



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

LILIANE BARBOSA AMORIM

Populações de *Culex quinquefasciatus* Say, 1983 (Diptera: Culicidae) do Estado de Pernambuco: diversidade genética e perfil de susceptibilidade ao organofosforado temephos

Recife
2013

LILIANE BARBOSA AMORIM

Populações de *Culex quinquefasciatus* Say, 1983 (Diptera:Culicidae) do Estado de Pernambuco: diversidade genética e perfil de susceptibilidade ao organofosforado temephos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biologia Animal.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres.

Co-orientadora: Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira.

Recife
2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

A524p Amorim, Liliane Barbosa

Populações de *Culex quinquefasciatus* Say, 1983 (Diptera: Culicidae) do Estado de Pernambuco: diversidade genética e perfil de susceptibilidade ao organofosforado temephos / Liliane Barbosa Amorim. – Recife: O Autor, 2013.

113 f. : il., fig., tab.

Orientador: Constância Flávia Junqueira Ayres

Coorientadora: Cláudia Maria Fontes de oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia Animal, 2013.

Inclui bibliografia e apêndice

1. Mosquito 2. Díptero 3. *Culex* 4. Resistência aos inseticidas I. Ayres, Constância Flávia Junqueira (orientadora) II. Oliveira, Cláudia Maria Fontes de (coorientadora) III. Título.

595.772

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-095

LILIANE BARBOSA AMORIM

Populações de *Culex quinquefasciatus* Say, 1983 (Diptera:Culicidae) do Estado de Pernambuco: diversidade genética e perfil de susceptibilidade ao organofosforado temephos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biologia Animal.

Aprovada em: 26/02/2013

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cleide Maria Ribeiro de Albuquerque
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Simão Dias de Vasconcelos Filho
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Valesca Pandolfi
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maria Alice Varjal de Melo Santos
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
(Orientadora)

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
(Orientadora)

*Dedico à minha família e ao meu
Maracujá (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

À força que rege a evolução (Deus). À minha família, minha bengala, que me ajuda a caminhar com firmeza e que aprendi o verdadeiro sentido do amor incondicional. Aos meus pais por todo amor e força que dedicam desde o meu nascimento (José e Neide). Aos meus irmãos (Lidiane e Gomes) que me suportam nas crises de risos, choros e gritos. Aos meus avós (José e Deda) que nos alegram aos domingos; ao Seu Luís e Dona Irene (meu maracujá) que resolveram encantar nos dois últimos anos (*in memoriam*). Aos primos, que são nossos irmãos, Livia, Natália e Marília – me doam o ombro, a casa, o copo e a vida.

Às minhas orientadoras, Constância e Cláudia, pelos ensinamentos, reagentes, contatos, correções e por ter aceitado o desafio de me orientar. À banca examinadora, pelas contribuições e críticas para o aperfeiçoamento do trabalho. Ao professor Simão, por ter me aceitado no estágio docência e pelo estímulo dado ao longo dos dois semestres. Aos agentes de endemias de Glória do Goitá e Santa Cruz do Capibaribe, em especial à Msc. Cândida Walter. À Cássia Docena e Viviane Carvalho do NPT pelo sequenciamento das amostras. Aos amigos do Departamento de Entomologia do CPqAM pela alegria na convivência e apoio, em especial à Ana Paula e Elisama que me ajudaram a desvendar os bioensaios e bioquímicos. À Alessandra, que me ajudou a entender tantas letras num lugar só. Ao Marcelo Paiva, pela análise de microssatélites. Aos meus amores – Diogo, Tatiane, Lígia, Daniela e Taty Romão, pelas conversas, cachaças, sorrisos e tanto amor compartilhado. Aos amigos do insetário e meninos do ‘campo’, pelo companheirismo ao longo desses 10 anos de Aggeu.

Àquelas pessoas que, sem elas, os quatros anos do doutorado não seria possível (claro que sem os resultados também não); Deram-me força quando pensei em desistir, sorrisos quando estava chorando e muita diversão. Aos meus amigos: Paula, Cecile, Bárbara, Mariana, Michelline, Layse, André, Luciana, Fernando (Elo), Ewerton, Karin, Agatha, Nina e S.O.S Amizade (sem ordem de preferência, por favor). À turma ‘The Killer’, se não foi a melhor, foi a turma de mestrado/doutorado mais divertida da Biologia Animal, aprendi muito com nossas discussões, viagens e risadas. Aos amigos do CVA de Jaboatão dos Guararapes, em especial à Ellyda Vanessa.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), pela oportunidade de estágio e pela estrutura oferecida para realização de trabalhos com qualidade. A CAPES pelo apoio financeiro. A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para minha formação e para a realização deste trabalho, que aqui não foram citados.

Eu não sei o que quero ser, mas sei muito bem o que não quero me tornar.

Friedrich Nietzsche

O degrau da escada não foi inventado para repousar, mas apenas para sustentar o pé o tempo necessário para que o homem coloque o outro pé um pouco mais alto.

Aldous Huxley

RESUMO

Culex quinquefasciatus é vetor de muitos agentes etiológicos de doenças humanas, incluindo *Wuchereria bancrofti*, o parasita que causa a filariose linfática, uma doença endêmica no Estado de Pernambuco (PE), Brasil. A elevada densidade deste mosquito pode causar problemas secundários que têm impacto na saúde e qualidade de vida das pessoas expostas; por isso, o controle desta espécie é importante. O objetivo do trabalho foi identificar se existem e quais são os mecanismos de resistência a inseticidas químicos e a diversidade genética de populações naturais de *Culex quinquefasciatus* coletadas em PE. As avaliações foram feitas por meio de bioensaios, ensaios bioquímicos para mensurar a atividade das enzimas de detoxificação e ensaios moleculares para estimar a frequência da mutação presente no gene da acetilcolinesterase (*ace-1*), associada à resistência a organofosforados (OPs) e carbamatos (CMs). A diversidade genética das populações foi avaliada utilizando 16 marcadores microssatélites. Ovos de *Culex* foram coletados em seis municípios de PE: Olinda (Peixinhos e Alto da Conquista), Recife (Água Fria), Jaboatão dos Guararapes, Ipojuca, Glória do Goitá e Santa Cruz do Capibaribe. Os resultados mostraram que apenas a população proveniente de Santa Cruz do Capibaribe (SC) apresentou alteração na susceptibilidade (RR = 7,2 vezes), com nível de resistência moderado ao temephos, enquanto as outras populações analisadas não mostraram alteração na susceptibilidade ao inseticida. Quanto aos testes bioquímicos, apenas em SC foi observado um aumento na atividade de todas as esterases estudadas e indícios de insensibilidade da acetilcolinesterase. A frequência da mutação G119S no alelo de resistência *ace-1* (G119S) foi de 0,11 em SC e zero nas outras populações. O número de alelos por *locus* variou entre 2 e 15. Alguns desses alelos foram exclusivos de algumas localidades. O percentual de variabilidade genética encontrado foi maior dentro das populações do que entre as populações e os resultados indicam excesso de heterozigotos. Estes dados mostram que embora não haja programas nacionais para o controle de *Culex*, esta espécie apresenta mecanismos de resistência que estão sendo mantidos em populações naturais como um resultado da exposição acidental ao inseticida, o que poderia prejudicar as ações de controle que podem ser implantadas no futuro.

Palavras-chave: Resistência a inseticidas. Culicidae. Bioensaios. Enzimas de detoxificação. Acetilcolinesterase. Microssatélites. Diversidade genética.

ABSTRACT

Culex quinquefasciatus is the vector of many agents of human diseases, including *Wuchereria bancrofti*, the parasite that causes bancroftian filariasis, an endemic disease in Pernambuco State (PE), Brazil. The high density of this mosquito can also cause secondary problems that have an impact on health and quality of life of exposed people; ergo the control of this species is important. The aim of this work was to identify resistance mechanisms to insecticide and the genetic diversity of *C. quinquefasciatus* natural populations collected in PE. Evaluations were made by bioassays, biochemical assays to measure the detoxification enzymes activity and molecular assays to estimate the frequency of acetylcholinesterase mutation (G119S), associated with temephos resistance. The genetic diversity was evaluated by 16 microsatellites. *Culex* eggs were collected from six regions in Pernambuco State Olinda (Peixinhos and Alto da Conquista), Recife (Água Fria), Jaboatão dos Guararapes, Ipojuca, Glória do Goitá and Santa Cruz do Capibaribe. The results showed that only Santa Cruz do Capibaribe population showed a change in susceptibility (RR = 7.2 fold), a moderate level of resistance to temephos, and the others populations analyzed showed no change in insecticide susceptibility. To biochemical assay, only in Santa Cruz was observed an increase of all esterase activity studied and evidence of acetylcholinesterase insensitivity. The G119S mutation frequency in the *ace-1* gene was 0.11 in this population and zero in the others analyzed. The number of alleles per locus varied between 2 to 15. Some of these alleles were only observed in particular localities. The percentage of genetic variability was higher within populations than between populations and the results indicate excess of heterozygote. These data show that although there are no national programs to *Culex* control, this species has resistance mechanisms that are being maintained in natural population as a result of incidental exposure to the insecticide, which could undermine control actions that may be deployed in the future.

