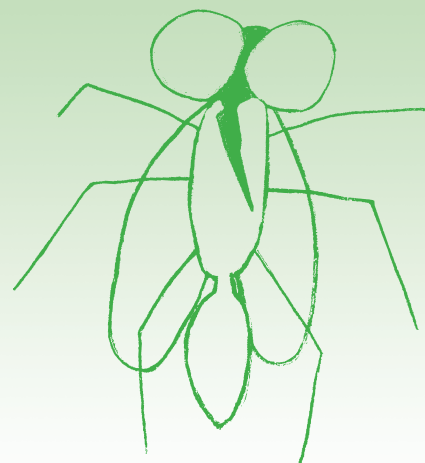


MINISTÉRIO DA SAÚDE



Metodologia para Quantificação de Atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em *Aedes aegypti*

Quantification Methodology for Enzyme Activity Related to Insecticide Resistance in *Aedes aegypti*



Brasília/DF

**Metodologia para Quantificação de
Atividade de Enzimas Relacionadas com a
Resistência a Inseticidas em *Aedes aegypti***

**Quantification Methodology for
Enzyme Activity Related to Insecticide
Resistance in *Aedes aegypti***

© 2006 Ministério da Saúde.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens desta obra é da área técnica.

A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: <http://www.saude.gov.br/bvs>

Série A. Normas e Manuais Técnicos

Tiragem: 1.ª edição – 2006 – 1000 exemplares

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Secretaria de Vigilância em Saúde

Diretoria Técnica de Gestão

Esplanada dos Ministérios, bloco G

Edifício Sede, 1.º andar, sala 134

CEP: 70058-900, Brasília – DF

E-mail: svs@saude.gov.br

Home page: <http://www.saude.gov.br/svs>

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Av. Brasil, 4.365 – Manguinhos

Rio de Janeiro – RJ – CEP 21040-900

Home page: <http://www.fiocruz.br/>

Coordenação Editorial:

Denise Valle - IOC/FIOCRUZ

Isabela Reis Montella – IOC/FIOCRUZ - Instituto de Biologia do Exército

Equipe Técnica da Elaboração do Manual:

Denise Valle – IOC/FIOCRUZ

Isabela Reis Montella – IOC/FIOCRUZ - Instituto de Biologia do Exército

Rosana Aparecida Ribeiro - IOC/FIOCRUZ

Priscila Fernandes Viana Medeiros - IOC/FIOCRUZ

Ademir de Jesus Martins-Júnior - IOC/FIOCRUZ

José Bento Pereira Lima - IOC/FIOCRUZ

Revisão Técnica- científica:

Denise Valle – IOC/FIOCRUZ

Isabela Reis Montella – IOC/FIOCRUZ - Instituto de Biologia do Exército

Consultor Técnico:

William G Brogdon - Centers for Disease Control and Prevention – CDC/Atlanta

Revisão de Português:

Astrogildo Esteves Filho

Revisão de Inglês:

Mitchell Raymond Lishon

Walter Oelemann

Colaboradores:

Ima Aparecida Braga

Instituto de Biologia do Exército

Programação Visual:

Pixels e Pontos/Rossana Henriques

Direção de Arte:

Rossana Henriques

Manipulação e Tratamento de Imagens:

Ricardo Gandra

Produção Fotográfica:

Rossana Henriques e Ruy Barbosa Pinto

Fotografias:

Rossana Henriques e Ruy Barbosa Pinto

Impresso no Brasil / Printed in Brazil

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz.

Metodologia para qualificação de atividades de enzimas relacionados com a resistência a inseticidas em *aedes aegypti*/Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz = Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *aedes aegypti*/Ministry of Health of Brazil, Fundação Oswaldo Cruz. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006. 128 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

ISBN 85-334-1291-6

1. Resistência a inseticidas. 2. *Aedes aegypti*. 3. Vigilância em saúde. 4. Saúde pública. I. Título. II. Série.

NLM QX 600

Catálogo na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2006/1338

Títulos para indexação:

Em inglês: Quantification Methodology for Enzyme Activity Related to Insecticide Resistance in *Aedes Aegypti*

Em espanhol: Metodología para Calificación de Actividades de Enzimas Relacionadas con la Resistencia a Pesticidas en *Aedes aegypti*

**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**Metodologia para Quantificação de
Atividade de Enzimas Relacionadas com a
Resistência a Inseticidas em *Aedes aegypti***

**Quantification Methodology for
Enzyme Activity Related to Insecticide
Resistance in *Aedes aegypti***

Série A. Normas e Manuais Técnicos

**Brasília/DF
2006**

ÍNDICE

PREFÁCIO	8
AGRADECIMENTOS	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. ABREVIATURAS	18
3. EQUIPAMENTOS E REAGENTES	20
3.1. Equipamentos	20
3.2. Vidraria e plásticos	20
3.3. Miscelânea	22
3.4. Reagentes	22
3.4.1. reagentes de uso geral para os testes	22
3.4.2. reagentes específicos	24
4. PREPARAÇÃO DOS MOSQUITOS PARA TESTE	26
4.1. Congelamento	26
4.2. Homogeneização	26
4.3. Distribuição de homogenatos nas placas	30
4.3.1. preparo da “placa de mosquitos”	30
4.3.2. distribuição de amostras nas placas-teste	32
5. TESTES ENZIMÁTICOS	34
5.1. Acetilcolinesterase (ACE)	36
5.2. Oxidases de Função Mista (MFO)	38
5.2.1. curva-padrão de citocromo C	40
5.3. Esterase alfa (α -EST)	40
5.3.1. curva-padrão de alfa-naftol	44
5.4. Esterase beta (β -EST)	44
5.4.1. curva-padrão de beta-naftol	46
5.5. Esterase “PNPA” (PNPA-EST)	48
5.6. Glutationa-S-transferase (GST)	48
5.7. Proteínas totais (PTN)	50
5.7.1. curva-padrão de proteína – alternativa 1	52
5.7.2. curva-padrão de proteína – alternativa 2	54
5.7.3. posição das amostras de BSA para a curva-padrão	54
6. PREPARAÇÃO DE REAGENTES ESPECÍFICOS	56
6.1. Acetilcolinesterase (ACE)	56
6.2. Oxidases de Função Mista (MFO)	58
6.3. Esterase alfa (α -EST)	60
6.4. Esterase beta (β -EST)	62

INDEX

PREFACE	9
ACKNOWLEDGEMENTS	13
1. INTRODUCTION	15
2. ABBREVIATIONS	19
3. EQUIPMENT AND REAGENTS	21
3.1. Equipment	21
3.2. Glassware and plasticware	21
3.3. Miscellaneous	23
3.4. Reagents	23
3.4.1. reagents of general use	23
3.4.2. specific reagents	25
4. PREPARING MOSQUITOES	27
4.1. Freezing	27
4.2. Homogenization	27
4.3. Distribution of the homogenates in the microplates	31
4.3.1. preparing the “mosquito plate”	31
4.3.2. distributing samples in the test microplates	33
5. ENZYMATIC TESTS	35
5.1. Acetylcholinesterase (ACE)	37
5.2. Mixed Function Oxidases (MFO)	39
5.2.1. cytochrome C standard curve	41
5.3. alpha-Esterase (α-EST)	41
5.3.1. alpha-naphthol standard curve	45
5.4. beta-Esterase (β-EST)	45
5.4.1. beta- naphthol standard curve	47
5.5. “PNPA” Esterase (PNPA-EST)	49
5.6. Glutathione-S-transferase (GST)	49
5.7. Total proteins (PTN)	51
5.7.1. protein standard curve – alternative 1	53
5.7.2. protein standard curve – alternative 2	53
5.7.3. distribution of BSA samples for the standard curve	55
6. PREPARING SPECIFIC REAGENTS	57
6.1. Acetylcholinesterase (ACE)	57
6.2. Mixed Function Oxidases (MFO)	59
6.3. alfa-Esterase (α-EST)	61
6.4. beta-Esterase (β-EST)	63

6.5.	Esterase “PNPA” (PNPA-EST)	64
6.6.	Glutathiona-S-transferase (GST)	66
6.7.	Proteínas totais (PTN)	68
7.	TAMPÕES GERAIS E SOLUÇÕES-ESTOQUE	70
7.1.	Tampões fosfato de sódio	70
7.1.1.	estoques fosfato de sódio (mono e bibásico) a 1 M	70
7.1.2.	tampões- estoque fosfato de sódio a 1 M	72
7.1.3.	tampões fosfato de sódio a 100 e 50 mM	72
7.1.4.	tampão fosfato de sódio a 20 mM	72
7.2.	Tampões fosfato de potássio	74
7.2.1.	estoques fosfato de potássio (mono e bibásico) a 1 M	74
7.2.2.	tampões-estoque fosfato de potássio a 1 M	76
7.2.3.	tampão fosfato de potássio a 90 mM pH 7,2	76
7.2.4.	tampão fosfato de potássio a 100 mM pH 6,5	76
7.3.	Tampão acetato de sódio	78
7.3.1.	tampão estoque acetato de sódio 250 mM pH 5,0	78
7.4.	Propoxur (ensaio Acetilcolinesterase)	78
7.5.	SDS (ensaio Esterases alfa e beta)	78
8.	COMPARAÇÃO PROTOCOLOS OMS – CDC – LAFICAVE	80
9.	ANÁLISE DOS RESULTADOS	84
9.1.	Acetilcolinesterase (ACE)	84
9.2.	Proteínas totais (PTN)	84
9.3.	Oxidases de Função Mista (MFO)	86
9.4.	Esterases alfa e beta (α e β -EST)	88
9.5.	Esterase “PNPA” (PNPA-EST)	88
9.6.	Glutathiona-S-transferase (GST)	90
10.	METODOLOGIA LAFICAVE PARA PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS RESULTADOS	92
10.1.	Arquivo 1 – transferência dos dados do Soft Max para Excel	94
10.2.	Arquivo 2 – conversão dos valores de absorbância (exceção de PNPA-EST)	98
10.3.	Arquivo 3 – conversão dos valores de absorbância de PNPA-EST	108
10.4.	Arquivo 4 – total dos dados de cada população	114
11.	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	118
11.1.	Critérios para inclusão de avaliações de mosquitos individuais	118
11.2.	Critérios para classificação das populações	120
12.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

6.5.	“PNPA” Esterase (PNPA-EST)	65
6.6.	Glutathione-S-transferase (GST)	67
6.7.	Total proteins (PTN)	69
7.	GENERAL BUFFERS AND STOCK SOLUTIONS	71
7.1.	Sodium phosphate buffers	71
7.1.1.	sodium phosphate stocks (mono and bibasic) at 1M	71
7.1.2.	sodium phosphate stock buffers at 1 M	73
7.1.3.	sodium phosphate buffers at 100 and 50 mM	73
7.1.4.	sodium phosphate buffer at 20 mM	73
7.2.	Potassium phosphate buffers	75
7.2.1.	potassium phosphate stocks (mono and bibasic) at 1M	75
7.2.2.	potassium phosphate stock buffers at 1 M	77
7.2.3.	potassium phosphate buffer at 90 mM pH 7.2	77
7.2.4.	potassium phosphate buffer at 100 mM pH 6.5	77
7.3.	Sodium acetate buffer	79
7.3.1.	sodium acetate buffer, stock at 250 mM pH 5.0	79
7.4.	Propoxur (Acetylcholinesterase assay)	79
7.5.	SDS (alpha and beta-Esterases test)	79
8.	COMPARING WHO – CDC – LAFICAVE PROTOCOLS	81
9.	ANALYSIS OF RESULTS	85
9.1.	Acetylcholinesterase (ACE)	85
9.2.	Total proteins (PTN)	85
9.3.	Mixed Function Oxidases (MFO)	87
9.4.	alpha and beta-Esterases (α and β -EST)	89
9.5.	“PNPA” Esterase (PNPA-EST)	89
9.6.	Glutathione-S-transferase (GST)	91
10.	LAFICAVE METHODOLOGY FOR THE PROCESSING AND ANALYSIS OF RESULTS	93
10.1.	File 1 – data transfer from Soft Max to Excel	95
10.2.	File 2 – conversion of absorbance values (except PNPA-EST)	99
10.3.	File 3 – conversion of PNPA-EST absorbance values	109
10.4.	File 4 – total data of a given population	115
11.	INTERPRETATION OF RESULTS	119
11.1.	Criteria for inclusion of evaluations from individual mosquitoes	119
11.2.	Criteria for population classification	121
12.	REFERENCES	127

PREFÁCIO

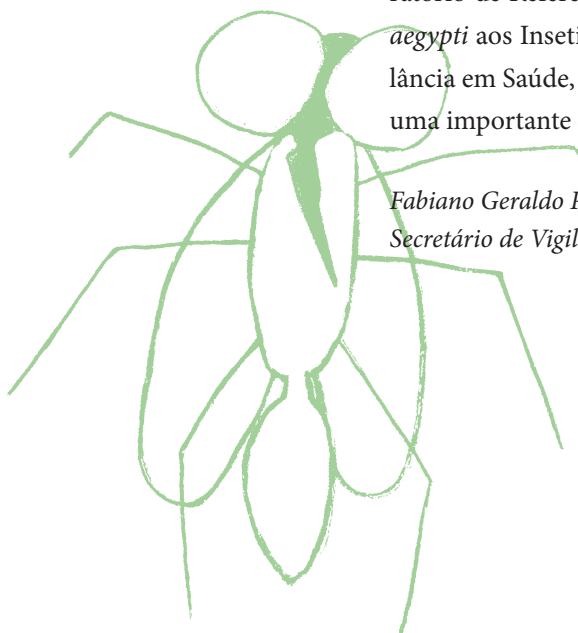
Uma das ferramentas utilizadas no controle da dengue é aplicação de inseticidas para controle do vetor. Nesse contexto, o monitoramento do *status* de resistência de populações de *Aedes aegypti*, assim como a detecção dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência são muito importantes para definir as estratégias de controle desse vetor.

A edição deste manual, que fornece instruções detalhadas para a quantificação, em *Aedes aegypti*, da atividade de enzimas associadas à resistência a inseticidas, utilizando metodologias adequadas às nossas condições, vem preencher uma lacuna importante e que dará subsídios aos laboratórios da Rede de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* aos Inseticidas para executarem melhor e de maneira coordenada esses ensaios bioquímicos.

Por outro lado, as atividades do monitoramento proporcionarão à Secretaria de Vigilância em Saúde/Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Dengue, informações relevantes que auxiliarão no controle racional do vetor de dengue no país.

Com esta publicação, a Secretaria de Vigilância em Saúde, em conjunto com o Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores/Fiocruz-RJ, atualmente Laboratório de Referência Nacional da Rede de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* aos Inseticidas, cumpre o seu papel no âmbito do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde, contribuindo para uma melhor efetividade das ações de controle de uma importante doença no contexto do perfil epidemiológico do país.

Fabiano Geraldo Pimenta Júnior
Secretário de Vigilância em Saúde



PREFACE

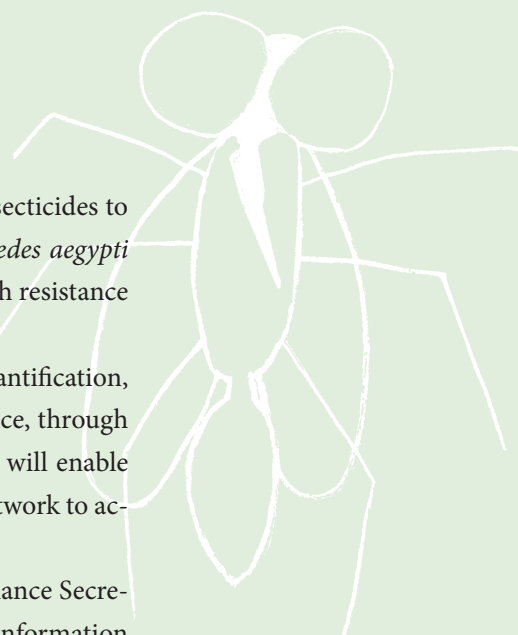
One of the tools employed in the dengue control is the application of insecticides to control its vector. In this context, monitoring the resistance status of *Aedes aegypti* populations, as well as detecting biochemical mechanisms implicated with resistance are very important parameters to define control strategies of this vector.

The publication of this handbook that gives detailed instructions to the quantification, in *Aedes aegypti*, of the activity of enzymes related to insecticide resistance, through methodologies adapted to our conditions, fulfills an important gap and will enable the Laboratories of the Brazilian *Aedes aegypti* Resistance Monitoring Network to accomplish these biochemical assays coordinately and in a better way.

On the other hand, monitoring activities will provide the Health Surveillance Secretary/Brazilian Dengue Control Program General Coordination relevant information to help the rational control of the dengue vector in the country.

With this publication, the Health Surveillance Secretary, together with the Laboratory of Physiology and Control of Arthropod Vectors/Oswaldo Cruz Foundation/Rio de Janeiro, presently National Reference Laboratory of the Brazilian *Aedes aegypti* Insecticide Resistance Monitoring Network, accomplishes its role in the scope of the National Health Surveillance System, contributing to a higher effectiveness in the control actions of an important disease in the context of the epidemiological profile of the country.

Fabiano Geraldo Pimenta Júnior
Health Surveillance Secretary



PREFÁCIO

A detecção e a caracterização iniciais de um caso de resistência a inseticidas são geralmente obtidas por meio da realização de algum tipo de bioensaio. Bioensaios são conduzidos para responder à pergunta: Este inseticida vai controlar este vetor neste local, neste momento? Esta é a questão prática fundamental que o agente de controle operacional precisa responder, preferencialmente antes que o inseticida seja adquirido.

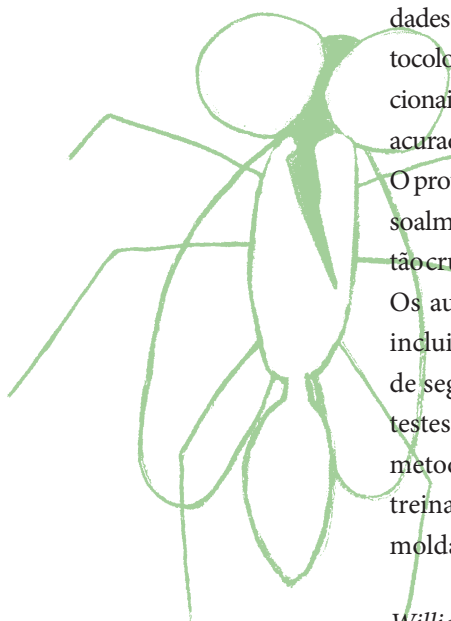
Sempre que resistência é detectada, surge a questão: O que eu faço agora? É para responder a esta questão que métodos bioquímicos e moleculares foram desenvolvidos, para detectar e avaliar, em insetos individuais, os mecanismos de resistência e o potencial de resistência cruzada e sua especificidade para tipos particulares de inseticidas.

Ensaio bioquímico de resistência baseado em microplacas foram inicialmente desenvolvidos no Centro de Controle de Doenças, em Atlanta, no final dos anos 1970. Na medida em que sua utilização foi expandida, várias modificações do protocolo foram feitas. Estas modificações foram principalmente consequência da variação dos conjuntos de filtros disponíveis em espectrofotômetros comerciais para leitura de microplacas e da conveniência de laboratórios particulares no uso de diferentes proporções de reagentes, tampões mais convenientes e fatores de diluição dos homogenatos de insetos. Em geral, acredita-se que dois protocolos sejam mais amplamente utilizados: os protocolos do CDC e da Organização Mundial de Saúde.

Contudo, a força de qualquer protocolo reside em sua capacidade de preencher as necessidades de programas de controle específicos. Por esta razão, protocolos modificados e protocolos originais devem ser encorajados sempre que preencherem as necessidades operacionais de um país ou programa. O único requisito é que o protocolo do ensaio represente acurada e precisamente a bioquímica da resistência a inseticidas em insetos individuais.

O protocolo do LAFICAVE aqui descrito preenche estes requisitos, como eu verifiquei pessoalmente, e corresponde a uma valiosa adição à nossa gama de métodos para abordar a questão crucial da detecção e descrição, em termos práticos, da resistência em vetores de doenças. Os autores procuraram fornecer um manual prático, orientado para o laboratório, incluindo um CD-ROM extremamente útil, que deixará o usuário com a sensação de segurança de saber exatamente o que está sendo feito quando da execução destes testes. Grande cuidado foi empregado na avaliação empírica de todos os aspectos da metodologia. No CDC, estamos planejando ligar este protocolo ao nosso *website* de treinamento em resistência, enfatizando que uma metodologia consistente deve ser moldada para preencher as necessidades de programas.

William G. Brogdon, Ph.D.
Pesquisador Entomologista Senior
Seção de Entomologia
Divisão de Doenças Parasitárias
Centro Nacional de Doenças Infecciosas
Centros de Controle e Prevenção de Doenças
Atlanta, Geórgia, EUA 30341



PREFACE

The initial detection and characterization of an instance of insecticide resistance is generally accomplished using some form of bioassay. Bioassays are conducted to answer the question: Will this insecticide control this vector at this place at this time? This is the fundamental practical question that operational control personnel must have answered, preferably before the insecticide is purchased.

Where resistance is found, the question then becomes: What do I do now? It is to answer this question that biochemical and molecular methods were developed for detecting and assessing in individual insects insecticide resistance mechanisms and the potential for cross resistance and its specificity for particular types of insecticides.

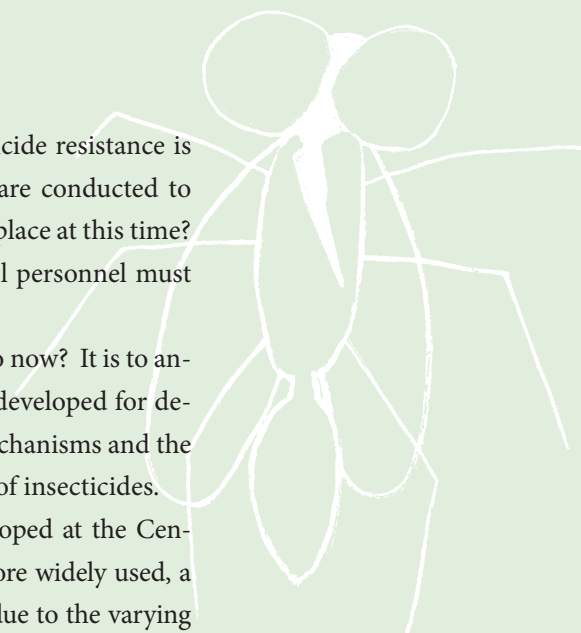
Microplate based biochemical resistance assays were initially developed at the Centers for Disease Control in Atlanta in the late 70s. As they were more widely used, a number of modifications in protocol occurred. These were mainly due to the varying filter sets available in commercial micropolates-reading spectrophotometers and to the convenience in particular labs of using different proportions of reagents, more convenient buffers and dilution factors of insect homogenates. In general, two protocols have perhaps been most widely used: the CDC and World Health Organization protocols.

However, the strength of any protocol lies in its adaptability to fulfill the needs of specific control programs. For that reason, modified protocols and original protocols are to be encouraged where they fill an operational need in a country or program. The only caveat is that the assay protocol represent accurately and precisely the biochemistry of insecticide resistance in individual insects.

The LAFICAVE protocol described herein fulfills these requirements, as I have personally verified, and should prove to be a valuable addition to our tool kit of methods for addressing the crucial issue of detecting and describing in practical terms resistance in vectors of disease.

The authors are seeking to provide a practical lab-oriented manual, including what will be a most useful CD rom, that will leave the user with the secure feeling that they know exactly what they are doing when performing these tests. Great care has been exercised in an empirical assessment of every aspect of the methodology. At CDC, we are planning to link this protocol to our resistance training website, further emphasizing that a robust methodology can be tailored to fit the needs of programs.

*William G. Brogdon, Ph.D.
Senior Fellow and Research Entomologist
Entomology Branch
Division of Parasitic Diseases
National Center for Infectious Diseases
Centers for Disease Control and Prevention
Atlanta, Georgia, U.S.A. 30341*



AGRADECIMENTOS

Muitos profissionais e amigos colaboraram para tornar possível a publicação deste manual e nomear todos seria uma tarefa difícil; certamente, esqueceríamos de alguns nomes importantes. No entanto, destacamos algumas pessoas que desempenharam papel fundamental na realização deste projeto. A Dr^a Ima Aparecida Braga, assessora técnica do Programa Nacional de Controle da Dengue/Secretaria de Vigilância em Saúde (PNCD/SVS), acompanhou e incentivou todos os passos do trabalho de padronização dos procedimentos e, posteriormente, de viabilização de cada etapa necessária para sua publicação. Seu empenho profissional e pessoal e sua amizade foram cruciais para a concretização deste projeto. Não menos importante foi o apoio do Dr. Giovanini Coelho, coordenador do PNCD, que, assim como a Dr^a Ima, é um profissional extremamente comprometido com a qualidade da prestação de serviços em saúde pública no país, valorizando sempre os avanços técnicos e o conhecimento científico. Não poderíamos deixar de mencionar o Dr. Fabiano Pimenta, Secretário de Vigilância em Saúde, e o Dr. Jarbas Barbosa, Secretário Executivo do Ministério da Saúde, por todo o esforço de valorização das competências nacionais. Devemos a estes quatro profissionais, entre muitos esforços no sentido de impulsionar a qualidade do controle de dengue no Brasil, a iniciativa de trazer o Dr. William G. Brogdon, do Centers for Disease Control, Estados Unidos, que, na condição de consultor e avaliador, acompanhou todas as etapas do protocolo aqui apresentado e aprovou os procedimentos por nós padronizados. Ao Dr. Brogdon também gostaríamos de agradecer, por toda a paciência e pelas valiosas sugestões.

Fundamental foi também a Fiocruz, em especial a Vice-Presidência de Serviços de Referência e Ambiente, representada pelo Vice-Presidente Ary Carvalho de Miranda e por sua assessora, Ana Beatriz Moraes da Silva, onde sempre encontramos entusiástico apoio, sem mencionar o grande empenho na valorização dos Laboratórios de Referência da Instituição, e o Instituto Oswaldo Cruz, unidade da Fiocruz à qual pertencemos, que muito tem trabalhado na integração entre a pesquisa básica e aplicada e a prestação de serviços de qualidade que contribuam para a melhoria da saúde da população. Igualmente importante tem sido a parceria encontrada no Instituto de Biologia do Exército, comandada pelo Coronel Benedito Domicio Ferrari, e anteriormente pelo General de Brigada Ivan da Costa Garcez Sobrinho, onde temos encontrado irrestrito apoio à realização de nossas atividades.

Além da Fiocruz e da Secretaria de Vigilância em Saúde/Coordenação Geral de Laboratórios (SVS/CGLAB), recebemos suporte financeiro de vários programas e instituições de fomento à pesquisa, como o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) e o Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde Pública da Fiocruz (PDTSP).

Gostaríamos de citar ainda Mitchell Raymond Lishon e o Dr. Walter Oelemann, pela revisão do inglês, respectivamente do texto e das planilhas eletrônicas, o primoroso trabalho de diagramação de Rossana Henriques e o desenho de nosso mosquito-mascote feito por Daniel Peixoto. Finalmente, devemos ressaltar que este trabalho jamais teria sido realizado sem a colaboração de todos os membros do Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, que foram solidários e participativos em todas as etapas, desde a decisão inicial de definir protocolo adequado às nossas necessidades, até a finalização deste manual.

A estas pessoas, e a todos os outros que de alguma forma colaboraram conosco, nossos sinceros agradecimentos.

ACKNOWLEDGEMENTS

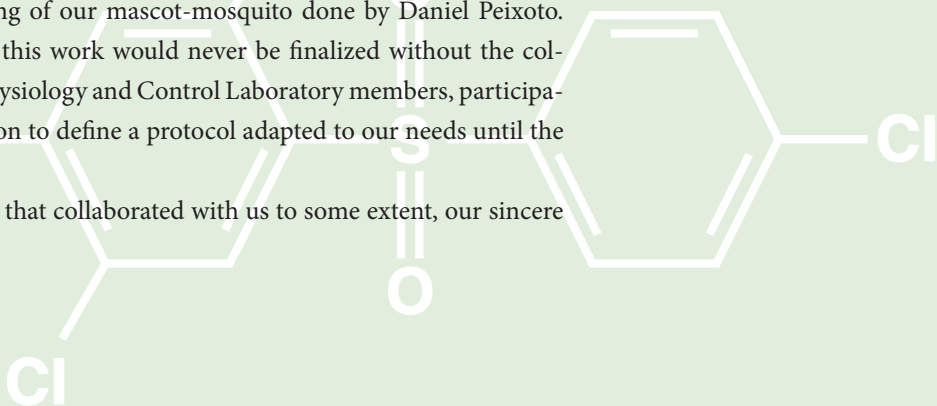
Many professionals and friends collaborated to make the publication of the present handbook possible and it would be very difficult without forgetting someone. However, some persons played an important role towards the concretization of this project and must be named. Dr Ima Aparecida Braga, technical assistant of the Brazilian Dengue Control Program/Health Surveillance Department, (PNCD/SVS) encouraged all the steps of both the protocol standardization work and, later, the publication of this volume. Her professional and personal persistence and her friendship were essential to the accomplishment of this project. Equally important has been the support of Dr Giovanini Coelho, coordinator of the Brazilian Dengue Control Program, who, as well as Dr Braga, is a professional extremely engaged with the quality of the public health services in our country, and always takes into account technical and scientific knowledge advances. It is also ought mentioning Dr Fabiano Pimenta, Secretary of the Brazilian Health Surveillance Department, and Dr Jarbas Barbosa, Health Ministry Executive Manager, for their effort to support national abilities. We owe to these four professionals, among many efforts to stimulate the dengue control quality in Brazil, the initiative to bring Dr William G. Brogdon, from the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, US, which, as an external consultant, personally evaluated all the steps of the protocol and approved the procedures standardized by our team. We would like to thank Dr Brogdon for all his patience and valuable suggestions.

Also relevant to the accomplishment of this work was the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), specially the Reference Services and Environment Department, represented by Dr Ary Carvalho de Miranda and his adviser, Ana Beatriz Moraes da Silva, from whom we always received enthusiastic support and an expressive effort in the improvement of the Fiocruz Reference Laboratories and the Oswaldo Cruz Institute, the unit to where we belong, which has been working hard in the interaction between basic and applied research and the qualified public services, aiming at a better public health. Also important is our partnership with the Army Biology Institute, under the command of Colonel Benedito Domicio Ferrari, and previously of General Ivan da Costa Garcez Sobrinho, where we found unrestricted support to the accomplishment of our activities.

Besides Fiocruz and the Brazilian Health Surveillance Department/General Laboratories Coordination (SVS/CGLAB) we received financial support of several programs and research funding agencies, like the National Council for Technological and Scientific Development (CNPq), the Rio de Janeiro Research Funding Agency Carlos Chagas Filho (Faperj), and the Public Health Technological Development Program/Fiocruz (PDTSP).

We would like to mention the English revision of the text and the electronic files made by, respectively, Mitchell Raymond Lishon and Dr Walter Oelemann, the excellent final art work of Rossana Henriques and the drawing of our mascot-mosquito done by Daniel Peixoto. Finally, it should be emphasized that this work would never be finalized without the collaboration of all Arthropod Vectors Physiology and Control Laboratory members, participative in all steps, from the initial decision to define a protocol adapted to our needs until the publication of this handbook.

To these persons, and to all the others that collaborated with us to some extent, our sincere gratitude.



1. INTRODUÇÃO

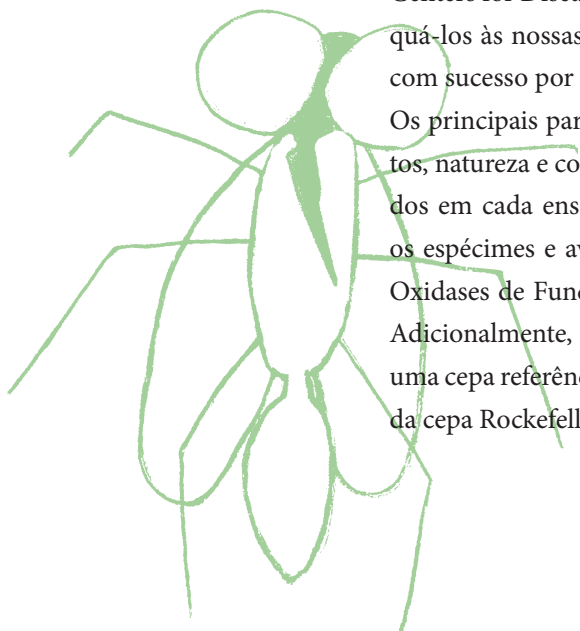
Os inseticidas químicos desempenham até hoje um papel importante no controle de vetores transmissores de doenças. Os mais amplamente usados atuam no sistema nervoso central (SNC) dos insetos e são classificados em quatro grandes grupos, de acordo com a sua natureza química: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides. O aparecimento de insetos resistentes a estes compostos decorre principalmente de uma alteração nos seus sítios de ação ou de maior eficiência de detoxificação. Este último mecanismo é conhecido como resistência metabólica e o aumento da atividade de enzimas detoxificantes (Glutathione-S-transferases, Esterases, Oxidases de Função Mista) contribui para a eliminação ou inativação dos inseticidas circulantes no organismo do vetor.

O uso de inseticidas no Brasil, desde 1967, vem expondo o vetor do dengue a uma intensa pressão seletiva. Portanto, é de extrema relevância para o controle analisar o *status* de resistência de populações de *Aedes aegypti* e o mecanismo envolvido. Métodos bioquímicos podem detectar precocemente o aparecimento de indivíduos alterados, fornecendo informações sobre o mecanismo de resistência de uma população, assim como o padrão de resistência cruzada frente aos inseticidas empregados.

Este manual foi elaborado com o objetivo de fornecer instruções detalhadas para a quantificação, em *A. aegypti*, da atividade de enzimas associadas à resistência a inseticidas. O trabalho é parte das atividades do MoReNAa (Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* aos Inseticidas), grupo que congrega laboratórios que atuam em sintonia com o PNCD (Programa Nacional de Controle da Dengue), na tentativa de fornecer subsídios para o controle racional do vetor de dengue no país.

Os protocolos que este manual descreve foram resultado de modificações nos métodos recomendados pela Organização Mundial de Saúde (Hemingway 1998) e pelo Centers for Disease Control (Insecticide Resistance Workshop 1998), de forma a adequá-los às nossas condições e necessidades. Estes protocolos estão sendo utilizados com sucesso por nossa equipe desde 2002.

