



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**WANESSA PORTO TITO GAMBARRA**

**TECNOLOGIAS DE GEORREFERENCIAMENTO E  
GENÉTICA MOLECULAR APLICADOS À AVALIAÇÃO DA  
RESISTÊNCIA DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (DIPTERA:  
CULICIDAE) AO TEMEFÓS**

**(DISSERTAÇÃO)**

**CAMPINA GRANDE**

**2010**

**WANESSA PORTO TITO GAMBARRA**



**TECNOLOGIAS DE GEORREFERENCIAMENTO E GENÉTICA MOLECULAR APLICADOS À AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE) AO TEMEFÓS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, na área de concentração Ciência Ambiental, da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento aos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre.

**ORIENTADOR: Dr. EDUARDO BARBOSA BESERRA**

**CAMPINA GRANDE**

**2010**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL-UEPB

G188t Gambarra, Wanessa Porto Tito.

Tecnologias de georreferenciamento e genética molecular aplicados à avaliação da resistência de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: culicidae) ao Temefós [manuscrito] / Wanessa Porto Tito Gambarra. – 2010.

90 f. : il. color.

Digitado

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Centro de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual da Paraíba, 2010.

“Orientação: Prof. Dr. Eduardo Barbosa Beserra, Departamento de Biologia”.

1. *Aedes Agypti*. 2. Mosquitos. 3. Dengue. 4. Inseticida. I. Título.

22. ed. CDD 614.432 3

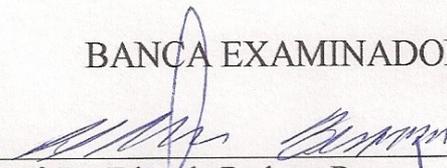
WANESSA PORTO TITO GAMBARRA

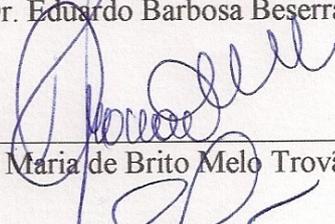
TECNOLOGIAS DE GEORREFERENCIAMENTO E  
GENÉTICA MOLECULAR APLICADOS À AVALIAÇÃO DA  
RESISTÊNCIA DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (DIPTERA:  
CULICIDAE) AO TEMEFÓS

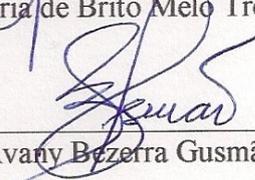
Dissertação apresentada ao Programa de  
Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental  
da Universidade Estadual da Paraíba, em  
cumprimento às exigências para obtenção do  
título de Mestre.

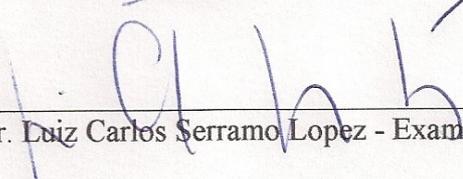
Aprovada em 19 de Novembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Eduardo Barbosa Bezerra – Orientador

  
Profª. Drª. Dilma Maria de Brito Melo Trovão - Examinador Interno

  
Profª. Drª. Maria Avany Bezerra Gusmão - Examinador Externo

  
Prof. Dr. Luiz Carlos Serrano Lopez - Examinador Externo

*A Francisco Gambarra, meu marido, e aos meus  
pais Socorro e Givaldo Tito.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, saúde, entendimento e pela presença constante em minha vida;

A Universidade Estadual da Paraíba, pelo conhecimento proporcionado;

Ao meu Orientador, Professor Eduardo, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho, por toda a paciência, conhecimento, pela reintegração à pesquisa e amizade demonstrada ao longo desses últimos oito anos;

A Walter Fabrício, também pela orientação e apoio no laboratório;

Aos professores do Mestrado, pelas experiências repassadas;

Aos meus pais, Socorro e Givaldo Tito por todo amor, carinho, equilíbrio emocional e pelos ensinamentos de vida proporcionados;

Ao meu marido Francisco Gambarra, por todo amor, cumplicidade, pelo incentivo, compreensão, por valiosas contribuições na estatística desse trabalho e por tornar minha vida mais alegre em sua maravilhosa companhia;

Aos meus irmãos, Rodrigo e Lucas, pela força e carinho transmitidos ao longo da minha vida pessoal e profissional, além da ajuda nas longas e cansativas coletas;

Aos meus sogros, Fernando e Ana, e minhas cunhadas, Fernanda e Fabiana, que compreenderam a minha ausência em muitos momentos e me ajudaram na conquista deste objetivo;

Aos amigos, mais do que colaboradores, que sem os quais o presente estudo teria sido difícil: Mauricio, Ingredy, Renata Leandro, Lafayette, Débora, Íris, Sandrinha, Dairla, Digiane, Carlo Rivero, Kátia e Otávia;

Aos colegas de turma, alunos do MCTA, pelo companheirismo, experiências compartilhadas e palavras de conforto nos momentos difíceis;

A toda minha família: tios, tias, primos, primas, avô e minhas avós, por estarem sempre perto, mesmo estando a muitos quilômetros de distância;

Aos meus amigos, pelos ensinamentos e pelos muitos agradáveis momentos de risadas e descontração;

A Banca Examinadora, por aceitar o convite para as considerações na melhoria deste trabalho.

*Extremamente e sinceramente grata!*

## RESUMO

O uso frequente do temefós tem levado ao desenvolvimento de resistência a inseticida em *Aedes aegypti*, comprometendo o controle e favorecendo a transmissão das doenças por ele veiculadas. Assim, este trabalho teve como objetivo obter informações sobre a resistência ao temefós de populações de *A. aegypti* coletadas em municípios da Paraíba, visando subsidiar os agentes sanitários a desenvolverem estratégias de monitoramento e controle das populações deste vetor. As vinte e quatro populações estudadas foram coletadas nos municípios de Alagoa Grande, Alagoa Nova, Campina Grande, Esperança, Lagoa Seca e Serra Redonda, onde foram realizadas coletas de ovos utilizando-se ovitrampas, a partir de bairros com altos índices de infestação do vetor – área A- e em bairros equidistantes a 500 m, 1.000 m e 1.500 m de distância da área A, constituindo as áreas B, C e D, respectivamente. Os ovos coletados foram levados ao laboratório para criação do mosquito, identificação e determinação do Índice de Infestação para Armadilha de Oviposição (IAO). Coordenadas geográficas de cada ponto de coleta foram obtidas, montada uma matriz de distância geográficas com o número dos quarteirões, o total de residências e/ou estabelecimentos positivos ou não. Os bioensaios de laboratório foram realizados com o temefós, do qual se determinou a dose diagnóstica. O homogenato protéico de larvas L4 foi submetido à eletroforese em géis de poliacrilamida 7,5%. Nesse estudo foi observado que o IAO foi elevado, acima de 20%. A maior incidência do vetor foi constatada para o bairro Catolé, área C do município de Esperança com IAO de 90%. Todas as populações foram submetidas à dose diagnóstica de 0,352 mg de i.a./L, onde obtivemos 0% de mortalidade. A maior CL<sub>90</sub> foi verificada no município de Alagoa Nova, aproximadamente trinta e oito vezes o valor da CL<sub>90</sub> para a população susceptível (Rockefeller – padrão). Todas as populações estudadas apresentaram RR maior que 20, sendo, portanto, consideradas altamente resistentes. A atividade esterásica foi visualizada através dos substratos  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil acetato, possibilitando a visualização de seis regiões de  $\alpha$  e  $\beta$ -esterase, denominadas EST-1 a EST-6. As populações caracterizadas como resistentes mostraram de duas a seis regiões de atividade esterásica, enquanto que a população suscetível foi visualizada apenas uma região de atividade.

**Palavras-Chave:** *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas, esterase.

## ABSTRACT

The frequent use of temephos has resulted in development of insecticide resistance in *Aedes aegypti*, compromising control and favoring the transmission of diseases transmitted by him. This study aimed to obtain information on temephos resistance of *A. aegypti* collected in the municipalities of Paraíba, aiming to support health workers to develop strategies to monitor and control the populations of this vector. The twenty-four populations were collected in the towns of Alagoa Grande, Alagoa Nova, Campina Grande, Esperança, LagoaSeca e Serra Redonda, where eggs were collected using ovitraps from neighborhoods with high levels of vector infestation - area A neighborhoods and equidistant at 500 m, 1,000 m and 1,500 m away from the area, constituted the areas B, C and D, respectively. The eggs were taken to the laboratory for mosquito breeding, identification and determination of the index for Oviposition Trap (IAO). Geographical coordinates of each collection point were obtained, mounted an array of geographical distance with the number of blocks, the total number of residences and/or establishments positive or not. The laboratory bioassays were conducted from temephos, which was determined with the diagnostic dose. The homogenate protein L4 larvae was subjected to electrophoresis on 7.5% polyacrylamide gels. In this study we found that the IAO was high, above 20%. The highest incidence of vector was found for the Catolé district, area C of the City of Esperança with IAO 90%. All populations underwent diagnostic dose of 0.352 mg de i.a./L, where we had 0% mortality. Most LC<sub>90</sub> was found in the city of Alagoa Nova, about thirty-eight times the value of LC<sub>90</sub> to the susceptible population (Rockefeller - default). All populations showed RR bigger than 20, therefore is considered highly resistant. The esterase activity was visualized using the substrates  $\alpha$  and  $\beta$ -naphthyl acetate, allowed the visualization of six regions of  $\alpha$  and  $\beta$ -esterase, called EST- 1 EST- 6. The populations characterized as resistant showed two to six regions of esterase activity, whereas the susceptible population was viewed only one region of activity.

**Key-words:** *Aedes aegypti*, insecticide resistance, esterase.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1: Mapa dos locais de coleta do <i>Aedes aegypti</i> .	36
Figura 2: Armadilhas do tipo ovitramp, instaladas no intra e peridomicílio a fim de coletar ovos de <i>Aedes aegypti</i> .	37
Figura 3: Sala de criação do NCBP/UEPB.	38
Figura 4: Eletroforese nativa em géis vertical de poliacrilamida 7,5%.	42
Figura 5: Mapa dos locais de coleta no município de Campina Grande.	44
Figura 6: Mapa dos locais de coleta no município de Esperança.	45
Figura 7: Mapa dos locais de coleta no município de Lagoa Seca.	46
Figura 8: Mapa dos locais de coleta no município de Alagoa Nova.	47
Figura 9: Mapa dos locais de coleta no município de Alagoa Grande.	48
Figura 10: Mapa dos locais de coleta no município de Serra Redonda.	49
Figura 11: Quantidade de ovos recolhidos por município.	54
Figura 12: Toxidade do temefós abate em populações de <i>A. aegypti</i> .	57
Figura 13: Gráfico dos escores para a PC1 para as oito concentrações testadas em quatro cidades da Paraíba.	60
Figura 14: Gráfico dos escores para a PC1 <i>versus</i> PC2 para as oito concentrações testadas em quatro cidades da Paraíba.	61
Figura 15: Frequências alélicas observadas em seis locos de esterases em populações naturais de <i>Aedes aegypti</i> coletados no município de Serra Redonda ponto D.	62
Figura 16: Frequências alélicas observadas em um loco de esterase na população de <i>A. aegypti</i> suscetível (Rockefeller).	63
Figura 17: Dendograma revelando a análise de agrupamento entre populações de <i>A. aegypti</i> provenientes da Paraíba, baseado na presença e ausência de locos de esterases, pelo método UPGMA.	71

## LISTA DE TABELAS

	<b>Pág.</b>
Tabela 1: Índice para Armadilha de Oviposição (IAO).	51
Tabela 2: Resposta de concentração-mortalidade das populações de <i>Aedes aegypti</i> com diferentes proporções de indivíduos	

suscetíveis e resistentes ao temefós (Abate <sup>□</sup> ).	58
Tabela 3: Frequências alélicas observadas em seis locos de esterase em vinte e uma amostras populacionais de <i>Aedes aegypti</i> .	64
Tabela 4: Resumo da variação genética observada nas amostras populacionais de <i>Aedes aegypti</i> .	65
Tabela 5: Quantidade de locos e a razão da resistência das populações de <i>Aedes aegypti</i> que foram submetidas aos testes de caracterização da resistência a inseticida.	66
Tabela 6: Estimativa de diversidade genética em populações de <i>Aedes aegypti</i> coletadas na mesorregião do agreste paraibano.	68
Tabela 7: Níveis de diferenciação genética ( $F_{st}$ ) das populações de <i>Aedes aegypti</i> .	70

## SUMÁRIO

	<input type="checkbox"/>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
	3
<b>2 OBJETIVOS</b>	1
	5
2.1 Objetivo Geral	1
	5
2.2 Objetivos Específicos	1
	5
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	1
	6

3.1 Situação da dengue no Brasil	1
	6
3.2 Controle do <i>Aedes aegypti</i>	1
	6
3.3 Controle Químico	1
	8
3.3.1 Mecanismos de ação dos inseticidas	1
	9
3.4 Resistência do <i>Aedes aegypti</i> a inseticidas	2
	1
3.4.1 Mecanismos e tipos de resistência a inseticidas	2
	2
3.4.2 Fatores que influenciam a resistência a inseticidas	2
	3
3.4.3 Técnicas de detecção da resistência de insetos a inseticidas	2
	4
3.4.4 Marcadores moleculares no estudo da resistência	2
	5
3.4.4.1 Eletroforese	2
	7
3.4.4.2 Vantagens da Isoenzima como marcador molecular	2
	9
3.4.4.3 Estimativa de níveis de variabilidade genética em populações naturais	3
	0
3.4.5 Monitoramento e Manejo da Resistência do <i>Aedes aegypti</i>	3
	1
3.5 Importância do sensoriamento remoto no controle do <i>Aedes aegypti</i>	3
	3
3.6 Análise de Componentes Principais (PCA)	3
	4
<b>4 METODOLOGIA</b>	3
	6
4.1 Distribuição espacial e georeferenciamento de populações de <i>Aedes aegypti</i> resistentes e suscetíveis ao temefós	3
	6
4.1.1 Coletas de <i>Aedes Aegypti</i>	3
	7
4.2 Bioensaio de laboratório	3
	8
4.2.1 Metodologia de criação de <i>Aedes aegypti</i>	3
	8
4.2.2 Definição da dose diagnóstica e caracterização da resistência de	3

<i>Aedes aegypti</i> ao temefós	9
4.2.3 Análise da expressão do gene de esterase através de eletroforese de Isoenzimas	4 0
4.3 Análise dos dados	4 2
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	4 4
5.1 Distribuição espacial de populações de <i>Aedes aegypti</i> .	4 4
5.2 Verificação e caracterização da resistência ao temefós de populações de <i>Aedes aegypti</i>	5 5
5.3 Padrão eletroforético do gene de esterase	6 2
<b>6 CONCLUSÃO</b>	7 3
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	7 4

# 1 INTRODUÇÃO

As estratégias de controle do *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) estão baseadas na utilização de produtos biológicos e químicos, integrados a programas de manejo ambiental (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

No Brasil, os programas que visam o controle do *A. aegypti* empregam principalmente inseticidas químicos, dos quais se destacam os organofosforados e piretróides (LUNA et al., 2004). Os índices de casos da dengue aumentam ano a ano, influenciados por diferentes fatores, entre os quais, a resistência do vetor aos produtos químicos, diminuindo a eficiência de controle, favorecendo o aumento das populações de mosquitos e, conseqüentemente, o aumento do número dos casos de dengue (CAMPOS e ANDRADE, 2001).

De acordo com estudos realizados em vários municípios, a resistência está amplamente disseminada em populações de *A. aegypti* no Brasil (LIMA et al., 2003; MARCORIS et al., 2003; LIMA et al., 2006). Na Paraíba a resistência ao temefós foi constatada para populações provenientes dos municípios de Boqueirão, Brejo dos Santos, Campina Grande, Itaporanga e Remígio (BESERRA et al., 2007). Tais relatos corroboram a hipótese de que a eficiência dos inseticidas empregados no combate ao *A. aegypti* deve ser rotineiramente avaliada como medida de segurança à saúde pública.

A detecção da resistência e o conhecimento dos mecanismos envolvidos são fundamentais, pois elucidam os aspectos básicos relacionados aos inseticidas e fornecem informações importantes para o seu manejo em espécies alvo (SCOTT, 1995; CRUZ, 2002). Um aspecto essencial para o desenvolvimento de estratégias de manejo da resistência é determinar sua dinâmica, desenvolvendo estudos que avaliem as mudanças e freqüência no decorrer do tempo (GEORGHIOU, 1972; CAMPOS e OMOTO, 2006).

Para se obter sucesso neste manejo e controle do vetor, é preciso determinar como as populações de insetos se distribuem, pois os esforços amostrais e de controle devem se concentrar nos locais em que estão distribuídos

e nas épocas propícias à ocorrência de surtos populacionais. Informações sobre a disseminação espacial e geográfica de populações de *A. aegypti* resistentes ao temefós orientam o desenvolvimento e implementação das estratégias de controle, visto que auxiliam na descoberta de pontos vulneráveis do inseto, que podem servir no direcionamento das ações de controle diminuindo os gastos e custos ambientais decorrentes do uso de técnicas inadequadas.

A caracterização da variabilidade genética presente nas populações naturais é uma ferramenta de grande utilidade para os programas de controle, pois a detecção de populações de vetores geneticamente distintas dentro de uma região pode ter importantes implicações na saúde pública, uma vez que estas podem estar associadas às variações comportamentais, ecológicas, biológicas e caracteres epidemiológicos expressos pelo vetor.

Atualmente, existem várias técnicas disponíveis para detectar polimorfismos de DNA, tanto genômico quanto mitocondrial, das quais podemos destacar: Polimorfismo do DNA Amplificado Randomicamente (RAPD), eletroforese de Isoenzimas, Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP) e seqüenciamento.

Desde a década de 1960, as isoenzimas são importantes ferramentas para os geneticistas, e embora novas técnicas moleculares tenham surgido, estes marcadores ainda são amplamente utilizados em estudos genéticos (SOUZA, 2000). A natureza co-dominante das bandas e os custos relativamente baixos tornaram a análise de isoenzimas atraente e útil na pesquisa. São especialmente utilizadas para a comparação de diversos táxons ou indivíduos (KLASS, 1998). Além disso, constituem a maneira mais direta e rápida de avaliar genotipicamente muitos locos num grande número de indivíduos (AUGUSTIN, 1999; FARALDO et al., 2003).

## **2 OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo geral:

Obter informações sobre a resistência ao temefós de populações de *Aedes aegypti* coletadas em municípios da Paraíba, visando subsidiar os agentes sanitários a desenvolverem estratégias de monitoramento e controle das populações deste vetor.

## 2.2 Objetivos específicos:

- I- Detectar populações de *A. aegypti* resistentes ao temefós;
- II- Caracterizar a distribuição espacial de populações de *A. aegypti* resistentes ao temefós;
- III- Caracterizar a resistência ao temefós das populações de *A. aegypti*;
- IV- Avaliar a expressão do gene de esterase envolvido na resistência de populações de *A. aegypti* através da eletroforese de Isoenzimas;
- V- Quantificar a variabilidade genética do gene de esterase nas populações resistentes ao temefós, verificando a presença de variantes eletroforéticas e estimando índices de heterozigiosidade.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### **3.1 Situação da dengue no Brasil**

No Brasil, há referências de epidemia desde o século XIX. No século passado há relatos de casos em 1916, no Estado de São Paulo e em 1923, na cidade de Niterói (Rio de Janeiro), sem diagnóstico laboratorial. A primeira epidemia, documentada clínica e laboratorialmente, ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista/Roraima, causada pelos sorotipos 1 e 4. Em 1986, ocorreram epidemias no Rio de Janeiro e algumas capitais da região Nordeste. Desde então, a dengue vem ocorrendo no Brasil de forma continuada, intercalando-se com a ocorrência de epidemias, geralmente associadas com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente indemes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

A mobilização deve ser mantida em todo o país e intensificada nos Estados com situação mais preocupante. O novo balanço parcial de casos de dengue desse ano, divulgado pelo Ministério da Saúde, apontou 942.153 casos suspeito até o dia três de julho de 2010. Desse total, 482.284 já foram confirmados, 153.098 foram descartados e 306.771 permanecem em investigação. Já no Estado da Paraíba foram notificados 2.851 casos, um aumento de 1.397 casos para o mesmo período no ano de 2009 (Ministério da Saúde, 2010).