Key-words: Insecticide resistance. Culicidae. Bioassay. Detoxifying enzymes. Acetylcholinesterase. Microsatellites. Genetic diversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ciclo biológico do mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	17
Figura 2 -	Estrutura química do organoclorado temephos.	26
Figura 3 -	Processo de biotransformação e excreção de xenobiótico.	31
Mapa 1 -	Mapas do Brasil (A) e do Estado de Pernambuco (B).	45
Figura 4 -	Instalação da armadilha BR-OVT no intra e peridomicílio de uma residência em Ipojuca, Pernambuco, Brasil.	45
Figura 5 -	Etapas para homogeneização de fêmeas de <i>Culex quinquefasciatus</i> , coletadas no Estado de Pernambuco, para avaliar a atividade das enzimas de detoxificação e insensibilidade da acetilcolinesterase.	47
Quadro 1 -	Microssatélites utilizados para genotipagem de sete populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas no Estado de Pernambuco.	50
Figura 6 -	Localização esquemática dos <i>primers</i> de microssatélites mapeados nos três cromossomos do mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .	51
Gráfico 1 -	Perfil da atividade enzimática em populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> susceptível (Água Fria) e com resistência moderada (Santa Cruz) ao temephos, provenientes do Estado de Pernambuco, Brasil, comparadas com a atividade da população de laboratório susceptível (Peixinhos).	57
Figura 7 -	Diversidade haplotípica no gene <i>ace1</i> em populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> provenientes do Estado de Pernambuco.	59
Gráfico 2 -	Distribuição das frequências dos alelos encontrados para os <i>loci</i> de microssatélites analisados nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas no Estado de Pernambuco.	69
Gráfico 3 -	Distância genética entre sete populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas no Estado de Pernambuco, avaliadas por meio de 15 <i>loci</i> de microssatélites.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características demográficas e microrregião de seis municípios do Estado de Pernambuco.	43
Tabela 2 -	Toxicidade do temephos contra larvas de 3º/4º estágio de <i>Culex quinquefasciatus</i> . As populações analisadas foram: uma colônia de laboratório susceptível (PX) e cinco populações de campo coletadas no Estado de Pernambuco: Água Fria (AF), Santa Cruz do Capibaribe (SC), Glória do Goitá (GG), Ipojuca (IP) e Jaboatão dos Guararapes (JB).	54
Tabela 3 -	Utilização do temephos (kg) em seis municípios do Estado de Pernambuco para controle do mosquito <i>Aedes aegypti</i> de 2007 a 2011.	55
Tabela 4 -	Atividade enzimática observada em três populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> provenientes do Estado de Pernambuco, Brasil – Peixinhos (PX): colônia de laboratório susceptível; Água Fria – colônia de campo susceptível; Santa Cruz do Capibaribe (SC) colônia de campo que apresentou resistência moderada ao temephos mensurada por bioensaios.	56
Tabela 5 -	Riqueza de alelos medida para cada <i>locus</i> de microsatélite e média da riqueza de alelos entre os 15 <i>loci</i> avaliados nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> provenientes do Estado de Pernambuco, baseado no tamanho amostral mínimo de 14 indivíduos.	63
Tabela 6 -	Frequência de alelos por <i>locus</i> de microsatélite encontrados nas populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas no Estado de Pernambuco.	64
Tabela 7 -	Análise intrapopulacional de populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> provenientes do Estado de Pernambuco.	72
Tabela 8 -	Análise de variância molecular para sete populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas no Estado de Pernambuco.	73
Tabela 9 -	Valores de diferenciação genética (F_{ST}) entre as sete populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> coletadas no Estado de Pernambuco, obtidos pela estimativa total para os 15 <i>loci</i> de microsatélites.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Alto da Conquista

AChE – Acetilcolinesterase

ACh – Acetilcolina

AF – Água Fria

BHC – beta-hexaclorociclohexano

Bs – *Bacillus sphaericus*

BR-OVT – Armadilha de oviposição

Bt – *Bacillus thuringiensis*

Bti – *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis*

CL₅₀ e **CL₉₅** – Concentrações letais de inseticidas para 50 e 95% dos insetos expostos

CM – Carbamato

CPqAM – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

CYP - Citocromo

DDT – Dicloro Difenil Tricloroetano

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxirribonucleotídeos trifosfato

EC – Código da enzima dado pela *Enzyme Commission*

EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

EST - esterase

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FL - Filariose

GABA – ácido γ -amino butírico

GG – Glória do Goitá

GST – Glutathione S-Transferase

He – Heterozigosidade esperada

Ho – Heterozigosidade observada

IAM - *Infinite Allele Model*

IGR – *Insect Growth Regulator*

IP – Ipojuca

JB – Jaboatão dos Guararapes

kdr – *knockdown resistance*

MAPEG – Membranas associadas ao metabolismo de eicosanoides e glutathione

mf - microfilárias

MFO – Oxidases de Função Mista

MIV – Manejo Integrado de Vetores

OMS – Organização Mundial de Saúde

OC – Organoclorado

OP- Organofosforado

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

pb – pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PNCD – Plano Nacional para Controle da Dengue

PNPA – 4-nitrofenil acetato

PX - Peixinhos

PM – Peso molecular

PY– Piretróide

RMR – Região Metropolitana do Recife

RNAi – Ácido ribonucleico de interferência

RR – Razão de Resistência

SC – Santa Cruz do Capibaribe

SMM - *Stepwise Mutation Model*

TM – Tratamento em Massa

TMBZ - 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TPM - *Two Phase Model*

UV – Ultravioleta

UVB – Ultrabaixo Volume

VNO – Vírus do Oeste do Nilo

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 <i>Culex quinquefasciatus</i> SAY, 1823 (Diptera: Culicidae)	16
2.1.1 Distribuição, biologia e ecologia	16
2.1.2 Importância vetorial	18
2.2 Controle populacional de vetores	20
2.2.1 Controle biológico	20
2.2.2 Controle genético	21
2.2.3 Controle químico	22
2.3 Inseticidas orgânicos sintéticos	24
2.3.1 Organoclorados	24
2.3.2 Organofosforados	25
2.3.3 Carbamatos	26
2.3.4 Piretróides	27
2.4 Resistência	27
2.4.1 Resistência comportamental	29
2.4.2 Redução na taxa de penetração	29
2.4.3 Resistência metabólica	30
2.4.3.1 <i>Oxidases de Função Mista</i>	31
2.4.3.2 <i>Esterases</i>	33
2.4.3.3 <i>Glutathione S-transferases</i>	34
2.4.4 Resistência por alteração do Sítio-Alvo	34
2.5 Diversidade genética	36
3 JUSTIFICATIVA	40
4 HIPÓTESES	41
5 OBJETIVOS	42
5.1 Objetivo geral	42
5.2 Objetivos específicos	42
6 METODOLOGIA	43
6.1 Áreas de estudo	43
6.2 Populações naturais e colônias de mosquitos	44

6.3 Bioensaio de dose-resposta	46
6.4 Ensaios bioquímicos	46
6.5 Extração do DNA genômico	48
6.6 PCR e sequenciamento do gene <i>ace1</i>	48
6.7 Caracterização da diversidade genética utilizando marcadores microssatélites	49
6.7.1 Amplificação e separação dos microssatélites	49
6.7.2 Análise dos dados de microssatélite	52
7 RESULTADOS	53
7.1 Susceptibilidade ao temephos	53
7.2 Ensaios bioquímicos	55
7.3 Mutação no gene <i>ace1</i>	58
7.4 Diversidade genética das populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> por meio de microssatélites	62
7.4.1 Variabilidade genética e Equilíbrio de Hardy-Weinberg	62
7.4.2 Análises Interpopulacionais	73
8 DISCUSSÃO	75
9 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	84
APÊNDICE	107
Apêndice – Artigo publicado na revista Pest and Management Science	107

1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Culex quinquefasciatus é vetor exclusivo do verme filarial *Wuchereria bancrofti* nas Américas, o agente etiológico da filariose linfática, uma doença ainda endêmica na Região Metropolitana do Recife (RMR). Também pode ser vetor de diversos arbovírus de encefalites humanas, como o vírus do Nilo Ocidental, responsável por epidemias nos Estados Unidos e que já foi isolado no Caribe, Colômbia, Argentina. Devido à inexistência de vacinas específicas para a prevenção dessas doenças, torna-se necessário o controle do vetor.

Desde 1940, o emprego de inseticidas químicos tem sido a ferramenta mais utilizada no controle de insetos. O uso de inseticidas da classe dos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, por um extenso período de tempo, levou à seleção de diversas populações de insetos resistentes, dificultando ainda mais o controle de doenças endêmicas como a filariose, malária, leishmaniose, entre outras. Os mecanismos mais comuns de resistência são o aumento da capacidade metabólica das enzimas de detoxificação como esterases, oxidases e glutathione S-transferases (GSTs), e/ou diminuição da sensibilidade do sítio-alvo do inseticida. Para espécies de *Culex*, foram descritos três *loci* que apresentam os principais alelos de resistência aos inseticidas organofosforado e carbamato. Dois desses *loci*, *Est-2* e *Est-3*, apresentam genes que conferem resistência ao inseticida pela superprodução de esterases (resistência metabólica), que é alcançada pela amplificação ou pela regulação gênica positiva. O terceiro *locus*, *ace-1*, codifica uma acetilcolinesterase e os alelos de resistência de *ace-1* possuem mutações pontuais que acarretam na diminuição da ligação do inseticida ao sítio-alvo (alteração do sítio-alvo).

No Brasil, alguns municípios utilizam de forma pontual o larvicida biológico *Bacillus sphaericus* para o controle de *C. quinquefasciatus*, e já foram descritas populações com alterações na susceptibilidade a esta bactéria. Contudo, não existe um programa nacional de controle de *Culex*, diferente do observado o mosquito *Aedes aegypti*, vetor do vírus da dengue e da febre amarela, cujo organofosforado temephos foi, no período de 1996 a 2011, o larvicida de primeira escolha no Plano Nacional para Controle da Dengue (PNCD). A utilização de inseticidas químicos, apesar de dirigida aos criadouros preferenciais desta espécie, representados por reservatório de água potável como caixas d'água, tonéis, cisternas e outros, possivelmente também atinge as populações de *Culex*, porém estudos sobre a influência desses compostos nestas populações foram pouco explorados.

A proposta deste trabalho foi identificar se as populações naturais de *C. quinquefasciatus* do Estado de Pernambuco estão resistentes a inseticidas químicos e quais mecanismos estão envolvidos ou modulando esta resistência, além de avaliar a diversidade genética dentro e entre as populações coletadas. O modelo utilizado no estudo apresenta características ideais para a avaliação da resistência e variabilidade genética em populações naturais de *C. quinquefasciatus* e pode trazer importantes contribuições para o estabelecimento de estratégias de detecção e manejo da resistência.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823 (Diptera: Culicidae)

2.1.1 Distribuição, biologia e ecologia

C. quinquefasciatus é considerado um mosquito trópico-cosmopolita que ocorre nas porções meridionais da Ásia, África, Américas (do sul dos EUA ao norte da Argentina) e na Oceania. No Brasil, sua distribuição é abrangente e sua abundância é influenciada pela presença humana e urbanização (FORATTINI et al., 1993). É um inseto holometábolo, sendo o adulto alado e as formas pré-imaginais aquáticas. O seu ciclo biológico tem duração média entre 10 a 12 dias, desde a eclosão das larvas até a emergência do adulto, porém a duração do ciclo depende de fatores como disponibilidade de alimento, temperatura, luz e umidade (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Após a cópula, a fêmea, que é hematófaga, realiza o repasto sanguíneo geralmente à noite ou durante o período vespertino. Quando atingida a repleção, a fêmea procura um local de repouso até a oviposição, que ocorre entre 48 e 72 horas após o repasto. Os ovos são depositados diretamente sob a lâmina d'água dos criadouros, agrupados em número de 150 a 250, sob a forma de jangada (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A seleção do local de oviposição é o principal fator de distribuição da espécie, que é influenciado pelo feromônio de oviposição presente na superfície apical dos ovos que tem a capacidade de atrair as fêmeas para os criadouros já colonizados (BARBOSA et al., 2007; LAURENCE; PICKETT, 1985).