Os principais parâmetros avaliados foram: volume de homogeneização dos mosquitos, natureza e concentração dos tampões e demais reativos, volumes de extratos usados em cada ensaio e tempos de reação. Foi adotado o uso de duplicatas de todos os espécimes e avaliou-se ainda o efeito da centrifugação sobre a quantificação das Oxidases de Função Múltipla, enzimas associadas a membranas (Montellano 2004). Adicionalmente, optou-se pela inclusão de mosquitos susceptíveis a inseticidas, de uma cepa referência, como controles internos, em cada ensaio (nós usamos mosquitos da cepa Rockefeller).



1. INTRODUCTION

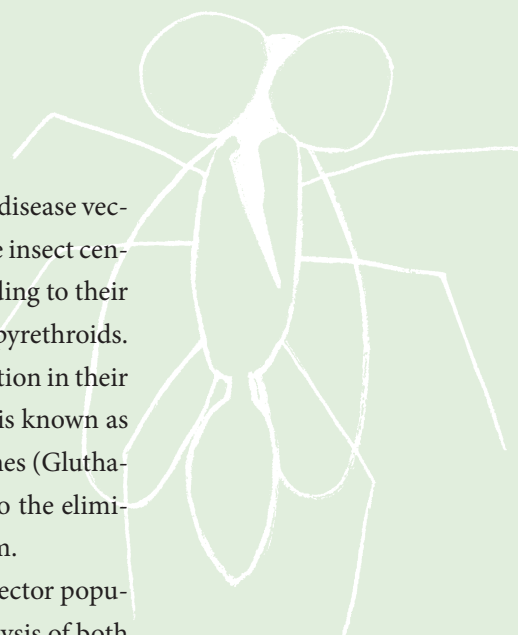
Chemical insecticides have up now played an important role in the insect disease vectors control. In Public Health, the more widely used insecticides act on the insect central nervous system (CNS) and are classified in four major groups, according to their chemical nature: organochlorines, organophosphates, carbamates and pyrethroids. Insects become resistant to these compounds as a result of either an alteration in their target sites or an increased detoxification efficacy. The latter mechanism is known as metabolic resistance, and the increase in the activity of detoxifying enzymes (Glutathione-S-Transferases, Esterases, Mixed Function Oxidases) contributes to the elimination or deactivation of the insecticides circulating the vector's organism.

In Brazil, as a consequence of the use of insecticides since 1967, dengue vector populations are exposed to an intense selection pressure. In this sense the analysis of both the resistance status of wild populations and the mechanisms involved is of relevance to the control of *Aedes aegypti*. Biochemical methods can be responsible for the early detection of altered specimens, yielding information concerning the resistance mechanisms of a given population as well as a pattern of cross resistance to different insecticides.

This handbook was prepared in order to give detailed instructions to the quantification of the enzyme activity related to insecticide resistance in *A. aegypti*. The work is part of MoReNAa (Brazilian *Aedes aegypti* Insecticide Resistance Monitoring Network) activities, a group of laboratories that act together with the PNCD (Brazilian Dengue Control Program) and give support to the rational control of the dengue vector in the country.

The protocols described in this handbook are the result of modifications in the procedures recommended by the World Health Organization (Hemingway 1998) and by the Centers for Disease Control (Insecticide Resistance Workshop 1998) in order to adapt the methodology to our conditions and needs. These protocols have been utilized with success by our group since 2002.

The main parameters evaluated were: mosquito homogenization volume, nature and concentration of buffers and reactives, size of the aliquots of mosquito homogenate used in each assay and reaction time. We opted to use duplicate samples for all enzymes. We also evaluated the effect of centrifugation on the quantification of Mixed Function Oxidases, since these enzymes are known to be associated with membranes (Montellano 2004). Furthermore, internal controls, corresponding to mosquitoes of the insecticide susceptible reference strain (we use Rockefeller mosquitoes), were included in each assay.

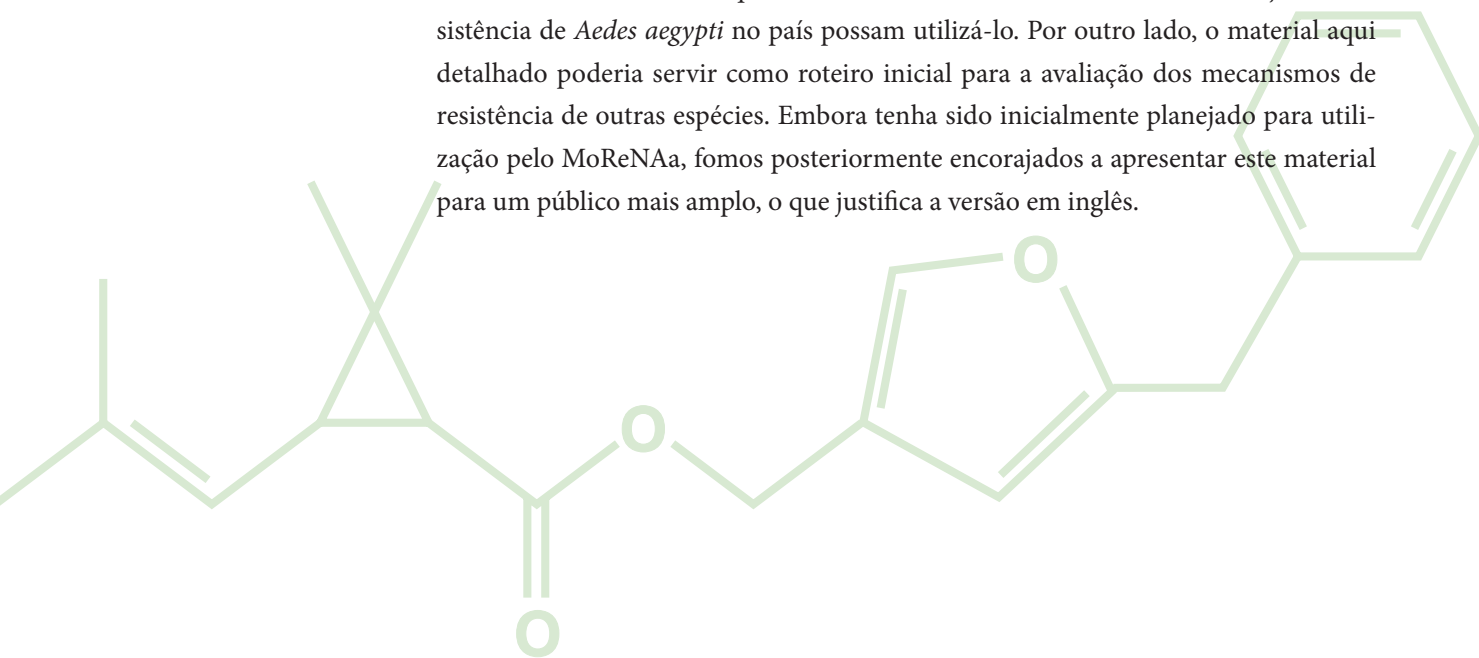


Nossa intenção é testar outros parâmetros, como a expressão diferencial nos dois sexos, ao longo do desenvolvimento ou em adultos de diferentes idades. Atualmente, trabalhamos com fêmeas adultas, um dia após a emergência. Com relação aos adultos, o método CDC utiliza apenas fêmeas, enquanto o método OMS admite também o uso de machos. Por outro lado, enquanto a OMS utiliza apenas adultos jovens, de um dia, o CDC não faz nenhuma restrição nesse sentido. Contudo, pode haver diferença temporal na expressão das enzimas envolvidas com a resistência. Expressão diferencial entre larvas e adultos pode ser relevante para o monitoramento da resistência, quando é necessário confrontar os bioensaios e os ensaios bioquímicos.

Foram definidos protocolos para a quantificação de Acetilcolinesterase, enzima-alvo, no SNC, de organofosforados e carbamatos, e das principais enzimas envolvidas com a resistência metabólica. Estas, em conjunto, podem ser importantes para a resistência aos grupos de inseticidas mais amplamente empregados em saúde pública. As Esterases estão sendo quantificadas com três substratos diferentes. Todos os ensaios quantificam a atividade enzimática, com exceção do teste de Oxidases de Função Mista (MFO), que é uma medida indireta do conteúdo da enzima, uma vez que quantifica o grupamento heme, seu grupamento prostético (ver [Seção 9.3](#)).

O texto foi organizado em seções para facilitar a consulta, desde o congelamento dos mosquitos até a interpretação dos resultados. Detalhes da preparação dos reagentes e dos tampões também podem ser encontrados em seções separadas. Finalmente, em associação com este manual, foram elaboradas planilhas, no programa Excel, que permitem, de forma semi-automática, a comparação das réplicas de cada amostra, a transformação dos valores de absorbância em atividade enzimática, a correção pela quantidade de proteínas totais em cada mosquito e a elaboração de gráficos que mostram o perfil de atividade de cada população analisada.

Esperamos que este trabalho possa contribuir com o monitoramento que vem sendo executado, na medida em que outros laboratórios envolvidos com a avaliação da resistência de *Aedes aegypti* no país possam utilizá-lo. Por outro lado, o material aqui detalhado poderia servir como roteiro inicial para a avaliação dos mecanismos de resistência de outras espécies. Embora tenha sido inicialmente planejado para utilização pelo MoReNAa, fomos posteriormente encorajados a apresentar este material para um público mais amplo, o que justifica a versão em inglês.

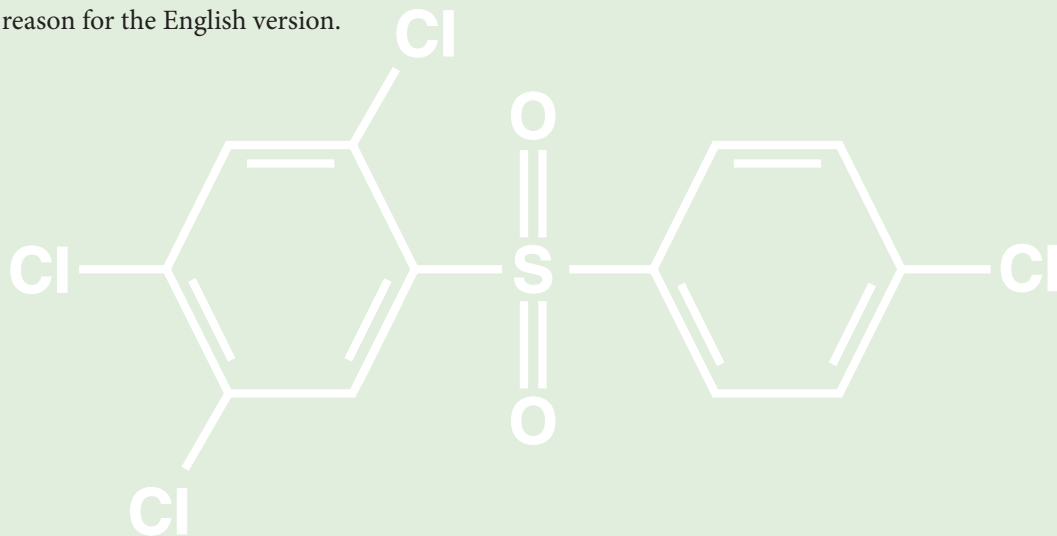


We intend to evaluate other parameters, like the differential expression between males and females, throughout development or in adult mosquitoes of varying ages. Currently we work with one-day old adult females. As far as biochemical assays with adults are concerned, CDC methodology utilizes only females while WHO protocol also recommends the use of males. By contrast, WHO protocol works only with young adults, one-day old, while CDC has no special recommendation on this issue. However, temporal differences in the expression of enzymes related to resistance can occur. Differential expression between larvae and adults is also an important parameter to resistance monitoring when it is necessary to compare bioassays and biochemical tests.

We defined protocols to quantify Acetylcholinesterase, the target site in the CNS of organophosphates and carbamates, and the main enzymes related to metabolic resistance. In conjunction, these enzymes can determine resistance to the major insecticide classes employed in Public Health. We describe the quantification of Esterases with three different substrates. All the protocols are based on the quantification of the enzyme activity. The exception is the Mixed Function Oxidases (MFO) assay, an indirect measure of the enzyme content, since it quantifies the heme group, its prosthetic group (see [Section 9.3](#)).

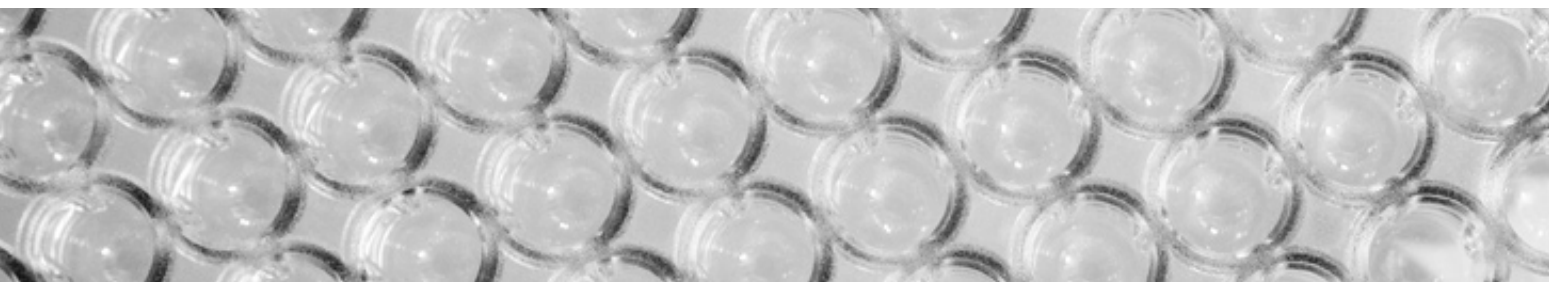
To facilitate handling, the text is organized in separate sections, from freezing of mosquitoes to interpretation of the results. Details of preparation of buffers and reagents can also be found in separate sections. Finally, four Excel files accompany this handbook. These files enable, in a semi-automatic way, to compare replicas of each sample, to calculate the enzymatic activity of each mosquito, to correct values obtained by the total protein amount of each mosquito and to elaborate graphs with the activity profile of each tested population.

We hope this work contributes to the *Aedes aegypti* insecticide resistance monitoring that is presently being performed in the country, stimulating other laboratories to perform biochemical assays. It could also serve as an initial guide to the evaluation of resistance mechanisms in other insect species. Initially planned as a handbook to be used by the MoReNAa network, we were later encouraged to present this material to a wider public; this is the reason for the English version.



2. ABREVIATURAS

ACE	Acetilcolinesterase
AChE	atividade total de Acetilcolinesterase
AChI	atividade de Acetilcolinesterase na presença de inibidor
ACTH	iodeto de acetiltiocolina
BSA	albumina sérica bovina
cit	citocromo
CDNB	1-cloro 2,4 dinitrobenzeno
DIA	orto dianisidina, tetrazotizada
DTNB	ácido 5,5 ditiobis (2-nitro-benzóico)
EST	Esterase
GSH	L-glutationa reduzida
GST	Glutationa-S-transferase
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
K fosf	fosfato de potássio
MFO	Oxidases de Função Mista
Na acet	acetato de sódio
PNPA	4-nitrofenil acetato
PTN	proteínas
TMBZ	3,3,5,5 dihidrocloro de tetrametil benzidina



2. ABBREVIATIONS

ACE	Acetylcholinesterase
AChE	total activity of Acetylcholinesterase
AChI	Acetylcholinesterase activity in the presence of an inhibitor
ACTH	acetylthiocholine iodide
BSA	bovine serum albumin
cit	cytochrome
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
DIA	o-dianisidine, tetrazotized
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
EST	Esterase
GSH	glutathione
GST	Glutathione-S-transferase
H₂O₂	hydrogen peroxide
K phosph	potassium phosphate
MFO	Mixed Function Oxidases
Na acet	sodium acetate
PNPA	p-nitrophenyl acetate
PTN	proteins
TMBZ	3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine dihydrochloride



3. EQUIPAMENTOS E REAGENTES

3.1. Equipamentos

- Máquina de produzir gelo (em flocos)
- Sistema de purificação de água (grau reagente)
- Microcentrífuga para tubos tipo Eppendorf
- Espectrofotômetro, leitor de microplacas (Versa-Max, da Molecular Devices)
- Pipetas monocal, P20, P200 e P1000, volumes variáveis
- Pipeta multicanal (12 canais), 5 a 50 μl
- Pipeta multicanal (12 canais), 30 a 300 μl ou 50 a 300 μl
- pHmetro
- Balança analítica
- Geladeira
- Congelador a -20°C
- Congelador a -80°C
- Agitador magnético

3.2. Vidraria e plásticos

- Becheres de 20 – 25 – 150 – 600 – 1000 ml
- Garrafas (de preferência transparentes) de 500 e 1000 ml
- Provetas de 10 – 50 – 100 – 500 – 1000 ml
- Tubos tipo Falcon de 15 e 50 ml
- Reservatórios de reagentes para pipetas multicanal (Sigma – n° cat.: R1525).
- microplacas de 96 poços, com fundo em U e capacidade de 300 μl da NUNC (Thomas Scientific n° cat.: 6106U07)
- Ponteiros para pipetas automáticas mono e multicanal



3. EQUIPMENT AND REAGENTS

3.1. Equipment

- Ice machine (flaked ice)
- Water purification system (reagent grade water)
- Microcentrifuge for Eppendorf tubes
- Microplates spectrophotometer (Versa-max, Molecular Devices)
- Single channel pipettes, P20, P200 and P1000, variable volumes
- Multichannel pipette (12 channels), 5 to 50 μ l
- Multichannel pipette (12 channels), 30 to 300 μ l or 50 to 300 μ l
- pH Meter
- Analytical balance
- Refrigerator
- Freezer -20°C
- Freezer -80°C
- Magnetic stirrer

3.2. Glassware and plasticware

- Beakers (volumes: 20 – 25 – 150 – 600 – 1000 ml)
- Bottles (preferably transparent)(volumes: 500 and 1000 ml)
- Graduated cylinders (volume: 10 – 50 – 100 – 500 – 1000 ml)
- Falcon Tubes (volumes: 15 and 50 ml)
- Pipetting reservoir (Sigma – n° cat: R1525)
- 96-well NUNC microplates, round-bottom, well volume: 300 μ l (Thomas Scientific cat n°: 6106U07)
- Tips for single and multichannel automatic pipettes



3.3. Miscelânea

- Aparato para filtração de soluções
- Homogeneizador

Usamos homogeneizador elétrico, com pedal. Homogeneizador a pilha também pode ser usado com o mesmo bastão.



Homogeneizador elétrico com pedal.
Página ao lado: homogeneizador a pilha

3.4 Reagentes¹

3.4.1. reagentes de uso geral para os testes

reagente	origem	n° catálogo	quantidade
Acetato de sódio, anidro	Sigma	S-2889	1 Kg
Fosfato de potássio monobásico, anidro	Sigma	P-5379	500 g
Fosfato de potássio bibásico, anidro	Sigma	P-3786	
Fosfato de potássio bibásico, trihidratado	Sigma	P-5504	1 Kg
Fosfato de sódio monobásico, anidro	Sigma	S-5011	
	Sigma	S-0751	500 g
Fosfato de sódio bibásico, anidro	Sigma	S-5136	1 Kg

Os tampões fosfato podem ser feitos com fosfatos anidro ou hidratados, desde que sejam considerados os pesos moleculares dos reagentes originais.

Todos os reagentes listados acima devem ser estocados à temperatura ambiente.

¹ Uso de uma marca registrada não implica endosso pelo Ministério da Saúde, mas objetiva apenas auxiliar na identificação de um determinado produto. O uso de reagentes de outros fabricantes deve ser precedido por testes de avaliação.

3.3. Miscellaneous

- Filtration system
- Homogenizer

We use an electric homogenizer, with pedal. A battery homogenizer also can be employed. The same pestle can be used in both cases.

Battery homogenizer.
Facing page:
electric homogenizer,
with pedal



3.4 Reagents¹

3.4.1. reagents of general use

reagent	manufacturer	cat n°	quantity
Sodium acetate, anhydrous	Sigma	S-2889	1 Kg
Monobasic potassium phosphate, anhydrous	Sigma	P-5379	500 g
Bibasic potassium phosphate, anhydrous	Sigma	P-3786	
Bibasic potassium phosphate, tri-hidratad	Sigma	P-5504	
Monobasic sodium phosphate, anhydrous	Sigma	S-5011	1 Kg
	Sigma	S-0751	500 g
Bibasic sodium phosphate, anhydrous	Sigma	S-5136	1 Kg

Phosphate buffers can be prepared with anhydrous or hydrated phosphates, providing the molecular weight of the original reagents is considered.

All the reagents listed above can be stored at room temperature.

¹ Use of trademark names does not imply endorsement by the Health Ministry but is intended only to assist in identification of a specific product. Use of reactivates from other manufacturers should be preceded by evaluation tests.

3.4.2. reagentes específicos

enzima	reagente	fabricante	n° catálogo	PM	embalagem	temp estoque	quant / teste	n° testes/frasco
ACE	DTNB	Sigma	D8130	396,4	Frasco 5 g	4°C (**)	0,012 g	416
	ACTH (*)	Sigma	A5751	289,2	Frasco 5 g	-20°C	0,0174 g	287
	Propoxur	Sigma	45644	209,2	Frasco 250 mg	4°C (**)	0,1281 mg	1.950
MFO	Citocromo C	Sigma	C3131	12,3	Frasco 100 mg	-20°C	0,01 mg	10.000
	TMBZ (*)	Sigma	T8768	313,3	Frasco 5 g	4°C	0,012 g	416
	metanol	Merck	106.009	32,04	Frasco 1 l	Temp amb	7 ml	142
	ácido acético glacial	Sigma	A-6283	60,05	Frasco 500 ml	Temp amb	(#)	(#)
	H ₂ O ₂ a 30%	Sigma	21,676-3	34,01	Frasco 100 ml	4°C (**)	300 µl	333
	beta-naftil acetato	Sigma	N6875	186,2	Frasco 25 g	-20°C	1,4 mg	17.857
	alfa-naftil acetato	Sigma	N8505	186,2	Frasco 25 g	-20°C	1,4 mg	17.857
	beta-naftol (*)	Sigma	N1250	144,2	Frasco 50 g	Temp amb	0,075 mg	666.666
	alfa-naftol	Sigma	N2780	144,2	Frasco 10 g	Temp amb	0,075 mg	133.333
EST	SDS	Bio-Rad	161-0302	288,38	Frasco 1 kg	Temp amb	0,525 g	1.904
	Fast Blue (***)	Sigma	D9805	475,5	Frasco 10 g	4°C	0,045 g	222
	PNPA	Sigma	N8130	181,2	Frasco 5 g	-20°C	0,0045 g	1.111
	acetonitrila	Sigma	36,045-7	41,05	Frasco 500 ml	Temp amb	250 µl	500-2000 (##)
	acetona	Merck	100.014	58,08	Frasco 1 l	Temp amb	500 µl	2.000
GST	GSH	Sigma	G6529	307,3	Frasco 5 g	4°C	0,0615 g	81
	CDNB	Sigma	C-6396	202,6	Frasco 5 g	4°C (*)	0,0042 g	1.190
PTN totais	protein assay	Bio-Rad	500-0006		Frasco 450 ml	4°C	8 ml	56
	BSA a 2 mg/ml	Pierce	23209		Ampola 1 ml	4°C (*)	60 µl	16

(*) Reagente fotossensível. Guardar ao abrigo da luz.

(**) Embora a recomendação original seja para o estoque destes reagentes à temperatura ambiente, no laboratório eles são mantidos a 4°C, em função de nosso clima tropical.

(***) Ou dianisidina

(#) ver **Seção 7.3.1, a.**

(##) ver **Seção 6.5.**

3.4.2. specific reagents

enzyme	reagent	manufacturer	cat n°	MW	packaging	temp storage	quantity/test	n° tests/pack
ACE	DTNB	Sigma	D8130	396.4	5 g flask	4°C (**)	0.012 g	416
	ACTH (*)	Sigma	A5751	289.2	5 g flask	-20°C	0.0174 g	287
	propoxur	Sigma	45644	209.2	250 mg flask	4°C (**)	0.1281 mg	1.950
MFO	cytochrome C	Sigma	C3131	12.3	100 mg flask	-20°C	0.01 mg	10.000
	TMBZ (*)	Sigma	T8768	313.3	5 g flask	4°C	0.012 g	416
	methanol	Merck	106.009	32.04	1 l flask	Room temp	7 ml	142
	acetic acid glacial	Sigma	A-6283	60.05	500 ml flask	Room temp	(#)	(#)
	30% H ₂ O ₂	Sigma	21,676-3	34.01	100 ml flask	4°C (**)	300 µl	333
	beta-naphthyl acetate	Sigma	N6875	186.2	25 g flask	-20°C	1.4 mg	17.857
	alpha-naphthyl acetate	Sigma	N8505	186.2	25 g flask	-20°C	1.4 mg	17.857
	beta-naphthol (*)	Sigma	N1250	144.2	50 g flask	Room temp	0.075 mg	666.666
	alpha-naphthol	Sigma	N2780	144.2	10 g flask	Room temp	0.075 mg	133.333
EST	SDS	Bio-Rad	161-0302	288.38	1 kg flask	Room temp	0.525 g	1.904
	Fast Blue (***)	Sigma	D9805	475.5	10 g flask	4°C	0.045 g	222
	PNPA	Sigma	N8130	181.2	5 g flask	-20°C	0.0045 g	1.111
	acetonitrile	Sigma	36.045-7	41.05	500 ml flask	Room temp	250 µl	500-2.000 (##)
	acetone	Merck	100.014	58.08	1 l flask	Room temp	500 µl	2.000
GST	GSH	Sigma	G6529	307.3	5 g flask	4°C	0.0615 g	81
	CDNB	Sigma	C-6396	202.6	5 g flask	4°C (*)	0.0042 g	1.190
total PTN	protein assay	Bio-Rad	500-0006		450 ml flask	4°C	8 ml	56
	BSA, 2 mg/ml	Pierce	23209		1 ml vial	4°C (*)	60 µl	16

(*) light sensitive reagent. Store protected from light.

(**) Although storage of these reagents at room temperature is originally recommended, in the laboratory we keep them at 4°C, because of our tropical climate.

(***) also dianisidine.

(#) see [Section 7.3.1 a.](#)

(##) see [Section 6.5.](#)



4. PREPARAÇÃO DOS MOSQUITOS PARA TESTE

4.1. Congelamento

- a) São usadas fêmeas adultas de um dia de idade (0 a 24 horas após emergência), NÃO alimentadas com sangue².
- b) As fêmeas das populações a serem testadas são colocadas, ainda vivas, em tubos tipo Eppendorf, em grupos de 40-50. Fêmeas de uma linhagem de referência, susceptível a inseticidas, usadas como controle interno dos ensaios, são colocadas nos tubos tipo Eppendorf em grupos de sete (7).
- c) Os tubos são congelados imediatamente (*fêmeas ainda vivas*) a -70°C ³.
- d) Quando da utilização (**Seção 4.2, c**), retirar os tubos necessários do congelador para processamento, *imediatamente antes do uso*. Colocar no gelo. Não é recomendável recongelar mosquitos excedentes.

4.2. Homogeneização

- a) Distribuir 45 tubos tipo Eppendorf, numerados, sobre uma bacia com gelo.
- b) Adicionar 30 μl de água a cada tubo. Usar, preferencialmente, água tipo Milli-Q⁴.
- c) Retirar do congelador um tubo com 45-50 mosquitos fêmea da população a ser testada e um tubo com sete susceptível a inseticidas.
- d) Espalhar os mosquitos sobre uma bacia plástica (ou uma placa de Petri), colocada diretamente sobre o gelo.
- e) Distribuir os mosquitos nos tubos numerados (um por tubo). Nos tubos 1 a 40 coloque os mosquitos da população a ser testada e nos tubos 41-45, mosquitos controle, de uma cepa referência, susceptível.

² De acordo com o manual da OMS (Hemingway 1998), não se recomenda usar mosquitos que foram diretamente expostos aos pesticidas antes de morrer.

³ De acordo com o manual da OMS (Hemingway 1998), insetos que morreram há mais que alguns minutos (e foram mantidos à temperatura ambiente) têm níveis de enzimas seriamente reduzidos.

⁴ Não estoque nem autoclave água Milli-Q. Água de osmose reversa (Milli-RO) também pode ser usada.

4. PREPARING MOSQUITOES

4.1. Freezing

- a) Use one-day old (0 - 24 hours after emergence) adult females, NON blood fed².
- b) Females from the populations to be tested are placed still alive inside Eppendorf tubes in pools of 40-50. Females of an insecticide susceptible reference strain, used as internal controls of the assays, are stored in groups of seven (7).
- c) Tubes containing mosquitoes are immediately frozen (*females still alive*) at -70°C ³.
- d) When necessary, remove tubes from the freezer *immediately before use* (Section 4.2, c). Maintain the tubes iced. It is not recommended to re-freeze the remaining mosquitoes.

4.2. Homogenization

- a) Distribute 45 numbered Eppendorf tubes in a basin containing ice.
- b) Add 30 μl of water to each tube. Use preferably reagent grade water (ex: Milli-Q)⁴.
- c) Remove one tube containing 45-50 mosquitoes to be tested and one tube with the insecticide susceptible mosquitoes from the freezer.
- d) Spread mosquitoes over a plastic basin (or a Petri dish), directly placed over ice.
- e) Put one mosquito in each numbered tube, 1-40 corresponding to mosquitoes from the population to be tested and 41-45, susceptible mosquitoes, from the reference strain.

² According to the WHO handbook (Hemingway 1998), it is not recommended to use mosquitoes that were directly exposed to pesticides.

³ According to the WHO handbook (Hemingway 1998), dead insects kept at room temperature for more than some minutes have enzyme levels seriously reduced.

⁴ Do not store neither autoclave Milli-Q water. Reverse osmosis purified water can also be used.



- f) Homogeneizar cada mosquito^{5,6}. Seguir a ordem da numeração dos tubos. *Manter os tubos no gelo durante todo o procedimento*⁷.
- g) Adicionar 270 µl de água a cada tubo. NÃO aplicar na parede, e sim pelo meio, de forma a favorecer a mistura. Seguir a ordem de numeração dos tubos (1 a 45). Com isso, quando se chega ao último tubo, os restos celulares das amostras iniciais já estarão decantados. A partir daí pode-se iniciar a distribuição das alíquotas para os testes de Acetilcolinesterase (ACE) e das Oxidases de Função Mista (MFO) (**Seções 5.1 e 5.2**).
- h) Antes de centrifugar os homogenatos, separar quatro alíquotas, de 25 µl cada, para dosagem de ACE; cada par de alíquotas em uma placa de 96 poços diferente (ver **Seção 4.3.2**)⁸.
- i) Ainda antes de centrifugar, transferir mais duas alíquotas, de 20 µl cada, para uma placa de 96 poços, para quantificação de MFO⁸.
- j) Centrifugar o restante (~160 µl) a 12.000 g por 60 segundos^{9,10}.
- k) Voltar com os tubos da centrífuga para a bacia com gelo. Manter os tubos no gelo durante toda a distribuição dos homogenatos, de forma a reduzir proteólise¹¹.
- l) Transferir, para uma placa nova de 96 poços (a “placa dos mosquitos”, **Seção 4.3.1**), aproximadamente 130-150 µl do sobrenadante de cada homogenato¹². A partir desse ponto, a distribuição das alíquotas é feita com auxílio de pipetas multicanal.

Detalhe de
homogeneização de
mosquito individual com
homogeneizador elétrico



5 Homogeneizadores automáticos são bastante eficientes. Usamos um equipamento de bancada, adaptado, com pedal. Homogeneizadores portáteis, movidos a pilha, também são indicados (**Seção 3.3**).

6 Cada mosquito é homogeneizado por aproximadamente 5-10 segundos. Depois de cada homogeneização, o bastão é lavado em um Becher de 100 ml de capacidade, contendo 50 ml de água, aproximadamente. A mesma amostra de água é usada para todo o procedimento. Depois de cada lavagem, o bastão é seco com guardanapo de papel (tipo Kleenex).

7 A partir da homogeneização, é importante que os procedimentos sejam executados rapidamente.

8 Cuidado para não ressuspender o decantado. Evite retirar material do fundo do tubo.

9 De acordo com o manual da OMS (**Hemingway 1998**), a centrifugação é importante principalmente para a GST (partículas interferem com a absorção a 340 nm, ver **Seção 5.6**).

10 O ideal é usar centrífuga refrigerada. Nas não refrigeradas, não usar tempos maiores que 2 minutos. Usamos mini-centrífuga tipo Eppendorf na velocidade máxima.

11 De acordo com o manual da OMS (**Hemingway 1998**), congelamento a -20°C imediatamente após a homogeneização mantém atividade da enzima relativamente constante por várias horas. Contudo, em nossa experiência é importante realizar o teste o mais rapidamente possível.

12 Serão usados, no total, 110 µl de cada homogenato para as dosagens adicionais (além da Acetilcolinesterase e MFO, cujos volumes estão especificados nas letras h e i).

- f) Homogenize each mosquito^{5,6}, following the numbers defined for the tubes. *Keep tubes iced during the whole homogenization procedure*⁷.
- g) Add 270 µl of water to each tube. DO NOT pipette on the tube wall: if you pipette in the middle of the tube, mixing will be favored. Respect the numbers defined for the tubes (1-45). In this way, when the last tube is attained, the cell debris from the first samples will already have sunk to the bottom of the tube. You can now start the distribution of aliquots to the Acetylcholinesterase (ACE) and Mixed Function Oxidases (MFO) assays (**Sections 5.1 and 5.2**).
- h) Before centrifugation, remove four aliquots, 25 µl each, to quantify ACE; each pair of aliquots in one separate 96-well microplate (see **Section 4.3.2**)⁸.
- i) Before centrifugation, transfer two additional aliquots, 20 µl each, to one 96-well microplate, in order to quantify MFO⁸.
- j) Centrifuge the remaining homogenate (~160 µl) at 12.000 g for 60 seconds^{9,10}.
- k) Remove tubes from the centrifuge and transfer to the basin containing ice. Keep tubes on ice while you distribute the homogenates, in order to reduce proteolysis¹¹.
- l) Transfer to a new 96-well microplate (the “mosquito plate”, **Section 4.3.1**), about 130-150 µl of the supernatant from each homogenate¹². From this point on, a multi-channel pipette can be used to distribute the aliquots.