### **3.2 Controle do *Aedes aegypti***

Atualmente, nenhum país conseguiu eliminar a transmissão da dengue após sua re-emergência na metade do século passado. O mosquito *Aedes*

*aegypti*, principal vetor dessa doença, tem apresentado uma grande facilidade em adaptar-se a diversas condições ambientais (TAUIL, 2006).

A crescente incidência de dengue nas últimas décadas requer estratégias efetivas e eficientes para o combate desses complexos processos ecológicos-epidemiológicos pelos serviços de saúde.

O combate a esse Culicídeo consiste em medidas contra as larvas e mosquitos adultos. Entretanto, seus principais criadouros são produzidos principalmente pelos seres humanos, pois permitem sua proliferação em reservatórios artificiais de água (KUNO, 1995), uma vez que as deficiências no abastecimento de água encanada fazem com que muitos habitantes passem a armazenar o líquido nos domicílios, proporcionando assim, criadouros para infestação do mosquito (FORATTINI, 2002).

Nos programas de controle de dengue, a vigilância entomológica é feita, principalmente, a partir de coletas de larvas, de acordo com a proposta de CONNOR e MONROE (1923) para medir a densidade de *A. aegypti* em áreas urbanas. Essa metodologia consiste em vistoriar os depósitos de água e outros recipientes localizados nas residências e demais imóveis considerados estratégicos, por produzirem grande quantidade de mosquitos adultos, para cálculo dos índices de infestação predial (IIP) e de Breteau (IB) (FUNASA, 2001; ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE LA SALUD, 1995).

A coleta de larvas é importante para verificar o impacto das estratégias básicas de controle da doença, dirigidas à eliminação das mesmas. Essa metodologia, entretanto, não é um bom indicador para se medir a abundância do adulto, ineficaz para estimar o risco de transmissão, embora venha sendo usada com essa finalidade (NELSON, 1995).

As armadilhas para coleta de larvas, ou ‘larvitrapas’, são depósitos geralmente feitos de seções de pneus usados. Nas larvitrapas, as flutuações de água da chuva induzem a eclosão dos ovos e são as larvas que se contam, ao invés dos ovos depositados nas paredes da armadilha. A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) recomenda seu uso para detecção precoce de novas

infestações e para a vigilância de populações de *Aedes* com baixa densidade (FUNASA, 2001).

A armadilha de oviposição, também conhecida no Brasil como ‘ovitrampa’, é destinada à coleta de ovos. Em um recipiente de cor escura, adere-se um material áspero que permite a fixação dos ovos depositados. Em 1965, iniciou-se o uso das ovitrampas para a vigilância das populações adultas de *A. aegypti* (FAY e PERRY, 1965).

As ovitrampas fornecem dados úteis sobre distribuição espacial e temporal (sazonal). Dados obtidos com essa metodologia também foram usados para monitorar o impacto de vários tipos de medidas de controle que envolve a redução do vetor com inseticidas (GOMES, 1998; FOCKS, 2000).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) recomenda que as larvitrapas sejam usadas em locais considerados como porta de entrada do vetor adulto, tais como portos fluviais ou marítimos, aeroportos, terminais rodoviários e ferroviários e terminais de carga, para verificação da entrada do vetor em áreas ainda não infestadas; e para monitoramento desses pontos em áreas infestadas. Em razão do grande fluxo de pessoas, é importante que esses locais estejam livres de *Aedes*.

Também no Brasil, confirmou-se a maior sensibilidade das ovitrampas, em relação à pesquisa larvária e às larvitrapas, para verificação da presença do vetor (BRAGA et al., 2000; MARQUES et al., 1993).

### **3.3 Controle Químico**

Relatos do uso de compostos químicos no combate aos insetos datam desde antes do ano 2.500 a.C., em que os sumérios aparentemente utilizavam compostos sulfúricos para o controle de insetos (RETNAKARAN et al., 1985).

Essas substâncias são chamadas genericamente de inseticidas, mas quando são destinadas a atingir formas larvais são chamadas larvicidas. Embora o uso

desses compostos seja motivo de algumas restrições, por contribuírem para a poluição ambiental e apresentarem alguma toxicidade ao ser humano, ainda constituem parte importante do controle integrado de insetos vetores e sua utilização não pode deixar de ser considerada (FORATTINI, 2002). Os inseticidas mais usados no Brasil são os dos grupos químicos piretróides e organofosforado, como exemplo do primeiro grupo temos deltametrina e do segundo o malathion, fenitrothion e, especialmente o temefós, utilizado há décadas no Brasil (FUNASA, 2001).

O temefós é utilizado a 1ppm de princípio ativo, absorvido em grãos de areia numa formulação contendo 1% dessa substância, que pode ser aplicada em água para consumo humano, graças à sua baixa toxicidade oral para mamíferos (LIMA et al., 2006).

Contudo, a exposição continuada dos insetos a estes produtos constitui uma forte pressão de seleção, de forma que os espécimes mais aptos a resistir podem produzir descendência capaz de sobrepujar a população dos não-resistentes. A resistência a inseticidas já foi registrada em mais de 500 espécies de insetos, incluindo muitas de importância médica (MARCONDES, 2001) como, por exemplo, o *A. aegypti*.

### **3.3.1 Mecanismos de ação dos inseticidas**

De acordo com o seu modo de ação os larvicidas podem ser classificados em: asfixiantes, quando as substâncias são destinadas a obstruir os espiráculos; de contato, quando atravessam a superfície corporal ou penetram no corpo pelo sistema respiratório; gástricos, trata-se de substâncias que agem ao serem ingeridas pelas larvas e absorvidas pelo aparelho digestório; e inibidores de crescimento, quando interferem nas ecdises ou comprometem a formação de quitina (FORATTINI, 2002).

O modo de ação dos inseticidas inclui respostas anatômica, física e bioquímica do organismo ao agente químico administrado. O mais importante foco dessa discussão são os efeitos fisiológicos que resultam na morte do inseto. Todos os inseticidas bloqueiam processos metabólicos nos insetos, mas isto ocorre de diferentes maneiras, segundo os diversos agentes químicos. De acordo com o seu modo de ação os inseticidas químicos mais utilizados, agem no sistema nervoso, muscular e respiratório (PEDIGO, 1989).

Os organofosforados agem por contato e ingestão, sendo comumente utilizados como um termo genérico, pois inclui todos os inseticidas que contenham fósforo. Possuem duas características marcantes: uma baixa estabilidade química e uma maior toxicidade a vertebrados do que os organoclorados (BECKER et al., 2003).

Por possuírem baixa persistência, foram bastante utilizados como método alternativo aos persistentes organoclorados, particularmente o DDT. Esta classe de inseticidas é conhecida por produzir grande acúmulo da acetilcolina (ACh) nas terminações nervosas. A acetilcolina é um importante neurotransmissor que em condições normais o organismo a destrói, pela ação da colinesterase (ChE). Em insetos expostos a esses compostos, a colinesterase é inibida, fazendo com que os níveis de acetilcolina se elevem causando hiperexcitação, tremores, convulsões, paralisia e morte (MADDRELL, 1980).

Essa inibição é praticamente irreversível, o que difere da ação dos carbamatos que, embora apresente o mesmo alvo, a inibição é reversível com o tempo (TAYLOR, 1980).

### **3.4 Resistência do *Aedes aegypti* a inseticidas**

A resistência é o desenvolvimento da capacidade de suportar doses de tóxicos que seriam letais para a maioria da população susceptível da mesma espécie em determinada linhagem (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

O número de populações de insetos vetores resistentes depende do volume e frequência de aplicação de inseticidas para o seu controle (FLORES et al., 2001).

A utilização intensa de inseticidas favoreceu o desenvolvimento de resistência em populações de *A. aegypti* (MACORIS, 1999) em várias regiões do mundo, tais como Caribe (RAWLINS, 1995), Cuba (RODRIGUES et al., 1999), Venezuela (RODRIGUES et al., 2001) e Ilhas Virgens (WIRTH, 1999).

No Brasil, a resistência a inseticidas já foi detectada em São Paulo (MACORIS, 1999), Ceará (LIMA et al., 2006), Campo Grande (MS) (CAMPOS e ANDRADE, 2003), Distrito Federal (CARVALHO et al., 2004), Rio de Janeiro, Sergipe, Alagoas (BRAGA et al., 2004) e Paraíba (BESERRA et al., 2007).

Dentre as conseqüências drásticas da evolução para a resistência está a aplicação freqüente de pesticidas; aumento na dosagem do produto e substituição por outro produto, geralmente de maior toxicidade (GEORGHIOU, 1983). Estes fatores comprometem os programas de manejo integrado de pragas em detrimento da contaminação ambiental com pesticidas, destruição de organismos benéficos, além de elevar os custos de controle da praga. Acredita-se que a descoberta e o desenvolvimento de uma nova molécula química estão se tornando cada vez mais difícil e cara. Associado a este fator, existe a possibilidade de insetos expressarem a resistência para os novos compostos através da resistência cruzada (termo a ser definido posteriormente). Sendo assim, o manejo da resistência de artrópodes a produtos químicos tem se tornado um importante tema de vários estudos (GEORGHIOU, 1983; SAWICKI, 1987; CROFT, 1990; DENHOLM e ROLLAND, 1992).

### 3.4.1 Mecanismos e tipos de resistência a inseticidas

Os mecanismos de resistência a inseticidas são incluídos em três categorias: 1) redução da penetração do inseticida pela cutícula do inseto; 2) redução da sensibilidade no sítio de ação do sistema nervoso e 3) detoxificação ou metabolização por enzimas (FERRARI, 1996; BECKEL e LORINI, 2002).

No primeiro mecanismo ocorre a redução da entrada do inseticida devido às mudanças na cobertura de quitina do inseto, diminuindo seu potencial de ação no local que atua (BECKEL e LORINI, 2002).

No segundo, os insetos que apresentam resistência se mostram insensíveis à ação do inseticida por apresentarem baixa sensibilidade no local de ação. Quando ocorre a resistência, o inseto utiliza-se desse mecanismo reduzindo a afinidade do inseticida com seu local alvo, permitindo a transmissão normal ou quase do impulso nervoso (BRAGA e VALLE, 2007). Estas alterações podem comprometer a atividade inseticida em questão. A enzima acetilcolinesterase, o receptor neuronal do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e os canais de sódio dependentes de voltagem, são exemplos de sítio-alvos envolvidos neste tipo de resistência (HEMINGWAY et al., 2004).

No terceiro mecanismo os insetos modificam ou “diminuem” a toxicidade do inseticida a ponto de evitar a ação do mesmo (BECKEL e LORINI, 2002). Neste caso há uma mutação no inseto resistente que aumenta a expressão de um determinado gene que codifica uma enzima detoxificante, então poderá metabolizar muito mais inseticida que outro inseto não mutante (SCOTT, 1995; HEMINGWAY, 2000).

Um pequeno grupo de enzimas ou família de enzimas está envolvido neste mecanismo de resistência: as oxidases, as glutational-s-transferases e as esterases (PAIVA, 2006).

A resistência a inseticidas pode ser cruzada ou múltipla. A primeira é resultante de um só gene, isto é, o inseto resiste ao efeito de produtos diferentes

em função de uma única característica genética, ou ainda, quando um único mecanismo de resistência confere resistência a dois ou mais produtos químicos; a segunda surge devido a mecanismos distintos contra vários tipos de produtos químicos, ou seja, quando dois ou mais mecanismos coexistentes conferem resistência a dois ou mais produtos químicos (GRAVENA, 1994).

### **3.4.2 Fatores que influenciam a resistência a inseticidas**

A evolução da resistência a inseticidas em populações de campo está sob a influência da genética; dos fatores bioecológicos que variam conforme a espécie, população e localização; e de fatores operacionais, podendo desenvolver-se mais rapidamente em algumas circunstâncias, ou mais lentamente, ou ainda não se desenvolver (GEORGHIOU, 1983).

A resistência é uma característica herdável, e sendo assim outra definição dentro de um contexto genético é a de Crow (1957) que define resistência como "o marco na mudança da composição genética de uma determinada população em resposta à pressão de seleção".

Os evolucionistas assumem que os indivíduos têm a capacidade de desenvolver algum tipo de resistência, uma vez que os genes que conferem resistência estejam presentes, a frequência inicial em que eles ocorrem também pode ser importante. Obviamente, se essa frequência for alta a resistência torna-se muito mais provável de acontecer (GEORGHIOU, 1983).

A pressão de seleção através de inseticidas e a imigração podem estabelecer um equilíbrio instável nas frequências gênicas; abaixo desse equilíbrio os genes para resistência (R) decrescem e acima dele, aumentam. A frequência, o número, dominância, penetração, expressividade e interações dos genes para a resistência, são fatores preponderantes na determinação da mesma (CAMPAHOLA, 1990).

### 3.4.3 Técnicas de detecção da resistência de insetos a inseticidas

Existem várias metodologias para o diagnóstico de resistência. O método de detecção ideal deve ser rápido, de baixo custo, de fácil manuseio e capaz de detectar resistência no estágio inicial do seu desenvolvimento (SCOTT, 1995). Os testes de resistência podem ser divididos em bioensaios, ensaios bioquímicos e, o mais recentemente desenvolvido, teste molecular de resistência. Os métodos podem então ser divididos em dois grupamentos tecnológicos, os tradicionais e os moleculares (SABATINI, 2003).

Os bioensaios têm um custo mais baixo, não necessitam de equipamentos especiais e são de fácil manuseio (SCOTT, 1995). Os bioensaios de monitoramento em geral se baseiam nas determinações das concentrações letais medianas ou noventa por cento ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) ou mesmo na dose letal (DL) ou tempo (TL) para essas mortalidades. Em alguns casos quando a resistência é ainda incipiente, é melhor a determinação de uma dose ou concentração diagnóstica (CD), e de uma forma geral, pode-se trabalhar com um valor de CD igual a 2 ou 3 vezes a  $CL_{90}$  da população susceptível (ANDRADE e SANTOS, 1999).

Os testes bioquímicos mais utilizados na detecção da resistência a inseticidas são: a eletroforese, o de imunidade e o colorimétrico que mede a atividade total das esterases (FURIATTI e LAZZARI, 2003).

Os métodos de tecnologia molecular podem detectar resistência a uma frequência baixa e possibilitam a distinção genotípica da resistência, por exemplo, heterozigotos, homozigoto susceptível e homozigoto resistente. Estes testes não são influenciados por componentes ambientais que usualmente podem interferir nos resultados de um bioensaio ou ensaio bioquímico. Outra vantagem da tecnologia molecular é a possibilidade de se realizar um teste a partir de apenas um indivíduo (SABATINI, 2003).

Um dos mais novos métodos para o diagnóstico da resistência é a utilização da tecnologia de “microarrays”, como o chip de desintoxicação do vetor da malária, *Anopheles gambiae*, para monitorar o nível de expressão dos genes responsáveis pela desintoxicação (DAVID et al., 2005), podendo também identificar os genes adicionais que confere ou estão associados com a resistência a inseticidas (VONTAS et al., 2005). Entretanto, estas tecnologias não são atualmente amplamente disponíveis, e é discutível se são realmente úteis, porque elas precisam de sofisticados sistemas de gerenciamento de dados para que se tenha uma correta interpretação do estado de resistência em uma população (NAUEN, 2007).

Outra poderosa tecnologia para o diagnóstico molecular da resistência é highthroughput pyrosequencing, milhares de insetos individuais podem ser analisadas dentro de dias, a fim de detectar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na sequência dos genes (GRUBER et al., 2002). Essa técnica é extremamente útil no diagnóstico do sítio-alvo de resistência como KDR ou MACE e permite a detecção de frequências de alelos de resistência inferior a 1% em populações (BENTING, 2004).

#### **3.4.4 Marcadores moleculares no estudo da resistência**

A caracterização da biodiversidade através de marcadores moleculares tem demonstrado grande potencialidade para estudos de genética de populações, biologia evolutiva e taxonomia, permitindo a caracterização da variabilidade e plasticidade genética das populações naturais (OOSTERHOUT et al., 2004). O conhecimento da base molecular desta flexibilidade genética, os consequentes mecanismos que garantem a sua diversidade, associado ao conhecimento da estrutura genética das populações de mosquitos, podem contribuir substancialmente para o desenvolvimento de métodos de controle mais eficazes, uma vez que fornecem informações úteis sobre o polimorfismo dos genes de resistência, bem como os padrões de dispersão dos genes e dos vetores.

Atualmente, existem várias técnicas disponíveis para detectar polimorfismos de DNA, e entre as vantagens apresentadas por estes marcadores moleculares, se destacam a necessidade de pequena quantidade de material biológico, facilidade de realização e automação em grande escala (MITCHELL-OLDS, 1995).

O avanço das técnicas em genética molecular como sequenciamento de genes, tornou possível detectar alelos mutantes que podem conferir resistência, passando a desempenhar um papel promissor nos estudos da resistência em mosquitos (PAIVA, 2006).

Vários genes de resistência já foram descritos utilizando-se diferentes métodos, como a clonagem, seqüenciamento e expressão funcional do gene da acetilcolinesterase em *A. aegypti* (FFRENCH-CONSTANT et al., 1995); a análise de mutações no gene do canal de sódio voltagem-dependente em *A. aegypti* (BRENGUES et al., 2003); a descrição do gene da citocromo P450 (COLLINS et al., 2002); a análise molecular da relação entre as glutatióntransferases e a resistência aos inseticidas químicos (HEMINGWAY et al., 2004); análise da mutação kdr, causada pela troca de uma leucina por uma fenilalanina em *A. gambiae* (DIABATE et al., 2004), análise do promotor da *y*-esterase em *Culex quinquefasciatus* (HAWKES, 2002; HEMINGWAY et al., 2004) e o monitoramento do gene de esterase envolvido na resistência a organofosforados em populações naturais de *A. aegypti* do Brasil (PAIVA, 2006). As técnicas moleculares, por serem mais específicas e sensíveis, se mostram bastantes úteis na elucidação mais aprofundada do problema da resistência a inseticidas químicos. No entanto, apesar de todo o avanço alcançado através de estudos moleculares, ainda existe a necessidade de um maior intercâmbio entre os achados laboratoriais e as técnicas empregadas em campo.

#### **3.4.4.1 Eletroforese**

Das muitas técnicas existentes para a análise de proteínas (enzimáticas ou não), a eletroforese em gel de isoenzimas é sem dúvida uma técnica versátil e facilmente aplicável. A eletroforese pode ser definida como a migração de modo diferencial e próprio de partículas eletricamente carregadas, quando submetida a um determinado potencial elétrico em certo pH (LOPES, 1984).

Na prática, quantidades de extratos crus de tecidos (sangue, insetos, folhas, caules, cotilédones ou endospermas de plantas esmagadas, etc.) homogeneizados de indivíduos são colocados em uma fenda de um suporte normalmente feito de amido de batata, poliacrilamida, agar, agarose, acetato de celulose, ou qualquer outra substância capaz de formar uma matriz homogênea. Quando se faz passar uma corrente elétrica através do gel, as proteínas do tecido migram a uma velocidade determinada em função da carga elétrica dos aminoácidos que a constituem, embora o tamanho e a configuração da proteína possam também influir na velocidade de migração. A eletroforese é tão sensível que se podem detectar proteínas que só diferem em um aminoácido de um total de várias centenas que as constituem (AYALA, 1978).