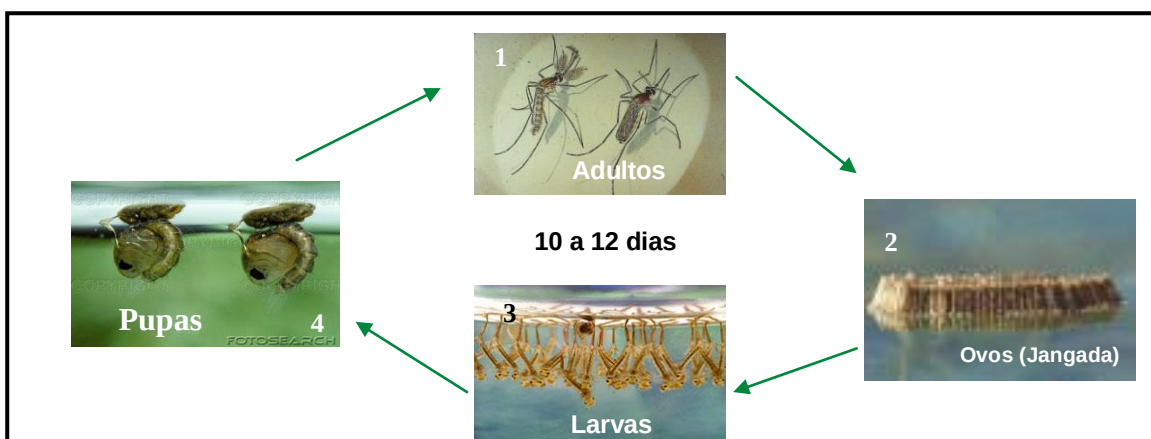
O desenvolvimento pré-imaginal ocorre no ambiente aquático e é composto por quatro estádios larvais (L1, L2, L3 e L4) e um de pupa (Figura 1). As larvas são filtradoras e alimentam-se preferencialmente na superfície dos criadouros. As pupas não se alimentam, mas permanecem ativas, movimentando-se quando o ambiente é perturbado e os adultos alimentam-se de seiva vegetal. As fêmeas são também hematófagas e a alimentação sanguínea está relacionada à maturação de seus ovos. Embora possam realizar o repasto sanguíneo em aves ou em outros animais, as fêmeas são predominantemente antropofílicas (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

O sequenciamento do genoma de *C. quinquefasciatus* está completo, sua anotação está em andamento e já foram descritos 22.629 genes, destes 18.883 são codificadores de proteínas, sendo este número maior do que o número de genes descritos para *Ae. aegypti* e

Anopheles gambiae (ARENSBURGER et al., 2010; REDDY; LABBÉ; CORBEL, 2012). Logo, é importante entender como este número elevado de genes interfere na preferência pela alimentação sanguínea, transmissão de patógenos, na adaptação das populações de *Culex* aos criadouros que são, na maioria das vezes, poluídos e também na resposta aos inseticidas (BARTHOLOMAY et al., 2010; REDDY; LABBÉ; CORBEL, 2012).

Os criadouros preferenciais do mosquito *C. quinquefasciatus* são coleções de água estagnada do nível do solo, rica em matéria orgânica em decomposição e detritos, tais como valetas, fossas, córregos, caixas de inspeção de esgoto, entre outros. Após a emergência, os adultos permanecem, preferencialmente, próximos ao local onde ocorreu a oviposição, no ambiente peridomiciliar ou dentro das casas, para que as fêmeas possam buscar o repasto sanguíneo (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Um estudo realizado por Oliveira (1996), em uma área endêmica para filariose no Recife, demonstrou que o número de adultos no ambiente domiciliar depende do número de criadouros no intra e peridomicílio, e que sua densidade é maior no período chuvoso, provavelmente devido ao aumento do número dos criadouros. Nesta área, foram registradas densidades que flutuaram entre 20 e 60 adultos por quarto por noite, sendo que nos períodos de chuva este número foi maior do que 100 mosquitos (REGIS et al., 1995).

Figura 1. Ciclo biológico do mosquito *Culex quinquefasciatus*.



Nota: Adultos (1). As fêmeas depositam na água ovos agrupados sob a forma de jangada (2), após a eclosão há quatro estádios larvais (3), em seguida é atingido o estágio de pupa (4), que dará origem aos adultos (1).

Fonte: (1) Action Nature (2008); (2) Gulf Coast Mosquito Control (2006); (3) Wildlife Trust (2006); (4) Fotosearch (2008).

2.1.2 Importância vetorial

C. quinquefasciatus pode ser vetor de patógenos de doenças e causa um grande desconforto à população humana devido ao elevado número de picadas durante a hematofagia das fêmeas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2011a), a espécie é vetor exclusivo da filariose bancroftiana nas Américas. Esta parasitose é endêmica em várias regiões tropicais, com estimativa de 120 milhões de indivíduos infectados em 81 países e mais de um bilhão de pessoas vivendo em áreas de risco de contrair a infecção (WHO, 2011a). A transmissão ativa da filariose nas Américas foi evidenciada em quatro países: Brasil, República Dominicana, Guiana e Haiti. No Brasil, a Região Metropolitana do Recife (RMR), localizada no Estado de Pernambuco, apresenta focos endêmicos da filariose linfática desde 1990.

No Brasil, a doença é causada pelo verme nematoda *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae) e sua transmissão se dá através da picada da fêmea do mosquito *C. quinquefasciatus*. O ciclo biológico de *W. bancrofti* é do tipo heteroxênico, possuindo hospedeiro intermediário (mosquito) e definitivo (homem) (REY, 2001). A infecção vetorial ocorre quando a fêmea do mosquito realiza o repasto sanguíneo e ingere microfilárias, forma jovem de *W. bancrofti*, presentes no sangue periférico do indivíduo infectado. No mosquito, as microfilárias perdem a bainha e transformam-se em larva de primeiro estágio (L₁), estas larvas atravessam a parede do intestino e migram para os músculos torácicos, havendo mais duas mudas e, cerca de duas semanas após o repasto sanguíneo, atingem o estágio de larva infectante (L₃) e migram para as glândulas salivares do mosquito por movimento ativo (REY, 2001).

Quando a fêmea de *C. quinquefasciatus* realiza novamente o repasto sanguíneo, as L₃ se desprendem do aparelho bucal e penetram ativamente na pele do hospedeiro humano, através da lesão causada pela picada do mosquito, alcançam a corrente sanguínea e se alojam nos vasos linfáticos aferentes, onde se desenvolvem até a fase adulta. Quando macho e fêmea se encontram no mesmo vaso linfático ocorre a fase reprodutiva. A longevidade dos adultos nos vasos linfáticos pode atingir de 8 a 10 anos (FONTES, 2003).

Um programa global para eliminação da filariose proposto pela OMS foi iniciado em 2000 e, para tal, a associação de medidas como o tratamento em massa (TM) da população humana com uma droga microfilaricida é recomendada para interromper o ciclo de transmissão da doença (OTTESEN et al., 2008; WHO, 2011a). Entretanto, um número de

entraves biológicos e operacionais tem ameaçado o sucesso do TM, por exemplo, o elevado número de pessoas que rejeitam o tratamento, o que levou a questionar se somente o TM seria suficiente para eliminar a doença. Estas dificuldades surgem em áreas onde *Culex* é o principal vetor, uma vez que este mosquito exibe algumas “limitações” como, por exemplo, o número de microfilárias (mf) que se desenvolvem até o estágio infectivo é reduzido à medida que a quantidade de mf ingeridas aumenta. Isto significa que a capacidade vetorial é maior quando o número de mf em cada alimentação sanguínea é baixo, o que é esperado após um TM. Em consequência, a FL transmitida por *Culex* representa o maior desafio para o controle da doença (OTTESEN et al., 2008).

C. quinquefasciatus também tem sido incriminado como vetor de arbovírus de importância para saúde pública. Foi encontrado naturalmente infectado com vírus causadores de encefalites como St. Louis, Venezuelana (Panamá) e Oropouche (Pará), e tem sido incriminado como vetor de arbovírus em áreas rurais e urbanas. Outro exemplo é a transmissão da encefalite causada pelo Vírus do Nilo Ocidental (VNO), um arbovírus do gênero *Flavivirus*, que tem como hospedeiro principal as aves migratórias, sendo transmitido ao homem por mosquitos infectados, sobretudo do gênero *Culex*. Epidemias nos Estados Unidos ocorrem desde 1999 e o vírus já foi isolado no Caribe, Colômbia, Argentina e, recentemente, foram encontrados cavalos com sorologia positiva para o vírus no Brasil (BERROCAL et al., 2006; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003; MORALES et al., 2006, PAUVOLID-CORREA et al., 2011). Cerca de 80% das pessoas que se infectam com o VNO não apresentam sintomas clínicos ou desenvolvem a doença, com período de incubação da infecção pelo VNO de dois a 14 dias (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003). As características clínicas são febre, dor de cabeça, fadiga e, em alguns casos, rachadura na pele e dor nos olhos, porém, quando o sistema nervoso é afetado pode causar meningite e encefalite, podendo levar a morte (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003).

Como a disseminação do VNO pode ocorrer através de aves migratórias, deve haver vigilância ambiental de animais tidos como reservatórios e vetores para impedir a entrada e dispersão do VNO no país (LUNA; PEREIRA; SOUZA, 2003). Há uma estimativa de ampliação mundial da transmissão de arboviroses e mosquitos do gênero *Culex* podem ter um papel estratégico, devido a sua abundância em áreas urbanas. Além do papel de vetor, a alta densidade de *Culex* e o incômodo associado a sua picada durante a hematofagia também

podem provocar problemas secundários que têm um impacto na saúde e qualidade de vida das populações expostas.

