramenta de escolha quando há a necessidade de se monitorar o progresso da resistência em uma determinada população. Uma escala de diferentes doses de inseticidas é utilizada para se obter um espectro de respostas de mortalidade entre as amostras estudadas. A resposta obtida pode ser analisada através da análise de próbites (FINNEY, 1971).

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

Ensaio bioquímico em microplacas

A utilização de ensaios bioquímicos é de vital importância quando se busca identificar o mecanismo de resistência em uma determinada população. Estes ensaios fornecem a relação entre atividade enzimática e qual o possível mecanismo de resistência presente no inseto analisado (BROGDON, 1989).

Segundo Brogdon e Dickinson (1983), estes ensaios podem detectar atividades de esterases (α e β), acetilcolinesterases (AChE), glutatona S-transferases (GSTs) e oxidases. Correções para as variações dos diferentes tamanhos de insetos podem ser feitas através da detecção dos níveis de proteínas totais. Os níveis enzimáticos são lidos em leitor de ELISA, de acordo com a sua absorvância específica.

2.3.1.2 Abordagens moleculares no estudo da resistência

Caracterizar variações genéticas em populações naturais de vetores é considerado um dos passos mais relevantes dos últimos tempos. Com o avanço da genética molecular e da clonagem de genes, a utilização de técnicas moleculares na detecção de alelos mutantes que podem conferir resistência, passou a desempenhar um papel promissor nos estudos da resistência em mosquitos.

Até o momento, o maior número de dados em genética de populações foi fornecido por pesquisas que utilizaram as isoenzimas como marcadores (TABACHNICK; BLACK IV, 1996). No entanto, métodos mais recentes de análise genética concentraram seus esforços quase que totalmente no uso de marcadores de DNA e RNA. Vários genes de resistência já foram descritos utilizando-se tais métodos, como o trabalho de clonagem, seqüenciamento e expressão funcional do gene da acetilcolinesterase em *Ae. aegypti* (FFRENCH-CONSTANT et al., 1995); a análise de mutações no gene do canal de sódio voltagem-dependente em *Ae. aegypti* (BRENGUES et al., 2003); a descrição do gene da citocromo P450 (COLLINS et al., 2002); a análise molecular da relação entre as glutathione transferases e a resistência aos inseticidas químicos (HEMINGWAY et al., 2004); análise da mutação *kdr*, causada pela troca de uma leucina por uma fenilalanina em *Anopheles gambiae* (DIABATE et al., 2004; SIMARD et al., 2006) e a análise do promotor da β -esterase em *Culex quinquefasciatus* (HAWKES; HEMINGWAY, 2002).

As técnicas moleculares, por serem mais específicas e sensíveis, se mostram bastante úteis na elucidação mais aprofundada do problema da resistência a inseticidas químicos. No entanto, apesar de todo o avanço alcançado através de estudos moleculares, ainda existe a necessidade de um maior intercâmbio entre os achados laboratoriais e as técnicas empregadas em campo.

2.4 Mecanismos de resistência em mosquitos

A base molecular pela qual mosquitos, sob pressão de seleção de inseticidas químicos, apresentam um quadro de resistência, ainda está sendo elucidada. Esta elucidação está sendo bastante auxiliada, pelo fato dos genomas da *Drosophila melanogaster*, do *Anopheles gambiae* e de boa parte de *Ae. aegypti* já estarem disponíveis em bancos de dados, tais como o GeneBank e o TIGR (HEMINGWAY et al., 2004).

Os mecanismos de resistência podem ser divididos em quatro categorias: penetração reduzida, mudanças comportamentais, alteração do sítio-alvo e resistência metabólica (FERRARI, 1996).

Penetração reduzida

Mudanças na cobertura de quitina do inseto podem significar uma diminuição na penetração do inseticida. Mosquitos que desenvolvem este tipo de mudança não apresentam altos níveis de resistência, mas quando associada a outros mecanismos, o nível de resistência aumenta consideravelmente (APPERSON; GEORGHIOU, 1975).

Mudanças comportamentais

Mosquitos podem apresentar mudanças de comportamento em áreas tratadas. Estas mudanças podem fazer com que os mosquitos reconheçam superfícies tratadas com inseticidas, apresentando maior tendência de não adentrar em áreas sob tratamento, reduzindo a taxa de invasão de domicílios ou modificando o horário de repasto sangüíneo (MATHENGE et al., 2001).

Alteração do sítio-alvo

Este tipo de resistência é ocasionada por mutações em genes que codificam para o sítio de ação do inseticida, impedindo/dificultando assim a ligação do inseticida com sua molécula-alvo. Estas alterações podem comprometer parcialmente ou integralmente a atividade inseticida em questão. A enzima acetilcolinesterase, o receptor neuronal do ácido γ -aminobutírico (GABA) e os canais de sódio dependentes de voltagem, são exemplos de sítio-alvos envolvidos neste tipo de resistência (HEMINGWAY et al., 2004).

Acetilcolinesterase insensível: Como mencionado anteriormente, inseticidas organofosforados e carbamatos são neurotóxicos, que agem inibindo a enzima acetilcolinesterase (HEMINGWAY, 2000). A AChE possui um papel fundamental no sistema nervoso central, finalizando o impulso nervoso pela catalisação da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Apesar deste tipo de resistência já ter sido detectado, através de ensaios bioquímicos, em várias espécies vetoras, o mesmo ainda não foi relatado para o *Aedes aegypti* (HEMINGWAY et al., 2004).

Mutação no receptor GABA: O sítio de ação dos inseticidas organoclorados, como o dieldrin, é o receptor neuronal do ácido γ -aminobutírico (GABA). A ligação do GABA ao seu receptor, composto por cinco subunidades, resulta na rápida abertura de um canal iônico cloro-seletivo. A insensibilidade do receptor GABA já foi bem estudada em várias espécies de insetos (HEMINGWAY; RANSON, 2000; HEMINGWAY et al., 2004).

Mutações no canal de sódio dependentes de voltagem. O efeito farmacológico do DDT e piretróides consiste em causar ativação constante dos canais de sódio. Este efeito é conhecido por nocaute, do inglês “knock-down”. O intenso uso de piretróides e DDT levaram populações de vários tipos de insetos, incluindo *Anopheles* e *Aedes*, a desenvolverem resistência do tipo *Kdr* (*knockdown resistance*) (SODERLUND; KNIPPLE, 2003).

Resistência metabólica

A resistência metabólica é o resultado de uma mudança estrutural na molécula da enzima que aumenta sua habilidade em detoxificar o inseticida e/ou, elevação nos níveis da enzima produzida (HEMINGWAY, 2000). Um pequeno grupo de enzimas ou família de enzimas está envolvido neste mecanismo de resistência: as oxidases, as glutationa-s-transferases e as esterases.

Oxidases. A citocromo P450 faz parte de uma família complexa de enzimas encontradas desde bactérias até mamíferos. São responsáveis pelo metabolismo oxidativo de vários compostos endógenos e exógenos. A diversidade dessa família de enzimas pode ser exemplificada pelas múltiplas isoformas da citocromo

P450, diferentes padrões de expressão e uma grande variedade de substratos (FEYEREINSEN, 1999). Como objetivo de classificar essa variada família, Nelson et al. (1993) sugeriram um sistema de nomenclatura baseado na seqüência de aminoácidos. Este sistema preconiza que cada P450 seja classificada em uma família (designada por um número), e uma subfamília (designada por uma letra). A disponibilização do genoma completo da *Drosophila melanogaster* tem facilitado bastante o trabalho de filogenia baseado na análise das oxidases P450 de insetos (RANSON et al., 2002). Nesta espécie, foram encontrados 83 genes que codificam P450 funcionais. Estas P450s foram classificadas em 25 famílias diferentes, sendo mais de 50% destas, pertencentes à família CYP4 ou CYP6 (TIJET; HELVIG; FEYEREISEN, 2001; COLLINS et al., 2002). Há relatos de resistência mediada por tipos diferentes de P450 oxidases para todas as classes de inseticidas, mas nem todas as famílias de P450 são capazes de se ligar e conseqüentemente degradar o inseticida (COLLINS et al., 2002). Vários trabalhos ressaltam níveis elevados de P450s das famílias CYP4, CYP6 e CYP12 em amostras de insetos resistentes, mas apenas em poucos é estabelecida uma relação entre uma P450 específica e alto metabolismo de inseticida (COLLINS et al., 2002). Níveis elevados de atividade da monoxidase P450, em mosquitos resistentes, são freqüentemente encontrados em associação com atividade alterada de outras enzimas (HEMINGWAY et al., 2004). Brogdon (1999) relatou a resistência contra a cipermetrina, causada por oxidase e esterase em *Anopheles albimanus*.

Glutathione S-transferases (GSTs): Estas enzimas pertencem a uma ampla família de enzimas multifuncionais, envolvidas na detoxificação de uma variedade de compostos – incluindo os inseticidas (SALINAS; WONG, 1999). Há duas classes de GSTs, classificadas de acordo com sua localização na célula: microsomal e citosólica (HEMINGWAY et al., 2004). Em *An. gambiae*, há apenas três GSTs microsomais e um grande número de citosólicas. Seqüências de aminoácidos de GSTs que compartilham 40% de homologia são geralmente classificadas na mesma classe. Propriedades imunobiológicas, relação filogenética, e estrutura terciária também são empregadas na classificação (HEMINGWAY et al., 2004).

Estas enzimas desempenham importante função no estresse fisiológico, estando também implicadas no transporte intracelular e cascatas biosintéticas (WILCE; PARKER, 1994).

Níveis elevados de GSTs, em amostras de insetos resistentes aos organofosforados, foram originalmente relatadas por Hayes e Wolf (1988) apud Hemingway et al. (2004). No entanto, a elevada atividade das GSTs em insetos tem estado associada aos mecanismos de resistência a todas as quatro classes de inseticidas químicos. A atividade enzimática elevada ocorre, na maioria das vezes, devido ao aumento da concentração de uma ou mais enzimas GSTs, não sendo um resultado da amplificação gênica (RANSON; HEMINGWAY, 2004).

Esterases: São enzimas que, em insetos, desempenham papel no sistema nervoso central, na proteólise, no metabolismo hormonal, entre outros (ALDRIGDE, 1953). Em uma grande variedade de mosquitos, a atividade elevada das esterases tem sido reportada como o principal mecanismo de resistência aos inseticidas organofosforados (HEMINGWAY, 2000). Esta atividade é resultante de uma superprodução de esterases não-específicas, as quais capturam a molécula do inseticida antes que a mesma alcance seu alvo: a acetilcolinesterase (HAWKES; HEMINGWAY, 2002).

As esterases podem gerar dois tipos de resistência a inseticidas químicos: uma resistência de grande amplitude através de uma rápida ligação ao inseticida (seqüestro) ou uma resistência de amplitude menor através da metabolização de uma variedade pequena de inseticidas que contenham uma ligação éster em comum (KARUNARATNE et al., 1995). Em geral, a elevação dos níveis de esterases que seqüestram a molécula do inseticida se dá por amplificação gênica. A única exceção relatada consiste na elevação *est α 1* em uma linhagem de *Culex pipiens* da França, a qual não está relacionada com a amplificação do gene (RAYMOND et al., 1998). Apesar da amplificação do gene da esterase estar bem documentada em linhagens resistentes de algumas espécies de mosquitos, como o *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens*, *Cx. tarsalis* e *Cx. tritaeniorhynchus* (MOUCHES et al., 1986; KARUNARATNE et al., 1998; SMALL; HEMINGWAY,

2000), pouco se sabe sobre a ocorrência deste mecanismo para o mosquito *Ae. aegypti*.

A classificação das esterases é feita de acordo com suas afinidades para α - ou β - naftil acetato, sua mobilidade em gel de poliacrilamida, e sua seqüência de nucleotídeos (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998). Embora uma grande variedade de genótipos de esterases tenham sido descritos em linhagens resistentes de *Cx. quinquefasciatus*, há a predominância da amplificação de dois genes, *est α 2* e *est β 2*, em um cístron de aproximadamente 25 kb (VILLANI et al., 1983; HEMINGWAY; CALLAGHAN; AMIN, 1990). Estes genes estão localizados numa orientação invertida, separados por um espaçador intergênico de aproximadamente 2,7 kb. Na linhagem susceptível, os genes homólogos *est α 3* e *est β 1* estão separados por apenas 1,7 kb. Estes espaçadores intergênicos provavelmente contêm tanto o promotor para as seqüências do gene α , como também para o gene β esterase e outros elementos regulatórios, os quais são também comumente encontrados dentro destas seqüências (Figura 4). É importante salientar que devido à proximidade de ambos os *loci*, os genes da α e β -esterase são co-amplificados como uma única unidade (ROOKER et al., 1996). Apesar dos genes de esterase serem co-amplificados em uma proporção de 1:1, estudos realizados na região promotora do gene identificaram que são obtidas quantidades três vezes maiores de proteínas de β -esterase em insetos adultos do que de α -esterase. Além disso, 1,3 a 32 vezes mais RNAm de *est β 2* é encontrado em homogenatos de indivíduos adultos do que RNAm de *est α 2* (HAWKES; HEMINGWAY, 2002).

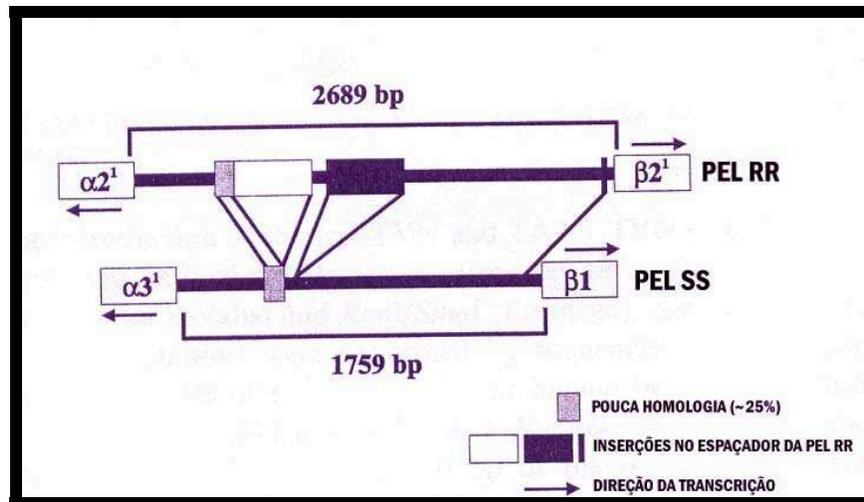


Figura 4. Representação esquemática da comparação dos espaçadores intergênicos entre a *est* α e *est* β de linhagens resistentes (Pel RR) e linhagens suscetíveis (Pel SS) de *Culex quinquefasciatus*. Fonte: (Hawkes e Hemingway, 2002) modificado.

Uma síntese da relação entre as classes de inseticidas empregados, tipo de resistência envolvido e enzima/alvo envolvidos, está mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Diferentes classes de inseticidas, enzimas e sítios alvos envolvidos nos mecanismos de resistência já relatados em mosquitos.

Classe de Inseticida	Mecanismo de resistência	Enzima/alvo envolvida	Referência Bibliográfica
Organofosforados	Metabólico	Esterases	Hemingway, 2000
		Glutathionas-S-transferases (GSTs)	Hemingway, 2000
		Oxidases	Hemingway et al., 2004
	Modificação do sítio-alvo	Acetilcolinesterase (AChE)	Weill et al., 2003
Carbamatos	Metabólico	Esterases	Hemingway, 2000
		Glutathionas-S-transferases (GSTs)	Vontas; Small; Hemingway, 2001
	Modificação do sítio-alvo	Acetilcolinesterase (AChE)	Weill et al., 2003
Piretróides	Metabólico	Esterases	Hemingway; Ranson, 2000
		Glutathionas-S-transferases (GSTs)	Ranson et al., 1997
		Oxidases	Vulule et al., 1994
	Modificação do sítio-alvo	Canais de Sódio	Brengues et al., 2003
Organoclorados	Metabólico	Glutathionas-S-transferases (GSTs)	Vontas; Small; Hemingway, 2001
		Oxidases	Hemingway et al., 2004
		Modificação do sítio-alvo	Receptores GABA
	Modificação do sítio-alvo	Canais de Sódio	Brengues et al., 2003

2.5 Situação atual do Programa de controle do vetor da dengue

Nos anos 40, um programa de controle do *Ae. aegypti* foi iniciado pela Organização Pan Americana de Saúde (PAHO) visando prevenir epidemias urbanas de febre amarela. Este programa eliminou o vetor de 19 países representando mais de 73% da área primeiramente infestada (SCHLEISSMAN; CALHEIROS, 1974; MONATH, 1994; GUBLER, 1997). Infelizmente a erradicação era difícil de ser mantida e por volta dos anos 70, a reinvasão do mosquito foi intensa. Tal infestação continuou durante os anos 80 e 90. Hoje, *Ae. aegypti* tem uma distribuição mais ampla do que a registrada nos anos 40.

Nos últimos tempos o *Ae. aegypti*, que também é o principal vetor do Dengue no Brasil, tem sido combatido multisetorialmente. Infelizmente, tais medidas de controle são as mesmas empregadas há 100 anos atrás, levando a insucessos do programa de controle deste mosquito.