As proteínas sintetizadas por diferentes indivíduos de uma população são comparadas fazendo-as correr em posição vizinha no gel durante um determinado tempo. Uma vez que as proteínas tenham migrado, determina-se a posição das mesmas aplicando um corante específico para a proteína que está em estudo. Como produto da reação substrato-enzima forma-se um complexo possível de ser visualizado colorido e insolúvel no gel. Dessa forma, pode-se visualizar uma banda colorida, correspondente à posição de migração de enzima originalmente presente na amostra. Se a enzima for homogênea, apenas uma banda será vista no gel. No caso de amostra analisada conter enzimas com diferentes cargas ou de diferentes tamanhos ou configurações espaciais, diversas frações são separadas dando origem a diversas bandas coloridas no gel (MEDINA FILHO, 1983).

Como cada cadeia de aminoácidos de uma proteína (algumas proteínas são formadas por mais de uma cadeia) é o produto de um só gene, este estudo permite ao pesquisador estimar o número de locos de uma população que apresenta alelos múltiplos e quantos estão em homozigose. A eletroforese, portanto, constitui-se em uma técnica que permite a detecção de mutações que alteram a estrutura das enzimas, que passa a ter múltiplas formas moleculares, modificando sua mobilidade eletroforética, porém, mantendo suas atividades catalíticas (PIRES, 1983).

O termo “isoenzima” foi proposto por MARKET e MOLLER (1959) para descrever diferentes formas moleculares de proteínas, que apresentam especificidade enzimática similar ou idêntica.

O fenômeno da multiplicidade enzimática já era conhecido em alguns casos há muitos anos, porém foi somente após o desenvolvimento da técnica do zimograma (padrão eletroforético observado para um determinado sistema enzimático) por Hunter e Markert, citados por LOPES (1984), que a ocorrência de isoenzimas passou a ser investigada ativamente.

#### **3.4.4.2 Vantagens da Isoenzima como marcador molecular**

Os enormes avanços obtidos no conhecimento científico no último século foram alcançados, em boa parte, através da introdução de novas técnicas científicas. Entre estas se encontram a eletroforese, que tem possibilitado ampliar as fronteiras da análise química e biológica até então difíceis ou impossíveis de serem alcançadas (FARALDO et al., 2003).

As isoenzimas obtidas por eletroforese apresentam-se como excelente material para estudos genéticos, pois: são pouco influenciadas pelo ambiente (PIRES, 1983), de tal forma que a variação no padrão de bandejamento pode ser

diretamente comparada à variação do gene que codifica proteínas variantes (GOTTLIEB, 1971); o padrão de bandas é tratado como um fenótipo e investigado por testes genéticos que determinam quais bandas são codificadas por genes alélicos e quais são especificadas por genes não alélicos (GOTTLIEB, 1971); apresentam um controle monogênico (PIRES, 1983), com as bandas quase sempre segregando como simples fatores medelianos, o que obviamente simplifica grandemente a análise (GOTTLIEB, 1971).

A utilização de técnicas eletroforéticas requer apenas algumas horas ou dias (PIRES, 1983) e podem ser empregadas como marcadores, constituindo-se em um método indireto de seleção de características de importância econômica, porque os genes que codificam certas enzimas podem estar ligados a genes que controlam essas características quantitativas (PIRES, 1983); quando houver homogeneidade na população a expressão das isoenzimas será qualitativa e possibilita a contagem de locos que variam e que apresentam variação (GOTTLIEB, 1971).

Hubby e Lewontin (1966) demonstram que a eletroforese permite à detecção de diferenças fenotípicas causadas por substituição alélica em um único loco do indivíduo, a identificação de substituições alélicas em outros locos e a avaliação de uma amostra substancial do genoma. Todos os cálculos baseados em eletroforese são influenciados pela pequena fração do genoma analisado, pela exclusão dos genes reguladores e pelo fato de nem todas as substituições de aminoácidos serem detectadas número amostral também (WAGNER e SELANDER, 1974).

Deve-se salientar que a técnica de eletroforese é aplicável a qualquer tipo de inseto e, de imediato, revela grande número de locos e alelos. É também bastante simples, sendo necessária apenas pequena quantidade de material a qual não requer purificação ou outro processamento adicional para ser analisada (MEDINA FILHO, 1983).

### **3.4.4.3 Estimativa de níveis de variabilidade genética em populações naturais**

Estudos de estrutura genética em populações naturais buscam descrever os níveis e a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações.

A distribuição da variabilidade genética em populações naturais é influenciada principalmente pelo modo de reprodução, sistemas de cruzamento, tamanho efetivo da população, fluxo gênico e distribuição geográfica, sendo estruturada no tempo e espaço (HAMRICK, 1983). A distribuição dessa variabilidade é resultante da interação de diversos fatores evolutivos, tais como mutação, migração, seleção e deriva genética.

A caracterização da variabilidade genética de populações é efetuada a partir de medidas de diversidade intrapopulacionais, como a porcentagem de locos polimórficos e seu número médio de alelos, a média de alelos observados e as taxas de heterozigosidade (esperada e observada). Diversos parâmetros genéticos podem ser estimados com o uso de marcadores moleculares e bioquímicos, destacando-se o conhecimento do sistema de reprodução, da variabilidade e da estrutura genética de populações. Esse conhecimento é importante para o delineamento de estratégias em programas de melhoramento e conservação genética de espécies (SEOANE; SEBBENN, 2004).

As técnicas de eletroforese para estimar a variação genética em populações primeiramente foram aplicadas no homem por Harris (DOBZHANSKY et al., 1977). A partir de então, sua aplicação começou a se difundir rapidamente, envolvendo populações de vários organismos.

O grau de polimorfismo varia muito de um loco para outro numa mesma população. Na maioria dos organismos estudados existe uma grande variação genética, no entanto, em algumas populações pesquisadas não foi detectada variação genética. Nestes casos a explicação mais conveniente parece ser o fato de que estas populações, num período recente, foram reduzidas a um pequeno

número de indivíduos (DOBZHANSKY et al., 1977). Com o auxílio desta técnica tem sido possível determinar variabilidade entre e dentro de famílias e de populações, mesmo nos casos onde os caracteres morfológicos não o permitiram. Este tipo de estudo com base em um grande número de locos enzimáticos é um caminho para gerar considerável informação genética em um tempo limitado. Os resultados obtidos e cuidadosamente interpretados geram informações que podem ter bastante valor para a decisão a ser tomada (FARALDO et al., 2003).

### **3.4.5 Monitoramento e Manejo da Resistência do *Aedes aegypti***

A resistência tem se tornado um problema bastante sério a nível mundial. O Brasil empregou como alternativa de controle para esta resistência a substituição de um produto por outro que não demonstrasse resistência cruzada, a rotação ou ação conjunta de inseticidas e o controle integrado de pragas, visando minimizar a utilização destes reagentes químicos para manter o número de indivíduos suscetíveis, prevenindo o desenvolvimento consistente da resistência nas populações alvo (CAMPAHOLA, 1990).

Nos anos 90, a incidência de dengue aumentou consideravelmente, como conseqüência da dispersão do *A. aegypti* no território nacional, que se intensificou a partir de 1994 (BARBOSA SILVA et al., 2002), tornando cada vez mais evidente a necessidade de melhorar a vigilância do vetor.

Estudos efetuados pelo Núcleo de Entomologia do Estado do Rio de Janeiro e a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), em 1998, detectaram diminuição da persistência de temefós em simulações de campo, indicando a grande necessidade de implementar o monitoramento da susceptibilidade do *A. aegypti* a inseticidas, principalmente ao temefós, malation e fenitrothion,

organofosforados que vinham sendo utilizados na rotina do programa de controle da dengue.

Desde o segundo semestre de 1998, iniciaram-se discussões sobre a necessidade de avaliação da susceptibilidade dos vetores aos inseticidas utilizados para seu controle no Brasil. Um grupo de trabalho foi formado e no I Seminário Internacional de Controle de Vetores e Reservatórios, realizado em outubro de 1998, formulou-se uma proposta para a implantação, em nível nacional, do monitoramento da resistência dos vetores a inseticidas. Como prioridade, optou-se pelo monitoramento do *A. aegypti* (FUNASA, 1999).

Entre 29 de junho a 2 de julho de 1999, a equipe da Funasa reuniu-se em Brasília com diversos técnicos do programa de controle da dengue, da área de Entomologia e de controle de vetores juntamente com especialistas nacionais e internacionais em resistência de vetores a inseticidas. O grupo definiu orientações sobre o uso de inseticidas no país (piretróides, para controle de adultos; e temefós, para larvas) e recomendou a implantação do monitoramento da resistência do *A. aegypti* a inseticidas (FUNASA, 1999).

A Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *A. aegypti* a Inseticidas – MoReNAa – foi instituída no mesmo ano, sob a coordenação da Gerência de Entomologia e Pesquisa Operacional (GTEPO) da Funasa, com a proposta de agregar 12 laboratórios para realização das provas biológicas. Três desses laboratórios atuariam também como referência para os ensaios bioquímicos. Durante o ano 2000, com a colaboração dos laboratórios de referência, técnicos de sete laboratórios dos Núcleos de Entomologia da Funasa foram capacitados para realizar provas biológicas (BRAGA e VALLE, 2007).

Em 1999-2000, populações de *A. aegypti* de 67 Municípios do país foram avaliadas, tendo sido detectada resistência a temefós principalmente em Municípios das Regiões Sudeste e Nordeste. O trabalho consistiu, inicialmente, na exposição de larvas a uma dose diagnóstica de temefós, conforme recomendado pela OMS para detecção de resistência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981).

Desde então, vêm sendo avaliados, periodicamente, cerca de 80 municípios em todo o país. Hoje, todos os laboratórios pertencentes à rede de monitoramento realizam provas de susceptibilidade do *A. aegypti* ao temefós.

Os dados obtidos pelos ensaios biológicos, conjugados com observações de campo, foram usados para definir novas estratégias de controle. A Funasa optou por substituir o temefós pelo biolarvicida Bti nos Estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Norte, como também em alguns outros Municípios do país que apresentaram resistência ao temefós (BRAGA et al., 2004).

### **3.5 Importância do sensoriamento remoto no controle do *Aedes aegypti***

O uso de técnicas de sistemas de informações geográficas (SIG) tem possibilitado identificar mais precisamente as áreas de risco para dengue, pois permitem a análise conjunta dos dados encontrados de áreas de maior transmissão, mais vulneráveis ao vetor e planejamento das ações de controle, buscando otimizar as atividades de vigilância epidemiológica e entomológica (BARCELLOS et al., 2005).

O sensoriamento remoto pode ser usado para avaliar o terreno classificado e descobrir variáveis referentes à presença e a abundância de mosquitos portadores da dengue e sua proximidade com zonas povoadas, a fim de gerar um mapa de risco da dengue. O resultado da construção desses mapas georreferenciados possibilita a visualização espacial de qualquer informação geográfica. Sendo assim, esse sistema é de grande importância para a geografia da saúde, pois a mesma tem como objetivo de estudo a distribuição geográfica e ecologia das doenças. Portanto, a agilidade e precisão das informações processadas pelo SIG contribuem para entender a manifestação espacial das

patologias, possibilitando a ação eficaz para mitigar a ocorrência das mesmas (LEITE et al., 1998).

### **3.6 Análise de Componentes Principais (PCA)**

A PCA é uma técnica biométrica de reconhecimento de padrões não-supervisionado cujo princípio é fatorar um conjunto de dados de natureza multivariada, objetivando a representação das variações existentes na forma de componentes principais (PCs). As PCs são as representações dos novos eixos formados a partir da combinação linear das variáveis originais e nelas está contida toda a informação dos dados na forma de variância. Elas são sempre ortogonais (perpendiculares) umas as outras, e sucessivas PCs descrevem quantidades decrescentes da variância explicada dos dados, de modo que a informação relevante está contida nas primeiras componentes. Por esta razão, poucas PCs são necessárias para que toda ou a maior parte da variância dos dados seja explicada, permitindo que os dados multivariados sejam interpretados em dimensionalidades plausíveis à percepção humana (MASSART et al., 1997; BEEBE et al., 1998, FERREIRA et. al., 1999).

O número de PCs suficiente para descrever a informação dos dados é definido como sendo a dimensionalidade inerente (DI) ou posto da matriz. A DI deve-se às características físicas e/ou químicas encontradas no conjunto de dados, que estão mascaradas pela presença de correlação entre as variáveis e ruídos. Para que a DI seja alcançada, é imprescindível definir o número adequado de PCs que fornecem as informações de interesse para o analista, excluindo o máximo de ruído sem comprometer as informações pertinentes à melhor interpretação dos dados (BEEBE et al., 1998).

Por isso, recorre-se ao uso de ferramentas de diagnóstico, que investigam e exploram três aspectos do conjunto de dados: o modelo, as amostras e as variáveis. Dentre estas ferramentas, pode-se citar o gráfico dos resíduos, o

gráfico da variância explicada, gráfico dos escores e o gráfico dos pesos. Outro ponto tão importante quanto à determinação do número de PCs é a detecção de amostras anômalas (*outliers*), que apresentam características diferentes e afetam os resultados obtidos. Estas amostras devem, portanto, ser removidas do conjunto de dados (MASSART et al., 1997, BEEBE et al., 1998).

É importante ressaltar que o descarte de uma ou mais amostras do modelo deve ser efetivamente avaliado utilizando diversos tipos de ferramentas de diagnóstico. Desconsiderar a variabilidade existente do conjunto de dados como um todo e adotar, com pouca informação *a priori*, uma amostra como sendo *outlier* pode prejudicar o desempenho dos modelos.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Distribuição espacial e georeferenciamento de populações de *Aedes aegypti* resistentes e suscetíveis ao temefós**

A pesquisa foi realizada durante o período de 01 de fevereiro de 2009 a 15 de julho de 2010. As populações de *Aedes aegypti* foram coletadas em seis municípios localizados na mesorregião do agreste paraibano, são eles: Campina Grande (Lati.: 7°17'12"S, Long.: 35°48'31"W); Lagoa Seca (Lati.: 7°10'01"S, Long.: 35°51'57"W); Serra Redonda (Lati.: 7°11' 37"S, Long.: 35° 41'08"W);

Alagoa Grande (Lati.: 07°03'20"S, Long.: 35°38'49"W); Alagoa Nova (Lati.: 07°04'02"S, Long.: 35°46'07"W); Esperança (Lat.: 07°00'08"S, Long.:35°50'28"W) (Figura 1).

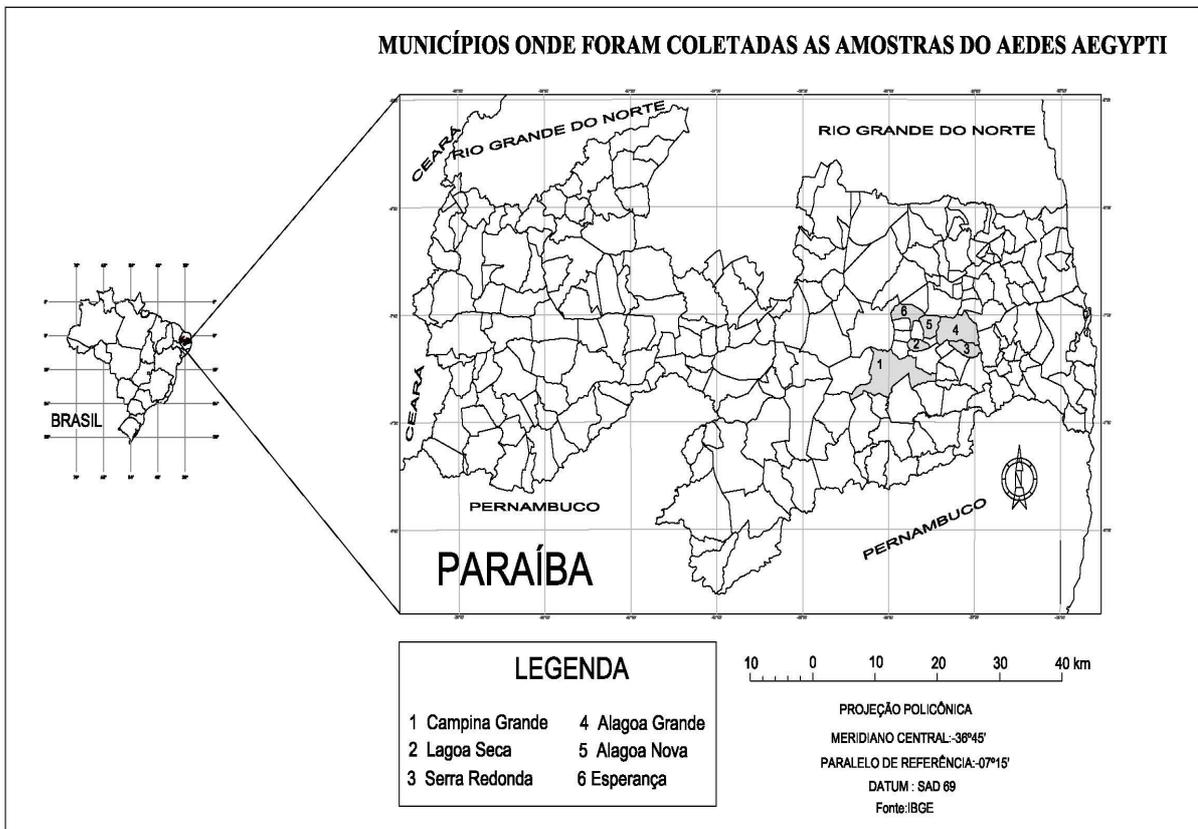


Figura 1: Mapa dos locais de coleta do *Aedes aegypti*.

#### 4.1.1 Coleta de *Aedes aegypti*

As coletas de populações de *A. aegypti* foram realizadas no período de 01 de fevereiro a 03 de abril de 2009, a partir de bairros com altos índices de infestação do vetor de acordo com a secretaria de saúde de cada município – ponto A - e em bairros equidistantes localizados a 500m, 1.000m e 1.500m de distância do ponto A, constituindo os pontos B, C e D, respectivamente.

Nas áreas definidas como pontos A, B, C e D, foram instaladas 30 armadilhas para coleta de ovos (ovitramp), sendo distribuídas no intra e peridomicílio das residências escolhidas ao acaso (Figura 2). As armadilhas foram recolhidas a cada quatro dias após a instalação, e o material coletado

acondiçionado em caixas térmicas de isopor e trazido para o laboratório para a quantificação do número de ovos.

As palhetas contendo os ovos foram colocadas em bandejas plásticas, contendo água destilada e, quando do quarto estágio (L<sub>4</sub>), as larvas eram montadas em lâminas sob microscópio estereoscópio e identificada à espécie utilizando-se a chave dicotômica contida em Forattini (2002).



Figura 2: Armadilhas do tipo ovitrap, instaladas no intra e peridomicílio a fim de coletar ovos de *Aedes aegypti*.

#### **4.2 Bioensaio de Laboratório**

Os testes biológicos de resistência, as criações das populações de *A. aegypti* e a eletroforese de isoenzimas foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico do Núcleo de Manejo Integrado de Pragas (NCBP) da Universidade Estadual de Paraíba (Figura 3), em salas climatizadas a temperatura de  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotofase de 12 horas.



Figura 3: Sala de criação do NCBP/UEPB.

#### 4.2.1 Metodologia de criação de *Aedes aegypti*

As palhetas de eucatex contendo ovos de *A. aegypti* provenientes dos municípios em estudo eram colocadas para secar por um período de 48 horas sendo, em seguida, acondicionadas em bandejas plásticas de cor branca medindo 40 cm de comprimento x 27 cm de largura x 7,5 cm de profundidade com um terço da sua capacidade preenchida com água desclorada. Após a eclosão das larvas, era ofertada ração para peixe ornamental (Alcon/goldfish crescimento) na proporção de 100 mg/bandeja, as quais foram cobertas por uma tela de malha fina. As pupas, após sexadas, eram transferidas em copos descartáveis de 250 ml para as gaiolas de criação dos adultos. Essas gaiolas, construídas de armação de madeira e tecido tipo organza, medindo 40,0 cm x 40,0 x 30,0 cm, recebiam os indivíduos machos e fêmeas. Aos adultos foram ofertadas uma solução de mel a 20%, e às fêmeas foi permitido repasto sanguíneo em codornas, *Coturnix japonica* (Temmincke Schlegel, 1849) durante vinte minutos, três vezes por semana. Após o repasto, em cada gaiola, foi colocado um copo descartável de 250 ml com água desclorada, com um funil plástico revestido por um papel filtro para servir como substrato de oviposição.