Facing page:
homogenization
detail of an individual
mosquito, with an electric
homogenizer

⁵ Automatic homogenizers are very efficient. We use an adapted bench equipment, with pedal. Portable homogenizers, battery-operated, are also indicated (**Section 3.3**).

⁶ Each mosquito is homogenized during 5-10 seconds, approximately. After homogenizing each mosquito, the pestle is washed in a 100 ml capacity Beaker, containing 50 ml water. Water in the Beaker is not changed during all the procedure. After each washing, the pestle is dried with a Kleenex.

⁷ *Once you started the homogenization, it is important to proceed quickly.*

⁸ Avoid to resuspend and to remove the decanted material at the bottom of the tube.

⁹ According to the WHO handbook (**Hemingway 1998**), the centrifugation step is important mainly to the GST dosage (particles can interfere with absorption at 340 nm, see **Section 5.6**).

¹⁰ Ideally use a refrigerated centrifuge. If only non-refrigerated centrifuges are available, do not centrifuge for more than 2 minutes. We use a microcentrifuge for Eppendorf tubes, at maximum speed.

¹¹ According to the WHO handbook (**Hemingway 1998**), freezing at -20°C immediately after the homogenization procedure keeps enzyme activity relatively constant for several hours. However, in our experience, it is important to perform the test as quickly as possible.

¹² A total of 110 µl of each homogenate will be needed in the remaining quantifications (besides Acetylcholinesterase and MFO, already discriminated, items h and i).

4.3. Distribuição de homogenatos nas placas

4.3.1. preparo da “placa de mosquitos”

Para facilitar os testes, 130-150 µl dos sobrenadantes dos homogenatos de mosquitos individuais são transferidos dos tubos tipo Eppendorf para uma placa de 96 poços (sempre no gelo), na seguinte ordem¹³:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9	m10	m11	m12
B	m13	m14	m15	m16	m17	m18	m19	m20	m21	m22	m23	m24
C	m25	m26	m27	m28	m29	m30	m31	m32	m33	m34	m35	m36
D	m37	m38	m39	m40	R41	R42	R43	R44	R45			
E												
F												
G												
H												

m = mosquito da população a ser testada
 R = mosquito da cepa referência, susceptível a inseticidas



Transferência dos sobrenadantes de homogenatos de mosquitos para a “placa de mosquitos”

¹³ Esta distribuição permite que a mesma placa seja utilizada para dois testes diferentes: no primeiro teste são usadas as linhas A-D e no segundo, as linhas E-H.

4.3. Distribution of the homogenates in the microplates

4.3.1. preparing the “mosquito plate”

To speed up the tests, 130-150 μ l of the supernatant from the homogenates of individual mosquitoes are transferred from the Eppendorf tubes to a 96-well microplate (always on the ice), in the following order¹³:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9	m10	m11	m12
B	m13	m14	m15	m16	m17	m18	m19	m20	m21	m22	m23	m24
C	m25	m26	m27	m28	m29	m30	m31	m32	m33	m34	m35	m36
D	m37	m38	m39	m40	R41	R42	R43	R44	R45			
E												
F												
G												
H												

m = mosquito from the population to be tested

R = mosquito from the insecticide susceptible reference strain

Facing page: transfer of mosquito homogenate supernatants to the “mosquito plate”

¹³ This distribution enables the use of the same microplate in two tests: lines A-D and lines E-H.

4.3.2. distribuição de amostras nas placas-teste

Separar, para teste, em cinco (5) placas diferentes, alíquotas de homogenato, em duplicata, como segue:

enzima	alíquotas
GST	2 X 15 µl
Esterase alfa	2 X 10 µl
Esterase beta	2 X 10 µl
Esterase "PNPA"	2 X 10 µl
Proteínas totais	2 X 10 µl

Distribuir as alíquotas de homogenatos de acordo com o modelo abaixo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9	m10	m11	m12
B	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9	m10	m11	m12
C	m13	m14	m15	m16	m17	m18	m19	m20	m21	m22	m23	m24
D	m13	m14	m15	m16	m17	m18	m19	m20	m21	m22	m23	m24
E	m25	m26	m27	m28	m29	m30	m31	m32	m33	m34	m35	m36
F	m25	m26	m27	m28	m29	m30	m31	m32	m33	m34	m35	m36
G	m37	m38	m39	m40	R41	R42	R43	R44	R45	b	b	b
H	m37	m38	m39	m40	R41	R42	R43	R44	R45	c	c	c

m = mosquito da população a ser testada

R = mosquito da cepa referência, susceptível a inseticidas

b = branco (controle negativo)

c = controle positivo¹⁴

¹⁴ Nos casos em que não há controle positivo, os seis poços (G10 a G12 e H10 a H12) são preenchidos como brancos (ver [Seção 5](#)).

Antes da centrifugação, alíquotas de homogenatos de mosquitos são transferidas para as placas de 96 poços, para quantificação de ACE e MFO



4.3.2. distributing samples in the test microplates

Prepare five (5) different microplates, containing the following amounts of mosquito homogenate, in duplicate samples:

enzyme	aliquots
GST	2 X 15 µl
alpha-Esterase	2 X 10 µl
beta-Esterase	2 X 10 µl
“PNPA” Esterase	2 X 10 µl
Total proteins	2 X 10 µl

Distribute the homogenate aliquots according to the model below:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9	m10	m11	m12
B	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9	m10	m11	m12
C	m13	m14	m15	m16	m17	m18	m19	m20	m21	m22	m23	m24
D	m13	m14	m15	m16	m17	m18	m19	m20	m21	m22	m23	m24
E	m25	m26	m27	m28	m29	m30	m31	m32	m33	m34	m35	m36
F	m25	m26	m27	m28	m29	m30	m31	m32	m33	m34	m35	m36
G	m37	m38	m39	m40	R41	R42	R43	R44	R45	b	b	b
H	m37	m38	m39	m40	R41	R42	R43	R44	R45	c	c	c

m = mosquito from the population to be tested

R = mosquito from the insecticide susceptible reference strain

b = blank (negative control)

c = positive control¹⁴

Facing page: before centrifugation, mosquito homogenate aliquots are transferred to 96-well microplates in order to quantify ACE and MFO

¹⁴ When no positive control is available, the 6 wells (G10 to G12 and H10 to H12) are used as blanks (see Section 5).

5. TESTES ENZIMÁTICOS

Cada teste é sempre executado por duas pessoas ao mesmo tempo, para otimizar o processo. NÃO recomendamos que o teste completo (de todas as enzimas simultaneamente, 45 mosquitos) seja executado por uma só pessoa.

O teste para cada enzima tem um protocolo e um tempo de reação diferente. No laboratório, definimos uma ordem de execução que facilita o teste rápido e sem atropelos de todas as enzimas:

- 1) Oxidases de Função Mista¹⁵
- 2) Acetilcolinesterase
- 3) Esterase-alfa¹⁵
- 4) Esterase-beta¹⁵
- 5) dosagem de proteínas
- 6) curva-padrão de proteína¹⁶
- 7) Esterase “PNPA”
- 8) Glutathiona-S-transferase

Com exceção da quantificação de atividade de MFO e ACE, que devem ser as primeiras enzimas a serem testadas, a ordem acima não é obrigatória, devendo cada laboratório determinar o fluxo de trabalho mais adequado à sua rotina.



¹⁵ Além dos testes com as enzimas, são realizadas curvas-padrão com substratos das MFO e das Esterases alfa e beta. Estas curvas são utilizadas para conversão dos valores de absorbância em atividade específica das enzimas. Em nossa rotina laboratorial, optamos por refazer as curvas-padrão com os substratos destas enzimas toda vez que iniciamos uma nova bateria de testes com as populações de campo (10 a 20 populações). Usamos como base para cálculo a média de pelo menos três curvas-padrão.

¹⁶ Uma nova curva-padrão de proteína é feita a cada teste. Embora possa ser feita a qualquer tempo durante o teste, recomenda-se que seja realizada junto com a dosagem de proteínas.



5. ENZYMATIC TESTS

In order to optimize the procedure, each test is always performed simultaneously by two persons. We DO NOT recommend that a complete test (45 mosquitoes, all enzymes simultaneously) be done by just one person.

The test for each enzyme has a different protocol and a different reaction time. In the laboratory we defined an optimized sequence for all the reactions:

- 1) Mixed Function Oxidases¹⁵
- 2) Acetylcholinesterase
- 3) alpha-Esterase¹⁵
- 4) beta-Esterase¹⁵
- 5) total proteins
- 6) protein standard curve¹⁶
- 7) “PNPA” Esterase
- 8) Glutathione-S-transferase

This sequence of reactions is not obligatory, excluding MFO and ACE that are the first enzymes to be quantified. Each laboratory should define the sequence of reactions most convenient for its routine.

¹⁵ In addition to the quantification of this enzyme, it is necessary to do standard curves with the substrates of MFO and alpha- and beta-Esterases. These curves are necessary to the conversion of absorbance values in the specific activity of each enzyme. In our routine, we opted to construct new standard curves each time a new batch of tests with field populations starts (10-20 populations). *We take into account the mean of at least three standard curves.*

¹⁶ A new protein standard curve is done at each test. It can be done at any moment during the test. However, it is recommended that it is performed together with the protein dosage of the mosquito homogenates.

5.1. Acetilcolinesterase (ACE)

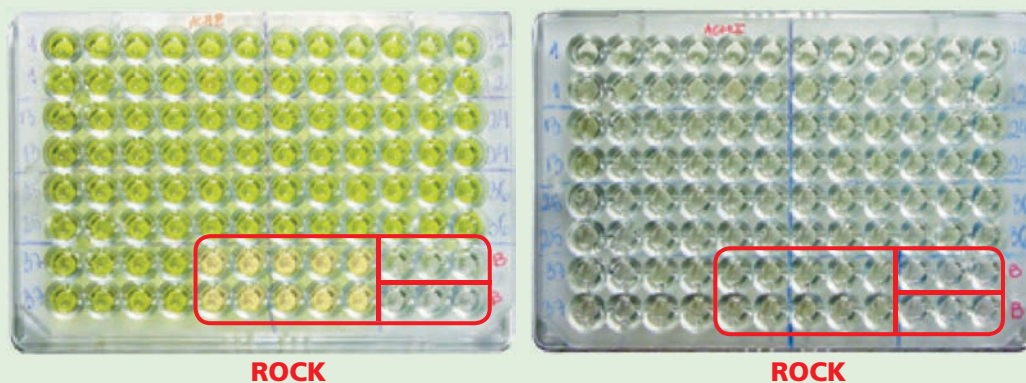
A tabela abaixo discrimina as soluções necessárias para este teste. Para consulta sobre os detalhes da preparação, consulte a [Seção 6.1](#).

n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	Triton/Na fosfato	29 ml	500 ml	em estoque
2	DTNB/Na fosfato	2 ml	3 ml	preparar antes do teste
3	AChE	2,5 ml	3 ml	
4	AChI	2,5 ml	3 ml	

- Distribuir 25 µl de homogenato, *antes da centrifugação*, em duplicata, em duas placas. Uma placa receberá o nome de “AChE” e a outra, de “AChI”. Na placa AChE mede-se a atividade total de Acetilcolinesterase. Na placa AChI mede-se a atividade desta enzima quando na presença de um inibidor. O inibidor utilizado é propoxur, carbamato indicado para esta finalidade pelo manual da OMS ([Hemingway 1998](#)).
- Nos poços correspondentes aos “brancos” (6 poços: G10 a G12 e H10 a H12), adicionar 25 µl de água.
- Adicionar, em cada poço, 145 µl de Triton / Na fosfato.
- Adicionar, em cada poço, 10 µl DTNB / Na fosfato.
- Adicionar, na placa AchE, em cada poço, 25 µl da solução AchE.
- Adicionar, na placa AchI, em cada poço, 25 µl da solução AchI.
(o volume final em cada poço é de 205 µl)
- Fazer a leitura (*end point*), após uma hora, das duas placas (AchE e AchI), a 405 nm.

Distribuição de homogenatos de mosquitos nas placas para teste de ACE. *Página ao lado:* detalhe da coloração resultante do teste ACE, nas placas AChE (painel da esquerda) e AChI (painel da direita), respectivamente com e sem propoxur. B: branco





Resulting color of ACE assay, in the AChE (left panel) and AChI (right panel) plates, respectively with and without propoxur. B: blank. Facing page: mosquito homogenate distribution in the microplates for ACE test

5.1. Acetylcholinesterase (ACE)

The table below discriminates the solutions necessary for this test. More details related to the preparation of solutions are shown in [Section 6.1](#).

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	Triton/Na phosphate	29 ml	500 ml	in stock
2	DTNB/Na phosphate	2 ml	3 ml	freshly prepared
3	AChE	2.5 ml	3 ml	
4	AChI	2.5 ml	3 ml	

- Distribute 25 μ l of the homogenates, *before centrifugation*, in duplicate, in two microplates. One plate is named “AChE” and the other “AChI”. In the AChE plate the total activity of Acetylcholinesterase is quantified. In plate AChI the remaining activity of this enzyme, in the presence of an inhibitor, is measured. Propoxur is the inhibitor utilized, carbamate indicated by the WHO handbook ([Hemingway 1998](#)).
- In the “blank” wells (6 wells: G10 to G12 and H10 to H12), add 25 μ l of water.
- Add to each well 145 μ l of Triton / Na phosphate.
- Add to each well 10 μ l DTNB / Na phosphate.
- Add to each well of the plate AChE 25 μ l of the solution AChE.
- Add to each well of the plate AChI 25 μ l of the solution AChI.
(the final volume in each well is 205 μ l)
- Read the absorbance of both plates (AChE and AChI), at 405 nm after 1 hour (“end point”).

5.2. Oxidases de Função Mista (MFO)

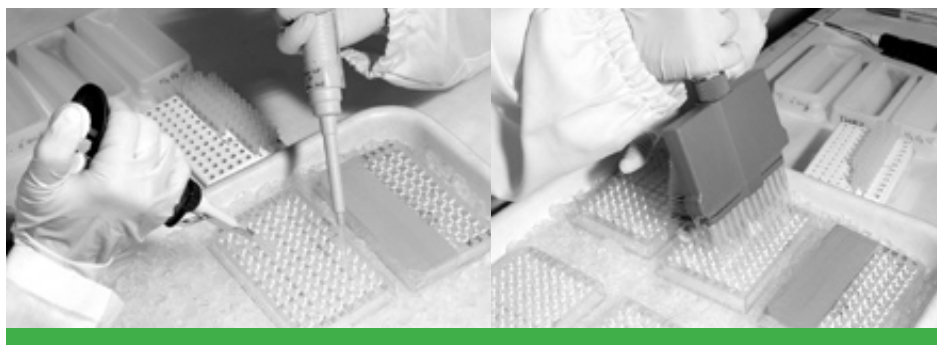
Esta não é uma medida de atividade enzimática, e sim uma quantificação do grupamento heme, que, em insetos não alimentados com sangue está, em sua maioria, associado ao citocromo P450 (ver [Seção 9.3](#)).

A tabela abaixo discrimina as soluções necessárias para este teste. Para consulta sobre os detalhes da preparação, consulte a [Seção 6.2](#).

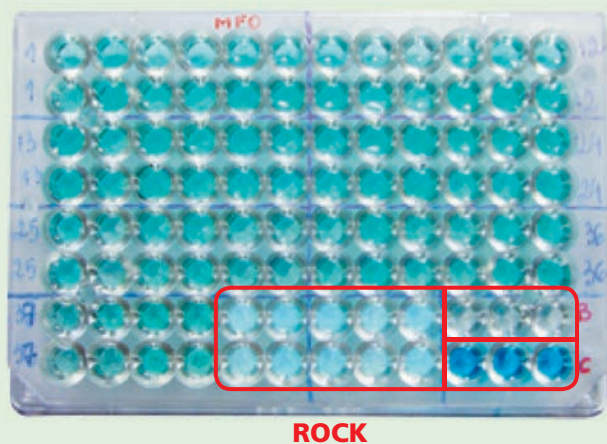
n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	K fosf 90 mM, pH 7,2	6 ml	500 ml	em estoque
2	citocromo C 0,01 mg/ml	60 µl	5 ml	
3	TMBZ/Na acet	20 ml	24 ml	preparar antes do teste
4	H ₂ O ₂ a 3%	2,5 ml	3 ml	

- Distribuir 20 µl de homogenato, antes da centrifugação, em duplicata, em uma placa.
- Em cada um dos poços correspondentes aos “brancos” (três poços: G10 a G12) adicionar 20 µl de tampão K fosf.
- Em cada um dos poços correspondentes aos controles positivos (três poços: H10 a H12), adicionar 20 µl de solução de citocromo C (total gasto por teste: 0,2 ug de citocromo C)¹⁷.
- Adicionar, em cada poço, 60 µl de tampão K fosf.
- Adicionar, em cada poço, 200 µl de solução de trabalho: TMBZ/Na acet.
- Adicionar, em cada poço, 25 µl H₂O₂ a 3% (*).
(o volume final em cada poço é de 305 µl)
- Incubar por 90 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.
- Fazer a leitura (*end point*) a 650 nm.

Distribuição de homogenatos de mosquitos na placa para quantificar MFO (painel da esquerda) e distribuição de reagente com o uso de pipeta multicanal (painel da direita).
Página ao lado: detalhe da coloração resultante do teste MFO. B: branco; C: controle positivo



¹⁷ A concentração de citocromo C usada no controle positivo foi calibrada em função da curva-padrão, estando na faixa de linearidade. É recomendável observar sempre o valor de absorvância do controle positivo, que é bastante estável em testes sucessivos. Recomenda-se repetir a curva-padrão se os valores observados para o citocromo C estiverem muito alterados em relação ao que se observa geralmente.



Resulting color of MFO assay. B: blank; C: positive control. *Facing page*: mosquito homogenate distribution for MFO test (left panel) and distribution of reagents using a multichannel pipette (right panel)

5.2. Mixed Function Oxidases (MFO)

This test does not measure the enzymatic activity. It quantifies the heme group that, in non blood-fed insects, is mainly associated with cytochrome P450 (see [Section 9.3](#) for details).

The table below discriminates the solutions necessary for this test. More details related to the preparation of solutions are shown in [Section 6.2](#).

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	90 mM K phosph, pH 7.2	6 ml	500 ml	in stock
2	0.01 mg/ml cytochrome C	60 µl	5 ml	
3	TMBZ/Na acet	20 ml	24 ml	freshly prepared
4	3% H ₂ O ₂	2.5 ml	3 ml	

- Distribute 20 µl of the homogenates, before centrifugation, in duplicate, in one microplate.
 - In the “blank” wells (3 wells: G10 to G12), add 20 µl of K phosph.
 - In the “positive control” wells (3 wells: H10 to H12), add 20 µl of the solution cytochrome C (total per test: 0.2 µg cytochrome C)¹⁷.
 - Add to each well 60 µl K phosph buffer.
 - Add to each well 200 µl of the working solution: TMBZ/Na acet.
 - Add to each well 25 µl of 3% H₂O₂ (*).
- (the final volume in each well is 305 µl)
- Incubate at room temperature and protected from light during 90 minutes.
 - Read the absorbance at 650 nm (“end point”).

¹⁷ The concentration of cytochrome C used in the positive control was calibrated according to the standard curve and it is included in its linearity range. It is recommended to frequently observe the absorbance value of the positive control, generally very stable among successive tests. It is recommended to repeat the standard curve if the values observed for the cytochrome C are very different from the usual ones.

5.2.1. curva-padrão de citocromo C

Em nossa rotina laboratorial, optamos por refazer a curva toda vez que examinamos uma nova bateria de testes com as populações de campo. Consideramos, como base para cálculo de coeficiente angular, a ser utilizado na conversão de absorbância para ug de substrato ([Seção 9.3](#)), o valor da média de pelo menos três curvas-padrão.

Adicionar, em duplicata, na mesma linha de uma placa, as seguintes quantidades de citocromo C, na concentração de 0,01 mg/ml:

µg cit C	µl cit C (0,01 mg/ml)	µl K fosf
0,0	–	80
0,01	1	79
0,02	2	78
0,05	5	75
0,1	10	70
0,2	20	60

Proceder como para a dosagem nas amostras – [Seção 5.1, e – h](#).

5.3. Esterase alfa (α -EST)

A tabela abaixo discrimina as soluções necessárias para este teste. Para consulta sobre os detalhes da preparação, consulte a [Seção 6.3](#).

n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	alfa-naftol (controle positivo)	30 µl	5 ml	em estoque
2	alfa-naftil acetato/Na fosfato	20 ml	25 ml	preparar antes do teste
3	Fast Blue	10 ml	15 ml	

- Distribuir 10 µl de homogenato, *depois da centrifugação*, em duplicata, em uma placa.
- Em cada um dos poços correspondentes aos “brancos” (três poços: G10 a G12) adicionar 10 µl de água.

5.2.1. cytochrome C standard curve

In our laboratory routine, we opted to devise a new standard curve for every new battery of tests with field populations. We consider the mean of at least three standard curves as a basis to calculate the angular coefficient that is utilized in the conversion of absorbance to μg substrate (Section 9.3).

Add, in duplicate, in the same line of a microplate, the following quantities of 0.01 mg/ml cytochrome C:

μg cit C	μl cit C (0.01 mg/ml)	μl K phosph
0.0	–	80
0.01	1	79
0.02	2	78
0.05	5	75
0.1	10	70
0.2	20	60

Proceed exactly as to the quantification of mosquito samples – Section 5.1, e – h.

5.3. alpha-Esterase (α -EST)

The Table below discriminates the solutions necessary for this test. More details related to the preparation of solutions are shown in Section 6.3.

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	alpha-naphthol (positive control)	30 μl	5 ml	in stock
2	alpha-naphthyl acetate/Na phosphate	20 ml	25 ml	freshly prepared
3	Fast Blue	10 ml	15 ml	

- Distribute 10 μl of the homogenates, *after centrifugation*, in duplicate, in one microplate.
- In the “blank” wells (3 wells: G10 to G12) add 10 μl of water.

- c) Em cada um dos poços correspondentes aos controles positivos (três poços: H10 a H12), adicionar 10 μl de solução de alfa-naftol a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($\sim 3,5$ nmoles/ μl) em cada poço (total: 5 μg ou ~ 35 nmoles)^{18,19}.
- d) Adicionar, em cada poço, 200 μl de alfa-naftil acetato/Na fosfato.
- e) Deixar 15 minutos à temperatura ambiente.
- f) Adicionar, em cada poço, 50 μl de Fast Blue. Esta solução é preparada em quantidade suficiente para a quantificação de alfa e beta-Esterases (gasta-se 5 ml para cada teste). Esta solução contém detergente e produz muitas bolhas, por isto, prepara-se um volume superior àquele efetivamente gasto. Por este mesmo motivo, as agitações são feitas por inversão (e não no *vortex*).
Cuidado ao pipetar. (*o volume final em cada poço é de 260 μl*)
- g) Esperar 5 minutos à temperatura ambiente.
- h) Fazer a leitura (*end point*), a 570 nm.

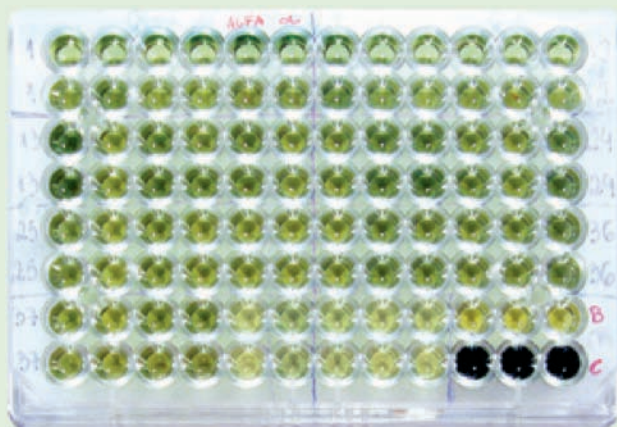
Distribuição de homogenatos de mosquitos nas placas para teste de α -EST e β -EST.
 Página ao lado: detalhe da coloração resultante do teste α -EST. B: branco; C: controle positivo



¹⁸ Os controles positivos (alfa e beta-naftol) são bastante estáveis. Contudo, é conveniente que alíquotas de 50 μl sejam congeladas (-20°C), e descongeladas uma única vez.

¹⁹ A concentração de alfa e de beta-naftol usada no controle positivo (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) foi calibrada em função da curva-padrão, estando na faixa de linearidade. É recomendável observar sempre o valor de absorbância do controle positivo, que é bastante estável em testes sucessivos. Recomenda-se repetir a curva-padrão se os valores observados para os controles positivos estiverem muito alterados em relação ao que se observa geralmente.

- c) In the “positive control” wells (3 wells: H10 to H12), add 10 μl of the solution alpha-naphthol at 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (~ 3.5 nmoles/ μl) in each well (total: 5 μg or ~ 35 nmoles)^{18,19}.
- d) Add to each well 200 μl of alpha-naphthyl acetate/Na phosphate.
- e) Incubate at room temperature during 15 minutes.
- f) Add to each well 50 μl of Fast Blue. Prepare this solution in quantity enough to the dosage of alpha and beta Esterases (5 ml are used in each test). The solution contains a detergent, and foam is produced during its preparation. For this reason it is recommended to prepare a volume higher than the volume used. Agitate by inversion (do not use the vortex). Pipette with care.
(the final volume in each well is 260 μl)
- g) Incubate at room temperature during 5 minutes.
- h) Read the absorbance at 570 nm (end point).



Resulting color of α -EST assay. B: blank; C: positive control. Facing page: mosquito homogenate distribution for α -EST and β -EST tests

¹⁸ The positive controls, alpha- and beta-naphthol, are stable. However, it is convenient to freeze 50 μl aliquots (-20°C) and thaw it just once.

¹⁹ The concentration of alpha- and beta-naphthol used in the positive control (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) was calibrated according to the standard curve and it is included in its linearity range. It is recommended to frequently observe the absorbance value of the positive control, generally very stable among successive tests. It is recommended to repeat the standard curve if the values observed for the positive controls are very different from the usual ones.

5.3.1. curva-padrão de alfa-naftol

Adicionar, em duplicata, na mesma linha de uma placa, as seguintes quantidades de alfa-naftol a 0,5 mg/ml:

μg alfa-naftol	μl alfa-naftol (0,5 mg/ml)	μl H ₂ O
0	–	10
1	2	8
2	4	6
3	6	4
4	8	2
5	10	–

Página ao lado:
Coloração resultante
do teste para β -EST.
B: branco; C: controle
positivo

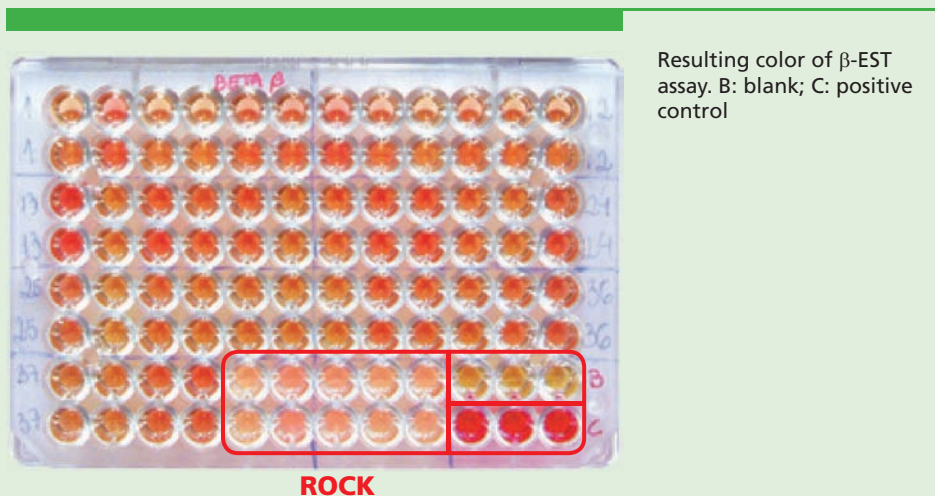
Proceder como para a dosagem nas amostras – [Seção 5.3, d – h](#).

5.4. Esterase beta (β -EST)

A tabela abaixo discrimina as soluções necessárias para este teste. Para consulta sobre os detalhes da preparação, consulte a [Seção 6.4](#).

n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	beta-naftol (controle positivo)	30 μl	5 ml	em estoque
2	beta-naftil acetato/Na fosfato	20 ml	25 ml	preparar antes do teste
3	Fast Blue	10 ml	15 ml	

- Distribuir 10 μl de homogenato, *depois da centrifugação*, em duplicata, em uma placa.
- Em cada um dos poços correspondentes aos “brancos” (três poços: G10 a G12) adicionar 10 μl de água.
- Em cada um dos poços correspondentes aos controle positivos (três poços: H10 a H12), adicionar 10 μl de solução de beta-naftol a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (~ 3,5 nmoles/ μl) em cada poço (total: 5 μg ou ~35 nmoles).
- Adicionar, em cada poço, 200 μl de beta-naftil acetato/Na fosfato.
- Deixar 15 minutos à temperatura ambiente.
- Adicionar, em cada poço, 50 μl de Fast Blue. Como mencionado na seção anterior, esta solução é preparada em quantidade suficiente para a quantificação de alfa e beta-Esterases. Cuidado ao pipetar.
(o volume final em cada poço é de 260 μl)



5.3.1. alpha-naphthol standard curve

Add, in duplicate, in the same line of a microplate, the following quantities of 0.5 mg/ml alpha-naphthol:

μg alpha-naphthol	μl alpha-naphthol (0.5 mg/ml)	μl H ₂ O
0	–	10
1	2	8
2	4	6
3	6	4
4	8	2
5	10	–

Proceed exactly as to the quantification of mosquito samples – [Section 5.3, d – h](#).

5.4. beta-Esterase (β -EST)

The table below discriminates the solutions necessary for this test. More details related to the preparation of solutions are shown in [Section 6.4](#).

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	beta-naphthol (positive control)	30 μl	5 ml	in stock
2	beta-naphthyl acetate/Na phosphate	20 ml	25 ml	freshly prepared
3	Fast Blue	10 ml	15 ml	

- Distribute 10 μl of the homogenates, *after centrifugation*, in duplicate, in one microplate.
- In the “blank” wells (3 wells: G10 to G12) add 10 μl of water.

- g) Esperar 5 minutos à temperatura ambiente.
 h) Fazer a leitura (*end point*), a 570 nm.

Adição dos reagentes nas placas para quantificação de α -EST e β -EST



5.4.1. curva-padrão de beta-naftol

Adicionar, em duplicata, na mesma linha de uma placa, as seguintes quantidades de beta-naftol a 0,5 mg/ml:

μg beta-naftol	μl beta-naftol (0,5 mg/ml)	μl H ₂ O
0	–	10
1	2	8
2	4	6
3	6	4
4	8	2
5	10	–

Proceder como para a dosagem nas amostras – [Seção 5.4, d – h](#).

- c) In the “positive control” wells (3 wells: H10 to H12), add 10 μl of the solution beta-naphthol at 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (~ 3.5 nmoles/ μl) in each well (total: 5 μg or ~ 35 nmoles).
- d) Add to each well 200 μl of beta naphthyl acetate/Na phosphate.
- e) Incubate at room temperature during 15 minutes.
- f) Add to each well 50 μl of Fast Blue. As mentioned in the previous section, this solution is prepared in quantity enough to the dosage of alpha and beta-Esterases. Pipette with care.
(the final volume in each well is 260 μl)
- g) Incubate at room temperature during 5 minutes.
- h) Read the absorbance at 570 nm (end point).

5.4.1. beta-naphthol standard curve

Add, in duplicate, in the same line of a microplate, the following quantities of 0.5 mg/ml beta-naphthol:

μg beta-naphthol	μl beta-naphthol (0,5 mg/ml)	μl H ₂ O
0	–	10
1	2	8
2	4	6
3	6	4
4	8	2
5	10	–

Proceed exactly as to the quantification of mosquito samples – [Section 5.4, d – h](#).

Facing page: Addition of specific Esterase reagents in 96-well test microplates

5.5. Esterase “PNPA” (PNPA-EST)

A tabela abaixo discrimina a solução necessária para este teste. Para consulta sobre os detalhes da preparação, consulte a [Seção 6.5](#).

n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	PNPA/Na fosfato	20 ml	25 ml	preparar antes do teste

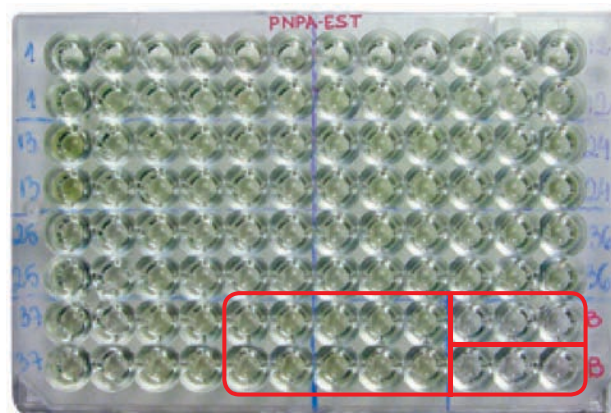
- Distribuir 10 µl de homogenato, *depois da centrifugação*, em duplicata, em uma placa.
- Em cada um dos poços correspondentes aos “brancos” (seis poços: G10 a G12 e H10 a H12) adicionar 10 µl de água.
- Adicionar, em cada poço, 200 µl de solução de trabalho: PNPA/Na fosfato. *(o volume final em cada poço é de 210 µl)*
- Fazer leitura, por 2 minutos, a intervalos de 15 segundos, a 405 nm. *De acordo com o manual da OMS (Hemingway 1998), este ensaio NÃO pode ser lido como end point.*

5.6. Glutathiona-S-transferase (GST)

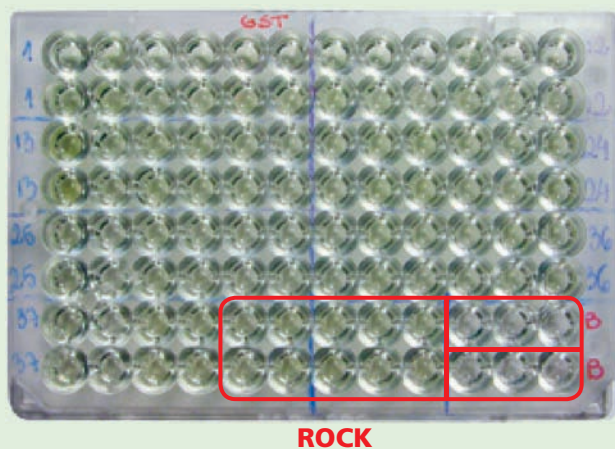
A tabela abaixo discrimina a solução necessária para este teste. Para consulta sobre os detalhes da preparação, consultar a [Seção 6.6](#).

n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	GSH/CDNB	20 ml	21 ml	preparar antes do teste

Coloração resultante do teste para PNPA-EST. *Página ao lado:* O teste para GST que não resulta em coloração visível e deve ser lido com filtro UV (340nm). B: branco



ROCK



The GST assay is read with a UV filter (340nm) since its reaction product is not colored. Facing page: Resulting color of PNPA-EST assay. B: blank

5.5. "PNPA" Esterase (PNPA-EST)

The table below discriminates the solutions necessary for this test. More details related to the preparation of solutions are shown in [Section 6.5](#).