A implantação do Programa de Erradicação do *Aedes aegypti*, o PEAA, resultou em um fortalecimento das ações de combate ao vetor, com um significativo aumento dos recursos utilizados para essas atividades, mas ainda com as ações de prevenção centradas quase que exclusivamente nas atividades de combate ao *Ae. aegypti*, em campo, com o uso de inseticidas. Essa estratégia, comum aos programas de controle de doenças transmitidas por vetor em todo o mundo, mostrou-se incapaz de responder à complexidade epidemiológica da dengue (BRASIL, 2003).

Os resultados obtidos no Brasil e o próprio panorama internacional, onde não existem evidências da viabilidade de uma política de erradicação do vetor, em curto prazo, levaram o Ministério da Saúde a fazer uma nova avaliação dos avanços e das limitações do programa, com o objetivo de estabelecer um novo programa, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que incorporasse elementos como a mobilização social e a participação comunitária, indispensáveis para responder de forma adequada a um vetor altamente domiciliado. Neste cenário epidemiológico, torna-se indispensável que o conjunto de ações sejam intensificadas, permitindo um melhor enfrentamento do problema e a redução do impacto da dengue no Brasil (BRASIL, 2003).

Segundo Macoris et al. (1995), populações de *Ae. aegypti* procedentes de Goiás, tratadas com o temephos desde 1986, apresentaram modificações na suscetibilidade a este composto, tendo sido este, o primeiro registro de resistência em *Ae. aegypti* no Brasil. Em 1999, Macoris et al. detectaram populações resistentes em nove municípios de São Paulo. Ainda naquele ano, teve início a elaboração do programa de monitoramento da susceptibilidade aos inseticidas empregados no PNCD, em âmbito nacional. No ano de 2000, populações de 69 municípios caracterizados como sentinelas foram investigados pelo Ministério da Saúde. Dessas populações de *Ae. aegypti*, 19 foram classificadas como resistentes ao temephos, 16 apresentaram os primeiros indícios de resistência, estando inclusas nessa lista populações do Recife e Jaboatão dos Guararapes (BRASIL, 2000). Em alguns estados como Rio de Janeiro, Ceará e Rio Grande do Norte, foi recomendada a substituição do temephos por biolarvicidas a base de *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*), bactéria entomopatogênica considerada um dos agentes de controle biológico mais eficazes contra culicídeos (BRASIL, 2000).

III. JUSTIFICATIVA

O monitoramento da resistência aos inseticidas químicos desempenha um papel fundamental nos programas de controle de vetores pelas seguintes razões: 1) A detecção *a priori* de genes de resistência em populações naturais irá direcionar a escolha da classe de inseticida mais adequada para ser empregada no controle, permitindo definir um esquema de rotatividade entre inseticidas, bem como o momento exato de realizar a introdução de novos agentes de controle sem que ocorram falhas nestas ações, 2) este monitoramento evitará a seleção de genes de resistência, por monitorar sua frequência em populações naturais, evitando, por exemplo, o estabelecimento de uma pressão de seleção que leve a inutilização do inseticida, 3) permitirá seu uso de forma adequada/racional, de modo a evitar danos à saúde humana e meio ambiente e 4) fornecerá informações sobre a dinâmica dos genes de resistência em populações que estão sob efeito do inseticida.

Os métodos atualmente utilizados para a detecção de resistência, como os bioensaios (com larvas e mosquitos adultos) e os testes bioquímicos, além de laboriosos, requerem grande número de larvas ou de mosquitos adultos e podem superestimar a resistência devido à tolerância apresentada por alguns indivíduos da população. Esta tolerância pode não ter base genética e, portanto não estar relacionada à resistência. Assim, uma superestimativa nos resultados gerados pelos bioensaios, pode alterar substancialmente os resultados da taxa predita na qual a resistência será selecionada em populações com baixa frequência dos genes de resistência.

Apesar da importância, o monitoramento da resistência aos inseticidas utilizados nos programas de controle nunca foi avaliado de forma sistemática no Brasil.

IV. PERGUNTA CONDUTORA

Qual o papel das esterases nos mecanismos de resistência ao inseticida químico temephos em populações brasileiras de *Ae. aegypti*?

V. OBJETIVOS

Geral:

- Identificar e avaliar a presença de alelos de resistência ao inseticida organofosforado no gene da esterase, em populações naturais de *Aedes aegypti*.

Específicos:

1. Identificar o mecanismo envolvido com a resistência ao temephos nas populações naturais de *Ae. aegypti*;
2. Detectar a presença de alelos de resistência no gene da esterase nestas populações;
3. A partir da detecção de alelos de resistência, estimar as frequências destes alelos nas populações naturais do estado de Pernambuco, através da eletroforese de isoenzimas ao longo do tempo;
4. Caracterizar a diversidade gênica dos genes de esterase nestas populações;
5. Avaliar o grau de polimorfismo dos genes de esterases em populações naturais deste mosquito;

VI. MATERIAIS E MÉTODOS

Os mecanismos de resistência aos inseticidas químicos são complexos e requerem uma diversidade de técnicas para sua análise. Neste trabalho objetivamos identificar se o mecanismo de resistência relacionado às esterases estaria presente em uma linhagem de *Aedes aegypti* resistente de laboratório. Neste sentido, realizamos testes bioquímicos nesta população e posteriormente, identificamos diferentes alelos no gene da esterase com diferenças no padrão de expressão por eletroforese de isoenzimas. Após a identificação do alelo superexpresso, avaliamos sua frequência em dois momentos diferentes em populações naturais do mesmo mosquito. Seqüenciamos parte do gene da esterase e comparamos a quantidade do número de cópias do gene na linhagem susceptível e nas populações naturais pela técnica de PCR em tempo real. Um esquema geral mostrando as etapas do trabalho está ilustrado na Figura 5. A seguir descreveremos cada uma das técnicas detalhadamente.

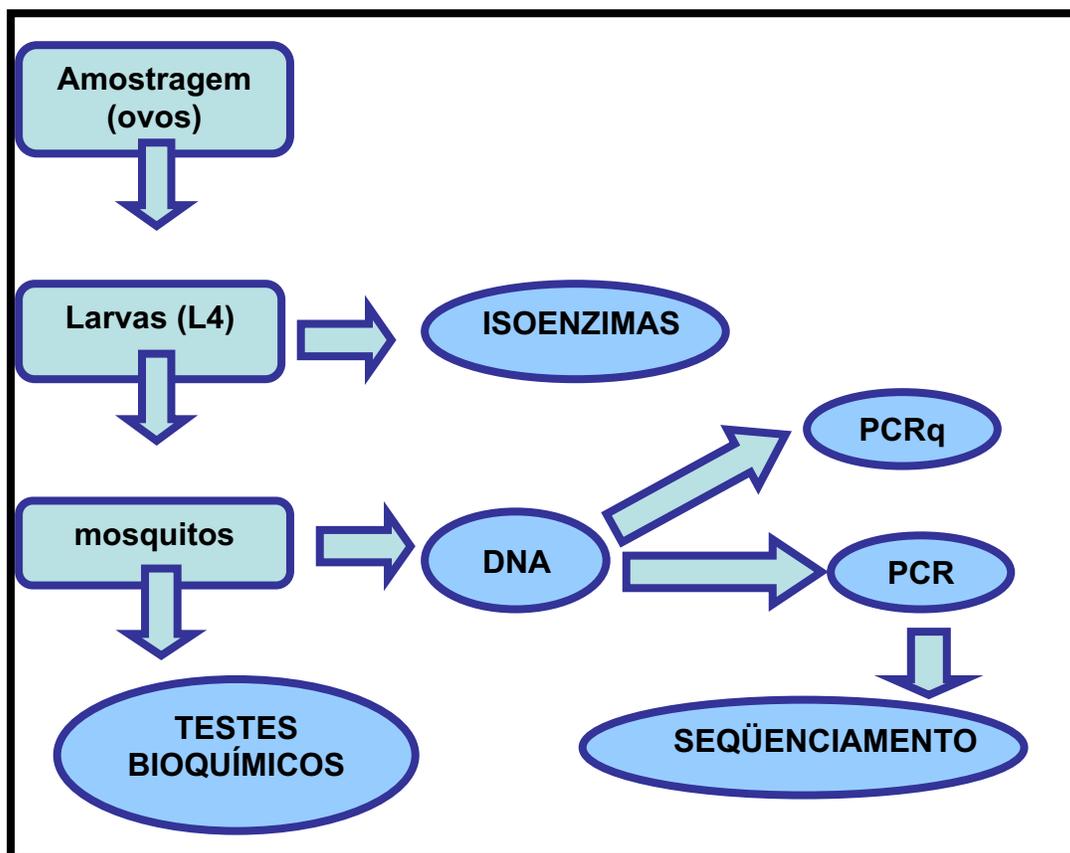


Figura 5: Organograma representativo da metodologia utilizada no trabalho.

6.1 Linhagens e populações de *Aedes aegypti*

6.1.1 Linhagens de laboratório

Neste estudo, foram utilizadas duas linhagens de laboratório de *Ae. aegypti*. A linhagem Rockefeller, conhecida mundialmente por ser susceptível a todas as classes de inseticidas químicos, foi utilizada como padrão de susceptibilidade em algumas das etapas a seguir. A segunda linhagem utilizada foi a Recife-Resistente, a qual foi originariamente proveniente de Araripina (localizada a aproximadamente 690 km da cidade de Recife). Indivíduos desta localidade foram submetidos a bioensaios dose-diagnóstica, utilizando-se como inseticida o temephos, em um trabalho paralelo realizado em nosso insetário (PAIVA et al., em preparação). Esta população apresentou uma mortalidade média de apenas 16,8%, e uma alta razão de resistência (RR=14) (MELO SANTOS et al., comunicação pessoal). Diante destes resultados, a população de Araripina está sendo exposta ao temephos e encontra-se na quinta geração sob pressão de seleção e, atualmente é denominada de Recife-Resistente (Rec-R).

6.1.2 Populações naturais

As populações naturais utilizadas neste estudo foram previamente submetidas a bioensaios dose-diagnóstica (DD = 0,012 mg/L) com o temephos e, todas elas foram classificadas como resistentes (MELO SANTOS, dados não publicados) (Tabela 2). Foram estudadas sete populações coletadas na região metropolitana do Recife (Engenho do Meio, Dois Irmãos, Alto José do Pinho, Morro da Conceição, Casa Forte, Parnamirim e Brasília Teimosa), uma do município de Moreno (Nossa Senhora de Fátima), e uma outra população proveniente do Araripe (Ceará) (Figura 6). Todas as amostras foram coletadas em forma de ovos, através de armadilha de oviposição adaptada do modelo descrito por Fay e Perry (1965) e posteriormente, levadas ao insetário do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Após a abertura dos ovos, as larvas do 4º estágio (L4) foram separadas e congeladas a -70° C individualmente em microtubos de 1,5 ml, para serem utilizadas nos testes

isoenzimáticos, enquanto que os mosquitos adultos foram congelados para posterior extração de DNA. Um total de 1.760 indivíduos foi utilizado no presente trabalho.

Tabela 2. Status das populações utilizadas neste estudo, diante de bioensaios dose-diagnóstica.

Localidades	Total de larvas expostas	Mortalidade Dose Diagnóstica (%)	Status
Rockefeller			Susceptível
Dois Irmãos	320	62,1	Resistente
Morro da Conceição	560	67,5	Resistente
Alto José do Pinho	520	71,0	Resistente
Parnamirim	560	65,4	Resistente
Engenho do Meio	480	70,0	Resistente
Casa Forte	520	67,0	Resistente
Brasília Teimosa	360	77,5	Resistente
Nossa Sra. De Fátima	600	70,0	Resistente
Araripe	600	3,80	Resistente

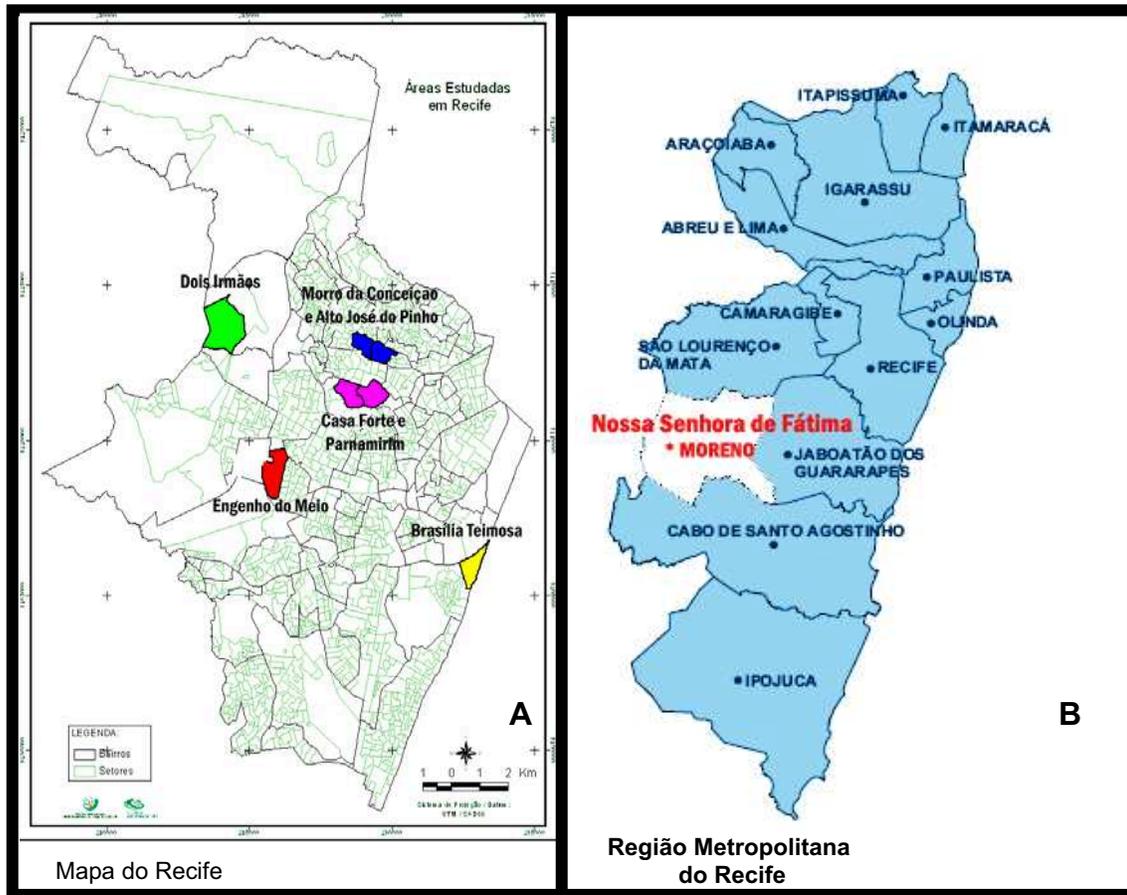


Figura 6: Sítios de coleta de ovos de *Aedes aegypti*. **A.** Bairros da cidade de Recife, em destaque as localidades de Morro da Conceição, Alto José do Pinho, Casa Forte, Parnamirim, Brasília Teimosa, Engenho do Meio e Dois Irmãos. **B.** Região Metropolitana de Recife, destacando o bairro de Nossa Senhora de Fátima no município de Moreno.

6.2 Ensaios bioquímicos

Os testes bioquímicos foram realizados nas dependências do Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC – Centers for Disease Control and Prevention), em Atlanta – GA, EUA. O protocolo utilizado neste trabalho foi baseado em Brogdon (1989). Nesta técnica foi avaliada somente a linhagem Recife-Resistente, comparada com a linhagem Rockefeller, para as enzimas α e β -esterase, acetilcolinesterase insensível e nível de proteínas totais. Foram testados, em média, 60 indivíduos distribuídos em duas placas para cada enzima testada.

Todos os reagentes empregados nos testes foram preparados minutos antes da reação, assim, não houve degradação dos substratos em função da luz e temperatura.

Mosquitos adultos foram macerados em 100 μ l de tampão fosfato de potássio 0,1 M (KH_2PO_4) pH 7,2, em seguida, completado seu volume para 1 ml com o mesmo tampão. Cada indivíduo foi analisado em triplicatas e para todas as placas, utilizou-se uma triplicata de controles positivos e negativos. Os controle positivos para os ensaios da β -esterase foram 25 mg de β -naftol dissolvidos em 5 ml de acetona e, para α -esterase, o controle positivo foi constituído de 25 mg de α -naftol dissolvidos em 5 ml de acetona. As reações da iAChE e proteínas totais não utilizaram nenhum tipo de controle positivo. Os controles negativos foram todos constituídos de apenas KH_2PO_4 (Figura 7).

