

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE *Aedes aegypti* L. (Diptera:
Culicidae) A INSETICIDAS

MARIA DE LOURDES DA GRAÇA MACORIS

BOTUCATU – SP
Ano 2011

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE *Aedes aegypti* L. (Diptera:
Culicidae) A INSETICIDAS**

MARIA DE LOURDES DA GRAÇA MACORIS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração: Biologia de
Parasitas e Microorganismos)

ORIENTADOR: PAULO EDUARDO MARTINS RIBOLLA

**BOTUCATU – SP
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Macoris, Maria de Lourdes da Graça.

Mecanismos de resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas / Maria de Lourdes da Graça Macoris. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Capes: 21303002

1. *Aedes aegypti* - Resistência a inseticidas. 2. Praga - Controle - Medidas de segurança. 3. Dengue.

Palavras-chave: Controle de vetor; Dengue; Resistência a inseticidas;

Dedico este trabalho a todos que acreditam e trabalham pela saúde pública.

Agradecimentos

A quem me moldou "Severamente";

À minha mãe, pelo apoio sempre presente e incondicional torcida;

A meus irmãos: Assis, Delphim e Maria Teresa,

cujas sabedorias sempre me guiaram;

A todos os colegas do Núcleo de Pesquisa da Sucen de Marília, cuja dedicação e qualidade do trabalho tornaram este estudo possível;

A Maria Teresa M. Andrighetti que, com seu apoio irrestrito à pesquisa científica aplicada, viabilizou o desenvolvimento do Núcleo de Pesquisa da Sucen de Marília que, sob sua orientação, realiza um trabalho que possibilita aumentar constantemente a eficiência na prevenção e no controle de vetores nas mais diversas regiões do país, beneficiando comunidades inteiras e seus recursos naturais;

Aos meus amigos, pelo estímulo;

Ao Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla, pela orientação.

SALVE SALVADOR!

Prefácio

O resultado deste estudo está organizado em três capítulos.

No primeiro capítulo descreve-se o histórico das avaliações de susceptibilidade das populações de *Aedes aegypti* do estado de São Paulo e os dados de avaliações de efetividade do controle químico realizado em condições de campo.

No segundo capítulo está descrito um estudo para avaliação de atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de inseticidas como instrumento de avaliação do mecanismo de resistência de larvas a temephos.

No terceiro capítulo constam os dados de análise de vínculo genético entre as populações que são consideradas sentinelas para o monitoramento da susceptibilidade a inseticidas.

Lista de ilustrações

Capítulo 1 – Gráficos

| | |
|---|----|
| Gráfico 1. Incidência acumulada de Dengue no período de 1996 a 2008, segundo município ou região. | 17 |
| Gráfico 2. Percentual médio de mortalidade de populações de <i>Aedes aegypti</i> , segundo nível de resistência, expresso como R.R. ₉₅ | 21 |
| Gráfico 3. Percentual médio de mortalidade de populações de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao tratamento com larvicida temephos, segundo origem e ano de avaliação..... | 22 |
| Gráfico 4. Percentual médio de mortalidade observado em populações de <i>Aedes aegypti</i> expostas em gaiolas sentinelas ao tratamento com cipermetrina (dose 0,6 g i.a./ímovel). Provas realizadas em 2000/2001. | 29 |
| Gráfico 5. Percentual médio de mortalidade em populações de <i>Aedes aegypti</i> em tratamento espacial com permetrina. Testes realizados em 2002..... | 30 |
| Gráfico 6. Percentual médio de mortalidade de populações de <i>Aedes aegypti</i> expostas em gaiolas sentinelas ao tratamento com malathion (2002/2003)..... | 31 |
| Gráfico 7. Percentual médio de mortalidade de populações de <i>Aedes aegypti</i> expostas superfícies tratadas com piretróides, carbamato e organofosforado (2002/2003)..... | 32 |
| Gráfico 8. Percentual médio de mortalidade de populações de <i>Aedes aegypti</i> expostas superfícies tratadas com inseticidas fenitrothion e pyrimiphosmetyl. (2002/2003)..... | 33 |
| Gráfico 9. Percentual médio de mortalidade de populações de <i>Aedes aegypti</i> expostas a tratamento UBV com deltametrina. Provas com gaiolas sentinelas realizadas em 2007..... | 34 |
| Gráfico 10. Percentual médio de mortalidade de populações de <i>Aedes aegypti</i> expostas ao tratamento UBV com malathion. Provas com gaiolas sentinelas realizadas em 2008 e 2009. | 34 |

Capítulo 1 – Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Evolução da Razão de Resistência a temephos. Estimativa em Concentração Letal 95% (Rockefeller)..... | 19 |
| Tabela 2. Evolução da resposta biológica expressa em percentual médio de mortalidade. Larvas expostas à dose diagnostica de temephos, 0,012 mg/L. | 20 |
| Tabela 3. Evolução da Razão de Resistência a fenitrothion. Estimativa em Concentração Letal 95%..... | 24 |
| Tabela 4. Evolução da resposta biológica expressa em percentual médio de mortalidade. Larvas expostas à dose diagnostica de fenitrothion, 0,01 mg/L..... | 25 |
| Tabela 5. Percentual médio de mortalidade de adultos de <i>Aedes aegypti</i> pela exposição à Dose Diagnóstica de Cipermetrina: 146 mg i.a./m ² . Papéis impregnados pela Sucen..... | 26 |
| Tabela 6. Percentual médio de mortalidade de adultos de <i>Aedes aegypti</i> pela exposição à Dose Diagnóstica de Deltametrina 18 mg i.a./m ² | 27 |
| Tabela 7. Percentual médio de mortalidade de adultos de <i>Aedes aegypti</i> pela exposição à Dose Diagnóstica de Malathion 292 mg i.a./m ² | 28 |

Capítulo 2 – Tabelas

| | |
|--|----|
| Table 1. Resistance Ratio at Lethal Concentration 95% of temephos and mean enzyme activity observed on field populations of <i>Aedes aegypti</i> | 48 |
| Table 2. Data from assays for increasing the SSA resistance to temephos. | 49 |
| Table 3. Lethal Concentrations (fiducial limits) and Resistance Ratios of temephos in each generation of <i>Aedes aegypti</i> from Salvador..... | 50 |
| Table 4. Results from enzyme activity measured on SSA population. | 51 |
| Table 5. Average mortality observed on bioassays with <i>Aedes aegypti</i> adults exposed to diagnostic dose of insecticides. WHO method of impregnated paper..... | 52 |

Capítulo 3 – Ilustrações

| | |
|--|----|
| Figura 1. Análise genética de sete populações sentinelas do Estado de São Paulo..... | 63 |
|--|----|

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUÇÃO | 3 |
| OBJETIVOS..... | 10 |
| | |
| CAPÍTULO 1 AVALIAÇÃO DO PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA SUSCEPTIBILIDADE DE <i>Aedes aegypti</i> A INSETICIDAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. | 11 |
| Resumo..... | 12 |
| Introdução | 13 |
| Metodologia | 14 |
| Resultados | 16 |
| Discussão..... | 35 |
| Conclusões | 40 |
| | |
| CAPÍTULO 2 EVALUATION OF METABOLIC ENZYMES ACTIVITY IN <i>AEDES AEGYPTI</i> RESISTANCE TO TEMEPHOS. | 41 |
| Abstract | 42 |
| Introduction | 43 |
| Materials and Methods..... | 44 |
| Results | 47 |
| Discussion | 52 |
| Conclusions | 56 |
| | |
| CAPÍTULO 3 ESTUDO GENÉTICO DAS POPULAÇÕES DE <i>AEDES AEGYPTI</i> SENTINELAS DO PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA SUSCEPTIBILIDADE A INSETICIDAS NO ESTADO DE SÃO PAULO. | 57 |
| Introdução | 58 |
| Metodologia | 59 |
| Resultados e Discussão | 62 |
| Conclusões | 63 |
| | |
| REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS..... | 65 |

RESUMO

A necessidade de se controlar dengue com uso de inseticidas tem acarretado o desenvolvimento de resistência aos produtos mais utilizados em âmbito mundial. No Brasil, o Ministério da Saúde monitora anualmente o nível de susceptibilidade de populações de *Aedes aegypti* aos inseticidas. Este estudo objetivou analisar os dados disponíveis para o estado de São Paulo visando avaliar não só o impacto das estratégias de manejo adotadas nos níveis de resistência das populações, mas também o papel de resistência metabólica como um mecanismo da resistência detectada em larvas.

Foram analisados os dados do período de 1996 a 2009, relativos à caracterização biológica da resistência de larvas e insetos adultos e os resultados de provas de efetividade em campo. Para avaliação do papel atividade de enzimas metabólicas na resistência observada em larvas, foi feito um experimento em laboratório com medida de atividade enzimática durante o processo de incremento da resistência em população originada do campo. Os dados foram confrontados com os resultados da atividade enzimática das populações de campo.

Os dados do Programa de Monitoramento demonstraram ao longo do tempo um aumento do número de populações resistentes ao principal larvicida utilizado (temephos); que a resistência a adulticidas da classe dos piretróides é disseminada em todo o estado desde 2000 e que há comprometimento do controle em campo nas populações resistentes. Enzimas do grupo das esterases foram caracterizadas como envolvidas no mecanismo de resistência a temephos, embora tenham sido caracterizadas alterações em outras classes de enzimas em populações resistentes dificultando a interpretação pontual de atividade enzimática. A caracterização do vínculo genético apontou para um baixo fluxo gênico entre as populações justificando a manutenção da avaliação e manejo das sentinelas independente de suas proximidades geográfica.

Conclui-se que há uma tendência geral de perda de susceptibilidade aos produtos utilizados para o controle de *Aedes aegypti*. As estratégias de manejo utilizadas não foram suficientes, até o presente, para reverter resistência. As ações de controle em campo são comprometidas em populações caracterizadas como “Resistentes” em laboratório indicando que o manejo deva ser adotado para populações que apresentem “Susceptibilidade Diminuída”. O uso de inseticidas é uma ferramenta auto limitada e que deve ser preservada.

ABSTRACT

The need to control dengue transmission with insecticides has led to the development of resistance to the most used products all over the world. In Brazil the Ministry of Health monitors annually the level of susceptibility of *Aedes aegypti* populations to insecticides. This study aimed to evaluate data from São Paulo State in order to evaluate the impact of management of resistance on resistance levels in vector populations and also evaluate the role of metabolic enzymes on larval resistance to temephos.

Data of larval and adults resistance from 1996 to 2009 were analyzed together with field efficacy tests response. In order to evaluate the role of metabolic enzymes on resistance of larvae to temephos, an experiment for increasing resistance and measurement of enzyme activity were compared with enzyme profile from field populations.

Results showed, along the period, a decrease in susceptibility to the temephos-based larvicide in all populations; resistance to pyrethroids, observed in adult stage, was disseminated in the state since 2000 and that in resistance impacts on field activities. Enzymes from the esterase class were involved on temephos resistance of larvae, although other classes of enzymes show alterations in resistant populations making it difficult the interpretation of enzyme activity on single population. The characterization of the genetic link pointed to a low gene flow among populations. This justifies the maintenance of the assessment and management of sentinel regardless of their geographical origin.

The study concludes that there is a general trend for losing susceptibility of *Aedes aegypti* to the most used insecticides. To date management strategies adopted were not enough to avoid this process. There is impact of field control on “resistant” populations showing that management should be triggered on populations with “Decreased Susceptibility” status. Insecticide use is a self imitating tool which should be preserved.

INTRODUÇÃO

Dengue

Dengue é uma arbovirose transmitida pela picada do mosquito *Aedes aegypti* e existem quatro sorotipos do vírus da Dengue. Até o momento não há vacina disponível contra nenhum sorotipo. Existem duas formas de dengue: a clássica e a hemorrágica. A dengue clássica apresenta-se geralmente com febre, dor de cabeça, no corpo, nas articulações e por trás dos olhos, podendo afetar crianças e adultos, mas raramente mata. A dengue hemorrágica é a forma mais severa da doença, pois além dos sintomas citados, é possível ocorrer sangramento, ocasionalmente choque e conseqüências como a morte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Os primeiros registros de dengue clássico, na literatura médica, ocorreram em 1779 com registro de transmissão no Egito e na Indonésia e, em 1780, nos Estados Unidos (GUBLER & TRENT, 1993). Nas Américas, em 1827 registrou-se uma epidemia no Caribe e de 1881 a 1922 ocorreu expansão na região, com transmissão de Dengue atingindo toda a área do Caribe e sul dos Estados Unidos (GOMEZ-DÁNTES, 1991). No final da década de 50 foi elaborado um Plano Continental para Erradicação do vetor *Aedes aegypti* e, no início dos anos 60, o mosquito foi considerado erradicado da quase totalidade da América do Sul de toda a América Central. Na América do Norte apenas uma pequena área no Sul dos Estados Unidos da América ainda permanece infestada (ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1983). Na década de 80, novamente se detectou a presença deste vetor em vários países das Américas e, do Caribe e como conseqüência, ocorreu transmissão de dengue em vários deles: Bolívia (1987); Paraguai e Equador (1988); Cuba (1977/1981), Venezuela (1989) (ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1989).

Atualmente, a transmissão de dengue se mantém nas regiões tropicais dos países em desenvolvimento.

A primeira ocorrência de Dengue no Brasil data de 1846 quando se relatou transmissão nos Estados do Rio de Janeiro, Bahia, Pernambuco e Paraná. No Estado de São Paulo há registro de epidemias em 1916 e no Rio Grande do Sul em 1917. Em 1923 registrou-se epidemia em Niterói. Desde esta época até 1980 não havia registro de transmissão. No verão de 1981/82 reaparece a doença e se registra a primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente em Boa Vista, RR, com 12000 casos (SHATZMAYR, 2000). Em março de 1986, iniciou uma grande epidemia no Rio de Janeiro e região com 80000 casos registrados. Como conseqüência desta epidemia, ocorreu uma expansão das áreas com transmissão atingindo as regiões Sudeste (São Paulo e Minas

Gerais) e Nordeste (Alagoas, Ceara, Pernambuco e Bahia) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988) do país. No final da década de 80 e na década seguinte, a despeito das tentativas de controle do vetor, o que se observou foi um aumento do número de municípios infestados e expansão do número de municípios com transmissão de Dengue sendo que a grande maioria dos casos se concentra nas regiões Sudeste e Nordeste.

No Estado de São Paulo, posterior ao período de erradicação, foi detectada uma nova infestação do mosquito *Aedes aegypti* em 1985 quando um amplo levantamento entomológico foi realizado. Em 1986 ocorreu a primeira transmissão de Dengue, na região oeste do Estado (municípios de Araçatuba e Guararapes). Em 1991 ocorreu transmissão na região norte do Estado (Ribeirão Preto e região) e a epidemia se expandiu para 58 municípios. Houve uma redução da transmissão até 1994 onde se observaram casos em 25 municípios, porém de 1995 até 1999 o número de municípios com transmissão tem oscilado ao redor de uma centena sendo que no ano de 1998 houve o maior número de casos. A transmissão ocorre principalmente nas regiões noroeste e litorânea do Estado, sendo observado o maior número de casos na região de Santos (cerca de 70 % dos casos). O coeficiente de incidência em 1987 foi de 0,15; em 1998 de 30,27 e em 1999, de 42,36 casos por 100.000 habitantes. Após um período de baixa incidência, nos anos de 2001 e 2002 houve uma nova elevação da incidência da doença no Estado com coeficientes, respectivamente, 137,2 e 102,62. Após declínio destes coeficientes a partir de 2003, um novo ciclo de transmissão ocorreu a partir de 2006 (84,26), 2007 (200,23), novo declínio entre 2008 e 2009 e nova epidemia em 2010 a qual atingiu o recorde histórico de 443,6 casos por 100.000 habitantes (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2010).

Vetor da Dengue no Brasil

O *Aedes aegypti* é um mosquito originário da África, onde existe uma forma silvestre e uma forma mais adaptada às condições urbanas. Esta última forma foi a que se expandiu e que está presente nas Américas. Seu ciclo de vida depende da presença de pequenas coleções de água onde ocorrem as fases de larva e pupa. Recipientes artificiais como latas, potes, frascos plásticos, pneus, vasos e tanques se transformam em criadouros importantes quando passam a acumular água com pouca matéria orgânica. Uma vez que estes tipos de recipientes são freqüentemente encontrados em residências e devido ao fato deste mosquito ser altamente antropofílico, o habitat humano reúne todas as condições necessárias para sua proliferação.

O controle deste vetor pode ser feito através de ações mecânicas de eliminação ou alteração da disposição de criadouros (as formas aquáticas não sobrevivem fora da água) ou através de controle químico com uso de larvicidas. Para as formas adultas, mosquitos alados os quais são os envolvidos na transmissão da doença, a única forma de controle realizada é a química, uma vez que medidas de proteção individual como telas e mosquiteiros têm pouca aplicabilidade prática, devido ao hábito diurno do vetor (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2002).

A adoção de medidas de controle mecânico depende de motivação da comunidade, de conscientização e adoção de estratégias específicas para atingir este objetivo. Na prática, o que se tem observado é que o controle se restringe ao uso de produtos químicos, tanto para o controle de focos como principalmente para interrupção de transmissão da doença.

Controle do vetor no Estado de São Paulo

No Estado de São Paulo, quando foi registrado, em 1985, o estabelecimento da espécie em municípios do oeste paulista, a despeito de todas as orientações e tentativas de controle, verificou-se, a partir daí, uma rápida expansão geográfica desse Culicídeo do oeste para o leste do Estado (GLASSER, 2000). Medidas de controle mecânico e químico passaram a ser executadas desde 1985 pela Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN e, nos anos que se seguiram, por Prefeituras Municipais.

As medidas de controle químico realizadas rotineiramente foram o controle larvário com temephos e controle adúltica de ação residual, também com ação larvicida, por meio de fenitrothion, ambos inseticidas organofosforados. O malathion foi utilizado em pequena quantidade em substituição ao fenitrothion, nos anos de 1987 a 1993, em períodos de falta deste último no mercado. O fenitrothion foi utilizado até final de 1999 quando se passa a utilizar o piretróide cipermetrina. As nebulizações térmicas e atérmicas foram utilizadas desde 1985, ficando restritas, de maneira geral, ao período de verão e outono, quando a densidade do vetor é mais elevada, e quando ocorre a maior incidência de dengue. Foram vários os inseticidas empregados nessa atividade, destacando-se: propoxur (1986 a 1989), malathion (1985 a 1992) e cipermetrina (1989 até 2000), os quais pertencem respectivamente ao grupo dos carbamatos, organofosforados e piretróides. Até o ano de 2000 a escolha de produtos para controle químico obedeceu a critérios de disponibilidade por parte do ministério da saúde por este ser um insumo estratégico disponibilizado para Estados e municípios.

A partir de 2000, com a detecção da resistência das populações de *Aedes aegypti* ao adúlticida cipermetrina, foi reintroduzido o uso de malathion (organofosforado) no Estado de São Paulo.

As modalidades de controle químico com uso de inseticidas para o controle de *Aedes aegypti* empregadas nos programas de controle desde a década de 80 são (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2002):

Tratamento Focal: Tratamento de recipientes contendo água que se constituem focos pela presença de larvas de culicídeos no seu interior e/ou em condições para se tornarem focos. O principal produto utilizado no Brasil desde a década de 80 é um larvicida organofosforado a base de temephos em cuja formulação o princípio ativo é aderido a grânulos de areia e, pela sua lenta liberação, possui efeito residual durante meses nos recipientes tratados.

Tratamento Perifocal: Tratamento de superfícies ao redor de focos larvários, em especial em locais de acúmulo de potenciais criadouros como em cemitérios, borracharias, depósitos de materiais para construção. Esta modalidade de controle também foi intensamente utilizada em municípios onde focos iniciais do vetor foram detectados, visando impedir o estabelecimento da infestação do vetor.

Nebulização: Tratamento espacial de inseticida, através de máquinas acopladas a viaturas ou portáteis (tipo moto - mochila). O alvo desta aplicação são os insetos adultos e esta técnica é geralmente usada com objetivo de matar fêmeas adultas contaminadas, em áreas de transmissão ou de risco de transmissão de Dengue.