2.2 Controle populacional de vetores

Um controle de culicídeos exige estratégias que levem em consideração a biologia e ecologia do inseto, pois fatores como o curto ciclo biológico e o elevado número de criadouros encontrados em áreas urbanas dificultam o controle da densidade populacional dos insetos vetores (REGIS et al., 1995). O controle pode ser realizado por meio de métodos físicos, como saneamento, adicionar microesferas de poliestireno na superfície das fossas e vedá-las, entre outros, além do emprego de inseticidas químicos ou biológicos. Estes métodos visam reduzir os níveis populacionais desses insetos, interrompendo o ciclo de transmissão de doenças e o incômodo causado pela picada dos mosquitos.

2.2.1 Controle Biológico

O controle biológico baseia-se na utilização de predadores, parasitas, competidores, patógenos ou toxinas resultantes do metabolismo de agentes biológicos. Podem ser utilizados peixes, insetos, nematódeos, protozoários, fungos, vírus e bactérias entomopatógenas (BECKER et al., 2003). No conceito de controle biológico, entende-se que esses agentes são seletivos e considerados inócuos para outros invertebrados não-alvo, para o ambiente, para o homem e outros vertebrados (BECKER et al., 2003).

Nenhum dos vírus entomopatógenos conhecidos são eficazes no controle de dípteros, a maioria é patógena para insetos da ordem Lepidoptera (BECKER et al., 2003). Pesquisas têm sido desenvolvidas para avaliar o papel de muitas espécies de fungos no controle biológico de mosquitos. A espécie *Lagenidium giganteum* é considerada um agente de controle biológico em potencial desde o início da década de 70. Estudos demonstraram a eficácia desse fungo para espécies de *C. pipiens*, *C. tarsalis*, *An. gambiae* e *Ae. aegypti* (GOLKAR et al., 1993; WOODRING; KAYA; KERWIN, 1995). Os problemas mais frequentemente encontrados na utilização de fungos como entomopatógenos têm sido a baixa especificidade, a alta dosagem necessária e as dificuldades de cultivo *in vitro* (BECKER et al., 2003; CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

As bactérias entomopatógenas, por sua vez, são utilizadas desde os anos 60 para o controle de insetos praga na agricultura. O seu uso para o controle de dípteros tomou impulso com a descoberta da propriedade inseticida de *Bacillus sphaericus* (Bs) (KELLEN et al., 1965) e do isolamento de *B. thuringiensis* sorovar. *israelenses* (Bti) (GOLDBERG; MARGALIT, 1977). A propriedade inseticida destas bactérias é devida, primariamente, a proteínas inseticidas produzidas durante a fase de esporulação. Estudos têm demonstrado que populações de *Culex* podem desenvolver resistência aos biolarvicidas à base de Bs quando submetidas à forte pressão de seleção, sob condições de laboratório ou de campo, porém, continuaram susceptíveis a Bti (AMORIM et al., 2007; PEI et al., 2002; YUAN et al., 2003).

Uma nova abordagem para o controle biológico de mosquitos vetores de patógenos tem sido recentemente proposta, a qual utiliza a bactéria endossimbiótica intracelular *Wolbachia pipientis*, presente em 70% das espécies de insetos no mundo (RUANG-AREERATE et al., 2003). A incompatibilidade citoplasmática (IC) é uma das manipulações reprodutivas causada pela bactéria. A IC ocorre na cópula entre indivíduos que diferem no tipo de linhagem da *Wolbachia* e resulta na morte embrionária precoce da prole (CHARLAT; CALMET; MERCOT, 2001). Como o mosquito *Ae. aegypti* não é naturalmente infectado pela bactéria, por isso, pesquisadores produziram infecções artificiais nesta espécie com a transfecção da linhagem *wAlb*, que infecta naturalmente *Ae. albopictus*, levando à elevadas taxas de IC, diminuindo a população do vetor (XI et al., 2005). O projeto ‘Eliminar a Dengue: Desafio Brasil’ tem como objetivo cessar a transmissão do vírus da dengue pela introdução de *Ae. aegypti* infectado com a linhagem *wMel*, que infecta *Drosophila melanogaster*, junto às populações locais de mosquitos, o que pode levar à IC e diminuição de baixos níveis populacionais do inseto vetor; a fase inicial do projeto será conduzida no Rio de Janeiro (HOFFMANN et al., 2011; ILICIEV, 2012; MCMENIMAN et al., 2008; WALKER et al., 2011).

2.2.2 Controle Genético

Com o avanço das pesquisas no campo da Biologia Molecular, a técnica de silenciamento gênico via RNA de interferência (RNAi) tem sido bastante estudada como potencial alternativa para o controle de insetos (WHYARD; SINGH; WONG, 2009). O RNAi é um mecanismo de regulação que ocorre naturalmente na maioria das células eucarióticas e, em plantas e animais, é uma defesa importante contra ataque de vírus (MOLNAR et al., 2005;

SUN; TSAO, 2008). Este mecanismo é capaz de promover a inativação gênica após a transcrição do RNA mensageiro, o que permite silenciar a atividade de genes específicos, controlar o fluxo de informação genética na célula, além de identificar a função destes genes (FIRE et al., 1998). Esta técnica pode ser usada para reduzir a competência vetorial ou diminuir a população dos insetos, pois é possível bloquear a transmissão de patógenos, gerar machos inférteis ou silenciar genes responsáveis pela síntese de quitina (PARADKAR et al., 2012; THAILAYILA et al., 2011; ZHANG; ZHANG; ZHU, 2010).

A utilização de mosquitos transgênicos para o controle de doenças pode ser possível devido a mecanismos que levam ao bloqueio da transmissão do patógeno, redução do número de picadas, aumento da mortalidade da prole e aumento da mortalidade dos mosquitos induzida pela infecção (MEDLOCK et al., 2009). Uma variação da técnica do inseto estéril, a liberação de insetos carregando um gene letal dominante (RIDL – *Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene*), está sendo utilizada com sucesso na Bahia para o controle de *Ae. aegypti* (LIMA, 2012). Esta linhagem, denominada de RIDL OX513A, produz mosquitos que carregam um gene responsável pela morte das larvas durante seu desenvolvimento. Esta técnica consiste na inserção de um gene que codifica uma proteína ativadora de transcrição que, quando expresso, atua na ativação de um segundo gene inserido na linhagem modificada, produzindo um produto letal ao mosquito. Porém, na presença de tetraciclina, a funcionalidade deste fator de transcrição é reprimida, o que leva a regulação condicional da ativação do gene letal (WILKE et al., 2009). As liberações de *Ae. aegypti* machos transgênicos na Bahia foram iniciadas em fevereiro de 2011, sendo um dos mecanismos utilizados para o combate ao vetor (LIMA, 2012; OLIVEIRA; CARVALHO; CAPURRO, 2011).

2.2.3 Controle Químico

Com o advento da agricultura, diversos compostos orgânicos e inorgânicos foram utilizados para o controle de insetos. Segundo Mariconi (1988), os inorgânicos são classificados em fluorados (fluoreto de sódio, criolita) arsenicais (arsênico branco, cálcio e chumbo) e miscelânea (sulfatos, carbonatos, entre outros). Dentre os inseticidas orgânicos, cujas substâncias ativas são provenientes de plantas, destacam-se o alcaloide nicotina, isolado de espécies de *Nicotiana*, o qual é agonista do receptor nicotínico da acetilcolina; além da rotenona, isolada de espécies do gênero *Derris* e *Lonchocarpus* e inibe o complexo da cadeia

de transporte de elétrons na mitocôndria (CASIDA; QUISTAD, 1998; SOLOWAY, 1976). Os compostos inorgânicos são bastante tóxicos; além disso, são sensíveis à luz e sua obtenção tem elevado custo, não sendo viável a sua utilização em campo.

Estes inseticidas foram amplamente substituídos no controle de pragas após a descoberta dos primeiros produtos orgânicos sintéticos em meados da década de 30 até os anos 70 (CASIDA; QUISTAD, 1998). O uso de compostos da classe dos organoclorados (OC), organofosforados (OP), carbamatos (CM) e piretróides (PY) teve um sucesso sem precedentes em várias campanhas de controle de vetores, sobretudo de espécies implicadas na transmissão da malária (BRADLEY, 1998). Porém, o meio ambiente tem sofrido com a utilização descontrolada destes compostos químicos, pois, além de causarem enorme impacto ambiental, depois de certo tempo perdem o largo espectro de atividade. Além disso, já foram descritas diversas espécies de artrópodes resistentes às quatro classes de inseticidas químicos citadas.

A partir dos estudos básicos de fisiologia dos insetos, a pesquisa por inseticidas alternativos, com sítio-alvo diferente dos inseticidas orgânicos sintéticos, levou à utilização de substâncias capazes de interferir nos processos da metamorfose e reprodução dos insetos (BECKER et al., 2003). Neste caso, surgiram os inseticidas que são reguladores de crescimento de insetos (IGR – *Insect Growth Regulator*) que podem ser divididos em duas categorias: os hormonais e os não-hormonais (GRAF, 1993). Os IGRs hormonais, como metoprene, hidroprene, piriproxifen e fenoxicarb, interferem no sistema endócrino provocando retardo no desenvolvimento do inseto e a morte. Já os IGRs não hormonais, como diflubenzuron e triflumuron, atuam sobre a formação do exoesqueleto dos insetos interferindo na síntese de quitina, molécula que constitui a cutícula e matriz peritrófica da maioria dos insetos e, dos ovários e ovos de algumas espécies (GRAF, 1993; MANSUR et al., 2010; MERZENDORFFER; ZIMMICH, 2003). O Plano Nacional para Controle da Dengue (PNCD) indica que nas localidades nas quais existam populações de *Ae. aegypti* resistentes aos inseticidas de 2ª geração, estes sejam substituídos por IGRs, como o metoprene e diflubenzuron, ou por bactérias entomopatógenas (BRASIL, 2009a).