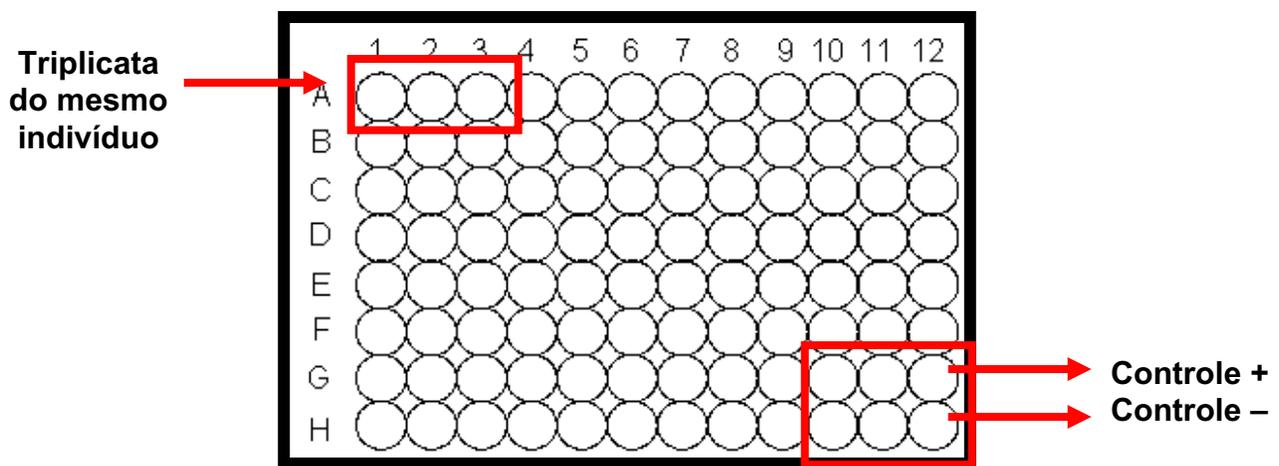


Figura 7: Representação da placa utilizada nos ensaios bioquímicos.

Para a aferição da atividade β -esterásica, uma solução do substrato foi preparada dissolvendo-se 56 mg de β -naftil acetato em 20 ml de acetona e 80 ml de tampão KH_2PO_4 . A solução foi acondicionada em um frasco à prova de luz à 4° C. Uma solução de diamizidina foi preparada dissolvendo-se 100 mg de θ -diamizidina tetrazóica em 100 ml de água destilada. A solução obtida também foi acondicionada nas mesmas condições citadas acima. Em cada poço da placa foram adicionados 100 μ l do homogenato, em seguida, adicionados 100 μ l da

solução do substrato e a placa incubada à temperatura ambiente por dez minutos. Após o término da incubação, foram acrescentados 100 µl da solução de diamizidina, incubado por mais dois minutos e finalmente feita a leitura fotocolorimétrica em leitor de ELISA (BIORAD, microplate reader 3550) em filtro 540 nm. A atividade da α -esterase pôde ser analisada seguindo o mesmo protocolo da β -esterase, apenas modificando o substrato para α -naftil acetato.

A atividade da acetilcolinesterase foi detectada através do teste chamado de ensaio da acetilcolinesterase insensível. Para isto, uma solução de acetiltiocolina iodada (ATCh) contendo 75 mg de ATCh, 21 mg de propoxur, diluído em 10 ml de acetona e 90 ml de tampão KH_2PO_4 . Uma segunda solução, a DNTB, foi feita com 13 mg de ácido ditio-bis-2-nitrobenzóico (DNTB) diluída em 100 ml de tampão KH_2PO_4 . Todas as duas soluções foram acondicionadas em frascos à prova de luz à 4° C. Em cada poço foram pipetados 100 µl de homogenato, em seguida, pipetou-se 100 µl da solução ATCh e mais 100 µl da solução DNTB. Foi realizada uma leitura imediata da absorbância da placa em filtro de 414 nm e, uma outra após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente.

Um ensaio de proteínas totais foi realizado com o objetivo de traçar um parâmetro entre concentração de proteínas totais e os níveis da enzima em estudo. Para tal reação, uma solução protéica estoque contendo 20 ml do concentrado protéico (BIORAD) diluído em 80 ml de água destilada foi acondicionada a 4° C. Em cada poço contendo 20 µl do homogenato, foram pipetados 80 µl de tampão KH_2PO_4 e 200 µl da solução protéica. A leitura foi feita imediatamente utilizando-se filtro 620 nm.

Todos os ensaios realizados foram repetidos para garantir a qualidade dos resultados.

6.3 Isoenzimas de esteraes

A eletroforese de esterases foi realizada em 70 indivíduos de cada população, em dois momentos distintos: Setembro de 2004 e Setembro de 2005. Larvas individuais em 4º estágio foram maceradas em 50 µl de água destilada e centrifugadas a 10.000 rpm/4º C por 10 minutos. O sobrenadante foi misturado ao tampão de amostra (azul de bromofenol 0,1% e glicerol 30%) e aplicado em géis de poliacrilamida 6%, de tamanho 14 X 18 cm. Pedacos de papel filtro (Whatman) foram embebidos nas amostras e aplicados no gel. A eletroforese horizontal foi realizada a 4º C por aproximadamente 5 horas de corrida, a 120 V. Esse tempo foi suficiente para a corrida alcançar sete centímetros de comprimento e separar as bandas.

O processo de detecção enzimática foi realizado de acordo com Harris e Hopkinson (1976). Para identificar os *loci* e os alelos da α e β -esterases, dois géis foram corridos com as mesmas amostras e corados separadamente, um com α -naftil acetato e outro com β -naftil acetato. Após mapear onde havia atividade enzimática, todos os géis seguintes foram incubados com os dois substratos ao mesmo tempo. A coloração consistiu de 15 mg de α -naftil acetato, 25 mg de β -naftil acetato e 50 mg de RR-Salt, diluídos em 2 ml de acetona e 50 ml de tampão fosfato pH 6,0 (NaH_2PO_4 0,2 M e Na_2HPO_4 0,2 M). Após uma hora a 37º C, em ausência de luz, a solução de coloração foi diluída com água destilada na proporção de 1:4. O recipiente foi coberto com papel alumínio e acondicionado a 27º C *overnight*.

Os *loci* e alelos foram numerados de acordo com a nomenclatura descrita por Neale, Weber e Adams (1984). A frequência alélica e os parâmetros de variabilidade genética foram calculados utilizando o Tools for Population Genetics Analyses (TFPGA), versão 1.3 (MILLER, 1997). Desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg foram testados para cada *locus* e população, usando o teste exato proposto por Haldane (1954) e corrigido por Bonferroni (Lessios, 1992).

6.4 Extração de DNA

O DNA foi extraído de mosquitos individuais de acordo com o protocolo de Ayres et al. (2003). Foram extraídos 50 indivíduos de cada população. Os mosquitos foram macerados individualmente, em microtubo de 1,5 ml, em uma solução contendo 400 μ l de tampão de lise (NaCl 5M, Tris-HCl 1 M e EDTA 0,5 M pH 8.0), 7 μ l de proteinase K (SIGMA) (10 mg/ml) e 72 μ l de SDS 10%. O material foi incubado a 65° C por no mínimo 8 horas. A cada tubo foram acrescentados 420 μ l de NaCl 5M, os mesmos foram homogeneizados e centrifugados a 12.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo de 2,0 ml, adicionado 1 volume de isopropanol e incubado a -20° C por 1 hora. Após a incubação, os microtubos foram centrifugados por 12.000 rpm por 20 minutos. O sedimento foi lavado com 500 μ l de etanol 70%, homogeneizado e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento seco e ressuscitado em 150 μ l de T.E. (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) estéril. Todos os DNAs foram avaliados quanto à sua integridade, por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

6.5 PCR

Indivíduos de sete populações foram avaliados por PCR para o *exon 4* do gene da α -esterase: Engenho do Meio (EM), Recife-Resistente (Rec-R), Parnamirim (PN), Nossa Senhora de Fátima (NSF), Casa Forte (CF), Morro da Conceição (MC), Brasília Teimosa (BT) e Araripe-CE (AR). Os *primers* para amplificação do *exon 4* em *Aedes aegypti*, foram desenhados através da análise do alinhamento de várias seqüências do gene entre outras espécies, já que o mesmo ainda não foi descrito no gênero *Aedes*. O gene foi localizado no genoma do *Ae. aegypti* disponível no site do projeto TIGR (*The Institute for Genomic Research*: <http://www.tigr.org/msc/aedes/aedes.shtml>), através de uma busca utilizando como modelo o *exon 4* do gene *est α 2* do mosquito *Culex quinquefasciatus* (número de acesso Z47988). Cinco *primers* foram desenhados,

sendo dois 5' (A2X4R1 e A2X4R2) e três 3' (A2X4L1, A2X4L2 e A2X4L3) (Figura 7). Os cinco *primers* geraram seis combinações:

Set 1: A2X4L1 e A2X4R1 = 150 pb

Set 2: A2X4L1 e A2X4R2 = 152 pb

Set 3: A2X4L2 e A2X4R1 = 153 pb

Set 4: A2X4L2 e A2X4R2 = 155 pb

Set 5: A2X4L3 e A2X4R1 = 178 pb

Set 6: A2X4L3 e A2X4R2 = 180 pb

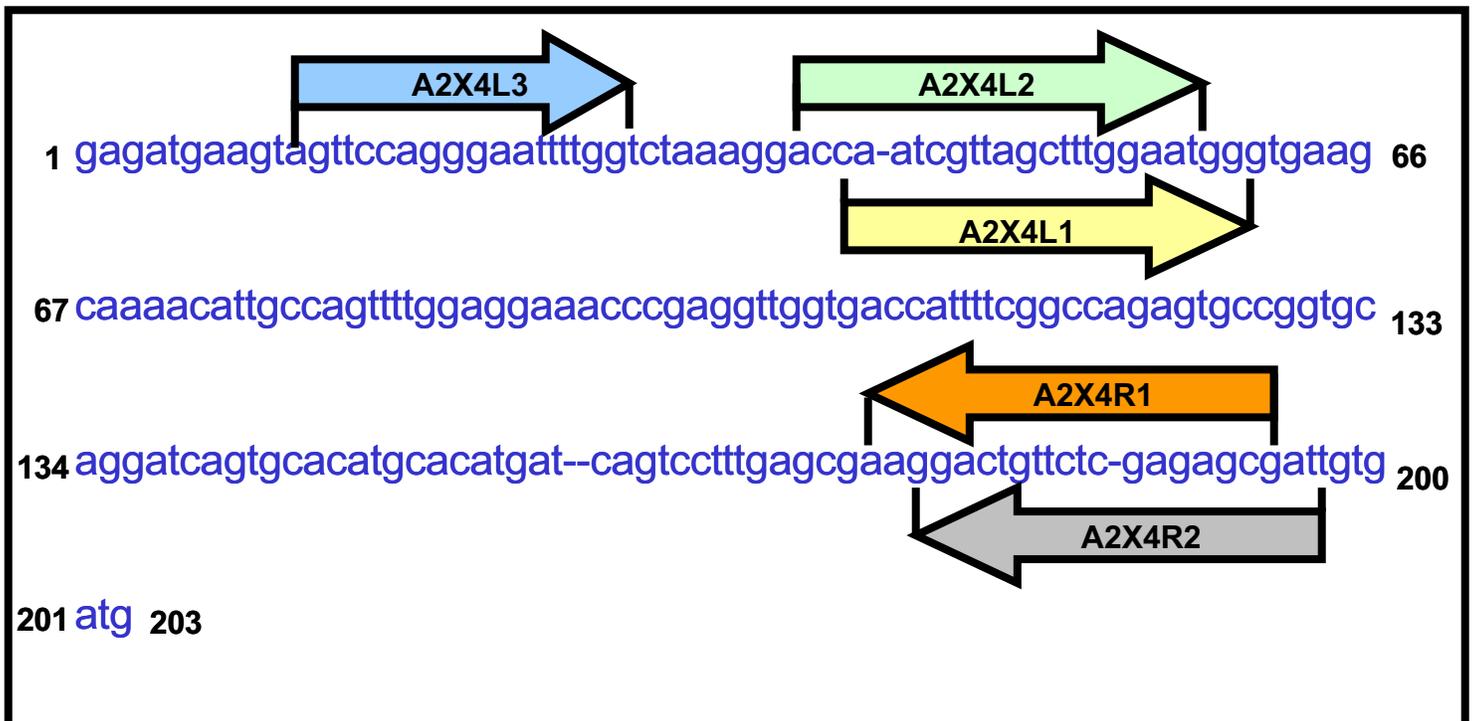


Figura 8: Localização dos *primers* utilizados no exon 4 do gene da α -esterase do mosquito *Ae. aegypti*.

Cinquenta indivíduos foram testados para as diferentes combinações de *primers*. As reações foram preparadas em um volume final de 25 μ l por tubo contendo: 200 ng de DNA genômico; 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP-PROMEGA); 1,5 mM de $MgCl_2$; 10 pmol de cada *primer*; 1U da enzima Taq DNA polimerase (PROMEGA) e tampão da enzima (Tris-HCl 200 mM, KCl 200

mM, pH 8,4). A amplificação foi realizada em um termociclador (EPPENDORF Mastercycler gradiente), utilizando as seguintes condições: 95° C por 5 minutos, 35 ciclos de 95° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto. Uma temperatura final de extensão a 72° C por 10 minutos foi utilizada antes da reação ser finalizada em 4° C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 0,8% corados com brometo de etídeo.

6.6 Seqüenciamento

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o *Kit Montage PCR₉₆ Cleanup* (Millipore), de acordo com as recomendações do fabricante. Uma vez purificadas por filtração a vácuo, as amostras foram ressuspendidas em T.E. (Tris 10 mM, EDTA 1mM, Tween 20 0.05%, pH 9.0). Foram selecionados 5 indivíduos de cada população: Engenho do Meio, Recife-Resistente, Parnamirim, Nossa Senhora de Fátima, Casa Forte e Morro da Conceição, para cada um dos sets de *primers*, totalizando 25 indivíduos por população. Os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação do seqüenciamento, utilizando-se o Big Dye Terminator Ready Reaction Kit v1.1 (Applied Biosystems). Em cada reação foram utilizados 0,5 µl do Terminator Ready Reaction v1.1 (Applied Biosystems), 2,0 µl do tampão de seqüenciamento ABI, 5 pmol de cada primer, 1,0-2,0 µl do DNA molde e 10 µl de água ultrapura (Millipore). A reação de seqüenciamento foi realizada em um termociclador (Eppendorf), utilizando as seguintes condições: 25 ciclos de 96° C por 10 s, 50° C por 5s e 60° C por 4 minutos. A reação foi novamente purificada, desta vez utilizando colunas Centri-Sep (Princeton Separations), secas em um concentrador e ressuspendidas em 15 µl de HI-DI (formamida) antes de serem colocadas no seqüenciador. As reações de seqüenciamento foram realizadas no Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC – Atlanta, GA), utilizando o seqüenciador automático ABI 3100da Applied Biosystems. Os programas utilizados para a análise das seqüências foram o Chromas Lite, Clustal W, DnaSP e o Mega. O Chromas Lite foi utilizado para a análise dos eletroferogramas, o Clustal W foi utilizado no alinhamento dos *contigs* (seqüências editadas), o DnaSP para fornecer os dados de polimorfismo de DNA

e o Mega, como ferramenta de análise de sítios polimórficos. Além dos programas acima citados, foram utilizados o conjunto de programas do DNASTar, principalmente o Editseq, que permitiu editar as seqüências obtidas e, o programa SeqMan, que possibilitou a montagem dos *contigs*.

Uma outra análise do sequenciamento foi realizada considerando cada nucleotídeo diferente entre as seqüências analisadas como sítios segregantes polimórficos, após o alinhamento entre elas. Neste sentido, calculou-se o índice de número de sítios nucleotídicos polimórficos (p_n), que é descrito de acordo com a seguinte fórmula abaixo, onde S_n é o número de sítios polimórficos por seqüência e m_T corresponde ao número total de nucleotídeos analisados (Nei, 1987).

$$p_n = S_n/m_T$$

6.7 PCR em Tempo Real

A análise da PCR em Tempo Real (PCRq) para parte do exon 4 do gene *est α 2*, foi realizada em 10 indivíduos de de cada uma das seguintes populações: Engenho do Meio, Dois Irmãos, Casa Forte e Alto José do Pinho. Além dessas quatro localidades, 5 indivíduos de Recife-Resistente e 5 de Arippe – CE foram acrescentados ao estudo. Em todos os testes foram utilizados como controle de susceptibilidade, indivíduos da linhagem Rockefeller. Todos os indivíduos analisados foram testados em duplicatas, para evitar eventuais erros. No geral, 120 indivíduos, incluindo os da linhagem Rockefeller e os controles negativos, de seis localidades distintas, foram analisados através da PCRq.

A técnica da PCR em Tempo Real permite que seja adicionado um composto fluorescente (Sybr Green), que se intercala na fita dupla do DNA, e o mesmo é detectado pelo aparelho, permitindo seguir a cinética de amplificação de um determinado produto de PCR. Ao ser adicionado na reação, o Sybr Green imediatamente se liga a todos os DNAs fita-dupla presentes na amostra. Assim, à proporção que a Taq polimerase amplifica a seqüência-alvo, criando os produtos de PCR, o Sybr Green se liga a cada nova cópia amplificada. Ao final da reação, a

intensidade da fluorescência será proporcional à quantidade de produto de PCR produzida. O nível de fluorescência computado para cada amostra é aquele suficiente para atingir um ciclo limiar, por convenção esse limiar é denominado de *Ct* (*Cycle Treshold*).