Resistência a inseticidas

O controle da transmissão de dengue, através de produtos químicos, causa conseqüências não só para o meio ambiente, mas também para a própria eficácia do controle. O uso de inseticidas, em diversas partes do mundo, propiciou o desenvolvimento de populações resistentes aos produtos mais intensamente utilizados. O desenvolvimento de resistência em mosquitos a inseticidas foi detectado pela primeira vez, em 1947 quando populações de *Aedes taeniorhynchus* e *Aedes sollicitans* começaram a apresentar resistência ao DDT na Flórida (BROWN, 1986). Dados mais recentes indicam que populações de *Aedes aegypti* presentes em diversas partes do mundo, exceto em certos países da África,

apresentam resistência ao DDT (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992). A resistência a organofosforados, não evidenciada nas populações de *Aedes aegypti* que fizeram parte de um inquérito mundial em 1969, foi detectada na Ásia, em 1972 (GEORGHIOU, 1987) e no final da década de 80 já se apresentou espalhada no Caribe e países vizinhos, incluindo América Central e do Sul DDT (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992). A resistência aos piretróides sintéticos, inseticidas de utilização mais recente, já foi evidenciada nos Estados Unidos, Porto Rico, Camboja, Taiwan, Malásia e Tailândia (RANSON et al., 2009).

A capacidade de um inseto resistir a um determinado inseticida é uma característica genética que normalmente ocorre numa frequência muito baixa nas populações naturais. Populações de insetos resistentes surgem através da seleção exercida pela pressão do uso de inseticidas, os quais matam os insetos suscetíveis, favorecendo o aumento da frequência de genes resistentes. Deste modo, a escolha dos inseticidas utilizados nos programas de controle, assim como o tempo de uso, e a seqüência de classes dos produtos, são parâmetros importantes que devem ser considerados numa avaliação de suscetibilidade a inseticidas.

O ideal é que se avalie o nível de suscetibilidade de uma determinada espécie, antes da introdução do uso de um inseticida. Caso isto não seja realizado, há alternativa de se avaliar o nível de suscetibilidade de modo comparativo com uma população nunca exposta à pressão de seleção com uso de produtos químicos, cuja resposta biológica (morte ou sobrevivência) possa ser considerada padrão para a espécie. A este tipo de população se denomina “população suscetível”. Uma terceira alternativa para avaliação da suscetibilidade é, na ausência de uma população suscetível, avaliar a mesma população ao longo do tempo. Nesta última maneira, considera-se a primeira avaliação como a linha base que servirá de padrão para comparações futuras.

Para a espécie *Aedes aegypti*, existem algumas populações, sabidamente, suscetíveis aos inseticidas. Estas populações têm sido mantidas em laboratório (insetários) há muitos anos, sendo periodicamente testadas quanto à sua suscetibilidade. Uma destas populações é a chamada cepa Rockefeller, que tem sido mantida pelo laboratório do “Centers of Disease Control”, em Porto Rico.

No Brasil, em 1995, registrou-se a diminuição da suscetibilidade a temefos em uma população proveniente do Estado de Goiás (MACORIS et al, 1995). A partir de 1996 iniciou-se em São Paulo um Programa de monitoramento da resistência de populações de *Aedes aegypti* aos principais inseticidas utilizados para seu controle sob responsabilidade da SUCEN. Através deste programa, em 1998 evidenciou-se, através de bioensaios, uma

diminuição da suscetibilidade ao temephos em populações dos municípios de Campinas e Santos, ambos no Estado de São Paulo (MACORIS et al., 1999).

Com esta informação, deu-se início a partir do segundo semestre de 1998, a discussão da necessidade de se avaliar a situação da suscetibilidade do vetor aos inseticidas utilizados para seu controle no Brasil. Com a formação de um grupo de trabalho, esboçou-se a proposta para implantação de um programa de monitoramento em nível nacional, durante o I Seminário Internacional de Controle de Vetores e Reservatórios realizado em Belo Horizonte, MG em Outubro 1998 (BRAGA & VALLE, 2007 b). Como prioridade optou-se pelo monitoramento do *Aedes aegypti* devido ao registro da resistência e também pela sua importância epidemiológica atual.

Foi organizada uma rede (MoReNAa) de laboratórios para monitoramento da resistência de *Aedes aegypti*, coordenado pela Secretaria de Vigilância em Saúde (BRAGA & VALLE, 2007b), e através de avaliações anuais foi evidenciada resistência elevada ao larvicida organofosforado temephos em populações do Nordeste e Sudeste (LIMA et al., 2003; MACORIS et al., 2003; BRAGA et al., 2004). A partir de 2001 também foi evidenciada resistência a piretróides em mosquitos adultos (PEREIRA DA CUNHA et al., 2005).

A avaliação da susceptibilidade das populações do vetor envolve a caracterização da resposta biológica dos estádios de larva e adulto segundo as metodologias padronizadas pela Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981 a b c; 1992; 1998; 2000); a mensuração do nível de controle em situações de campo controlado nas populações caracterizadas em laboratório como resistentes aos inseticidas e, numa terceira etapa a avaliação de mecanismos de resistência através de medida de atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de inseticidas.

Detecção e manejo da resistência

As três etapas acima citadas objetivam subsidiar as ações de manejo da resistência fornecendo resposta aos gestores de programa se há resistência nas populações monitoradas, qual o nível de comprometimento das ações de campo nas populações com resistência caracterizada em laboratório e a elucidação do mecanismo de resistência permite a escolha de produtos para manejo.

Justificativa

Atualmente a única forma de controle da dengue é através do controle do vetor, uma vez que não existe vacina ou mesmo drogas antivirais específicas (GUBLER, 1989). Dentre as formas de controle do vetor, o controle químico com uso de inseticidas é uma ferramenta importante para interrupção de transmissão da doença e sua efetividade depende, além das questões operacionais de aplicação, que a população de insetos seja susceptível aos inseticidas utilizados.

Há registro de resistência aos principais produtos utilizados para o controle de *Aedes aegypti* no Brasil e há evidências de que o histórico de produtos utilizado influenciou o desenvolvimento da resistência registrada nas populações do vetor provenientes das regiões Sudeste e Nordeste (BRAGA et al., 2004; LIMA et al., 2003; MACORIS et al., 1995, 1999, 2003; PEREIRA DA CUNHA et al., 2005).

A fixação da resistência na população depende do custo adaptativo que esta confere aos insetos, da continuidade da seleção de indivíduos resistentes e da migração de susceptíveis. Para o vetor *Aedes aegypti*, estudos populacionais tem demonstrado que há diferenciação de populações, sinalizando para importante fluxo gênico (BROWN, 2011). Deste modo a análise da evolução da resistência do vetor aos principais inseticidas utilizados no Estado de São Paulo, assim como a caracterização da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de inseticidas em populações de *Aedes aegypti* com diferentes níveis de resistência e sua relação com a resposta das populações a dose utilizada em campo poderá evidenciar os mecanismos de resistência envolvidos além de contribuir para o entendimento do processo de desenvolvimento da resistência, avaliar o impacto da resistência nas operações de controle e fornecer subsídios para escolha de estratégias de manejo e em ultima análise um controle mais efetivo do vetor.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliação dos dados do Programa de Monitoramento da susceptibilidade de *Aedes aegypti* do estado de São Paulo para esclarecimento dos mecanismos de resistência a inseticidas em populações de *Aedes aegypti*

Objetivos específicos

- Avaliar o histórico dos níveis de susceptibilidade das populações de *Aedes aegypti* do Estado de São Paulo monitoradas desde 1996
- Avaliar o impacto da resistência a inseticidas em operações de rotina de controle.
- Avaliar a atividade das principais enzimas relacionadas ao metabolismo de inseticida em populações de *Aedes aegypti* com diferentes níveis de susceptibilidade a inseticidas.
- Analisar a relação de vínculo genético entre as populações sentinelas do Programa de Monitoramento da susceptibilidade de inseticidas do Estado de São Paulo visando fornecer subsídios para a interpretação da diferenciação da evolução da resistência observada e seus mecanismos.

CAPÍTULO 1 AVALIAÇÃO DO PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *Aedes aegypti* A INSETICIDAS DO ESTADO DE SÃO PAULO.

Histórico dos níveis de susceptibilidade e impacto da resistência do vetor em atividades de controle a campo.

Resumo

OBJETIVO: Avaliar os dados do Programa de Monitoramento da susceptibilidade de populações de *Aedes aegypti* do Estado de São Paulo e as estratégias de controle químico utilizadas. **MÉTODOS:** O Estado de São Paulo integra a Rede de Monitoramento de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas (Rede MoReNAa) coordenada pelo Ministério da Saúde. Anualmente uma amostra de populações de municípios sentinelas é coletada e é feita a caracterização do nível de susceptibilidade aos inseticidas utilizados na rotina do controle do vetor. As populações são também submetidas a provas de efetividade em campo com produtos utilizados na rotina do Programa de Controle e a provas bioquímicas para avaliação de mecanismos de resistência. Foram analisados os dados do programa do período de 1996 a 2009. As populações de mosquitos dos municípios foram agrupadas segundo os níveis iniciais de susceptibilidade, avaliadas em provas quantitativas para larvas. Foram testadas associações entre nível de resistência em laboratório e efetividade em campo e por meio de análise de correlação. **RESULTADOS:** Embora tenha se evidenciado uma tendência geral de evolução para resistência aos produtos utilizados para seu controle, houve diferenciação entre as populações de *Aedes aegypti* analisadas. Evidenciou-se diminuição da resposta em campo à partir do nível de Razão de Resistência 3 na Concentração Letal 95% para o larvicida temephos. Para insetos adultos houve comprometimento da efetividade em campo para todas as populações de *Aedes aegypti* caracterizadas como resistentes a piretróides em laboratório. As estratégias de manejo utilizadas com substituição de inseticidas nas regiões com resistência e restrição do uso de controle químico no Estado como um todo começou a partir de 2001 e, até o presente, não foi suficiente para reverter a resistência detectada, nem impedir o desenvolvimento de resistência em outras regiões. **CONCLUSÕES:** Os resultados indicaram uma tendência geral de perda de susceptibilidade aos produtos utilizados para o controle de *Aedes aegypti*. O nível de corte indicativo para manejo da resistência a larvicidas adotado no Programa de monitoramento é sensível para detectar comprometimento. Para adulticidas, a caracterização de resistência em ensaios qualitativos foi acompanhada, na maioria das populações estudadas, por comprometimento do controle em campo. As estratégias de manejo utilizadas, com substituição de produtos em populações já resistentes, não foram suficientes, até o presente, para reverter a resistência detectada. A estratégia de restrição do uso de larvicidas não impediu o desenvolvimento de resistência em algumas regiões. A interrupção do uso de piretróides no início da década de 2000 ainda não proporcionou alteração do status de susceptibilidade a esta classe de produtos até 2009.

Introdução

Diante da detecção da infestação do estado de São Paulo *Aedes aegypti* pelo mosquito, em 1985 foi implantado um programa de controle deste vetor com uso de medidas de controle mecânico e químico visando inicialmente impedir a expansão geográfica para os municípios não infestados (GLASSER, 2000). Num segundo momento, diante da rápida dispersão do vetor no estado, as atividades de controle passaram a ter como objetivo impedir ou controlar transmissão de Dengue.

Três modalidades de controle químico são empregadas nos programas de controle de *Aedes aegypti* em São Paulo (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2002) e no Brasil (FUNASA, 2002): *Tratamento focal*: tratamento de recipientes contendo água que se constituem focos pela presença de larvas de culicídeos no seu interior e/ou em condições para se tornarem focos. O principal produto utilizado no Brasil desde a década de 80 é um larvicida organofosforado à base de temephos em cuja formulação o princípio ativo é aderido a grânulos de areia e que, pela sua lenta liberação, possui efeito residual durante meses nos recipientes tratados. *Tratamento Perifocal*: tratamento de superfícies ao redor de focos larvários, em especial em locais de acúmulo de potenciais criadouros como em cemitérios, borracharias, depósitos de materiais para construção. Esta modalidade de controle também foi intensamente utilizada em municípios onde focos iniciais do vetor foram detectados, visando impedir o estabelecimento da infestação do vetor. *Nebulização*: tratamento espacial de inseticida, através de máquinas portáteis (tipo moto - mochila) ou acopladas a viaturas. O alvo desta aplicação são os insetos adultos e esta técnica é geralmente usada com objetivo de matar fêmeas adultas contaminadas, em áreas de transmissão ou de risco de transmissão de Dengue.

O controle químico implantado na década de 80 foi baseado no uso de produtos da classe dos organofosforados: temephos, que tem ação sobre a fase larvária e o fenitrothion, inseticida de ação residual que, além de atuar sobre a fase adulta do vetor, possui também ação larvicida. O malathion, também organofosforado, foi utilizado em pequena quantidade, em substituição ao fenitrothion, nos anos de 1987 a 1993, em períodos de falta deste último no mercado. O fenitrothion foi utilizado até final de 1999, quando então passou a ser utilizado o piretróide sintético cipermetrina. Nas nebulizações vários inseticidas foram utilizados iniciando com a classe dos carbamatos - propoxur (1986 a 1989), passando para uso de organofosforados - malathion (1985 a 1992 e a partir de 2001 até 2010) e piretróide - cipermetrina (1989 a 2001)

A estratégia de controle químico pressupõe que a espécie alvo seja susceptível aos produtos utilizados. Buscando garantir a eficácia do Programa de Controle, a Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN – introduziu em 1996 um Programa de Monitoramento da Suscetibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas e a partir de 1999 passou a integrar a Rede Nacional de Monitoramento de *Aedes aegypti* aos inseticidas – MoReNAa, coordenada pelo Ministério da Saúde (BRAGA & VALLE, 2007b).

O presente trabalho objetiva avaliar os dados obtidos no Programa de monitoramento quanto à evolução dos níveis de susceptibilidade das populações de *Aedes aegypti* provenientes do Estado de São Paulo e o impacto da resistência nas diferentes modalidades de controle químico na rotina do controle do vetor.

Metodologia

O Programa de monitoramento da susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas avalia anualmente populações do vetor provenientes de alguns municípios selecionados por terem sido alvo de uso intenso de inseticidas em função da transmissão de dengue e/ou municípios onde houvesse a possibilidade de introdução de mosquitos de outras áreas, por dispersão passiva, em função da relevante importância econômica desse município na região. Inicialmente foram selecionados nove municípios que seriam considerados como sentinelas para as suas respectivas regiões. Por sentinela subentende-se que a população amostrada represente o perfil de susceptibilidade das populações do vetor da região (BRAGA & VALLE, 2007b). Assim, uma resposta biológica compatível com status resistente deflagra ações de manejo (substituição de inseticidas ou moderação de uso) não apenas para o município sentinela, mas também para a região que este representa.

O Programa de monitoramento compreende três etapas: caracterização da susceptibilidade, identificação de mecanismos de resistência e avaliação do impacto da resistência na rotina dos tratamentos químicos. A caracterização da susceptibilidade aos inseticidas é realizada através de provas biológicas. Quanto à identificação de possíveis mecanismos de resistência são realizadas provas bioquímicas para avaliação de atividade de enzimas envolvidas na degradação de inseticidas. A avaliação do impacto da resistência em campo é feita pela avaliação da resposta biológica em situação de uso do inseticida na técnica utilizada na rotina do controle de campo para as populações que apresentaram, em laboratório, algum nível de resistência nas provas biológicas.

Caracterização da susceptibilidade

A resposta biológica de larvas e insetos adultos é avaliada em bioensaios através de metodologia padronizada pela Organização Mundial de Saúde – OMS/WHO. Para larvas são realizados ensaios qualitativos com uso de dose diagnóstica (ORGANIZATION MUNDIAL DE LA SALUD, 1960; WHO 1981 a, b, 1992, 1998) e quantitativos com ensaios de dose-resposta em gradiente de dose e estimativa de Razão de Resistência (R.R.) pela comparação das concentrações letais das populações de campo com as obtidas para uma cepa susceptível de referência (WHO 1981c, 2000; MACORIS et al., 2005). A cepa susceptível de referência utilizada é a Rockefeller, gentilmente cedida pelo Centers of Disease Control - CDC - de Porto Rico. Com os insetos adultos são realizados apenas ensaios qualitativos com uso de dose diagnóstica em provas com papéis impregnados (WHO 1981 b,c, 1992, 1998). A avaliação da susceptibilidade é realizada com os princípios ativos dos produtos que são utilizados na rotina do Programa de Controle de Dengue (PNCD), temephos e fenitrothion para larvas, cipermetrina, deltametrina e malathion para as formas adultas. Os critérios de interpretação dos bioensaios com dose diagnóstica são os preconizados pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998), onde o percentual de mortalidade igual ou superior a 98% caracteriza a população como “Susceptível”, menor que 80% caracteriza-a como “Resistente” e valores entre 80 e 98 % caracterizam a população com “Susceptibilidade Diminuída”. Para a Razão de resistência, o critério de interpretação é considerar resistente população com R.R. maior que 10 (MAZZARI & GEORGHIOU, 1995; BROWN, 1986).

Avaliação da atividade de enzimas envolvidas na degradação de inseticidas.

Pelo fato da resistência a inseticidas ser comumente relacionada à atividade de enzimas envolvidas no metabolismo desses produtos, a identificação de mecanismos da resistência detectada nos bioensaios é feita através da quantificação da atividade das enzimas carboxilesterase (alfa e beta); oxidase multi-função (MFO) e glutathion-S-transferase (GST). A metodologia utilizada é a proposta pelo CDC em provas bioquímicas em placas de microtitulação, onde o produto da reação entre um substrato e a enzima presente nos insetos é corada e medido em espectrofotômetro (CDC, 1998; BROGDON 1984, 1989; BROGDON & BARBER 1990; BROGDON & MCALLISTER 1997, 1998). A atividade enzimática da cepa Rockefeller é considerada como padrão normal de atividade. A análise da atividade enzimática das populações é feita segundo metodologia proposta pelo MINISTÉRIO DA

SAÚDE (2006), onde se calcula o percentil 99 da atividade enzimática da cepa susceptível de referência e a análise da população de campo baseia-se no percentual de indivíduos que possuem atividade enzimática superior a este valor. Um percentual acima de 50% de indivíduos com atividade superior ao percentil 99 da cepa susceptível caracteriza a população com atividade “Muito Alterada”; entre 15 e 50% dos indivíduos, atividade “Alterada” e abaixo de 15 % dos indivíduos, atividade normal.

Avaliação da efetividade de tratamento com inseticidas em condições de campo simulado.

Para avaliação do impacto da resistência detectada em laboratório no tratamento realizado na rotina, são feitas provas de efetividade com os produtos comerciais e as técnicas de aplicação utilizadas no Programa de Controle – tratamento focal, perifocal e espacial. Para avaliação da efetividade do tratamento focal são realizadas provas biológicas para avaliação do efeito residual de larvicidas segundo metodologia preconizada pela OMS (WHO, 2005), enquanto que para tratamento perifocal a avaliação é feita em provas de parede (WHO 1996; 2006) em superfícies tratadas e para tratamento espacial, bioensaios com gaiolas sentinelas (REZENDE et al. 1998; WHO 2001, 2003).

Critérios do PNCD para se deflagrar estratégias de manejo da resistência.

A Rede MoReNAa utiliza como critério indicar a substituição de larvicida quando for identificada em laboratório Razão de Resistência igual ou maior que 3 no nível de concentração letal 95%. (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2006).

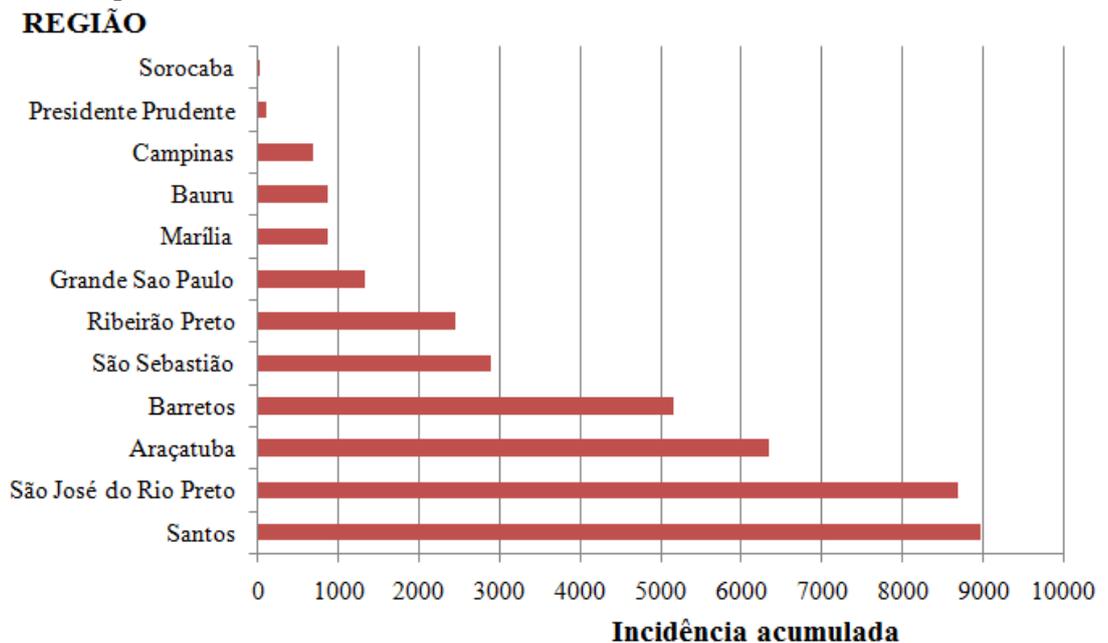
Para as provas de efetividade em campo, considera-se satisfatório um percentual de mortalidade superior a 80% (WHO 1982; 1996; 2005; 2006). O critério de interpretação agrega também a comparação da resposta com a cepa susceptível de referência (Rockefeller): um percentual inferior a 70% da resposta da cepa sensível é sugestivo de indicação de substituição do produto avaliado (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2004).