Novas moléculas com atividade tóxica ao sistema nervoso de artrópodes foram desenvolvidas, buscando reduzir o efeito da resistência cruzada, além de aumentar a seletividade contra insetos, reduzir a toxicidade para outras espécies e apresentar alta eficácia, o que possibilita aplicações em campo em concentrações menores e mais espaçadas. Dentre alguns exemplos, podem-se citar os neonicotinóides, derivados da molécula de nicotina, que

agem como agonistas dos receptores nicotínicos da acetilcolina, promovendo a abertura dos canais de sódio, o que gera um colapso do sistema nervoso e morte (TOMIZAWA; CASIDA 2005). O espinosade foi o primeiro inseticida comercial entre as espinosinas, moléculas isoladas do actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* (HUANG et al., 2009), que tem como mecanismo de ação o estímulo do receptor colinérgico, o que induz ativação alostérica persistente dos receptores nicotínicos de acetilcolina, levando à morte dos insetos devido à prolongada contração muscular (PERRY; BATTERHAM; DABORN, 2011). Um recente trabalho realizado no México demonstrou a eficácia do espinosade no controle de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *C. quinquefasciatus* e *C. coronator*, mesmo após a recolonização do ambiente (MARINA et al., 2012).

2.3 Inseticidas orgânicos sintéticos

2.3.1 Organoclorados

A partir de 1940, o evento da descoberta dos inseticidas químicos de síntese provocou uma revolução que abriu espaço para que esta ferramenta passasse a ser a mais utilizada no controle de insetos (HEMINGWAY; RANSON, 2000). Os organoclorados (OC) foram os primeiros inseticidas sintéticos produzidos com amplo uso agrícola e domiciliar. São moléculas de hidrocarbonetos derivadas do clorobenzeno (DDT), ciclohexano (BHC, lindane) ou do ciclodieno (aldrin, dieldrin, endosulfan). O modo de ação destes compostos ainda não foi completamente elucidado, porém, sabe-se que atuam por ingestão e/ou contato, impedindo a transmissão nervosa normal (COATS, 1990). Os OCs derivados do clorobenzeno e do ciclohexano atuam nos canais de sódio, fazendo com que sua conformação fique permanentemente aberta, mesmo após a passagem do impulso. Aqueles derivados do ciclodieno atuam sobre os receptores do neurotransmissor inibitório do ácido gama-aminobutírico (GABA), não permitindo a entrada de íons de cloro no neurônio. Estas interferências levam a impulsos repetitivos, o que gera contração muscular, convulsões e provoca paralisia no inseto (*knockdown*), que pode ser seguida de morte (COATS, 1990; D'AMATO; TORRES; MALM, 2002).

O DDT foi o inseticida escolhido pela OMS para o controle das diferentes populações de insetos vetores de doença e foi amplamente utilizado no processo de erradicação da malária nas décadas de 50-60 (HEMINGWAY; RANSON, 2000). Porém, teve a utilização descontinuada e proibida, principalmente no controle de pragas agrícolas, pois

tem como uma de suas principais características a capacidade de acumular-se nas células gordurosas dos humanos e de outros animais, além de ser muito estável, podendo persistir nos organismos e no ambiente por até 30 anos (OPAS, 1996). Porém, o DDT é um dos 12 inseticidas recomendados pela OMS e continua sendo utilizado no controle da malária na África, apenas para pulverização residual de interiores, devido ao elevado poder residual (WHO, 2011b). No Brasil, é proibida a utilização dos OCs na agricultura desde 1985, e em 1998, foi proibido para uso em campanhas de saúde pública (BRASIL, 2009b). A Lei nº 11.936/09, instituída em 2009, proíbe a fabricação, a importação, a manutenção em estoque, a comercialização e o uso de DDT no Brasil (BRASIL, 2009b). Os OCs ainda desempenham um papel importante no presente, como desempenharam no passado, em programas de controle da Malária (CASIDA; QUISTAD, 1998).

2.3.2 Organofosforados

Os inseticidas que contêm fósforo em sua composição ou organofosforados (OPs) são classificados em três categorias, baseadas em sua natureza química: os derivados de grupos fenil (temephos, fenitrothion, entre outros), os alifáticos (malathion, vapon, vidrin, entre outros) e os heterocíclicos (clorpirifos, metil-clorpirifos) (BRAGA; VALLE, 2007). As duas primeiras categorias necessitam passar por uma etapa de bioativação, pois são administradas na forma de pró-inseticidas. Ocorre uma reação de oxidação por intermédio das Oxidases de Função Mista (MFOs), no qual o metabólito gerado possui toxicidade maior que o composto original (FUKUTO, 1990; MARONI et al., 2000).

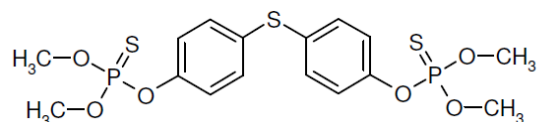
Esta classe de inseticidas age por contato e/ou ingestão, ligando-se ao centro esterásico da enzima acetilcolinesterase (AChE), impossibilitando-a de hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético, pois a enzima é fosforilada pelo inseticida, ficando inativa. A presença continuada da acetilcolina nas terminações nervosas interfere no mecanismo de transmissão neuronal, no qual o estímulo do sistema nervoso central é contínuo, ocasionando paralisia e morte do inseto (BRAGA; VALLE, 2007; SUCEN, 2001).

Por serem biodegradáveis e não se acumularem nos tecidos dos animais e vegetais, os OPs foram amplamente utilizados em programas de controle, substituindo os OCs. Porém, estes compostos são quimicamente instáveis, o que requer aplicações periódicas, em ciclos bimestrais (BRAGA; VALLE, 2007). Além disso, mesmo em doses relativamente baixas, são

mais tóxicos para os vertebrados do que os OCs (BECKER et al., 2003). O malathion é amplamente utilizado como adulticida em programas de controle de vetores na Saúde Pública, aplicado em ultrabaixo volume (UBV).

Para o controle das larvas, temephos (O,O,O',O'-tetrametil O,O'-ditiop-fenileno fosforotionato) (Figura 2) é amplamente utilizado nos programas de controle, numa concentração de 1 ppm de princípio ativo absorvido em grão de areia, numa formulação contendo 1% desta substância, esta formulação promove a liberação do ingrediente ativo lentamente para a água e prolonga o efeito do tratamento (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009). É o único OP aprovado pela OMS para uso em água de consumo humano, devido à baixa solubilidade em água e a baixa toxicidade ao ser humano (WHO, 2009). Como o temephos é um composto hidrofóbico, certa quantidade das moléculas deve ser adsorvida na matéria orgânica e nas paredes do recipiente, reduzindo a concentração na água e no período residual de controle das larvas. À medida que a concentração do resíduo diminui, o temefós adsorvido na matéria orgânica e nas paredes do recipiente tende a retornar à água e sob condições abióticas é estável à hidrólise por cerca de 30 dias (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009; HUGHES et al., 1980).

Figura 2. Estrutura química do organoclorado temephos.



Fonte: WHO, 2011c.

2.3.3 Carbamatos

Os carbamatos (CMs) são inseticidas orgânicos derivados do ácido carbâmico e, assim como os OPs, inibem a enzima AChE. Porém, o processo de inibição é por carbamilação e a ligação deste inseticida à enzima é mais instável, sendo reversível (SUCEN, 2001). Foram introduzidos no mercado consumidor desde 1950 e existem hoje aproximadamente 14 tipos diferentes de inseticidas CMs disponíveis (BRAGA; VALLE, 2007). Os CMs mais conhecidos são: Propoxur, Aldicarb e Bendiocarb. O conhecido “chumbinho”, utilizado como raticida, pertence a esse grupo (Aldicarb). Devido ao menor

odor de algumas formulações, os CMs tendem a ser mais utilizados para uso intradomiciliar quando comparado aos OPs.

2.3.4 Piretróides

Os piretróides (PYs) são compostos naturais obtidos a partir do piréto, extraídos do crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), sendo seus análogos sintéticos, como a aletrina, resmetrina, cipermetrina e deltametrina, produzidos em laboratório (ELLIOTT et al., 1973). Podem ser divididos em dois grupos: os de baixa toxicidade e que possuem alto efeito *knockdown* nos insetos, como aletrina e metoflutrina, e aqueles que são altamente tóxicos, como a cipermetrina e deltametrina (KAWADA et al. 2009). Estão sendo, atualmente, amplamente utilizados no controle dos insetos por serem biodegradáveis, não cumulativos e por raramente provocarem intoxicação em vertebrados terrestres (BRAGA; VALLE, 2007). Porém, para os animais aquáticos são extremamente tóxicos (WHO, 1990). Os inseticidas PY atuam tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central e o alvo são os canais iônicos de sódio dependente de voltagem (BECKER et al., 2003). A ligação do PY ao canal de sódio acarreta no prolongamento da abertura deste canal o que leva ao aumento do período de permeabilidade do sódio na membrana. Agem nos insetos com rapidez causando paralisia imediata e mortalidade. Junto aos OPs, malathion e temephos, é a classe de inseticida mais utilizada nos programas de controle do Brasil, sendo a deltametrina e cipermetrina os compostos mais utilizados para controle de insetos vetores (BRAGA; VALLE, 2007).

2.4 Resistência

O maior problema na entomologia aplicada e que ainda não foi totalmente resolvido é a evolução da resistência a inseticidas em populações de artrópodes (TABASHNIK; CROFT, 1982). Por conta da utilização em larga escala de inseticidas sintéticos por décadas, as populações de insetos vêm sendo expostas e selecionadas a diferentes produtos, reduzindo a probabilidade da existência de uma população ainda não teve contato com algum tipo inseticida (BECKER et al., 2003). A OMS (1998) define a resistência como a tolerância de uma linhagem a doses de um produto que é letal para a maioria dos indivíduos em uma população normal da mesma espécie. Já foram detectadas populações de insetos resistentes a todas as classes de inseticidas, incluindo Bs e IGRs (BRAGA; VALLE, 2007). Por isso,

Whalon e McGhaghey (1998) redefiniram resistência como um processo microevolucionário, no qual a alteração genética selecionada pelo uso do inseticida produz populações com diferenciado modo de manejo.