#### **4.2.2 Definição da dose diagnóstica e caracterização da resistência de *Aedes aegypti* ao temefós**

Nos testes biológicos de resistência foi avaliado o temefós em grau técnico na primeira geração do laboratório (F<sub>1</sub>) e o Temefós Abate<sup>®</sup> na primeira e na segunda geração do laboratório (F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>).

A determinação da dose diagnóstica foi realizada através de testes de concentrações múltiplas que causaram mortalidades entre 5% e 99%, considerando-se como dose diagnóstica o dobro da CL<sub>90</sub> da população suscetível (S), segundo o que preconiza Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

A população Rockefeller, mantida no laboratório de controle biológico à quatro anos sem pressão de seleção, foi tomada como a população suscetível de referência (S). A temperatura e pH das soluções eram aferidas através de um termômetro químico com aferição até 60°C e de um Phmetro digital, respectivamente, e a umidade do ambiente através de um Termo-Higrometro digital modelo HT- 210.

A verificação e a caracterização da resistência nas populações de *A. aegypti* ao larvicida temefós foram realizadas a partir da dose diagnóstica determinada a partir dos testes com a população suscetível (S), e de concentrações múltiplas que proporcione mortalidade entre 5% e 99%, e água com 1,0 ml de álcool etílico (P.A. 95%) como controle. Para cada teste, larvas de 3º estágio tardio (L<sub>3</sub>) e/ou 4º estágio jovem (L<sub>4</sub>) do vetor foram distribuídas em copos descartáveis de 500 ml, contendo 400 ml de cada solução diluída em água destilada, e 25 larvas, repetidas em quatro vezes sendo que após vinte e quatro horas de exposição das larvas ao produto era avaliada a porcentagem de

mortalidade segundo critério da OMS na interpretação do padrão de suscetibilidade: □ 98%, população suscetível; de 80% a 98%, verificação da resistência; □ 80%, população resistente.

Devido à quantidade insuficiente de ovos da primeira geração de laboratório ( $F_1$ ), a caracterização da resistência foi feita com a  $F_2$  das populações provenientes de Alagoa Nova D, Alagoa Grande B, Lagoa Seca C e Serra Redonda B. Foi escolhido apenas um ponto de cada município para submeter as concentrações múltiplas que proporcionaram mortalidade entre 5% e 99%. Para essas populações testaram-se as concentrações de: 1,76 mg/L; 2,464 mg/L; 2,816 mg/L; 3,52 mg/L; 4,224 mg/L; 5,28 mg/L; 7,04 mg/L e 8,8 mg/L.

### **4.2.3. Análise do gene de esterase através de eletroforese de Isoenzimas**

Das vinte e quatro amostras de populações de *A. aegypti* coletadas na mesoregião do agreste paraibano, apenas vinte foram submetidas à eletroforese de isoenzimas. Por falta de eclosão das larvas não foram possíveis essas análises para as populações de Lagoa Seca ponto B, Campina Grande ponto D e Esperança pontos B e D.

As larvas da primeira geração de laboratório ( $F_1$ ) de cada população de *A. aegypti* (n= 36) foram homogeneizadas em 50 µl de tampão de extração Tris-Hcl 0,5 M, pH 6,8 sob resfriamento, e posteriormente, centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min/ 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para microtubos de 2.0 ml com auxílio de uma pipeta de precisão e adicionou-se 3 µL de azul de bromofenol. Posteriormente, armazenados em freezer até o momento das análises eletroforéticas.

Os géis de poliacrilamida 7,5% em tampão Tris-glicina pH 8,9 foram preparados adicionando 9,0 ml de acrilamida, 350 µL de persulfato de amônia,

35 mL de Temede, 3,5 ml tampão tris – glicina, 22,5 ml de água destilada. O tampão de corrida tris-glicina, pH 8.9 (10x) para o sistema enzimático examinado foi feito com 63,2 g de Tris Base; 39,9 g de glicina, adicionando-se aproximadamente 900 ml de água destilada, diluindo 1:10 antes do uso.

Foram submetidos à eletroforese nativa em géis vertical de poliacrilamida 7,5% (Figura 4), 15 mL das amostras armazenadas. A corrida eletroforética foi conduzida à amperagem 0,70A e voltagem de 170 V / 5h). Posteriormente, o gel foi submetido à coloração histoquímica específica para o sistema enzimático Esterase (EST, EC 3.1.1.1), realizada com 0,015 g de  $\alpha$ -naftil acetato, 0,020 g de  $\beta$ -naftil acetato, 0,050 g de Fast blue RR salt. Os substratos  $\alpha$  e o  $\beta$ -naftil acetato foram diluídos em 2 ml de acetona e 2 ml de água, e o Fast blue RR salt em 10 ml de tampão fosfato (C + D), homogeneizou-se a solução e completou o volume para 50 ml com tampão fosfato (C + D). A revelação enzimática foi realizada em estufa a 37° C durante 1 hora. O processo de fixação foi realizado seguindo a metodologia descrita por Alfenas et al. (1991).



Figura 4: Eletroforese nativa em géis vertical de poliacrilamida 7,5%.

### 4.3 Análise dos dados

Para a confecção dos mapas da distribuição espacial dos pontos de coleta do *A. aegypti* foi utilizada a carta SB-25-Y-C-I como base, de escala 1/100.000, constando os municípios que fazem parte da área de estudo. O material cartográfico está disponibilizado no portal da AESA (Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba), e sua modificação foi feita a partir de um programa do tipo CAD (computer-aided design).

Para o georreferenciamento dos municípios foi utilizado um GPS Garmin de navegação <Sistema de Posicionamento Global>, com projeção UTM e “Datum” planimétrico SAD 69. As coordenadas dos pontos de coleta do *A. aegypti* foram inseridos no mapa já georreferenciado, para que fosse possível mostrar sua distribuição real no espaço e indicar com precisão a localização das populações desse culicídeo resistente ou não ao temefós.

Os números de ovos foram tabulados utilizando-se o programa Excel/Windows. Os dados de mortalidade de cada população foram submetidos à análise de Probit através do programa POLO-PC, sendo a razão de resistência (RR) calculada a partir da  $CL_{50}$  da população resistente (R) e da  $CL_{50}$  da população suscetível (S) de laboratório. Diferenças entre populações geográficas foram consideradas significativas se 95% dos intervalos de confiança da  $CL_{50}$  não se sobrepõem (SOSA-GOMEZ et al., 2001).

O programa Unscrambler<sup>®</sup> 9.7 (CAMO S.A.) foi empregado para a construção da Análise de Componentes Principais (PCA), com a finalidade de representar as variações existentes nos dados na forma de componentes principais (PCs) e verificar se as populações estudadas diferem quanto à toxicidade do temefós.

A análise dos zimogramas foi realizada seguindo a nomenclatura descrita por TABACHNICK e POWELL (1979), onde locos e alelos são designados por

números. A avaliação quantitativa (densitometria) dos zimogramas ocorreu através da variação na intensidade das bandas observadas nos géis.

As Frequências alélicas, as taxas de heterozigose e o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados através dos programas TFPGA – Tools for Population Genetic Analysis (MILLER, 1997) e GenALEx 6.4 (PEAKALL and SMOUSE, 2006).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Distribuição espacial de populações de *Aedes aegypti***

Os mapas construídos a partir deste estudo mostram a distribuição real no espaço e indicam com precisão a localização das populações de *A. aegypti* resistentes ao temefós (Figuras 5 a 10). Podendo assim, contribuir para tomada de decisões que controlem de maneira efetiva esse vetor na região de estudo.

As coletas realizadas no município de Campina Grande abrangeram os bairros de Centenário (A, B), São José (C) e Santa Rosa (D) (Figura 5), onde foram recolhidos 449 ovos. Neste município, o ponto B apresentou o maior Índice para armadilha de Oviposição (IAO), 37,04; o menor IAO foi verificado no ponto C, 20,00.

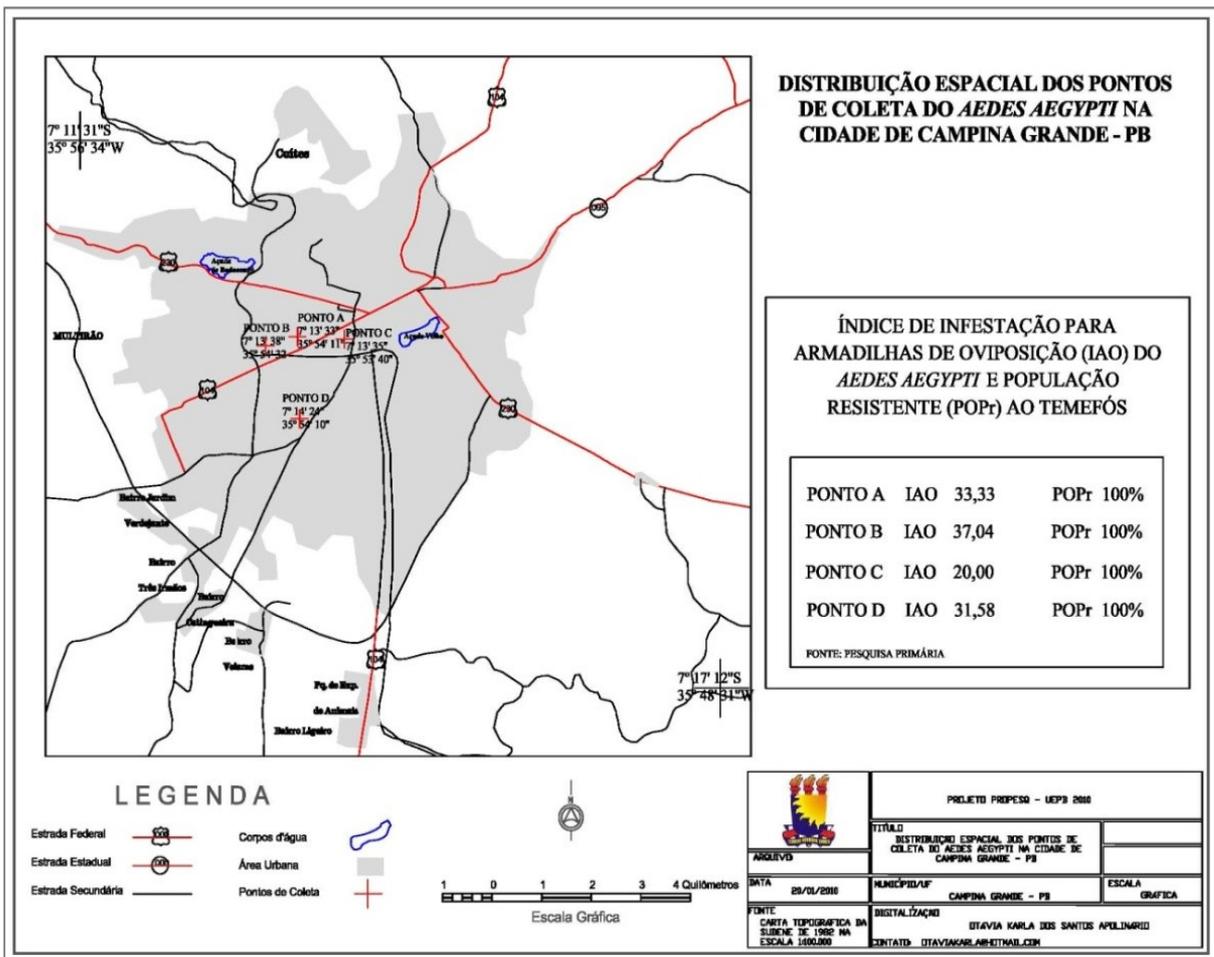


Figura 5: Mapa dos locais de coleta no município de Campina Grande.

Em Esperança, as coletas abrangeram os bairros do Britador (A), Bela Vista (B), Catolé (C) e na região do Sítio Imburana (D) (Figura 6), onde foram coletados 2.502 ovos. O IAO foi muito alto para o bairro do Catolé, 90. Esse alto índice pode ser explicado devido às condições precárias de saneamento básico observadas no local de coleta. Nos demais pontos esse índice variou de 46,43 a 56,66.

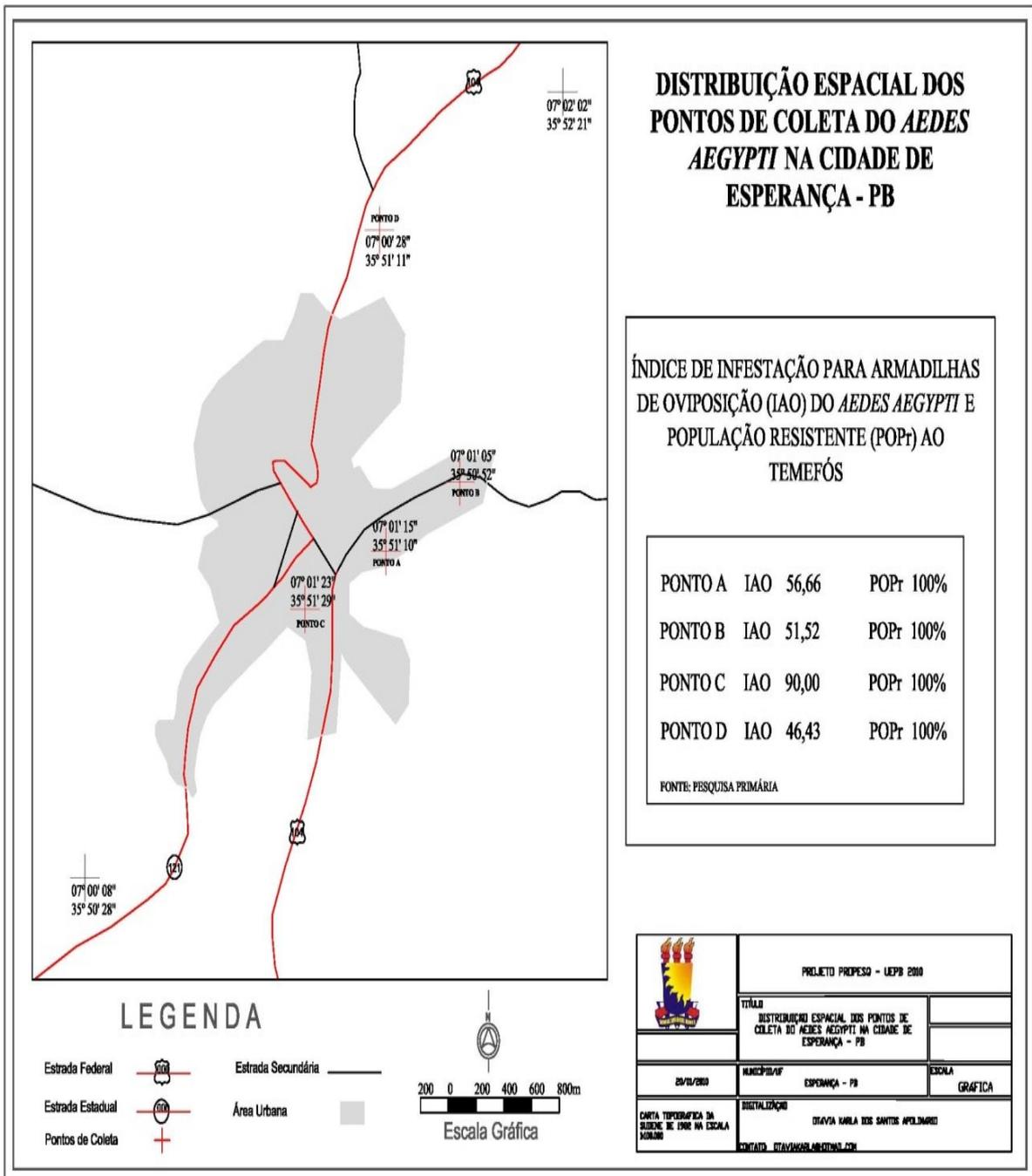


Figura 6: Mapa dos locais de coleta no município de Esperança.

As coletas realizadas em Lagoa Seca abrangeram os bairros de Monte Alegre (A), Centro (B, C) e Novo Horizonte (D) (Figura 7), onde foram recolhidos 1.452 ovos. O maior IAO neste município foi verificado no ponto C, 58,06; no entanto, todos os demais pontos apresentaram valores próximos a 50% de imóveis investigados com presença do vetor.

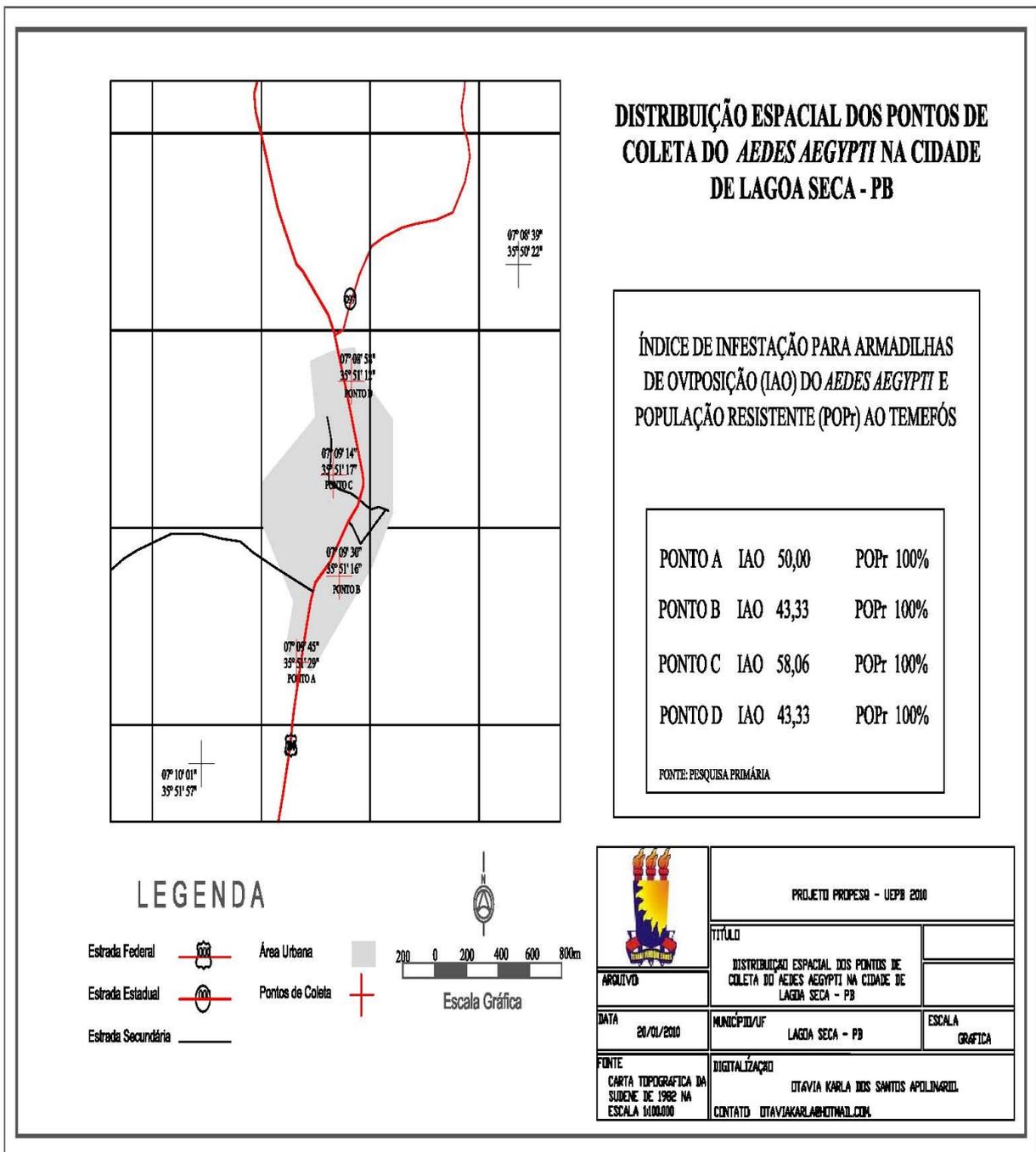


Figura 7: Mapa dos locais de coleta no município de Lagoa Seca.