Resultados

Incidência de Dengue

Como o Programa foi desenhado para detectar resistência a inseticidas nos municípios onde houve maior incidência de Dengue - o que indiretamente reflete maior uso de inseticida ou maior pressão de seleção de populações resistentes - no gráfico 1 esta ilustrada a distribuição da incidência acumulada de Dengue no período de 1996 a 2008 nos municípios de origem das populações de *Aedes aegypti* monitoradas (Total de casos de dengue do período/população do início do período por 100 mil habitantes). Nota-se uma distribuição desigual da doença no estado de São Paulo com as maiores incidências nos municípios da região litorânea (Santos e São Sebastião) e regiões Norte e oeste (Ribeirão Preto, Barretos, São Jose do Rio Preto, Araçatuba,).

Gráfico 1. Incidência acumulada de Dengue no período de 1996 a 2008, segundo município ou região. Casos por 100.000 habitantes.



Fonte: Centro de Vigilância Epidemiológica. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE (2010).

Susceptibilidade de larvas

A série temporal de 13 anos de monitoramento permite que se avalie a tendência geral da evolução da resistência. A comparação dessa evolução entre as populações é mais importante do que os dados pontuais. Vamos centralizar a análise nas onze populações que constam no programa de monitoramento desde seu início. Na região metropolitana de São Paulo as unidades sentinelas compreenderam dois bairros (Ipiranga e Pirituba) e três outras regiões onde houve intensidade de controle químico (Jandira, Itapevi, Santana do Parnaíba). Os dados das cinco localidades foram agrupados como média da Grande São Paulo.

Para o larvicida temephos foram analisados os dados de Razão de Resistência (C.L.95%- R.R.₉₅) (tabela 1) e o percentual de mortalidade obtido em provas com dose diagnóstica (tabela 2) no período de 1996 a 2009. As populações de *Aedes aegypti* foram agrupadas segundo os valores de R.R.₉₅ inicialmente apresentados. No primeiro grupo, populações com R.R.₉₅ menor que 2 (Bauru, Marília e Presidente Prudente), seguidas do grupo com R.R.₉₅ entre 2 e 3 (Araçatuba, Barretos, Campinas, São Jose do Rio Preto e Grande São Paulo) e num terceiro grupo, populações com R.R.₉₅ maior que 3 (Ribeirão Preto, Santos, São Sebastião e Sorocaba).

Os três grupos tiveram, no período, suas médias de R.R.₉₅ comparadas através de teste não paramétrico (Mann-Whitney) excluindo-se o dado inicial (critério de inclusão no grupo) e todos diferiram significativamente entre si ($p < 0.005$). As diferenças de níveis de susceptibilidade observadas inicialmente evoluíram ao longo do tempo, no sentido de perda da susceptibilidade, de modo semelhante entre os dois primeiros grupos (R.R.₉₅ < 2 e R.R.₉₅ entre 2 e 3), com aumento de R.R.₉₅ em quase duas vezes os valores iniciais. No terceiro grupo (R.R.₉₅ > 3), embora com oscilação dos níveis de R.R.₉₅, houve tendência de manutenção dos níveis de resistência ao temephos (Tabela 1).

Foi feita análise da evolução da resistência comparando a média de cada sentinela com a média geral do Estado. No primeiro grupo (R.R.₉₅ < 2) a média das 3 populações - Bauru, Marília e Presidente Prudente - foi significativamente menor do que a média do Estado (respectivamente $p = 0,0367$; $0,0006$ e $0,0$, teste Mann-Whitney). No segundo grupo (R.R.₉₅ < 2 > 3), apenas duas populações diferiram da média do estado: Campinas, com média significativamente menor ($p = 0,0185$) e São José do Rio Preto, com média significativamente maior que a observada para o Estado ($p = 0,0422$). No terceiro grupo (R.R.₉₅ > 3), a população de Santos se diferencia por apresentar média de resistência maior que o Estado ($p = 0,0064$).

Tabela 1. Evolução da Razão de Resistência a temephos. Estimativa em Concentração Letal 95% (Rockefeller). São Paulo, 1998 a 2009.

| População | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| R.R. < 2 | | | | | | | | | | | | |
| Bauru | 1,5 | 2,3 | 1,5 | 1,8 | 1,8 | 2,0 | 2,2 | - | 2,6 | - | 5,7 | 3,8 |
| Marília | 1,6 | 2,4 | 1,7 | 1,9 | 1,8 | 1,8 | 2,1 | 1,8 | - | 2,6 | | 2,7 |
| Presidente Prudente | 1,7 | 1,8 | 1,2 | 1,5 | 2,4 | 2,1 | 1,7 | - | 2,5 | 3,0 | 4,1 | 4,2 |
| R.R. entre 2 e 3 | | | | | | | | | | | | |
| Araçatuba | 2,0 | 3,2 | 2,2 | 2,2 | 2,5 | 2,6 | 3,4 | 3,1 | 3,4 | 3,6 | 3,1 | 3,3 |
| Barretos | 2,4 | 2,9 | 2,4 | 2,8 | 3,1 | 3,4 | 2,7 | 2,7 | 3,7 | - | 3,6 | 5,2 |
| Campinas | 2,7 | 2,9 | 2,6 | 2,9 | 1,9 | 2,8 | 2,5 | 2,2 | - | 2,8 | - | 3,1 |
| S.J. Rio Preto | 2,5 | - | 2,4 | 3,0 | 4,3 | 5,1 | 3,5 | 3,1 | 5,0 | 4,8 | 5,6 | 5,4 |
| Grande São Paulo | - | - | 2,48 | 2,76 | - | 3,5 | 2,9 | 2,9 | 3,8 | - | 3,8 | 4,0 |
| R.R. > 3 | | | | | | | | | | | | |
| Ribeirão Preto | - | 3,5 | 2,8 | 2,9 | 2,5 | 3,8 | 2,8 | 3,5 | 3,1 | 3,3 | 2,7 | 3,1 |
| Santos | 6,3 | 5,8 | 2,9 | 4,8 | 4,1 | 4,6 | 4,1 | 10,6 | 6,7 | 3,3 | 3,8 | 5,0 |
| São Sebastião | - | - | - | 3,4 | - | 4,1 | 10,5 | 2,8 | 4,1 | 3,7 | 2,7 | 4,8 |
| Sorocaba | - | - | - | - | - | 3,3 | 3,8 | 3,3 | - | 3,5 | | 4,1 |
| Média do Estado SP | 2,6 | 3,1 | 2,2 | 2,7 | 2,7 | 3,3 | 3,5 | 3,6 | 3,9 | 3,4 | 3,9 | 4,1 |

Os dados contidos na tabela 2 demonstram a mudança do status das populações e, novamente, fica evidente a tendência de aumento da resistência. No final do período, nenhuma das onze populações monitoradas está classificada como susceptível. Sete são classificadas como resistentes e quatro com “Susceptibilidade Diminuída”. Embora seja evidenciada alguma variação no nível de mortalidade, a tendência geral observada foi de perda do status “Susceptível”, manutenção por um período de seis a sete anos no status de “Susceptibilidade Diminuída” e, posterior a este período, evolução para o status “Resistente”. A diferença entre os grupos se observa no tempo em que a mudança de status ocorre. Enquanto que no primeiro grupo (o qual tinha R.R.₉₅ menor que 2 no início do Programa) a evolução para o status de “Susceptibilidade Diminuída” ocorreu a partir de 2003, nos outros dois grupos a mudança ocorreu a partir de 1998.

Tabela 2. Evolução da resposta biológica expressa em percentual médio de mortalidade. Larvas expostas à dose diagnóstica de temephos, 0,012 mg/L. São Paulo, 1996 a 2009.

| TEMEPHOS | Ano | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 |
| População | | | | | | | | | | | | | | |
| Bauru | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 99,8 | 99,6 | 95,8 | 96,5 | | 95,7 | | 61,4 | 83,6 |
| Marília | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 99,4 | 100 | 98,0 | 97,4 | 99,5 | | 97,8 | | 86,7 |
| Presidente Prudente | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 99,4 | 98,9 | 98,5 | 98,2 | | 92,4 | 93,9 | 72,9 | 63,0 |
| Araçatuba | 100 | 100 | 100 | 92,4 | 97 | 97,3 | 97,8 | 95,3 | 92,1 | 79,8 | 78,9 | 78,3 | 70,8 | 77,7 |
| Barretos | | 100 | 100 | 90,6 | 94 | 97,8 | 97,3 | 89,0 | 94,3 | 87,3 | 78,0 | | 76,6 | 64,9 |
| Campinas | | | 96,6 | 99,5 | 91,0 | 93,6 | 99,6 | 90,9 | 98,8 | 97,3 | | 97,9 | | 87,7 |
| Ribeirão Preto | 98,7 | | | 75,9 | 87,5 | 94,6 | 93,2 | 96,3 | 90,6 | 74,9 | 76,4 | 90,4 | 72,2 | 85,0 |
| S. J. Rio Preto | 99,5 | 100 | | | 95,5 | 81,5 | 93,1 | 84,9 | 84,3 | 82,1 | 67,8 | 76,4 | 63,2 | 64,4 |
| Grande São Paulo | | | | | 88,7 | 94,3 | | 81,3 | 52,9 | 94,2 | 75,8 | | 83,9 | 66,0 |
| Santos | | 98,6 | | 56,5 | 79,0 | 54,7 | 81,6 | 71,2 | 43,2 | 58,1 | 53,8 | 73,5 | 44,3 | 48,6 |
| São Sebastião | | | | | | 79,2 | | 51,2 | 22,1 | 85,3 | 45,9 | 60,1 | 66,9 | 55,9 |
| Sorocaba | | | | | | | | 86,9 | 79,9 | 98,1 | 66,3 | 79,5 | | 76,9 |

“Susceptível” (mortalidade entre 98 e 100%); “Susceptibilidade Diminuída” (mortalidade entre 80 e 97%) e “Resistente” (mortalidade abaixo de 80%).

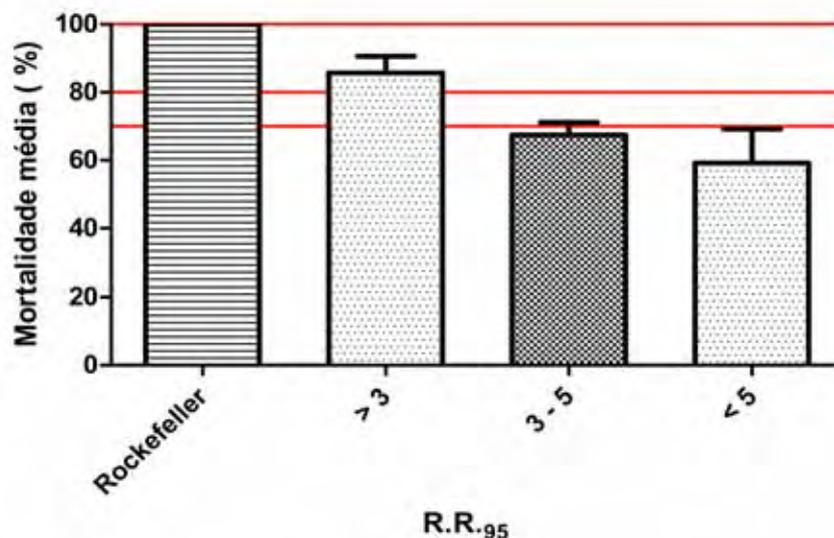
Avaliação da efetividade do tratamento com temephos em situação de campo simulado.

A resistência ao temephos pode causar a redução no tempo de seu efeito residual (RAWLINS, 1998).

Foi feita avaliação do efeito residual de formulações comerciais de temephos em 20 populações de *Aedes aegypti* que apresentaram algum R.R.₉₅ superior a 3. A metodologia dos bioensaios foi realizada conforme descrito por ANDRIGHETTI et al. (2008) e WHO (2005). As populações de *Aedes aegypti* de campo foram expostas de modo pareado com a cepa Rockefeller e a resposta biológica, medida como percentual de mortalidade das larvas expostas ao tratamento, foi relativizada tendo como resposta esperada a mortalidade observada para a cepa Rockefeller. Foi considerado satisfatório o percentual de mortalidade superior a 80 %.

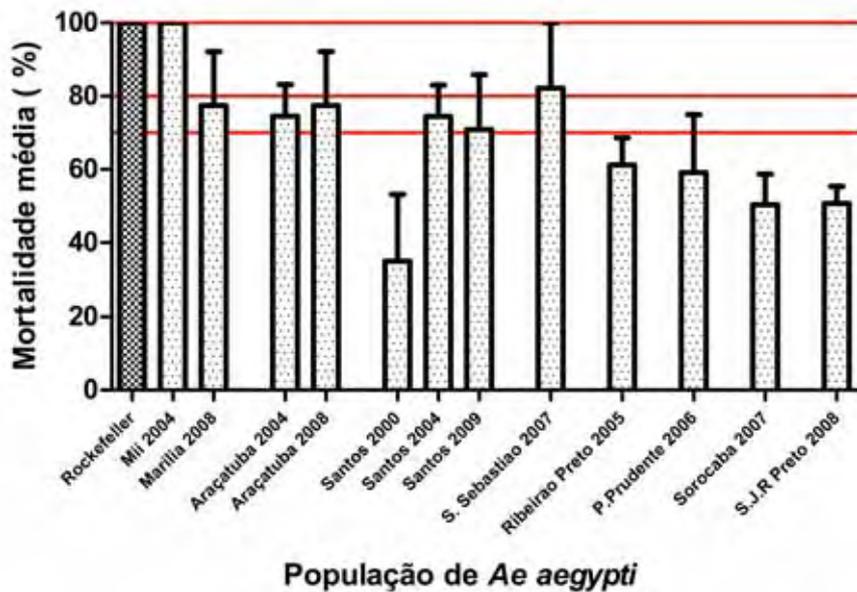
Os resultados foram agrupados de acordo com a R.R.₉₅ apresentada sendo o grupo I formado por 4 populações com R.R.₉₅ >3.0; grupo II, 12 populações com R.R.₉₅ entre 3 e 5 e grupo III, 4 populações com R.R.₉₅ >5.0. O percentual de mortalidade observado em cada tipo e réplica de recipiente foi agrupado segundo os grupos de R.R.₉₅. O percentual médio de mortalidade (desvio padrão) para cada grupo foi, respectivamente: 85,7 (12,0), 67,5 (7,4) e 59,2 (13,2). A diferença entre os percentuais médios de mortalidade entre os grupos foi significativa (ANOVA, p=0.0003). Os dados estão ilustrados no gráfico 2.

Gráfico 2. Percentual médio de mortalidade de populações de *Aedes aegypti*, segundo nível de resistência, expresso como R.R.₉₅.



Para o Programa de Controle, no entanto, houve necessidade de se caracterizar a resposta em campo segundo origem da população. A Rede MoReNAa indica substituição de produto quando o percentual de mortalidade for inferior a 70% do que foi observado para cepa susceptível. Seguindo este critério, a população de Santos foi a primeira a apresentar comprometimento de efetividade, tendo sido necessária a substituição do temephos em 2001, pelo biolarvicida á base de *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. Os testes de efetividade realizados entre 2005 e 2008 demonstraram haver comprometimento do efeito residual do larvicida em todas as populações testadas e apontaram a necessidade de substituição, em médio prazo, do temephos nas regiões de Araçatuba, Ribeirão Preto e São José do Rio Preto e Sorocaba e, em longo prazo, nas regiões de Bauru, Marília e Presidente Prudente. Os dados dos ensaios obtidos em provas de efetividade com temephos no período de 2000 a 2008 encontram-se no gráfico 3. A média de efeito residual obtido para as populações de campo está relativizada pelo tempo de efeito obtido para a cepa Rockefeller.

Gráfico 3. Percentual médio de mortalidade de populações de *Aedes aegypti* expostas ao tratamento com larvicida temephos, segundo origem e ano de avaliação.



Para o produto fenitrothion, que apresenta efeito larvicida e adulticida, os dados dos ensaios com estimativa de $R.R._{95}$ e dose diagnóstica encontram-se, respectivamente nas tabelas 3 e 4.

A evolução da resistência ao fenitrothion ocorreu, porém se deu num menor nível do que a do temephos. Os dados de resposta à dose diagnóstica de fenitrothion demonstram que a tendência da alteração do status “Susceptível” para o status de “Susceptibilidade Diminuída” é generalizada no estado. A “Susceptibilidade Diminuída”, evidenciada a partir de 2001, coincide com o período de introdução deste produto no tratamento perifocal. Na série de dados de 2000 a 2009, o incremento de $R.R._{95}$ foi em média de 50%. Apenas a população de Santos apresentou, na primeira avaliação $R.R._{95}$ superior a 3. Ao longo do período apenas 3 populações evoluíram para $R.R._{95}$ superior a 3: Barretos, São José do Rio Preto e Presidente Prudente

A avaliação de efetividade ao fenitrothion foi realizada apenas com insetos adultos por ser esta a fase principal do controle na modalidade que o produto é utilizado.

Tabela 3. Evolução da Razão de Resistência a fenitrothion. Estimativa em Concentração Letal 95%. São Paulo, 2000 a 2009.

| População | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 |
|-------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| R.R. < 2 | | | | | | | | | | |
| Bauru | 1,5 | 1,1 | 1,7 | 2,5 | 2,0 | - | 1,3 | - | 2,0 | 2,8 |
| Campinas | 1,9 | 1,7 | 2,0 | 2,2 | 1,9 | 1,8 | - | 1,6 | - | 2,5 |
| Marília | 1,8 | 1,9 | 1,8 | 2,5 | 1,8 | 1,9 | - | 1,6 | - | 2,9 |
| Presidente Prudente | 1,6 | 1,3 | 2,0 | 2,5 | 1,7 | - | 2,2 | 1,8 | 2,2 | 3,4 |
| R.R. entre 2 e 3 | | | | | | | | | | |
| Araçatuba | 2,2 | 1,7 | 2,7 | 3,4 | 2,6 | 2,6 | 2,0 | 2,4 | 2,3 | 2,9 |
| Barretos | 2,4 | 1,8 | 2,6 | 3,4 | 2,0 | 2,6 | 2,4 | - | 2,8 | 3,7 |
| Grande São Paulo | 2,6 | 2,5 | - | 1,9 | 1,9 | 2,4 | 1,9 | - | 2,1 | 2,6 |
| Ribeirão Preto | 2,6 | 2,4 | 2,7 | 2,9 | 1,8 | 2,5 | 2,0 | 2,4 | 2,4 | 2,9 |
| São José do Rio Preto | 2,7 | 2,3 | 2,5 | 2,5 | 2,2 | 2,5 | 2,1 | 2,2 | 2,5 | 3,2 |
| São Sebastião | - | 1,9 | - | 3,5 | 2,1 | 2,2 | 2,5 | 2,1 | 2,3 | 2,9 |
| Sorocaba | - | - | - | 2,5 | 2,2 | 2,2 | - | 2,2 | - | 2,5 |
| R.R. > 3 | | | | | | | | | | |
| Santos | 3,2 | 2,5 | 2,8 | 4,0 | 2,2 | 3,1 | 2,0 | 2,1 | 2,5 | 3,1 |
| Média Estado SP | 2,2 | 1,9 | 2,3 | 2,8 | 2,0 | 2,4 | 2,0 | 2,0 | 2,3 | 3,0 |

Tabela 4. Evolução da resposta biológica expressa em percentual médio de mortalidade. Larvas expostas à dose diagnóstica de fenitrothion, 0,01 mg/L. São Paulo, 1996 a 2009.

| FENITROTHION | Ano | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 |
| População | | | | | | | | | | | | | | |
| Bauru | 100 | 100 | 100 | 99,9 | 99,8 | 100 | 98,4 | 98,1 | 99,8 | - | 99 | - | 97,9 | 95,7 |
| Marília | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 98,4 | 97,3 | 99,6 | 95,7 | | 98,7 | | 94,4 |
| Campinas | | | 99,8 | 100 | 100 | 99,1 | 99,5 | 97,6 | 97,5 | 96,7 | | 98,3 | | 97,7 |
| Presidente Prudente | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 99,1 | 99,7 | 97,5 | 98,5 | | 95,2 | 97,9 | 96,3 | 89,3 |
| Araçatuba | 99,8 | 100 | 100 | 99,9 | 100 | 94,0 | 97,3 | 84,8 | 87,8 | 86,9 | 83,8 | 92,7 | 95,4 | 97,0 |
| Barretos | | | 100 | 99,9 | 100 | 99,6 | 91,7 | 87,8 | 95,1 | 80,7 | 81,3 | | 85,0 | 86,2 |
| Grande São Paulo | | | | | 99,7 | 97,0 | | 97,0 | 98,0 | 97,0 | 97,0 | | 98,0 | 97,0 |
| Ribeirão Preto | 99,0 | | | 100 | 100 | 94,6 | 93,9 | 91,5 | 98,7 | 92,3 | 94,6 | 92,9 | 92,5 | 93,8 |
| São J. Rio Preto | 100 | 100 | 100 | | 100 | 95,9 | 96,5 | 78,3 | 93,4 | 88,0 | 93,7 | 95,6 | 90,7 | 94,0 |
| São Sebastião | | | | | | 99,2 | | 93,4 | 96,0 | 94,5 | 86,8 | 96,2 | 97,3 | 93,1 |
| Sorocaba | | | | | | | | 93,0 | 90,5 | 95,5 | | 94,4 | | 97,3 |
| Santos | | | 100 | 99,9 | 99,8 | 87,1 | 83,0 | 76,3 | 90,4 | 83,4 | 94,7 | 96,3 | 95,1 | 91,6 |

“Susceptível” (mortalidade entre 98 e 100%); “Susceptibilidade Diminuída” (mortalidade entre 80 e 97%) e “Resistente” (mortalidade abaixo de 80%).