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	PNPA/Na phosphate	20 ml	25 ml	freshly prepared

- Distribute 10 μ l of the homogenates, *after centrifugation*, in duplicate, in one microplate.
- In the "blank" wells (6 wells: G10 to G12 and H10 to H12), add 10 μ l of water.
- Add to each well 200 μ l of the working solution: PNPA/Na phosphate.
(the final volume in each well is 210 μ l)
- Read the absorbance at 405 nm, at 15-second intervals, during 2 minutes.
According to the WHO handbook ([Hemingway 1998](#)), *this assay must not be read as "end point"*.

5.6. Glutathione-S-transferase (GST)

The table below discriminates the solutions necessary for this test. More details related to the preparation of solutions are shown in [Section 6.6](#).

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	GSH/CDNB	20 ml	21 ml	freshly prepared

- Distribuir 15 µl de homogenato, *depois da centrifugação*, em duplicata, em uma placa.
- Em cada um dos poços correspondentes aos “brancos” (seis poços: G10 a G12 e H10 a H12) adicionar 15 µl de água.
- Adicionar, em cada poço, 195 µl de solução de trabalho: GSH/CDNB.
(o volume final em cada poço é de 210 µl)
- Fazer leitura, por 20 minutos, a intervalos de 1 minuto, a 340 nm.

5.7. Proteínas totais (PTN)

A tabela abaixo discrimina as soluções necessárias para este teste. Para consulta sobre os detalhes da preparação, consulte a [Seção 6.7](#).

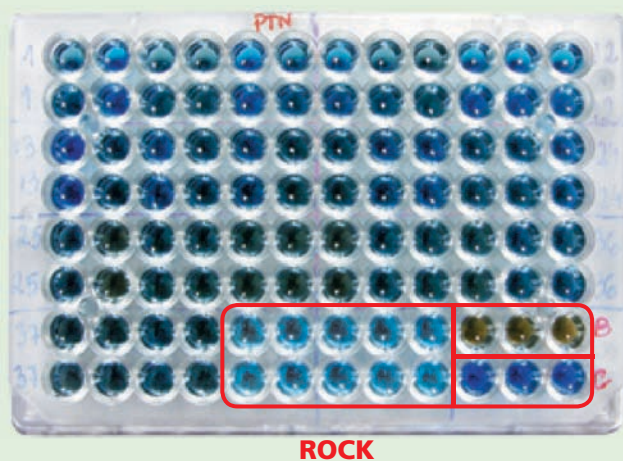
n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	BSA 1 µg/µl	30 µl	1 ml	em estoque
2	reativo Bio-Rad	30 ml	40 ml (**)	preparar antes do teste

(**) deste total, parte é usada para a confecção da curva-padrão de BSA: 3,6 ml ([Seção 5.7.1](#), alternativa 1) ou 7,2 ml ([Seção 5.7.2](#), alternativa 2).

- Distribuir 10 µl de homogenato, *depois da centrifugação*, em duplicata, em uma placa.
- Em cada um dos poços correspondentes aos “brancos” (três poços: G10 a G12), adicionar 10 µl de água.
- Em cada um dos poços correspondentes aos controles positivos (três poços: H10 a H12), adicionar 10 µl de solução de BSA a 1 µg/µl (10 µg totais).
- Adicionar, em cada poço, 300 µl do reativo (Bio-Rad) a 1:5.
(o volume final em cada poço é de 310 µl)
- Fazer leitura, 3 a 5 minutos após a adição de reativo, a 620 nm.

Adição do reativo para dosagem de proteína total nos homogenatos de mosquitos. *Página ao lado*: Coloração resultante do teste para PTN. B: branco; C: controle positivo





Resulting color of PTN assay. B: blank; C: positive control. *Facing page:* Addition of protein reactive to quantify total proteins in mosquito homogenates

- Distribute 15 μl of the homogenates, *after centrifugation*, in duplicate, in one microplate.
- In the “blank” wells (6 wells: G10 to G12 and H10 to H12) add 15 μl of water.
- Add to each well 195 μl of the working solution: GSH/CDNB.
(*the final volume in each well is 210 μl*)
- Read the absorbance at 340 nm, at one-minute intervals, during 20 minutes.

5.7. Total proteins (PTN)

The table below discriminates the solutions necessary for this test. More details related to the preparation of solutions are shown in [Section 6.7](#).

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA	30 μl	1 ml	in stock
2	Bio-Rad reactive	30 ml	40 ml (**)	freshly prepared

(**) part of this quantity is used in the BSA standard curve: 3.6 ml ([Section 5.7.1](#), alternative 1) or 7.2 ml ([Section 5.7.2](#), alternative 2).

- Distribute 10 μl of the homogenates, *after centrifugation*, in duplicate, in one microplate.
- In the “blank” wells (3 wells: G10 to G12) add 10 μl of water.
- In the “positive control” wells (3 wells: H10 to H12), add 10 μl of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA (total:10 μg).
- Add to each well 300 μl of the Bio-Rad reactive at 1:5.
(*the final volume in each well is 310 μl*)
- Read the absorbance 3 -5 minutes later, at 620 nm.

5.7.1. curva-padrão de proteína – alternativa 1

Esta é a curva-padrão utilizada rotineiramente. Adicionar, em duplicata, na mesma linha de uma placa, como indicado na [Seção 5.7.3](#), as seguintes quantidades de BSA:

$\mu\text{g BSA}$	$\mu\text{l BSA (*)}$	$\mu\text{l H}_2\text{O}$
0	0	10
2,5	2,5	7,5
5	5,0	5
7,5	7,5	2,5
10	10,0	0
15	7,5	2,5

(*) Em todos os casos, utiliza-se solução-estoque de BSA a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, com exceção do ponto de 15 μg , quando solução a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ é usada.

Proceder como para a dosagem nas amostras – [Seção 5.7, d, e](#).

Exemplo de leitura de absorvância no espectrofotômetro



5.7.1. protein standard curve – alternative 1

This standard curve is routinely used. Add, in duplicate, in the same row of a microplate, as indicated in [Section 5.7.3](#), the following quantities of BSA:

$\mu\text{g BSA}$	$\mu\text{l BSA (*)}$	$\mu\text{l H}_2\text{O}$
0	0	10
2.5	2.5	7.5
5	5.0	5
7.5	7.5	2.5
10	10.0	0
15	7.5	2.5

(*) A 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA stock solution is used in all cases, except in the point "15 μg ", when a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA solution is used.

Proceed as to the quantification of mosquito samples – [Section 5.7, d, e](#).

5.7.2. protein standard curve – alternative 2

This standard curve can be used when a higher level of detail is needed. Add, in duplicate, in two rows of a microplate, as indicated in [Section 5.7.3](#), the following quantities of BSA:

$\mu\text{g BSA}$	$\mu\text{l BSA (*)}$	$\mu\text{l H}_2\text{O}$
0	0.0	10
1	1.0	9
2	2.0	8
3	3.0	7
4	4.0	6
5	5.0	5
6	6.0	4
7	7.0	3
8	8.0	2
9	9.0	1
10	10.0	0
15	7.5	2.5

(*) A 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA stock solution is used in all cases, except in the point "15 μg ", when a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA solution is used.

Facing page: Example of absorbance reading in the spectrophotometer

Proceed as to the quantification of mosquito samples - [Section 5.7, d, e](#).

6. PREPARAÇÃO DE REAGENTES ESPECÍFICOS

6.1. Acetilcolinesterase (ACE)

n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	Triton/Na fosf	29 ml	500 ml	em estoque
2	DTNB/Na fosf	2 ml	3 ml	preparar na hora
3	AChE	2,5 ml	3 ml	
4	AChI	2,5 ml	3 ml	

1) **Triton/Na fosf** – 1% Triton X-100 em 100 mM tampão fosfato de sódio pH 7,8
Esta solução pode ser estocada por meses, fechada, a 4°C.

Estoque, 500 ml

- 5 ml Triton X-100 a 100%
- 50 ml tampão fosfato de sódio a 1 M pH 7,8 (para preparação consultar [Seção 7.1.2](#))
- água qsp 500 ml

2) **DTNB/Na fosf** – 10 mM DTNB em 100 mM tampão fosfato de sódio pH 7,0
Esta solução deve ser preparada *no máximo 4 horas antes do uso*.

Solução de trabalho, 3 ml

- 0,012 g (0,01189 g) de DTNB (PM 396,3)²⁰
- 3 ml tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (para preparação consultar [Seção 7.1.3](#))

3, 4) **AChE/AChI** – Iodeto de acetiltiocolina, a 10 mM, em água, na ausência (*AChE*) ou na presença (*AChI*) de propoxur
Estas soluções devem ser preparadas *no máximo 4 horas antes do uso*.

Para ter 3 ml de cada solução:

Solução de trabalho, 6 ml

- 0,0174 g de iodeto de acetiltiocolina (PM 289,2)²¹
- 6 ml água
- separar 3 ml: *AChE*
- aos 3 ml restantes, adicionar 6 µl de propoxur 0,1 M em acetona: *AChI*
(para preparação de propoxur, consultar [Seção 7.4](#))

²⁰ Em geral, mantemos várias alíquotas de 0,012 g de DTNB em tubos Eppendorf, a 4°C.

²¹ Em geral, mantemos várias alíquotas de 0,0174 g de acetiltiocolina em tubos Eppendorf, a -20°C.

6 PREPARING SPECIFIC REAGENTS

6.1. Acetylcholinesterase (ACE)

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	Triton/Na phosph	29 ml	500 ml	in stock
2	DTNB/Na phosph	2 ml	3 ml	freshly prepared
3	AChE	2.5 ml	3 ml	
4	AChI	2.5 ml	3 ml	

1) **Triton/Na phosph** – 1% Triton X-100 in 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.8

This solution can be stored for several months, closed, at 4°C.

Stock, 500 ml

- 5 ml 100% Triton X-100
- 50 ml 1 M sodium phosphate buffer pH 7.8 (details of preparation in [Section 7.1.2](#))
- water to 500 ml

2) **DTNB/Na phosph** – 10 mM DTNB in 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.0

This solution must be prepared *just before use* (4 hours maximum).

Working solution, 3 ml

- 0.012 g (0.01189 g) DTNB (MW 396.3)²⁰
- 3 ml 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 (details of preparation in [Section 7.1.3](#))

3, 4) **AChE/AChI** – 10 mM acetylthiocholine iodide, in water, in the absence (*AChE*) or in the presence (*AChI*) of propoxur.

Both solutions must be freshly prepared (*maximum 4 hours before use*).

In order to have 3 ml of each solution:

Working solution, 6 ml

- 0.0174 g acetylthiocholine iodide (MW 289.2)²¹
- 6 ml water
- reserve 3 ml: *AChE*
- to the remaining 3 ml, add 6 µl 0.1 M propoxur in acetone: *AChI* (details of propoxur preparation in [Section 7.4](#))

²⁰ We keep several 0.012 g DTNB aliquots in Eppendorf tubes, at 4°C.

²¹ We keep several 0.0174 g acetylthiocholine aliquots in Eppendorf tubes, at -20°C.

6.2. Oxidases de Função Mista (MFO)

n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	K fosf	6 ml	500 ml	em estoque
2	citocromo C	60 µl	5 ml	
3	TMBZ / Na acet	20 ml	24 ml	preparar na hora
4	H ₂ O ₂ a 3%	2,5 ml	3 ml	

1) **tampão fosfato de potássio (K fosf)** – 90 mM tampão fosfato de potássio pH 7,2

Esta solução pode ser estocada por meses, fechada, a 4°C.

Estoque, 500 ml

- para preparação consultar [Seção 7.2.3](#)

2) **citocromo C** – 0,01 mg/ml em acetato de sódio 250 mM pH 5,0

Esta solução é estocada a -20°C, em alíquotas de 80-100 µl. *Cada alíquota é usada apenas uma vez e o restante é descartado.*

Estoque, 5 ml

- pesar 0,5 mg de citocromo C

- adicionar 5 ml tampão acetato de sódio 250 mM pH 5,0 ([Seção 7.3](#)).

Concentração final da solução: 0,1 mg/ml

- diluir a solução acima dez vezes: 0,5 ml do estoque + 4,5 ml de acetato de sódio 250 mM pH 5,0

- esta quantidade é suficiente para 50 alíquotas de 100 µl

3) **TMBZ/acetato de sódio (TMBZ/Na acet)**

Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

Solução de trabalho

- 6 ml TMBZ a 0,2% em metanol (a)

- 18 ml tampão acetato de sódio a 250 mM pH 5,0 (b)

Esta solução é feita em duas etapas:

a) 0,2% TMBZ em metanol (6 ml por ensaio)

6.2. Mixed Function Oxidases (MFO)

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	K phosph	6 ml	500 ml	in stock
2	cytochrome C	60 µl	5 ml	
3	TMBZ/Na acet	20 ml	24 ml	freshly prepared
4	3% H ₂ O ₂	2.5 ml	3 ml	

1) **potassium phosphate buffer (K phosph)** - 90 mM potassium phosphate buffer
pH 7.2

This solution can be stored for several months, closed at 4°C.

Stock, 500 ml

- details of preparation in [Section 7.2.3](#)

2) **cytochrome C** – 0.01 mg/ml in 250 mM sodium acetate pH 5.0

This solution is stored at -20°C, in 80-100 µl aliquots. *Each aliquot is used only once, and the remainder is discarded.*

Stock, 5 ml

- weight 0.5 mg cytochrome C

- add 5 ml 250 mM sodium acetate buffer pH 5.0 ([Section 7.3](#)). Final concentration:
0.1 mg/ml

- dilute this solution to a tenth: 0.5 ml stock + 4.5 ml 250 mM sodium acetate pH 5.0

- this amount is enough for 50 aliquots of 100 µl each

3) **TMBZ/sodium acetate (TMBZ/Na acet)**

This solution must be freshly prepared.

Working solution

- 6 ml 0.2% TMBZ in methanol (a)

- 18 ml 250 mM sodium acetate buffer pH 5.0 (b)

This solution is prepared in two steps:

a) 0.2% TMBZ in methanol (6 ml for each assay)

Solução de trabalho

- 0,012 g de TMBZ²²

- 6 ml metanol

Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

b) tampão acetato de sódio a 250 mM pH 5,0

Estoque

- para detalhes de preparação, consultar [Seção 7.3.1](#)

4) **peróxido de hidrogênio** – H₂O₂ a 3%

Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

Solução de trabalho

- 300 µl H₂O₂ a 30%

- 2,7 ml água

6.3. Esterase alfa (α-EST)

n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	alfa-naftol (controle positivo)	30 µl	5 ml	em estoque
2	alfa-naftil acet/Na fosf	20 ml	25 ml	preparar na hora
3	Fast Blue	5 ml	15 ml	

1) **alfa-naftol** – alfa-naftol a 0,5 mg/ml (~ 3,5 mmoles/ml) (PM: 144,2)

Esta solução é estocada a -20°C, em alíquotas de 100 µl. As alíquotas podem ser usadas mais de uma vez.

Estoque, 5 ml

- pesar 2,5 mg de alfa-naftol

- adicionar 5 ml de acetona

- esta quantidade é suficiente para 50 alíquotas de 100 µl

2) **alfa-naftil acetato/fosfato de sódio (alfa-naftil acet / Na fosf)** – 0,3 mM

alfa-naftil acetato em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2

Esta solução deve ser preparada *no máximo 1-2 horas antes do uso*.

²² Em geral, mantemos várias alíquotas de 0,012 g de TMBZ em tubos tipo Eppendorf, a 4°C.

Working solution

- 0.012 g TMBZ²²
- 6 ml methanol

This solution must be freshly prepared.

b) 250 mM sodium acetate buffer pH 5.0

Stock

- details of preparation in [Section 7.3.1](#)

4) **hydrogen peroxide** – 3% H₂O₂

This solution must be freshly prepared.

Working solution

- 300 µl 30% H₂O₂
- 2.7 ml water

6.3. alfa-Esterase (α -EST)

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	alpha-naphthol (positive control)	30 µl	5 ml	in stock
2	alpha-naphthyl acet/Na phosph	20 ml	25 ml	freshly prepared
3	Fast Blue	5 ml	15 ml	

1) **alpha-naphthol** – 0.5 mg/ml alpha-naphthol (~ 3.5 mmoles/ml) (MW: 144.2)

This solution is stored at -20°C, in 100 µl aliquots. Aliquots may be used more than once.

Stock, 5 ml

- weigh 2.5 mg de alpha-naphthol
- add 5 ml acetone
- this amount is enough for 50 aliquots of 100 µl each

2) **alpha-naphthyl acetate/sodium phosphate (alpha-naphthyl acet/Na phosph)** – 0.3 mM alpha-naphthyl acetate in 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.2

This solution must be prepared *not more than 1-2 hours before use*.

²² We keep several 0.012 g TMBZ aliquots in Eppendorf tubes, at 4°C.

Solução de trabalho

- 250 µl 30 mM alfa-naftil acetato (a)
- 24,75 ml tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2 (b)

Esta solução é feita em duas etapas:

a) 30 mM alfa-naftil acetato em acetona

Estoque

- 0,028 g de alfa-naftil acetato (PM 186,2)
- 5 ml acetona

Esta solução pode ser estocada por meses, fechada, a 4°C.

b) tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2

- para preparação consultar [Seção 7.1.4](#)

3) **Fast Blue** – 0,3% Fast Blue B em 3,5% SDS

Esta solução deve ser preparada no máximo 1-2 horas antes do uso.

Solução de trabalho

- pesar 45 mg de Fast Blue B (0,045 g)²³
- adicionar 4,5 ml de água
- *Depois de dissolvido*, adicionar 10,5 ml de SDS a 5% ([Seção 7.5](#))

6.4. Esterase beta (β-EST)

n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	beta-naftol (controle positivo)	30 µl	5 ml	em estoque
2	beta-naftil acet/Na fosf	20 ml	25 ml	preparar na hora
3	Fast Blue	5 ml	15 ml	

1) **beta-naftol** – beta-naftol a 0,5 mg/ml (~ 3,5 mmoles/ml)

Esta solução é estocada a -20°C, em alíquotas de 100 µl. As alíquotas podem ser usadas mais de uma vez.

Estoque, 5 ml

- pesar 2,5 mg de beta-naftol
- adicionar 5 ml de acetona
- esta quantidade é suficiente para 50 alíquotas de 100 µl

²³ Em geral, mantemos várias alíquotas de 45 mg (0,045 g) de Fast Blue em tubos tipo Eppendorf, a 4°C.

Working solution

- 250 μ l 30 mM alpha-naphthyl-acetate (*a*)
- 24.75 ml 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.2 (*b*)

This solution is prepared in two steps:

- a*) 30 mM alpha-naphthyl acetate in acetone

Stock

- 0.028 g alpha-naphthyl acetate (MW 186.2)
- 5 ml acetone

This solution can be stored for several months, closed, at 4°C.

- b*) 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.2

- details of preparation in [Section 7.1.4](#)

- 3) **Fast Blue** – 0.3% Fast Blue B in 3.5% SDS

This solution must be prepared not more than 1-2 hours before use.

Working solution

- weigh 45 mg Fast Blue B (0.045 g)²³
- add 4.5 ml water
- *After solubilization*, add 10.5 ml 5% SDS ([Section 7.5](#))

6.4. beta-Esterase (β -EST)

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	beta- naphthol (positive control)	30 μ l	5 ml	in stock
2	beta- naphthyl acet/Na phosph	20 ml	25 ml	freshly prepared
3	Fast Blue	5 ml	15 ml	

- 1) **beta-naphthol** - 0.5 mg/ml beta-naphthol (~ 3.5 mmoles/ml)

This solution is stored at -20°C, in 100 μ l aliquots. Aliquots can be used more than once.

Stock, 5 ml

- weigh 2.5 mg de beta-naphthol
- add 5 ml acetone
- this amount is enough for 50 aliquots of 100 μ l each

²³ We keep several 45 mg (0.045 g) Fast Blue aliquots in Eppendorf tubes, at 4°C.

- 2) **beta-naftil acetato/fosfato de sódio (beta-naftil acet/Na fosf)** – 0,3 mM beta-naftil acetato em tampão fosfato 20 mM pH 7,2
Esta solução deve ser preparada no máximo 1-2 horas antes do uso.

Solução de trabalho

- 250 µl 30 mM beta-naftil acetato (a)
- 24,75 ml tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2 (b)

Esta solução é feita em duas etapas:

- a) 30 mM beta-naftil acetato em acetona

Estoque

- 0,028 g de beta-naftil acetato (PM 186,2)
- 5 ml acetona

Esta solução pode ser estocada por meses, fechada, a 4°C.

- b) tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2
 - para preparação consultar [Seção 7.1.4](#)

- 3) **Fast Blue** – A preparação desta solução, em quantidade suficiente para os ensaios de alfa e beta-Esterases, está indicada na seção anterior.

6.5. Esterase “PNPA” (PNPA-EST)

n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	PNPA/Na fosf	20 ml	25 ml	preparar na hora

- 1) **acetato de para-nitrofenil/fosfato de sódio (PNPA/Na fosf)** – 1 mM PNPA em tampão fosfato de sódio a 50 mM pH 7,4
 Esta solução deve ser preparada imediatamente antes do uso (normalmente preparamos *no máximo 5 minutos antes de usar*).
 Se a solução estiver fortemente amarelada, descartar.

Solução de trabalho:

- 250 µl 100 mM PNPA em acetonitrila (a)
- 24,75 ml tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 (b)

2) **beta-naphthyl acetate/sodium phosphate (beta- naphthyl acet/Na phosph)** – 0.3 mM beta-naphthyl acetate in 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.2

This solution must be prepared not more than 1-2 hours before use.

Working solution

- 250 µl 30 mM beta-naphthyl acetate (a)
- 24.75 ml 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.2 (b)

This solution is prepared in two steps:

- a) 30 mM beta-naphthyl acetate in acetone

Stock

- 0.028 g beta-naphthyl acetate (MW 186.2)
- 5 ml acetone

This solution can be stored for several months, closed, at 4°C.

- b) 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.2

- details of preparation in [Section 7.1.4](#)

- 3) **Fast Blue** – Preparation of this solution, in quantity enough to the alpha and beta-Esterases assays, is indicated in the previous section.

6.5. "PNPA" Esterase (PNPA-EST)

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	PNPA/Na phosph	20 ml	25 ml	freshly prepared

- 1) **p-nitrophenyl acetate/sodium phosphate (PNPA/Na phosph)** – 1 mM PNPA in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.4

This solution must be prepared immediately before use (in general our preparation *does not exceeded 5' prior to usage*).

If the solution presents an intense yellow color, discard.

Working solution

- 250 µl 100 mM PNPA in acetonitrile (a)
- 24.75 ml 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 (b)

Esta solução é feita em duas etapas:

a) 100 mM PNPA em acetonitrila

Solução de trabalho

- 0,01815 g PNPA (PM 181,15)²⁴

- 1 ml de acetonitrila²⁵

De acordo com o manual da OMS (**Hemingway 1998**), esta solução pode ser estocada por 1-2 meses, fechada, a 4°C. *No laboratório, descartamos depois de uma semana.*

Acetonitrila é altamente tóxica. Cuidado!

b) tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4

Solução de trabalho

- para preparação consultar **Seção 7.1.3**

6.6. Glutathione-S-transferase (GST)

n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	GSH/CDNB	20 ml	21 ml	preparar na hora

1) **glutathione reduzida/cloro-dinitrobenzeno (GSH/CDNB)** – 9,5 mM GSH em 1 mM CDBN

O manual da OMS (**Hemingway 1998**) preconiza que esta solução seja preparada 1 a 2 horas antes do uso. *Nós preparamos, no máximo, 10-15 minutos antes.*

Solução de trabalho:

- 20 ml de GSH a 10 mM (a)

- 1 ml de CDBN a 21 mM (b)

Esta solução é feita em duas etapas:

a) 10 mM GSH (PM 307,3) em tampão fosfato de potássio

²⁴ Esta solução é suficiente para quatro testes. A solução descrita no item (a) é mantida a 4°C. Adicionalmente, podem-se manter várias alíquotas de 0,01815 g de PNPA em tubos tipo Eppendorf, a -20°C.

²⁵ Já experimentamos problemas em virtude da qualidade da acetonitrila; atualmente usamos o produto da Sigma, que tem funcionado adequadamente.

This solution is prepared in two steps:

a) 100 mM PNPA in acetonitrile

Working solution

- 0.01815 g PNPA (MW 181.15)²⁴

- 1 ml acetonitrile²⁵

According to the WHO handbook ([Hemingway 1998](#)), this solution can be stored during 1-2 months, closed, at 4°C. *In the laboratory we discard after one week.*

Acetonitrile is highly toxic. Attention!!

b) 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.4

Working solution

- details of preparation in [Section 7.1.3](#)

6.6. Glutathione-S-transferase (GST)

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	GSH/CDNB	20 ml	21 ml	freshly prepared

1) **Reduced glutathione/chloro-dinitrobenzene (GSH/CDNB)** – 9.5 mM GSH in 1 mM CDBN

The WHO handbook ([Hemingway 1998](#)) recommends preparing this solution 1-2 hours before use. *We prepare at most 10-15 minutes before.*

Working solution

- 20 ml 10 mM GSH (*a*)

- 1 ml 21 mM CDBN (*b*)

This solution is prepared in two steps:

a) 10 mM GSH (MW 307.3) in potassium phosphate buffer

²⁴ This solution is enough to four (4) tests. The solution described in (a) is kept at 4°C. In addition, several 0.01815 g PNPA aliquots can be stored in Eppendorf tubes at -20°C.

²⁵ We already had problems derived from the quality of acetonitrile. We presently we use Sigma's product that works well.

Solução de trabalho

- 0,0615 g de GSH²⁶
- 20 ml tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,5 (ver [Seção 7.2.4](#))

b) 21 mM CDNB (PM 202,6) em metanol

Solução de trabalho

- 0,0042 g de CDNB²⁴
- 1 ml metanol

6.7. Proteínas totais (PTN)

n°	solução	quantidade por teste		observações
		qto se gasta	qto se prepara	
1	BSA (controle)	30 µl	1 ml	em estoque
2	reativo Bio-Rad	30 ml	40 ml (**)	preparar na hora

1) Albumina Sérica Bovina (BSA) – 1 mg/ml em água

Ampolas contendo 1 ml de solução-padrão de BSA, a 2 mg/ml (ver [Seção 3.4.2](#)) são mantidas a 4°C. Depois que uma ampola é aberta, seu conteúdo é distribuído em alíquotas de 60 ou 100 µl, em tubos tipo Eppendorf de 0,5 ml de capacidade. As alíquotas são mantidas a -20°C.

No momento do uso, adiciona-se igual volume de água à alíquota (para preparação de BSA a 1 mg/ml).

Cada alíquota é suficiente para os controles positivos (na placa com as amostras de mosquitos) e para a curva-padrão, de acordo com a alternativa 1 (alíquota de 60 µl) ou alternativa 2 (alíquota de 100 µl). *A solução de 1 mg/ml que sobra é descartada.*

O ponto de 15 µg de BSA da curva-padrão (ver [Seções 5.7.1 e 5.7.2](#)) é feito diretamente com a solução a 2 mg/ml. No laboratório, usamos uma alíquota separada, que recongelamos 2-3 vezes.

2) reativo para proteínas (reativo Bio-Rad) – Bio-Rad n° catálogo 500-0006

A solução deve ser preparada no momento do uso.

Solução de trabalho:

- 8 ml reativo
- 32 ml água

²⁶ Em geral, mantemos várias alíquotas de 0,0615 g de GSH e de 0,0042 g de CDNB em tubos tipo Eppendorf, a 4°C.

Working solution

- 0.0615 g GSH²⁶
- 20 ml 100 mM potassium phosphate buffer pH 6.5 (see [Section 7.2.4](#))

b) 21 mM CDNB (MW 202.6) in methanol

Working solution

- 0.0042 g CDNB²⁴
- 1 ml methanol

6.7. Total proteins (PTN)

n°	solution	quantity per test		observations
		quantity used	quantity prepared	
1	BSA (control)	30 µl	1 ml	in stock
2	Bio-Rad reactive	30 ml	40 ml (**)	freshly prepared

1) **Bovine Serum Albumin (BSA)** – 1 mg/ml in water

Vials with 1 ml of the standard BSA solution, at 2 mg/ml (see [Section 3.4.2](#)) are kept at 4°C. Once the vial is opened, its content is distributed in 60-100 µl aliquots in 0.5 ml Eppendorf tubes, stored at -20°C.

Upon application, an equal volume of water is added to one aliquot (in order to prepare 1 mg/ml BSA).

Each aliquot is enough for the positive controls (in the microplates containing the mosquito samples) and for the standard curve, according to alternative 1 (60 µl aliquot) or alternative 2 (100 µl aliquot). *The remaining 1 mg/ml BSA solution is discarded.*

In the standard curve, the point corresponding to 15 µg BSA (see [Sections 5.7.1 and 5.7.2](#)) is obtained directly with the solution at 2 mg/ml. For this purpose, we use a separate aliquot that is re-frozen 2-3 times.

2) **protein reactive (Bio-Rad reactive)** – Bio-Rad cat 500-0006

This solution must be prepared immediately prior to usage.

Working solution

- 8 ml reactive
- 32 ml water

²⁶ We keep several 0.0615 g GSH and 0.0042g CDNB aliquots in Eppendorf tubes, at 4°C.

7. TAMPÕES GERAIS E SOLUÇÕES-ESTOQUE

Todas as soluções descritas nas **Seções 7.1 a 7.4** são estocadas a 4°C.

Observações importantes:

- 1) Fazer a solução-estoque de tampão no máximo 20 vezes mais concentrada que a solução de trabalho.
- 2) Para obter o pH adequado, devem-se misturar duas soluções de mesma molaridade (monobásico e bibásico), nas quantidades indicadas. A solução resultante (o tampão) estará, automaticamente, na mesma molaridade que as soluções de fosfato originais.
- 3) Fazer a mistura no pHmetro. As quantidades indicadas abaixo são, na prática, apenas uma aproximação.
 - Adicionar mais fosfato bibásico se tiver que elevar o pH.
 - Adicionar mais fosfato monobásico se tiver que baixar o pH.
- 4) *Atenção com contaminações.* Guardar as soluções em frascos transparentes. Examinar sempre ao usar!

7.1. Tampões fosfato de sódio

Tampões fosfato de sódio necessários:

molaridade	pH	enzima, teste	solução
100 mM	7,0	ACE	DTNB/Na fosf
50 mM	7,4	PNPA-EST	PNPA
100 mM	7,8	ACE	Triton/Na fosf
20 mM	7,2	EST (alfa, beta)	naftil acet/Na fosf

Preparação de estoques de tampão fosfato de sódio:

7.1.1. estoques fosfato de sódio (mono e bibásico) a 1 M

- fosfato de sódio monobásico 1 M – 1 litro (PM = 120)

(usamos fosfato anidro: NaH_2PO_4)

120 g de fosfato de sódio monobásico

água qsp 1 litro

Esterilize com filtro 0,22 μm

- fosfato de sódio bibásico 1 M – 1 litro (PM = 142)

(usamos fosfato anidro: Na_2HPO_4)

142 g de fosfato de sódio bibásico

7. GENERAL BUFFERS AND STOCK SOLUTIONS

All the solutions described in **Sections 7.1 to 7.4** are stored at 4°C.

Important notes:

- 1) The buffer stock solution should be at most 20 times more concentrated than the working solution.
- 2) To obtain the required pH, two solutions of identical molarity (mono and bibasic) have to be mixed, in the indicated quantities. The resulting solution (buffer) will have, automatically, the same molarity than the original phosphate solution.
- 3) Mix both solutions in the pHmeter. The amounts indicated below are just an indication.
 - Add more bibasic phosphate if you have to increase pH.
 - Add more monobasic phosphate if you have to decrease pH.
- 4) *Take care with contaminations.* Store your solutions in transparent flasks. Examine always before using!!

7.1. Sodium phosphate buffers

Sodium phosphate buffers needed:

molarity	pH	enzyme, test	solution
100 mM	7.0	ACE	DTNB/Na phosph
50 mM	7.4	PNPA-EST	PNPA
100 mM	7.8	ACE	Triton/Na phosph
20 mM	7.2	EST (alpha, beta)	naphthyl acet/Na phosph

Preparing stocks of sodium phosphate buffers:

7.1.1. sodium phosphate stocks (mono and bibasic) at 1 M

- sodium phosphate monobasic 1M – 1 liter (MW = 120)

(we use anhydrous phosphate: NaH_2PO_4)

120 g sodium phosphate monobasic

water to 1 liter

Sterilize by filtration through a 0.22 μm filter

- sodium phosphate bibasic 1M – 1 liter (MW = 142)

(we use anhydrous phosphate: Na_2HPO_4)

142 g sodium phosphate bibasic

água qsp 1 litro
Esterilize com filtro 0,22 µm

7.1.2. tampões-estoque fosfato de sódio a 1 M

a) Na tabela abaixo estão as quantidades recomendadas para a preparação de 1 litro dos tampões fosfato de sódio nos pHs necessários. É importante que a concentração seja a mesma nas duas soluções de fosfato:

pH	monobásico (NaH ₂ PO ₄)	bibásico (Na ₂ HPO ₄)
7,0	390 ml	610 ml
7,2	280 ml	720 ml
7,4	190 ml	810 ml
7,8	85 ml	915 ml

b) Abaixo seguem as quantidades de fosfato de sódio a 1M que usamos de rotina no laboratório:

pH	monobásico (NaH ₂ PO ₄)	bibásico (Na ₂ HPO ₄)
7,0	19,5 ml	30,5 ml
7,2	70 ml	180 ml
7,4	9,5 ml	40,5 ml
7,8	42,5 ml	457,5 ml

c) Usar as soluções-tampão a 1 M para preparar tampões cuja concentração seja igual ou superior a 50 mM

7.1.3. tampões fosfato de sódio a 100 e 50 mM

teste	mM	pH	ml tampão 1 M (*)	ml água	ml total
ACE	100	7,0	50	450	500
PNPA-EST	50	7,4	50	950	1000

(*) solução-tampão (Seção 7.1.2) a 1 M no pH indicado

7.1.4. tampão fosfato de sódio a 20 mM

Este tampão é usado para os testes de Esterase alfa e beta.