Os resultados mais confiáveis foram obtidos utilizando-se a combinação de *primers* (A2X4R1 e A2X4L1), em uma concentração de 2,5 pmoles/ μ l, 50 ng do DNA molde, sob as seguintes condições de PCR: 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de 95° C por 15 segundos, 55° C por 30 segundos e 72° C por 30 segundos.

Todos os indivíduos foram processados em duplicatas, sempre acompanhados de controles Rockfeller e no mínimo dois controles negativos (Sybr Green mastermix, *primers*, água), no ABI Prism 7000 da Applied Biosystems. Dois experimentos independentes serviram para compor os resultados deste trabalho.

Os valores encontrados na PCRq foram submetidos ao teste estatístico de normalidade Shapiro-Wilk. Os resultados encontrados nas populações, foram testados quanto à sua significância, em comparação à linhagem Rockefeller ($P < 0,05$).

VII. RESULTADOS

7.1 Ensaios bioquímicos

Testes bioquímicos foram realizados com o intuito de se identificar qual o mecanismo de resistência envolvido na linhagem Recife-Resistente. Como citado anteriormente, esta população apresentou altos índices de resistência, após avaliação por ensaios biológicos com o temephos. Foram testados três sistemas enzimáticos diferentes: α -esterases, β -esterases e acetilcolinesterase insensível (iAChE).

Os ensaios da α -esterase demonstraram uma atividade enzimática elevada de larvas de Recife-Resistente em relação à linhagem Rockefeller. O limiar de absorvância encontrado para indivíduos Rockefeller foi de 0,9, enquanto que para Recife-Resistente atingiu 1,2. Estes números estão representados no gráfico abaixo (Figura 9).

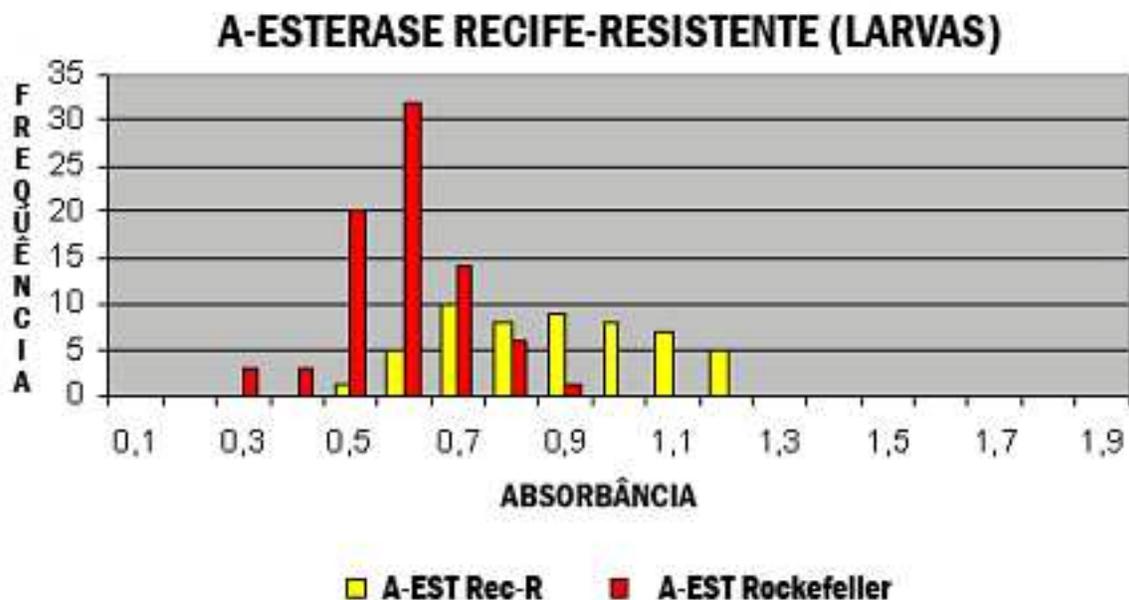


Figura 9: Distribuição das frequências de absorvância em larvas de *Ae. aegypti* para o ensaio bioquímico da α -esterase, em um total de 54 indivíduos da linhagem Recife-Resistente.

Mesmo apresentando níveis elevados de α -esterase, foi possível identificar que estas amostras apresentaram, também níveis muito elevados de β -esterase. O limiar de absorvância encontrado para indivíduos Rockefeller foi de 1,4, enquanto que para Recife-Resistente foi 1,9. Estes números estão representados no gráfico abaixo (Figura 10).

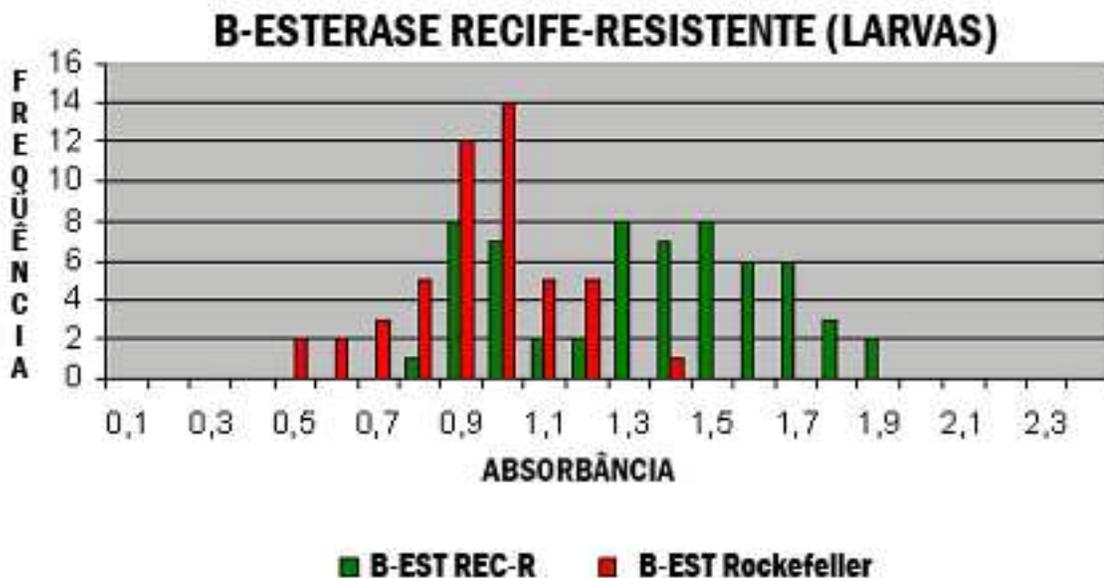


Figura 10: Distribuição das frequências de absorvância em larvas de *Ae. aegypti* para o ensaio bioquímico da β -esterase, em um total de 62 indivíduos da linhagem Recife-Resistente.

A análise bioquímica dos níveis de iAChE, mostrou não haver atividade alterada da acetilcolinesterase nas amostras estudadas quando comparado à linhagem padrão susceptível. O limiar de absorvância encontrado para indivíduos Rockefeller foi de 0,08, no entanto, o limiar atingido em indivíduos provenientes da linhagem Recife-Resistente foi de 0,03. Estes valores estão mostrados no gráfico a seguir (Figura 11).

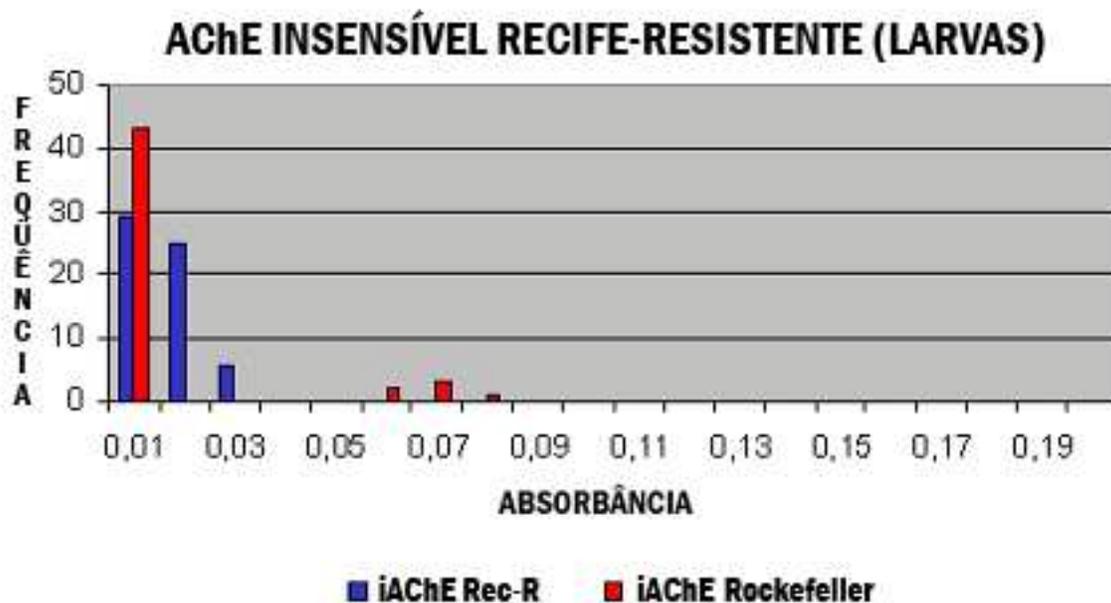


Figura 11: Distribuição das frequências de absorvância em larvas de *Ae. aegypti* para o ensaio bioquímico da iAChE, em um total de 50 indivíduos da linhagem Recife-Resistente.

Os ensaios de proteínas totais foram realizados para quantificar a relação da atividade das enzimas estudadas, e o volume corpóreo dos indivíduos testados. Este teste teve a finalidade de evitar superestimativas das dosagens enzimáticas, oriundas das variações de massa corporal intrínsecas da amostragem. As atividades esterásicas foram comparadas com as dosagens de proteínas totais em cada amostra e indicaram que os valores encontrados não superestimavam os resultados.

7.2 Isoenzimas de esterases

Nesse estudo foram analisados 630 indivíduos de *Ae. aegypti* no total, sendo 70 de cada uma das nove localidades do estado de Pernambuco, em dois períodos diferentes, 2004 e 2005.

Um total de cinco *loci* foi detectado para α e β -esterases, mas apenas quatro foram utilizados nesta análise. O quinto *locus* não foi detectado em todas as populações estudadas, sendo excluído da análise final. Onze alelos foram identificados nestes *loci* e o número de alelos por *locus* variou de 1 a 3. Os valores de heterozigidade observada (H_o) variaram de 0,278 na população de Morro da Conceição a 0,533 na população de Parnamirim em 2004. Em 2005, a H_o variou de 0,388 na população de Brasília Teimosa a 0,608 na população de Engenho do Meio. As freqüências de H_o e heterozigidade esperada H_e estão mostradas na Tabela 2. Os níveis de diferenciação genética das populações (F_{st}) foram baixos, mas apresentaram-se significantes ($P < 0,05$). Entre os anos de 2004 e 2005, os níveis variaram de 0,0385 para 0,0405, respectivamente.

Tabela 3: Valores de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) nas amostras de *Ae. aegypti* coletadas nos anos de 2004 e 2005.

Localidade	2004		2005	
	$H_o \pm SE$	$H_e \pm SE$	$H_o \pm SE$	$H_e \pm SE$
Engenho do Meio	0,442±0,125	0,510±0,066	0,608±0,265	0,499±0,009
Alto José do Pinho	0,506±0,085	0,507±0,067	0,558±0,237	0,502±0,054
Brasília Teimosa	0,481±0,252	0,496±0,059	0,388±0,189	0,472±0,028
Parnamirim	0,533±0,232	0,527±0,040	0,501±0,180	0,482±0,019
Casa Forte	0,493±0,272	0,512±0,038	0,530±0,238	0,444±0,051
Dois Irmãos	0,362±0,160	0,543±0,063	0,465±0,460	0,521±0,023
Morro da Conceição	0,278±0,132	0,488±0,061	0,499±0,287	0,491±0,021
Nossa Senhora de Fátima	0,447±0,200	0,550±0,057	0,396±0,373	0,411±0,177
Recife-Resistente	-	-	0,474±0,094	0,434±0,028

Os géis de isoenzimas apresentaram uma região de alta atividade esterásica, denominada de *locus* 1. Visualmente, esta região apresentou alelos com diferentes intensidades entre as populações analisadas. O alelo responsável pela maior atividade esterásica no loco foi chamado de 3. A frequência deste alelo variou entre as diferentes populações estudadas. Nas populações de CF, PN e EM, a frequência deste alelo aumentou de um ano para o outro, e nas demais populações sua frequência diminuiu, ocorrendo uma redução considerável na população de NSF (Tabela 3). A maior frequência deste alelo foi observado na

população de Recife-Resistente, que correspondeu a 0,214 em 2005. Nos outros *loci*, não foram observados alelos superexpressos.

Tabela 4: Freqüência do alelo superexpresso (3) entre as populações estudadas.

N: tamanho da amostra

Cidade	Localidade	2004		2005		
		N	A	N	A	
Recife	Engenho do Meio	70	0,145	70	0,164	
	Alto José do Pinho	70	0,191	70	0,107	
	Brasília Teimosa	70	0,125	70	0,071	
	Parnamirim	70	0,107	70	0,121	
	Casa Forte	70	0,114	70	0,185	
	Dois Irmãos	70	0,100	70	0,071	
	Morro da Conceição	70	0,127	70	0,085	
	Moreno	Nossa Senhora de Fátima	70	0,121	70	0,010
	Recife-Resistente		-	-	70	0,214

Na Figura 12, é possível notar a diferença na intensidade do alelo superexpresso em indivíduos coletados em 2004 de Engenho do Meio.

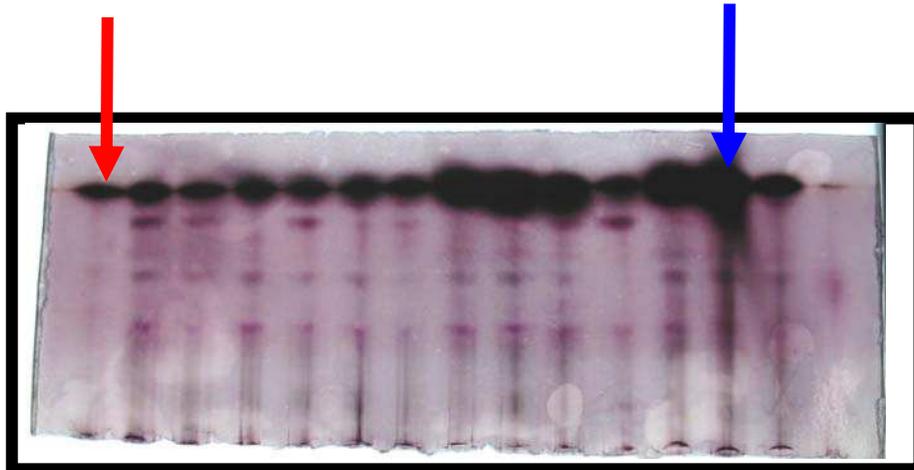


Figura 12: Gel de poliacrilamida 6% mostrando diferentes frequências do alelo superexpresso, na população de Engenho do Meio. Seta vermelha indicando alelo normal e seta azul, o alelo superexpresso.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi rejeitado ($P < 0,05$) para todas as populações em ambos os anos, no entanto, desvios significantes não foram observados nos loci após a correção de Bonferroni (ajuste de significância de 5% para 2004: 0,00156 e 2005: 0,00125).

7.3 PCR

De cada localidade, 56 indivíduos foram submetidos aos 6 *sets* de *primers*, desenhados para amplificar um fragmento de aproximadamente 180 pb, do exon 4 do gene da α -esterase. O sexto *set* não foi reproduzível em todas as populações. Este *set* de *primer* apresentou bandas secundárias, mesmo em altas temperaturas de anelamento. Desta forma, este *set* foi descartado da análise final. As PCRs geraram fragmentos que variaram de 150 (*set* 1) a 180 pares de base (*set* 5), sendo todas as condições otimizadas para a reação gerar apenas um fragmento específico. Estes produtos foram purificados e utilizados na reação de seqüenciamento. A Figura 13 mostra a amplificação do fragmento de esterase, utilizando-se o *set* 3 de *primers*, em indivíduos provenientes de Recife-Resistente.



Figura 13. Gel de agarose 0,8%. M. marcador de peso molecular Ladder 100 pb. Poços 1 a 20: 5 μ l de produto de PCR de indivíduos *Ae. aegypti* da linhagem Recife-Resistente, amplificados com o *set* 3 de *primers*.

7.4 Seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram realizadas em 25 indivíduos de cada população, utilizando-se cinco indivíduos para cada um dos 5 *sets* de *primers*.

Um total de 300 seqüências foi obtido e, posteriormente analisados seus eletroferogramas. Esta análise apontou 40 seqüências de baixa qualidade, as quais foram excluídas da análise final.