Suscetibilidade de insetos adultos

O Estado de São Paulo fez opção pelo uso de piretróides em tratamentos ambientais para o controle das formas adultas de *Aedes aegypti* em 1989 quando o produto cipermetrina foi introduzido. No Programa de Monitoramento a avaliação da susceptibilidade a este produto só teve início em 2000 pela falta de definição de uma dose diagnóstica para papéis impregnados.

As primeiras provas realizadas indicaram que, com exceção das populações de *Aedes aegypti* de Marília e Campinas, a resistência a este produto já estava disseminada no estado.

Tabela 5. Percentual médio de mortalidade de adultos de *Aedes aegypti* pela exposição à Dose Diagnóstica de Cipermetrina: 146 mg i.a./m². Papéis impregnados pela Sucen. São Paulo, 2000 a 2009.

| População/ Ano | 2000 | 2003/2004 | 2005/2006 | 2007/2008 | 2009 |
|---------------------|------|-----------|-----------|-----------|------|
| Araçatuba | 71,7 | 42,4 | 28,7 | 51,4 | 79,4 |
| Barretos | 71,4 | 83,8 | 20,8 | 52,1 | 77,4 |
| Bauru | 74,7 | 82,2 | 67,5 | - | 76,7 |
| Campinas | 88,0 | 82,9 | 88,9 | 93,5 | 72,3 |
| Marília | 87,7 | 92,6 | 83,7 | 93,4 | 93,6 |
| Presidente Prudente | 72,8 | 70,9 | 42,9 | 66,4 | 53,2 |
| Ribeirão Preto | 56,4 | 71,1 | 58,4 | 57,2 | 79,2 |
| Santos | 42,2 | 64,5 | 46,0 | 48,5 | 76,4 |
| S.J.R. Preto | 50,1 | 55,9 | 54,5 | 70,1 | 66,4 |
| São Sebastião | - | 68,3 | 32,0 | 60,7 | 78,3 |
| Sorocaba | - | 74,2 | 77,0 | 83,1 | 94,0 |

“Susceptível” (mortalidade entre 98 e 100%); “Susceptibilidade Diminuída” (mortalidade entre 80 e 97%) e “Resistente” (mortalidade abaixo de 80%).

A partir de 2006 também foi monitorada a susceptibilidade das populações a outro piretróide, deltametrina, uma vez que este produto passou a ser disponibilizado pelo Ministério da Saúde para uso em tratamento ambiental. A resposta para deltametrina (Tabela 6), assim como para cipermetrina, demonstra, ao longo do tempo, a manutenção da resistência das populações do vetor à classe dos piretróides no estado de São Paulo.

Tabela 6. Percentual médio de mortalidade de adultos de *Aedes aegypti* pela exposição à Dose Diagnóstica de Deltametrina 18 mg i.a./m². São Paulo, 2006 a 2009.

| População/ Ano | 2006 | 2007/2008 | 2009 |
|---------------------|------|-----------|------|
| Araçatuba | 45,1 | 34,0 | 38,1 |
| Barretos | 39,8 | 46,5 | 55,9 |
| Bauru | 64,5 | 69,0 | 83,0 |
| Campinas | - | 56,3 | 53,6 |
| Marília | - | 68,8 | 81,3 |
| Presidente Prudente | 53,4 | 32,7 | 46,0 |
| Ribeirão Preto | 38,8 | 24,1 | 49,1 |
| Santos | 25,4 | 24,3 | 58,0 |
| S. J. R. Preto | 65,6 | 57,0 | 47,4 |
| São Sebastião | 30,1 | 46,7 | 55,7 |
| Sorocaba | - | 48,8 | 68,1 |

“Susceptível” (mortalidade entre 98 e 100%); “Susceptibilidade Diminuída” (mortalidade entre 80 e 97%) e “Resistente” (mortalidade abaixo de 80%).

Com relação à susceptibilidade ao organofosforado malathion, o status “Susceptível” é geral no Estado, conforme descrito na tabela 7. Nos primeiros anos de avaliação houve diferenciação de resposta com “Susceptibilidade Diminuída” em 4 populações (Araçatuba, Campinas, Santos e São Sebastião). No entanto, ao longo do tempo, apenas as populações de Araçatuba e São Sebastião apresentaram, por mais de um ano, pequena “Susceptibilidade Diminuída”.

Tabela 7. Percentual médio de mortalidade de adultos de *Aedes aegypti* pela exposição à Dose Diagnóstica de Malathion 292 mg i.a./m². São Paulo, 2001 a 2009.

| População/ Ano | 2001 | 2003/3004 | 2005/2006 | 2007/2008 | 2009 |
|---------------------|------|-----------|-----------|-----------|------|
| Araçatuba | 97,6 | 90,3 | 87,0 | 100 | 100 |
| Barretos | 98,4 | 100 | 99,8 | 97,3 | 99,0 |
| Bauru | 99,5 | 98,4 | 100 | 100 | 100 |
| Campinas | 91,4 | 100 | 100 | 100 | 99,8 |
| Marília | 99,7 | 100 | 100 | 99,8 | 100 |
| Presidente Prudente | 100 | 100 | 100 | 99,4 | 99,5 |
| Ribeirão Preto | 99,8 | 100 | 100 | 99,8 | 100 |
| Santos | 96,7 | 100 | 98,3 | 99,4 | 99,5 |
| S. J. R. Preto | 100 | 100 | 100 | 96,7 | 100 |
| São Sebastião | 95,8 | 97,0 | 88,6 | 99,6 | 100 |
| Sorocaba | - | 99,4 | 100 | 100 | 99,5 |

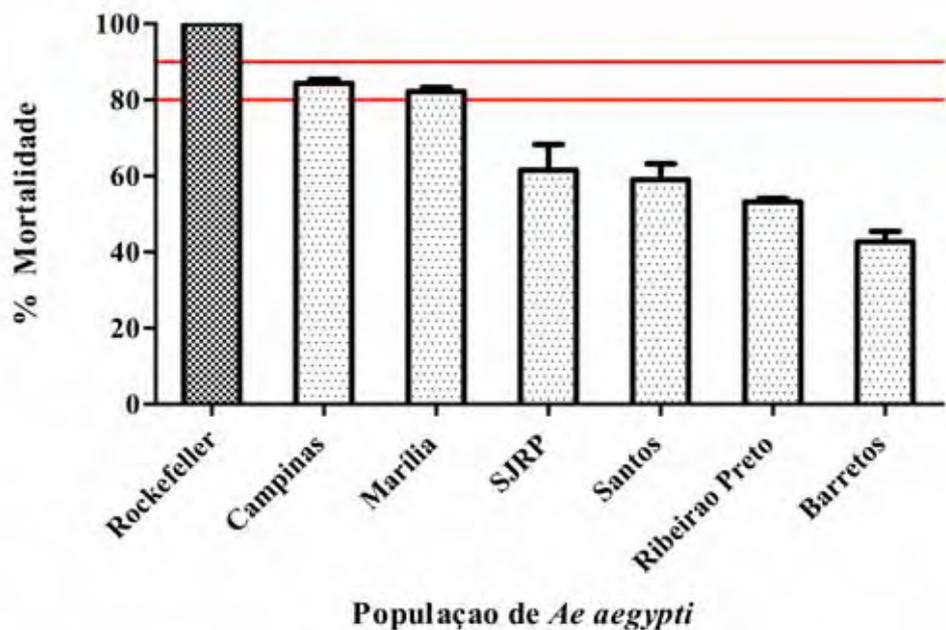
“Susceptível” (mortalidade entre 98 e 100%); “Susceptibilidade Diminuída” (mortalidade entre 80 e 97%) e “Resistente” (mortalidade abaixo de 80%).

Provas de efetividade com insetos adultos

Avaliação de efetividade do tratamento espacial a Ultra Baixo Volume (UBV)

Diante da caracterização da resistência a cipermetrina em 2000 foi necessário avaliar se a resistência observada em laboratório causava algum impacto nas ações de controle em campo. Foram realizadas provas de efetividade com gaiolas sentinelas nos municípios onde havia na época transmissão de Dengue: Barretos, Ribeirão Preto e Santos. Para comparar a resposta com uma população que apresentava em laboratório apenas diminuição de susceptibilidade, também foram realizadas provas com as populações de Marília e Campinas. Os resultados, ilustrados no Gráfico 4, evidenciaram que o percentual médio de mortalidade foi abaixo de 70% para as populações caracterizadas como “Resistente” e, portanto, dentro do critério para manejo com substituição do produto.

Gráfico 4. Percentual médio de mortalidade observado em populações de *Aedes aegypti* expostas em gaiolas sentinelas ao tratamento com cipermetrina (dose 0,6 g i.a/imóvel). Provas realizadas em 2000/2001.

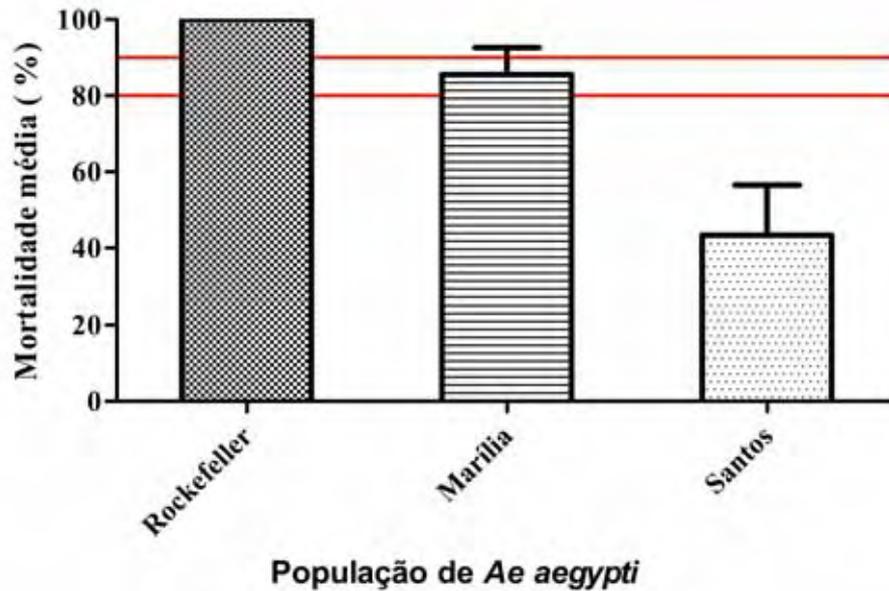


SJRP=São José do Rio Preto

Provas de efetividade com outros piretróides foram realizadas no intuito de se testarem alternativas dentro dessa classe de produtos. Provas com gaiolas sentinelas em tratamento espacial com permetrina foram realizadas em 2002 para as populações de Marília

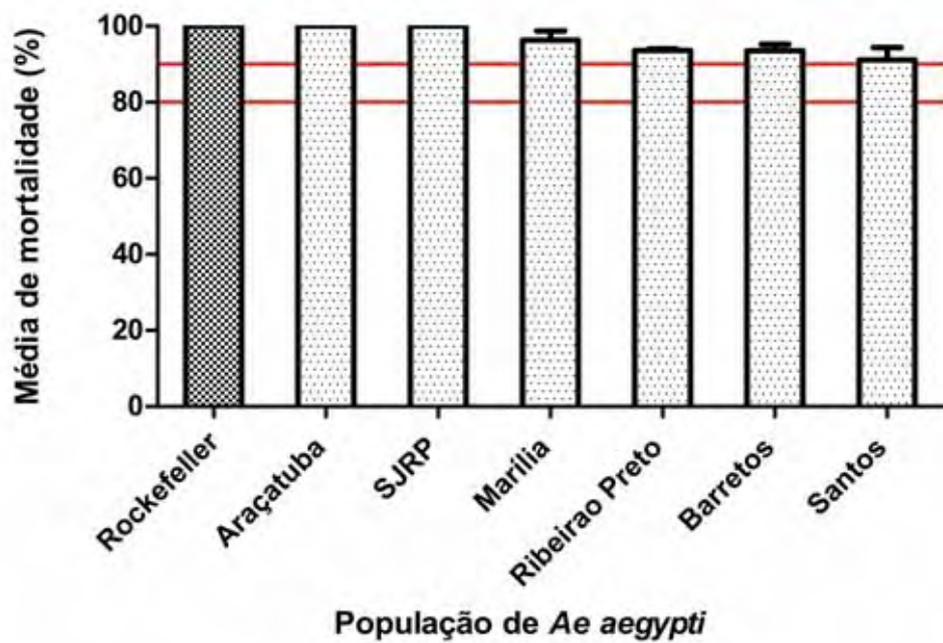
e Santos por estas representarem os dois perfis de, respectivamente, “Susceptibilidade Diminuída” e resistência a piretróide. Os dados ilustrados no Gráfico 5 demonstraram que para a população de Santos não apresentou nível de controle satisfatório para este produto.

Gráfico 5. Percentual médio de mortalidade em populações de *Aedes aegypti* em tratamento espacial com permetrina. Provas realizadas em 2002.



Visando avaliar a resposta em campo ao tratamento com o organofosforado malathion, para o qual em laboratório as populações do vetor eram susceptíveis, foram também realizadas provas com gaiolas sentinelas em tratamento a U.B.V. com este produto. Os resultados, ilustrados no Gráfico 6, indicaram níveis elevados de mortalidade em campo para todas as populações.

Gráfico 6. Percentual médio de mortalidade de populações de *Aedes aegypti* expostas em gaiolas sentinelas ao tratamento com malathion. Provas realizadas em 2002/2003.

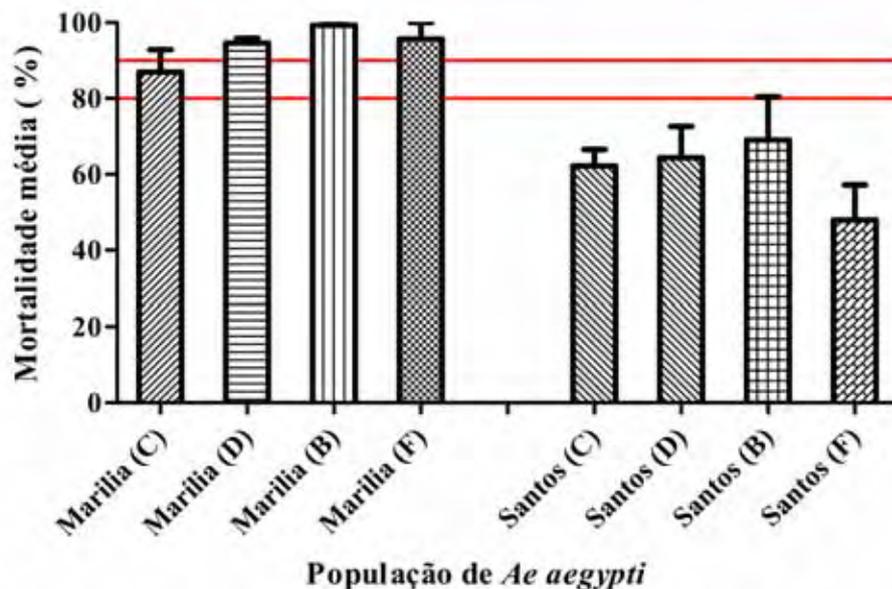


Avaliação de efetividade do tratamento de superfícies

Para avaliar a efetividade da modalidade de tratamento perifocal com adulticidas, onde superfícies são borrifadas com inseticidas, foi realizada uma série de bioensaios com insetos expostos á áreas tratadas, segundo a metodologia de prova biológica de parede (WHO 1996; 2006). Avaliou-se a resposta ao tratamento de superfícies com os três grupos de inseticidas: piretróides (cipermetrina e deltametrina), organofosforados (fenitrothion) e carbamato (bendiocarb). Nos bioensaios sempre foi pareada a resposta de populações com diferentes níveis de resistência a piretróides. A resposta foi expressa como média de mortalidade em comparação com a resposta observada para a cepa Rockefeller.

Os dados ilustrados no gráfico 7 demonstram que, enquanto para a população de mosquitos provenientes de Marília o nível de controle obtido era adequado para os três grupos de inseticidas, para os mosquitos de Santos não houve resposta adequada para nenhum produto testado.

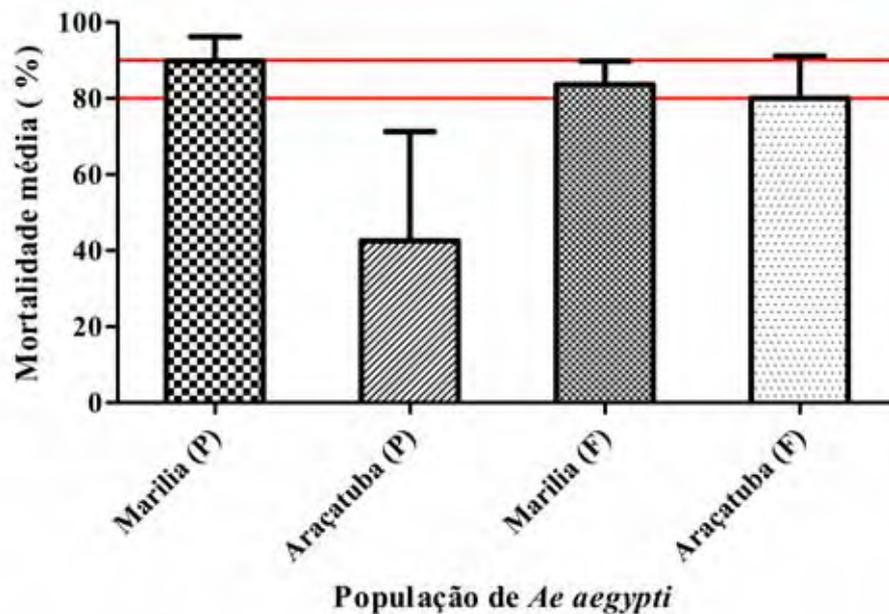
Gráfico 7. Percentual médio de mortalidade de populações de *Aedes aegypti* expostas a superfícies tratadas com piretróides, carbamato e organofosforado. Provas realizadas em 2002/2003.



C= cipermetrina D- deltametrina B- bendiocarb F- fenitrothion

Ainda foi comparada a resposta biológica entre os organofosforados fenitrothion e pyrimiphosmetyl. Os resultados, ilustrados no gráfico 8, demonstraram um maior nível de controle com o produto à base de fenitrothion.

Gráfico 8. Percentual médio de mortalidade de populações de *Aedes aegypti* expostas superfícies tratadas com inseticidas fenitrothion e pyrimiphosmetyl. Provas realizadas em 2002/2003.



F= fenitrothion P= pyrimiphosmetyl

Diante dos resultados das provas de efetividade nas duas modalidades de tratamento adulticida a opção do manejo foi interromper o uso de piretróides em todo o Estado de São Paulo. Entre 2001 e 2003, gradualmente, a cipermetrina foi substituída pelos organofosforados malathion e fenitrothion.

Mesmo com a interrupção do uso de piretróides para o controle de formas adultas, o nível de susceptibilidade ao produto cipermetrina continuou sendo monitorado e, a partir da disponibilização pelo Ministério da Saúde, em 2006 do produto deltametrina, este também passou a ser avaliado no Programa de Monitoramento, conforme dados da Tabela 6.