As coletas em Lagoa Seca abrangem três áreas no Centro da cidade (A, B e C) e uma no bairro de Nossa Senhora Aparecida (D) (Figura 8), com um total de 1.658 ovos coletados. O maior IAO foi verificado no ponto C (53,33). Uma grande quantidade de criadouros do mosquito foi observada nos pontos A, B e C.

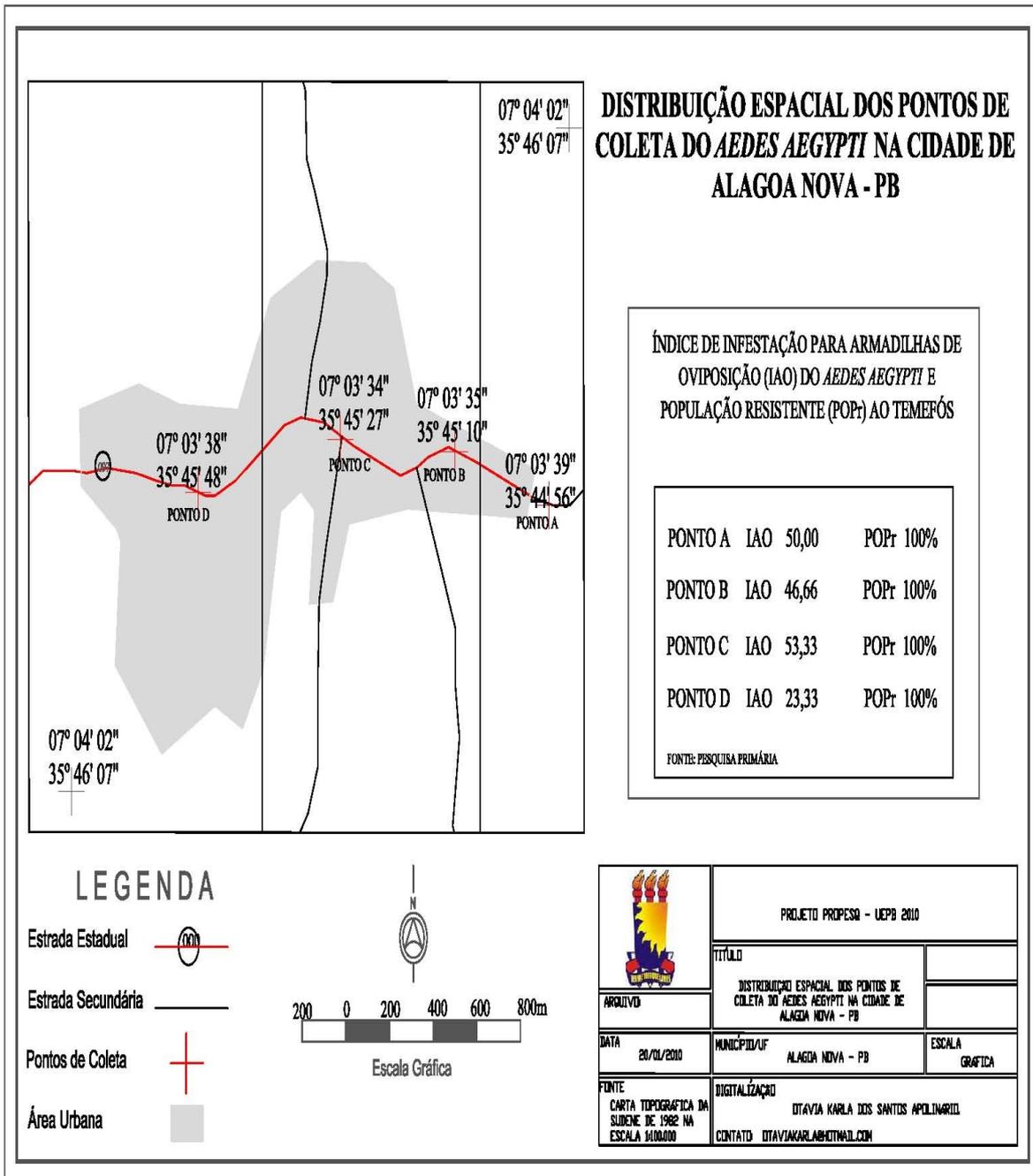


Figura 8: Mapa dos locais de coleta no município de Alagoa Nova.

Em Alagoa Grande, as coletas também foram realizadas em três áreas no Centro da cidade (A, B e C) e uma no Conjunto Agnaldo Veloso Borges (D) (Figura 9), com um total de 1.227 ovos coletados. Neste município, o IAO foi igual ou superior a 60 nos pontos A, B e C. No ponto D observo-se o menor índice, 42,86.

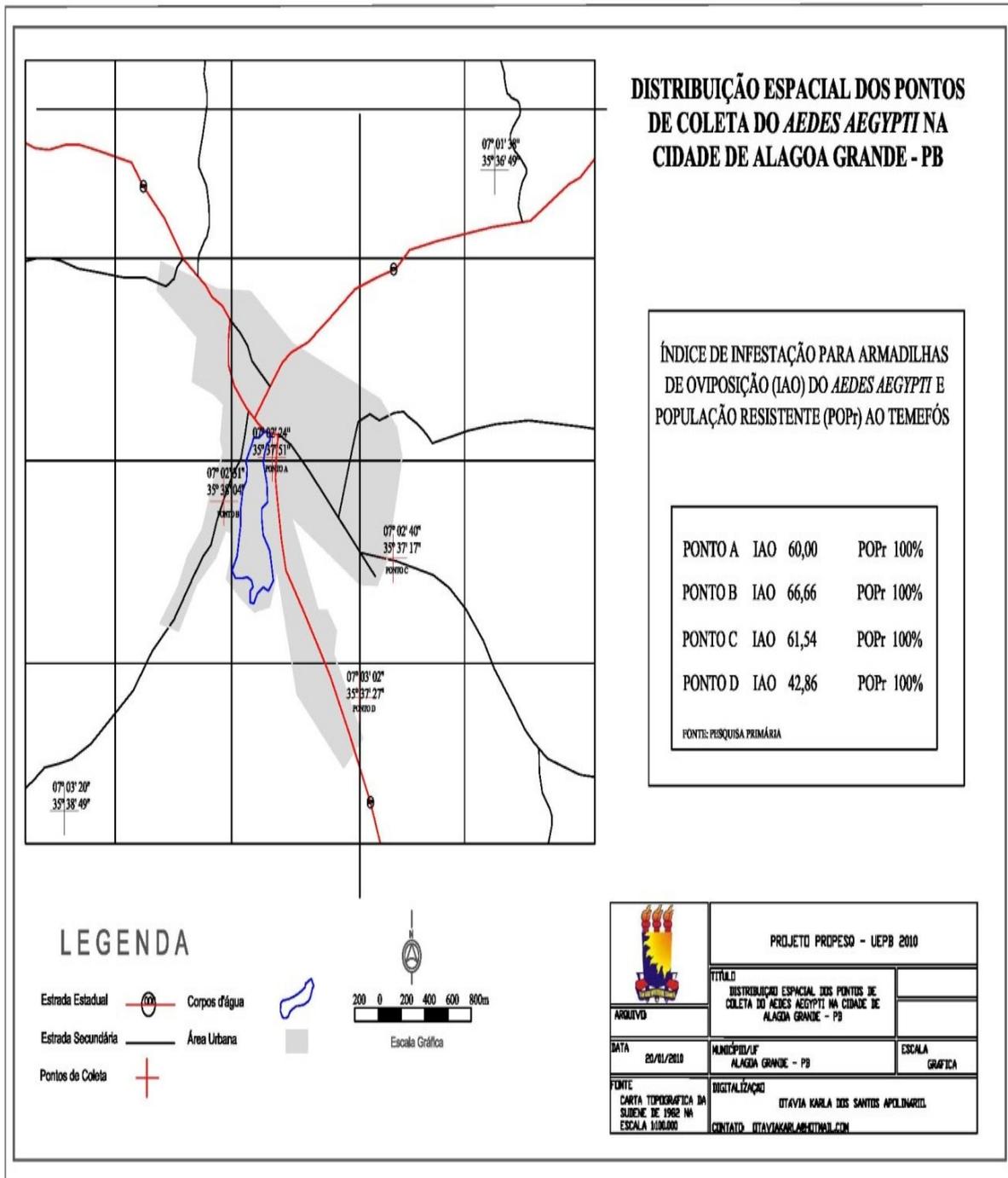


Figura 9: Mapa dos locais de coleta no município de Alagoa Grande.

As coletas realizadas no município de Serra Redonda abrangeram uma área no bairro do Mariz II (A), e as demais no Centro da cidade (B, C e D) (Figura 10), onde foram recolhidos 2.893 ovos. O IAO foi muito alto nos pontos A, B e C. Nestes locais foi observada uma grande quantidade de terrenos baldios contendo “reservatórios artificiais” de água parada, propiciando lugares favoráveis para a procriação do vetor. O menor IAO foi no ponto D, 42,86.

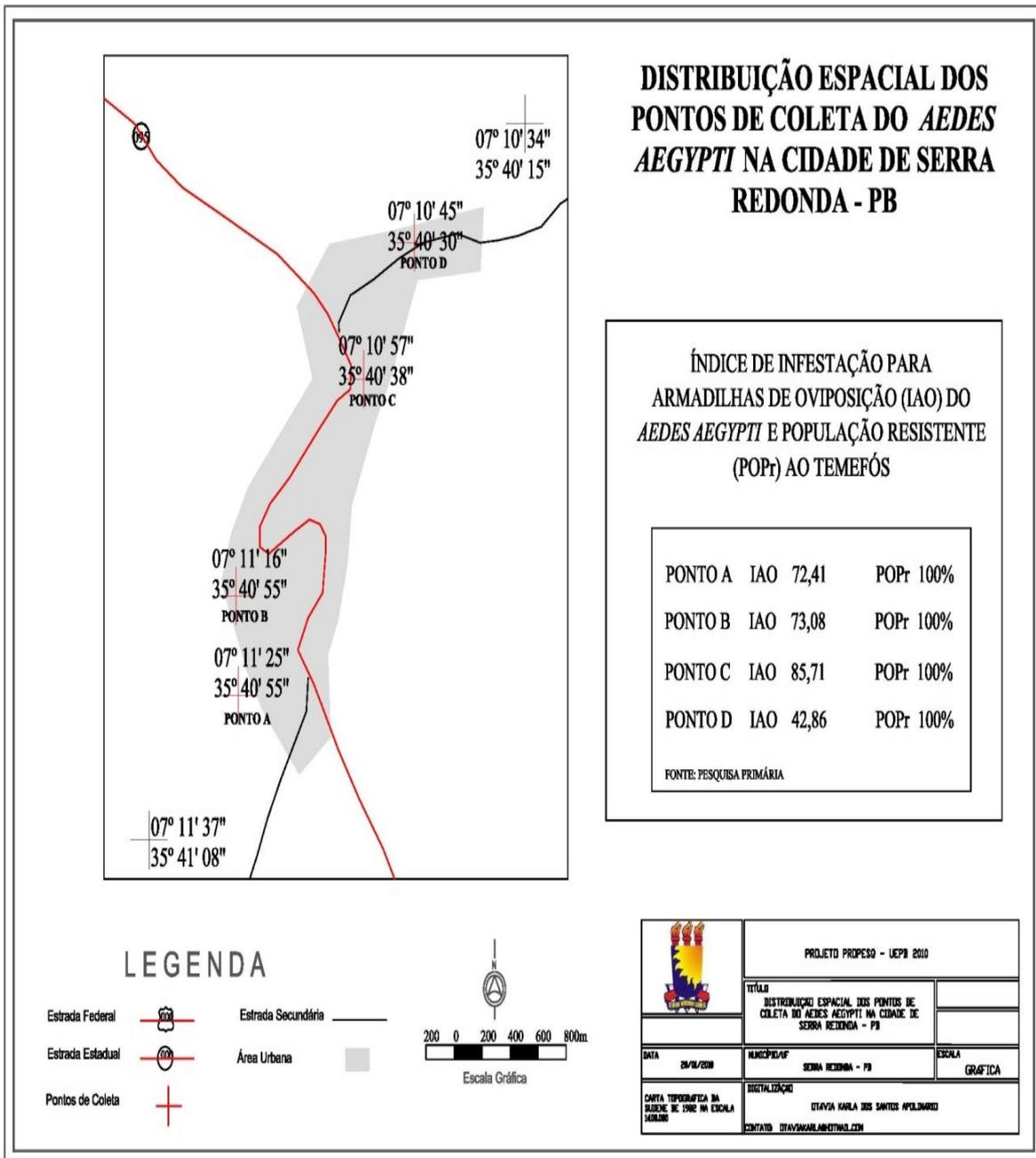


Figura 10: Mapa dos locais de coleta no município de Serra Redonda.

Há vários registros na literatura de estudos sobre dengue utilizando o geoprocessamento. Em pesquisa realizada no município de Salvador-BA, no ano 1995, Barreto et al. (2008) utilizou o sensoriamento remoto para identificar aglomerados espaciais da dengue e as áreas de maior concentração do vetor. Em outros foram utilizadas as análises espaciais para monitoramento do vetor dando subsídio para ações preventivas (SU and CHANG, 1994; BARREIRA, 2000; SOUZA-SANTOS e CARVALHO, 2000; KOBAYASHI, 2002).

Em 1998, Morrison utilizou também análises exploratórias espaço-tempo utilizando GIS, o que levou à conclusão de que a progressão temporal e espacial rápidas da doença na cidade sugere que as medidas devam ser aplicadas à cidade inteira em vez de apenas às áreas em torno das casas com casos notificados.

O fato, então, de se ter acesso a um sistema computadorizado que integra as análises habituais com a possibilidade de visualização e análise espacial oferecida por mapas digitais, como é o caso do geoprocessamento, pode representar enormes possibilidades de avanços no controle das doenças transmitidas por vetores e mais especificamente, no caso deste estudo, no controle do dengue.

Além disso, a disponibilidade de um Sistema de Informações Geográficas (SIG) permite a análise dos casos da doença com seus fatores de risco ou de associação, juntamente com os recursos de assistência à saúde, considerando o tempo e a localização dos mesmos. Isto permite a visualização destes fatores, facilitando, em muito, o planejamento e avaliação das ações de controle (NAJAR, 1998; CARVALHO et al., 2000).

Observou-se nesta pesquisa um alto Índice para Armadilha de Oviposição (IAO) na maioria das cidades estudadas (Tabela 1).

Tabela 1. Índice para Armadilha de Oviposição (IAO).

Municípios / Pontos de Coleta	Bairros	Coordenadas geográficas	
<b>Campana Grande</b>	A	Centenário	Lati. 07° 13.558 S Long. 035° 54. 232O 33,33
	B	Centenário	Lati. 07° 13.660 S Long. 035° 54.535 O 37,04
	C	São José	Lati. 07° 13.603S Long. 035° 53. 6810 O 20,00
	D	Santa Rosa	Lati. 07° 14. 408 S Long. 035° 54.183 O 31,58
<b>Espera</b>	A	Britador	Lati. 07° 01.247 S Long. 035° 51.192 O 56,66

<b>Esperança</b>	B	Bela Vista	Lati. 07° 01.116 S Long. 035° 50.924 O	51,52
	C	Catolé	Lati. 07° 01.449 S Long. 035° 51.509 O	90,00
	D	Sítio Imburana	Lati. 07° 00.438 S Long. 035° 51.195 O	46,43
<b>Lagoa Seca</b>	A	Monte Alegre	Lati. 07° 09. 759 S Long. 035° 51. 490 O	50,00
	B	Centro	Lati. 07° 09. 530 S Long. 035° 51. 321 O	43,33
	C	Centro	Lati. 07° 09. 246 S Long. 035° 51. 319 O	58,06
	D	Novo Horizonte	Lati. 07° 08. 994 S Long. 035° 51. 221 O	43,33
<b>Alagoinhas</b>	A	Centro	Lati. 07° 02.347 S Long. 035° 37.853 O	60,00
	B	Centro	Lati. 07° 02.541 S Long. 035° 38.097 O	66,66
	C	Centro	Lati. 07° 02. 680 S Long. 035° 37. 386 O	61,54
	D	Conjunto Agnaldo Veloso	Lati. 07° 03. 086 S Long. 035° 37. 511 O	42,86
<b>Serra Redonda</b>	A	Mariz II	Lati. 07° 11. 493 S Long. 035° 40. 962 O	72,41
	B	Centro	Lati. 07° 11. 219 S Long. 035° 40. 900 O	73,08
	C	Centro	Lati. 07° 11. 013 S Long. 035° 40. 698 O	85,71
	D	Centro	Lati. 07° 10. 781 S Long. 035° 40. 561 O	42,86
<b>Alagoinhas Nova</b>	A	Centro	Lati. 07° 03. 679 S Long. 035° 44. 921 O	50,00
	B	Centro	Lati. 07° 03. 609 S Long. 035° 45. 184 O	46,66
	C	Centro	Lati. 07° 03. 581 S Long. 035° 45. 489 O	53,33
	D	Nossa Senhora Aparecida	Lati. 07° 03. 644 S Long. 035° 45. 742 O	23,33

Quando comparamos o IAO entre os municípios, verificamos que os índices mais elevados foram o de Serra Redonda e o menor foi o de Campina Grande. Porém, vale ressaltar que nos demais municípios houve uma taxa bastante alta deste vetor há exemplo da área C de Esperança, cujo IAO foi de 90%. (Tabela 1).

Como vemos na tabela 1, a distribuição desse vetor é cada vez mais abrangente. O alto índice de IAO nas cidades em estudos pode ser explicado devido o período de coletas terem sido realizadas no verão. Isso pode ser

facilmente entendido já que as altas temperaturas influenciam na eclosão das larvas do *A. aegypti*.

Vários trabalhos mostram que a sua expansão geográfica sofre influência de condições climáticas, estando sempre associada com o aumento da temperatura, pluviosidade e umidade do ar. De acordo com Moore (1985) e TEIXEIRA et al. (2001) o padrão sazonal de incidência da doença coincide com o verão, devido a maior ocorrência de chuva e aumento de temperatura nesta estação.

Para Gonçalves Neto e Rebêlo (2004) as chuvas exercem grande influência na determinação do período de ocorrência da doença. A pluviosidade não só aumenta consideravelmente a quantidade de criadouros disponíveis para o desenvolvimento das formas imaturas do vetor, como também gera condições ambientais mais apropriadas para o desenvolvimento de adultos.

Obviamente, não são apenas fatores naturais que agravam a incidência deste vetor nos municípios citados, os costumes da população, no que diz respeito à higiene, contribuem para o aumento ou minimização dos focos desse culicídeo.

Em algumas cidades estudadas, o abastecimento de água era irregular e através de caminhões pipa, havendo necessidade de armazenamento de água em caixas d'água, tambores e outros recipientes, a maioria sem cobertura, o que favorecia o desenvolvimento do mosquito.

No período da coleta, focos do mosquito foram encontrados em edifícios de todas as classes sociais, entretanto, nas áreas mais humildes observou-se mais infestação do mosquito *Aedes*.