Foram construídos 88 *contigs*, utilizando-se 275 seqüências para a construção dos mesmos. Estes *contigs* foram alinhados entre si para análise de homologia entre os nucleomorfos obtidos. Esta análise mostrou que em 180 nucleotídeos de extensão, havia a presença de apenas 4 sítios polimórficos. Foi possível observar que estes sítios se encontravam em indivíduos heterozigotos e não estavam fixados em nenhuma das populações, indicando que não havia variação nos fragmentos estudados, entre as diferentes populações. O alinhamento das seqüências em *An. gambiae*, *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, demonstrou que o gene, aparentemente, pode apresentar *splicing* alternativo. O índice de número de sítios nucleotídicos polimórficos (P_n) foi de 0,022.

7.5 PCR em Tempo-Real

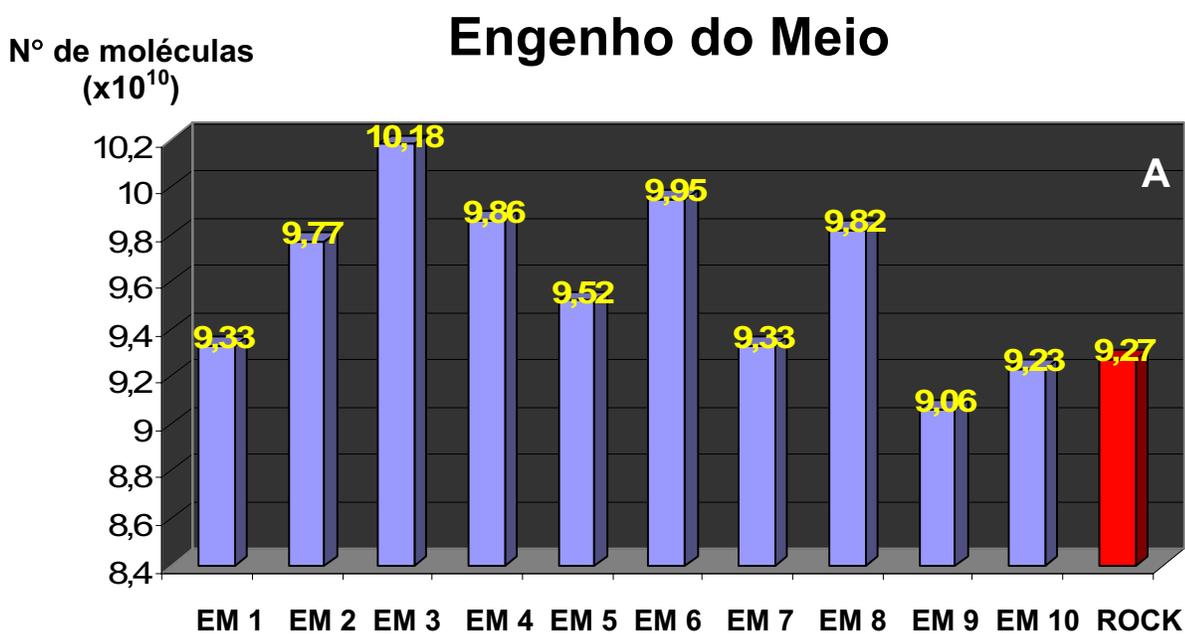
Esta técnica forneceu resultados quantitativos, em relação à amplificação do gene da α -esterase, no DNA de seis populações naturais de *Ae. aegypti*. As reações de PCRq são caracterizadas por indicar o momento exato em que o produto de PCR é inicialmente detectado. Este momento é denominado de *Ct* ou *threshold cycle* (limiar de detecção), o qual representa em números, o resultado final da quantificação. O *Ct* é inversamente proporcional ao número de cópias do alvo em questão, ou seja: quanto menor o *Ct*, maior a quantidade de cópias ao início da reação.

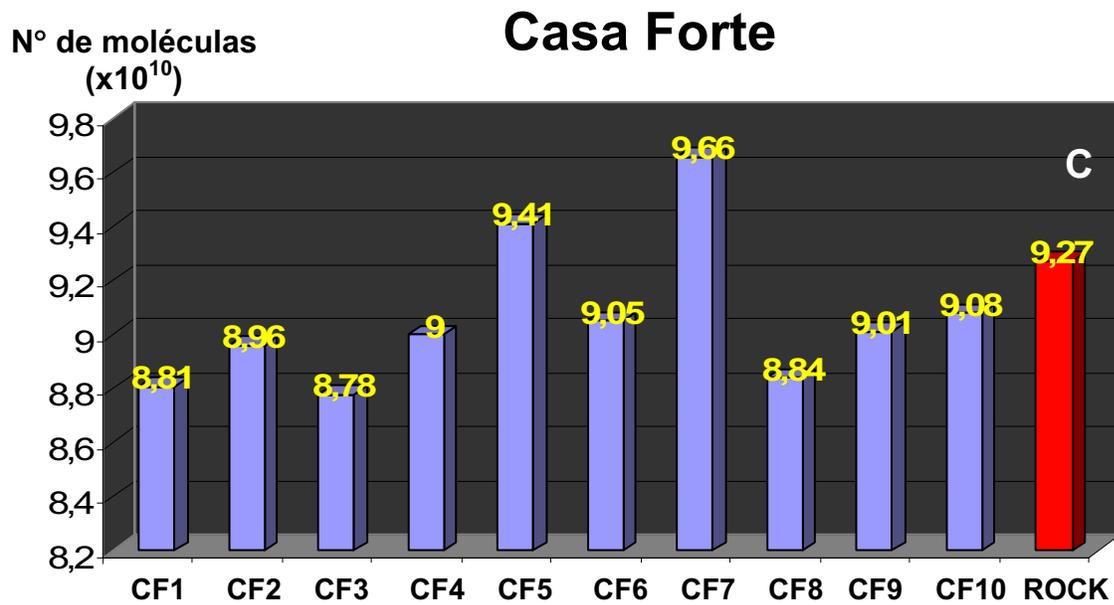
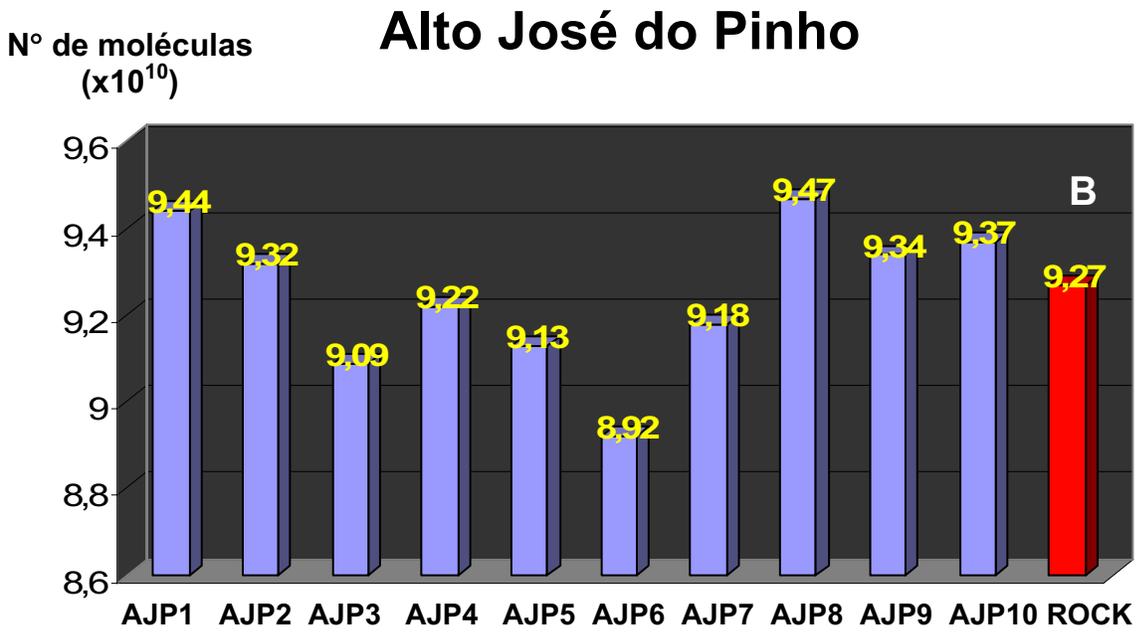
Para quantificação das amostras foi adotado um padrão a partir da amplificação do gene, que codifica parte do exon 4 da α -esterase, com os primers A2X4R1 e A2X4L1. Este produto amplificado foi subseqüentemente purificado e quantificado por espectrofotômetro. A concentração de DNA encontrada foi verificada por eletroforese, utilizando o marcador de massa molecular DNA *Low Mass* (Invitrogen). O valor em μg obtido no fragmento purificado foi convertido em número de moléculas, através da ferramenta de conversão disponível no *site*: <http://molbiol.edu.ru/eng/>. Os *Cts* encontrados para quantidades conhecidas do padrão foram utilizados para quantificação do nº de moléculas, nas amostras submetidas ao ensaio (Tabela 4 e Figura 15).

Tabela 5: Resultados obtidos pela PCR em Tempo Real de parte do exon 4 do gene *est α 2*, através do ciclo limiar (*Ct*) e n^o de moléculas.

População	Indivíduo	<i>Ct</i>	N ^o de moléculas (x 10 ¹⁰)
Engenho do Meio	1	33,16	9,33
Engenho do Meio	2	31,70	9,77
Engenho do Meio	3	30,41	10,18
Engenho do Meio	4	31,41	9,86
Engenho do Meio	5	32,51	9,52
Engenho do Meio	6	31,13	9,95
Engenho do Meio	7	33,21	9,33
Engenho do Meio	8	31,54	9,82
Engenho do Meio	9	34,17	9,06
Engenho do Meio	10	33,54	9,23
Alto José do Pinho	1	32,79	9,44
Alto José do Pinho	2	33,23	9,32
Alto José do Pinho	3	34,04	9,09
Alto José do Pinho	4	33,58	9,22
Alto José do Pinho	5	33,91	9,13
Alto José do Pinho	6	34,69	8,92
Alto José do Pinho	7	33,72	9,18
Alto José do Pinho	8	32,69	9,47
Alto José do Pinho	9	33,15	9,34
Alto José do Pinho	10	33,05	9,37
Casa Forte	1	35,14	8,81
Casa Forte	2	34,57	8,96
Casa Forte	3	35,26	8,78
Casa Forte	4	34,39	9
Casa Forte	5	32,89	9,41
Casa Forte	6	34,22	9,05
Casa Forte	7	32,07	9,66
Casa Forte	8	35,05	8,84
Casa Forte	9	34,37	9,01
Casa Forte	10	34,08	9,08
Dois Irmãos	1	33,35	9,29
Dois Irmãos	2	33,67	9,2
Dois Irmãos	3	34,41	9
Dois Irmãos	4	37,58	negativo
Dois Irmãos	5	33,25	9,31
Dois Irmãos	6	32,95	9,4
Dois Irmãos	7	32,90	9,41
Dois Irmãos	8	32,70	9,47
Dois Irmãos	9	33,38	9,28
Dois Irmãos	10	34,35	9,02
Recife-Resistente	1	33,03	9,38
Recife-Resistente	2	34,96	8,86

Recife-Resistente	3	34,27	9,04
Recife-Resistente	4	34,51	8,97
Recife-Resistente	5	33,20	9,33
Araripe	1	30,86	10,04
Araripe	2	31,58	9,81
Araripe	3	32,44	9,55
Araripe	4	32,62	9,5
Araripe	5	32,28	9,6
Rockefeller	1	33,41	9,27





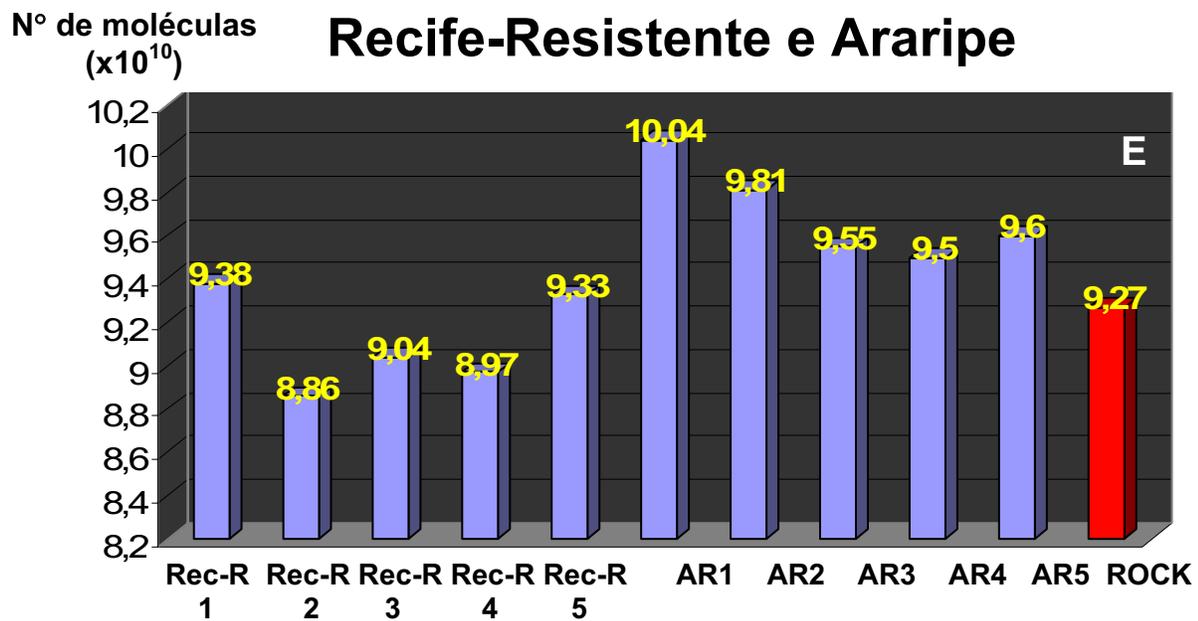
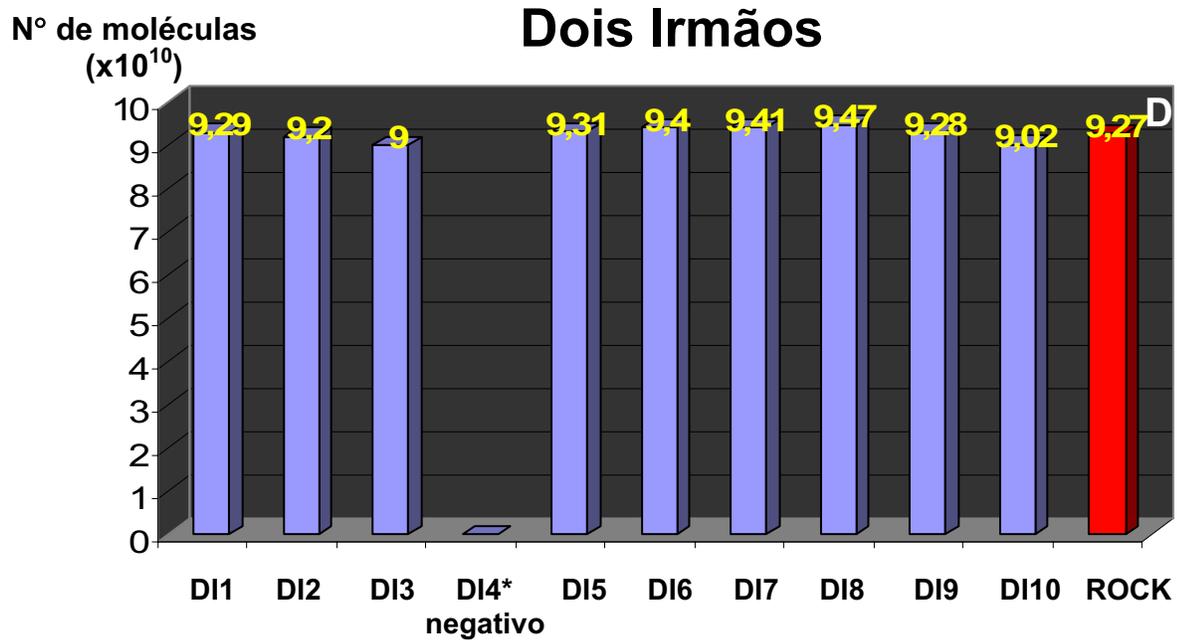


Figura 14: Gráfico representativo da PCR em Tempo Real de parte do exon 4 do gene *estα2*. Ordenadas representando o número de moléculas (x10¹⁰) e abscissas, nº de moléculas encontradas em cada população comparadas à referência Rockefeller. **A.** Engenho do Meio, **B.** Alto José do Pinho, **C.** Casa Forte, **D.** Dois Irmãos e **E.** Recife-Resistente e Araripe.

* Indivíduo com *Ct* maior que o controle negativo.

Os valores encontrados na PCRq para as populações de Engenho do Meio e Araripe foram os únicos significativamente maiores que os valores da linhagem susceptível de Rockefeller. Os controles negativos tiveram um *Ct* de aproximadamente 37, no entanto, a curva de dissociação mostrou que apesar do alto *Ct* apresentado, não houve amplificação nestes controles (Figura 15). Desta forma, os *Ct*s encontrados em indivíduos de populações naturais acima de 37, foram considerados negativos (nenhuma ou baixa amplificação).