Em 1951 foi registrado o primeiro caso de populações de *Anopheles* resistentes ao organoclorado DDT e estudos têm demonstrado que diversas ordens de artrópodes apresentavam resistência a uma ou mais classes de inseticidas químicos (GEORGHIOU, 1990; GEORGHIOU; LAGUNES-TEJEDA, 1991). Liu et al. (2004) observaram que populações de *C. quinquefasciatus* do Alabama e da Flórida estavam resistentes a OPs, como o malathion, além de apresentar resistência cruzada a outras classes de inseticidas. Na Argentina o temephos é usado em programas de controle de *Ae. aegypti* desde 1998, com aplicações sistemáticas desde 2002. Um estudo realizado em 2008 mostrou que estas populações apresentaram uma razão de resistência na ordem de 3,9 vezes ao temephos (LLINÁS et al., 2010).

A redução da sensibilidade dos insetos aos inseticidas pode ocorrer devido a diferentes mecanismos como modificações comportamentais, redução da penetração do inseticida pela cutícula do inseto, aumento da capacidade de metabolização dos inseticidas (resistência metabólica) ou ainda pode ocorrer alterações nos sítios alvo dos inseticidas (HEMINGWAY; RANSON, 2000). A resistência a inseticidas é caracterizada por uma variedade de modificações moleculares, tais como alterações na transcrição, amplificação de genes e/ou mutações pontuais em regiões codificantes, que resultam no aumento da expressão de enzimas de detoxificação ou na sensibilidade reduzida da proteína alvo do inseticida, afetando o metabolismo do inseto (LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007; VONTAS; RANSON; ALPHEY, 2010). Os dois principais mecanismos de resistência aos OPs em populações de *Culex* são: o aumento da atividade de enzimas de detoxificação (BROGDON; McALLISTER, 1998) ou a perda da sensibilidade da acetilcolinesterase (TOMA et al., 2011; WEILL et al., 2003). A identificação dos alelos que conferem resistência é fundamental, pois um dos fatores que influenciam a evolução da seleção de resistência é a frequência inicial desses alelos de resistência nas populações.

2.4.1 Resistência comportamental

A resistência comportamental pode ser determinada por ações que influenciam a resposta do inseto a pressões seletivas exercidas por um determinado inseticida, podendo estar relacionadas à adaptação do inseto ao ambiente (HOY; HEAD; HALL, 1998). Neste caso, o inseto pode reconhecer a presença do xenobiótico e evitar o contato como, por exemplo, reduzindo a entrada em domicílios e escapando dos efeitos letais do inseticida (MATHENGE et al., 2001). A população de insetos mantém a susceptibilidade ao inseticida, porém muda o seu comportamento evitando o contato com o mesmo. De acordo com Dobzhansky (1951), a resistência a inseticidas caracteriza-se por ser pré-adaptativa, genética e hereditária e, como o ambiente tem efeito no comportamento dos insetos, a grande dificuldade é demonstrar a herdabilidade do caráter relacionado à resistência comportamental.

2.4.2 Redução na taxa de penetração

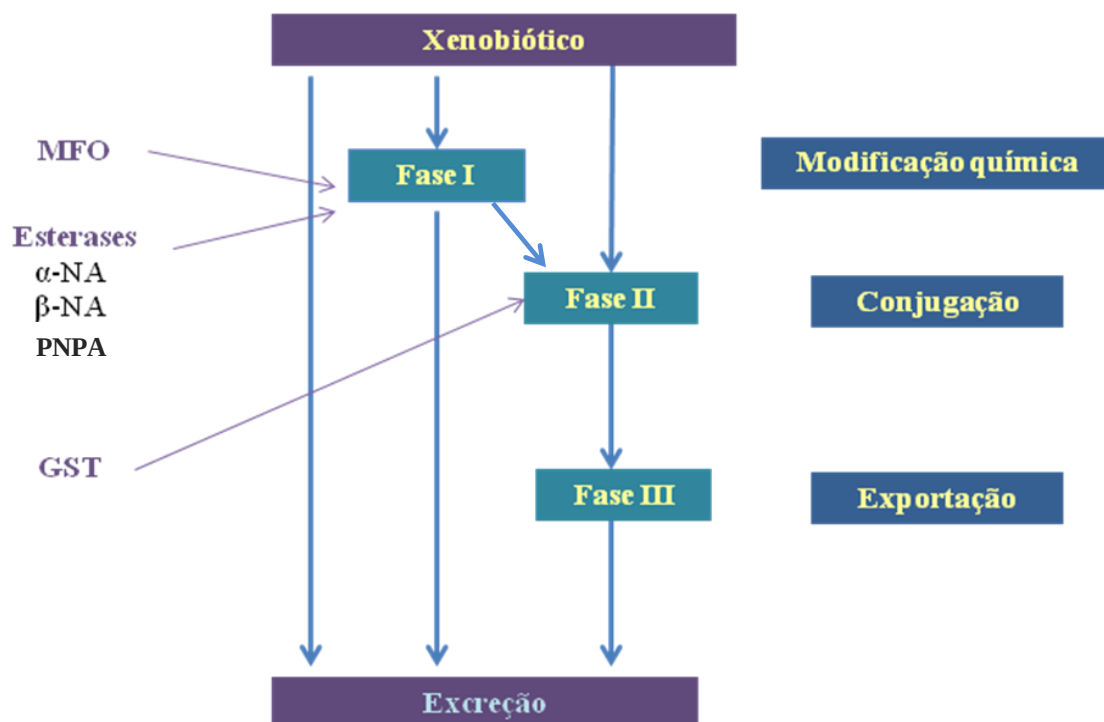
O mecanismo de redução da taxa de penetração do inseticida pela cutícula ocorre devido às alterações fisiológicas do inseto e na química da exocutícula, no qual a composição proteica do exoesqueleto tem papel relevante para esse mecanismo. Embora confira baixos níveis de resistência isoladamente, quando associada a outros mecanismos de resistência representa maior relevância no processo de resistência (BRAGA; VALLE, 2007). A base genética desse mecanismo está relacionada a genes secundários e, normalmente, esta característica confere pouca resistência, na ausência de outro mecanismo de resistência, não sendo significativa para as ações de programas de controle (ROUSH; DALY, 1990). Este mecanismo foi observado em populações de *C. quinquefasciatus* e *C. tarsalis* resistentes a organofosforados (APPERSON; GEORGHIOU, 1975; STONE; BROWN, 1969).

2.4.3 Resistência metabólica

A biotransformação inclui diversos sistemas enzimáticos, os quais atuam em uma variedade de substratos. Muitas destas enzimas têm a função de converter estruturas tóxicas em menos tóxicas, além de converter químicos lipofílicos em estruturas hidrofílicas que são rapidamente excretadas pela célula (LISKA, 1998).

A resistência metabólica tem sido associada à biotransformação dos inseticidas de 2ª geração pelo aumento da atividade de detoxificação promovida, principalmente pelas enzimas pertencentes às classes das Oxidases de Função Mista (MFOs), Esterases (ESTs) e Glutathione S-transferases (GSTs) (HEMINGWAY; RANSON, 2000). A biotransformação ocorre em três fases pela ação de enzimas detoxificantes (Figura 3). Na fase I, as enzimas irão reconhecer e atuar diretamente sobre o xenobiótico, levando à modificação química da molécula. As principais enzimas envolvidas nesta fase são as MFOs, responsáveis pela reação de oxidação, e as ESTs que reconhecem os grupos ésteres e hidrolisam a molécula. Quando não excretados, os produtos resultantes dessas reações podem sofrer reação de conjugação na fase II, e enzimas como as GSTs ligam a glutathione ao composto que foi ativado na fase I, tornando-o mais solúvel; a fase III consiste na compartimentalização e/ou excreção dos metabólitos para fora da célula (LISKA, 1998). Mutações que levam a amplificação dos genes que codificam enzimas de detoxificação ou alteração no perfil transcricional destes genes podem acarretar no aparecimento da resistência em diversas espécies de mosquitos (LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007).

Em *C. quinquefasciatus* foram identificados 302 genes relacionados com enzimas de detoxificação, sendo 71 esterases, 196 citocromo P450 e 35 GSTs citosólicas (YAN et al., 2012). Além disso, os autores identificaram que a expansão gênica em *Culex*, em relação a outras espécies de dípteros, ocorreu nas famílias das esterases e citocromo P450, e os genes das α -esterases, esterases do hormônio juvenil e as subfamílias *CYP325* e *CYP4* (oxidases) apresentaram uma maior expansão no genoma (YAN et al., 2012).

Figura 3 – Processo de biotransformação e excreção de xenobiótico.

Nota: A biotransformação pode ocorrer em três fases: na fase I ocorre a modificação química da molécula e as principais enzimas envolvidas são as oxidases de função mista (MFO) e esterases (ESTs). A reação de conjugação ocorre na fase II e, entre outras, as enzimas glutatona S-transferases ligam a glutatona ao composto que foi ativado na fase I, tornando-o mais solúvel; a fase III consiste na compartimentalização e/ou excreção dos metabólitos para fora da célula (LISKA, 1998).

Fonte: CARVALHO, 2008.

2.4.3.1 Oxidases de Função Mista

As enzimas citocromo P450, uma classe diversificada de enzimas pertencentes ao sistema de Oxidases de Função Mista (MFO), têm papel fundamental na detoxificação e/ou ativação de xenobióticos como drogas, pesticidas, toxinas de plantas, entre outros. Também estão envolvidas no metabolismo de compostos endógenos como hormônios, ácidos graxos e esteroides (LIU et al., 2011). As MFOs são codificadas pelos genes *CYP* (Cytochrome P450) e, por catalisar numerosas reações oxidativas, podem ser designadas na literatura por uma variedade de nomes, além de MFO: enzima citocromo P450, citocromo P450 Monooxigenases, dentre outros (FEYEREISEN, 1999). A nomenclatura da superfamília das MFOs é baseada na similaridade das sequências de aminoácidos e foi descrita por Nerberty (1993), o qual designa todos os genes com o prefixo *CYP*, seguido por um numeral para a

família, uma letra para a subfamília, e outro numeral para o gene individual (HEMINGWAY; RANSON, 2000).

Devido à grande variedade de xenobióticos degradados pelo sistema MFO, estas enzimas são altamente especializadas em insetos, estando envolvidas no metabolismo de todos os inseticidas e possuem um papel importante no metabolismo do hormônio juvenil e ecdisona (FEYEREISEN, 1999; HEMINGWAY; RANSON, 2000; LI; SCHULER; BERENBAUM, 2007). Uma única MFO consegue metabolizar mais de 20 diferentes substratos, além disso, um único composto xenobiótico pode ser metabolizado por múltiplas enzimas MFO (BERGÉ; FEYEREISEN; AMICHOT, 1998; FEYEREISEN, 1999). São hemoproteínas que utilizam o NADPH como cosubstrato e estão ligadas à membrana, localizadas na fração microssomal do retículo endoplasmático (microssomais) e nas mitocôndrias de todos os organismos, inclusive nos insetos (FEYEREISEN, 1999; HEMINGWAY; RANSON, 2000; KORSLOOT; van GERTEL; van STRAALLEN, 2004).