Para preparação do tampão fosfato de sódio a 20 mM pH 7,2, usar estoques de fosfato de sódio (mono e bibásico) a 0,2 M:

- a) Diluir 5 vezes os estoques de fosfato de sódio a 1 M:
- fosfato monobásico: 20 ml fosfato + 80 ml água (100 ml final)

water to 1 liter

Sterilize by filtration through a 0.22 µm filter

7.1.2. sodium phosphate stock buffers at 1 M

a) The table below discriminates the amounts recommended to prepare 1 liter of sodium phosphate buffers at defined pHs. It is important to assure that the concentration of both phosphate solutions is the same:

pH	Monobasic (NaH ₂ PO ₄)	bibasic (Na ₂ HPO ₄)
7.0	390 ml	610 ml
7.2	280 ml	720 ml
7.4	190 ml	810 ml
7.8	85 ml	915 ml

b) The quantities of 1 M sodium phosphate we use in laboratory routine are as follows:

pH	monobasic (NaH ₂ PO ₄)	bibasic (Na ₂ HPO ₄)
7.0	19.5 ml	30.5 ml
7.2	70 ml	180 ml
7.4	9.5 ml	40.5 ml
7.8	42.5 ml	457.5 ml

c) Use 1 M buffer solutions to prepare buffers that are at least 50 mM.

7.1.3. sodium phosphate buffers at 100 and 50 mM

test	mM	pH	ml buffer 1 M (*)	ml water	ml total
ACE	100	7.0	50	450	500
PNPA-EST	50	7.4	50	950	1000

(*) 1 M buffer solution (Section 7.1.2) in the indicated pH

7.1.4. sodium phosphate buffer at 20 mM

This buffer is used for the alpha and beta-Esterases tests.

To prepare 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.2, use stocks of 0.2 M sodium phosphate (mono and bibasic):

a) Dilute the 1 M sodium phosphate stocks 5 times:

- monobasic phosphate: 20 ml phosphate + 80 ml water (100 ml final)

- fosfato bibásico: 40 ml fosfato + 160 ml água (200 ml final)
(estas serão soluções de fosfato a 0,2 M)
- b) Preparar 250 ml de tampão a 0,2 M, usando as mesmas proporções indicadas na tabela da **Seção 7.1.2, b**:
 - 70 ml fosfato monobásico
 - 180 ml fosfato bibásico
- c) Corrigir o pH, conforme necessário, usando as soluções de fosfato de sódio mono ou bibásico a 0,2 M (ver **item a**).
- d) Descartar o excedente das soluções de fosfato mono e bibásico a 0,2 M (descritas no **item a**).
- e) Diluir o tampão a 0,2 M 10 vezes para preparar a solução a 20 mM:
 - 10 ml tampão fosfato 0,2 M pH 7,2 (ver **item c**)
 - 90 ml água
 - Este tampão pode ser diluído em quantidade suficiente para uso por 2-3 dias.
 - Dependendo do volume de trabalho, pode-se preparar 200 ml, adicionando-se 20 ml de tampão fosfato 0,2 M e 180 ml de água.

7.2. Tampões fosfato de potássio

Tampões fosfato de potássio necessários:

molaridade	pH	enzima, teste	solução
90 mM	7,2	MFO	K fosf
100 mM	6,5	GST	GSH

Preparação de estoques de tampão fosfato de sódio:

7.2.1. estoques fosfato de potássio (mono e bibásico) a 1M

- fosfato de potássio monobásico 1 M – 1 litro (PM = 136,1)

(usamos fosfato anidro: KH_2PO_4)

136,1 g de fosfato de potássio monobásico

água qsp 1 litro

Esterilize com filtro 0,22 μm

- fosfato de potássio bibásico 1 M – 1 litro (PM = 228,2)

(usamos fosfato trihidratado: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

228,2 g de fosfato de potássio bibásico

água qsp 1 litro

Esterilize com filtro 0,22 μm

- bibasic phosphate: 40 ml phosphate + 160 ml water (200 ml final)
(these will be 0.2 M phosphate solutions)
- b) Prepare 250 ml of 0.2 M buffer, using the same proportions indicated in the table of **Section 7.1.2, b**:
 - 70 ml monobasic phosphate
 - 180 ml bibasic phosphate
- c) Correct the pH, if necessary, using the 0.2 M mono or bibasic sodium phosphate solutions (see **item a**).
- d) Discard the remaining 0.2 M mono and bibasic phosphate solutions (described in **item a**).
- e) Dilute the 0.2 M buffer 10 times to prepare the 20 mM solution:
 - 10 ml 0.2 M phosphate buffer pH 7.2 (see **item c**)
 - 90 ml water
 - This buffer can be diluted in amounts sufficient for usage during 2-3 days.
 - Depending on the work volume, 200 ml can be prepared, mixing 20 ml 0.2 M phosphate buffer and 180 ml water.

7.2. Potassium phosphate buffers

Potassium phosphate buffers needed:

molarity	pH	enzyme, test	solution
90 mM	7.2	MFO	K phosph
100 mM	6.5	GST	GSH

Preparing stocks of potassium phosphate buffers:

7.2.1. potassium phosphate stocks (mono and bibasic) at 1M

- potassium phosphate monobasic 1M – 1 liter (MW = 136.1)

(we use anhydrous phosphate: KH_2PO_4)

136.1 g potassium phosphate monobasic

water to 1 liter

Sterilize by filtration through a 0.22 μm filter

- potassium phosphate bibasic 1 M – 1 liter (MW = 228.2)

(we use trihydrated phosphate: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

228.2 g de potassium phosphate bibasic

water to 1 liter

Sterilize by filtration through a 0.22 μm filter

7.2.2. tampões-estoque fosfato de potássio a 1 M

a) Na tabela abaixo estão as quantidades recomendadas para a preparação de 1 litro dos tampões fosfato de potássio nos pHs necessários. É importante que a concentração seja a mesma nas duas soluções de fosfato:

pH	monobásico (KH_2PO_4)	bibásico (K_2HPO_4)
6,5	640 ml	360 ml
7,2	283 ml	717 ml

7.2.3. tampão fosfato de potássio a 90 mM pH 7,2

- a) preparação de tampão a 1 M
- 71,7 ml de fosfato bibásico a 1 M
 - 28,3 ml de fosfato monobásico a 1 M
 - misturar no agitador magnético, com acompanhamento no pHmetro
 - corrigir o pH, se necessário, acrescentando fosfato bibásico para elevar o pH ou o fosfato monobásico para diminuir o pH
 - com isto, tem-se 100 ml de uma solução tampão fosfato de potássio a 1 M pH 7,2
- b) preparação de tampão a 90 mM
- 45 ml tampão fosfato de potássio a 1 M, pH 7,2 (ver [item a](#))
 - 455 ml de água
 - conferir pH. Acertar com fosfato bibásico ou monobásico a 90 mM para manter a molaridade desejada²⁷

7.2.4. tampão fosfato de potássio a 100 mM pH 6,5

- a) preparação de tampão a 1 M
- 18 ml de fosfato bibásico a 1 M
 - 32 ml de fosfato monobásico a 1 M
 - misturar no agitador magnético, com acompanhamento no pHmetro
 - corrigir, se necessário, acrescentando fosfato bibásico para elevar o pH ou o fosfato monobásico para diminuir o pH
 - com isto, tem-se 50 ml de uma solução tampão fosfato de potássio a 1 M pH 6,5
- b) preparação de tampão a 100 mM
- 50 ml tampão fosfato de potássio a 1 M, pH 6,5
 - 450 ml de água
 - conferir pH. Acertar com fosfato bibásico ou monobásico a 100 mM para manter a molaridade desejada²⁸.

²⁷ Para preparar fosfato de potássio mono ou bibásico a 90 mM basta adicionar 9 ml dos estoques a 1 M ([Seção 7.2.1](#)) a 91 ml de água.

²⁸ Para preparar fosfato de potássio mono ou bibásico a 100 mM basta adicionar 10 ml dos estoques a 1 M ([Seção 7.2.1](#)) a 90 ml de água.

7.2.2. potassium phosphate stock buffers at 1 M

a) The table below discriminates the quantities recommended to prepare 1 liter of potassium phosphate buffers at defined pHs. It is important to assure that the concentration of both phosphate solutions is the same:

pH	monobasic (KH_2PO_4)	bibasic (K_2HPO_4)
6.5	640 ml	360 ml
7.2	283 ml	717 ml

7.2.3. potassium phosphate buffer at 90 mM pH 7.2

a) preparation of buffer at 1 M

- 71.7 ml 1 M bibasic phosphate
- 28.3 ml 1 M monobasic phosphate
- mix on the magnetic stirrer, accompanying with the pHmeter
- correct the pH, if necessary, adding bibasic phosphate to increase the pH or monobasic phosphate, to decrease the pH
- this corresponds to 100 ml of a 1 M potassium phosphate buffer pH 7.2 solution

b) preparation of buffer at 90 mM

- 45 ml 1 M potassium phosphate buffer pH 7.2 (see [item a](#))
- 455 ml water
- check pH. Correct if necessary, using the 90 mM mono or bibasic phosphate solutions, to keep the desired molarity²⁷

7.2.4. potassium phosphate buffer at 100 mM pH 6.5

a) preparation of buffer at 1 M

- 18 ml 1 M bibasic phosphate
- 32 ml 1 M monobasic phosphate
- mix on the magnetic stirrer, accompanying with the pHmeter
- correct the pH, if necessary, adding bibasic phosphate to increase the pH or monobasic phosphate, to decrease the pH
- you will have 50 ml of a 1 M potassium phosphate buffer pH 6.5

b) preparation of buffer at 100 mM

- 50 ml 1 M potassium phosphate buffer pH 6.5
- 450 ml water
- check pH. Correct if necessary, using the 100 mM mono or bibasic phosphate solutions, to keep the desired molarity²⁸

²⁷ Prepare mono or bibasic potassium phosphate at 90 mM mixing 9 ml of 1 M stocks ([Section 7.2.1](#)) and 91 ml water.

²⁸ To prepare 100 mM potassium phosphate mono or bibasic mix 10 ml of the 1 M stocks ([Section 7.2.1](#)) to 90 ml water.

7.3. Tampão acetato de sódio

Tampão acetato de sódio necessário:

molaridade	pH	enzima, teste	solução
250 mM	5,0	MFO	TMBZ/Na acet

7.3.1. tampão estoque acetato de sódio 250 mM pH 5,0

a) preparação de tampão a 3 M:

- pesar 246,09 g de acetato de sódio anidro (PM 82,03)
- dissolver em 800 ml de água
- ajustar o pH para 5,0 com ácido acético glacial
- completar o volume para 1 litro com água
- Esterilize com filtro 0,22 μ m

b) preparação de tampão a 250 mM

- 41,6 ml tampão acetato de sódio a 3 M
- adicionar água até 450 ml
- conferir pH novamente. Acertar com ácido acético glacial
- completar o volume para 500 ml com água

7.4. Propoxur (ensaio Acetilcolinesterase)

0,1 M propoxur em acetona

Estoque, 1 ml:

- 0,02092 g de propoxur (PM: 209,24)
 - 1 ml acetona
 - fazer alíquotas de 100 μ l, estocá-las a 4°C
- (Gasta-se 6 μ l por ensaio)

7.5. SDS (ensaio Esterases alfa e beta)

SDS a 5%

Em nosso laboratório preparamos esta solução por diluição a partir de estoque a 10% (50 ml de SDS a 10% e 50 ml de água)

Estoque a 10%, 500 ml:

- 50 g de SDS (usar máscara ao pesar!)
 - água qsp 500 ml
 - dissolver usando agitador magnético, *lentamente* (para evitar bolhas)
 - Esterilize com filtro 0,22 μ m (*também lentamente*)
 - estocar a temperatura ambiente
- (SDS precipita se estocado a 4°C)

7.3. Sodium acetate buffer

Sodium acetate buffer needed:

molarity	pH	enzyme, test	solution
250 mM	5.0	MFO	TMBZ/Na acet

7.3.1. sodium acetate buffer, stock at 250 mM pH 5.0

a) preparation of buffer at 3 M:

- weigh 246.09 g sodium acetate, anhydrous (MW 82.03)
- dissolve in 800 ml water
- adjust pH to 5.0 with glacial acetic acid
- add water up to 1 liter
- Sterilize by filtration through a 0.22 μm filter

b) preparation of buffer at 250 mM

- 41.6 ml 3 M sodium acetate buffer
- add water up to 450 ml
- check pH again. Correct with glacial acetic acid
- complete volume to 500 ml with water

7.4. Propoxur (Acetylcholinesterase assay)

0.1 M propoxur in acetone

Stock, 1 ml:

- 0.02092 g propoxur (MW: 209.24)
- 1 ml acetone
- prepare 100 μl aliquots and store at 4°C
(6 μl are used in each test)

7.5. SDS (alpha and beta-Esterases test)

5% SDS

In the laboratory this solution is obtained by dilution of the 15% stock (50 ml 10% SDS and 50 ml water)

Stock at 10%, 500 ml:

- 50 g SDS (use mask when weighing!)
- water up to 500 ml
- dissolve with the aid of a magnetic stirrer, *slowly* (to avoid bubbles)
- Sterilize by filtration through a 0.22 μm filter (*also slowly*)
- store at room temperature
(SDS precipitates if stored at 4°C)

8. COMPARAÇÃO PROTOCOLOS OMS – CDC – LAFICAVE

MÉTODO OMS (homogenato 200ul)

ENZIMA	vol amost (µl)	nº réplicas	λ (Abs)	t leitura (minutos)	K X EP (*)	ordem (**)
EST alfa	20	1	570	15	EP	não indicado
EST beta	20	1	570	15	EP	
PNPA-EST	10	2	405	2	K	
GST	10	2	340	5 K/20 EP	EP/K	
MFO	2	2	650	120	EP	
ACE	25 (x 2)	1	405	5 K/60 EP	K/EP	
PTN	10	2	620	5	EP	

MÉTODO CDC (homogenato 2000ul)

ENZIMA	vol amost (µl)	nº réplicas	λ (Abs)	t leitura (minutos)	K X EP (*)	ordem (**)
EST alfa	100	3	540	20	EP	1
EST beta	100	3	540	20	EP	1
PNPA-EST	este teste não é realizado					
GST	100	3	340	0 – 5	EP	4
MFO	100	3	620	10	EP	3
ACE	100	3 x 2	414	20	EP	2
PTN	20	3	620	0	EP	5

MÉTODO LAFICAVE (homogenato 300ul)

ENZIMA	vol amost (µl)	nº réplicas	λ (Abs)	t leitura (minutos)	K X EP (*)	ordem (**)
EST alfa	10	2	570	15	EP	4
EST beta	10	2	570	15	EP	3
PNPA-EST	10	2	405	2	K	5
GST	15	2	340	20	K	7
MFO	20	2	650	90	EP	1
ACE	25 (x 2)	2	405	60	EP	2
PTN	10	2	620	5	EP	6

(*) K: leitura cinética; EP: leitura *end point*

(**) ordem de reação

8. COMPARING WHO – CDC – LAFICAVE PROTOCOLS

WHO METHOD (200UL HOMOGENATE)

ENZYME	sample vol (µl)	n° replicate	λ (Abs)	t lecture (minutes)	K X EP (*)	order (**)
EST alpha	20	1	570	15	EP	not indicated
EST beta	20	1	570	15	EP	
PNPA-EST	10	2	405	2	K	
GST	10	2	340	5 K/20 EP	EP/K	
MFO	2	2	650	120	EP	
ACE	25 (x 2)	1	405	5 K/60 EP	K/EP	
PTN	10	2	620	5	EP	

CDC METHOD (2000ul homogenate)

ENZYME	sample vol (µl)	n° replicate	λ (Abs)	t lecture (minutes)	K X EP (*)	order (**)
EST alpha	100	3	540	20	EP	1
EST beta	100	3	540	20	EP	1
PNPA-EST	test not done					
GST	100	3	340	0 – 5	EP	4
MFO	100	3	620	10	EP	3
ACE	100	3 x 2	414	20	EP	2
PTN	20	3	620	0	EP	5

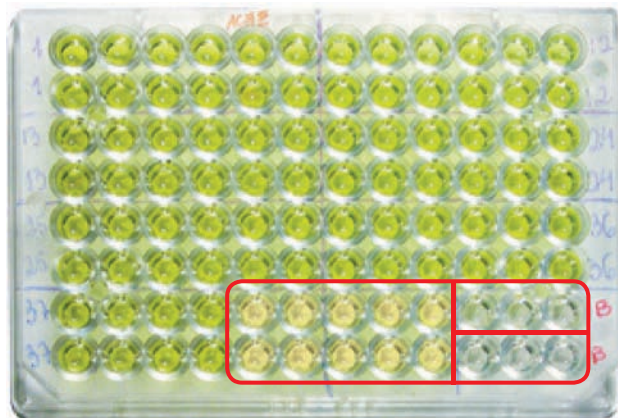
LAFICAVE METHOD (homogenate 300ul)

ENZYME	sample vol (µl)	n° replicate	λ (Abs)	t lecture (minutes)	K X EP (*)	order (**)
EST alpha	10	2	570	15	EP	4
EST beta	10	2	570	15	EP	3
PNPA-EST	10	2	405	2	K	5
GST	15	2	340	20	K	7
MFO	20	2	650	90	EP	1
ACE	25 (x 2)	2	405	60	EP	2
PTN	10	2	620	5	EP	6

(*) K: reading of absorbance as a rate, kinetic lecture; EP: "end point" reading of absorbance

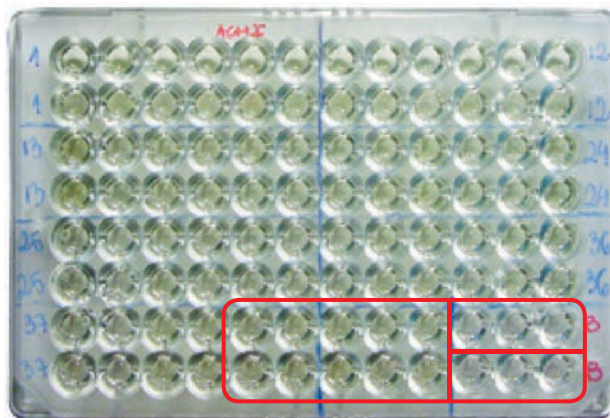
(**) reaction order

ACE (AChE)



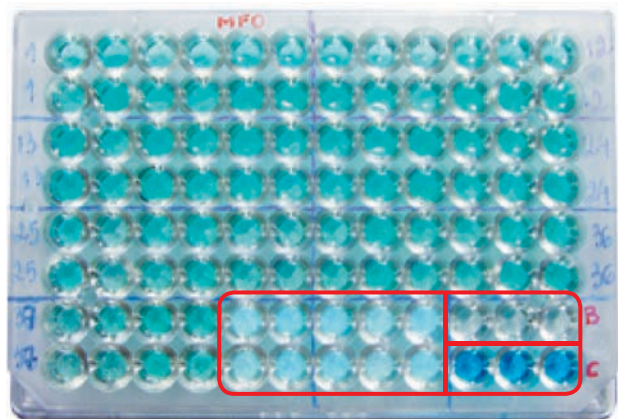
ROCK

ACE (AChI)



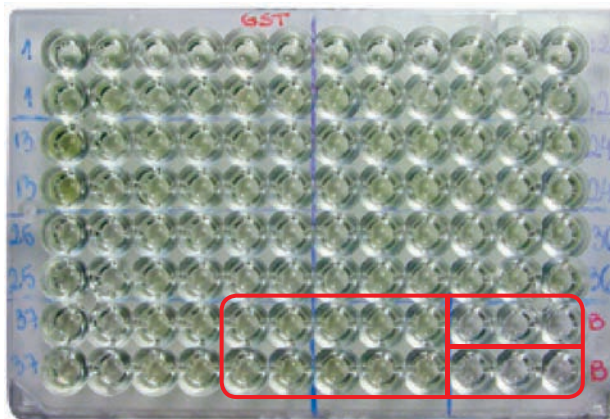
ROCK

MFO



ROCK

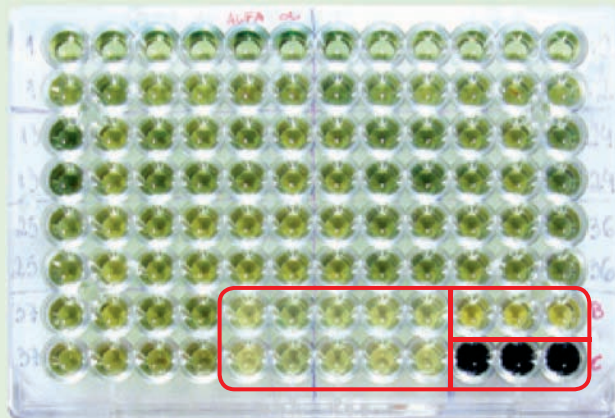
GST/PNPA-EST



ROCK

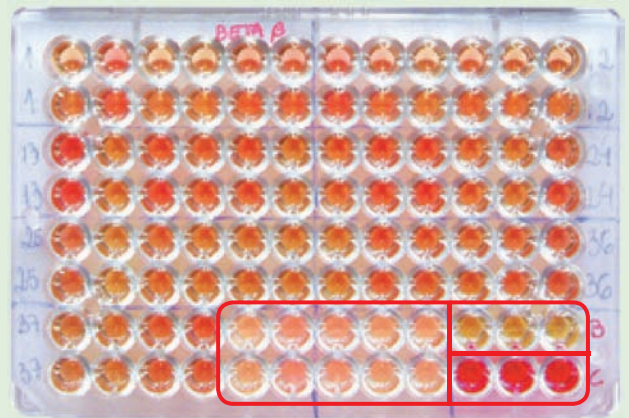
Coloração resultante de cada teste como indicado sobre as placas. As reações de PNPA-EST e GST estão representadas pela mesma placa, uma vez que não produzem cor (GST) ou apenas uma ligeira coloração amarela. No painel "Standard Protein Curve" as duas alternativas de curva-padrão de proteína indicadas no texto são apresentadas. B: branco; C: controle positivo; ROCK: cepa suscetível (Rockefeller)

α -EST



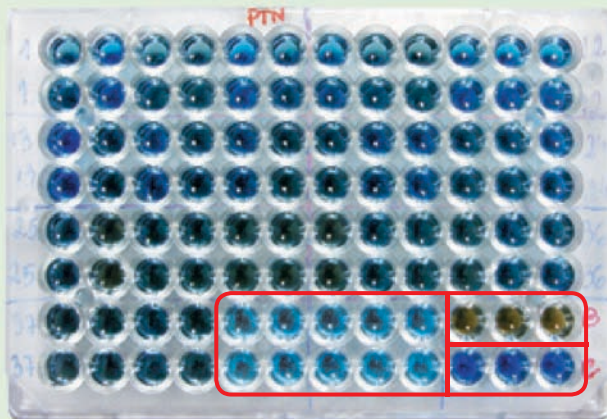
ROCK

β -EST



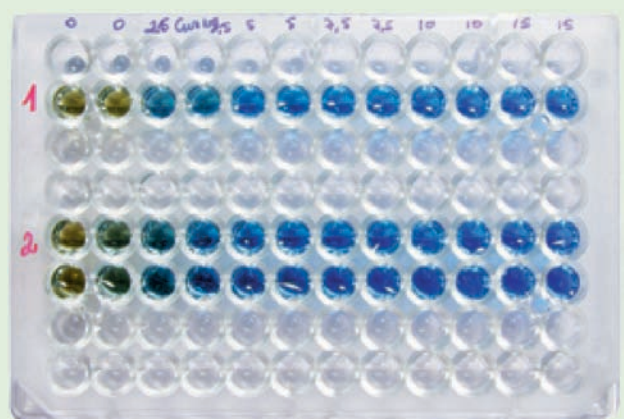
ROCK

PTN



ROCK

PTN STANDARD CURVE



Resulting coloration of each assay as indicated above the microplates. PNPA-EST and GST reactions are presented by the same microplate since no color (GST) or a weak yellow color (PNPA-EST) is developed. In the panel "Standard Protein Curve", both alternatives indicated in the text are presented. B: blank; C: positive control; ROCK: susceptible strain (Rockefeller)

9. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Ao final de cada ensaio, obtém-se, como resultado, o valor de absorvância das réplicas de cada mosquito. Para serem expressos em valores de atividade enzimática, estes dados precisam ser processados e corrigidos:

- 1) pelo volume de homogeneização do mosquito
- 2) pela quantidade de proteínas totais em cada mosquito
- 3) pela unidade de atividade de cada enzima considerada

Nos próximos itens, estão indicadas as unidades usadas para representar os resultados obtidos com cada enzima. As etapas necessárias para as conversões dos valores de absorvância em atividade enzimática de cada mosquito também estão brevemente discriminadas.

9.1. Acetilcolinesterase

Os resultados de Acetilcolinesterase são expressos como o percentual de atividade enzimática remanescente após a adição do inibidor. Para isso calcula-se, para cada mosquito, a diferença entre os resultados de atividade obtidos na presença (placa AChI, [Seção 5.1](#)) e na ausência (placa AChE, [Seção 5.1](#)) do inibidor, propoxur:

$$\% \text{ atividade remanescente} = \frac{\text{AChI} \times 100}{\text{AChE}}$$

Alternativamente, pode-se expressar o resultado como o percentual de inibição da Acetilcolinesterase:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{AChE} - \text{AChI}) \times 100}{\text{AChE}}$$

Esta é a única enzima para a qual não é necessário corrigir os valores obtidos pelo total de proteínas nem pelo volume de homogeneização dos mosquitos.

9.2. Proteínas totais

A dosagem do total de proteínas de cada mosquito é necessária para a correção de todos os valores de atividade das enzimas relacionadas com a resistência metabólica. Para calcular o total de proteínas de cada mosquito, os valores de absorvância obtidos nas alíquotas (10 µl) devem:

- 1) ser corrigidos para o volume total de homogenato (300 µl) - multiplicar a absorvância por 30;

9. ANALYSIS OF RESULTS

At the end of each assay the absorbance value of the replicates of each mosquito is obtained. In order to express these values as enzymatic activity the data must be processed and corrected according to:

- 1) the volume of mosquito homogenization
- 2) the amount of total proteins in each mosquito
- 3) the activity unit considered for each enzyme

In the following items the units used to represent results with each enzyme are indicated. The steps needed to convert absorbance values in enzymatic activity for each mosquito are also briefly discriminated.

9.1. Acetylcholinesterase (ACE)

Acetylcholinesterase results are expressed as the percentage of remaining activity after addition of the inhibitor. The difference between activity in the presence (plate AChI, [Section 5.1](#)) and absence (plate AChE, [Section 5.1](#)) of the inhibitor, propoxur, is calculated:

$$\% \text{ remaining activity} = \frac{\text{AChI} \times 100}{\text{AChE}}$$

Alternatively the result can be expressed as the Acetylcholinesterase inhibition rate:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{AChE} - \text{AChI}) \times 100}{\text{AChE}}$$

In the case of ACE it is unnecessary to correct values according to the total quantity of proteins or to the homogenization volume of each mosquito.

9.2. Total proteins (PTN)

Dosage of total proteins of each mosquito is a necessary step to correct activity values obtained for all enzymes related to metabolic resistance.

To calculate total protein quantity in each mosquito, the absorbance values obtained in the 10 µl aliquots should:

- 1) be corrected by the total homogenate volume (300 µl) –absorbance multiplied by a factor of 30;
- 2) be transformed in µg protein. *In order to do this, it is necessary to divide by the conversion factor.* This factor is obtained with the standard curve ([Sections 5.7.1](#)

- 2) ser transformados em μg de proteína. Para isto é necessário dividir pelo fator de conversão. Este fator é obtido com a curva-padrão (Seções 5.7.1 e 5.7.2), a partir da qual se calcula a equação da reta ($y = ax + b$)²⁹. O fator de conversão (a) é o coeficiente angular desta reta, que é obtido aplicando-se a fórmula:

$$a = \frac{\Delta y - b}{\Delta x}$$

Onde:

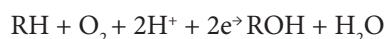
Δy = diferença entre os valores de absorvância de dois pontos da reta

Δx = diferença entre os valores de proteína (BSA) dos pontos acima

b = valor de absorvância na ausência de BSA (branco)

9.3. Oxidases de Função Mista

Neste ensaio, mede-se o conteúdo de heme no inseto. Em mosquitos não alimentados com sangue, o heme está principalmente associado ao citocromo P450 (Hemingway 1998), do qual é o grupamento prostético. O citocromo P450 e seu grupamento prostético estão envolvidos em reações de monooxigenação, que catalisam a inserção de um átomo de oxigênio ao substrato, a partir de O_2 ; o outro átomo de oxigênio é reduzido à água. A equação geral para esta reação é:



As enzimas citocromo P450 podem receber outras denominações, como Monooxigenases citocromo P450, Oxidases de Função Mista (MFOs), Monooxigenases poli-substrato (PSMOs), *heme thiolate proteins* ou simplesmente P450 (Feyereisen 1999). Com o teste descrito na Seção 5.2 não é possível medir diretamente a atividade de monooxigenação da P450 sobre um substrato. Em vez disso, quantifica-se o conteúdo de heme presente no mosquito, o que permite inferir sobre a atividade da enzima. Assim, quanto mais elevado for o conteúdo de heme, maior deve ser a atividade da P450, e vice-versa. Vale ressaltar a necessidade de usar mosquitos não alimentados com sangue, para reduzir o número de moléculas de heme (como aquelas presentes na proteína hemoglobina) que possam interferir com os resultados.

Neste ensaio também se faz uma curva-padrão (Seção 5.2.1), com citocromo (que contém heme). Esta curva-padrão permite converter em conteúdo de citocromo os valores de absorvância obtidos com os homogenatos de mosquitos. Os resultados deste ensaio são então representados em μg ou nmoles de citocromo por miligrama de proteína total dos mosquitos ($\mu\text{g cit/mg ptn}$ ou nmoles cit/mg ptn).

Para calcular a concentração de citocromo/mg de proteína, os valores de absorvância obtidos nas alíquotas (20 μl) devem:

- 1) ser corrigidos para o volume total de homogenato (300 μl) - multiplicar a absorvância por 15;

²⁹ Nesta equação y = absorvância, x = concentração de BSA da curva-padrão, em microgramas, b = absorvância na ausência de proteína (branco).

and 5.7.2), that is used to calculate a linear equation ($y = ax + b$)²⁹. The conversion factor (a) is the slope of this line, and it is obtained by the formula:

$$a = \frac{\Delta y - b}{\Delta x}$$

Where:

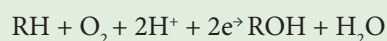
Δy = difference between the absorbance values of two points

Δx = difference between the protein values (BSA) of the these points

b = absorbance value in the absence of BSA (blank)

9.3. Mixed Function Oxidases (MFO)

This assay measures the heme content of the insect. In non blood-fed mosquitoes, heme is mainly associated with cytochrome P450 (Hemingway 1998). Cytochrome P450 and its prosthetic heme group are involved in monooxygenation reactions, which catalyze the insertion of an oxygen atom of O₂ in the substrate; the other oxygen atom is reduced to water. The general equation of this reaction is:



The cytochrome P450 enzymes are also known as Monooxygenases cytochrome P450, Mixed Function Oxidases (MFOs), poly-substrate Monooxygenases (PSMOs) and “heme thiolate proteins” or simply P450 (Feyereisen 1999). The assay described in Section 5.2 does not measure the monooxygenation activity of P450 over a substrate, directly. Instead, it quantifies the total heme content of the mosquito, and this enables an indirect estimate of the enzyme activity. Hence, the higher the heme content, higher should be the P450 activity. It is important to note that non blood-fed mosquitoes must be used in order to reduce the number of heme molecules (like those present in the hemoglobin protein) that can interfere with results.

A standard curve is constructed (Section 5.2.1) with cytochrome, containing heme. This standard curve enables conversion of the absorbance values of mosquito homogenates to cytochrome content. Results of this assay are represented as cytochrome μg or nmoles present per total protein of each mosquito, in milligrams ($\mu\text{g cit/mg ptn}$ or nmoles cit/mg ptn).

To calculate the cytochrome concentration/protein mg in each mosquito, the absorbance values obtained in the 20 μl aliquots should:

- 1) be corrected by the total homogenate volume (300 μl) –absorbance multiplied by a factor of 15;
- 2) be transformed in cytochrome μg (or nmoles). In order to do this it is necessary to divide by the conversion factor. This factor is obtained with the standard curve (Section 5.2.1), and calculations are done exactly as described in the previous section;

²⁹ In this equation, y = absorbance, x = BSA concentration in the standard curve, in micrograms, b = absorbance in the absence of protein (“blank”).

- 2) ser transformados em μg (ou nmoles) de citocromo. Para isso é necessário dividir pelo fator de conversão. Este fator é obtido com a curva-padrão (**Seção 5.2.1**), e os cálculos são feitos exatamente como indicado na seção anterior;
- 3) ser corrigidos para o conteúdo total de proteína de cada mosquito. Para isso, divide-se o valor obtido acima pelo total de proteína do mosquito correspondente, cuja obtenção está descrita no item anterior (**Seção 9.2**).