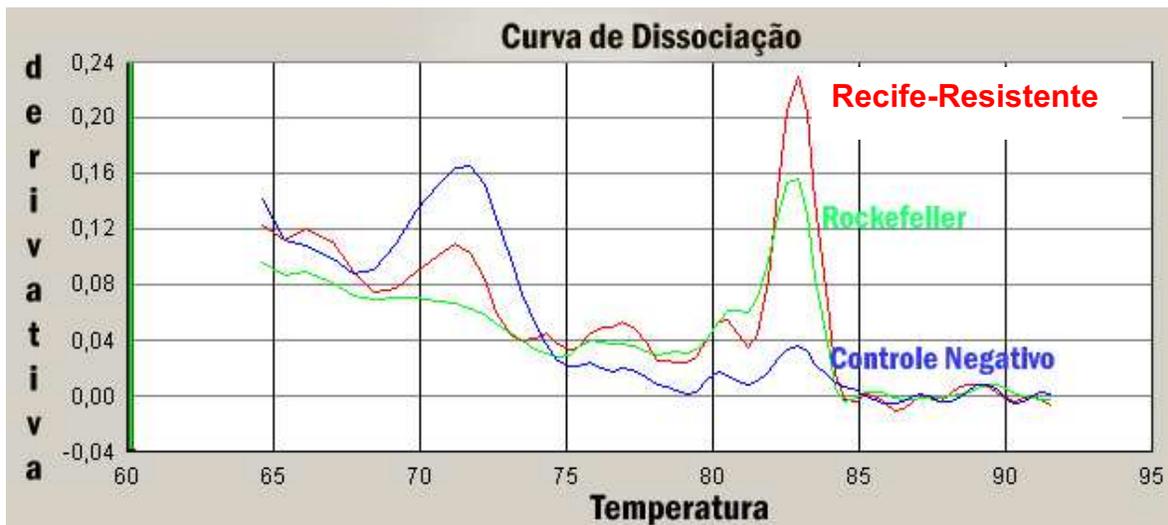


Figura 15: Curva de dissociação representativa das amostras da linhagem Recife-Resistente, Rockefeller e do controle negativo.

VIII. DISCUSSÃO

O mecanismo de resistência ao inseticida organofosforado temephos foi confirmada na linhagem Recife-Resistente de *Aedes aegypti*. Níveis alterados de atividade esterásica, sem níveis alterados de AChE, foram obtidos nos ensaios bioquímicos realizados nesta população. Resultados como estes corroboram os valores encontrados previamente, quando esta mesma população foi submetida a ensaios biológicos e exibiu uma mortalidade de apenas 16,8% ao inseticida temephos (MELO SANTOS et al., dado não publicado). Apesar dos organofosforados possuírem a AChE como alvo de ação, níveis elevados desta enzima nunca foram relatados para populações naturais de *Ae. aegypti* resistentes a organofosforados. Mazzari e Georghiou (1995), analisando amostras de *Ae. aegypti* resistentes a organofosforados, obtiveram níveis elevados de esterases sem a elevação da AChE nestas populações. Níveis elevados de esterases também foram relatados para amostras desta espécie, resistentes ao temephos (VAUGHN; FFRENCH-CONSTANT, 1998). Flores et al. (2005) encontraram resultados similares ao analisar populações de *Ae. aegypti* provenientes do México. Os autores relataram resistência ao piretróide clorpirifós, através da elevada atividade de esterases e uma baixa atividade da AChE. Os resultados obtidos na linhagem Recife-Resistente ainda apontam para uma elevação maior nos níveis de β -esterases, quando comparadas aos níveis de atividade α -esterásicas. Este resultado similar ao descrito por Hawkes e Hemingway (2002). Os autores, ao analisarem a região promotora do gene da esterase em uma linhagem resistente de *Cx. quinquefasciatus*, identificaram uma atividade β -esterase três vezes maior do que a atividade α -esterase.

A grande maioria dos estudos de isoenzimas, que utilizam as esterases como marcadores não-neutros, evidenciam apenas a expressão e o padrão dessas enzimas nos géis (FIELD; HITCHEN; REES, 1984; SOUZA-POLEZZI; BICUDO, 2005). Por outro lado, a análise das isoenzimas esterásicas pode fornecer outros dados importantes a respeito das populações estudadas.

A análise ao longo do tempo das esterases mostrou uma variação nas freqüências alélicas entre os anos de 2004 e em 2005. Os níveis de

heterozigosidade observada aumentaram de um ano para o outro. A ausência de dados de heterozigosidade (H) nestas populações, referentes a um momento anterior à utilização do inseticida biológico *Bti*, torna difícil uma análise comparativa utilizando-se apenas estes dois momentos, referentes a dois e três anos após a introdução do *Bti*. Os resultados encontrados estão de acordo com os descritos por Lerdthusnee e Chareonviriyaphap (1999), os quais utilizaram isoenzimas para avaliar o efeito antes e após a introdução do *Bti* no controle de populações de *Ae. aegypti* da Tailândia. Os autores observaram valores de H de 0,147 antes do tratamento, uma diminuição para 0,069 após a introdução do *Bti* e, após cinco meses, uma retomada para 0,254. A elevação dos valores de H mencionados pelos autores e, os valores observados em nossas populações, demonstram uma restauração desses valores após o efeito *bottleneck* (gargalo de garrafa) do temephos nestas populações. Yan, Chadee e Severson (1998) afirmam que a seleção por inseticidas químicos diminui a diversidade genética da população naqueles *loci* que conferem resistência e, em outros *loci* próximos, os quais também podem apresentar diminuição na diversidade genética devido ao efeito genético de *hitchhiking* (efeito-carona). Os valores de diferenciação genética (F_{st}) encontrados entre as populações nos anos de 2004 ($F_{st} = 0,0385$) e 2005 ($F_{st} = 0,0405$), estão bem abaixo dos valores descritos por Ayres et al. (2004), de 0,177. Entretanto, apesar destes valores estarem abaixo dos valores descritos anteriormente, estes foram significativos.

A análise dos géis de isoenzimas revelou a presença de alelos expressos em diferentes intensidades, nas diferentes populações estudadas. Estas observações também foram realizadas por Wirth e Georghiou (1999), os quais relataram o aparecimento de resistência ao temephos, associada aos elevados níveis de esterase em populações de *Ae. aegypti* de Tortola, nas Ilhas Virgens. Em alguns indivíduos analisados neste trabalho, foi possível a identificação de um terceiro alelo (3) localizado no loco 1, e a sua presença foi relacionada a uma maior atividade enzimática naquele loco. A identificação de um alelo responsável pela resistência foi também relatada por Rodriguez et al. (2002) em amostras de *Ae. aegypti* resistentes ao temephos. O alelo 3, identificado neste trabalho,

apresentou diferentes freqüências entre as populações estudadas nos anos de 2004 e 2005. A linhagem Recife-Resistente apresentou a maior freqüência deste alelo (0,214) entre todas as populações estudadas. Nas populações de Casa Forte, Parnamirim e Engenho do Meio, a freqüência do alelo resistente aumentou de um ano para o outro. Estes resultados encontrados sugerem que os intervalos de tratamento com o Bti são longos o suficiente para permitir rearranjos populacionais. Foi observada uma diminuição considerável na freqüência do alelo 3 na população de Nossa Senhora de Fátima em 2005. Esta diminuição é o resultado de uma coleta de ovos maciça, e da utilização do Bti com intervalos de tratamentos mais curtos do que nas demais populações analisadas. De uma maneira geral, a freqüência do alelo de resistência foi similar entre as localidades estudadas, indicando um efeito de seleção uniforme sobre os alelos. Esta pressão de seleção contrapõe ao efeito da deriva genética.

A linhagem Recife-Resistente apresentou a maior freqüência deste alelo, por outro lado, Dois Irmãos foi a população com menor freqüência do alelo 3. Souza-Polezzi e Bicudo (2005) identificaram diferentes freqüências alélicas, comparando os resultados obtidos, em um intervalo de cinco anos atrás, utilizando-se da mesma população de *Ae. aegypti*. Segundo os autores, mudanças no grau de expressão daquele determinado alelo são o resultado da interação ambiente/indivíduo. Desta forma, as populações avaliadas no presente trabalho apresentaram uma distinta relação: nível de resistência/freqüência do alelo de resistência. Esta relação é notável na linhagem Recife-Resistente, onde a baixa mortalidade causada pelo temephos e a constante pressão de seleção submetida, são traduzidas em maior freqüência do gene superexpresso da esterase entre as populações sob estudo. Os resultados obtidos indicam que o método de isoenzimas esterásicas é sensível o suficiente para detectar variações na freqüência dos alelos superexpressos, em populações naturais de *Ae. aegypti*, ao longo do tempo. O monitoramento da freqüência deste alelo poderá auxiliar o manejo da resistência ao inseticida químico, em trabalhos de campo.

O seqüenciamento de parte do gene da α -esterase nas populações de *Ae. aegypti*, forneceu uma fonte de informação a respeito deste gene, que até então

não havia sido descrito para esta espécie. As seqüências mostraram haver a presença de apenas quatro sítios polimórficos (SNPs) e, que estas mutações encontravam-se apenas em indivíduos heterozigotos, sugerindo não haver a fixação de diferentes alelos de resistência nestas populações. Morlais e Serverson (2003) sugerem que a distribuição de SNPs entre os genes nucleares de *Ae. aegypti*, seja em média, de 12 SNPs a cada mil pares de base ($\pi = 0,0122$). Como no presente trabalho observamos 4 SNPs em 180 pb ($\pi = 0,0222$), este valor apresenta aproximadamente o dobro do valor descrito por Morlais e Severson (2003). Este alto grau de heterogeneidade nucleotídica sugere que determinados genes, dependendo da função, apresentem maior frequência de SNPs. (MORLAIS e SEVERSON, 2003). É importante destacar que o fragmento em questão é muito pequeno, representando apenas parte do exon 4 do gene da α -esterase, que ao todo contem 7 exons e 6 introns. Como as esterases são enzimas inespecíficas, este nível de polimorfismo é aceitável. Holt et al. (2002) observaram que o genoma do *An. gambiae* também apresenta regiões com grandes oscilações nas frequências de SNP.

A análise do número de sítios nucleotídicos polimórficos (p_n) mostrou um baixo grau de variabilidade (2,2%), quando comparado aos valores descritos por Guillemaud et al. (1996). Os autores detectaram variações de 8.7% nos éxons e 21.4% nos íntrons do gene da esterase, em populações de *Cx. pipiens* susceptíveis. Este foi o mais alto valor de polimorfismo gênico já descrito em animais. É necessário ainda ressaltar que, o presente trabalho, avaliou o polimorfismo apenas de seqüências do quarto exon do gene da α -esterase, e não no gene inteiro.

Uma informação importante, fornecida pelo alinhamento das seqüências em *An. gambiae*, *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, é que aparentemente o gene pode sofrer *splicing* alternativo (anexo 1). Mecanismo similar foi descrito no gene da GST no mosquito *An. gambiae*. Estudos moleculares comprovaram que *splicings* alternativos presentes nestes genes são as principais formas de se explicar a diversidade das GSTs, tanto em linhagens susceptíveis quanto em resistentes de *An. gambiae* (RANSON; COLLINS; HEMINGWAY, 1998). Neste

caso, as diferentes formas de isoenzimas observadas pelo gel de poliacrilamida podem ser resultantes de um único gene.

A análise da quantificação do gene da α -esterase, nas populações estudadas, foi realizada seguindo três condições básicas: nenhum produto não-específico detectado na análise da curva de dissociação, estudos do log de fluorescência foram analisados em função das várias concentrações de DNA-molde utilizadas e, a ciclagem final utilizada foi estabelecida em função do estudo da curva de amplificação. Estes três critérios foram estabelecidos visando gerar resultados com a maior precisão possível para a quantificação gênica. Os resultados da quantificação indicaram que as populações estudadas não apresentam amplificação gênica para o gene da α -esterase, quando comparadas à linhagem Rockefeller (referência de susceptibilidade). Entretanto nas populações de Engenho do Meio e Araripe, o número de moléculas foi significativamente maior que a linhagem Rockefeller. Estes resultados ainda apresentam-se insuficientes e, precisam de maiores comprovações, como a utilização de uma curva padrão para quantificação absoluta mais detalhada deste gene.

Paton et al. (2000) sugere que apesar dos genes *est α 2* e *est β 2* serem transcritos em uma proporção 1:1, estes são traduzidos de forma desigual. O gene *est β 2* possui uma tradução média de 10:1 em relação à *est α 2*. Os autores sugerem haver a operação de mecanismos de controle transcricionais e traducionais para regular a expressão de genes de esterases em populações resistentes de *Cx. quinquefasciatus*. Os resultados encontrados neste trabalho indicaram que a superexpressão dos genes, na linhagem Recife-Resistente e populações naturais estudadas, é a possível causa da resistência, mas que esta superexpressão deve ser causada por alterações no sítio promotor e não pela amplificação do n° de cópias do gene.

O próximo desafio consiste na incorporação de dados genéticos em programas de controle, como uma ferramenta de avaliação da efetividade das ações de controle de vetores.

IX. CONCLUSÕES

1. As esterases exibem um papel fundamental na resistência ao inseticida químico temephos, em populações naturais de *Ae. aegypti*;
2. O mecanismo de resistência ao temephos, exibido pela linhagem Recife-Resistente, consiste na elevação dos níveis de esterases;
3. Diferentes frequências do alelo superexpresso podem ser detectadas em amostras naturais de *Ae. aegypti*, através da técnica de isoenzimas em gel de poliacrilamida;
4. A análise de parte do exon 4 do gene *est α 2* demonstrou um alto grau de heterogeneidade nucleotídica.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AESCHLIMANN, J. A.; REINERT, M. Acetylcholinesterase and anticholinesterases, em: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. (G. A. Kerkut, e L. I. Gilbert, eds.), Pergamon Press, p. 115-130, 1931.

ALDRIDGE, W. N. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.*, v. 53, p. 110-117, 1953.

ANASTÁCIO, D. B. *Estudo da distribuição espacial da resistência ao inseticida químico temephos em populações de Aedes aegypti, no município do Recife-PE*. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas)-Faculdade Frassinetti do Recife, Recife, 27p. 2003.

APPERSON, C. S.; GEORGHIOU, G. P. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. *J. Econ. Entomol.*, v. 68, n. 2, p. 153-157, 1975.

AYRES et al. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. *J. Med. Entomol.*, v. 40, p. 430-435, 2003.

AYRES et al. Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro- and macrogeographic levels in Brazil. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 20, n.4, p. 350-356, 2004.

BECKER, N. et al. *Mosquitoes and their control*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 377p., 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Monitoramento da Resistência das Populações de Aedes aegypti do País*. Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. *Monitoramento da Resistência das Populações de Aedes aegypti do País*. Brasília, 2003.

BRENGUES, C. et al. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med. Vet. Entom.*, v. 17, p. 87-94, 2003.

BROGDON, W. G.; DICKINSON, C. M. A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Anal. Biochem.*, v. 131, p. 499-503, 1983.

BROGDON, W. G. Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. *Parasit. Today*, v. 5, p. 56-60, 1989.

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

BROGDON, W. G. et al. Oxidase—based DDT-pyrethroid cross-resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v. 64, p. 101-111, 1999.

CASIDA, J. E. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environ. Health Persp.*, v. 34, p. 189-202, 1980.

COLLINS, F.H. et al. Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, v. 11, p. 409-418, 2002.

CREMLYN, R. *Pesticides. Preparation and mode of action*. John Wiley e Sons, New York, 240 p., 1978.

CROFT, B. A. Developing a philosophy and program of pesticide resistance management. Em: B. E. Tabashnik and R. T. Roush, editors, *Pesticide Resistance in Arthropods*. New York: Chapman and Hall. p. 277-296, 1990.

CROW, J. F. Genetics of resistance to chemicals. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 2, p. 227-246, 1957.

DENHOLM, I.; ROLLAND, M. W. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 37, p. 91-112, 1992.

DIABATE, A. et al. The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic entroggression and de novo phenomena. *Trop. Medic. Intern. Health*, v. 9, n. 12, p. 1267-1273, 2004.

ELDEFRAWI, A. T. Acetylcholinesterase and anticholinesterases, em: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. (G. A. Kerkut, e L. I. Gilbert, eds.), v. 12, Pergamon Press, p. 115-131, 1985.

FAY R. W.; PERRY S. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. *Mosquito News*, v. 25, p. 276-281, 1965.

FERRARI, J. A.. Population genetics in vector biology. Em: Marquardt W. C. & Beaty B. J. *The Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado, Niwot, p. 512-525, 1996.

FEYEREINSEN, R. Insect P450 enzymes. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 44, p. 507-533, 1999.

FINNEY, D.K. Probit analysis. 3rd ed. *Cambridge Univ. Press*, Cambridge, U.K, 1971.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. The molecular and poopulation genetics of cyclodiene insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 24. n. 4, p. 335-345, 1994.