Visando avaliar o nível de efetividade em tratamento a ultra baixo volume com piretróides após um período de interrupção de seu uso, em 2007 foram realizadas novas provas biológicas com gaiolas sentinelas com mosquitos das populações de Araçatuba (“Resistente”) e Marília (“Susceptibilidade Diminuída”). Os resultados, no entanto, demonstraram comprometimento da efetividade, conforme ilustrado no gráfico 9, impedindo a recomendação de seu uso em campo.

A resposta ao adulticida organofosforado malathion também teve uma avaliação em provas com gaiolas sentinelas expostas ao tratamento espacial mais recente. Testes realizados em 2009 com as populações de Barretos e Marília são comparados aos resultados obtidos em 2000 para as mesmas populações, conforme ilustrado no gráfico 10.

Gráfico 9. Percentual médio de mortalidade de populações de *Aedes aegypti* expostas a tratamento UBV com deltametrina. Provas com gaiolas sentinelas realizadas em 2007.

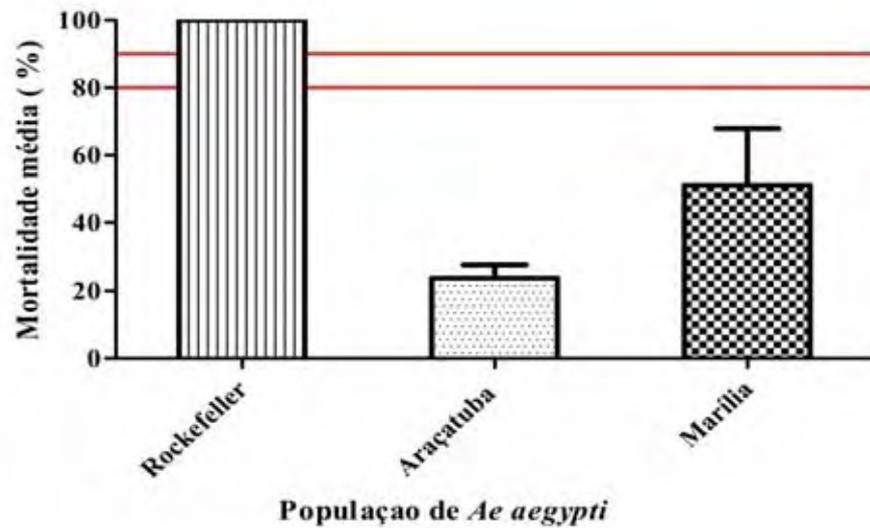
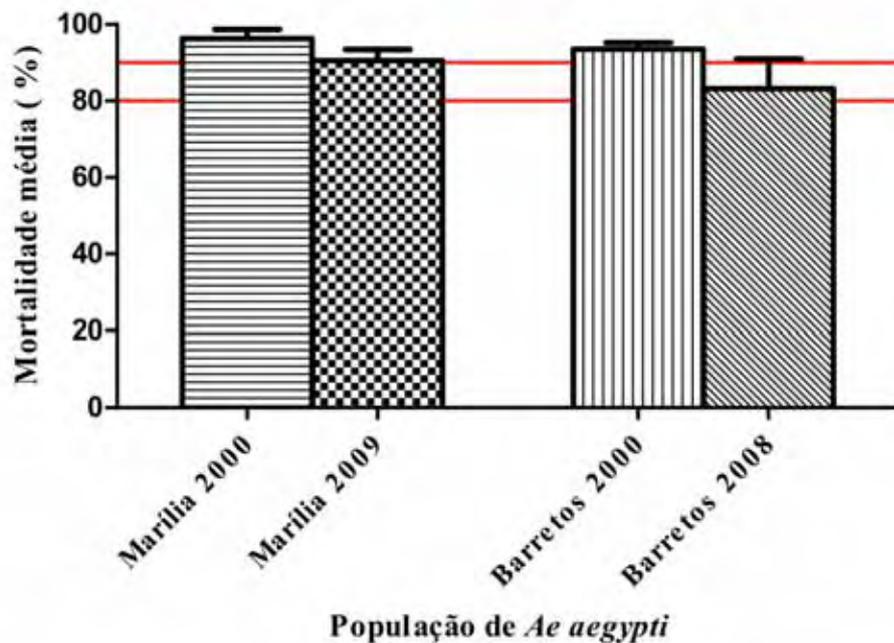


Gráfico 10. Percentual médio de mortalidade de populações de *Aedes aegypti* expostas ao tratamento UBV com malathion. Provas com gaiolas sentinelas realizadas em 2008/ 2009.



Discussão

O conhecimento do nível de susceptibilidade de vetores a inseticidas é fundamental para a definição de estratégias eficazes de controle das doenças por eles transmitidas.

A capacidade de um inseto resistir a um determinado inseticida é uma característica genética que normalmente ocorre em frequência muito baixa nas populações naturais. Populações de insetos resistentes surgem devido à seleção exercida pelo uso contínuo de inseticidas, uma vez que a eliminação de insetos suscetíveis favorece o aumento da frequência de genes resistentes (FERRARI, 1996). Assim, o uso contínuo de um determinado produto pode favorecer o desenvolvimento de resistência na população alvo de controle. O uso contínuo e disseminado de DDT para erradicação de *Aedes aegypti* na década de 50 propiciou o desenvolvimento da resistência deste vetor em praticamente todo o mundo (WHO, 1992).

Diante da identificação do impacto da resistência a inseticidas nos programas de controle de vetores - em especial no controle da malária - a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu a necessidade de se avaliar a suscetibilidade de insetos a inseticidas e propôs a padronização de bioensaios em 1960 (OMS, 1960). Tal padronização buscava permitir a comparação dos resultados e também a eficácia dos programas de controle de vetores, por meio de monitoramento periódico.

A partir da disponibilidade de métodos para identificação e quantificação da resistência a inseticidas, vários estudos tem sido relatados descrevendo o nível de susceptibilidade de vetores aos principais produtos utilizados (RANSON, 2009).

No entanto, os dados sobre susceptibilidade no geral se referem a avaliações pontuais. Poucos países monitoram continuamente o nível de susceptibilidade dos vetores. Destacam-se Cuba e Brasil. O Programa de Monitoramento da susceptibilidade de *Aedes aegypti* coordenado pelo Ministério da Saúde do Brasil é o único a realizar avaliações periódicas em grande extensão territorial. Um bom exemplo é o trabalho realizado no estado de São Paulo, onde o Programa de Monitoramento da susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas, coordenado pela SUCEN, com informação do anual desde 1996, pode permitir a compreensão da evolução da resistência deste vetor e contribuir para definição de estratégias de manejo.

O uso do critério da incidência de dengue para a definição de municípios sentinelas para serem monitorados foi adequado para a detecção de diferentes níveis de susceptibilidade aos inseticidas. A pressão de seleção de populações resistentes pelo uso

intenso e continuado de inseticidas pode ter contribuído para o estabelecimento de níveis mais elevados de resistência em populações do vetor provenientes dos municípios de Santos, São José do Rio Preto, Araçatuba e Barretos - historicamente com maior incidência da doença - do que os níveis em municípios com menor incidência: Bauru, Campinas, Marília e Presidente Prudente.

A susceptibilidade de larvas ao principal produto utilizado (temephos) foi sendo gradativamente diminuída em todo Estado. É importante ressaltar que, a partir de 2001, o uso de larvicida saiu da rotina de controle durante as visitas dos agentes nos imóveis ficando restrita a sua utilização em casos onde o supervisor da área concordasse em não haver possibilidade de solução do possível foco através de controle mecânico e na atividade de bloqueio durante transmissão de dengue. Tal restrição deveu-se ao fato de que no período de 1996 a 2000 já foi possível evidenciar mudança do status “Susceptível” para “Susceptibilidade Diminuída” em cinco municípios sentinelas. Mesmo com uso restrito, a susceptibilidade foi decrescendo. E desde 2006 não há mais nenhum município classificado como “Susceptível”. Sete municípios se caracterizaram como “Resistentes”, e quatro com “Susceptibilidade Diminuída”.

O nível de R.R.₉₅ igual ou maior que 3, critério de substituição do larvicida temephos, foi atingido em todas as populações avaliadas, exceto a população do município de Marília. As provas de efetividade do larvicida em situação de campo simulado demonstram a adequação do critério citado acima: a partir deste nível de R.R. já é possível ocorrer diminuição do efeito residual do produto. Uma vez que o Programa de Controle da Dengue preconiza uma periodicidade de visitas bimestrais, espera-se que o larvicida utilizado promova controle durante esse período. Estudos em Manaus realizados em 2001 (PINHEIRO & TADEI, 2002) demonstraram variação da duração do efeito de temephos em função do tipo de recipiente tratado e também da formulação comercial disponível. Uma diminuição do efeito pela resistência pode contribuir com essas variáveis para um menor controle a campo.

Comparando-se os níveis de resistência ao temephos das populações de *Aedes aegypti* do estado de São Paulo, verifica-se que estes estão bastante inferiores em relação às demais regiões do Brasil. Há registros de identificação de R.R._{90/95} superiores a 10 em Alagoas, Sergipe e Rio de Janeiro, em 2000, superiores a 20 nos estados de Sergipe e Pará em 2004 e superiores a 50 em Pernambuco e Bahia em 2008, 2009 (MONTELA et al, 2007; MELO-SANTOS, 2010; SUCEN, 2010). A diferença entre os níveis de resistência observados entre São Paulo e os demais estados pode ser atribuído à diferença de estratégia

de manejo. Enquanto todos estados utilizavam o larvicida organofosforado à base de temephos, houve diferença com relação ao uso de adulticidas. Enquanto São Paulo utilizou produtos do grupo dos piretróides de 1989 a 2000 (cipermetrina), os demais estados utilizaram também para as formas adultas, durante este período, produtos do grupo dos organofosforados (fenitrothion e malathion). A pressão de seleção com o mesmo grupo de inseticidas tanto para larvas como para insetos adultos pode ter contribuído para esta diferenciação (MACORIS, 2007), além da política de restrição de uso do produto.

O comprometimento da efetividade do temephos em condições de campo para populações resistentes foi caracterizado no Caribe na década de 90 (RAWLINS, 1998). Tal fenômeno já havia sido caracterizado no Brasil para populações com níveis de resistência (R.R.) superior a 10 (MONTELLA et al, 2007) e também no nível entre 5 e 10 (ANDRIGHETTI et al., 2008). Pelos dados das populações do estado de São Paulo se caracterizou que os níveis de R.R. entre 3 e 5 já apresentam algum grau de comprometimento do efeito residual.

Em São Paulo, a região de Santos foi a primeira a ser alvo de manejo, por sua sentinela apresentar comprometimento do controle com temephos em condições de campo em 2000. Um aspecto que torna difícil avaliar tal estratégia em Santos é a possibilidade de introdução de indivíduos resistentes de outras regiões, uma vez que a cidade abriga o maior porto do país. Diferentes estudos com caracterização genética apontam para uma diferenciação da população de *Aedes aegypti* de Santos em relação ao restante do Estado de São Paulo (BRACCO et al., 2007; MARQUES-DOS-SANTOS, 2003; PADUAN et al. 2006; PADUAN & RIBOLLA, 2008), sinalizando para a possibilidade de ter havido diferenciação no estabelecimento da espécie entre as regiões de São Paulo. Tal fato pode também explicar a diferenciação no nível de resistência observado em Santos, que é significativamente superior à média do estado.

Mesmo com essa ressalva, parece que a resistência a este produto seja de difícil reversão: a substituição de temephos por biolarvicidas na região de Santos ocorreu em 2001 e, até 2009, a população permanece com níveis semelhantes de resistência. BRAGA et al (2004) registra que o mesmo manejo realizado no Rio de Janeiro não foi suficiente para reverter a resistência, mesmo após 4 anos de troca de produto. Em estudo para comparação de técnicas de manejo em laboratório, MELO-SANTOS (2010) conclui que após 9 gerações do vetor criadas sem exposição ao temephos, houve diminuição do nível de resistência, porém sem a reversão para o status “susceptível”. De modo semelhante, WIRTH & GEORGHIOU (1999) registraram diminuição da resistência a temephos em uma cepa de

Tortola (Ilhas Virgens) de 46,8 em 1985 para 6,3 em 1995/6, ou seja, em 10 anos. Os níveis obtidos no final deste período, no entanto, não garantem efetividade em campo, segundo se pode concluir pelos nossos estudos.

Com relação à susceptibilidade de formas adultas de *Aedes aegypti*, o uso de cipermetrina por 11 anos no Estado de São Paulo (1989 – 2000) parece ter contribuído para desenvolvimento de resistência ao grupo de piretróides, pois esta resistência se evidenciou também para produtos não utilizados na rotina do programa de controle da dengue (deltametrina e permetrina).

Nenhuma das populações monitoradas no estado foi considerada “Susceptível”. Com exceção das populações de Campinas e Marília, todas as demais foram consideradas resistentes. As provas com dose diagnóstica não quantificam o nível de resistência. No entanto, a caracterização da resposta biológica aos piretróides, ao longo do período, embora oscilante, parece não ter sido alterada. Apenas houve mudança de status – de “Resistente” para “Susceptibilidade Diminuída”, na população de Sorocaba a partir de 2007 e de “Susceptibilidade Diminuída” para “Resistente”, na população de Campinas a partir de 2009.

Mesmo sem discriminar níveis de resistência, no entanto, a prova com dose diagnóstica para adultos foi sensível para detectar status nos quais há comprometimento da efetividade em campo. Todas as populações, caracterizadas como “Resistentes” nessas provas apresentaram resposta em campo abaixo dos níveis estipulados como aceitáveis (> 80% mortalidade ou > 70% da resposta da cepa susceptível de referência). As populações caracterizadas em laboratório como “Susceptibilidade Diminuída” apresentaram resposta em campo dentro dos níveis aceitáveis.

Não há registro na literatura sobre efetividade de formas adultas em campo em função do status de resistência para populações de *Aedes aegypti* e, portanto, nossos dados não podem ser comparados.

Com o comprometimento da efetividade de piretróides em campo, a estratégia de manejo utilizada foi substituição de cipermetrina pelos organofosforados malathion e fenitrothion para o controle de formas adultas. Nesse manejo há uma exceção, que é a utilização de piretróides em Araçatuba para o controle da leishmaniose visceral americana desde 2002 e, portanto, não houve interrupção da exposição de *Aedes aegypti* a esta classe de produtos.

Ainda devemos considerar que o referido manejo se restringe unicamente ao uso em ações de saúde pública pelo repasse de inseticidas do ministério da saúde para os municípios. O uso doméstico de inseticidas não é controlado e tampouco mensurável, já que não há disponibilidade de dados de consumo. Sabe-se que as formulações comerciais disponíveis no mercado são principalmente à base de piretróides e, pela escassez desses produtos em épocas de transmissão de dengue (verão), pode se inferir que seu consumo seja intenso. Estes aspectos dificultam a avaliação da estratégia de manejo adotada. Aparentemente, a resistência a piretróides em São Paulo se manteve inalterada por cerca de sete anos após sua interrupção de uso e os dados de efetividade de 2007 a 2009 sinalizam que o malathion seja ainda a indicação adequada.

Ressalta-se aqui o comentário de que a atual estratégia de utilização de inseticidas em São Paulo (grupo de organofosforados para larvas e insetos adultos) é a mesma utilizada no passado em outros estados e que, aparentemente, pode ter contribuído para os altos níveis de resistência ao larvicida. A recomendação da Organização Mundial de Saúde é de que se alternem grupos de inseticidas para as diferentes fases de desenvolvimento, visando diminuir a pressão de seleção de indivíduos resistentes (WHO, 1992). No entanto, a falta de alternativas de produtos a serem utilizados restringe as opções de escolha.

O controle da transmissão de dengue por meio da utilização de produtos químicos gera consequências não só para o meio ambiente, como também para a própria eficácia do controle, uma vez que o uso *contínuo* de inseticidas, independentemente da categoria a que pertençam, é condenado em qualquer ação de manejo da resistência (BROWN, 1986; GEORGHIOU et al., 1987; TABASHNICK et al., 1987; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992).

Os dados do Programa de Monitoramento da susceptibilidade de *Aedes aegypti* do estado de São Paulo confirmam a afirmação acima, acrescentando que a reversão da resistência estabelecida é um processo difícil e lento o que aponta para a necessidade de adoção de estratégias sustentáveis de controle em curto prazo.

Conclusões

Os dados do Programa de Monitoramento da susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas utilizados no controle de 1996 a 2009 demonstram que:

Houve um aumento do número de populações resistentes ao principal larvicida utilizado (temephos) com diferenciação do nível de susceptibilidade entre as populações do Estado de São Paulo com evidências de associação com a incidência acumulada de Dengue.

As ações de controle em campo são comprometidas em populações caracterizadas como “Resistentes” em laboratório indicando que o manejo deva ser adotado para populações que apresentem “Susceptibilidade Diminuída”.

A estratégia de manejo da resistência a temephos implantada em Santos (substituição por biolarvicida) não reverteu a resistência naquele município após sete anos de sua implantação.

A resistência de formas adultas de *Aedes aegypti* a piretróides detectada em 2000 não foi revertida após sete anos de interrupção de seu uso.

O uso de inseticidas é uma ferramenta auto limitada que deve ser preservada.

CAPÍTULO 2 EVALUATION OF METABOLIC ENZYMES ACTIVITY IN *Aedes Aegypti* RESISTANCE TO TEMEPHOS.

Manuscript submitted for publication in Acta Tropica
Submission number: S-10-0065

Authors:

Maria de Lourdes da Graça Macoris¹, Maria Teresa M. Andrighetti¹, Juliana Telles de Deus¹, Paulo Eduardo Martins Ribolla².

Affiliations:

1. Superintendência de Controle de Endemias. Núcleo de Pesquisa/Serviço Regional 11 Marília..
- 2 Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista – Unesp, Botucatu, SP, Brazil.

Abstract

The need to control Dengue transmission with insecticides has led to the development of resistance to the most used products in many parts of the world. In Brazil the Ministry of Health recognizes the importance of monitoring resistance of *Aedes aegypti* to the products under use on Dengue Programs. The monitoring scheme involves bioassays for characterization of resistance and biochemical assays aiming to detect resistance mechanisms. The difficulty of interpretation of data on biochemical tests rose when multiple mechanisms seem to be involved. In order to evaluate the role of metabolic enzymes on the resistance of *Aedes aegypti* to the larvicide temephos this study analyzed the data of enzyme activity and correlated them with the degree of resistance to temephos, measured by the Resistance Ratio (R.R.) of 37 field populations of the vector. In parallel, a laboratory study with selection pressure for resistance to the same product was performed with the measure of enzyme activities during several generations under pressure. While in field populations of the vector it was found a significant correlation between R.R. and esterases activity ($R^2 = 0.58$ and 0.28 , respectively for alpha and beta esterase, $p < 0.001$) the experiment in laboratory showed that, although all metabolic enzymes were altered before selection pressure, alpha esterase was presented increased activity after pressure with temephos ($R^2=0.89$, $p=0.016$). The meaning of the results for monitoring resistance and the impact on other insecticides detoxification are discussed.

Keywords: Resistance to temephos, *Aedes aegypti*, metabolic enzymes

Introduction

Dengue has become, in the last decades, one of the most important vector-borne diseases in the world with recorded prevalence in 120 countries and estimation that there are about 2.5 billion people around the world living in areas with dengue transmission risk (HALSTEAD 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2008). The mosquito *Aedes aegypti* is the most important vector of Dengue virus in the American region (GUBLER, 1989) and due to the lack of vaccines; this species has been target of chemical control with insecticides aiming to control Dengue epidemics.

In Brazil, re infestation of *Aedes aegypti* was documented in the 80s and since 2007 all the States are infested by the vector. Dengue transmission, initially restricted to the southeast and northeast regions in the 80s, now reaches all regions with epidemics waves especially on the last decade (PORTELA-CAMARA, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

The raise on Dengue cases is directly followed by a raise in insecticide use leading to resistance of the vector to the most used products. An average of 222 tons of active ingredient of organophosphates was used annually for dengue vector control globally in 2006 and 2007 (ZAIM & JAMBULINGAM, 2007). From this total 49% correspond to larvicide use. In Brazil, there is an annual consumption of 45,000 kg of temephos (Ministério da Saúde, personal communication). The intense use of this larvicide has led to the development of resistance in *Aedes aegypti* populations from different areas in Brazil. (MACORIS et al., 1999; BRAGA et al, 2004; RODRIGUEZ et al., 2002; LIMA et al., 2003; MACORIS et al. 2003; LUNA et al., 2004; LIMA et al., 2006; BESERRA et al, 2007; MACORIS et al., 2007). The development of resistance of *Aedes aegypti* to temephos is not restricted to the South America as it has been documented all over the world (RAWLINS, 1987; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992; HEMINGWAY & RANSON, 2000; JIRAKANJANAKIT et al. 2007; POUPARDIN et al. 2008; RANSON et al., 2009).