9.4. Esterases alfa e beta (α and β -EST)

Os resultados para estas enzimas são representados em nmol/mg ptn/min. Os valores de absorbância obtidos nas alíquotas (10 μl) devem:

- 1) ser corrigidos para o volume total de homogenato (300 μl) multiplicar a absorbância por 30;
- 2) ser transformados em nmoles de substrato. Para isso é necessário dividir pelos fatores de conversão. Estes fatores são obtidos com as curvas-padrão de alfa ou beta-naftol (**Seções 5.3.1 e 5.4.1**). O cálculo é feito exatamente como descrito na **Seção 9.2**;
- 3) ser corrigidos pelo total de proteínas de cada mosquito. Para isso, divide-se cada valor gerado acima pelo total de proteína do mosquito correspondente, cuja obtenção está descrita na **Seção 9.2**. O resultado é o total de substrato (em nmol) consumido por mg de proteína de cada mosquito no tempo total de reação (15 minutos);
- 4) para calcular a atividade da enzima por minuto, basta dividir o valor obtido no item acima por 15.

9.5. Esterase "PNPA"

Ao contrário das Esterases alfa e beta, para este ensaio (**Seção 5.6**) não se usa um substrato-padrão e, portanto, não é possível construir uma curva-padrão nem, conseqüentemente, converter os valores de absorbância em quantidade de substrato consumido. Neste ensaio, o resultado final é expresso em $\Delta\text{Abs}/\text{mg ptn}/\text{min}$, ou seja, calcula-se a variação de absorbância em um minuto e depois faz-se a correção para o conteúdo de proteína de cada mosquito. Na prática, a unidade considerada é a velocidade da reação (expressa em $\Delta\text{Abs}/\text{min}$).

Em nosso laboratório, este é o procedimento adotado com os valores de absorbância obtidos nas alíquotas (10 μl):

- 1) para cada mosquito constrói-se um gráfico "absorbância X minuto". Com estes gráficos, calcula-se a equação da reta e obtém-se o índice de correlação (R^2), que varia entre 0 e 1. Este índice avalia a relação entre os valores observados e esperados;
- 2) descartam-se todos os mosquitos cujos valores de R^2 forem inferiores a 0,9;
- 3) calcula-se a variação de absorbância entre os pontos de 90 e 30 segundos. Esta será a variação, na amostra, para um minuto de reação ($60''$);
- 4) para se obter o $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ por mosquito, multiplica-se o valor obtido acima por 30, que é o fator de diluição;

- 3) be corrected by the total protein content of each mosquito. It is then necessary to divide the value obtained above by the total protein content of the corresponding mosquito (that is described above, [Section 9.2](#)).

9.4. alpha and beta-Esterases (α and β -EST)

Results obtained with these enzymes are represented as nmol/mg ptn/min. The absorbance values obtained with 10 μ l mosquito aliquots should:

- 1) be corrected by the total homogenate volume (300 μ l) absorbance multiplied by a factor of 30;
- 2) be transformed in substrate nmols. In order to do this it is necessary to divide by the conversion factors. These factors are obtained with the alpha or beta-naphthol standard curves ([Sections 5.3.1 and 5.4.1](#)). Calculations are done exactly as described in [Section 9.2](#);
- 3) be corrected by total proteins. Each value obtained above is divided by the total protein content of the corresponding mosquito, detailed in [Section 9.2](#). The result is the amount of substrate (in nmol) consumed by protein mg of each mosquito in the total reaction time (15 minutes);
- 4) to calculate the enzyme activity per minute, it is sufficient to divide the value obtained above by 15.

9.5. "PNPA" Esterase (PNPA-EST)

In opposition to alpha- and beta-Esterases, for this assay ([Section 5.6](#)) a standard substrate is not available. For this reason it is neither possible to construct a standard curve nor to convert absorbance values in consumed substrate amount. In this assay the final result is expressed as Δ Abs/mg ptn/min, meaning that the absorbance variation in one minute is calculated, being corrected by the total protein content in each mosquito. In practice the unit that is considered is the rate of reaction (expressed as Δ Abs/min).

The procedure we adopt with the absorbance values obtained in the 10 μ l aliquots is as follows:

- 1) for each mosquito a graph "absorbance X minute" is constructed. With these graphs, the linear equation is calculated, and a correlation index (R^2) is obtained. This index, which varies from 0 to 1, evaluates the correlation between the observed and expected values;
- 2) all mosquitoes that have R^2 values lower than 0.9 are discarded;
- 3) the absorbance difference from 90 to 30 seconds is calculated. This corresponds to the one minute sample variation of reaction (60");
- 4) to obtain the Δ Abs/min for each mosquito, the value obtained above is multiplied by 30 (the dilution factor);

- 5) faz-se a correção pelas proteínas totais. Para isso, divide-se cada valor obtido acima pelo total de proteínas do mosquito correspondente, em miligramas.

9.6. Glutathione-S-transferase (GST)

Assim como para a Esterase “PNPA”, para este ensaio (Seção 5.6) não se usa um substrato padrão e, portanto, não é possível construir uma curva-padrão. Por outro lado, neste caso pode-se calcular a quantidade de substrato utilizado na reação. Para isso, os parâmetros utilizados por Hemingway (1998) foram considerados e incorporados aos cálculos. Estes parâmetros incluem:

- os valores do coeficiente de extinção do produto desta reação, a (3-(2-cloro-4-nitrofenil)-glutathione);
- o caminho óptico do espectrofotômetro, ou seja, a altura da solução nos poços das microplacas (em nosso caso, 0,6 cm).

Estes parâmetros são usados para transformar valores de absorvância (Abs) em mmoles/mosquito/minuto, de acordo com a fórmula:

$$\text{mmol/mosq/min} = \frac{(\text{Abs}_{20} - \text{Abs}_{10}) \times 20}{4,39 \times 0,6 \times 10}$$

Onde:

Abs_{20} = o valor de Abs obtido no tempo de leitura de 20 minutos

Abs_{10} = o valor de Abs obtido no tempo de leitura de 10 minutos³⁰

20 no numerador = fator de diluição (15 µl de amostra, de um total de 300 µl)

10 no denominador = minutos de reação (diferença entre 20 e 10 minutos)

4,39 = coeficiente de extinção do produto da reação

0,6 = caminho óptico (= altura da solução no poço, em cm)

Ou seja, simplificando:

$$\text{mmol/mosq/min} = \frac{(\text{Abs}_{20} - \text{Abs}_{10}) \times 2}{4,39 \times 0,6}$$

Para corrigir pelas proteínas totais, divide-se o valor gerado acima pelo total de proteína do mosquito correspondente, cuja obtenção está descrita na Seção 9.2. Com a correção da atividade por mg de proteína, o resultado final deste ensaio é expresso em mmoles/mg ptn/min, que corresponde à quantidade, em mmoles, do produto de reação gerado por minuto, por mg de proteína.

³⁰ Em nossa experiência, há muita oscilação nos valores medidos até 10 minutos de reação. Por isso, só estamos considerando o intervalo entre 10 e 20 minutos.

5) the correction by total proteins is then performed. Each value obtained above is divided by the total protein content of the corresponding mosquito, in milligrams.

9.6. Glutathione-S-transferase (GST)

Similarly to “PNPA” Esterase, for this assay (Section 5.6) a standard substrate is not available. For this reason it is not possible to construct a standard curve. However, in this case it is possible to calculate the amount of substrate used in the reaction. The parameters utilized by Hemingway (1998) have been considered and were incorporated in the calculations. These parameters include:

- the extinction coefficient value of the reaction product, (3-(2-chloro-4-nitrophenyl)-glutathione);
- the spectrophotometer path length, that corresponds to the height of the solution in the microplate well (in our case, 0.6 cm).

These parameters are used to transform absorbance values (Abs) in mmoles/mosquito/minute, according to the formula:

$$\text{mmol/mosq/min} = \frac{(\text{Abs}_{20} - \text{Abs}_{10}) \times 20}{4.39 \times 0.6 \times 10}$$

Where:

Abs_{20} = Abs value obtained after 20 minutes of reaction

Abs_{10} = Abs value obtained after 10 minutes of reaction³⁰

20 in the dividend = dilution factor (15 μl sample, from 300 μl homogenate)

10 in the divisor = minutes of reaction

4.39 = extinction coefficient of the reaction product

0.6 = path length (= height of the solution in the microplate well, in cm)

Simplifying:

$$\text{mmol/mosq/min} = \frac{(\text{Abs}_{20} - \text{Abs}_{10}) \times 2}{4.39 \times 0.6}$$

In order to correct by total proteins, the value above is divided by the total protein content of the corresponding mosquito, obtained as described in Section 9.2. After correction by protein mg, the final result of this assay is expressed as mmols/mg ptn/min, corresponding to the amount, in mmols, of the reaction product generated per minute, per protein mg.

³⁰ In our experience, a high oscillation is observed in the values measured up to 10 minutes of reaction. For this reason we consider only the interval between 10 and 20 minutes.

10. METODOLOGIA LAFICAVE PARA PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os ensaios aqui descritos geram um volume muito grande de dados, tendo em vista que:

- a) a atividade de seis enzimas é avaliada simultaneamente em cada mosquito;
- b) em cada ensaio são processados 40 mosquitos da população sob teste;
- c) para cada população de *Aedes aegypti* são avaliados 80 a 120 mosquitos.

Para agilizar o processamento dos dados brutos fornecidos pelo espectrofotômetro, foram elaborados, em Excel, quatro arquivos complementares. Esses arquivos, em conjunto, permitem a transformação dos dados originais (obtidos em valores de absorvância) em atividade enzimática e a correção pelo total de proteínas de cada mosquito. Adicionalmente, facilitam os cálculos discriminados nas seções anteriores. O resultado final do uso desses arquivos é a construção automática de histogramas - um para cada enzima, de cada população avaliada. Nesses histogramas, o eixo das abscissas refere-se à atividade da enzima (apresentada em classes), e o eixo das ordenadas refere-se ao número de indivíduos que se enquadram em uma determinada faixa. Dessa forma, ao final de cada análise, é possível observar o perfil enzimático de uma determinada população e compará-lo com o perfil da cepa referência de suscetibilidade (Figura 1).

A seguir estão descritos os procedimentos gerais de uso de cada arquivo mencionado³¹. Instruções detalhadas para o preenchimento passo a passo dos **Arquivos 1 a 4** estão incluídas na primeira planilha “instruções” de cada arquivo.

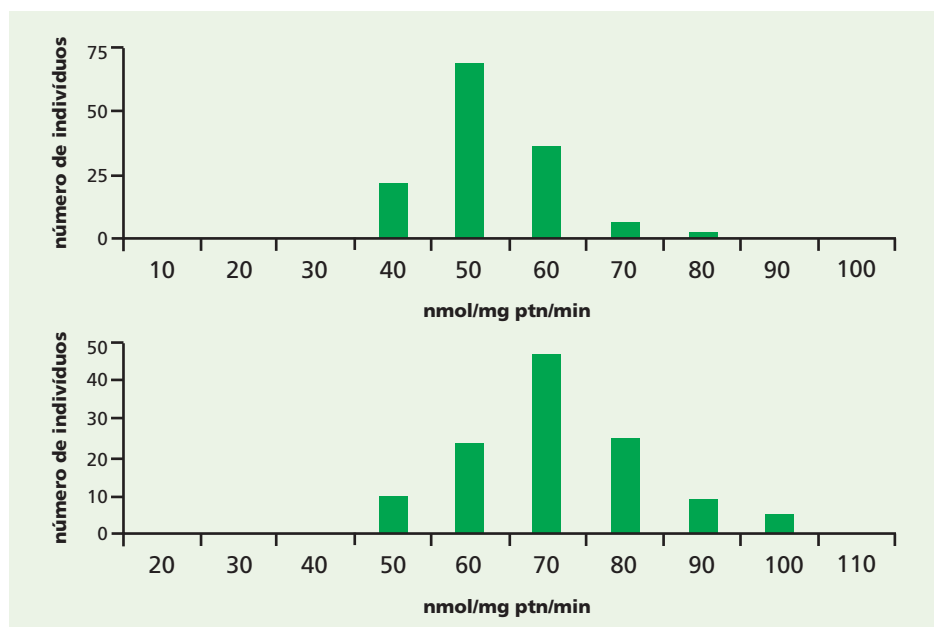


Figura 1: histograma típico gerado com o **Arquivo 2**. Perfil de atividade de alfa-Esterase da cepa susceptível (alto) e de uma população de campo (acima), alterada.

³¹ Esses arquivos estão disponibilizados em CD juntamente com o manual.

10. LAFICAVE METHODOLOGY FOR THE PROCESSING AND ANALYSIS OF RESULTS

The assays herein described generate a great volume of data, since:

- the activity of six enzymes is simultaneously evaluated in each mosquito;
- 40 mosquitoes from the population under test are processed in each assay;
- 80-120 *Aedes aegypti* mosquitoes of each population are evaluated.

To expedite processing of the data generated by the spectrophotometer, four complementary Excel files were elaborated. Together these files enable the transformation of the original data (expressed in absorbance values) in enzymatic activity and also the correction according to the total protein content of each mosquito. In addition, these files facilitate the calculations discriminated in the previous sections. Their final result is the automatic construction of histograms – one for each enzyme of the populations evaluated. In these histograms the *x*-coordinate refers to the activity of the enzyme (shown in classes), and the *y*-coordinate exhibits the number of specimens in each class. In this way, at the end of each analysis it is possible to evaluate the enzymatic profile of a given population, which may then be compared to the profile of the susceptible reference strain (Figure 1).

In the following sections, the general procedures for usage of each Excel file are described³¹. Detailed instructions for filling out **Files 1 to 4** are included in the first sheet (*instructions*) of each file.

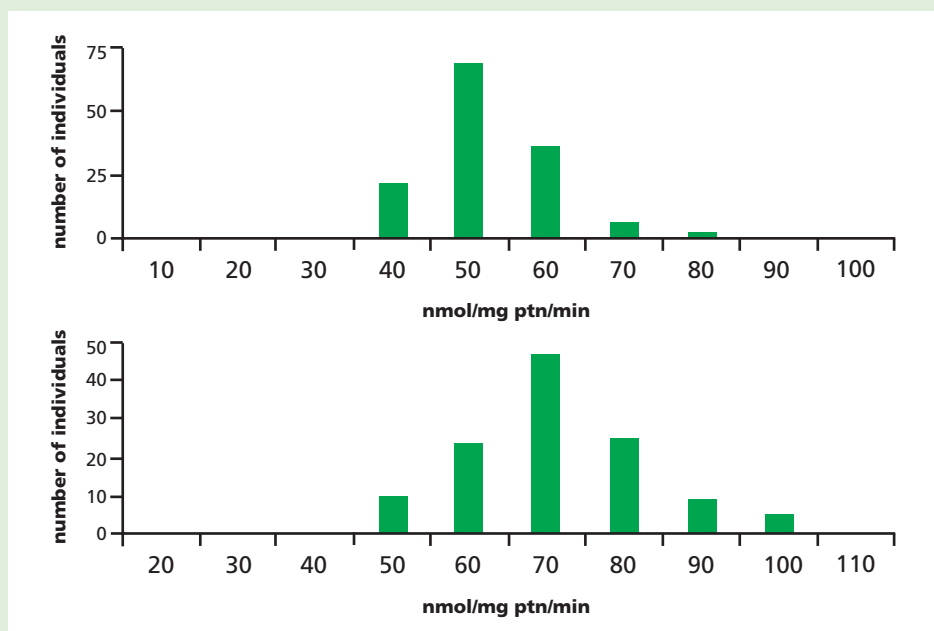


Figure 1: typical histogram generated by **File 2**. alpha-Esterase activity profile of the susceptible strain (upper graph) and an altered field population (lower graph).

³¹ These files are available in the CD that accompanies the present handbook.

10.1. Arquivo 1 – transferência dos dados do Soft Max para Excel

O espectrofotômetro que utilizamos no laboratório está associado ao programa Soft Max, que fornece os valores de absorbância de cada posição da microplaca. Por outro lado, como mencionado, os arquivos para processamento dos dados foram elaborados no programa Excel.

Quando se tenta transferir diretamente os dados de um programa para outro, os valores de absorbância vêm acompanhados de outros parâmetros, como temperatura e tempo de execução do teste, que não são necessários para o processamento dos dados. Esses dados “excedentes” devem ser excluídos para que restem apenas os valores de absorbância.

O **Arquivo 1** tem como objetivo principal preparar os dados originais de tal forma que apenas os valores de absorbância sejam mantidos. Com isso a transferência dos dados para outros arquivos fica facilitada. Desta forma também se pode trabalhar em outros computadores que não tenham o programa Soft Max instalado.

O **Arquivo 1** é composto por seis planilhas: a primeira com instruções de uso e cada uma das demais destinada aos dados de todas as enzimas de um teste completo. Estas planilhas são denominadas “*data1*” a “*data5*” e devem ser renomeadas com a data de realização do teste que lá será inserido.

Em cada planilha existem espaços destinados aos dados brutos de absorbância de todas as enzimas, da quantificação de proteínas totais e da curva-padrão de proteínas (BSA). Estes espaços, que estão coloridos de azul, simulam as microplacas de 96 poços, seguindo a numeração e a distribuição dos mosquitos previamente definidas: mosquitos 1 a 40 correspondem à população sob teste e mosquitos 41 a 45 correspondem à cepa referência de susceptibilidade, como descrito na **Seção 4.3.2**.

Como usar o Arquivo 1:

- 1) de acordo com a planilha “*instruções*” do **Arquivo 1**, salvar como o arquivo, com a expressão “*dados originais*” seguida do nome e da localização da população avaliada e do ano de coleta do material analisado;
- 2) renomear cada planilha “*data*” com a data de realização de um teste completo: mês, dia e ano;
- 3) copiar do programa Soft Max os dados brutos (fornecidos pelo espectrofotômetro) e colar em espaços em branco de cada planilha. Selecionam-se então apenas as células que contêm os valores de absorbância. Estes valores são transferidos para os espaços coloridos de azul, destinados aos dados brutos de absorbância para cada enzima.

A partir de agora, os dados inseridos nas planilhas do **Arquivo 1** serão usados para

10.1. File 1 – data transfer from Soft Max to Excel

The spectrophotometer we use in the laboratory is associated with the Soft Max program that shows the absorbance value for each microplate position. However, as mentioned above, the files for data processing were elaborated in the Excel program.

When data are transferred directly from Soft Max to Excel, the absorbance values are accompanied by other parameters, such as temperature and reading time, which are not necessary for the processing steps. These “excess” data should be eliminated, and only absorbance data should be retained.

The principal purpose of **File 1** is to prepare original data in such a way only the absorbance values are maintained. This procedure facilitates transference of data to the other files. By doing this it is also possible to work in other computers, where Soft Max is not installed.

File 1 contains six sheets. The first one presents filling out instructions; each of the remaining sheets was designed to receive data from all the enzymes of a complete test. These sheets are referred to as “*date1*” to “*date5*” and should be renamed with the date of the assay that will be inserted.

Each sheet has cells assigned to receive the original absorbance values from all the enzymes, from the quantification of total proteins and from the protein standard curve (BSA). These cells, that are blue-labeled and simulate the 96-well microplates, follow the numbering and distribution of the mosquitoes previously defined: mosquitoes 1 to 40 correspond to the population under test, and mosquitoes 41 to 45 belong to the susceptible reference strain, as described in **Section 4.3.2**.

How to use File 1:

- 1) according to the sheet “*instructions*” of **File 1**, save as the file, with the expression “*original data*”, followed by the name and localization of the analyzed population and the year of collection of specimens;
- 2) rename each sheet “*date*” with the date of the test: month, day, year;
- 3) copy the original data (provided by the spectrophotometer) from the Soft Max program and paste in blank cells on the sheet. Then select only cells containing the absorbance values. These values are transferred to the blue-labeled cells, designated to receive the absorbance values for each enzyme.

Henceforth, data inserted in **File 1** sheets will be used to fill out the following files (**Files 2 to 4**). These files contain calculations to convert the absorbance values in enzymatic activity (**Files 2 and 3**) and to pool all the tests from the same population (**File 4**).

preencher os próximos arquivos (Arquivos 2 a 4), que contêm os cálculos para a conversão dos valores de absorbância em atividade enzimática (Arquivos 2 e 3) e para o agrupamento de todos os testes de uma mesma população (Arquivo 4).

SoftMax Pro - [PNPA_25.09.2006.pda]

File Edit View Experiment Control Assays Data Window Help

24.0 °C Read

Experiment01

Notes#1

Platelet1

	Platelet1											
Vinax	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	15,347	15,107	13,200	8,040	10,893	11,893	10,520	16,533	13,967	23,700	21,073	-9,367
B	16,060	14,913	13,033	10,860	11,380	10,460	11,040	14,340	13,853	23,413	17,880	13,047
C	17,207	15,607	11,840	8,613	11,320	13,060	15,140	12,273	18,700	16,040	14,687	6,327
D	10,960	15,853	12,613	8,013	11,147	11,740	16,960	11,073	13,367	15,667	14,260	5,920
E	16,800	11,660	7,640	12,400	15,947	13,687	13,227	10,127	13,630	13,953	12,100	10,733
F	14,480	10,173	6,887	12,707	15,207	12,760	11,613	9,933	11,540	13,893	10,047	10,473
G	12,213	19,707	15,283	13,740	15,390	12,640	12,833	8,620	7,593	3,800	3,567	3,400
H	12,373	20,573	16,807	13,787	13,800	13,113	14,480	6,007	5,060	2,040	3,573	

Kinetic
Time: 2:00
Interval: 0:15
Reads: 9

Lml 405

Autonic: Off
Calibrate: On

Lag Time: 0:00
End Time: 2:00
OD Min: 0
OD Max: 1
Vinax Pts: 9/9

Plate Last Read: 11:09 25/9/2006

Wavelength Combination: Lml
Mean Temperature: 24,2 Range 24,1 - 24,2
Data Mode: Absorbance

Microsoft Excel - ARQUIVO 1 - TRANSFERÊNCIA DE DADOS DO SOFT MAX PARA O EXCEL

ARQUIVO 1 - TRANSFERÊNCIA DE DADOS DO SOFT MAX PARA O EXCEL

Instruções de preenchimento

1) depois que abrir este arquivo, "salvar como" no diretório da população correspondente
 O nome do arquivo será: "dados originais [nome da população] [localização] [ano de coleta]"
 exemplos:
 -- se for município:
 "dados originais Itaboraí RJ 2001"
 -- se for bairro:
 "dados originais Copacabana RJ 2001"
 No caso da cepe referência, colocar o mesmo ano de coleta das populações com as quais está sendo comparado
 exemplo (para a cepe Rockefeller): "dados originais Rock 2001"

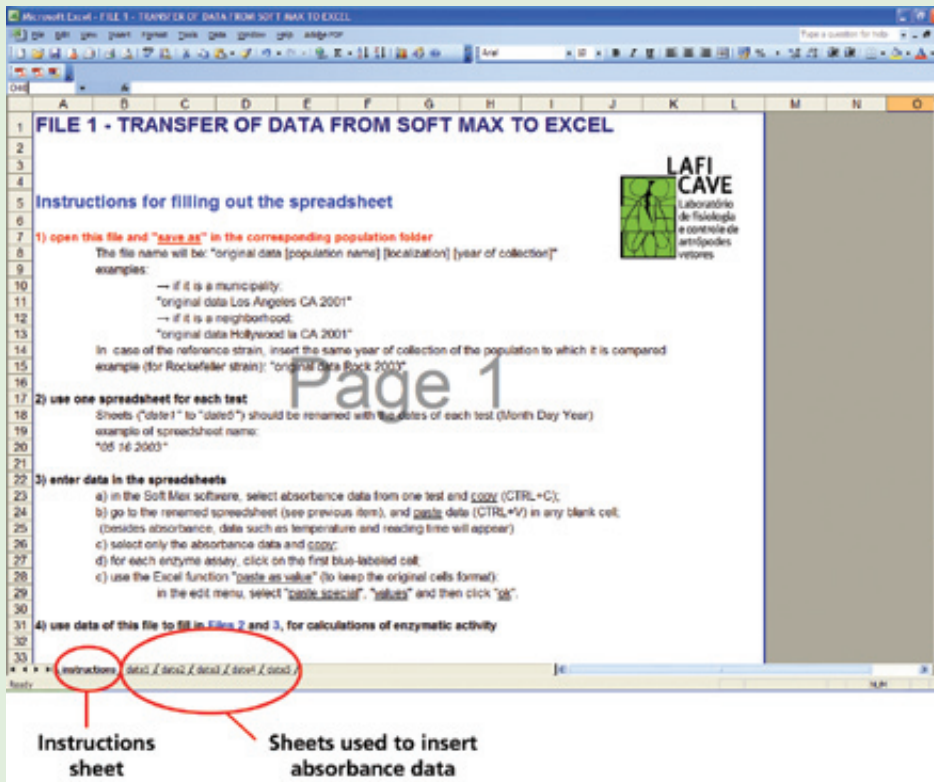
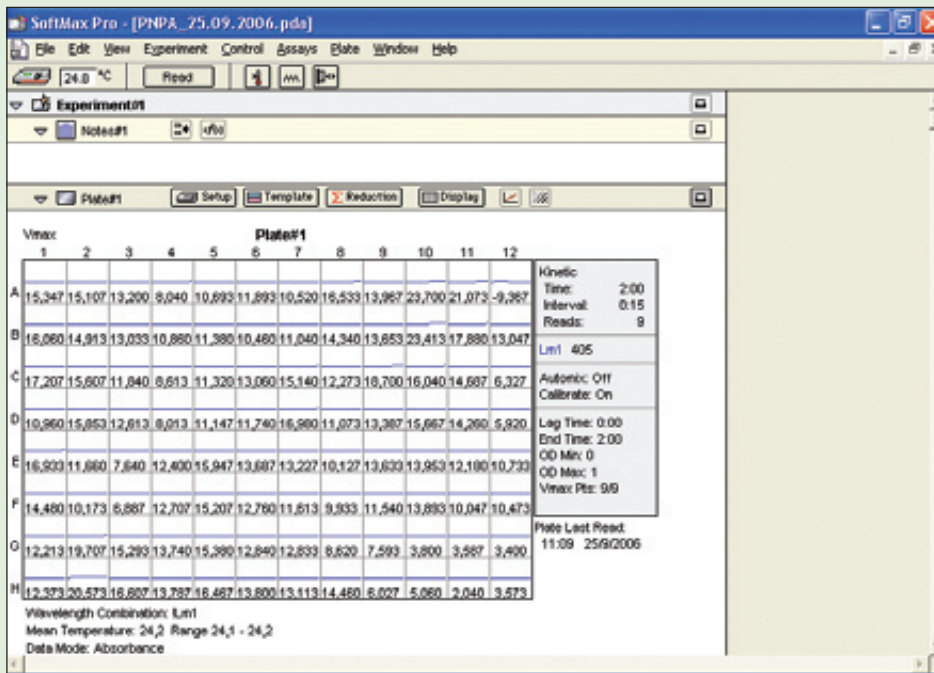
2) usar uma planilha para cada teste
 As planilhas ("data1" e "data2") devem ser nomeadas com as datas de cada teste (MM/ Dia/ Ano)
 exemplo de nome de planilha:
 "05/16/2003"

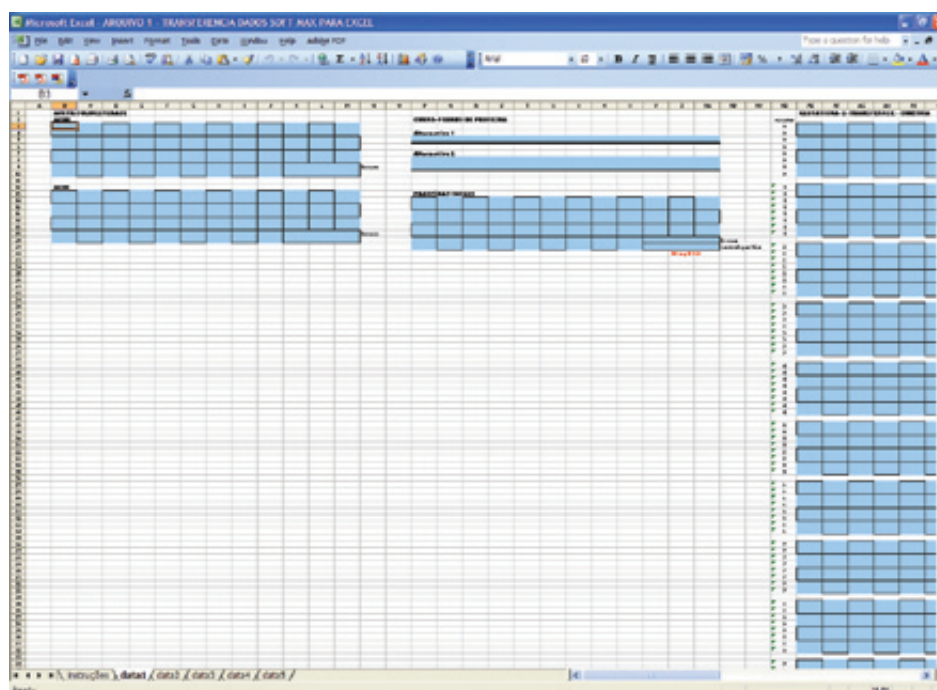
3) completar os dados nas planilhas
 a) selecionar os dados de absorbância de cada teste, do programa Soft Max e copiar (Ctrl+C);
 b) na planilha "data" deste arquivo, colar os dados (Ctrl+V) em qualquer espaço em branco; (além de absorbância, aparecerão dados como temperatura e tempo de reação)
 c) selecionar somente os dados de absorbância e colar;
 d) para o teste com cada enzima, posicionar o cursor na primeira célula marcada com azul;
 e) usar a função "colar como valor" do Excel (para manter a formatação original das células)
 na barra de ferramentas, clicar em "aditar", "colar especial", selecionar "valores" e clicar em "ok"

4) usar os dados deste arquivo para preencher os Arquivos 2 e 3, para os cálculos de atividades enzimáticas

Planilha com instruções

Planilha para inserção de dados de absorbância





10.2. Arquivo 2 – conversão dos valores de absorbância (exceção de PNPA-EST)

É neste arquivo que os dados originais serão convertidos em atividade enzimática e corrigidos pelo conteúdo total de proteínas de cada mosquito. Este arquivo contém todos os cálculos que foram descritos na **Seção 9** para cada enzima testada, com exceção da Esterase “PNPA”, cujos cálculos são efetuados em um arquivo separado (**Arquivo 3**).

O **Arquivo 2** é composto por 14 planilhas. Na primeira, “*instruções*”, estão as instruções de preenchimento. As 10 planilhas seguintes destinam-se ao processamento de dados de cada ensaio específico e recebem os nomes das enzimas avaliadas. Em alguns casos há mais de uma planilha para o mesmo teste:

- curva-padrão de proteína – duas planilhas, para serem usadas se as curvas-padrão, com BSA, forem feitas de acordo com a alternativa 1 ou 2 (**Seções 5.7.1 ou 5.7.2**);
- GST – uma planilha, “*GST cinética*”, tem espaço para transferência de todos os dados deste ensaio enquanto outra, “*GST T20-T10*”, tem espaço apenas para os pontos usados nos cálculos (10 e 20 minutos de reação). Esta segunda planilha é preenchida automaticamente, quando os dados são transferidos do **Arquivo 1** para o **Arquivo 2**, planilha “*GST cinética*”;
- MFO – uma planilha para cálculo de atividade expressa em μg , “*MFO μgC* ”, e outra planilha para cálculo de atividade expressa em nmoles, “*MFO nmolC*”.

10.2. File 2 – conversion of absorbance values (except PNPA-EST)

In this file original data are converted to enzymatic activity and corrected according to the total protein content of each mosquito. This file includes all the calculations described in [Section 9](#) for each tested enzyme with the exception of PNPA-EST, calculated in a separate file ([File 3](#)).

[File 2](#) has 14 sheets, the first of which, “instructions”, contains the filling out instructions. The 10 following sheets are designated for the data processing of each specific assay. These sheets correspond to the enzyme evaluated, in some cases more than one sheet for the same assay:

- protein standard curve – two sheets, if the standard curve, with BSA, has been established according to alternative 1 or 2 ([Sections 5.7.1 or 5.7.2](#));
- GST – two sheets: the first, “GST kinetics”, for transference of all the data from this assay and the other, “GST T20-T10”, for the timepoints that are used in the calculations (10 and 20 minutes of reaction). This second sheet is completed automatically, when data are transferred from [File 1](#) to [File 2](#), sheet “GST kinetics”;
- MFO – two sheets: the first for activity calculation when expressed in μg (“MFO μgC ”) and the other in nmols (“MFO nmolC”).

Seguem-se então três planilhas:

- a) “*consolidado*”, que fornece, automaticamente (com exceção de PNPA-EST, ver **Seção 10.3**), uma tabela com os resultados finais, para todos os mosquitos analisados, dos ensaios com cada enzima quantificada;
- b) “*gráficos*”, que apresenta tabelas com a classificação dos mosquitos analisados, por faixa de atividade de cada enzima. Esta planilha fornece ainda histogramas, um para cada enzima, com os perfis dos mosquitos avaliados. Estes histogramas mostram o perfil da população testada (no máximo 40 mosquitos por teste) e dos mosquitos-controle (no máximo 5 mosquitos);
- c) “*convenções*”, que informa os volumes de homogenato usados para o teste com cada enzima e dá instruções sobre a construção dos gráficos com os perfis das populações. Esta planilha não é usada rotineiramente e serve apenas para consulta.

Similarmente ao **Arquivo 1**, aqui também encontram-se, em cada planilha, quadrantes azuis, que simulam as microplacas de testes onde serão *colados* os valores do **Arquivo 1**. Nestes quadrantes estão ainda discriminadas as posições destinadas aos valores de referência (“brancos”, controles positivos e mosquitos da cepa referência, em branco, amarelo e rosa, respectivamente). Em algumas planilhas do **Arquivo 2** existem células coloridas de lilás. Estas correspondem aos locais onde devem ser inseridos os coeficientes angulares de algumas curvas-padrão, como detalhado abaixo (“*Observações sobre o Arquivo 2*”, itens **1** e **3**).

Como usar o Arquivo 2:

- 1) de acordo com a planilha “*instruções*” do **Arquivo 2**, salvar como o arquivo, com o nome e a localização da população avaliada e a data de realização do teste;
- 2) transferir os dados do **Arquivo 1** para as planilhas de cada enzima do **Arquivo 2**. Isto é feito para todas as enzimas, com exceção da PNPA-EST (ver **Seção 10.3**);
- 3) descartar as amostras cujas réplicas tiverem apresentado desvio-padrão acima do aceitável. Seguir as indicações da planilha “*instruções*”;
- 4) verificar os perfis obtidos para cada enzima na planilha “*gráficos*”. Os dados relativos a todas as enzimas estão também dispostos em uma tabela na planilha “*consolidado*”, de onde podem ser transferidos para qualquer outro programa, para análise posterior ou para confecção de outros tipos de gráfico;
- 5) Os critérios utilizados no laboratório para interpretação dos resultados estão detalhados na **Seção 11**.