FFRENCH-CONSTANT, R. et al. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Feder. Europ. Bioch. Societ.*, v. 368, p. 461-465, 1995.

FIELD, W. N.; HITCHEN, J. M.; REES, A. T. Esterase activity in strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) tolerant and susceptible to the organophosphate insecticide malathion. *J. Med. Entomol.*, v. 21, p. 412-418, 1984.

FLORES, A. E. et al. Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pest. Biochem. Physiol.*, v. 82, p. 66-78, 2005.

GEORGHIOU, G. P. Management of resistance in arthropods. Em: G. P. Georghiou and T. Saito, editors. *Pest Resistance to Pesticides*. New York, Plenum, p. 769-792, 1983.

GEORGHIOU, G. P.; LAGUNES-TEJEDA, A.; BAKER, J. D. Effect of insecticide rotations on evolution of resistance, em: 5th *Int. Congr. Pestic. Chem. (IUPAC)*, Kyoto. (J. Miyamoto, e P. C. Kearney, eds.), Pergamon Press, Oxford, UK, p. 183-189, 1983.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gluber, D. J., Kuno, G. (Eds.) em: *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, CAB International, New York, p. 1-22, 1997.

GUILLEMAUD, T. et al. Testing the unique amplification event and worldwide migration hypothesis of insecticide resistance genes with sequence data. *Heredity*, v. 77, p. 535-543, 1996.

HALDANE, J. B. S. An exact test for randomness of mating. *J. Genet.*, v. 52, p. 631-635, 1954.

HAWKES, N. J.; HEMINGWAY, J. Analysis of the promoters for the β -esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Acta*, v. 1574, p. 51-62, 2002.

HAYES, J. D.; WOLF, C. R. Role of glutathione transferase in drug resistance. In: Sies, H., Ketterer, B. (Eds), *Glutathione conjugation*. Academic Press, p. 315, 1988. *Apud* HEMINGWAY, J. et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 34, p. 653-665, 1988.

HEMINGWAY, J.; CALLAGHAN, A.; AMIN, A. M. Mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Saudi Arabia. *Med. Vet. Entomol.*, v. 4, p. 275-282, 1990.

HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. H. P. P. Mosquito carboxylesterases: A review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med. Vet. Entomol.*, v. 12, p. 1-12, 1998.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 45, p. 371-391, 2000.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 30, p. 1009-1015, 2000.

HEMINGWAY, J. et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 34, p. 653-665, 2004.

HILL, D. S.; WALLER, J. M. Pests and diseases of tropical crops, em: *Principles and methods of control*. Longman, London and New York, 1982.

HOLT et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, v. 298, p. 129-149, 2002.

KARUNARATNE, S.H.P.P. et al. Kinetic and molecular differences in the amplified and non-amplified esterases from insecticide-resistant and susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 31124-31128, 1995.

KARUNARATNE, S. H. P. P. et al. Amplification of a serine esterase gene is involved in insecticide resistance in Sri Lanka *Culex tritaeniorhynchus*. *Insect Mol. Biol.*, v. 7, p. 307-315, 1998.

LERDTHUSNEE, K.; CHAREONVIRIYAPHAP, T. Comparison of isozyme patterns of *Aedes aegypti* populations collected from pre- and post-*Bacillus thuringiensis israelensis* treatment sites in Thailand. *J. Am. Mosq.*, v. 15, p. 48-52, 1999.

LESSIOS, H. A. Testing electrophoretic data for agreement with Hardy-Weinberg expectations. *Mar. Biol.*, v. 112, p. 517-523, 1992.

LIMA, J. B. P., et al. 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.*, v. 68, n. 3, p. 329-333, 2003.

MACORIS, M. L. G. et al. Modificação da susceptibilidade de *Aedes (Stegomyia) aegypti* ao temephos. *Rev. Pat. Trop.*, v. 24, n. 1, p. 31-40, 1995.

MACORIS, M.L.G. et al. Alteração da resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Públ.*, v. 33, n. 5, p. 521-522, 1999.

MACORIS, M.L.G. et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 5, p. 703-708, 2003.

MADDRELL, S. H. P. The insect neuroendocrine system as a target for insecticides, em: *Insect neurobiology and pesticide action*. Society of Chemical Industry, London, p. 329-334, 1980.

MATHENGUE, E. M. et al. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. *J. Med. Entomol.*, v. 38, n. 4, p. 531-536, 2001.

MAZZARI, M. B.; GEORGHIOU, G. P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 11, p. 315-322, 1995.

MILLER, M. P. Tools For Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by autor, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. *Reunião técnica para a discussão do status de resistência de Aedes aegypti e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil*. Relatório final, 30 pp. Brasília, 2000.

MONATH, T. P. Yellow fever and dengue- the interactions of virus, vector and host in re-emergence of epidemic disease. *Semin. Virol.*, v. 5, p. 133-145, 1994.

MORLAIS, I.; SEVERSON, D. W. Intraspecific DNA variation in nuclear genes of the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, v. 12, n. 6, p. 631-639, 2003.

MOUCHES, C. et al. Amplification of an esterase gene is possible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science*, v. 233, p. 778-780, 1986.

MULLA, M. S.; DARWAZEH, H. A.; ZGOMBA, M. Effect of some environmental factors on the efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against mosquitoes. *Bull. Soc. Vector Ecol.*, v. 15, p. 166-175, 1990.

NEALE, D. B.; WEBER J. C.; ADAMS, W. T. Inheritance of needle tissue isozymes in Douglas fir. *Can. J. Genet. Cytol.*, v. 26, p. 459-468, 1984.

NEI, M. DNA polymorphism within and between populations. In: *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, 1987.

NELSON, D. R. et al. The P450 superfamily – update on new sequences, gene-mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA Cell Biol.*, v. 12, p. 307-317, 1993.

PATON, M. G. et al. Quantitative analysis of gene amplification in insecticide-resistant *Culex* mosquitoes. *Biochem. J.*, v. 346, p. 17-24, 2000.

RANSON, H. et al. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from DDT resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.*, v. 324, p. 91-102, 1997.

RANSON, H.; COLLINS, F. H.; HEMINGWAY, J. The role of mRNA splicing in generating heterogeneity within the *Anopheles gambiae* class I glutathione S-transferase gene family. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, v. 95, n.24, p. 14284-14289, 1998.

RANSON et al. Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, v. 11, n. 5, p. 409-418, 2002.

RANSON, H., HEMINGWAY, J. *glutathione S-transferases*, em: *Insect pharmacology and control*, Glibert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. (Eds.). Elsevier Ltd, Oxford, UK, 2004.

RAYMOND, M. et al. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philos. Trans. R. Soc. London*, v. 353, p. 1707-1711, 1998.

RETNAKARAN, A. et al. Insect Growth Regulator, em: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. (G. A. Kerkut, e L. I. Gilbert, eds.), v. 12, Pergamon Press, p. 529-601, 1985.

REY, L. Dípteros Nematóceros: Anofelinos e Culicíneos. Em: *Bases da Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (ed), p. 312-323, 2002.

RODRÍGUEZ, M. M. et al. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J. Med. Entomol.*, v. 36, n. 6, p. 882-888, 2002.

ROOKER et al. Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity*, v. 77, p. 555-561, 1996.

RUIGT, G. S. Pyrethroids, em: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. (G. A. Kerkut, e L. I. Gilbert, eds.), v. 12, Pergamon Press, p.183-263, 1985.

SALINAS, A. E.; WONG, M. G. Glutathione S-transferases – A review. *Current Med.Chem.*, v. 6, p. 279-309, 1999.

SAWICKI, R. Definition, detection and documentation of insecticide resistance. In: FORD, M. G., HOLLOMAN, D. W., KHAMBAY, B. P. S. e SAWICKI, R. M. (eds.), *Combating resistance to xenobiotics*. Ellis Horwood, Chichester, England, p. 105-107, 1987.

SCHLEISSMAN, D. J.; CALHEIROS, L. B. A review of the status of yellow fever and *Aedes aegypti* eradication programs in the Americas. *Mosq. News*, v. 34, p. 1-9, 1974.

SIMARD et al. First report of knockdown mutations in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *Am. J. Trop. Hyg.*, v. 75, n. 5, p. 795-797, 2006.

SMALL, G. J.; HEMINGWAY, J. Molecular characterization of the amplified carboxylesterase gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol. Biol.* v. 9, n. 6, p. 647-653, 2000.

SMALL, G. J.; HEMINGWAY, J. Differential glycosylation produces heterogeneity in elevated esterases associated with insecticide resistance in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Stal. Ins. Biochem. Mol. Biol.*, v. 30, p. 443-453, 2000b.

SODERLUND, D. M.; KNIPPLE, D. C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 33, p. 563-577, 2003.

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

TABACHNICK, W. J.; BLACK IV, W. C. Population genetics in vector biology. Em: Marquardt W. C. & Beaty B. J. *The Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado, Niwot, p. 417-437, 1996.

TAYLOR, P. Anticholinesterase agents, em: *The pharmacological basis of therapeutics* (A.G. Gilman, L. S. Goodman, and A. Gilman, eds.), 6th edition, Macmillan, New York, p. 100-119, 1980.

TIJET, N.; HELVIG, C.; FEYEREISEN, R. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, v. 262, p. 189-198, 2001.

VAUGH, A.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Biochemical monitoring of organophosphorous and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. *Med. Vet. Entomol.*, v. 12, p. 318-32, 1998.

VILLANI, F. et al. Inheritance and activity of some esterases associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the complex of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.*, v. 73, p. 153-170, 1983.

VONTAS, J. G.; SMALL, G. J.; HEMINGWAY, J. Glutathione S-transferases as antioxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.*, v. 357, p. 65-72, 2001.

VULULE, J. M. et al. Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. *Med. Vet. Entomol.*, v. 8, p. 71-75, 1994.

WEILL, M. et al. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, v. 423, p. 136-137, 2003.

WILCE, M. C.; PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1205, p. 1-18, 1994.

WIRTH, M. C.; GEORGHIOU, G. P. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 15, p. 315-320, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATIONS (WHO). Safe use of pesticides. 14th report of the WHO Expert Committee on vector biology and control. *Technical Report Series*, n. 813, Geneva, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATIONS (WHO) 2005. The WHO recommended classification of pesticides by hazard. Disponível em: www.who.org/tdr. Acesso em: 30/01/2006.

YAN, G.; CHADEE, D. D.; SEVERSON, D. W. Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics*, v. 148, p. 793-800, 1998.

ZAIM, M.; GUILLET, P. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasit.*, v. 18, n. 4, p. 161-163, 2002.

XI. ANEXOS

Anexo 1:

```

culex_anopheles_aedes.MSF.msf MSF: 1998 Type: D Thursday, 19 de January de
2006 Check: 3906 ..
Name: Culex_alfa_2.SEQ Len: 1998 Check: 1750 Weight: 1.00
Name: gambiae_a.SEQ Len: 1998 Check: 8081 Weight: 1.00
Name: gambiae_b.SEQ Len: 1998 Check: 6358 Weight: 1.00
Name: alfa_5.SEQ Len: 1998 Check: 6161 Weight: 1.00
Name: CB690927.SEQ Len: 1998 Check: 1556 Weight: 1.00
//
                1                                                    60
Culex_alfa_2.SEQ ACTACTGATGGACGTCGAACACCCGGTTGTGCCGACCCAGTACGGTCCAGTTAGGGGGGT
gambiae_a.SEQ .....GTCGCTGTGACGCAGTACGGCCCAGTGCGAGGCCGT
gambiae_b.SEQ A...TGAGCCAGCCCGATCACCTGTGCTGTGACGCAGTACGGCCCAGTGCGAGGCCGT
alfa_5.SEQ A.....TGGACGTCGAACATCCGGTAGTGCCGACCCAGTACGGTCCAGTTAGGGGGGT
CB690927.SEQ A.....GTCCTGTGGTTTGTACCAAGTATGGTCCTGTTAAAGGAAT

                61                                                    120
Culex_alfa_2.SEQ TCGTAAGTTGGCCGCAACGGGGGTCGATTACTACAGCTTTCAGCGGATTCCGTACGTGCA
gambiae_a.SEQ GAAGAAAACGGCTGCCACCGGTGTGAGTACTTGAACCTCCAGCGTATACTTACTGTAA
gambiae_b.SEQ GAAGAAAACGGCTGCCACCGGTGTGAGTACTTGAACCTCCAGCGTATACTTACTGTAA
alfa_5.SEQ TCGTAAGTTGGCCGCAACGGGGGTCGATTACTACAGCTTTCAGCGGATTCCGTACGTGCA
CB690927.SEQ AAGGAAAACAGCGGCCACGGGTGTAGAGTACTTTCAGTTTTCAACGGATTCCGTATGCTAA

                121                                                    180
Culex_alfa_2.SEQ GCCTCCTGTTGGAGAGTTAGAGTTTAAAG.....
gambiae_a.SEQ ACCACCGATCGGTGAGCGACGCTTTAAAG.....
gambiae_b.SEQ ACCACCGATCGGTGAGCGACGCTTTAAAG.....
alfa_5.SEQ GTCTCCCGTTGGAGAGCTTAGATTTAAGGTAGGGGATTTGGGGTATTGATTGTGGGGTTT
CB690927.SEQ ACCACCTGTGGCGATCTAAGGTTCAAG.....

                181                                                    240
Culex_alfa_2.SEQ .....GATGCTCAACCGCCGAAACCGTGGA
gambiae_a.SEQ .....GATCTGGAGCTGCCAGAGCCATGGA
gambiae_b.SEQ .....GATCTGGAGCTGCCAGAGCCATGGA
alfa_5.SEQ GAAATGATGGTGCTGAGTTTACTCTGATTTTTAGGATGCTCAACCGCCGAAACCGTGGA
CB690927.SEQ .....GATGCTGTACCACCGGCTGCGTGGA

                241                                                    300
Culex_alfa_2.SEQ CGGAACCGTTGGACTGTACCGTCCAAGGCCAGGTGGGTATCAATACAGTAAGTTGCTGA
gambiae_a.SEQ CGGAGCCGCTGGACTGCACCCAGCAGGGCCCCAGTGGATATCAGTTCAACAAGTTGCTGA
gambiae_b.SEQ CGGAGCCGCTGGACTGCACCCAGCAGGGCCCCAGTGGATATCAGTTCAACAAGTTGCTGA
alfa_5.SEQ CGGAACCGTTGGACTGTACCGTCCAAGGCCAGGTGGGTATCAGTACAGCAAGTTGCTGA
CB690927.SEQ CAGAAGAGTTGGACTGTACAGTGCAAGGACCTGCAGGATACCAATTTAGTAAGCTGCAGA

                301                                                    360
Culex_alfa_2.SEQ ACAAATCATTGGAAGAGAGGACAGCTTGCACATGAATGTGTTTACGAAGAAC.....
gambiae_a.SEQ ACAAGATCGTGGGCAGTGAGGATCACCTGTACATGAATGTGTACACGAAAGAG.....
gambiae_b.SEQ ACAAGATCGTGGGCAGTGAGGATCACCTGTACATGAATGTGTACACGAAAGAG.....
alfa_5.SEQ ACAAATCATTGGAAGTGAAGGACAGCTTGCACATGAATGTGTTTACGAAGAAGCGTAAGTT
CB690927.SEQ ATAAAATCATTGGCAATGAGGATTGCCTGCATATGAATGTTTTACGAAAAGT.....