The definition of strategies for managing resistance depends on the knowledge of resistance mechanisms since the choice of insecticides aims to stop the process of selection of resistant populations. Insecticide resistance in insects may be due to different mechanisms which can act independently and can be synergized if more than one mechanisms act together. Resistance to organophosphates can be due to insensitivity of acetylcholinesterase, the target site of this class of insecticide, or due to an increase in metabolic efficiency through either super expression or super production of detoxifying enzymes. In *Aedes*

aegypti the target site insensitivity has not been incriminated as an important mechanism for temephos resistance. By the other hand, the role of detoxifying enzymes, or metabolic resistance, is well documented being esterases and glutathione- S-transferase related to temephos resistance in many studies (RODRIGUEZ et al., 1999; GOKHALE, 2000; HEMINGWAY and RANSON, 2000; BRAGA AND VALLE, 2007a; MACORIS et al., 2003; RODRIGUEZ et al 2007).

The finding of altered activity of detoxifying enzymes in field mosquitoes might not be elucidating of insecticide mechanisms of a specific insecticide especially when more than one group of enzyme is altered, which has been frequently found in *Aedes aegypti*. In order to evaluate the role of detoxifying enzymes on temephos resistance, besides measuring their activity in field collected samples, an experiment was made to measure them on a laboratory process for increasing resistance to temephos in an *Aedes aegypti* population. Enzyme activity was measured on several generations during the process of selection of resistant individuals and susceptibility of the progenies to adulticides was also measured in order to investigate possible cross resistance.

Materials and Methods

Evaluation of Resistance Ratio (R.R.)

Thirty seven field populations were characterized for resistance to temephos through the evaluation of Resistance Ratio (R.R.) which relates the insecticide concentrations that kill 50 or 95% of a susceptible strain with the concentrations that kill the same amount of a field population by dividing the latter from the susceptible data. A R.R. of 10 is considered high according to BROWN (1986) and MAZARRI & GEORGHIOU (1995) and likely to cause field failure of the insecticide. Lethal concentrations were estimated by the dose response of larvae to a gradient of insecticide concentrations (WHO 1981a,b) and R. R was calculated using the susceptible Rockefeller strain as reference. In this study, 80 larvae were exposed to each of a range of 8 temephos concentrations, divided in four replicates of 20 larvae. This was considered one assay where 640 larvae were used. For the characterization of temephos response for each field population and each generation of insects from the selection process a total of 3 assays were performed. The response to each assay (number of dead and live larvae in each concentration and in the control situation) was analyzed for

estimation of lethal concentrations using probit analyzes (WHO, 1998) with the Polo-Pc software (Leora software, 1987).

Selection of temephos resistant strain

The criterion for selecting a strain for the experiment of increasing the temephos resistance was the choice of a population which under field conditions already presented a R.R (L.C. $_{95}$) higher than 10 which is considered “high” level of resistance according to (BROWN, 1986; MAZARRI & GEORGHIOU, 1995). With this criterion and using the Brazilian Network for Monitoring Resistance of *Aedes aegypti* to Insecticides (MoReNAa) (BRAGA & VALLE, 2007b), it was chosen the population from Salvador city (BA) that presented at the first generation in lab (P1) the R.R (L.C. $_{95}$) of 10.6.

Aedes aegypti from Salvador was collected in field from August to September 2007 according to the sampling methodology of MoReNAa Network for egg collection (BRAGA & VALLE, 2007b) and insects were colonized in the laboratory of Superintendência de Controle de Endemias (Sucen) in Marília (SP) in October 2007. In the study the population was coded as SSA P(x) where x is the number of each generation under laboratory conditions.

Salvador city has a history of Dengue transmission since 1995 that means for the last 12 years the vector population has being target of intense chemical control which might has led to the development of the high level of the observed insecticide resistance.

Inbreeding

Five hundred *Aedes aegypti* female and 500 male reared from eggs collected at Salvador city were allowed to mate on a cage until a number of 15,000 eggs were obtained. Those eggs were used to characterize larvae and adult response to insecticides. Sequentially, eggs P₂ were reared to obtain female and male to form another colony and that was done until the colony P₅. The eggs from the generation P₅ were used for evaluation of biological and biochemical response and compared to data obtained in P₁ generation which is normally characterized on the routine for evaluation of *Aedes aegypti* resistance on the Brazilian Network.

Selection pressure for segregating resistant insects

Larvae from the colony Salvador P5 were exposed to the Lethal Concentration that caused 50 % mortality (L.C. 50%) on dose-response assays done for that generation. Exposition to L.C. 50% was done on bioassays using 25 larvae for replicate and water solution of temephos technical grade previously diluted on ethanol P.A. Six rounds of pressure for selection of resistant individuals were done from November 2008 to November 2009. In each round a minimum of 5 assays with exposition of 4000 larvae to the L.C. 50% obtained from the previous generation was performed. Surviving larvae were reared to adults that were used to form the next colony (500 female and 500 male).

Evaluation of metabolic enzymes activity

In order to evaluate the role of metabolic enzymes on temephos resistance , it was measured the activity of alpha and beta esterases, glutathion-S-transferase (GST) and multi-function- oxidase (MFO) on larvae from field populations as well as on larvae from generations P2 and P5 (before the selection pressure) and on generations P6, P7 and P10 (after selection pressure) through biochemical assays following the methodology proposed at the Centers of Disease Control – CDC (CDC, 1998; BROGDON 1984, 1989; BROGDON & BARBER 1990; BROGDON & MCALLISTER 1997, 1998). Single larvae were previously homogenized in 100 µl, and then diluted to 2 ml in 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 7.2. Aliquots of 100 µl were transferred to individual micro titer plate wells for each enzyme evaluation. One hundred and twenty larvae from each selection phase or field population were analyzed in triplicate per plate. The reactions for alpha, beta esterases and MFO were calibrated using a curve of absorbance for different concentrations of the product reaction. Absorbance was measured with a spectrophotometer. Results were expressed as enzyme activity per milligram of protein per minute, correcting the result by each larvae size, measured as a function of the total amount of measured protein (BROGDON, 1984) and the time of reaction of each enzyme. The Rockefeller strain was used as the susceptible reference standard. The results were expressed as mean enzyme activity. The analysis of enzyme activity on each generation of SSA population was performed as proposed by MINISTÉRIO DA SAÚDE (2006) where the percentage of individuals with enzyme activity higher than the Rockefeller 99 percentile classifies that activity as normal, altered or highly altered respectively for the ranges: below 15%, from 15% to 49%, and more than 50%.

Mean enzyme activity of field populations were analyzed with their respective R.R. (L.C. 95%) to temephos in order to detect possible correlation between these variables.

Evaluation of the effect of temephos resistance on adult susceptibility to insecticides.

In all generations of Salvador populations, susceptibility of adult mosquitoes was evaluated to the pyrethroid deltamethrin and to the organophosphate malathion. Bioassays with impregnated paper were done according to the WHO standardized methods (WHO, 1981b,c; 1992). For each insecticide four tests with 100 mosquitoes exposed were done. Results were interpreted according to WHO criteria (WHO, 1998) classifying the mosquitoes as resistant if mortality was below 80%, susceptible if mortality was higher than 97 % and with decreased mortality in the intermediate range.

Results

Evaluation of Resistance Ratio (R.R.) to temephos

Thirty seven field populations that were characterized for temephos resistance at MoReNAa Network were analyzed. Results showed low level resistance ($R.R. < 5 > 10$) in the majority of the studied populations. Seven showed $R.R. < 3$, 16 < 3 and > 5 ; nine populations with $R.R. < 5$ and > 10 and only five with $R.R. > 10$ which is considered high level resistance (BROWN, 1986). Only one population presented a very elevated R.R. (Jequié, (BA) R.R. of 63.6). Data of R.R. for each field population is listed on Table 01 together with the correspondent mean enzyme activity.

Table 1. Resistance Ratio at Lethal Concentration 95% of temephos and mean enzyme activity observed on field populations of *Aedes aegypti*.

| Population | Year | R.R. ₉₅ | Mean enzyme activity nmoles/mgprot/min | | | |
|-------------|------|--------------------|---|---------------|------|-------|
| | | | Alpha esterase | Beta esterase | GST | MFO |
| Rockefeller | 2009 | 1 | 23.51 | 15.80 | 1.35 | 24.36 |
| Botucatu | 2006 | 2.2 | 33.98 | 18.06 | 1.60 | 25.22 |
| Pirituba | 2008 | 2.3 | 25.40 | 20.69 | 1.89 | 22.22 |
| Marília | 2007 | 2.6 | 26.76 | 18.38 | 1.92 | 24.38 |
| Bauru | 2006 | 2.6 | 27.16 | 18.71 | 2.88 | 17.80 |
| Marília | 2009 | 2.7 | 37.80 | 17.79 | 3.24 | 31.34 |
| R. Preto | 2008 | 2.7 | 26.44 | 17.52 | 1.72 | 31.86 |
| Campinas | 2007 | 2.8 | 28.63 | 19.60 | 2.33 | 69.01 |
| Brasília | 2007 | 3.0 | 29.45 | 18.44 | 1.87 | 35.87 |
| Campinas | 2009 | 3.1 | 29.19 | 19.38 | 2.55 | 56.18 |
| Araçatuba | 2008 | 3.1 | 37.70 | 20.60 | 1.74 | 28.63 |
| R. Preto | 2009 | 3.1 | 33.65 | 19.98 | 3.16 | 23.19 |
| R. Preto | 2007 | 3.3 | 27.73 | 19.67 | 2.52 | 28.05 |
| Araçatuba | 2006 | 3.4 | 24.93 | 19.00 | 2.53 | 35.04 |
| Araçatuba | 2007 | 3.6 | 27.94 | 17.88 | 2.24 | 29.60 |
| S.Sebastião | 2007 | 3.7 | 26.51 | 18.73 | 2.63 | 63.56 |
| Santos | 2008 | 3.8 | 34.97 | 19.02 | 1.46 | 28.85 |
| F. Iguaçu | 2008 | 3.9 | 26.63 | 21.62 | 1.90 | 26.61 |
| PPrudente | 2008 | 4.1 | 26.65 | 19.92 | 2.66 | 25.41 |
| Sorocaba | 2009 | 4.1 | 34.63 | 20.88 | 4.31 | 32.59 |
| Jandira | 2006 | 4.2 | 36.38 | 21.01 | 2.37 | 34.62 |
| P.Prudente | 2009 | 4.2 | 29.94 | 18.57 | 1.58 | 39.58 |
| S.Sebastião | 2006 | 4.5 | 29.20 | 18.14 | 2.20 | 36.76 |
| SJR Preto | 2007 | 4.8 | 28.63 | 18.59 | 2.88 | 62.73 |
| Santos | 2009 | 5.0 | 32.10 | 22.54 | 3.92 | 18.18 |
| Maringá | 2009 | 5.2 | 31.27 | 22.26 | 3.42 | 35.83 |
| Rio Branco | 2007 | 5.2 | 48.49 | 23.59 | 2.65 | 34.17 |
| SJR Preto | 2009 | 5.4 | 37.80 | 19.90 | 4.67 | 32.99 |
| SJR Preto | 2008 | 5.6 | 28.41 | 17.39 | 2.06 | 25.51 |
| Bauru | 2008 | 5.7 | 25.84 | 20.61 | 1.37 | 25.32 |
| Barreiras | 2008 | 5.9 | 30.79 | 23.82 | 2.53 | 29.16 |
| São Luís | 2006 | 8.1 | 25.89 | 18.25 | 1.89 | 31.51 |
| Palmas | 2009 | 8.1 | 29.17 | 23.22 | 2.88 | 33.27 |
| Salvador | 2008 | 10.6 | 30.82 | 20.04 | 2.04 | 21.71 |
| Araguaína | 2009 | 12.9 | 31.57 | 18.34 | 3.42 | 34.92 |
| Fortaleza | 2004 | 14.9 | 56.33 | 70.03 | 2.07 | 26.02 |
| Parnaíba | 2004 | 17.0 | 57.28 | 25.25 | 2.07 | 28.69 |
| Jequié | 2009 | 64.6 | 70.92 | 46.50 | 2.42 | 27.84 |

Selection pressure for segregating resistant insects

At the inbreeding period, the evaluation of Resistance Ratio at each generation in laboratory revealed that after the third generation (SSA P3) the response of the strain to temephos was stabilized, considering that there was no difference between each generation when we analyze the fiducial limits of estimated Lethal Concentrations. While they differed from the second to the third generation raised in laboratory, it did not differ until the 5th generation which was the one that was used for the experiment of increasing resistance. The apparent raise on R.R might be a consequence of sampling since we were working with a population originated from field conditions. It also reflects that resistance did not impact on fitness of the strain since it was not affected by the absence of the insecticide during this period. After the third generation, the biological response seemed to be stabilized.

Data from the bioassays for selection of resistant individuals in each generation are on Table 2.

Table 2. Data from assays for increasing the SSA resistance to temephos.

| Selection Round | Generation | Dose (ppm) | Number of assays | Exposed Larvae | Dead Larvae | Mortality (%) |
|-----------------|------------|------------|------------------|----------------|-------------|---------------|
| First | P5 | 0,03 | 6 | 5695 | 2917 | 51,2 |
| Second | P6 | 0,04 | 5 | 3850 | 2130 | 55,3 |
| Third | P7 | 0,04 | 9 | 4624 | 1935 | 41,8 |
| Fourth | P8 | 0,05 | 5 | 3871 | 2061 | 53,2 |
| Fifth | P9 | 0,07 | 5 | 3882 | 2195 | 56,5 |
| Sixth | P10 | 0,085 | 5 | 2560 | 1226 | 47,9 |

On the sixth round of selection it was needed to use a larger number of larvae as the vigor of the strain was already diminished and it was observed an oscillation on mortality level on the assays. It was observed a high increase on temephos resistance, expressed by R.R. (L.C. 95%) which was raised from 10.6, detected on field collected population, to 42.9 after six rounds of selection. Data from lethal concentrations in each generation and respective slope are listed on Table 3.

Table 3. Lethal Concentrations (fiducial limits) and Resistance Ratios of temephos in each generation of *Aedes aegypti* from Salvador.

| Strain | L.C. ₅₀ * (mg/L) | L.C. ₉₅ ** (mg/L) | R.R L.C. ₅₀ * | R.R L.C. ₉₅ ** | Slope |
|-------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------|
| Rockefeller | 0.0032 (0.0031-33) | 0.0050 (0.0048-52) | - | - | 8,40 |
| SSA (P1) | 0.0280 (0.027-0.029) | 0.0530 (0.050-0.056) | 8.8 | 10.6 | 6,05 |
| SSA (P2) | 0.0290 (0.028-0.030) | 0.0520 (0.050-0.055) | 9.1 | 10.4 | 6,59 |
| SSA (P3) | 0.0360 (0.035-0.038) | 0.0750 (0.066-0.078) | 11.3 | 15.0 | 5.18 |
| SSA (P4) | 0.0310 (0.030-0.031) | 0.0760 (0.071-0.083) | 9.7 | 15.2 | 4.27 |
| SSA (P5) | 0.0350 (0.034-0.036) | 0.0710 (0.068-0.076) | 10.9 | 14.2 | 5.34 |
| SSA (P6) | 0.0440 (0.043-0.045) | 0.0870 (0.082-0.094) | 13.8 | 17.4 | 5.55 |
| SSA (P7) | 0.0390 (0.037 - 0.041) | 0.0950 (0.087-0.11) | 12.2 | 19.0 | 4,27 |
| SSA (P8) | 0.037 (0.033 - 0.040) | 0.0960 (0.095 -0.11) | 11.6 | 19.2 | 3.64 |
| SSA (P9) | 0.0700 (0.066 -0.072) | 0.1600 (0.15-0.18) | 21.9 | 32.0 | 4.42 |
| SSA (P10) | 0.0850 (0.08-0.09) | 0.2100 (0.19-0.24) | 26.5 | 42.9 | 4.14 |

*L.C. 50= Lethal Concentration 50%

**L.C. 95=Lethal Concentration 95%

Evaluation of metabolic enzyme activity.

On table 4 the activity of metabolic enzymes are expressed as mean, standard deviation, variance and the classification according to the criteria described above for each generation of SSA colony. Evaluation on the first generation showed alteration for all four enzymes, being GST the most altered with 53% of individuals presenting higher activity than the Rockefeller 99% percentile. Analysis of variance (One-way ANOVA) showed that, except for GST, all enzymes increased after exposition to temephos. After selection pressure, it was observed an increase on esterase enzymes activity and the classification changed from “altered” to “very altered” (more than 50% of individuals with higher activity than the 99 percentile of Rockefeller strain). Linear regression between mean enzyme activity and Resistance Ratio showed significant results only for alpha esterase $p=0.016$ and R^2 of 0.89. For beta esterase, even with the modification on alteration status, the correlation

was not significant. There was also an increase on MFO activity but not enough for an alteration on status of alteration. The GST activity which was the higher on field collected sample remained almost the same on generations after insecticide exposition.

Table 4. Results from enzyme activity measured on SSA population.

| Enzyme | Population/ Strain | Number individuals | Median | Mean | S.D. | Variance | N > p99 | %>p99 | Status* |
|--------|-----------------------|-----------------------|--------|-------|-------|----------|---------|-------|---------|
| ALFA | Rockefeller | 120 | 23,02 | 23,51 | 3,20 | 10,22 | | 32,7 | |
| | SSA P2 | 120 | 30,24 | 30,82 | 4,84 | 23,41 | 37 | 30,8 | A |
| | SSA P5 | 118 | 30,92 | 31,96 | 5,88 | 34,57 | 39 | 33,1 | A |
| | SSA P6 | 116 | 31,10 | 31,93 | 5,17 | 26,68 | 44 | 37,9 | A |
| | SSA P7 | 115 | 32,96 | 33,46 | 5,08 | 25,85 | 61 | 53,0 | VA |
| | SSA P10 | 120 | 34,15 | 35,45 | 5,65 | 31,96 | 73 | 61,3 | VA |
| BETA | Rockefeller | 119 | 15,72 | 15,80 | 2,03 | 4,14 | | 20,77 | |
| | SSA P2 | 118 | 20,03 | 20,04 | 2,93 | 8,57 | 44 | 37,3 | A |
| | SSA P5 | 118 | 19,87 | 19,83 | 4,01 | 16,09 | 39 | 33,1 | A |
| | SSA P6 | 116 | 19,89 | 20,73 | 4,31 | 18,57 | 45 | 38,8 | A |
| | SSA P7 | 115 | 21,98 | 22,65 | 4,35 | 18,92 | 73 | 63,5 | VA |
| | SSA P10 | 118 | 21,80 | 22,46 | 4,15 | 17,25 | 70 | 59,3 | VA |
| GST | Rockefeller | 120 | 1,38 | 1,35 | 0,32 | 0,10 | | 1,99 | |
| | SSA P2 | 120 | 2,03 | 2,07 | 0,39 | 0,15 | 64 | 53,3 | VA |
| | SSA P5 | 119 | 1,93 | 2,09 | 0,60 | 0,36 | 52 | 43,7 | A |
| | SSA P6 | 117 | 2,03 | 2,08 | 0,51 | 0,26 | 62 | 53,0 | VA |
| | SSA P7 | 115 | 2,07 | 2,10 | 0,46 | 0,21 | 65 | 56,5 | VA |
| | SSA P10 | 119 | 2,07 | 2,11 | 0,56 | 0,31 | 67 | 56,3 | VA |
| MFO | Rockefeller | 115 | 24,21 | 24,36 | 2,18 | 4,75 | | 28,0 | |
| | SSA P2 | 118 | 25,41 | 26,02 | 3,54 | 12,54 | 30 | 25,4 | A |
| | SSA P5 | 118 | 25,34 | 25,54 | 3,31 | 10,98 | 28 | 23,7 | A |
| | SSA P6 | 116 | 26,03 | 26,80 | 6,59 | 43,43 | 34 | 29,3 | A |
| | SSA P7 | 108 | 26,59 | 27,03 | 4,30 | 18,50 | 42 | 38,9 | A |
| | SSA P10 | 120 | 25,48 | 29,14 | 14,38 | 206,72 | 51 | 42,5 | A |

*A= Altered; VA= Very altered

Mean enzyme activity measured on 37 field *Aedes aegypti* populations were paired with data from Resistance Ratio at LC 95% obtained for the same populations on bioassays with temephos and are listed on Table 1. Pearson correlation coefficient was calculated for each pair of enzyme and the R.R. value. Results showed significant correlation only with esterase enzymes activity with p value <0.001 for alpha esterase and 0.0006 for beta esterase but with rather low R² values (respectively 0.58 and 0.28 for alpha and beta esterase).