Em contra partida, Ferreira (2007) observou que os índices larvários não mostraram associação com os diferentes níveis socioeconômicos na cidade de São José do Rio Preto. Segundo ele, os bairros novos e loteamentos irregulares com as piores condições de saneamento básico podem sim, apresentar maiores quantidades de larvas. Esses resultados corroboram os achados de Oliveira e

Valla (2001) e Souza-Santos e Carvalho (2000), onde mostraram a relação existente entre a precariedade do saneamento básico e a dengue.

Em conversas informais com alguns moradores de Campina Grande, esses relataram ter conhecimento dos trabalhos de sensibilização e acompanhamento feito pelos agentes de saúde no intuito de prevenir a dengue, e isso pode explicar o baixo índice de Armadilha para Oviposição encontrado nesse município. Para Lefevre et al. (2007), o aumento nos números de casos de dengue apontam para necessidade de se estudar a problemática educativa a fim de identificar o conhecimento da população com vistas ao enfrentamento da defasagem entre a informação e a prática. Para ele, toda a sociedade deve ser engajada no controle da dengue, não somente o serviço público.

O número de municípios brasileiros nos quais tem sido apontada a presença de *A. aegypti* tem aumentado rapidamente nos últimos anos. Souza-Santos e Carvalho (2000), em um trabalho realizado na Ilha do Governador, no Rio de Janeiro, verificaram que a presença do mosquito foi maior nas áreas residências, porém não se restringe a tal, pois ele se distribui por toda a região.

No presente trabalho foram recolhidos 10.184 ovos (Figura 11), com um total de 720 ovitrampas instaladas. A utilização das ovitrampas revelou-se uma boa ferramenta para o estudo da infestação vetorial.

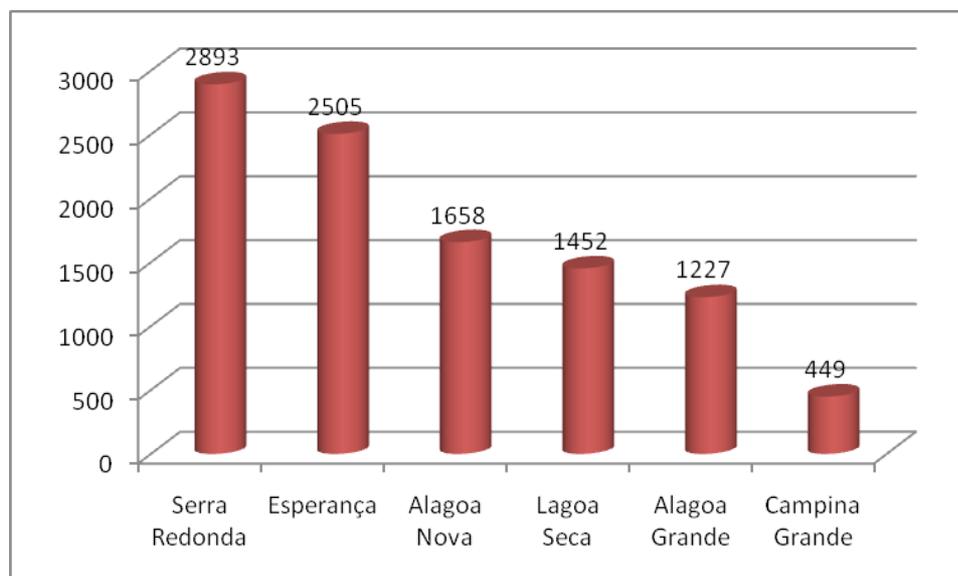


Figura 1:Quantidade de ovos recolhidos por município.

Braga et al. (2000) apontaram o monitoramento com ovitrampas como uma metodologia mais sensível e econômica quando comparada às metodologias de monitoramento oficiais, baseadas em pesquisa larvária. Concordando com Marques et al. (1993), que verificaram na ovitrampa a capacidade de positivar-se mesmo na presença de grande número de criadouros concorrentes. Uma das vantagens do uso de ovitrampas seria a retirada de ovos do ambiente (SANTOS e MARÇAL JUNIOR, 2004).

Neste estudo, foram monitorados e analisados a distribuição do *A. aegypti* em seis municípios da mesorregião do agreste paraibano, e dentre esses municípios quatro áreas distintas. Um alto índice e uma ampla distribuição da atividade do inseto dentro desses municípios (Figura 11).

## **5.2 Verificação e caracterização da resistência ao temefós de populações de *Aedes aegypti***

A presença de resistência ao temefós em grau-técnico nas vinte e quatro populações de *A. aegypti* coletadas nos seis municípios estudados foi avaliada nos meses de dezembro de 2009 a março de 2010.

Uma homogeneidade na resistência a esse organofosforado foi observada. Todas as populações obtiveram 0% de mortalidade para a dose diagnóstica 0,092 mg de i.a./L. A Rockfeller foi a única susceptível, apresentando 100% de mortalidade, o que já era esperado.

Como não foi possível a obtenção do temefós em grau-técnico para os testes seguintes, devido à mudança desse produto para o diflubenzuron e não fornecimento do grau-técnico pelo Ministério da Saúde ao Núcleo de Entomologia da Secretaria Estadual de Saúde optou-se pelo uso do Abate<sup>□</sup>, para se dá continuidade aos experimentos. Neste caso foi necessário repetir os testes com a população susceptível para a determinação da nova dose diagnóstica a ser aplicada nas populações de campo, obtendo-se uma CL<sub>90</sub> de 0,176 mg i.a./L e uma dose diagnóstica de 0,352 mg i.a./L. Todas as vinte e quatro populações foram submetidas à nova dose diagnóstica, onde novamente obtivemos 0% de mortalidade.

Na Paraíba, Beserra et al. (2007) verificou a resistência de populações de *A. aegypti* de Boqueirão e Remígio utilizando uma concentração de 0,012 mg i.a./L do larvicida temefós em grau técnico. Estas cidades apresentaram mortalidade de 4,8% e 48,0%, respectivamente. Já nas populações de Brejo dos Santos, Campina Grande, Itaporanga, Capim de Cheiro e Lagoa do Mato obteve-se uma mortalidade abaixo de 80% em todos os testes realizados.

Segundo Diniz (2008), populações coletadas em cinco bairros de Campina Grande se mostraram resistentes à dose diagnóstica de 0,28 mg i.a./L, não havendo mortalidade. Esse aumento na resistência do *A. aegypti* vem sendo observada por vários pesquisadores, afetando, direta e profundamente os programas de controle (BRAGA et al., 2007), como por exemplo, no estado do Rio de Janeiro, onde Lima et al. (2003) estudando populações coletadas em sete municípios, verificou mortalidade entre 23,5% e 74,0%, mostrando-se resistentes ao larvicida temefós.

Ainda no sudeste do país, dados semelhantes foram obtidos por Campos e Andrade (2001) para uma população de *A. aegypti* da região de Campinas, SP, onde a sobrevivência para a concentração de 0,012 ppm, adotada pela OMS (1981) foi alta, 24,5%, sendo essa população considerada resistente ao temefós.

De acordo com Ferrari (1996), populações de insetos, ácaros e outros artrópodes podem, naturalmente, apresentar uma proporção de indivíduos que

tenham alelos que lhes confirmam resistência a um determinado produto químico. Cepas resistentes podem surgir como resultado do uso persistente de pesticidas que matam indivíduos com alelos suscetíveis e não matam aqueles que possuam alelos resistentes.

Para Ferrari (1996), a resistência a inseticidas pode ser pensada como um processo de evolução acelerada de uma população que responde a uma intensa pressão seletiva, com a conseqüente sobrevivência dos indivíduos que possuem alelos que conferem resistência. A resistência é pré-adaptativa, resultado de mutações fortuitas. Assim, um pequeno número de indivíduos possui características que permitem sua sobrevivência sob doses de inseticidas normalmente letais. O próprio inseticida não produz uma mudança genética; seu uso continuado, entretanto, pode selecionar indivíduos resistentes.

A caracterização da resistência foi feita com a F<sub>2</sub> das populações provenientes de Alagoa Nova D, Alagoa Grande B, Lagoa Seca C e Serra Redonda B. Essas populações foram submetidas a oito concentrações múltiplas de 1,76 mg/L a 8,8 mg/L (Figura 12).

Como observamos no gráfico abaixo, todas as populações tiveram um aumento na mortalidade à medida que se aumentava a concentração do temefós.

Na concentração 8,8 mg/L desse larvicida a mortalidade chegou a 100% nos quatro municípios testados. Para a linhagem Rockefeller a mortalidade observada foi de 100% em todas as dosagens testadas, validando os resultados das demais populações.

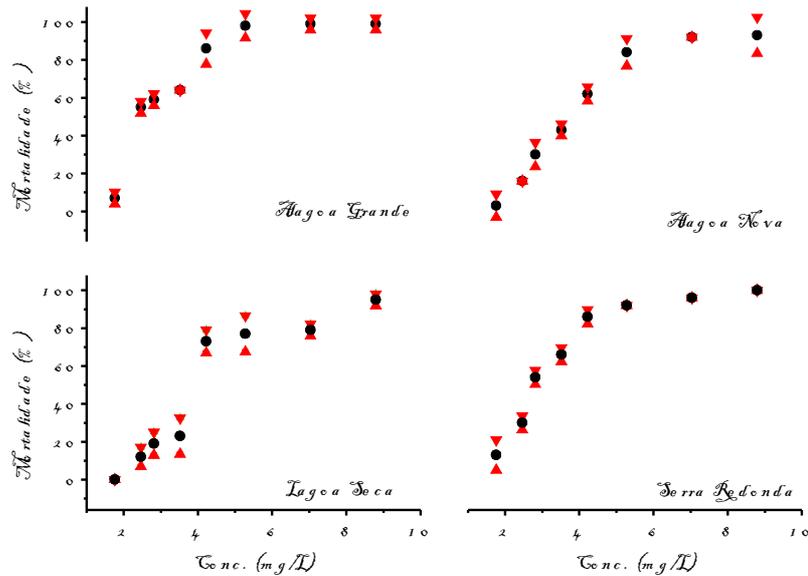


Figura 12: Toxicidade do temefós Abate<sup>□</sup> em quatro populações de *Aedes aegypti*.

As  $CL_{50s}$  para as populações estudadas foram superior a  $CL_{50}$  para a Rockefeller, sendo que nos municípios de Lagoa Seca e Alagoa Nova obtivemos os maiores valores, 4,114 e 3,813, respectivamente. Já a maior  $CL_{90}$  foi verificada no município de Alagoa Nova, aproximadamente trinta e oito vezes o valor da  $CL_{90}$  para a população susceptível (Tabela 2).

Tabela 2. Resposta de concentração-mortalidade das populações de *Aedes aegypti* com diferentes proporções de indivíduos suscetíveis e resistentes ao temefós (Abate<sup>□</sup>).

Populações	$CL_{50\%}$	IC 95%	$CL_{90\%}$	IC 95%	b ( $\square$ EP)	$\square^2$	G.L.	RR
Rockefeller	0,107	0,090-0,121	0,200	0,184-0,225	4,692 $\pm$ 0,581	12,56 0	22	---
Alagoa Nova	3,813	3,545-4,096	7,577	6,760-8,802	4,297 $\square$ 0,311	25,69 8	22	38,1
Alagoa Grande	2,668	2,501-2,826	4,248	3,921-4,738	6,345 $\square$ 0,548	21,66 2	19	26,6
Serra Redonda	2,866	2,697-3,030	4,984	4,611-5,499	5,331 $\square$ 0,407	7,815	22	28,6

<b>Lagoa Seca</b>	4,114	3,849-4,391	7,424	6,700-8,511	4,999 □ 0,334	$\frac{40,17}{2}$	26	41,1
-------------------	-------	-------------	-------	-------------	---------------	-------------------	----	------

Legenda: a. CL50: dosagem mortal a 50% da amostra, IC: intervalo de confiança; b. CL90: dosagem mortal a 90% da amostra, IC: intervalo de confiança; c. b (□EP): erro padrão; d.  $X^2$  = qui-quadrado; e. G. L.: grau de liberdade; f. RR: razão da resistência.

Todos os dados coletados na caracterização da resistência apresentaram homogeneidade de bioensaio com exceção de Lagoa Seca, onde o valor do qui-quadrado excedeu o valor da tabela de 95%, já para 98% ele se apresentou adequado.

De acordo com os critérios da OMS na interpretação do padrão de suscetibilidade, todas as populações estudadas apresentaram mortalidade inferior a 80%, sendo, portanto, consideradas resistentes.

Nas populações avaliadas, a razão da resistência (RR) foi superior a 20 (Tabela 2). Em 2007, Besera et al. já tinha observado um RR alto em populações provenientes de três localidades da Paraíba, são elas: Boqueirão, Sítio Piabas e Capim de Cheiro, apresentando uma razão de 11; 16,6 e 15,6 respectivamente.

O fato mais preocupante, segundo Mazzari et al. (1995), é a RR acima de 10, nível considerado comprometedora da ação do larvicida, causando prejuízos aos programas de controle do vetor. Para larvas que apresentam RR desta magnitude, o efeito residual do temefós em campo será menor, uma vez que há queda gradual da concentração disponível inicialmente nos depósitos tratados, contribuindo para o aumento no número de larvas sobreviventes com o passar do tempo. Esta situação acarreta a necessidade de maior número de aplicações de larvicidas em intervalos mais curtos, com o conseqüente aumento de custos nos programas de combate a dengue (LIMA et al., 2006).

Larvas de *Aedes* coletadas em São João de Meriti, Duque de Caxias e São Gonçalo quando submetidos ao temefós também mostraram um nível baixo de mortalidade. Esta última localidade apresentou o maior RR, 7,63 e as outras duas apresentaram níveis moderados de resistência, 3,0 e 5,15, respectivamente (LIMA et al., 2003). O mesmo foi verificado por Duque et al. (2004) e Duque

(2008) para populações de *A. aegypti* dos municípios de Curitiba, Foz do Iguaçu, Paranavaí, Maringá, Ibiporã, Cambé e Jacarezinho (PR).

Os altos padrões de resistência observados para as populações em estudo podem estar associados ao histórico de uso do produto em cada localidade, com diferentes intensidades e ou frequências de aplicações, submetendo-as a diferentes pressões de seleção, com conseqüente aumento dos graus de resistência para algumas, ou provavelmente, aos mecanismos de resistência desenvolvidos por cada população.

Foi realizada uma PCA com o conjunto de 16 amostras, formadas por oito concentrações múltiplas do temefós, para avaliar possíveis sobreposições entre as cidades. Essa análise mostrou que ao longo da PC1 há a formação de dois grupos: Lagoa Seca ficou próxima a Alagoa Nova e Serra Redonda ficou muito próximo a Alagoa Grande.

A figura 13 mostra o gráfico dos escores para a PC1 para todas as amostras.

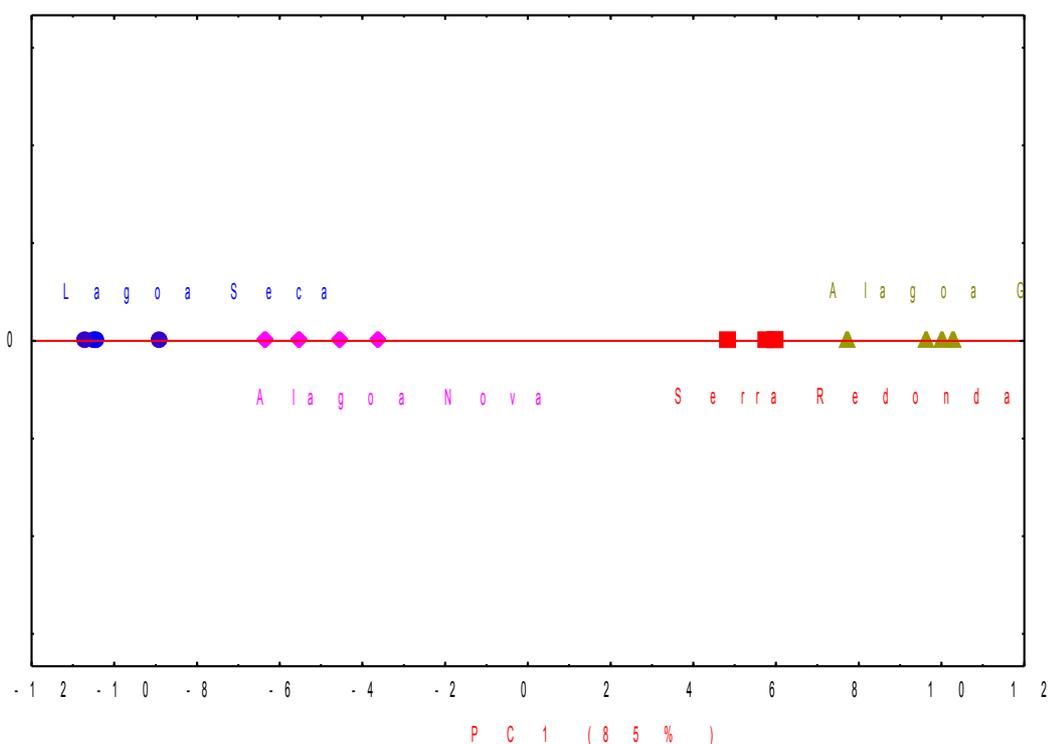


Figura 13: Gráfico dos escores para a PC1 para as oito concentrações testadas em quatro cidades da Paraíba.

Não houve diferenças significativas entre as populações de Serra Redonda e Alagoa Grande, já que 95% do intervalo de confiança da  $CL_{50}$  se sobrepõem. Provavelmente, por esse motivo essas cidades tenham ficado tão próximas ao longo da PC1. O mesmo ocorreu com Lagoa Seca e Alagoa Nova (Tabela 2).

Para a análise ao longo de PC1 e PC2 (Figura 14), houve a separação em quatro grupos, com 92% da variância explicada dos dados.

Para as duas PCs as populações analisadas ficam totalmente separadas uma das outras com relação aos dados da toxicidade do temefós. A PC2, com apenas 7% da variância dos dados, é responsável por essa separação, pois embora os intervalos se sobreponham, os valores reais das  $CL_{50}$  são diferentes.

Tal fato é corroborado quando se verifica que os coeficientes angulares não são os mesmos para as populações estudadas, significando que elas diferem quantitativamente e qualitativamente em relação à resistência ao temefós, ou seja, a intensidade e a qualidade das respostas dos indivíduos de cada população diferiram quanto à resistência ao produto.

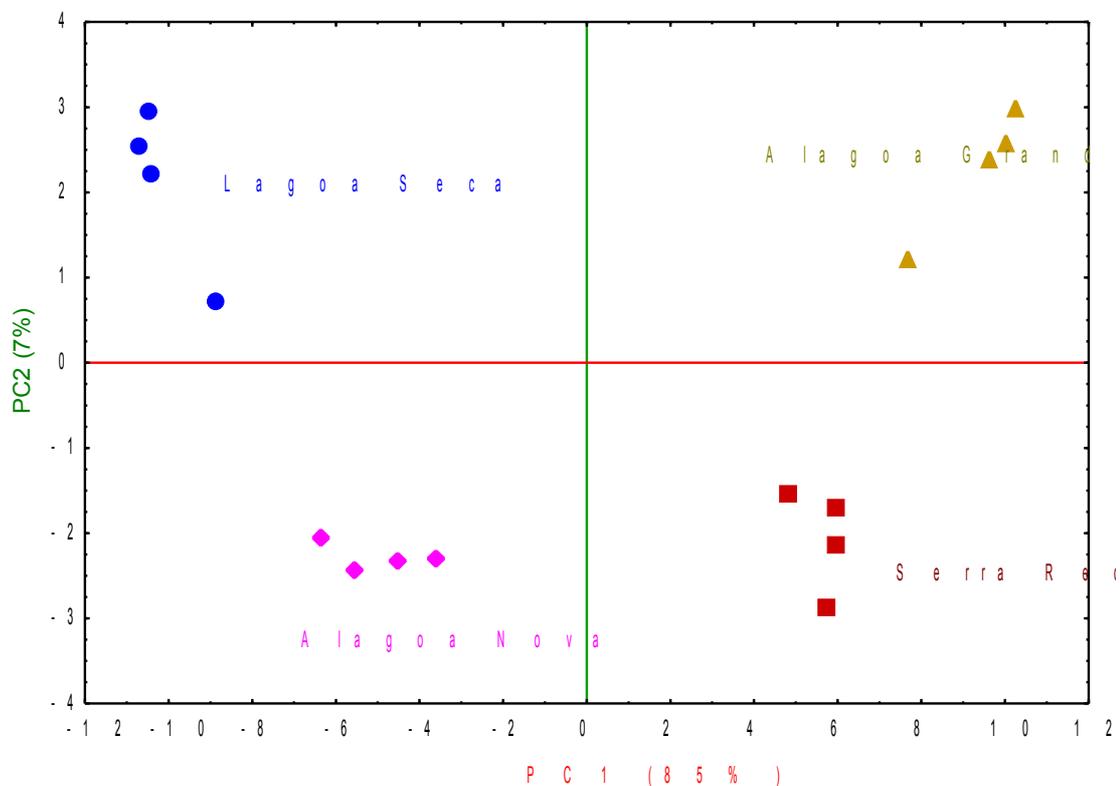


Figura 14: Gráfico dos escores para a PC1 *versus* PC2 para as oito concentrações testadas em quatro cidades da Paraíba.