O desenvolvimento da resistência aos inseticidas pode ocorrer devido à detoxificação destes compostos pelo aumento no número de proteínas ou da atividade das P450, sendo resultado da superexpressão constitutiva dos genes *CYP* nos insetos resistentes (KASAI et al., 2000; ZHU et al., 2008). A expressão de alguns genes *CYP* em insetos pode ser induzida por ambos compostos exógenos e endógenos, fenômeno conhecido por 'indução' e, até o momento, já foram identificadas mais de 1.700 *CYP* em insetos (FEYEREISEN, 2006; NELSON, 2009). A modulação da expressão gênica pode ser refletida na necessidade do inseto de conservar energia e sua habilidade de se adaptar rapidamente às mudanças do ambiente através do aumento da atividade das enzimas de detoxificação, porém, isto só irá acontecer quando ocorre estímulo químico, que pode ser tanto endógeno quanto exógeno (ZHU et al., 2008).

Populações de *C. quinquefasciatus* resistentes a inseticidas apresentaram elevada expressão de vários genes *CYP* por superexpressão constitutiva ou indução por piretróides; logo, estes são fatores importantes no aumento do nível de detoxificação e na resistência aos inseticidas (KOMAGATA; KASAI; TOMITA, 2010; LIU et al., 2011; ZHU et al. 2008). Yang e Liu (2011) identificaram 204 genes P450 em todo o genoma de *C. quinquefasciatus*, muitos desses foram positiva (*CYP6AA7* e *CYP4C52v1*) ou negativamente modulados (*CYP6BY3*), tanto no estágio de larva quanto de adultos, sugerindo uma relação com a seleção de resistência a permetrina. Estes dados indicam que múltiplos genes *CYP* não estão apenas envolvidos na resistência a inseticidas, mas também são coresponsáveis pela detoxificação

dos mesmos, e estarem relacionados com a resposta homeostática dos mosquitos as mudanças no ambiente celular (YANG; LIU, 2011).

2.4.3.2 Esterases

As esterases (ESTs) abrangem um conjunto amplo de enzimas que apresentam atividade hidrolítica multifuncional e catalisam a hidrólise de um grande número de ésteres (WALKER; MACKENESS, 1983). Nos insetos, com base na sensibilidade aos substratos que as esterases hidrolisam *in vitro*, dois grupos podem ser distinguidos: as α -esterases, que hidrolisam preferencialmente o α -naftil-acetato e as β -esterases, que hidrolisam preferencialmente o β -naftil-acetato. São diferenciadas em quatro classes: as carboxilesterases (EC 3.1.1.1), as acetilesterases (EC 3.1.1.6), as arilesterases (EC 3.1.1.2) e as colinesterases que são classificadas em duas subclasses, a acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) e pseudocolinesterase (EC 3.1.1.8) (OAKESHOTT et al., 1993). As ESTs apresentam importante papel metabólico nos insetos, participam do controle dos níveis de hormônio juvenil, da regulação de mecanismos reprodutivos, de processos digestivos, além de estarem envolvidas na resistência aos inseticidas (BROGDON; McALLISTER, 1998; MIKHAILOV; TORRADO, 2000; VERMUT et al., 1998).

No caso da resistência metabólica aos inseticidas, a classe das carboxilesterases age na degradação do inseticida pela amplificação do número de genes e/ou pelo aumento da atividade enzimática, por conta dos mecanismos de regulação gênica no qual ocorre o aumento da síntese do produto (MOUCHÈS et al., 1990; OAKESHOTT et al., 1993). As ESTs que hidrolisam o substrato acetato de p-nitrofenil (PNPA) também estão relacionadas à resistência metabólica; porém, o acetato de p-nitrofenil é um substrato mais genérico e, na quantificação, abrange as enzimas α -esterases e β -esterases (HEMINGWAY, 1998). As ESTs mais conhecidas que estão envolvidas na resistência de *Culex* aos OPs pertencem ao super *locus Est*, composto por dois *loci*, *Est-2* e *Est-3*, e a resistência ao inseticida ocorre devido à superprodução de esterases, alcançada pela amplificação ou pela regulação gênica positiva (RAYMOND et al., 1998). Muitos alelos do *locus Est* já foram mundialmente identificados e 13 deles foram relacionados com a resistência aos OPs – *Ester^{B1}*, *Ester¹*, *Ester²*, *Ester⁴*, *Ester⁵*, *Ester⁸*, *Ester⁹*, *Ester¹⁰*, *Ester¹¹*, *Ester^{B6}*, *Ester^{B7}*, *Ester^{B12}*, *Ester^{A13}* (BEN et al., 2008, 2009; BERTICAT et al., 2000; CUI et al., 2006, 2007; RAYMOND et al. 1998, 2001; ZHANG et al., 2012).

2.4.3.3 Glutathione S-transferases

As glutathione S-transferases (GSTs) pertencem a uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da molécula de glutathione a várias outras moléculas e, em plantas e animais, são as principais enzimas da Fase II dos processos de biotransformação de compostos endógenos e exógenos (CHELVANAYAGAM; PARKER; BOARD, 2001; KASAI et al., 2009). Suas funções também incluem transporte de compostos intracelulares, sinalização de moléculas e proteção contra estresse oxidativo (CHO et al., 2001; SAWICKI et al., 2003; SINGH et al., 2001). As GSTs catalisam a conjugação da glutathione com o centro hidrofílico das substâncias tóxicas e, geralmente, a consequência destas reações é o aumento da solubilidade dos compostos, contribuindo para sua excreção (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; LISKA, 1998). As GSTs são classificadas em três categorias principais: citosólica, microsomal (proteínas de membranas associadas ao metabolismo de eicosanóides e glutathione - MAPEG), e GSTs mitocondriais (CHE-MENDOZA; PENILLA; RODRIGUEZ, 2009).

Nos insetos foram descritas GSTs citosólicas e microsomais, das quais as citosólicas são as principais responsáveis pela detoxificação dos inseticidas (CHE-MENDOZA; PENILLA; RODRIGUEZ, 2009; LUMJUAN et al. 2007). As GSTs citosólicas são enzimas diméricas de aproximadamente 25 kDa e podem ser divididas em seis classes: Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Theta, Zeta e Iota, sendo as duas primeiras GSTs exclusivas de artrópodes (RANSON et al., 2001; 2002; REDDY et al., 2012). Um estudo recente identificou 35 GSTs citosólicas e cinco microsomais em *C. quinquefasciatus*, destas 65% pertenciam às classes Delta e Epsilon e estão relacionadas com a detoxificação de inseticidas (REDDY; PRASAD; RAGHAVENDRA, 2011; REDDY et al., 2012). Os autores identificaram e anotaram 14 genes da classe Delta, 9 da Epsilon, 1 da Omega, 1 da Sigma, 6 da Teta, 1 da Iota e 5 microsomais (REDDY; PRASAD; RAGHAVENDRA, 2011).

2.4.4 Resistência por alteração do Sítio-Alvo

Os inseticidas de 2ª geração têm como alvo o sistema nervoso dos insetos e apresentam alta especificidade pelo sítio ativo; logo, se houver alguma alteração nesses locais ocorre o impedimento da ligação ou a interação com o inseticida será dificultada, levando à resistência (KARUNARATNE; HEMINGWAY, 2001; SODERLUND; KNIPPLE, 2003).

Foram descritos três diferentes mecanismos de resistência por alteração no sítio-alvo: mutações no gene da acetilcolinesterase, no receptor do neurotransmissor ácido γ -amino butírico (GABA) e no canal de sódio (HEMINGWAY; RANSON, 2000).

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela degradação de acetilcolina, neurotransmissor que promove a propagação do impulso nervoso quando presente na fenda sináptica, o que induz a abertura de canais de sódio na célula pós-sináptica. Em seguida, após o término do estímulo, a acetilcolina é clivada pela AChE. Os inseticidas OPs e CMs têm estruturas análogas à acetilcolina, ligam-se covalentemente a um resíduo de serina no sítio ativo da AChE, inibindo-a e conduzindo a um acúmulo de acetilcolina nas sinapses, o que causa a morte dos insetos por excitação continuada (HEMINGWAY; RANSON, 2000; KONO; TOMITA, 2006). Foram descritas algumas mutações nos genes da AChE no qual o produto gênico é insensível à ação dos inseticidas em diversas espécies de insetos (DJOGBENOU et al., 2007; MUNHENGGA et al., 2008; WEILL et al., 2004).

Em *Culex* o *locus ace-1* codifica uma AChE e já foram identificadas três diferentes substituições de aminoácidos da proteína, resultando na diminuição da ligação do inseticida com o sítio-alvo devido a uma única mutação no gene que acarreta mudança de um aminoácido na proteína: G119S em *Culex vishnui* e *C. pipiens*, F290V em *C. pipiens* e, F331W em *C. tritaeniorhynchus* (ALOUT et al., 2007; 2009; NABESHIMA et al., 2004; WEILL et al., 2004).

Os receptores do ácido γ -amino butírico (GABA) pertencem a uma superfamília de receptores presentes nas junções sinápticas do sistema nervoso central e nas sinapses neuromusculares de insetos. Após a transmissão de um impulso nervoso, o neurotransmissor inibitório GABA reestabelece o estado de repouso do sistema nervoso central, pois há um aumento na permeabilidade da membrana aos íons cloro, o que desencadeia o mecanismo inibitório do sistema nervoso (HEMINGWAY; RANSON, 2000). Os ciclodienos agem antagonizando o efeito de GABA, impedindo a entrada dos íons Cl^- no neurônio, no qual resulta em hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, levando à morte do inseto (HEMINGWAY; RANSON, 2000). As avermectinas atuam competindo com o neurotransmissor GABA pela ligação aos os receptores, porém esta ligação é irreversível o que gera toxicidade, seguida de morte do inseto (HEMINGWAY; RANSON, 2000). Foram identificadas duas mutações no gene do receptor de GABA, A302S e A302G, que acarretaram na resistência em populações de *Culex* e *Anopheles* (ASIH et al., 2012; DU et al., 2005; TANTELY et al., 2010).