Biological response to adulticides

Results of susceptibility tests of adults in each generation are on Table 5. Although it was observed a small change on generations 4 and 7, the susceptibility profile of decreased susceptibility to deltamethrin was the same even after selection pressure for temephos resistance on larval stage. For the organophosphate malathion there was no change of susceptibility in all generations. Similar data were observed by Rodriguez et al. (2002). Those results indicate that resistance to temephos did not interfere on adult resistance to insecticides. MAZZARI & GEORGHIOU (1995), in an experiment of increasing resistance to temephos found cross resistance to deltamethrin on adult stage.

Table 5. Average mortality observed on bioassays with *Aedes aegypti* adults exposed to diagnostic dose of insecticides. WHO method of impregnated paper.

| Insecticide/ Dose | MALATHION 292 mg.a.i./m ² | | DELTAMETHRIN 18 mg.a.i./m ² | |
|----------------------|---|------------------|---|------------------|
| | % mort. | Number assays | % mort. | Number assays |
| SSA P1 | 100 | 4 | 91,9 | 4 |
| SSA P2 | 98,3 | 4 | - | - |
| SSA P3 | 100 | 4 | 94,7 | 4 |
| SSA P4 | 100 | 4 | 98,7 | 4 |
| SSA P5 | 100 | 5 | 96,7 | 5 |
| SSA P6 | 100 | 4 | 83,5 | 5 |
| SSA P7 | 100 | 5 | 98,6 | 4 |
| SSA P8 | 100 | 4 | 81,1 | 5 |
| SSA P9 | 100 | 4 | 92,0 | 4 |
| SSA P10 | 100 | 4 | 94,0 | 4 |

% mort = Percentage of mortality
a.i. active ingredient

- = not tested

Discussion

Dengue is actually one of the most important vector borne disease with epidemic cycles in increasing levels occurring on the tropical area since the beginning of the 80's (NATHAN & DAYAL-DRAGER, 2009). The need for controlling dengue transmission through vector control has increased the consumption of insecticide worldwide (ZAIM & JAMBULINGAM, 2007) and, as a consequence, resistance to the main products used on vector control programs has been documented on *Aedes aegypti* specially in regions of high

incidence of the disease: Americas and Asia (RANSON et al., 2009). Among the most used products for controlling *Aedes aegypti* are the larvicide temephos (organophosphate) and the adulticide deltamethrin (pyrethroid) and resistance to them is well documented in several parts of the world (RANSON et al., 2009). The effect of resistance to insecticides on field treatments depend on the level of resistance (BROWN, 1986) and the failure of field treatments is a concern of the World Health Organization since 1960 when the widespread resistance to DDT in *Aedes aegypti* made it impossible to use this product for this species. For the organophosphate temephos, the impact of resistance first described by RAWLINS (1998) in the Caribbean area is a shortened residual effect. This phenomenon was also observed in Brazil where *Aedes aegypti* populations with high R.R. (over 10) presented a decreased residual effect to treatment with temephos (MONTELLA et al, 2007). This effect compromises the routine of vector control in the Brazilian National Program for Dengue Control which is scheduled for bimonthly visits in the houses, period when it is expected that treated containers would be under larvicide control.

In Brazil the concern with insecticide resistance has led to the establishment of a laboratory network for monitoring resistance of *Aedes aegypti* to insecticides (BRAGA & VALLE, 2007b). The identification of presence of resistance, its level and its impact on field control activities are important tools that have been used to subsidize resistance management and to guarantee the efficacy of the National dengue control program – PNCD (FUNASA, 2002).

Among the mechanisms of resistance to insecticides, one of the most important is the metabolic resistance, which is the result of a structural change in an enzyme molecule causing an increase detoxification of insecticide or in the amount of enzyme production (FERRARI, 1996). The elevated activity of detoxifying enzymes has been described in *Aedes aegypti* resistant to the organophosphate temephos while alteration on the target site of this class of insecticide has not been evident on field populations of this species.

To date, the identification of alteration on enzyme activities were correlated to data from laboratory and field assays and possible relations of mechanisms of resistance were suspected. But as populations collected in field may have being under different process for selection of resistance, the correlations with mechanisms of resistance is not an easy task.

In *Aedes aegypti*, as well as in *Culex quinquefasciatus* (GEORGHIOU & PASTEUR, 1978; DARY et.al., 1990; WIRTH et al., 1990), increased esterase activity has been documented on temephos-resistant populations (GOKHALE ET AL., 2000; HEMINGWAY et al., 1989; MACORIS et al., 2003; MOURYA et al., 1993; RODRIGUEZ et al, 1999;

VAUGHAN et al., 1998). But as this is not the only class of enzyme which is more active on temephos resistant *Aedes aegypti*, the alteration observed on GST (RODRIGUEZ et al., 1999; BRAGA et al., 2005) and MFO (BRAGA & VALLE, 2007a) show that the mechanism of resistance might involve all the enzymes on different scales.

Laboratory studies with increasing resistance through pressure with temephos have been performed aiming to identify mechanisms of resistance and possible cross resistance to other insecticides (WIRTH & GEORGHIOU, 1999; RODRIGUEZ et. al, 2002; MELO-SANTOS, 2010; TIKAR, 2009).

The results are not easily compared and the comprehension of them might be elucidated by the theoretic base of insecticide resistance evolution. As described by FERREIRA (1996) and NAZNI et al. (1998), the evolution of resistance depends on genetic characteristics (presence or initial frequency of the resistance gene and its dominance); operational aspects that represent the level of selection pressure (frequency of treatments, dose, class of insecticides that the insect is exposed) and biological aspects (number of offspring, fitness cost of resistant individuals, duration of reproductive cycle).

The amount of increase of resistance, measured as increase in Resistance Ratio in relation to susceptible strain gave different results on these studies. While RODRIGUEZ et al (2002) obtained a 11-fold increase after six generations under temephos pressure, WIRTH & GEORGHIOU (1999) obtained only a 4-fold increase after 14 generations and in both studies the selection pressure was comparable (exposition to L.C. 90). As the initial resistance was higher on WIRTH & GEORGHIOU's strain (RR 46.8) than on the Rodriguez's strain (RR 19.6), biological aspects might have played important roles on the process. The smaller increase in resistance was obtained by WIRTH & GEORGHIOU (1999) -4-fold but, as their initial resistance was high, fitness cost of resistance might not permit resistance to arise.

TIKAR (2009) and MELO-SANTOS (2010) experiments were followed to a similar number of generations, respectively, 24 and 25. While the former presented a 20-fold increase in a susceptible laboratory strain, the latter obtained a 7-fold increase on a field resistant population with initial RR 7.0. Here the main difference on experiments was the selection pressure. While TIKAR (2009) submitted each generation to a LC 90%, MELO-SANTOS (2010) submitted them to a LC 50%.

Even considering the differences outlined above, some similar results are elucidative.

RODRIGUEZ (2002) field collected strain also presented high activity of several enzymes (alpha and beta esterase, MFO and GST) and just like we observed, after selection

pressure with temephos there was an increase on esterases and GST. MELO-SANTOS (2010) has found high activity of GST enzyme, with the expression of this alteration also observed on adult stage. But, as the enzymes activities was not measured during the process of increasing the resistance to temephos, it is not possible to assure that this is the mechanism, although it is quite evident this enzyme involvement.

The absence of cross resistance to the adulticide malathion observed in our study was also observed by RODRIGUEZ (2002) and MELO-SANTOS (2010). This information is important for adult control as malathion is one of the few alternatives for U.L.V. treatments. TIKAR (2009) has found a small cross resistance to malathion but it was the smallest among the insecticides he studied and it was evident only after 8 generations. The higher degree of cross-resistance that he described among temephos to fenthion and chlorpyrifos was ascribed to their group phosphorothionate while malathion belongs to the phosphorodithioate group. RODRIGUEZ-COTO et al. (2000) described a difference on evolution to malathion resistance between *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* from areas infested by both species in many countries of the Caribbean and South America regions. While *Culex quinquefasciatus* presented high levels of resistance to malathion, *Aedes aegypti* only presented RR around 2 (ZIV & BROWN, 1969) already inferred that detoxification by esterase was not an important mechanism of malathion resistance in *Aedes aegypti*. An specific carboxylesterase seems to be involved on malathion resistance (FERRARI, 1996).

The characterization of field populations according to enzyme activity has not been easy since many enzymes are altered on resistant populations. And on multiple resistant insects many mechanisms might be involved.

The data obtained in this study, where metabolic enzyme activity measured on a relative large number of field *Aedes aegypti* populations may support the previous findings with the additional information provided by the study of increasing resistance to temephos in laboratory since evaluation of enzyme activity were measured during this process.

Our results indicate that the detoxification of temephos by esterase enzymes is the main mechanism of resistance to this xenobiotic. But, two important considerations must be made about the results. The first is that *Aedes aegypti* presents many members of enzymes families: 49 esterases; 160 CYT P450s and 26 GST members (STRODE, 2008). Not all might be reacting on the substrates used on biochemical assays (MONTELLA et al., 2007, MELO-SANTOS, 2010). The second is that esterases, together with MFO are class I enzymes, involved on general response to xenobiotic and might not be specific to

degradation of temephos. In this sense, they might be acting together with GST, class II enzyme which would be involved on the degradation of the insecticide.

The high cross resistance to pyrethroids observed by WIRTH & GEORGHIOU (1999) and RODRIGUEZ et al. (2002) was not observed by us and neither by MELO-SANTOS (2010) and the last two studies were performed with Brazilian *Aedes aegypti* populations. One possible explanation might be the level of resistance of the two studies which were much higher than the R.R. obtained in our study with the SSA population. While we have obtained a R.R. of 42.2 at L.C 95, WIRTH AND GEORGHIOU (1999) and RODRIGUEZ et al. (2002) obtained, respectively, R.R. 146.8 at L.C. 95 and R.R. 132.29 at L.C. 90. Resistance to pyrethroids described by those two studies was related to degradation of the insecticides by esterase enzymes. Even with the higher activity of esterases in larvae being observed on our study, their expression in adults, which could be one mechanism involved on the cross resistance to pyrethroids, seemed not to be acting as observed by the susceptibility tests with adults, although we have not measured enzyme activity on this life stage.

Conclusions

The present study characterizes the involvement of esterases enzymes the resistance of *Aedes aegypti* to temephos. This fact highlights the need for surveillance and monitoring the frequency of this mechanism on field populations of the vector since it might also be involved on the degradation of other groups of insecticides, mainly pyrethroids, which are also, used on routine of many Dengue control Programs.

As in the Brazilian Network for Monitoring resistance of *Aedes aegypti* has detected that temephos resistance is widespread in the country, the knowledge of which mechanism is involved is important for the choice of management strategy. The fact that resistance to temephos did not caused cross resistance to the adulticide malathion supports the use of this product as an alternative for populations with resistant to pyrethroids.

CAPÍTULO 3 ESTUDO GENÉTICO DAS POPULAÇÕES DE *Aedes Aegypti* SENTINELAS DO PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA SUSCEPTIBILIDADE A INSETICIDAS NO ESTADO DE SÃO PAULO.

Introdução

Atualmente a única forma de controle da dengue é através do controle do vetor, uma vez que não existe vacina ou mesmo drogas antivirais específicas (GOMEZ-DANTES et al., 1991; GUBLER & TRENT, 1993). Dentre as formas de controle do vetor, o controle químico, com uso de inseticidas é uma ferramenta importante, com uso principalmente indicado para interrupção de transmissão de dengue. Para um efetivo controle químico é fundamental, além das questões operacionais de aplicação, que a população de insetos seja susceptível aos inseticidas utilizados.

No Brasil, a diferença de exposição a inseticidas observada entre as regiões Sudeste e Nordeste parece ter influenciado o nível de susceptibilidade a inseticidas das populações de *Aedes aegypti* destas regiões com registro de desenvolvimento de diferentes níveis de resistência aos inseticidas disponíveis (BESERRA et al., 2007; LIMA et al., 2004; MACORIS et al., 2007). Há evidências de que haja variabilidade genética entre as populações de *Aedes aegypti* destas duas regiões do país, o que pode se relacionar ao padrão de susceptibilidade a inseticidas (PADUAN et al., 2006).

Em São Paulo, anualmente são monitoradas populações de *Aedes aegypti* quanto a sua susceptibilidade a inseticidas. Este monitoramento iniciado em 1996 tem demonstrado haver diferenciação de níveis de susceptibilidade a inseticidas entre as populações consideradas como “sentinelas” para suas respectivas regiões (MACORIS et al., 1999; MACORIS et al., 2003). Por sentinela se entende que a população reflita o uso mais intenso de inseticida ocorrido na região e as ações de manejo de resistência deflagradas tem como parâmetro a resposta biológica dessa população a provas de efetividade do controle químico (BRAGA & VALLE, 2007b).

Considerando que há indícios de que haja diferenciação genética entre as populações do Estado de São Paulo (MARQUES DOS-SANTOS et al., 2003, PADUAN et al., 2006, PADUAN & RIBOLLA, 2008) e, considerando que a diferenciação ou semelhança entre as populações pode sinalizar para uma revisão das unidades sentinelas no Programa de Monitoramento da susceptibilidade a inseticidas, este estudo objetivou caracterizar populações do estado de São Paulo com diferentes níveis de susceptibilidade a inseticidas, segundo histórico deste Programa.

Metodologia

Populações do estudo

As populações do mosquito *Aedes aegypti* utilizadas neste estudo têm apresentado diferentes perfis de resistência aos inseticidas, em ensaios bioquímicos e biológicos realizados no Programa de Monitoramento da susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas, da Superintendência de Controle de Endemia – Sucen (MACORIS et al., 2007).

Para o estudo de caracterização genética foram analisados mosquitos provenientes de coleta realizada no ano de 2007, nos municípios de Araçatuba, Campinas, Marília, Presidente Prudente, Santos, São José do Rio Preto e São Sebastião.

As populações dos municípios de Santos/SP e São Sebastião/SP apresentam níveis elevados de resistência, embora tenham sido colonizadas em épocas diferentes: Santos em 1980, com erradicação pouco tempo depois, e re-colonização em 1995, e São Sebastião em 1996. Pela proximidade geográfica e pela semelhança de resposta biológica, suspeitava-se que a população de São Sebastião tenha sido colonizada a partir da população de Santos. Alguns estudos (MARQUES-DOS-SANTOS et al., 2003; PADUAN et al. 2006; PADUAN & RIBOLLA, 2008) relatam que a população de Santos apresenta um padrão genético diverso das demais populações do Estado de São Paulo. Assim, esta análise visa caracterizar se esta população, cuja origem possa ser distinta das demais populações do Estado, tem as mesmas características que a população de São Sebastião. Este dado se mostra fundamental para questões de manejo da resistência, uma vez que caracterizadas semelhanças ou diferenças entre as populações, as medidas de controle e manejo poderão ser otimizadas.

As populações de Marília e Presidente Prudente historicamente apresentaram níveis elevados de susceptibilidade ao larvicida temephos (MACORIS, 1999) enquanto que as populações de Campinas e São José do Rio Preto apresentavam “Susceptibilidade Diminuída” a este produto. De 1996 a 2009 foi observada uma tendência de perda da susceptibilidade a este produto tendo as populações de Araçatuba e São José do Rio Preto mudado do status “Susceptibilidade Diminuída” para “Resistente” ao passo que as populações de Marília e Presidente Prudente mudaram do status “Susceptível” para o status “Susceptibilidade Diminuída”.

A população de Campinas, por outro lado, permaneceu com o mesmo nível de diminuição de susceptibilidade ao longo do mesmo período. Com relação à susceptibilidade

dessas populações a produtos adulticidas, todas se mostram susceptíveis ao organofosforado malathion e a maioria é resistente ao piretróide cipermetrina. As populações de Campinas e Marília apresentam status de "Susceptibilidade Diminuída" (SUCEN, 2010). Pela variabilidade de resposta biológica, essas populações foram incluídas na análise genética.

Estudo Genético Populacional por SNPs

Preparação e Quantificação do DNA

O DNA genômico foi extraído de mosquitos inteiros, triturados com auxílio de um pistilo, em tampão de extração utilizando-se resina Chelex100® Molecular Biology Grade Resin (Bio-Rad Laboratories), preparada a 5% conforme as recomendações do fabricante. A concentração do DNA foi estimada submetendo-se 2 µL do DNA de cada amostra ao espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000). Após quantificação amostras foram diluídas a 10 ng/µL e acondicionadas em placas de 96 poços.

Marcadores SNPs

Os estudos foram inicializados utilizando nove marcadores SNPs para os genes AeMUC1 (Mucin-like protein), apolLp-II (Apolipoprotein II), Ef-2 (Elongation factor), Na/K (Sodium/potassium channel), PGK (Phosphoglycerate kinase), Chym (Chymotrypsin), CYP9J2 (Cytochrome P450), TSF (Transferrin) e FerH (Ferritin heavy chain), que foram previamente selecionados para o estudo populacional do *Aedes aegypti* no Brasil (PADUAN & RIBOLLA, 2009). A partir destes marcadores SNPs foram construídas sondas TaqMan para a realização da genotipagem em larga escala dos mosquitos individuais de cada uma das populações previamente selecionadas. As técnicas de genotipagem por SNPs foram realizadas para 95 indivíduos de cada uma das populações descritas anteriormente.

Genotipagem por SNPs (Reação TaqMan)

DNA de cada mosquito individual foi submetido à amplificação pela PCR em tempo real através da plataforma ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando o sistema TaqMan para a discriminação alélica. Sondas foram desenvolvidas pela Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) baseando-se nos SNPs

previamente descritos por PADUAN & RIBOLLA (2009). As reações foram preparadas utilizando o conjunto de reagentes TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), contendo nucleotídeos, tampão, No AmpErase UNG, AmpliTaq® ao qual foi adicionado o mix de sondas marcadas com fluorescência (VIC/FAN) e os oligonucleotídeos forward e reverse.

Também foram testados outros dois Master Mix: TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), e Maxima™ Probe qPCR Master Mix (Fermentas).

O volume utilizado para cada reação foi de 10 µl com concentração de DNA de 10-30 ng/µL. As condições iniciais de amplificação foram 10 minutos a 95°C seguidos de 40 ciclos a 92°C por 15 segundos (desnaturação), 60°C por 1 minuto (anelamento/extensão).

O aumento da fluorescência VIC e FAN foi monitorado em tempo real pela aquisição de cada ciclo no canal amarelo (excitação em 530nm e emissão em 555nm) e no canal verde (excitação em 470nm e emissão em 510nm) da plataforma ABI PRISM 7300, respectivamente.

Análises da Estrutura Genética Populacional

Obtenção dos dados

Após a corrida eletroforética, os SNPs foram identificados automaticamente com auxílio do software da plataforma ABI 7300 (Applied Biosystems). Planilhas com dados genotípicos diplóides foram montadas no formato Excel, sendo convertidas com auxílio do software Convert (GLAUBITZ, 2004), que auxilia na utilização de softwares como Arlequin 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005) e Structure 2.0 (PRITCHARD et al., 2000).

Frequências alélicas

As frequências alélicas foram calculadas através do pacote de softwares Arlequin 3.0. Este cálculo pode ser obtido somando-se o número de indivíduos heterozigotos para um determinado alelo mais duas vezes o número de indivíduos homozigotos, e dividindo-se o resultado pelo dobro do número total de indivíduos. De acordo com a equação:

$$F(p) = (p + 2 pq)/2N$$

em que:

- F(p): frequência do alelo p;
- p: número de indivíduos homozigotos do alelo p;
- pq: número de indivíduos heterozigotos;
- N: número de indivíduos na amostra.

A avaliação da frequência de um alelo particular em uma população, chamada frequência gênica ou alélica, é considerada fundamental nos estudos evolutivos, pois a mudança genética de uma população pode ser avaliada pela mudança nas suas frequências gênicas (NEI, 1978). O conhecimento da frequência de heterozigotos apresenta importância na medida em que cada heterozigoto carrega diferentes alelos, os quais demonstram a existência de variação genética na população (WEIR, 1996).

Estruturação populacional

O software Structure 2.0 (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizado na análise de estruturação de populações com base em dados de genotipagem multilocus. A utilização deste teste possibilita a construção de clusters genéticos e estima a fração do genótipo de cada indivíduo que pertence a cada cluster na ausência de qualquer informação prévia sobre a estrutura da população. A análise se baseia na combinação de todos os genótipos individuais multilocus e calcula a probabilidade de um número pré-determinado de clusters (κ), assumindo que misturas (híbridos) podem existir (ex. não se assume o isolamento genético). A seguir, obtém-se o valor mais provável de κ pela análise das probabilidades e distribuição dos genótipos. Os resultados são convertidos para um gráfico com a probabilidade do ancestral de cada cluster para cada indivíduo representado por diferentes cores.