Queiroga (2005) também observou uma variação na resposta de populações de *A. aegypti* provenientes de Brejo dos Santos, Lagoa do Mato e Itaporanga quando submetido a concentrações do inseticida temefós, onde foi possível observar diferenças significativas entre os coeficientes angulares destas populações, o que leva a inferir que estas populações possuem respostas diferentes ao larvicida.

Os diferentes graus de resistência detectados e as variações nas resistências observadas ao longo do tempo de estudo para as populações de *A. aegypti* da Paraíba mostram a necessidade de se manter um programa constante de monitoramento nas populações que são submetidas ao controle com o temefós. A percepção da mudança temporal da suscetibilidade a esse inseticida pode auxiliar no planejamento do manejo da resistência e das estratégias de controle a serem adotadas, de forma que as medidas de controle passem a atuar de forma efetiva contra o vetor.

### **5.3 Padrão eletroforético do gene de esterase**

O aumento na expressão do gene de esterase foi confirmado nos ensaios realizados em vinte populações provenientes da mesorregião do agreste paraibano. Apenas a população Rockefeller apresentou uma baixa atividade esterásica, como já era esperado, já que se trata de uma população suscetível.

O aumento dessa atividade já foi demonstrado em populações resistentes de *Myzus persicae*, em alguns mosquitos *Culex* e *Nilaparvata lugens* (VAUGHAN e HEMINGWAY, 1995; SMALL e HEMINGWAY, 2000). Maymo'o et al. (2002; 2006) também observou o aumento na atividade dos genes de esterase estudando populações de *Frankliniella occidentalis* provenientes do sudoeste da Espanha.

Os resultados possibilitaram a visualização de seis regiões de  $\alpha$  e  $\beta$ -esterase, denominadas EST-1 a EST-6. Os padrões isoenzimáticos observados em esterase são apresentados na Figura 15.

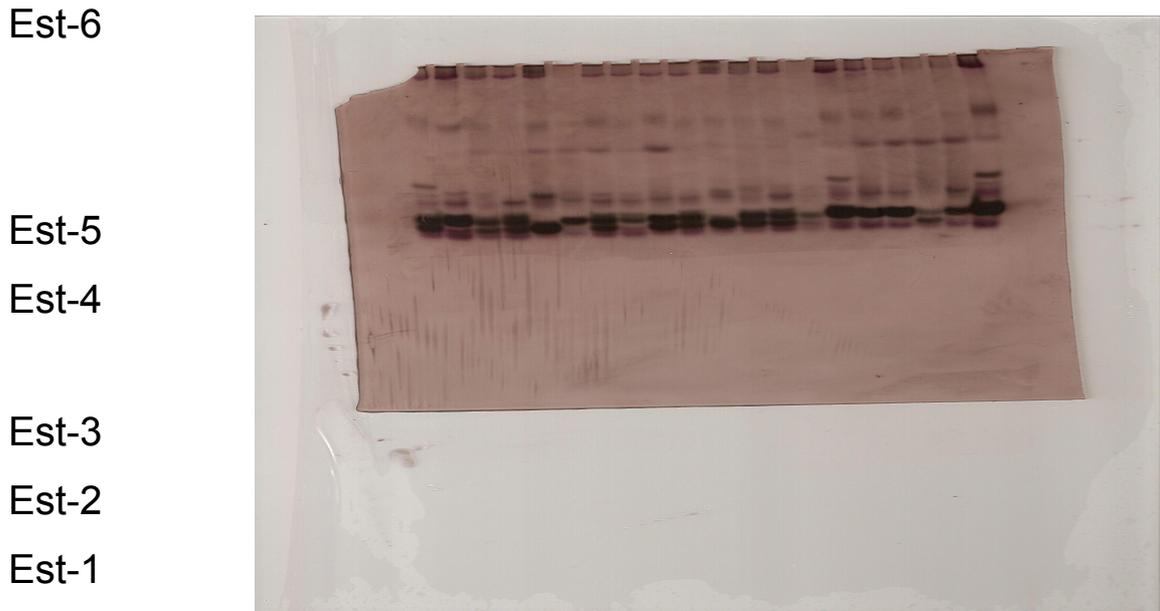


Figura 15: Frequências alélicas observadas em seis locos de esterases em populações naturais de *A. aegypti* coletados no município de Serra Redonda ponto D.

Dois locos apresentaram apenas um alelo (EST-3, EST-6), três locos apresentaram dois alelos (EST-1, EST-4, EST-5) e apenas um loco apresentou três alelos (EST-2), com predominância de três locos em 38% das populações, com intensidade forte, média e fraca observada em várias regiões do gel.

Na procura de esterases que estejam relacionadas com a condição de resistência ou suscetibilidade das populações analisadas, algumas esterases e algumas combinações de esterases poderiam estar envolvidas em um dos mecanismos de resistência, devendo ser submetidas a um estudo mais aprofundado, são: o loco EST-2, sozinha, pela sua presença em todas as populações resistentes, ou juntamente com EST-4, ocorrendo nas 17 das 21 populações avaliadas.

As populações caracterizadas como resistentes mostraram de duas a seis regiões de atividade esterásica, enquanto que na população suscetível (Rockefeller) foi visualizada apenas uma região de atividade (Figura 16). A confirmação de que esses padrões diferenciam insetos resistentes e suscetíveis foi obtida pelo teste de verificação da resistência, visto que todas as larvas

testadas sobreviveram à dose diagnóstica de 0,352 mg i.a./L, letal para a Rockefeller.

**Est-1**



Figura 16: Frequências alélicas observadas em um loco de esterase na população de *A. aegypti* suscetível (Rockefeller).

Padrões de esterase já foram utilizados com sucesso para a diferenciação genética de populações de insetos resistentes a inseticidas químicos (MAZZARI e GEORGHIOU, 1995; VAUGHN e FRENCH-CONSTANT, 1998; FLORES et al., 2005; MAYMÓ et al., 2006). Para populações de *A. aegypti* de São Paulo e Bahia foram possíveis revelar padrões de esterases capazes de diferenciar populações resistentes e suscetíveis (GUIRADO e BICUDO, 2008).

Paiva (2006) estudando populações de *A. aegypti* provenientes de nove localidades do Estado de Pernambuco verificou através da eletroforese um total de cinco regiões de  $\alpha$  e  $\beta$ -esterase para as populações resistentes. Na Rockefeller foi visualizada apenas uma região de atividade.

O padrão dos seis locos avaliados revelou a presença de 13 alelos (Est-1<sup>1</sup>, Est-2<sup>1</sup>, Est-2<sup>2</sup>, Est-2<sup>3</sup>, Est-3<sup>1</sup>, Est-3<sup>2</sup>, Est-4<sup>1</sup>, Est-4<sup>2</sup>, Est-5<sup>1</sup>, Est-5<sup>2</sup>, Est-5<sup>3</sup>, Est-6<sup>1</sup> e Est-6<sup>2</sup>), sendo que o alelo Est-2<sup>2</sup> foi o único presente em todas as populações analisadas, com frequências alélicas variando entre 0,083 e 1 (Tabela 3).

Tabela 3: Frequências alélicas observadas em seis locos de esterase em vinte e uma amostras populacionais de *Aedes aegypti*.

População/ Pontos de Coleta														
	Loco 1			Loco 2			Loco 3			Loco 4		Loco 5		
	Est- 1 <sup>1</sup>	Est- 2 <sup>1</sup>	Est- 2 <sup>2</sup>	Est- 2 <sup>3</sup>	Est- 3 <sup>1</sup>	Est- 3 <sup>2</sup>	Est- 4 <sup>1</sup>	Est- 4 <sup>2</sup>	Est- 5 <sup>1</sup>	Est- 5 <sup>2</sup>	Est- 5 <sup>3</sup>	Est- 6 <sup>1</sup>		
Alagoa Grande	A	1,000	0,000	1,000	0,00 0	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,00 0	0,53 3	0,46 7	0,00 0	0,000
	B	0,000	0,000	1,000	0,00 0	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,611	0,389
	C	0,000	0,000	1,000	0,00 0	1,00 0	0,000							
	D	1,000	0,000	1,000	0,00 0	0,76 5	0,23 5	0,02 9	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,54 5	0,455
Alagoa Nova	A	0,000	0,000	1,000	0,00 0	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,000
	B	0,000	0,000	1,000	0,00 0	1,00 0	0,000							
	C	0,000	0,000	0,889	0,111	0,00 0	1,00 0	0,000						
	D	1,000	0,000	1,000	0,00 0	1,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,00 0	0,86 8	0,13 2	0,00 0	0,000
Serra Redonda	A	0,000	0,514	0,100	0,38 6	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,68 2	0,318
	B	1,000	0,000	0,857	0,14 3	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,00 0	0,45 2	0,54 8	0,00 0	0,000
	C	0,000	0,431	0,486	0,08 3	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,00 0	0,10 6	0,89 4	0,00 0	0,000
	D	1,000	0,042	0,958	0,00 0	0,28 0	0,72 0	1,00 0	0,00 0	0,00 0	0,59 6	0,40 4	0,611	0,389
Campina Grande	A	0,000	0,000	0,639	0,36 1	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,09 4	0,57 8	0,32 8	0,00 0	0,000
	B	0,000	0,000	1,000	0,00 0	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,00 0	0,50 0	0,50 0	0,00 0	0,000
	C	0,000	0,917	0,083	0,00 0	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,40 0	0,16 7	0,43 3	0,00 0	0,000
Lagoa Seca	A	1,000	0,000	1,000	0,00 0	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,000
	C	0,000	0,000	1,000	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,16 7	0,83 3	0,00 0	0,24 3	0,75 7	0,00 0	0,000
	D	1,000	0,000	1,000	0,00 0	0,04 4	0,95 6	1,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,000
Esperança	A	0,000	0,000	1,000	0,00 0	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,00 0	0,15 2	0,84 8	0,00 0	0,000
	C	0,000	0,194	0,806	0,00 0	0,00 0	0,00 0	1,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,000
ROCK		0,000	0,000	1,000	0,00 0	0,00 0	0,000							

A grande maioria dos estudos de isoenzimas, que utilizam as esterases como marcadores não-neutros, evidencia apenas a expressão e o padrão dessas enzimas nos géis (FIELD; HITCHEN; REES, 1984; SOUZA-POLEZZI; BICUDO, 2005). Por outro lado, a análise das isoenzimas esterásicas pode fornecer outros dados importantes a respeito das populações estudadas. Os índices de diversidade genética: proporção de locos polimórficos (P) e heterozigosidade média revelaram diferenças e similaridades entre populações de uma mesma espécie (Tabela 4).

Tabela 4: Resumo da variação genética observada nas amostras populacionais de *Aedes aegypti*.

Populações	Total de locos	Intensidade dos locos			Proporção de locos Polimórficos	
		Fraca	Média	Forte		
<b>AGA</b>	4		1	3	16,67%	0,1244
<b>AGB</b>	4		2	2	16,67%	0,1188
<b>AGC</b>	2		1	1	0,00%	0,0000
<b>AGD</b>	6		3	3	50,00%	0,1521
<b>ANA</b>	3	1		2	0,00%	0,0000
<b>ANB</b>	2		1	1	0,00%	0,0000
<b>ANC</b>	2	1		1	16,67%	0,0988
<b>AND</b>	5	2	2	1	16,67%	0,0459
<b>SRA</b>	3	1		2	33,33%	0,3369
<b>SRB</b>	4	2		2	33,33%	0,1841
<b>SRC</b>	3	1	1	1	33,33%	0,2537
<b>SRD</b>	6		1	5	66,67%	0,2400
<b>CGA</b>	3	1		2	33,33%	0,3369
<b>CGB</b>	3		2	1	16,67%	0,1667
<b>CGC</b>	3	1	2		33,33%	0,2591
<b>LSA</b>	4	1	1	2	0,00%	0,0000
<b>LSC</b>	3		1	2	33,33%	0,2152
<b>LSD</b>	5	1	3	1	16,67%	0,0169
<b>ESPA</b>	3	1	2		16,67%	0,0857
<b>ESPC</b>	2	1	1		16,67%	0,1566
<b>ROCK</b>	1		1		0,00%	0,0000

A maior variabilidade genética foi observada para as amostras de *A. aegypti* do ponto D dos municípios de Serra Redonda e Alagoa Grande, pois correspondem às localidades com maior proporção de locos polimórficos, 66,67% e 50% respectivamente.

Já a heterozigosidade média foi maior no ponto A de Serra Redonda e Campina Grande, 0,3369. Yan et al. (1998) usando marcadores RFLP verificou em populações de *A. aegypti* expostas ao DDT uma heterozigosidade média de 0,604, valor bem acima dos encontrados nessa pesquisa. Entretanto, este aumento já era esperado, visto que o marcador RFLP analisa o genoma inteiro.

Os padrões dos locos de esterase detectados na população de Alagoa Grande ponto C, Alagoa Nova pontos A e B, Lagoa Seca ponto A e a Rock revelaram monomorfismo em todos os locos. A maior parte das populações estudadas apresentou 16,67% de locos polimórficos.

Yan et al. (1998) afirmam que a seleção por inseticidas químicos diminui a diversidade genética da população naqueles locos que conferem resistência. Essa afirmação está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, visto que as populações com maior variabilidade genética foram as que apresentaram menor resistência ao temefós, como: Serra Redonda e Alagoa Grande. Provavelmente, essas cidades sofrem menos pressão de seleção provenientes de inseticidas. Com exceção de Lagoa Seca podemos perceber que quanto maior o número de locos, maior a resistência (Tabela 5).

Tabela 5: Quantidade de locos e a razão da resistência das populações de *Aedes aegypti* que foram submetidas aos testes de caracterização da resistência.

<b>Populações</b>	<b>Número de locus</b>	<b>RR</b>
<b>Lagoa Seca Ponto C</b>	3	41,1
<b>Alagoa Nova Ponto D</b>	5	38,1
<b>Serra Redonda Ponto B</b>	4	28,6
<b>Alagoa Grande Ponto B</b>	4	26,6

Legenda: RR: razão da resistência.

Essa alta resistência apresentada pela população de Lagoa Seca, apesar de ter apenas três locos, pode ser explicada porque a análise dos géis de isoenzimas revelou a expressão do alelo Est-4<sup>2</sup> presente apenas nessa população, o que poderia ter propiciado uma maior atividade enzimática nesse loco. A identificação de um alelo responsável pela resistência foi também relatada por Rodriguez et al. (2002) em amostras de *A. aegypti* resistentes ao temefós.

Lo'pez-Soler et al. (2008) em seus estudos sobre a avaliação do gene de esterase na resistência de *Frankliniella occidentalis* através da eletroforese em gel de poliacrilamida relatou a presença de um padrão de bandas característico que mostrou uma forte correlação com a atividade esterase total e o grau de

resistência. Estes resultados são consistentes com a hipótese de que a seleção de inseticidas pode aumentar a frequência de algumas esterases, que normalmente exibem menor frequência nas populações suscetíveis (PARKER e CALLAGHAN, 1997).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para todas as populações separadamente para saber se as frequências gênicas e genótípicas permanecem constantes de geração para geração. Apesar do equilíbrio de Hardy-Weinberg esta baseada em um modelo teórico, ela descreve suficiente bem o que ocorre com grande número nas populações reais, pelo menos em um determinado espaço de tempo.

Nesse estudo, podemos perceber que dez, das vinte e sete populações, não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, isto é, elas estão sofrendo algum tipo de variação na sua composição genética. A(s) causa(s) desse desvio podem ser atribuídas a vários fatores, dentre eles podemos citar a presença de migração, mutação, deriva genética ou seleção devido o uso inadequado de inseticidas.

Os valores de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variaram de 0 a 36 (Tabela 6).

Tabela 6: Estimativa de diversidade genética em populações de *Aedes aegypti* coletadas na mesorregião do agreste paraibano.

Populações	N	Loco	A	$H_o$	$H_e$	$\chi^2$	GL	Probabilidade
ANC	36	2	22	28	28,444	0,563	1	ns
			23	8	7,111			
			33	0	0,444			
AND	34	5	22	25	25,596	0,791	1	ns
			23	9	7,809			
			33	0	0,596			
AGA	30	5	22	2	8,533	22,969	1	P < 0,001
			23	28	14,933			
			33	0	6,533			
AGB	27	6	11	8	10,083	2,846	1	ns
			12	17	12,833			
			22	2	4,083			
AGD	34	3	11	20	19,882	0,013	1	ns
			12	12	12,235			
			22	2	1,882			
		4	11	1	0,029	34,000	1	P < 0,001

			12	0	1,941			
			22	33	32,029			
		6	11	3	9,818	22,917	1	P < 0,001
			12	30	16,364			
			22	0	6,818			
<b>LSC</b>	36	4	11	6	1,000	36,000	1	P < 0,001
			12	0	10,000			
			22	30	25,000			
		5	22	0	2,064	3,601	1	ns
			23	17	12,871			
			33	18	20,064			
<b>LSD</b>	34	3	11	0	0,066	0,072	1	ns
			12	3	2,868			
			22	31	31,066			
<b>SRA</b>	35	2	11	9	9,257	4,285	3	ns
			12	2	3,600			
			22	0	0,350			
			13	16	13,886			
			23	5	2,700			
			33	3	5,207			
		6	11	13	15,341	3,528	1	ns
			12	19	14,318			
			22	1	3,341			
<b>SRB</b>	36	2	22	25	25,714	0,972	1	ns
			23	10	8,571			
			33	0	0,714			
		5	22	4	6,323	2,837	1	ns
			23	20	15,355			
			33	7	9,323			
<b>SRC</b>	36	2	11	0	6,674	20,760	3	P < 0,001
			12	26	15,069			
			22	4	8,507			
			13	5	2,583			
			23	1	2,917			
			33	0	0,250			
<b>SRC</b>	36	5	22	0	0,371	0,465	1	ns
			23	7	6,258			
			33	26	26,371			
<b>SRD</b>	35	2	11	1	0,063	15,312	1	P < 0,001
			12	1	2,875			
			22	34	33,063			
		3	11	0	1,960	3,781	1	ns
			12	14	10,080			
			22	11	12,960			
		5	22	7	9,240	3,331	1	ns
			23	17	12,519			
			33	2	4,240			
		6	11	9	13,444	9,715	1	P < 0,01
			12	26	17,111			
			22	1	5,444			
<b>CGA</b>	36	2	22	10	14,694	11,505	1	P < 0,001
			23	26	16,611			
			33	0	4,694			
	36	5	11	0	0,281	4,951	3	ns
			12	6	3,469			
			22	10	10,695			
			13	0	1,969			
			23	11	12,141			
			33	5	3,445			





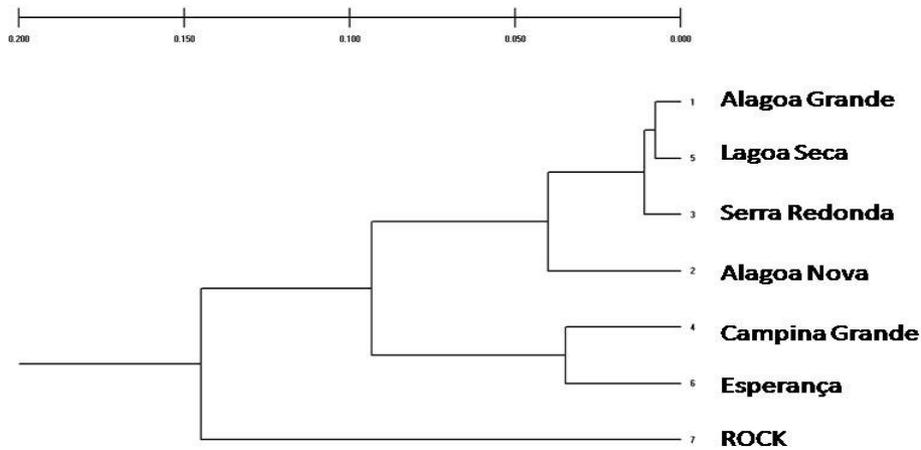


Figura 17: Dendrograma revelando a análise de agrupamento entre populações de *A. aegypti* provenientes da Paraíba, baseado na presença e ausência de locos de esterases, pelo método UPGMA.