```

	361	420
Culex_alfa_2.SEQ	
gambiae_a.SEQ	
gambiae_b.SEQ	
alfa_5.SEQ	GAATGGACCATTGAACTGTTAGTGGTGTCTGTTGTCGTGGTTATTGTATATATGATTAATAA	
CB690927.SEQ	
	421	480
Culex_alfa_2.SEQCTCGATAGCAAGCAGTTATTACCTGTGATGTTGTATATCCACGGTGGGGCCTTT	
gambiae_a.SEQCTCAAACCGGCAAAATTGCGCCCGGTAATGGTTTGGATTTCATGGGGCGCTTTT	
gambiae_b.SEQCTCAAACCGGCAAAATTGCGCCCGGTAATGGTTTGGATTTCATGGGGCGCTTTT	
alfa_5.SEQ	TTGTAGCTCAATAGCAAGCAGTTACTGCCAGTGATGTTGTACATCCACGGAGGAGCCTTC	
CB690927.SEQTTAGATAAGGGTGAACGGCTACCTGTGATGTTGTACATTACGGGGGTGCTTTC	
	481	540
Culex_alfa_2.SEQ	ATGAGAGGATCTAGTGGAGTGGAGATGTACGGTCCGGACTATCTCATAACAGAAGGATGTG	
gambiae_a.SEQ	ATGCGCGGCTCAAGCGGAACCGAAATGTACGGACCGGACTATCTCATCCAAAAGGACATT	
gambiae_b.SEQ	ATGCGCGGCTCAAGCGGAACCGAAATGTACGGACCGGACTATCTCATCCAAAAGGACATT	
alfa_5.SEQ	ATGAGAGGATCTAGTGGAGTGGAGATGTACGGACCGGACTATCTCATAACAGAAGGATGTC	
CB690927.SEQ	AATCGAGGTTCCAGCGGGGTGGAGATGTACGGCCAGATTACCTAATTCAGCTGACGTT	
	541	600
Culex_alfa_2.SEQ	GTGTTTCGTGTCGTTCAA.CTACAGAATAGGCGCACTTGG.....	
gambiae_a.SEQ	GTGCTGGTTACGTTCAA.CTATCGCATTGGAGCTTTCGG.....	
gambiae_b.SEQ	GTGCTGGTTACGTTCAA.CTATCGCATTGGAGCTTTCGG.....	
alfa_5.SEQ	GTGTTTCGTGTCGTTCAA.CTACAGAATCGGTGCCCTTGGTATGATTTGTGATTTCCTTGGT	
CB690927.SEQ	GTTTTTCGTGCTTTTTAAATTACAGAATTGGCGCTTTAGG.....	
	601	660
Culex_alfa_2.SEQATTCATCTCGTTTCGATTCTCCCGAG	
gambiae_a.SEQATTTTTGTCCCTCGATTTCGAAGGAG	
gambiae_b.SEQATTTTTGTCCCTCGATTTCGAAGGAG	
alfa_5.SEQ	AGACAACCTTGAAGAATGCTCAACCTATCCTTCAGATTTCATCTCGTTTCGATTCTCCCGAG	
CB690927.SEQATTTATTTTCGTTTGAATCGCCTGAA	
	661	720
Culex_alfa_2.SEQ	CTGGGACTACCGGGCAATGCCGGACTAAAGGACCAGAACCTCGCTCTCCGCTGGGTGGTG	
gambiae_a.SEQ	CTTGGCATAACCGGAAATGGTGGTTTGAAGATCAGAATGTGGCACTTCGCTGGGTGCGC	
gambiae_b.SEQ	CTTGGCATAACCGGAAATGGTGGTTTGAAGATCAGAATGTGGCACTTCGCTGGGTGCGC	
alfa_5.SEQ	CTGGGACTTCCGGGCAATGCCGGACTGAAGGACCAGAACCTCGCGCTTCGCTGGGTGGTG	
CB690927.SEQ	GTCGACCTTCCTGGTAATGCTGGTCTGAAAGATCAGAATCTAGCGTTGCGATGGGTTGTC	
	721	780
Culex_alfa_2.SEQ	GACAACGTCGCCAACTTTGGGGGTGACCCGAAGAACATTACGCTGTTTGGAGAGAGTGCC	
gambiae_a.SEQ	GACAACATCGCACAGTTTCGGTGGCGATCCCGACAATGTGACGCTGTTTCGGTGAGAGTGCC	
gambiae_b.SEQ	GACAACATCGCACAGTTTCGGTGGCGATCCCGACAATGTGACGCTGTTTCGGTGAGAGTGCC	
alfa_5.SEQ	GACAATATCGCCAACTTTGGGGGTGACCCGAAGAACATTACGCTGTTTGGAGAGAGTGCC	
CB690927.SEQ	GAAAACATTGAAGCATTTCGGGGGAGATCCCAATAACATAACGCTGTTTGGCGAGAGTGCT	
	781	840
Culex_alfa_2.SEQ	GGCGGTTGTTCCG.TGCACTACCACATGGTGTCCGACCTTTCGCG.GGGATTGTTTCAGC	
gambiae_a.SEQ	GGTGGCTGCTC.GGTCCATTACCATATGGTATCGAGCCAATCGAGACAG.TTGTTCGGC	
gambiae_b.SEQ	GGTGGCTGCTC.GGTCCATTACCATATGGTATCGAGCCAATCGAGACAG.TTGTTCGGC	
alfa_5.SEQ	GGTGGTTGTTCCG.TGCACTACCACATGGTGTCCGACCTGTGCG.GGGATTGTTTCAGC	
CB690927.SEQ	GGTGGCTGTTCCGGTTCATTATCACATGATTTTCGGATCAATCGGAAGGGGCTGTTTCAAC	

```

841                                     900
Culex_alfa_2.SEQ GTGCGATCGTAATGTCCGGCTGTGTGCTGAACAATTGGTCCGTGGTTCCACGAAGAAAGT
gambiae_a.SEQ GGGCGATAGTGATGTCTGGGCTGTACGTTGAACAACCTGGTCAACGGCGCCGAGACGCGGTA
gambiae_b.SEQ GGGCGATAGTGATGTCTGGGCTGTACGTTGAACAACCTGGTCAACGGCGCCGAGACGCGGTA
  alfa_5.SEQ GCGCGATCGTAATGTCCGGCTGCGTGCTGAACAATTGGTCCGTGATTCCACGAAGAAAGC
CB690927.SEQ GAGCGATTGTA.TGTCTGGCTGTTTCGGTTGACAATTGG.CTACAATACCGAGGAGGCAAT

901                                     960
Culex_alfa_2.SEQ TTAGCGAACGGCTGGCCAAAGCTCTCGG.ATGGAACGGGCAGGGTGGTGAGCGAGCTGCT
gambiae_a.SEQ TGGCGGAAAGGTTGGCCAAAGCGCTCGG.TTGAACGGGAAGGGAGGCGAAGCGGAATTG
gambiae_b.SEQ TGGCGGAAAGGTTGGCCAAAGCGCTCGG.TTGAACGGGAAGGGAGGCGAAGCGGAATTG
  alfa_5.SEQ GGAGCGAACGCCTGGCCAAAGCTCTAGG.CTGAACGGGCAGGGTGGTGAGCGGACCGCT
CB690927.SEQ TCAGCCAAAGACTGGCCAAAGCTTTTTGGGCTGGAATGGACCAANGAGGAGACAAAAGCT.

961                                     1020
Culex_alfa_2.SEQ CTGGAGGTGCTCGTGAAGGCGGATCCGGAGAGTATCGTTTCGTGAGCAGGAAGTTTTGTTG
gambiae_a.SEQ CTGAAGGTGCTGAGAGCAACACCGGCCGAGGAGATTATTAAGCATCAGGATCTGCTACTA
gambiae_b.SEQ CTGAAGGTGCTGAGAGCAACACCGGCCGAGGAGATTATTAAGCATCAGGATCTGCTACTA
  alfa_5.SEQ CTGGAGGTGCTCGTGAAGGCAGATCCGGAGAGTATCGTTTCGCGAGCAGGAGATTTTGCTG
CB690927.SEQ G.....

1021                                     1080
Culex_alfa_2.SEQ AATGAGAATG.....
gambiae_a.SEQ ACTAAGAATG.....
gambiae_b.SEQ ACTAAGAATG.....
  alfa_5.SEQ AACGAGAATGTAAGATTGATAGCTTGTTAGCTTAAATAGTTGATATTCAGTTAATTTAAT
CB690927.SEQ .....

1081                                     1140
Culex_alfa_2.SEQ .....AGATCGAAAATCGCATCCTATTTTCGTTTGGACCAGTGATTGAGCCCTACATT
gambiae_a.SEQ .....AGCTGGAAAACCGTATTCTGTTTCGCTTTTGGTCCAGTGGTGGAAACCGTACGTA
gambiae_b.SEQ .....AGCTGGAAAACCGTATTCTGTTTCGCTTTTGGTCCAGTGGTGGAAACCGTACGTA
  alfa_5.SEQ TTGTAGGAGATCGAAAATCGCATCCTATTTCTCATTTCGACCAGTTATCGAGCCATATGTT
CB690927.SEQ .....

1141                                     1200
Culex_alfa_2.SEQ ACAAAAAAATGCATGATTCCAAAAGATCCTGTAGAGATGTGTGCTGAAGCTTGGAGTAAC
gambiae_a.SEQ ACAGAAAGCACTTTTCATTCCGAAGGCACCATTAGAAAATGTGCCGTGAGGCATGGAGCAAC
gambiae_b.SEQ ACAGAAAGCACTTTTCATTCCGAAGGCACCATTAGAAAATGTGCCGTGAGGCATGGAGCAAC
  alfa_5.SEQ ACGAAAAAATGCATGATTCCAAAAGGATCCCCTGGAGATGTGTGCTGAAGCTTGGAGTAAC
CB690927.SEQ .....

1201                                     1260
Culex_alfa_2.SEQ GAAATCGACATTTTGTATCGGCGGAAACTCGGAAGAGGGTCTATTCTGTCTGAACGGGATC
gambiae_a.SEQ GACATCGACATACTGATCGGGGGAAACGCCGAGGAAGGATTGTTCTGCTTGAGCTCCATC
gambiae_b.SEQ GACATCGACATACTGATCGGGGGAAACGCCGAGGAAGGATTGTTCTGCTTGAGCTCCATC
  alfa_5.SEQ GAAATTGACATCTTGATCGGTGGAAACTCGGAAGAGGGTCTGTTCTGTCTCAACGGGATC
CB690927.SEQ .....

1261                                     1320
Culex_alfa_2.SEQ AAAGAAAATCCTTCGATCATGAGTAACTTGAAGGACTTTGAGTATCTGGTTCCGCTGGAG
gambiae_a.SEQ AAGGAAAGCCCCGCCATAATGGATAATCTGAAAAACTTCGAGTATCTCGTACCTACCGAG
gambiae_b.SEQ AAGGAAAGCCCCGCCATAATGGATAATCTGAAAAACTTCGAGTATCTCGTACCTACCGAG
  alfa_5.SEQ AAGGAGAATCCCTCGATCATGAGTAACTTGAAGGACTTTGAGTACCTGGTTCCGCTGGAG
CB690927.SEQ .....

```

```

1321                                     1380
Culex_alfa_2.SEQ CTGGACTTGGTACGCACATCTCAGAGATGCAAAGAGGTGGGCAAGCAGATGAAAAAGTTC
gambiae_a.SEQ CTAGAGCTGGTGCCTGGATCGCAAGCATGCCAGCAGTATGGGCTGAAGTTGAAAAAGTTC
gambiae_b.SEQ CTAGAGCTG.....
  alfa_5.SEQ CTGGACTTGGTCAGGACTTCTCAAAGATGCAAAGCAGGTGGGCAAGCAGATGAAAAAGTTC
CB690927.SEQ .....

1381                                     1440
Culex_alfa_2.SEQ TACTACGGTGAAACGGAACCGTTCGTTTGAGAATCGAGAGGGTTACCTTACG.....
gambiae_a.SEQ TACTACGGTGGATCCCAACCATCGTTCGACAATCGGGAAGGCTATTTAACG.....
gambiae_b.SEQ .....
  alfa_5.SEQ TACTACGGTGAAACGGAACCGTTCGTTTGAGAATCGAGAGGGTTACCTAACGGTAAGACGA
CB690927.SEQ .....

1441                                     1500
Culex_alfa_2.SEQ .....CTGATGACCGACAAGC
gambiae_a.SEQ .....CTCATGACCGATAAGC
gambiae_b.SEQ .....CTCATGACCGATAAGC
  alfa_5.SEQ TCATTACGCATTTCAATATCTATTACAAGTATCGTTCACACAGCTGATGACCGACAAGC
CB690927.SEQ .....

1501                                     1560
Culex_alfa_2.SEQ TATTCTGCACGGACTGCATCGTACGATCCTGTCAAGACTCAACTCGAAGAAACCGTTCGA
gambiae_a.SEQ TCTTCTGGCACGGGCTGCACCGTACCGTCTGCTCGAGGATCAGCTCCCAAAAGCCGGCCA
gambiae_b.SEQ TCTTCTGGCACGGGCTGCACCGTACCGTCTGCTCGAGGATCAGCTCCCAAAAGCCGGCCA
  alfa_5.SEQ TATTCTGCACGGACTGCATCGTACGATCCTGTCAAGACTCAACTCGAAGAAACCGTTCGA
CB690927.SEQ .....

1561                                     1620
Culex_alfa_2.SEQ AGACGTTTCTGTACCGTTTCTCGGTAGATTTCGGACACCTACAACCACTACCGGATCGTGT
gambiae_a.SEQ AAACGTTTCTGTCTACCGTTTTGCAGTGGATTTCGGAGACGTACAATCACTATCGCATCTATT
gambiae_b.SEQ AAACGTTTCTGTCTACCGTTTTGCAGTGGATTTCGGAGACGTACAATCACTATCGCATCTATT
  alfa_5.SEQ AGACCTTCTGTACCGTTTCTCCGTGGATTTCGGACACCTACAACCACTACCGGATCGTGT
CB690927.SEQ .....

1621                                     1680
Culex_alfa_2.SEQ TCTGCGACAAGAACGTGCGCGGAACTGCCCATGCCGACGATCTGTGCTACATCTTCAAGA
gambiae_a.SEQ TTTGCGATCGTAACGTGCGCGGTACCGCCCATGCCGATGATCTTTTCGTATCTGTTTAAGA
gambiae_b.SEQ TTTGCGATCGTAACGTGCGCGGTACCGCCCATGCCGATGATCTTTTCGTATCTGTTTAAGA
  alfa_5.SEQ TCTGCGACAAGAACGTGCGCGGCACGGCCCATGCCGACGACCTGTGCTACATCTTCAAGA
CB690927.SEQ .....

1681                                     1740
Culex_alfa_2.SEQ ACGTGTTCAACGATCCCCCGGCGAAGGATACCTTCGAGCATCGTGCGATGATGAACATG.
gambiae_a.SEQ ACGTGTTTACGCCCCGGTGCCGGATGTGGGCACGATGGAGTACAGGACGATGCAAACGCTG.
gambiae_b.SEQ ACGTGTTTACGCCCCGGTGCCGGATGTGGGCACGATGGAGTACAGGACGATGCAAACGCTG.
  alfa_5.SEQ ACGTGTTCAACGATCCCCCGGCGAAGGATACCTTCGAGCATCGTGCGATGATGAATATGG
CB690927.SEQ .....

1741                                     1800
Culex_alfa_2.SEQ .....GTCGGC
gambiae_a.SEQ .....GTCGAG
gambiae_b.SEQ .....GTCGAG
  alfa_5.SEQ TGAGTTGGACTTTCTGATTTCTATCCTTCATGTAGAGTAATTGAACGCTTACAGGTCGGC
CB690927.SEQ .....

```

```

1801                                     1860
Culex_alfa_2.SEQ TTATTCTCAACGTTTCGCGAGTA...ACAATGGAAATCCCAACGGAGAGCAGATCAACGAA
gambiae_a.SEQ TTGTTTACTAACTTTGCGACCGTGGGCAGCCCGAATGTTGGCGGCAGTGTGGCGATATA
gambiae_b.SEQ TTGTTTACTAACTTTGCGACCGTGGGCAGCCCGAATGTTGGCGGCAGTGTGGCGATATA
  alfa_5.SEQ TTGTTCTCAACGTTTCGCGAGTA...ACAATGGAAATCCCAACGGAGAGCAGACCAACGAA
CB690927.SEQ .....

1861                                     1920
Culex_alfa_2.SEQ TGGGAATCGATTGCGACGCCGGCGGGACCGTTCAAGTGTCTCAACATCAACAACGACGGT
gambiae_a.SEQ TGGCAACCGGTCGGTGCAAAGGTGGAGCCGTACAAGTGTTTAAATATTAACAATGGCGGT
gambiae_b.SEQ TGGCAACCGGTCGGTGCAAAGGTGGAGCCGTACAAGTGTTTAAATATTAACAATGGCGGT
  alfa_5.SEQ TGGGAATCGATTGAGACGCCAACGGGACCGTTCAAGTGTCTCAACATCAACAACGACGGT
CB690927.SEQ .....

1921                                     1980
Culex_alfa_2.SEQ TTGCAGTTTATTGAGTATCCGGAGCAGGAACGAATGAAGTTTTGGGATTCACTGTACAGC
gambiae_a.SEQ GTGAGCTTTATCGATTTGCCGGAAATGAGACGCATGCTGCTGTGGGATTCGTTGTACAAA
gambiae_b.SEQ GTGAGCTTTATCGATTTGCCGGAAATGAGACGCATGCTGCTGTGGGATTCGTTGTACAAA
  alfa_5.SEQ TTGCAGTTTATTGAGTATCCGGAGCAGGAACGAATGCAGTTTTGGGATTCACTCTACAGC
CB690927.SEQ .....

1981                                     1998
Culex_alfa_2.SEQ AAAGATAAGCTTTATTAG
gambiae_a.SEQ CGGGAACAGTTGTATTAA
gambiae_b.SEQ CGGGAACAGTTGTATTAA
  alfa_5.SEQ AAAGATAAACTTTATTAG
CB690927.SEQ .....

```

Anexo 2:

Parecer emitido pelo Comitê de Ética do CPqAM



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



FIOCRUZ
Ministério da Saúde

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CPqAM

Título do Projeto: "Monitoramento dos genes de resistência a inseticidas químicos em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil".

Pesquisador responsável: Marcelo Henrique Santos Paiva

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ

Data de apresentação ao CEP: 15.02.2005

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 05/05

PARECER

A Comissão considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, resolução CNS 196/96 e complementares

Recife, 02 de março de 2005

Ana Maria A. Santos

Drª Ana Maria Amisr dos Santos
Médica
Coordenação
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)