Resultados e Discussão

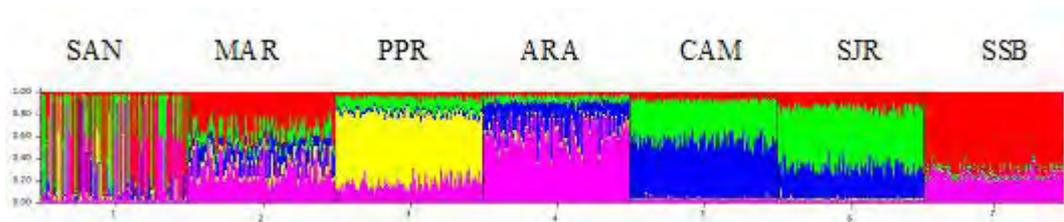
O estudo genético populacional de *Aedes aegypti* foi conduzido pela tipagem de 9 SNPs (mutações pontuais de base) selecionados de 9 diferentes genes localizados em regiões distintas dos cromossomos deste mosquito. Estes genes foram selecionados em trabalho realizado pelo laboratório (PADUAN & RIBOLLA, 2009) e se mostraram polimórficos nas populações brasileiras de *Aedes*. De cada população sentinela foram analisados 95 mosquitos.

Os dados iniciais (Figura 1) mostram as seguintes características: Nestas amostras estão presentes 6 *backgrounds* genéticos, Santos e São Sebastião apresentam um perfil diferente do resto do Estado de São Paulo, possivelmente por introduções de novas linhagens através dos portos, dados já mostrados em outros trabalhos (MARQUES DOS SANTOS *et al.*, 2003; PADUAN & RIBOLLA, 2008). Estes dois portos próximos apresentam padrões

distintos, o que sugere introduções independentes e baixo fluxo gênico entre as duas cidades. Além disso, a cidade de Santos apresenta um perfil muito heterogêneo, indicativo de alto grau de diversidade, podendo indicar múltiplas introduções.

No geral, os padrões apresentados pelos mosquitos de cada cidade são distintos, demonstrando baixo fluxo gênico, mesmo entre aquelas que distam menos de 200 km (MAR, PPR e ARA). Este padrão mosaico reforça a necessidade de análise individual das populações. Uma vez que seus perfis genéticos são distintos, características como resistência à inseticidas também serão distintos e influenciados regionalmente.

Figura 1. Análise genética de sete populações sentinelas do Estado de São Paulo.



Cada linha representa um indivíduo analisado. As cores representam os *backgrounds* genéticos de cada indivíduo. A análise foi realizada pelo programa Structure 2.0 (Excoffier 2001) com auxílio da localização do ponto de coleta. A quantidade de *backgrounds* genéticos mais significativa foi de 6 ($k=6$). SAN - Santos; MAR - Marília; PPR - Presidente Prudente; ARA - Araçatuba; CAM - Campinas; SJR - São José do Rio Preto; SSB - São Sebastião.

Conclusões

Os dados indicam haver baixo fluxo gênico entre as populações analisadas. A população de Santos indica a ocorrência de distintas introduções. Este último aspecto dificulta a interpretação da influência das ações de controle químico realizadas uma vez que o histórico das pressões de seleção de resistência não inicia em seu local de estabelecimento mas também nos locais de origem. As diferentes origens podem contribuir para o esclarecimento de diferenciação de evolução da resistência, não somente pelo aspecto do uso de controle químico. Por outro lado, o baixo fluxo indica que após o estabelecimento das populações nas regiões elas evoluem distintamente.

Esses dados reforçam a adequação da estratégia do Programa de Monitoramento em trabalhar com unidades sentinelas. Por outro lado, demonstram a necessidade de aprofundamento das avaliações genéticas, em especial com marcadores específicos para genes de resistência para uma maior compreensão da evolução e possibilidade de manejo da resistência em São Paulo. Idealmente as avaliações genéticas devem ser incluídas na rotina do monitoramento para que ao longo do tempo possamos identificar associações entre manejo, frequência gênica e resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIGHETTI, M.T.M.; CERONE, F.; RIGUETI, M.; GALVANI, K.C.; MACORIS, M.L.G. Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos, **Dengue Bull.** v. 32, p. 186-198, 2008.

BESERRA, E.B.; FERNANDES, C.R.M.; QUEIROGA, M.F.C.; CASTRO JR, F.P. Resistência de populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ao organofosforado temefós na Paraíba. **Neotropl. Entomol.** v. 36, p. 303-7, 2007.

BRAGA, I.A.; LIMA, J.B.P.; SOARES, S.S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 99, p. 199-203, 2004.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes Aegypti*: Insecticides, Mechanisms of Action and Resistance. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 16, p. 279-293, 2007a.

BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 16, p. 295-302, 2007b.

BRACCO, J.E. ; CAPURRO, M.R.; LOURENÇO-de-OLIVEIRA, R. SALLUN, M.A.M. al. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 573-580, 2007.

BROGDON, W.G. Mosquito protein microassay. I. Protein determinations from small portions of single mosquito homogenates, **Comp. Biochem. Physiol.** v. 79, p. 457-459, 1984.

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

BROGDON, W.G; BARBER, A.M. Microplate assay of glutathione S-transferase activity for resistance detection in single-mosquito triturates, **Comp. Biochem. Physiol.** v. 96, p. 339-342, 1990.

BROGDON, W.G.; McALLISTER, J.C. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing elevated oxidase for insecticide resistance, **J. Am. Mosq. Control Assoc.** v. 13, p. 233-237, 1997.

BROGDON, W.G.; McALLISTER, J.C. Insecticide resistance and vector control. **Emerg. Infect. Dis.** v. 4, p. 605-613, 1998.

BROWN, A.W.A. Insecticide Resistance in mosquitoes: A pragmatic review. **J Am Mosq Control Assoc.** v. 2, p. 123-40, 1986.

BROWN ET AL., Proc. R. Soc. B, doi:10.1098/rspb.2010.2469, 2011

CENTERS OF DISEASES CONTROL –CDC- Microplate assays. **Insecticide Resistance Workshop, Atlanta, GA, 1998.**

DARY, O.; GEORGHIOU, G.P.; PARSONS, E.; PASTEUR, N. Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects, **J. Econ. Entomol.** v. 83, p. 2187-2192, 1990.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol. Bioinf. Online**, v.1, p.47-50, 2005.

FERRARI, J.A. Insecticide resistance. In: Marquardt, William C., Beaty, Barry J. **The Biology of Disease Vectors**, University Press of Colorado. Chap. 30, p.512-529. 1996.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE – FUNASA, **Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD)**, Brasília, 2002.

GLASSER, C.M.; CASTRO-GOMES, A. Infestation of S.Paulo State, Brazil by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, **Rev. Saúde Pública** 34(6), p. 570-577, 2000.

GLAUBITZ, 2004 convert: A user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages, **Mol. Ecol.**v.12, p. 309-310.

GEORGHIOU, G.P.; PASTEUR, N. Electrophoretic esterase patterns in insecticide resistant and susceptible mosquitoes, **J. Econ. Entomol.** v. 71, p. 201-205, 1978.

GEORGHIOU, G.P.; WIRTH, M.; SAUME, F.; KNUDSEN, A.B. Potential for Organophosphate Resistance in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) in the Caribbean Area and Neighboring Countries, **J. Med. Entomol.** v. 24, p. 290-294, 1987.

GLUBER, D.J. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti* borne diseases control in the 1990s. Top down or bottom up, **Am. J. Trop. Med. Hyg.**v. 40, p. 571-578, 1989.

GUBLER, D.J.; TRENT, D.W. Emergence of Dengue/Dengue Hemorrhagic fever as a Public Health Problem in the Americas. **Infec. agents dis.** 2, (6), p.383-393, 1993.

GOKHALE, M.D.; JACOB, P.G.; MOURYA, D.T. Dengue virus and insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* mosquitoes from Belagola village, Mandya District, Karnakata state: during and post epidemic investigations, **J. Commun. Dis.** v.32, p. 247-53, 2000.

GÓMEZ-DÁNTES, H. El dengue en las Américas. Um problema de salud Regional. **Salud Pública Méx**, 33 (4) 347-355, 1991.

HALSTEAD, S.B. Dengue, **The Lancet**, 370, p. 1644-1652, 2007.

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

HEMINGWAY, J.; BODDINGTON, R.J.; HARRIS, J. Mechanisms of resistance of *Ae aegypti* L. (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico, **Bull. Ent. Res.** v.79, p.123-130, 1989.

JIRAKANJANAKIT, N.; RONGNOPARU, T. P.; SAENGTHARATIP, S.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.; DUCHON, S.; BELLEC, C.; YOKSAN, S. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* and *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005, **J. Econ. Entomol.**v.100, p. 545-550, 2007.

LIMA, J.B.; PEREIRA DA CUNHA, M.; CARNEIRO DA SILVA, R.; GALARDO, A.K.R.; SOARES, S.S.; BRAGA, I.A.; RAMOS, R.P.; VALLE, D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. **American J. Trop. Med. Hyg.** v.68, p. 329-33, 2003.

LIMA, E.P.; OLIVEIRA FILHO, A.M.O.; OLIVEIRA LIMA, J.W.; RAMOS JÚNIOR, A.N.R.; CAVALCANTI, L.P.G.; PONTES, R.J.S. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do estado do Ceará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**; v.39, p. 259 -63, 2006.

LUNA, J.E.D.; MARTINS, M.F.; ANJOS, A.F.; KUWABARA, E.F.; NAVARRO-SILVA, M.A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temefhos e cipermetrina, **Brasil. Rev. Saúde Pública** v.38, p.842-843, 2004.

MACORIS, M.L.; CAMARGO, M.F; SILVA, I.G.; TAKAKU, L.; ANDRIGHETTI, M.T.M. Modificação da suscetibilidade de *Aedes aegypti* ao temefhos, **Rev. Patol Trop** 24(1), 31-40, 1995.

MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C.M.; GARBELOTO, V.C.; CIRINO, V.C.D. Alteração de resposta de susceptibilidade a inseticidas organofosforados em municípios do estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública** v.33(5), p. 86-7, 1999.

MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; TAKAKU, L.; GLASSER, C.M.; GARBELOTO, V.C.; BRACCO, J.E. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil to organophosphates insecticides. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v.98, p. 703-8, 2003.

MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; NALON, K.C.R.; GARBELOTO, V.C.; CALDAS- JÚNIOR, A.L. Standardization of Bioassays for Monitoring Resistance to Inseticidas, **Dengue Bull.** v. 29, p. 176-82, 2005.

MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; OTRERA, V.C.G.; CARVALHO, L.R.; CALDAS-JÚNIOR, A.L.; BROGDON, W.G. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102(8), p. 895-900, 2007.

MARQUES DOS SANTOS, V. et al. Analysis of genetic relatedness between populations of *Aedes aegypti* from different geographic regions of São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, S. Paulo, v.45, n.2, p.99-101, 2003.

MAZZARRI, M.B.; GEORGHIOU, G.P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela, **J. Am. Mosq. Control Assoc.** v. 11, p. 315-22, 1995.

MELO-SANTOS, M.A.V.; VARJAL-MELO, J.J.M.; ARAÚJO, A.P.; GOMES, T.C.S.; PAIVA, M.H.S.; REGIS, L.N.; FURTADO, A.F.; MAGALHAES, T.; MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil, **Acta Trop.** v. 113, p. 180-189, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue no Brasil**. Relatório apresentado no Congresso Internacional de Medicina Tropical, Havana, Cuba, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, **Metodologia para quantificação de atividades de enzimas relacionadas a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti***, Ministério da Saúde, Série A. Normas e Manuais Técnicos, Brasil, 128p, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22207. Acesso em 06/12/2010.

MONTELLA, I.R.; MARTINS, A.J.; VIANA-MEDEIROS, P.F.; LIMA, J.B.P.; BRAGA, I.A.; VALLE D. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004, **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 77(3), p. 467-77, 2007.

MOURYA, D.T.; HEMINGWAY, J. ; LEAKE, C.J. Changes in enzyme titters with age in four geographical strains of *Aedes aegypti* and their association with insecticide resistance, **Med. Vet. Entomol.** v.7, p. 11-16, 1993.

NATHAN, M.B.; DAYAL-DRAGER, R. **Recent Epidemiological Trends, the Global Strategy and Public Health Advances in Dengue**, In: UNDP UNICEF, World Bank, WHO, Scientific Working Group Report on Dengue. Geneva, p. 30-34, 2007.

NAZNI, W.A.; LEE, H.L.; SADIYAH, I. Rate of resistance development in wild *Culex quinquefasciatus* (Say) selected by malathion and permethrin. **Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health** v. 29, p. 849–855, 1998.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, n.3, p.583-590, 1978.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD- OMS, **Resistencia a los insecticidas y lucha contra los vectores**. Décimo informe del Comité de Expertos en Insecticidas, Serie de Informes Técnicos, 191, Ginebra, 62 p, 1960.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Controle das doenças transmissíveis no homem**. Ed. Abraham S Benenson., 13^a Ed, 392p, 1983.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **El dengue in las Americas – 1980 – 1987**. **Bol. Epidemiologico**, 10 (1):1-8, 1989.

PADUAN, K.S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.P.; RIBOLLA, P.E.M. Genetic and variability in geographical populations of *Aedes aegypti* in Brazil elucidated by molecular markers, **Genet. Mol. Biol.**, v.29, n.2, p.391-395, 2006.

PADUAN, K.S.; RIBOLLA, P.E.M. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v.45, n.1, p.59-67, 2008.

PEREIRA DA-CUNHA M, LIMA, JBP, BROGDON, WG, MOYA, GE & VALLE, D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) populations collected between 2001and 2003, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v 100(4) p.441-444, 2005.

PINHEIRO V.C.S.; TADEI, W.P. Evaluation of the residual effect of temefos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificiasl containers in Manaus, Amazonas State, Brazil, **Cad. Saúde Pública** v. 18, p. 1529-1536, 2002.

PORTELA-CÂMARA, F.; THEOPHILO, R.L.G.; SANTOS, G.T., S.G.P., CÂMARA, D.C.P.; MATOS, R.R.C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas, **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 40(2), p.192-196, 2007.

POUPARDIN, R.; REYNAUD, S.; STRODE, C.; RANSON, H.; VONTAS, J. ;DAVID, J.P. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides, **Insect Biochem. Mol. Biol.** v.38, p. 540-551, 2008.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, n.2, p.945-959, 2000.

RAWLINS, S.C. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance, **Pan Am. J.Pub. Health** v.4, p. 243-251, 1998.

RANSON, H.; BURHANI ,J.; LUMJUAN, N.; BLACK, I.V.W.C. Insecticide resistance in dengue vectors, **TropIKA Reviews** 1-9, 2009.

REZENDE, M.C.; CALDERON, G.F.; MACORIS, M.L.G.; ANDRIGHETTI, M.T.M.; TAKAKU, L. Instruções para bioensaios para avaliação de aplicações espaciais de inseticidas. **Epidemiol. Serv. Saúde**; v (3), p. 189-194, 2004.

RODRIGUEZ-COTO, M.M.; LASCANO, J.A.B.; MOLINA DE FERNANDEZ, D., SOCA. Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after its use in *Aedes aegypti* control programs, **J. Am. Mosq. Control Assoc**, 16(4), p.324-330, 2000.

RODRIGUEZ, M.M.; BISSET, J.A.; MILA, L.H.; CALVO, E.; DIAZ, ALAIN, SOCA, A. Levels of insecticide resistance and its mechanisms in a strain of *Aedes aegypti* of Santiago de Cuba, **Rev. Cubana Med. Trop.** v. 51, p. 83-88, 1999.

RODRIGUEZ, M.M.; BISSET, J.A.; RUIZ, M. ; SOCA, A. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba, **J. Med. Entomol.** v.39, p. 882-888, 2002.

RODRIGUEZ, M.M.; BISSET, J.A.; FERNANDEZ, D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries, **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 23(4), p. 420-429, 2007.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE. SES. SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS (SUCEN). **Normas e recomendações Técnicas para a Vigilância e Controle do *Aedes aegypti* no Estado de São Paulo**, São Paulo, 2002.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA Banco de dados. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: 10/02/2010.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Ministério da Saúde. **Reunião Técnica Para Discutir e Avaliar os Resultados do Monitoramento de Resistência do *Aedes aegypti* a Inseticidas**, Brasília: Distrito Federal, 2004.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Ministério da Saúde, **Reunião Técnica Para Discutir Status de Resistência de *Aedes aegypti***. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2006.

SHATZMAYR, H.G. Dengue situation in Brazil by year 2000, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.95, p. 179-181, 2000.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS – SUCEN. Relatório do Programa de Monitoramento da susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas. São Paulo, SP. Brasil. 18pp, 2010

STRODE, C.; WONDJI, C.S.; DAVID, J.P.; HAWKES, N.J.; LUMJUAN, N.; NELSON, D.R.; DRANE, D.R.; KARUNARATNE, S.H.; HEMINGWAY, J.; BLACK, W.C.T.; RANSON, H. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*, **Insect Biochem. Mol. Biol.** v.38, p. 113-123, 2008.

TABASHNICK, B.E.; CUSHING, N.L.; JOHNSON, M.W. Diamondback moth (Lepidoptera:Plutellidae) resistance to insecticides in Hawaii: Intra - Island variation and cross resistance, Forum: **J. Econ. Entomol.** v. 80, p.1091-1099, 1987.

TIKAR, S.N.; KUMAR, A.; PRASAD, G.B. ; PRAKASH, S. Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India, **Parasitol. Res.** v.105, p. 57-63, 2009.

VAUGHAN, A.; CHADEE, D.D.; FFRENCH-CONSTANT, R. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad, **Med Vet Entomol**,v.12, p. 318-321, 1998.

WEIR, B.S. Genetic Data Analysis II – Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer Associates, Sunderland., p.337, 1996.

WIRTH, M.C.; MARQUINE, M.; GEORGHIOU, G.P.; PASTEUR, N. Esterases A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): Role in Organophosphate Resistance and Linkage, **J. Med. Entomol.** 27(5), p. 202-206, 1990.

WIRTH, M.C. ; GEORGHIOU, G.P. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands, **J. Am. Mosq. Control Assoc.** ,v. 15, p. 315-323, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Instructions for determining the susceptibility resistance of mosquito larvae to insecticides** WHO/VBC/81.807, Geneva, 6 pp, 1981a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Criteria and Meaning of Tests for Determining the susceptibility or Resistance of Insects to insecticides**, WHO/VBC/81.806, Geneva: 4 pp, 1981b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Instructions for determining the suscetibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides. Stablishment of the baseline**,WHO/VBC/81.805. Geneva: 4 pp, 1981c.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO . **Field surveys of exposure to pesticides. Standard protocols.** Geneva, World Health Organization (WHO/VBC/82.1), 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO , **Vector resistance to pesticides**, Technical Report Series No. 818, Geneva: 62 pp, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION –WHO, **Evaluating and testing of insecticides**, Report of the WHO Informal Consultation on the evaluation and testing of insecticides. WHO, Geneva,7–11 October 1996. Geneva, World Health Organization (CTD/WHOPES/IC/96.1), 32 pp, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO, **Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces**, WHO/CDS/CPC/ MAL/98.12, Geneva: 43 pp., 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO, **A collaborative study to assess the stability of alcoholic temephos solutions used for resistance monitoring in *Aedes aegypti*** (mimeo) 60 pp, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, **Guidelines for Assessing the efficacy of insecticidal space sprays for control of the dengue vector *Aedes aegypti***, P. Reiter & M. B. Nathan, WHO/CDS/CPE/PVC/2001.1, 34 pp., 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO, **Space spray application of insecticides for vector and public health pest control. A practitioner's guide**, WHO/CDS/WHOPE/GCDPP/2003.5, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, **Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides**, Geneva: WHO, Document WHO/CDS/WHOPE/GCDPP/2005.13, 43 pp. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, **Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets**. Document No. WHO/CDS/NTD/WHOPE/GCDPP/2006.3. 60 pp. Geneva, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, **Dengue and dengue haemorrhagic fever**, Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>. Acesso em: 10/12/2010.

ZAIM, M.; JAMBULINGAM, P. **Global insecticide use for vector-borne disease Control**, Third Edition, WHO/CDS/NTD/WHOPE/GCDRPP.2007.2, Geneva, 81p, 2007.

ZIV, M.; BROWN, A.W.A. Resistance potentialities of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* to organophosphorus and other insecticides, **Bull. WHO** v.41, p. 941-946, 1969.