No dendrograma pode-se observar cinco grupos distintos. A população de Alagoa Grande e Lagoa Seca são as únicas que possuem um ponto de coleta em que todos os locos foram monomórficos. A porcentagem de locos polimórficos também foi semelhante, 20% e 16%, respectivamente.

A população de Serra Redonda ficou isolada por ter a maior quantidade de locos polimórficos, 41%. Sua proximidade com o grupo das populações 1 e 5, deve-se ao fato de que as populações de Serra Redonda e Alagoa Grande serem as únicas que possuem em um ponto de coleta, seis locos: Est-1, Est-2, Est-3, Est-4, Est-5, Est-6.

Alagoa Nova formou um terceiro grupo e é a única que possui dois locos monomórficos. Já as populações de Campina Grande e Esperança respectivamente, são semelhantes devido à presença da mesma sequência dos locos Est-2, Est-4 e Est-5. Apenas Esperança ponto C não possui esse último loco. A população Rockefeller formou então o último grupo, e é a única população susceptível, possuindo um único loco monomórfico.

Os resultados encontrados neste trabalho indicaram que quanto maior a quantidade de locos maior é a resistência, com exceção de Lagoa Seca ponto C, na qual a presença de um alelo pode ter conferido uma maior resistência. Isso porque quanto maior a quantidade de esterase maior a chance do mosquito metabolizar o temefós. Estes resultados precisam de maiores comprovações, além de um estudo mais detalhado do gene de esterase.

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

## 6 CONCLUSÃO

Há um alto índice de distribuição na atividade do *Aedes aegypti* dentro dos seis municípios estudados.

As populações estudadas são resistentes ao organofosforado temefós em grau técnico e o temefós Abate<sup>□</sup>.

Todas as populações submetidas à caracterização da resistência apresentaram uma razão de resistência (RR) maior que 20, sendo, portanto, consideradas altamente resistentes.

As populações estudadas diferem quantitativamente e qualitativamente em relação à resistência ao temefós.

As esterases podem estar envolvidas em um dos mecanismos de resistência ao temefós em populações naturais de *A. aegypti* provenientes da Paraíba.

A técnica de isoenzimas em gel de poliacrilamida pode ser utilizada para detectar diferentes freqüências dos alelos de esterase em *A. aegypti*.

## 7 REFERÊNCIAS

Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba - AESA.  
Disponível: <http://www.aesa.pb.gov.br/geoprocessamento/geoportal/cad.html>.

Acesso em: janeiro 2010.

ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 242 p.

ANDRADE, C. F. S; SANTOS, L.R. Resistência dos Piolhos aos Inseticidas Químicos - Mecanismo, Detecção, Monitoramento e Manejo. **UNICAMP**, Campinas, 1999.

AUGUSTIN, E. et al. Identificação de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) através de isoenzimas. **Rev. Bras. de Agrociência**, v.5 n.2, 217-220 set-dez, 1999.

AYALA, F.J. The mechanisms of evolution. In: **EVOLUTION**. San Francisco, Scientific American, 1978. p.14-27.

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

BARBOSA DA SILVA J. Jr. et al. Dengue in Brazil: current situation and control activities. **Epidemiological Bulletin**. 2002; 23 (1):3-6.

BARCELLOS, C. et al. Identificação de locais com potencial de transmissão de dengue em Porto Alegre através de técnicas de geoprocessamento. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2005; 38(3):246-250.

BARRERA, R. et al. Stratification of a hyperendemic city in hemorrhagic dengue. **Rev Panam Salud Publica**. Oct 2000; 8 (4):225-33.

BARRETO, F. R. et al. Spread pattern of the first dengue epidemics in the City of Salvador, Brazil. **BMC Public Health**, n. 51, v. 8, p. 1-24, 2008.

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

BECKEL, H.; LORINI, I. **Detecção da resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae), praga de grãos de cevada armazenada, a inseticidas químicos**. 2002, disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br>. Acesso em: abril 2009.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics A Practical Guide**. New York: John Wiley e Sons, 1998.

BENTING, J. et al. Molecular diagnosis of resistance. **Pflanzenschutz Nachr Bayer**. 57:78–86 (2004).

BESERRA, E. B. et al. Resistência de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. **Neotropical Entomology**, v, 36, n. 2. p. 303- 307, 2007.

BRAGA, I. A. et al. Comparativ estudy between larval survey sand ovitraps to monitor populations of *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2000; 33(4): 347-353.

BRAGA, I. A. et al. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **99**: 199-203, 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismo de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16, n.4. 2007.

**BRASIL**. Ministério da Saúde. Programa de Combate à Dengue. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>. Acesso em: outubro 2010.

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

CAMO S.A. Manual do Usuário, *The Unscrambler 9.7*. Noruega, 1998.

CAMPANHOLA, C. **Resistência de Insetos a Inseticidas: Importância, características e Manejo**. Documento, 11 EMBRAPA-CNPDA, p.5-45, 1990.

CAMPOS, J.; ANDRADE, C. F. S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 3, p. 232- 236, 2001.

CAMPOS, J. F. e OMOTO, C. Estabilidade da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) a Hexythiazox em Pomares de citros. **Neotropical Entomology**, v, 35, n. 6. p. 840- 848, 2006.

CARVALHO, M. S. L. et al. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* ao inseticida Temephós no Distrito Federal, em 2000. **Inf. Epid. SUS** 10: 41-43, 2001.

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

CONNOR, M. E.; MONROE, W. M.; *Stegomyia* indices and their value in yellow fever control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 1923; 3:9-19.

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

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

CRUZ, P. **Manejo da Resistência de Insetos-Praga a Inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith)**. Embrapa Milho e Sorgo, 2002. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/Acesso> em: abril de 2009.

DAVID, J-P. et al., The *Anopheles gambiae* detoxification ship: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. **Proc Natl Acad Sci USA**. 102:4080–4084 (2005).

DENHOLM, I.; ROLLAND, M. W. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. **Ann. Rev. Entomol.** 37: 92-112, 1992.

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

DINIZ, L. S. C. M. M. **Custo adaptativo associado à resistência de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós**. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, 2008. (Monografia).

DOBZANSKY, T. The genetic structure of populations. **Evolution**. San Francisco, Scientific American, p.20-56. 1977.

DUQUE, J.E.L. et al. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas Temephos e Cipermetrina, Brasil. **Revista de Saúde Pública** **38**: 842-843, 2004.

DUQUE, J.E.L. **Descrição e análise de fatores epidemiológicos, vetoriais e do controle da dengue no Estado do Paraná, Brasil**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 150p, 2008.

FARALDO, M.I.F. et al. Marcadores moleculares em mandioca. **Agricultura Tuberosas Amiláceas Latino Americano**, v.2, p.101-117, 2003.

FAY, R.W.; PERRY, A.S.; Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. **Mosquito News**. 25: 270-281. 1965.

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

FERREIRA, M. M. C. et al., Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, 22: 724, 1999.

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

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

FLORES, A. E.; BADI, M. H; PONCE, G. **Resistência a inseticidas em insetos vetores de enfermidades com ênfase em mosquitos**. Nuevo Leon, México: Universidade Autônoma de Nuevo Leon, 2001.

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

FOCKS, D.A. **A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors** [monografia Internet] 2000. Disponível em: [www.ID-Analysis.com](http://www.ID-Analysis.com). Acesso em: abril, 2009.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Edusp, 2002. 860p.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Reunião técnica para discutir *status* de resistência de *Aedes aegypti* e definir estratégias a serem implantadas para monitoramento da resistência no Brasil. Brasília: Funasa; 1999.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Dengue, Instruções para o Pessoal de Controle ao Vetor: **Manual de Normas Técnicas**, 3ª. Ed. Brasília. Ministério da Saúde. F.N.S, 84pgs, 2001.

FURIATTI, R. S.; LAZZARI, S. M. N. Relação entre a atividade de esterases e a resistência de *Myzus persicae* (Sulz.) (Sternorrhyncha: Aphididae) a pirimicarbe. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 4, 2003.

GEORGHIOU, G. P. Management of resistance in arthropods. In: Georghiou, G. P. & Saito, T. [eds.], **Pest resistance to pesticides**. Plenum, New York, 1983, p. 769-792.

GOMES, A.C. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus*. **Informe Epidemiológico do SUS** 1998; 7(3): 4957.

GOTTLIEB, L.D. Gel eletroforesis: new approach to the study of evolution. **Bioscience**, 21: 939-44, 1971.

GRAVENA, S. **Rotação de Acaricidas no MIP- Citros: Menos desequilíbrio e Resistência**, 1994, Artigo Técnico. Laranja, Cordeirópolis, 15 (2): 375-395.

GRUBER, J. D.; COLLIGAN, P. B.; WOLFORD, J.K.; Estimation of single nucleotide polymorphism allele frequency in DNA pools by using pyrosequencing. **Human Genet** 110:395–401 (2002).

GUIRADO, M. M.; BICUDO, H. E. M. C; **Padrão de esterases em populações do mosquito *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), resistentes e suscetíveis a inseticidas utilizados no controle**, In: 54º Congresso Brasileiro de Genética. 2008. Salvador, BA, Brasil. Resumo.

HAMRICK, J.L. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. ***In Genetics and conservation*** (C.M. Schone-Wald-Cox, S.H. Chambers, B. MacByde & L. Thomas, eds.). Benjamin Cummings Publishing Company, Menlo Park, p.335-348.

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

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

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

HUBBY, J.L.; LEWOBIN, R.C. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. **Genetics**, 54: 577-94, 1966.

KLASS, M. Applications and impact of molecular markers on evolutionary and diversity studies in *Allium*. **Plant Breeding**, v.117, p.297-308, 1998.

KOBAYASHI, M.; NIHEI, N.; KURIHARA, T. Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system. **J Med Entomol**, Jan; 39(1): 4-11. 2002.

KUNO, G. Review of the factors modulating dengue transmission. **Epidemiologic Review**. 17: 321-335, 1995.

LEFEVRE, A. M. C et al. Representações sobre dengue, eu vetor e ações de controle por moradores do Município de São Sebastião, Litoral Norte do Estado de São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 23 (7): 1696-1706, 2007.

LEITE, M. E.; FONSECA, D. S. R.; BRAZ, C. K. R. Uso do SIG na análise da dengue: aplicação na microrregião de Montes Claros/Bocaiúva (MG). *Hygeia. Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*, 3 (6): 126-141. 1998.

LIMA, J. B. P.; DA-CUNHA, M. P.; DA SILVA JR., R. C. et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 68, n. 3, p. 329-333. 2003.

LIMA, E. P. et al. Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em Municípios do Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39(3): 259-263, mai-jun, 2006.

LOPES, C.R. **Estudos sobre as relações filogenéticas entre algumas espécies de Coffea**. Botucatu, 1984. 169p (Tese-Professor-UNESP).

L'OPEZ-SOLER, N. et al. Esterase isoenzymes and insecticide resistance in *Frankliniella occidentalis* populations from the south-east region of Spain. **Pest Manag Sci**. 64:1258–1266, 2008.

LUNA, J. E. D.; et al. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Pública**, v. 38, n. 6, 2004.

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

MARCORIS, M. L. et al. Alteration in susceptibility response of *Aedes aegypti* to organophosphates in cities in the state of S. Paulo, Brazil. **Journal of Public Health**, 33 (5), 1999.

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

MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**. 1ªed. São Paulo, Atheneu, 2001. 435pp.

MARKET, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of Natural Academy of Sciences**, 45: 753-63, 1959.

MARQUES, C.C. et al. Comparative study of the efficiency of larval and ovitraps for the surveillance of dengue and yellow fever vectors. **Revista de Saúde Pública**, 27(4):237-241. 1993.

MASSART, D. L. et al., **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A**. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1997.

MAYM'O, A. C. et al. Evaluation of metabolic detoxifying enzyme activities and insecticide resistance in *Frankliniella occidentalis*. **Pest Manag Sci**. 58:928–934, 2002.

MAYM'O, A. C. et al. Relationship between esterase activity and acrinathrin and methiocarb resistance in field populations of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. **Pest Manag Sci.** 62:1129–1137, 2006.

MAZZARI, M. B. GEORGHIU, G. P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field population of *Aedes aegypti* from Venezuela. **Jornal American Mosquito Control Association**, 11: 315-322, 1995.

MEDINA FILHO, H.P. Eletroforese em gel de amedo: aplicações em genética e melhoramento de plantas. **Circular. IAC**, Campinas (121): 1-15, 1983.

MILLER, M. P. Tools for populations genetic analyses (TFPGA) 1.3. A windows program for analysis of allozyme and molecular populations genetic data. Computer software distributed by authors. 1997.

MITCHELL-OLDS, T. The Molecular basis of quantitative genetic variation in natural populations. **Tree**, v. 10, n. 8, p. 324-328, 1995.

MOORE, C.G. Predicting *Aedes aegypti* abundance from climatological data. In: Lounibos LP, Rey JR, Frank JH, editors. Ecology of mosquitoes. Vero Beach (FL): **Florida Medical Entomology Laboratory**; p. 223-33. 1985.

MORRISON, A. C. et al. Exploratory space-time analysis of reported dengue. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 3, pp. 287–298. 1998.

NAJAR, A. L.; MARQUES, E. C. (ORG.). **Saúde e espaço: estudos metodológicos e técnicas de análise**. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1988.

NAUEN, R. Perspective Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. **Pest Management Science**. 63:628–633, 2007.

NELSON, M. The significance of indicators and indices. CTD/FIL (DEN)/IC/95 WP.3.4.1, 1995.

OLIVEIRA, R. M.; VALLA V.V. As condições e as experiências de vida de grupos populares no Rio de Janeiro: repensando a mobilização popular no controle do dengue. **Cad. Saúde Pública**. 17: 77-88. 2001.

OOSTERHOUT, C. V.; HEUVEN, M. K. V.; BRAKEFIELD, P. M. On the neutrality of molecular genetic markers: pedigree analysis of genetic variations in fragmented populations. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1025- 1034, 2004.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE LA SALUD. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para supervisión y control. Washington, DC: OPS; 1995.

PAIVA, M. H. S. **Monitoramento do gene, que codifica a esterase, envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil**. Fundação Oswaldo Cruz/ Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, PE, 2006. (Tese de mestrado).

PARKER, P.; CALLAGHAN, A. Esterase activity and allele frequency in field populations of *Simulium equinum* (L.) (Diptera: Simuliidae) exposed to organophosphate pollution. **Environ Toxicol Chem**. 16:2550–2555 (1997).

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlex 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. The Australian National University, Canberra, Australia. 2005.

PEDIGO, LARRY. P. **Entomology and pest management**, 1989.

PIRES, C.L. da S. **Estudo do polimorfismo enzimático em esterases de *Eucalyptus grandis***. Campinas, 1983.138p. (Tese-Mestrado-UNICAMP).

QUEIROGA, M. F. C. **Resistência ao Temefós de populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Díptera: Culicidae) Provenientes de quatro Regiões Bioclimáticas da Paraíba**. Campina Grande. 2005

RAWLINS S. C.; WAN, J. O. H. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. **Journal of the American Mosquito Control Association** 11:59-65, 1995.

RETNAKARAN, A.; KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, **Insect Growth Regulator**. v.12, Pergamon Press, p. 529-601, 1985.

RODRIGUES, M. M. et al. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical** 51:83-88, 1999.

RODRIGUES, M. M. et al. Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) from Cuba and Venezuela. **Journal of Medical Entomology**. 38:623-628, 2001.

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

SABATINI, G. Técnicas Moleculares no Diagnóstico da Resistência. **Palestra**, v. 65, n. 1, 2003.

SANTOS, A.; MARÇAL JUNIOR, O. Geografia do Dengue em Uberlândia (MG) na Epidemia de 1991. **Caminhos de Geografia**, v. 3, n. 11, p. 35-52, 2004.

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

SCOTT, J. A. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. **Florida Entomologist**, v.78, n.3, 1995.

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M. Herança genética e desequilíbrio de ligação em locos de isoenzimas de *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**. São Paulo, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2004.

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

SOSA-GOMEZ, D. R.; CORSO, I. C.; MORALES, L. Insecticide resistance to endosulfan, monocro to phos and metamidophos in the Neotropical brownstink bug, *Euchistus heros* (F.) **Neotropical Entomology**. V. 30, n. 2, p. 317-320, 2001.

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

SOUZA-SANTOS, R.; CARVALHO, M. S. Análise da distribuição espacial de larvas de *Aedes aegypti* na Ilha do Governador, Rio e Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**. 16(1): 31-42. 2000.

SU, M. D.; CHANG, N. T. Framework for application of geographic information system to the monitoring of deng vectors. **Gaoxiong Yi Xue Za Zhi**, dec 1994; 10 Suppl: S94-101.

TABACHNICK, W. J.; POWELL, J. R. A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Genetic Researcher**, v. 34, p. 215-229, 1979.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39(3): 275-277, mai-jun, 2006.

TAYLOR, P. et al. Anticholinesterase agents. **The pharmacological basis of therapeutics**. 6 th edition, Macmillan, New York, p. 100-119, 1980.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M.C.N.; BARRETO, L.M.; BARRETO, F.R. Epidemiologia da dengue em Salvador - Bahia, 1995- 1999. **Rev Soc Bras Med Trop**. 34:269-74. 2001.

TEMMINCK, C.; SCHLEGEL, N. Description des oiseaux observés au Japon par les voyageurs Hollandais. **Aves**: [s.n.], 1849. 142p.

VAUGH, A.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Biochemical monitoring of

organophosphorous and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. **Med. Vet. Entomol.**, v. 12, p. 318-32, 1998.

VAUGHAN, A.; HEMINGWAY, J. Mosquito carboxylesterase Est $\alpha$ 21 (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **J Biol Chem.** 270:17044–17049, 1995.

VONTAS, J.; et al. Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. **Insect Mol Biol** 14: 509–516 (2005).

WAGNER, R.R.; SELANDER, R.K. Isozymes in insects and their significance. **Annual review of entomology**, 19: 117-38, 1974.

WIRTH, M. C.; GEORGIU G. P. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti*, from Tortola, British Virgin Islands. **Journal of the American Mosquito Control Association** 15:315-320, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva; 1981. WHO/VBC/81.807.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides: Communicable disease control, prevention and eradication. Who pesticide evaluation scheme. Geneva. 2005.

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