Three additional sheets follow:

- a) “*consolidate*”, a sheet that automatically exhibits (with exception of PNPA-EST, see [Section 10.3](#)) a table with the final results for all mosquitoes analyzed for each enzyme that has been quantified;
- b) “*graphs*”, a sheet that presents tables (one for enzyme) with the classification of the evaluated mosquitoes with respect to range of activity. This sheet also presents histograms, one for each enzyme, with the profiles of the tested mosquitoes. These histograms display the profiles of the population evaluated (40 mosquitoes per test, maximum) and mosquito controls (5 mosquitoes, maximum);
- c) “*conventions*”, this sheet contains information regarding the mosquito homogenate volumes used in the assays with each enzyme and provides instructions for the construction of the histograms with the population profiles of the enzymatic activities. This sheet is not routinely used and was included only for consultation.

Similar to [File 1](#), each sheet of this file has blue-labeled areas, simulating the 96-well microplate, where [File 1](#) values are “pasted”. The positions corresponding to reference values (“blanks”, positive controls and reference strain mosquitoes, respectively in white, yellow and pink) are also discriminated. In some [File 2](#) sheets there are lilac cells, corresponding to the places where the slopes of some standard curves must be inserted, as detailed below (“*Observations regarding File 2*”, *items 1 and 3*).

How to use File 2:

- 1) according to the “*instructions*” sheet of [File 2](#), save as the file, with the name and location of the analyzed population, together with the date of the test;
- 2) transfer data from [File 1](#) to the sheets corresponding to each enzyme of [File 2](#). This is done for all the enzymes with the exception of PNPA-EST (see [Section 10.3](#));
- 3) discard samples if replicates present standard deviation beyond the acceptable. Follow indications on the “*instructions*” sheet;
- 4) verify the profiles obtained on the sheet “*graphs*”. Data for all the enzymes are also displayed in one table on the sheet “*consolidate*”. Data in this table can be transferred to several other programs if one wants to further analyze or construct other kinds of graphs.
- 5) The criteria utilized in our laboratory for the interpretation of results are detailed in [Section 11](#).

Observações sobre o Arquivo 2:

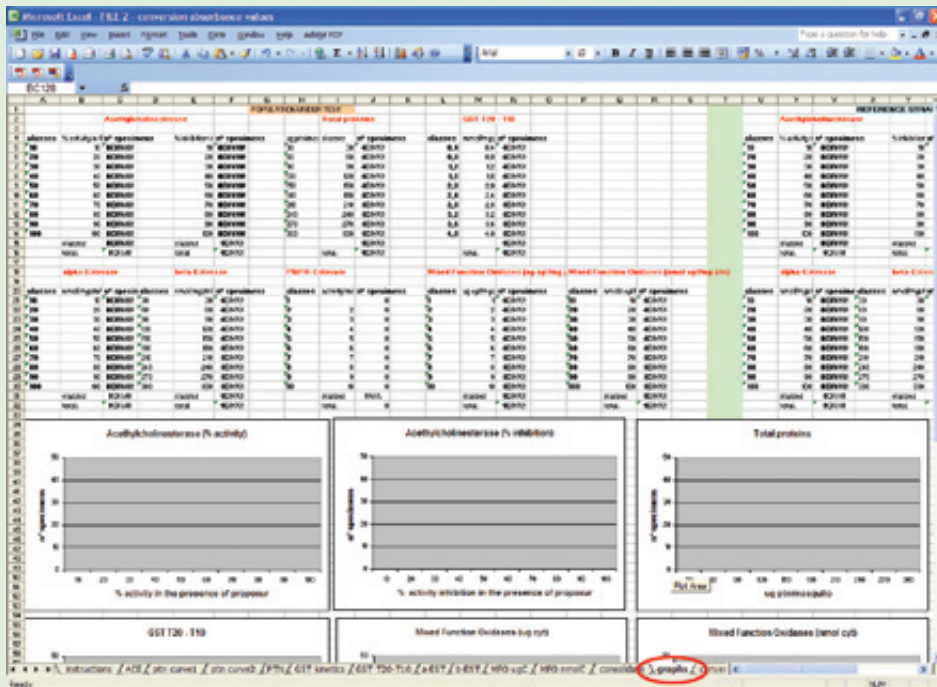
- 1) a curva-padrão de BSA é realizada sempre que se fizer um ensaio bioquímico, justificando a presença de uma planilha “*curva ptn*” no **Arquivo 2**. Os dados obtidos com esta curva são usados na dosagem de proteínas totais e o valor do coeficiente angular (a) da curva-padrão será utilizado, por sua vez, para calcular a quantidade de proteínas totais por mosquito, a cada teste. A partir daí, todos os valores de atividade enzimática são corrigidos automaticamente para o conteúdo total de proteínas de cada mosquito em todas as planilhas das enzimas associadas com à resistência metabólica;
- 2) somente para a Acetilcolinesterase, enzima relacionada com a resistência por alteração do sítio-alvo, não é necessária a correção para o total de proteínas: a análise destes resultados está baseada na diferença de sua atividade com ou sem propoxur (**Seção 9.1**);
- 3) os valores dos coeficientes angulares obtidos com as curvas-padrão para Esterases e MFO (**Seções 5.3.1, 5.4.1 e 5.2.1**) também devem ser usados para converter os valores de absorbância em valores de atividade, nos cálculos das respectivas planilhas do **Arquivo 2**. Note que estas curvas-padrão não estão incluídas neste arquivo, sendo realizadas separadamente. Para calcular-lhes os coeficientes angulares adota-se o mesmo procedimento empregado para a curva de proteínas (descrito na **Seção 9.2**). A frequência de realização dessas curvas vai depender da necessidade de cada laboratório (ver *nota 14*, na **Seção 5**);
- 4) na parte inferior das planilhas relativas às enzimas, os resultados finais para cada mosquito, já corrigidos, serão mostrados. Estes valores se repetirão na planilha denominada “*consolidado*”, que reúne os resultados de todas as planilhas que compõem o **Arquivo 2**;
- 5) na planilha “*gráficos*”, para cada enzima são apresentados os perfis dos mosquitos avaliados e dos mosquitos-controle, para comparação (ver **Seção 11** para detalhes);
- 6) é importante ressaltar que a organização de todos os resultados reunidos em uma única tabela permite analisar os dados de diferentes formas, não servindo apenas para a construção de histogramas como o da **Figura 1**. A consolidação destes dados permite, por exemplo, avaliar, para um mesmo mosquito, a atividade de cada enzima e estabelecer correlações potencialmente importantes entre as diversas enzimas. Adicionalmente, outras representações gráficas podem ser adotadas (ver **Seção 11** para exemplos).

Observations regarding File 2:

- 1) one protein standard curve, with BSA, is established for each new biochemical assay. This is the reason for a “*ptn curve*” sheet in **File 2**. Data obtained with this curve are used in the dosage of total proteins, and the slope (a) value of the standard curve is utilized to calculate the amount of total proteins of each mosquito of a given test. From this point on all the enzymatic activity values will be automatically corrected according to the total protein content of each mosquito in all the enzyme sheets related to metabolic resistance;
- 2) only in the case of Acetylcholinesterase, the enzyme related to target-site resistance, is correction according to total protein content not necessary: analysis of these results is based on the difference in activity with or without propoxur (**Section 9.1**);
- 3) the slope values obtained with the Esterases and MFO standard curves (**Sections 5.3.1, 5.4.1 and 5.2.1**) are also used to convert absorbance in activity values in the corresponding sheets of **File 2**. Note that these standard curves are not included in this file, as they are constructed separately. To calculate the slopes of these curves, the same procedure for the protein standard curve (described in **Section 9.2**) is adopted. The construction frequency of these curves depends on individual laboratory necessity (see *footnote 14*, at **Section 5**);
- 4) in the lower part of the enzyme sheets, the final result related to each mosquito, already corrected, will be displayed. These values will be repeated in the “*consolidate*” sheet, that pools results of all **File 2** sheets;
- 5) the sheet “*graphs*” exhibits the profile of each enzyme, for control and tested mosquitoes, thereby enabling comparison (see **Section 11** for details);
- 6) it is important to stress that organization of all the results in one table allows the analysis of data in different ways, as well as affording representations different from the histogram displayed in **Figure 1**. For instance, the consolidation of these data enables same mosquito evaluation of activity related to each enzyme and establishment of correlations among the enzymes that may be relevant. In addition, other graphic representations can be adopted (see **Section 11** for examples);

Microsoft Excel - TBL 2 - Conversion absorption values

The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet titled "TBL 2 - Conversion absorption values". The spreadsheet contains a large table with multiple columns and rows. The columns are labeled "Absorption" and "Conversion", with sub-columns for "100%", "50%", and "25%". The rows are numbered 1 through 30. A red circle highlights a cell in the bottom right corner of the table, containing the text "comodora".



10.3. Arquivo 3 - conversão dos valores de absorbância de PNPA-EST

Consideramos importante, no caso da PNPA-EST, incluir apenas mosquitos que não apresentem oscilações excessivas na cinética de atividade desta enzima. Para isso é necessário verificar, para cada mosquito, a correlação entre os dados obtidos e os valores esperados. Esta verificação é feita com a construção de gráficos que mostram a atividade enzimática de cada mosquito ao longo do tempo – e com o cálculo dos respectivos índices de correlação (R^2). Como o volume de dados para esta avaliação é muito grande, trabalha-se, para PNPA-EST, com um arquivo separado.

O **Arquivo 3** calcula, para todos os mosquitos de um teste, a atividade da enzima PNPA-EST, expressa em $\Delta\text{Abs}/\text{mg ptn}/\text{min}$.

O **Arquivo 3** é composto por três planilhas, denominadas:

- a) “*instruções*”;
- b) “*cálculo PNPA*”, onde estão os gráficos de mosquitos individuais. Aqui é possível avaliar os mosquitos para os quais a cinética da PNPA-EST apresentou muita oscilação. Esta planilha também discrimina as amostras cujas réplicas apresentam desvio padrão acima do aceitável;
- c) “*cálculo atividade*”, onde é feita a correção da atividade pelo conteúdo total de proteínas de cada mosquito. Os gráficos que mostram o perfil de atividade de PNPA-EST do total de mosquitos avaliados em um teste estão localizados no Arquivo 2, planilha “*gráficos*”.

Na planilha “*cálculo PNPA*” existem espaços, coloridos de azul, destinados a receber os dados brutos de absorbância da cinética desta enzima. Na planilha “*cálculo atividade*” devem ser inseridos os valores de proteína total de cada mosquito, calculados no **Arquivo 2**.

Como usar o Arquivo 3:

- 1) de acordo com a planilha “*instruções*” do **Arquivo 3**, salvar como o arquivo, com o termo “PNPA”, seguido do nome, da localização da população avaliada e da data de realização do teste;
- 2) transferir os dados da cinética de PNPA do **Arquivo 1** para a planilha “*cálculo PNPA*”;
- 3) transferir os dados de proteína total/mosquito do **Arquivo 2** para a planilha “*cálculo atividade*”;
- 4) descartar as amostras cujas réplicas tiverem apresentado desvio padrão acima do aceitável e quando o índice de correlação for baixo. Seguir as indicações da planilha “*instruções*”;
- 5) copiar os resultados obtidos na planilha “*cálculo atividade*” e colar no **Arquivo 2** do teste correspondente, planilha “*consolidado*”.

10.3. File 3 – conversion of PNPA-EST absorbance values

We consider that, in the case of PNPA-EST, it is important to include only mosquitoes whose activity kinetics does not oscillate excessively. To accomplish this, it is necessary to verify, for every mosquito, the correlation between the obtained results and the expected values. This is achieved by the construction of graphics exhibiting the enzymatic activity of each mosquito throughout time together with the calculation of the respective correlation indexes (R^2). Since this evaluation generates a huge volume of data, the conversion of PNPA-EST absorbance values is reserved for a separate file.

File 3 calculates, for all the mosquitoes of a given test, the activity of PNPA-EST, expressed in $\Delta\text{Abs}/\text{mg protein}/\text{min}$.

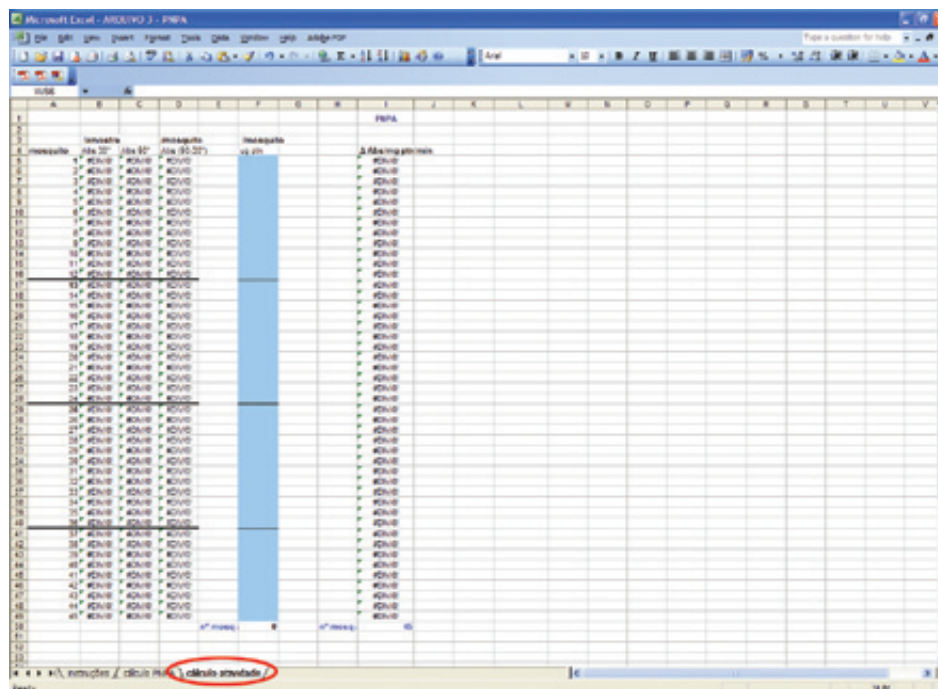
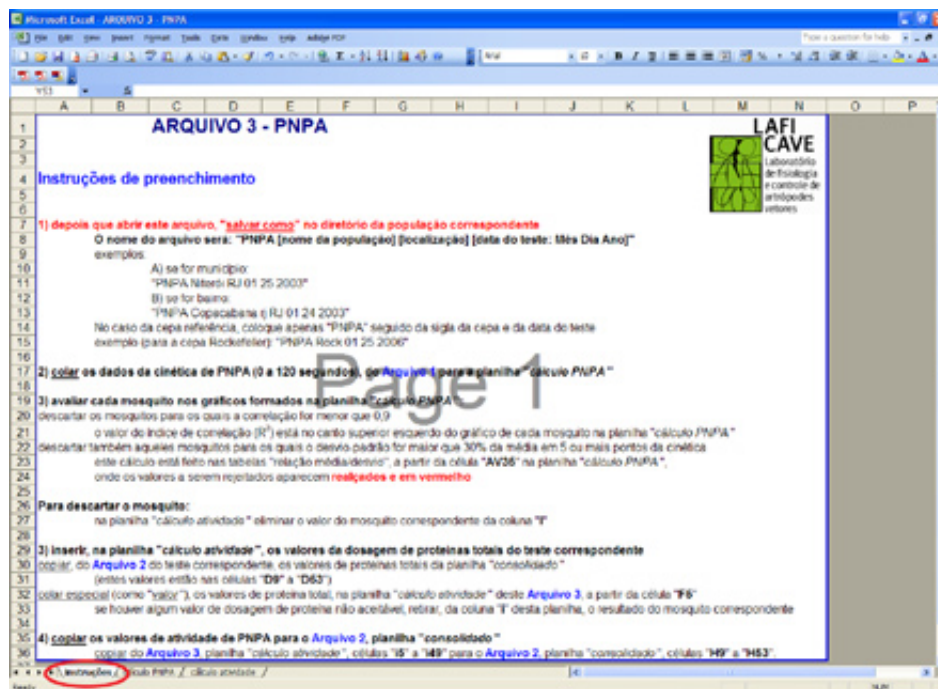
File 3 contains 3 sheets, entitled:

- a) “*instructions*”;
- b) “*PNPA calculation*”, containing graphics for individual mosquitoes. In this sheet it is possible to evaluate the mosquitoes presenting PNPA-EST kinetics with a high oscillation. It is also possible to discriminate samples with an unacceptable standard deviation;
- c) “*activity calculation*” where correction of activity according to the total protein amount of each mosquito is performed. Graphs with the PNPA-EST activity profile of the pool of mosquitoes evaluated in one test is displayed is shown in File 2, sheet “*graphs*”.

The sheet “*PNPA calculation*” presents blue-labeled cells assigned to receive the original absorbance values of the whole kinetics of this enzyme. Total protein values of each mosquito, calculated in **File 2**, are “pasted” in the sheet “*activity calculation*”.

How to use File 3:

- 1) according to the sheet “*instructions*” of **File 3**, save as the file with the expression “PNPA”, followed by the name and location of the analyzed population together with the date of the test;
- 2) transfer PNPA-EST kinetics results from **File 1** to the sheet “*PNPA calculation*”;
- 3) transfer total protein/mosquito data from **File 2** to the sheet “*activity calculation*”;
- 4) discard samples if replicates present standard deviation beyond acceptable or if the correlation index is low. Follow indications in the sheet “*instructions*”;
- 5) copy the results obtained from the sheet “*activity calculation*” and paste to **File 2** of the corresponding test, sheet “*consolidate*”.



Microsoft Excel - FILE 3 - PNPA

FILE 3 - PNPA

LAFI CAVE
Laboratoire de biologie et contrôle de arthropodes résistants

Instructions for filling out the spreadsheet

- 1) open this file and "save as" in the corresponding population folder
The file name will be: "PNPA [population name] [localization] [date of the test: Month Day Year]"
examples:
A) if it is a municipality:
"PNPA Los Angeles CA 01 25 2003"
B) if it is a neighborhood:
"PNPA Hollywood LA CA 01 24 2003"
In the case of the reference strain insert only "PNPA" followed by the strain abbreviation and the date of the test example (for Rockefeller strain): "PNPA Rock 01 25 2006"
- 2) paste PNPA kinetics data (0 to 120 seconds) from **File 4** to the sheet "PNPA calculation"
- 3) evaluate each mosquito in the graphs formed in the "PNPA calculation" sheet:
discard mosquitoes if the correlation index is lower than 0.9
The correlation index value (R^2) is in the upper left border of each mosquito's graph in the sheet "PNPA calculation"
also discard mosquitoes for which the standard deviation is higher than 30% of the mean in 5 or more points of the kinetics
this calculation appears in the tables "relation mean/stddev", starting at cell "AV35", in the sheet "PNPA calculation", where all the values to be discarded will appear in **bold and red**

To discard the mosquito:
in the sheet "activity calculation" eliminate the value of the corresponding mosquito from the "I" column

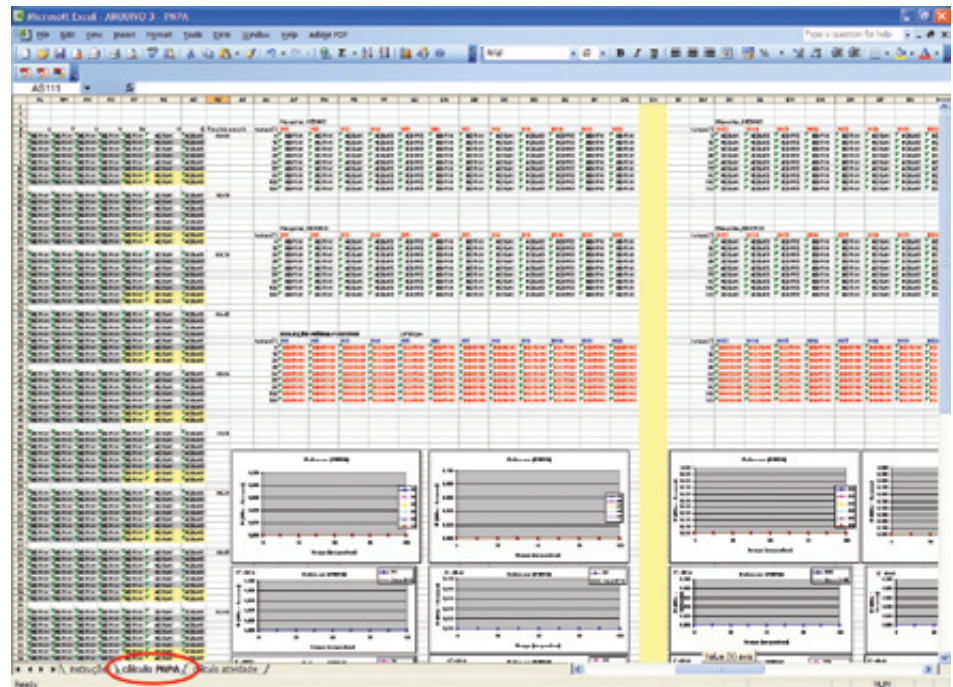
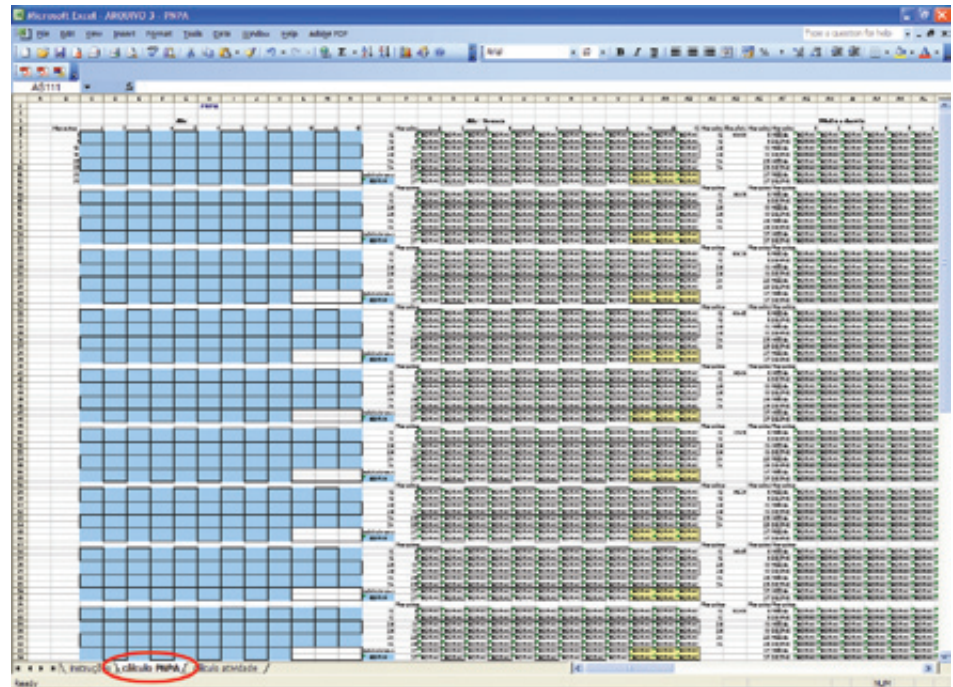
- 3) insert, in the sheet "activity calculation", the total protein dosage values from the corresponding test copy, from **File 2** of the corresponding test sheet "consolidate": the total protein values (these values are placed in cells "D9" to "D63")
paste special (as "values"), the total protein values, to this **File 3**, sheet "activity calculation", starting at cell "F5"
if any protein value is not acceptable, remove, from the "I" column of this sheet, the corresponding mosquito result
- 4) copy the PNPA activity values to **File 2**, sheet "consolidate"
copy from **File 3**, "activity calculation" sheet, cells "B5" to "M49" to **File 2**, "consolidate" sheet, cells "B5" to "M43"

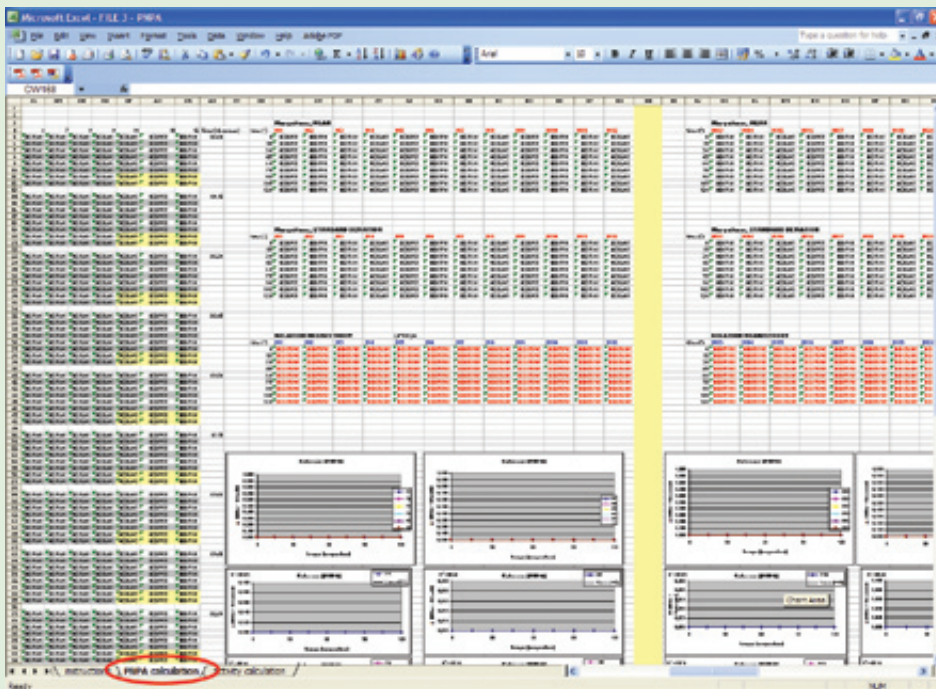
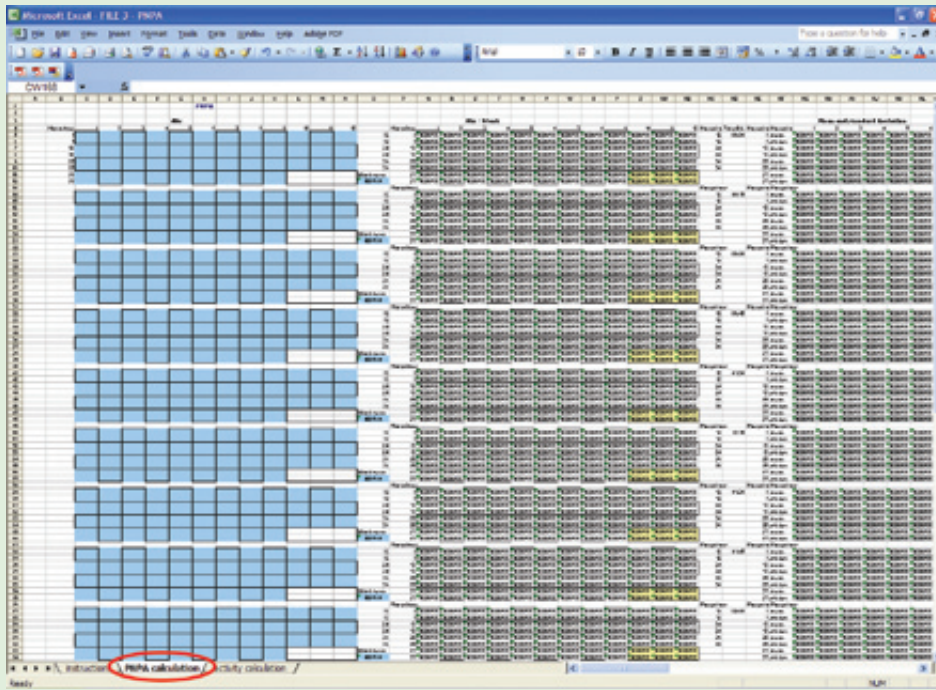
Microsoft Excel - FILE 3 - PNPA

Microsoft Excel - FILE 3 - PNPA

mosquito	amoxic	mosquito	mosquito	PNPA	relating protein
1	1	1	1		
2	2	2	2		
3	3	3	3		
4	4	4	4		
5	5	5	5		
6	6	6	6		
7	7	7	7		
8	8	8	8		
9	9	9	9		
10	10	10	10		
11	11	11	11		
12	12	12	12		
13	13	13	13		
14	14	14	14		
15	15	15	15		
16	16	16	16		
17	17	17	17		
18	18	18	18		
19	19	19	19		
20	20	20	20		
21	21	21	21		
22	22	22	22		
23	23	23	23		
24	24	24	24		
25	25	25	25		
26	26	26	26		
27	27	27	27		
28	28	28	28		
29	29	29	29		
30	30	30	30		
31	31	31	31		
32	32	32	32		
33	33	33	33		
34	34	34	34		
35	35	35	35		
36	36	36	36		
37	37	37	37		
38	38	38	38		
39	39	39	39		
40	40	40	40		
41	41	41	41		
42	42	42	42		
43	43	43	43		
44	44	44	44		
45	45	45	45		
46	46	46	46		
47	47	47	47		
48	48	48	48		
49	49	49	49		
50	50	50	50		
51	51	51	51		
52	52	52	52		
53	53	53	53		
54	54	54	54		
55	55	55	55		
56	56	56	56		
57	57	57	57		
58	58	58	58		
59	59	59	59		
60	60	60	60		
61	61	61	61		
62	62	62	62		
63	63	63	63		
64	64	64	64		
65	65	65	65		
66	66	66	66		
67	67	67	67		
68	68	68	68		
69	69	69	69		
70	70	70	70		
71	71	71	71		
72	72	72	72		
73	73	73	73		
74	74	74	74		
75	75	75	75		
76	76	76	76		
77	77	77	77		
78	78	78	78		
79	79	79	79		
80	80	80	80		
81	81	81	81		
82	82	82	82		
83	83	83	83		
84	84	84	84		
85	85	85	85		
86	86	86	86		
87	87	87	87		
88	88	88	88		
89	89	89	89		
90	90	90	90		
91	91	91	91		
92	92	92	92		
93	93	93	93		
94	94	94	94		
95	95	95	95		
96	96	96	96		
97	97	97	97		
98	98	98	98		
99	99	99	99		
100	100	100	100		

Microsoft Excel - FILE 3 - PNPA





10.4. Arquivo 4 - total dos dados de cada população

O **Arquivo 4** tem como objetivo consolidar os resultados de todos os experimentos de cada população analisada. Em princípio, deve existir um **Arquivo 4** para cada população avaliada. Alternativamente, pode ser feito apenas um **Arquivo 4** com várias planilhas, uma para cada população avaliada em uma determinada época.

Este arquivo apresenta, além da planilha “*instruções*”, mais duas planilhas: “*dados*” e “*gráficos*”. Para a planilha “*dados*” são transferidos os resultados obtidos com todos os testes completos (**Arquivo 2**, depois da inclusão dos dados de PNPA-EST) de uma mesma população. A planilha “*gráficos*” gera, automaticamente, histogramas com os perfis daquela população para cada enzima avaliada.

Como usar o Arquivo 4:

- 1) de acordo com a planilha “*instruções*” do **Arquivo 4**, salvar como o arquivo, com o termo “total” seguido do nome e da localização da população e do ano de coleta do material avaliado;
- 2) alternativamente, pode ser gerado um arquivo “total” para cada grupo de populações avaliadas em uma mesma época. Neste caso, o arquivo deve ser nomeado com o termo “total”, seguido do ano de coleta do material;
- 3) na planilha “*dados*” existem espaços, organizados em colunas, para inserção dos resultados obtidos com cada enzima, para todos os testes com uma mesma população. Para isto basta colar nestes espaços as células “*copiadas*” das planilhas “*consolidado*” de cada **Arquivo 2** de uma determinada população: dados referentes aos 40 mosquitos da população de campo (números 1 a 40, uma vez que os mosquitos 41 a 45 são da cepa-controle);
- 4) este procedimento é repetido, seqüencialmente, com cada teste realizado, até que essa planilha contenha os resultados de todos os testes efetuados com uma determinada população;
- 5) os resultados de atividade enzimática e os números de mosquitos testados serão usados na construção dos histogramas, que aparecerão simultaneamente à inserção dos dados na planilha denominada “*gráficos*”. Ao final, pode-se observar o perfil enzimático da população;
- 6) as classes definidas no **Arquivo 4** contemplam as populações de mosquito que têm sido avaliadas por nós. Se o perfil de uma determinada população for melhor representado por outro intervalo de classes, basta redefini-los. Para isso deve-se consultar o **Arquivo 2**, planilha “*convenções*”.

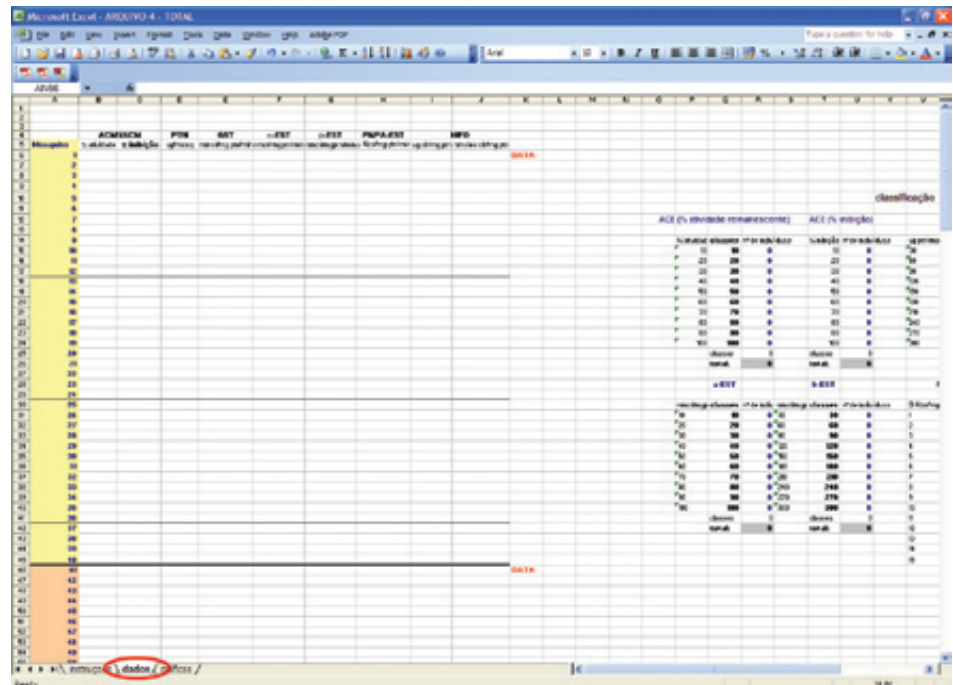
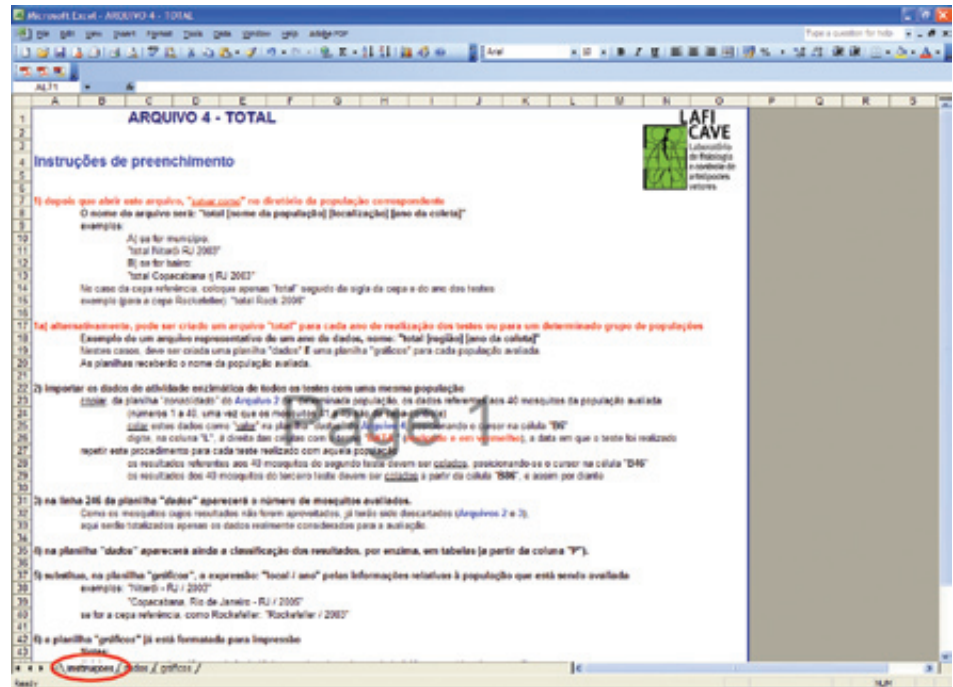
10.4. File 4 – total data of a given population

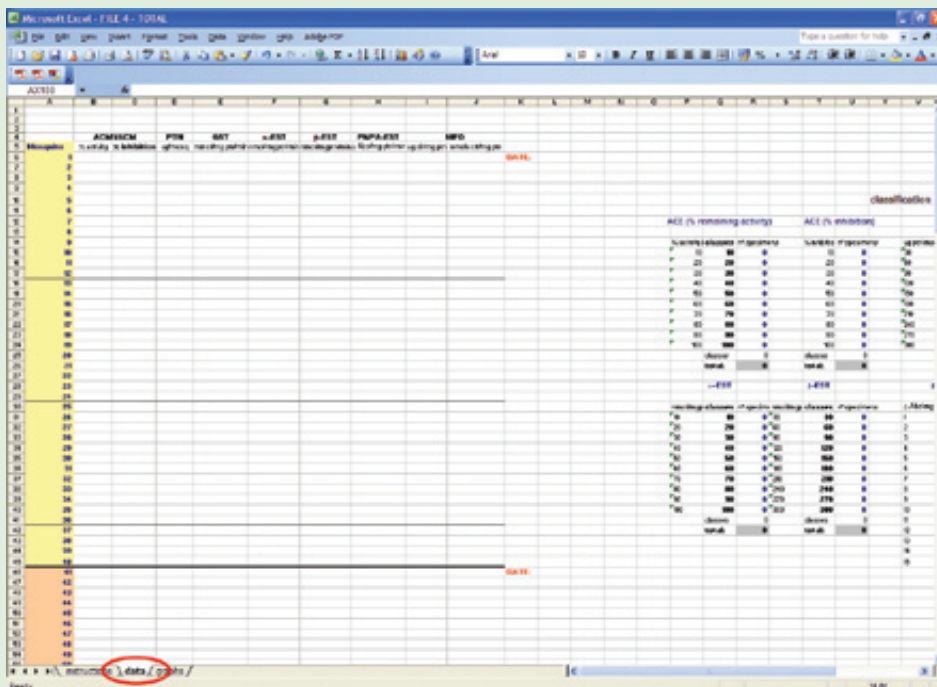
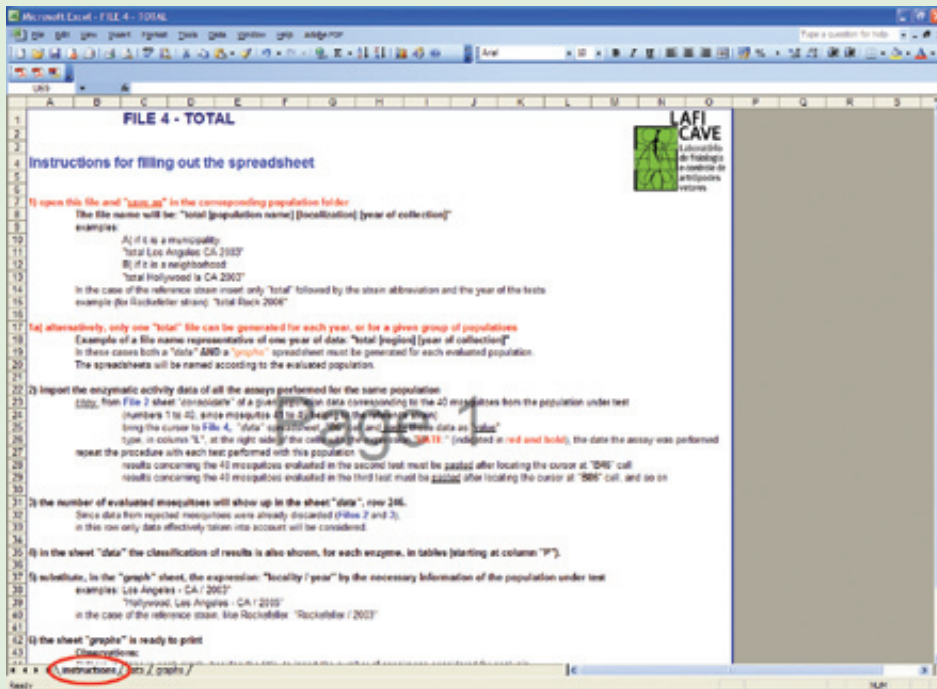
File 4 pools the results of all the assays with one population. In principle, one **File 4** should be created for each population. Alternatively, there may be only one **File 4** containing several sheets, one for each population evaluated in a given period of time.

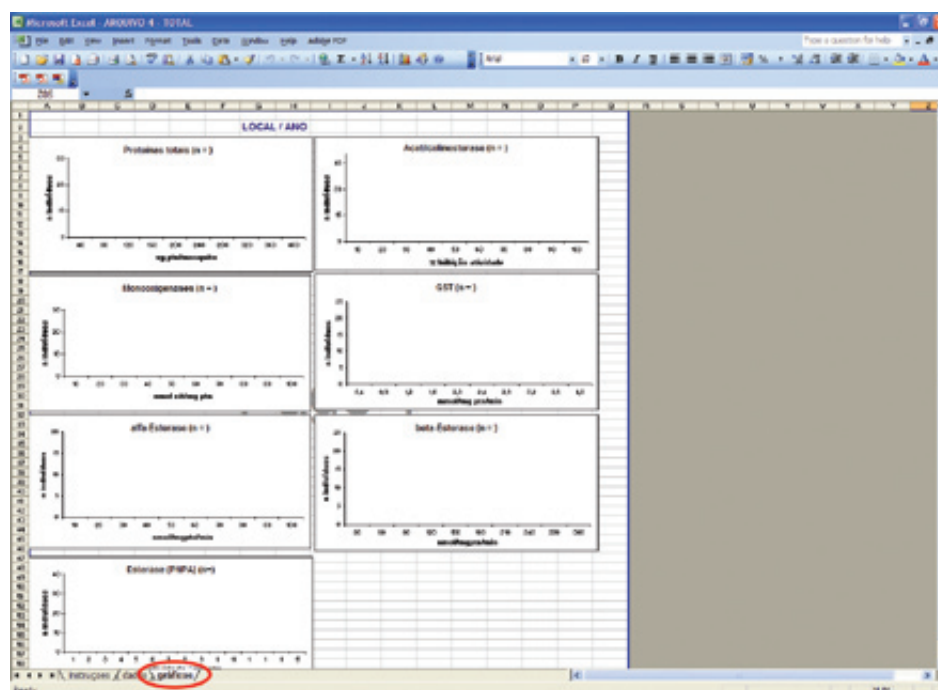
This file consists of, besides the sheet “*instructions*”, two more sheets: “*data*” and “*graphs*”. Results obtained from all the completed tests (**File 2**, after insertion of PNPA-EST) are transferred to the sheet “*data*”. The sheet “*graphs*” generates, automatically, histograms with the profiles of the population for each enzyme evaluated.

How to use File 4:

- 1) according to the sheet “*instructions*” of **File 4**, “*save as*” the file with the expression “total”, followed by the name and location of the analyzed population with the year of collection of specimens;
- 2) alternatively, a “*total*” file can be generated for a group of populations evaluated in a given period. In this case, the file should be entitled “total” followed by the year of specimen collection;
- 3) the sheet “*data*” has space, organized in columns, to insert results obtained with each enzyme of all the tests with the same population. In order to do this it is sufficient to paste in these cells data “*copied*” from the sheets “*consolidate*” of each **File 2** of that population: data concerning the 40 mosquitoes from the population under test (numbers 1 to 40, since mosquitoes 41 to 45 belong to the control strain);
- 4) this procedure is repeated, sequentially, with every test performed, until this sheet contains the results from all the tests with a given population;
- 5) the enzymatic activity results and the number of tested mosquitoes are used in the construction of histograms that appear simultaneously with the insertion of data, on the sheet “*graphs*”. As a final result, the enzymatic profile of the population can be observed;
- 6) enzymatic activity classes defined in **File 4** are adequate for the mosquito populations that are being evaluated in our laboratory. If the profile of a given population is better represented by other activity interval classes, it is sufficient to redefine them. In order to do this, go to **File 2**, sheet “*conventions*”.



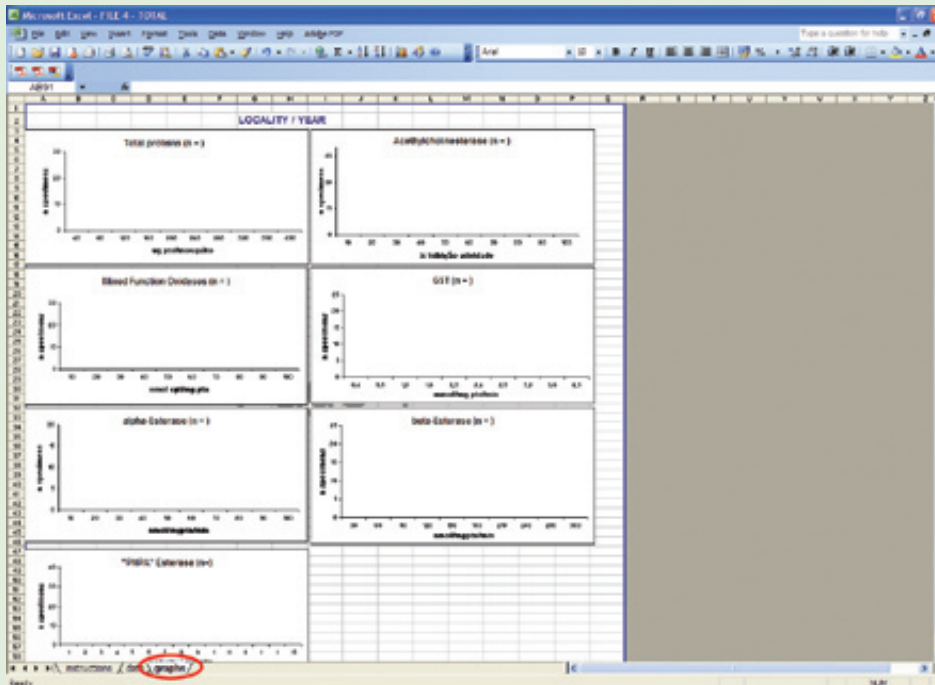




11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

11.1. Critérios para inclusão de avaliações de mosquitos individuais

- 1) Todos os ensaios são realizados em duplicata, para que possa haver controle da qualidade da manipulação. De acordo com isso, definimos, como critério arbitrário, rejeitar todas as amostras para as quais o desvio padrão entre as réplicas for maior que 30% da média. Nos **Arquivos 2 e 3**, o cálculo das médias e do desvio padrão entre as réplicas é feito automaticamente, assim como o cálculo do percentual que o desvio padrão representa da média. Adicionalmente, as amostras que devem ser rejeitadas aparecem negritadas e em vermelho, bastando eliminá-las dos campos indicados nas **Seções 10.2** (“Como usar o **Arquivo 2**”, item 3) e **10.3** (“Como usar o **Arquivo 3**”, item 4), e nas planilhas “instruções” destes arquivos.
- 2) A dosagem de PNPA-EST é feita com acompanhamento da cinética de reação. Neste caso, além de descartar as amostras que não atendem ao critério explicado acima, optamos por eliminar também mosquitos quando a oscilação da cinética de reação é muito grande. Definimos, igualmente como critério arbitrário, eliminar as amostras para as quais a correlação entre os dados obtidos e esperados (R^2) é inferior a 0,9. O preenchimento do **Arquivo 3** com os dados



11. INTERPRETATION OF RESULTS

11.1. Criteria for inclusion of evaluations from individual mosquitoes

- 1) In order to control the quality of manipulation, all the assays are carried out with duplicate samples. Accordingly, we decided as an arbitrary criterion, to reject all samples for which the standard deviation between the replicas was higher than 30% of the mean. In **Files 2** and **3** the mean and standard deviation between replicas are calculated automatically. These files also calculate the standard deviation representation with respect to the mean. In addition, samples that are to be rejected appear in bold and red. Suffice it to eliminate these samples from the cells indicated in **Sections 10.2** (“How to use **File 2**”, item 3) and **10.3** (“How to use **File 3**”, item 4) as well as on the “instructions” sheet of these files.
- 2) Quantification of PNPA-EST evaluates the reaction kinetics of the enzyme. In this case, in addition to the rejection of samples according to the criterion detailed above, we opted to eliminate mosquitoes when the oscillation of their reaction kinetics is very high. We defined, also as an arbitrary criterion, the elimination of samples when the correlation between the obtained and expected results (R^2) is lower than 0.9. Filling out **File 3** with absorbance data generates one graph for

de absorvância gera um gráfico para cada mosquito avaliado. Nestes gráficos, o valor de R^2 deve ser inspecionado e as amostras cujos R^2 forem inferiores a 0,9 devem ser descartadas dos campos indicados na **Seção 10.3** (“*Como usar Arquivo 3*”, item 4) e na planilha “*instruções*”.

- 3) Antes dos testes com as populações de campo, deve-se obter o perfil, para todas as enzimas aqui discriminadas, de uma cepa referência de susceptibilidade a inseticidas. Este perfil é obtido fazendo-se o ensaio completo pelo menos três vezes, totalizando aproximadamente 100-120 mosquitos. Os perfis da cepa referência para cada enzima servem para comparação com as populações de campo (nosso laboratório usa a linhagem Rockefeller).
- 4) Os perfis da cepa referência mencionados no item anterior também auxiliam no controle da qualidade dos testes com cada população de campo. Para isso é conveniente comparar os perfis da cepa referência, mencionados acima, com os resultados obtidos para os cinco espécimes usados como controle interno em cada teste. Se os valores forem equivalentes, o teste pode ser considerado.

11.2. Critérios para classificação das populações

1) **Representações gráficas:** uma opção à representação gráfica convencional, mostrada na **Figura 2**, é a inclusão, em um só gráfico, de todas as populações de uma série de avaliações. Este procedimento facilita a comparação direta da atividade enzimática entre populações. Neste gráfico, a inclusão da linhagem de referência, susceptível a inseticidas, permite a visualização do nível de alteração de atividade de cada população.

No entanto, consideramos que, para este tipo de representação, parâmetros como média e desvio padrão não são os mais adequados: em muitos casos, os indivíduos de uma população não seguem uma distribuição normal para as características avaliadas no escopo deste manual. Em particular, as populações nas quais a resistência é incipiente, apresentando poucos indivíduos alterados, são especialmente relevantes para o monitoramento, pois possibilitam uma intervenção no campo antes que essa resistência atinja um limiar de risco para o controle do vetor.

Uma das alternativas aos parâmetros “média” e “desvio padrão” é o uso da mediana. Graficamente, a representação das populações pode ser feita com gráficos tipo *box-plot*, em que a linha no interior da caixa indica a mediana; os limites da caixa, os quartis; e as linhas verticais fora das caixas, os indivíduos limítrofes da população (**Figura 2a**). Uma outra representação gráfica que também pode ser usada aparece como uma nuvem de pontos (gráfico de pontos), que mostra, de forma direta, a atividade de cada indivíduo, fornecendo uma idéia precisa do perfil da população (**Figura 2b**). Nenhuma destas duas representações está disponível nos **Arquivos 1 a 4** aqui descritos. O procedimento atual no laboratório é transferir os dados do **Arquivo 4** para o programa GraphPad Prism versão 4.00, para confecção dos gráficos *box-plot* ou de pontos.

each evaluated mosquito. In these graphics, the R^2 value must be inspected and samples with R^2 lower than 0.9 are discarded from the cells indicated in **Section 10.3** (“How to use **File 3**”, item 4) and on the “instructions” sheet.

- 3) Prior to test initiation with field populations it is necessary to obtain profiles for all the enzymes herein discriminated of an insecticide-susceptible reference strain. This profile is obtained after at least three complete assays (totalizing approximately 100-120 mosquitoes). The profiles of the reference strain for each enzyme enable comparisons with field populations (our laboratory uses Rockefeller strain).
- 4) The reference strain profiles mentioned above also help to control the quality of the tests performed with field populations. To accomplish this, it is convenient to compare the reference strain profiles, mentioned above, with the results obtained from the 5 mosquitoes used as internal controls in each test. If values are equivalent, the test can be considered valid.

11.2. Criteria for population classification

1) **Graph representation:** one option to the conventional graphic representation, shown in **Figure 2**, is the inclusion, in only one graph, of all populations from a series of evaluations. This procedure facilitates the direct comparison of enzymatic activity among populations. In this graph, the inclusion of the insecticide-susceptible reference strain enables visualization of the activity alteration level of each population.

However we consider that for this kind of representation parameters such as mean and standard deviation are not adequate: in several cases individuals of one population do not follow the normal distribution for the characteristics evaluated in the scope of this handbook. In particular, populations with an incipient enzymatic alteration, presenting only a few affected specimens, are especially relevant to resistance status monitoring. Identification of these populations allows intervention in the field before resistance attains a threshold that represents a risk to vector control.

One of the alternatives to the parameters “mean” and “standard deviation” is the use of the median. In this case, different populations are represented in box-plot graphs, where the line inside the box indicates the median, the box limits represent the quartiles and the vertical lines outside the box exhibit the limits of the distribution (**Figure 2 a**). Another graph representation that may also be adopted appears as a cloud of points (scatter plot). This representation displays directly the activity of each individual, giving a precise description of the population profile (**Figure 2 b**).

Neither of these two representations is available in **Files 1 to 4**, herein described. Our laboratory procedure is to transfer data from **File 4** to program GraphPad Prism version 4.00, in order to construct the box or scatter plot.

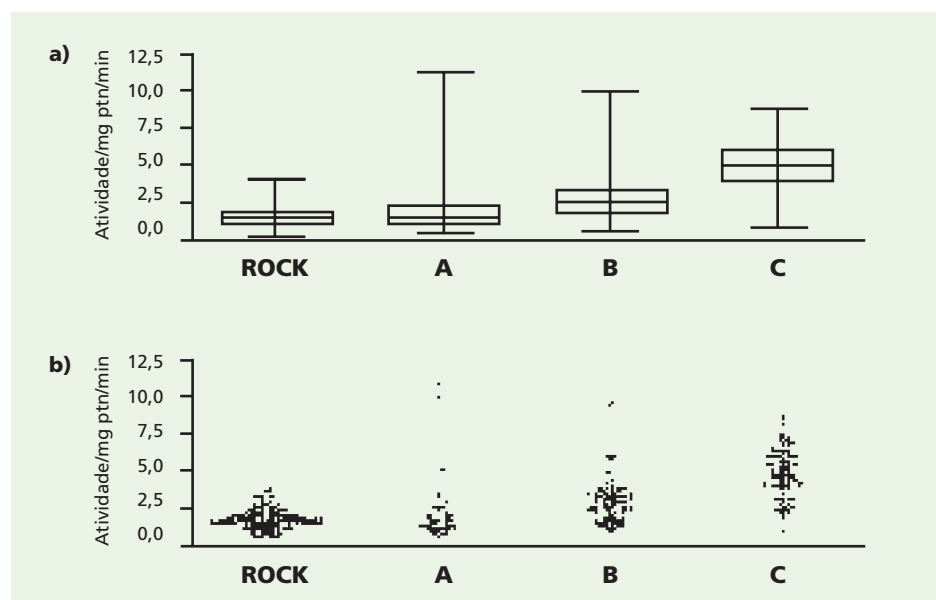


Figura 2: exemplos de representação gráfica de atividade enzimática nas populações de *Aedes aegypti*. Painel alto (a): gráfico tipo *box-plot*; painel acima (b): gráfico de pontos. Apresentam-se os perfis de atividade de Esterase, quando o substrato PNPA é usado, na cepa referência Rockefeller (ROCK) e em três populações de campo (A, B, C).

2) Quando classificar um perfil enzimático como normal ou alterado

Comparações do perfil enzimático entre as populações, por meio de análises estatísticas, paramétricas e não paramétricas, revelaram diferenças significativas, mesmo quando estas diferenças não eram relevantes em termos funcionais. Este foi, por exemplo, o caso com a ACE em populações brasileiras do vetor: a análise estatística mostrou que as populações de campo são muito diferentes da cepa referência, susceptível. Contudo, de acordo com o critério da OMS (que é um critério funcional), esta enzima é considerada susceptível se a inibição de sua atividade na presença de propoxur for igual ou maior que 70% (Hemingway 1998). Quando este critério foi aplicado nas populações avaliadas, verificou-se que a ACE de todas as populações deve ser considerada susceptível.

Decidimos então trabalhar na definição de uma classificação que traduzisse estas diferenças funcionais – e para isto avaliamos, de início, precisamente as atividades obtidas para Acetilcolinesterase, enzima para a qual o critério funcional de classificação é bastante aceito (Hemingway 1998).

Foi definida uma classificação que representa adequadamente as diferenças funcionais encontradas, não só para ACE, como também para as outras enzimas avaliadas. Esta classificação se baseia no uso do percentil 99 da cepa referência como ponto de corte. Avalia-se, então, em cada população, o percentual de indivíduos que apresentam atividade superior ao percentil 99 da enzima correspondente na cepa referência. Alguns exemplos são mostrados abaixo:

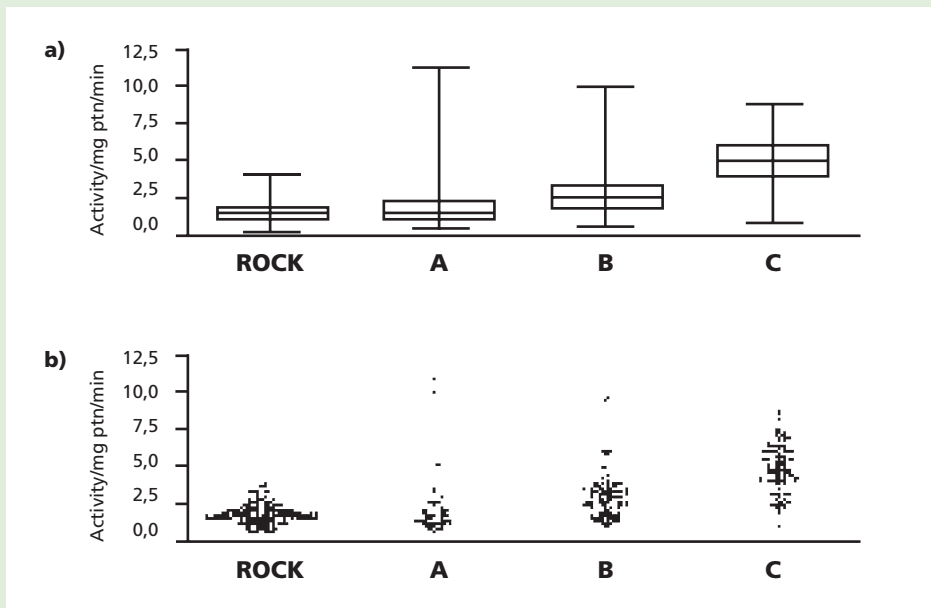


Figure 2: examples of graph representation of enzymatic activity in *Aedes aegypti* populations. Panel on top (a): box-plot; panel above (b): scatter plot. “PNPA” Esterase activity profiles are shown in the reference strain, Rockefeller (ROCK) and in three field populations (A, B, C).

2) How to classify a profile as normal or altered

Enzymatic profile comparisons among populations through parametric and non-parametric statistical analysis revealed significant differences even when these differences were not functionally relevant. This was, for instance, the case with ACE activity in Brazilian vector populations: statistical analysis demonstrated that several field populations were significantly different from the susceptible reference strain. However, according to WHO criterion (a functional criterion), this enzyme is considered susceptible if the inhibition of its activity in the presence of propoxur is 70% or more (Hemingway, 1998). When this criterion was employed in the evaluated populations, it was verified that ACE activity of all of them should be considered susceptible.

We then decided to work in accordance with the definition of a classification that was representative of these functional differences. Precisely due to this, we first evaluated ACE activity, as this enzyme is associated with a functional classification criterion that is widely accepted (Hemingway, 1998).

A classification was defined that represents adequately the functional differences that were found, regarding not only ACE but also other enzymes. This classification is based on the use of reference strain 99 percentile as the cutoff value. In each population, the percentage of specimens with activity above the 99 percentile of the reference strain is calculated. Some examples are exhibited below:

Etapa 1 – calcule o percentil 99 da cepa referência para cada enzima (isto é facilmente realizado em planilhas eletrônicas, como o Excel):

Exemplos de percentis 99 para uma cepa referência.

ACE	MFO	GST	α -Est	β -Est	PNPA-Est
(% atividade com inibidor)	nmoles cit/ mg ptn	mnoles/ mg ptn/min	nmol/ mg ptn/min	nmol/ mg ptn/min	Δ Abs/ mg ptn/min
25,12	33,77	1,79	48,62	81,18	3,58

Etapa 2 – calcular, para cada população, o percentual de indivíduos com atividade maior que o percentil 99 da cepa referência.

População	ACE	MFO	GST	α -EST	β -EST	PNPA-EST
A	0	0	21	14	4	21
B	0	0	45	39	39	44
C	0	0	61	33	2	27
D	2	2	0	23	21	14
E	0	24	0	93	80	0
F	0	0	0	3	1	18
G	3	35	2	77	61	19
H	11	0	15	0	19	81
I	0	0	0	48	16	0

Este ponto de corte permite identificar de forma bastante adequada as diferenças de atividade medidas. Além disso, é possível quantificar esta diferença, uma vez que são atribuídos valores numéricos para cada população (vale lembrar que estes valores representam sempre uma comparação com a cepa referência). Decidimos, então, de forma arbitrária, categorizar os números encontrados: valores entre 0 e 15 indicariam atividade “*não alterada*”, ou seja, equivalente à da cepa referência; valores entre 15 e 50, indicariam “*alteração de atividade*” e valores acima de 50 representariam atividade “*muito alterada*”. Pode-se atribuir cores a estes números para facilitar a visualização dos resultados:

Step 1 – calculate, for each enzyme, 99 percentile of the reference strain (this is easily achieved with several spreadsheet softwares, like Excel).

Examples of 99 percentile for a reference strain.

ACE	MFO	GST	α -Est	β -Est	PNPA-Est
(% inhibition activity)	nmoles cit/ mg ptn	mmoles/ mg ptn/min	nmol/ mg ptn/min	nmol/ mg ptn/min	Δ Abs/ mg ptn/min
25,12	33,77	1,79	48,62	81,18	3,58

Step 2 – calculate, for each population, the percentage of specimens with activity higher than the 99 percentile of the reference strain.


The numbers indicate, for hypothetical populations, the percentage of specimens above the 99 percentile of the reference strain.


Population	ACE	MFO	GST	α -EST	β -EST	PNPA-EST
A	0	0	21	14	4	21
B	0	0	45	39	39	44
C	0	0	61	33	2	27
D	2	2	0	23	21	14
E	0	24	0	93	80	0
F	0	0	0	3	1	18
G	3	35	2	77	61	19
H	11	0	15	0	19	81
I	0	0	0	48	16	0


This cutoff value enables the consistent identification of measured activity differences. In addition, it is possible to quantify this difference; since numeric values are assigned to each population (it is relevant to note that these values express a comparison with the reference strain). We then decided, arbitrarily, to classify these values: 0-15 corresponds to “unaltered” activity, equivalent to the reference strain; 15-50 suggest “altered activity”; values above 50 represent “highly altered” activity. It is possible to give colors to these numbers in order to facilitate the result visualization.

População	ACE	Monox	GST	α -EST	β -EST	PNPA-EST
A	0	0	21	14	4	21
B	0	0	45	39	39	44
C	0	0	61	33	2	27
D	2	2	0	23	21	14
E	0	24	0	93	80	0
F	0	0	0	3	1	18
G	3	35	2	77	61	19
H	11	0	15	0	19	81
I	0	0	0	48	16	0

% pop. legenda

0-15 

15-50 

50-100 

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Feyereisen R 1999. Insect P450 Enzymes. *Annu Rev Entomol.* 44: 507-33.
- Hemingway J 1998. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). WHO/CDC/CPC/MAL/98.6, World Health Organization, Geneva.
- Insecticide Resistance Workshop 1998. Centers for Diseases Control. "Microplate assays", Atlanta, GAS.³²
- Lima-Castelani AR, Ceron CR, Bicudo HE 2004. Variation of genetic expression during development, revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) *Biochem Genet* 42: 69-84.
- Montellano PRO 2004 Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry. 3rd ed. Springer. ISBN: 0306483246.
- Mourya DT, Hemingway J, Leake CJ 1993. Changes in enzyme titers with age in four geographical strains of *Aedes aegypti* and their association with insecticide resistance. *Med Vet Entomol* 7: 11-16.
- Sousa-Polezzi R, Bicudo H 2005. Genetic variation along time in a Brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), detected by changes in the esterase patterns. *Genetica* 125: 43-53.

³² Neste workshop foram apresentadas ligeiras modificações das metodologias de quantificação de diferentes enzimas, relacionadas nos artigos:

Brogdon WG, Dickinson CM 1983. A microassay system for measuring Esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Analyt Biochem* 131: 499-503.



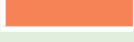
Brogdon WG 1988. Microassay of Acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. *Comp Biochem Physiol* 90C: 145-150.

Brogdon WG, Barber AM 1990. Microplate assay of Glutathione S-transferase activity for resistance detection in single-mosquito triturates. *Comp Biochem Physiol* 96B: 339-342.

Brogdon WG, McAllister JC, Vulule J 1997. Heme Peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated Oxidase for insecticide resistance. *J Amer Mosq Cont Assoc* 13: 233-237.

Population	ACE	MFO	GST	α -EST	β -EST	PNPA-EST
A	0	0	21	14	4	21
B	0	0	45	39	39	44
C	0	0	61	33	2	27
D	2	2	0	23	21	14
E	0	24	0	93	80	0
F	0	0	0	3	1	18
G	3	35	2	77	61	19
H	11	0	15	0	19	81
I	0	0	0	48	16	0

% pop. legend

0-15	
15-50	
50-100	

12. REFERENCES

- Feyereisen R 1999. Insect P450 Enzymes. *Annu Rev Entomol* 44: 507-33.
- Hemingway J 1998. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). WHO/CDC/CPC/MAL/98.6, World Health Organization, Geneva.
- Insecticide Resistance Workshop 1998. Centers for Diseases Control. "Microplate assays", Atlanta, GAS.³²
- Lima-Castelani AR, Ceron CR, Bicudo HE 2004. Variation of genetic expression during development, revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) *Biochem Genet* 42: 69-84.
- Montellano PRO 2004 Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry. 3rd ed. Springer. ISBN: 0306483246.
- Mourya DT, Hemingway J, Leake CJ 1993. Changes in enzyme titers with age in four geographical strains of *Aedes aegypti* and their association with insecticide resistance. *Med Vet Entomol* 7: 11-16.
- Sousa-Polezzi R, Bicudo H 2005. Genetic variation along time in a Brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), detected by changes in the esterase patterns. *Genetica* 125: 43-53.

³² In this Workshop slight modifications of the enzymes quantification methodologies, described in the references below, were presented.

Brogdon WG, Dickinson CM 1983. A microassay system for measuring Esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography eluate fractions. *Analyt Biochem* 131: 499-503.

Brogdon WG 1988. Microassay of Acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. *Comp Biochem Physiol* 90C: 145-150.

Brogdon WG, Barber AM 1990. Microplate assay of Glutathione S-transferase activity for resistance detection in single-mosquito triturates. *Comp Biochem Physiol* 96B: 339-342.

Brogdon WG, McAllister JC, Vulule J 1997. Heme Peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated Oxidase for insecticide resistance. *J Amer Mosq Cont Assoc* 13: 233-237

ISBN 85-334-1291-6



disque saúde
0800.61.1997

www.saude.gov.br/svs

www.saude.gov.br/bvs

Secretaria de
Vigilância em Saúde

Ministério
da Saúde