O canal de sódio é uma proteína transmembrana que consiste de quatro domínios homólogos, no qual cada domínio possui seis hélices e *loops* ligando as hélices e os domínios entre si (DONG, 2006). DDT e PYs ligam-se a uma das subunidades dos canais de sódio, modificando-os individualmente e mantendo-os abertos por mais tempo, promovendo um aumento do fluxo de sódio para o interior da membrana e a manutenção da fase de despolarização. Potenciais de ação repetitivos são desencadeados quando a despolarização atinge um limite, levando os insetos à morte por hiperexcitação (DONG, 2006).

Mutações no gene do canal de sódio levam à resistência em diversas espécies de insetos, conhecida como *knockdown resistance (kdr)*, geralmente causada por uma substituição de uma leucina (1014) no segmento hidrofóbico do domínio II, reduzindo a afinidade do sítio alvo para os inseticidas (DONG, 2006; O'REILL et al., 2006). Outra mutação no mesmo domínio, que ocasiona na substituição do aminoácido metionina por uma treonina, resulta num aumento elevado da resistência aos dois tipos de inseticidas (DDT e PYs), fenótipo conhecido por super *kdr*. Em *Culex* e *Anopheles* duas substituições, L1014F e L1014S, foram identificadas estando envolvidas com a resistência aos PYs (MARTINEZ-TORRES et al., 1998, 1999; RANSON et al., 2000; XU et al., 2011; ZHOU et al., 2009). Como diferentes inseticidas apresentam o mesmo sítio-alvo, a identificação precoce dessas mutações em populações naturais é importante para o manejo da resistência, com a utilização de inseticidas com sítio-alvo diferente.

2.5 Diversidade genética

Devido às diversas modificações do ambiente, populações de uma espécie podem ser subdivididas em grupos e, ao longo das gerações, pode ocorrer à diferenciação genética entre estas subpopulações. A diferenciação surge pela seleção natural de diferentes genótipos ou por processos aleatórios de transmissão dos alelos de uma geração a outra em cada subpopulação e, a habilidade de adaptação de um organismo depende de sua variabilidade genética (EXCOFFIER, 2001; MÜLLER; MARCONDES; NAVARRO-SILVA, 2010).

De acordo com o princípio de Hardy-Weinberg, as frequências gênicas não se alteram nas populações infinitamente grandes e panmíticas, e as proporções genotípicas atingem um equilíbrio mantendo uma relação constante entre si ao longo do tempo (BEIGUELMAN, 1994). O desvio desse equilíbrio pode ser demonstrado pelo cálculo do número de heterozigotos esperados para uma população e, quando há excesso de homozigotos

na população, a heterozigosidade observada na população (H_o) é menor do que a esperada (H_e). A heterozigosidade pode ser considerada uma medida de variabilidade genética a qual depende do número de alelos e de suas frequências na população. A H_e de um *locus* é equivalente à H_o , considerando-se apenas as populações em completo equilíbrio. Fatores como endogamia e deriva gênica influenciam os valores de heterozigotos na população (BEIGUELMAN, 1994).

Existem numerosas técnicas moleculares disponíveis para avaliar a diversidade genética, como a utilização de marcadores moleculares de fácil uso e que distingue *locus* com alelos codominantes, fornecendo maior informação genética por *locus* e que possibilitam inferir sobre a heterozigosidade de uma população, o que os tornam valiosos para avaliação da endogamia (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Além disso, os marcadores devem fornecer valores não ambíguos e preferivelmente com alta variação, pois a utilização desses marcadores é realizada na tentativa de estimar o número de modificações dos nucleotídeos entre alelomorfos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Microsatélites (*simple sequences repeats* - SSRs) são regiões do genoma que possuem de uma a seis bases de comprimento repetidas em *tandem* e possuem uma elevada taxa de mutação, que varia entre 10^{-3} e 10^{-6} por *locus* por geração (KASHI; KING; SOLLER, 1997). Estas mutações ocorrem durante a replicação, na qual ocorre ganho ou perda de repetições nucleotídicas, por um mecanismo de deslizamento da DNA polimerase, e cada alelo de um microsatélite referem-se ao número de repetições encontradas que quando amplificadas via PCR, estas sequências apresentam grande variação de comprimento ou de alelos entre os indivíduos (LI et al., 2002, 2004).

Os microsatélites possuem expressão codominante, são multialélicos e apresentam alto grau de polimorfismo genético; por isso, têm sido considerados os marcadores ideais para estudos genéticos de populações (LEHMANN; HAWLEY; COLLINS, 1996). Também possuem efeito sobre a regulação da atividade gênica, organização da cromatina e, recombinação e replicação do DNA (LI et al., 2002). Mecanismos como erros durante a recombinação com o *crossing-over* desigual, falhas durante a replicação ou reparo do DNA e retrotransposons, são candidatos para explicar como essas regiões altamente repetitivas e com elevado nível de mutação surgem no genoma (LI et al., 2002, 2004).

Segundo Oliveira et al. (2006), os microsatélites são classificados pelo número de nucleotídeos do motivo repetido, podendo ser mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos; além disso, também podem ser classificados de acordo com a sequência repetitiva

(microssatélites perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos). Os perfeitos consistem de um único motivo de repetição, não havendo interrupção na sequência (CACACACA); os imperfeitos apresentam nucleotídeos diferentes no meio da sequência (CACATCA); além disso, quando uma pequena sequência altera o padrão da repetição, interrompendo a sequência do microssatélite (CACACATTGGCA), são chamados de interrompidos, enquanto os microssatélites compostos consistem de dois ou mais motivos repetitivos diferentes (CACACAGTGTGT).

Esta classificação não é fácil de ser identificada, pois os microssatélites frequentemente estão flanqueados por sequências de nucleotídeos semelhantes, diferente do restante do DNA envolvente, o que dificulta o estabelecimento de fronteiras (OLIVEIRA et al., 2006). O processo evolutivo dos microssatélites é complexo e pode ser influenciável por fatores como o tamanho e composição do motivo, o número e a estrutura das repetições, a natureza da região flanqueadora dos alelos, e da taxa de recombinação (ELLEGREN, 2000).

Atualmente, os microssatélites são bastante utilizados em estudos de genética de populações para determinação do grau de relação entre indivíduos de uma mesma espécie, avaliação dos níveis de endogamia e o tamanho efetivo de uma população, ocorrência de gargalos populacionais, de fluxo gênico entre as populações, além de estudos filogeográficos e filogenéticos (LI et al., 2002). Diversos trabalhos relacionados com emprego de microssatélites em estudos com indivíduos da família Culicidae já foram realizados, nos quais foram avaliadas a capacidade vetorial, a dispersão, a variabilidade genética inter e intrapopulacional, entre outros (MÜLLER; MARCONDES; NAVARRO-SILVA, 2010). Kilpatrick et al. (2010) encontraram diferenças na estruturação genética entre indivíduos do complexo *C. pipiens*, coletados em Nova York e Massachusetts, infectados com o VNO daqueles que não estavam infectados, e também observaram que populações de locais geograficamente próximos, a competência vetorial variou de forma sincrônica, sugerindo que fatores ambientais e a genética populacional podem influenciar na competência vetorial.

O sequenciamento do genoma do *C. quinquefasciatus* está completo e, segundo Reddy, Labbé e Corbel (2012), não é apenas outro genoma para comparação genômica, pois esta espécie apresenta diversas particularidades quanto à resistência a inseticidas e capacidade vetorial. Diversos estudos estão sendo realizados utilizando marcadores microssatélites para diferenciar subespécies do complexo *C. pipiens*, além de analisar a diversidade genética em populações de diversas localidades e comparar esta diversidade com outras espécies, como *Ae. aegypti* e *An. gambiae* (HICKNER et al., 2010; KENT; HARRINGTON; NORRIS, 2007;

KOTHERA et al., 2009, 2012; REUSKEN et al., 2010; WEITZEL et al., 2009). Neste estudo, foram utilizados 16 marcadores microssatélites e avaliados diversos parâmetros para identificar a variabilidade genética e o fluxo gênico entre sete populações de *C. quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco.

3 JUSTIFICATIVA

Culex quinquefasciatus é uma espécie de mosquito vetor de agentes etiológicos causadores de doenças de interesse médico, frequentemente presente em elevadas densidades populacionais em áreas urbanas, causando grande incômodo à população humana, associado às picadas durante a alimentação sanguínea; portanto, são necessárias medidas para mantê-lo sob controle. Não há programas nacionais de controle desta espécie, porém, a cidade do Recife, em Pernambuco, utiliza o larvicida *Bacillus sphaericus* (Bs) para controle de *Culex* desde 2003 e avaliações semestrais dessa população identificaram alterações em sua susceptibilidade ao Bs.

Entretanto, os municípios brasileiros utilizam inseticidas químicos para o controle do mosquito *Aedes aegypti* desde 1996, com a implantação do Programa Nacional de Controle da dengue (PNCD). A ampla utilização destes compostos, sobretudo o temephos, larvicida da classe dos organofosforados, tem levado a seleção de populações de *A. aegypti* resistentes a estes inseticidas. Apesar de apresentarem criadouros diferentes, os inseticidas aplicados para o controle de *A. aegypti* podem selecionar resistem nas populações de *C. quinquefasciatus*, visto que, geralmente, o destino final da água utilizada para consumo humano (criadouro de *A. aegypti*) é nos esgotos (criadouro de *C. quinquefasciatus*).

A resistência aos inseticidas é um grande desafio para o seu manejo, mas ao mesmo tempo, é um sistema ideal para estudar o processo da microevolução e da adaptação ao meio ambiente. A identificação dos alelos de resistência é importante para estudar a evolução de mutações adaptativas nos insetos e das interações gênicas ao longo desse processo. Esses alelos podem ser utilizados como marcadores para dissecar o processo populacional em uma escala microevolutiva.

O sequenciamento do genoma do *C. quinquefasciatus* está completo e sua anotação está em andamento, portanto, este é um momento oportuno para explorar esta fonte de informação e desenvolver ferramentas que são de fundamental importância tanto para o controle do vetor como também para os pesquisadores investigarem a biologia básica da espécie.

4 HIPÓTESES

- Populações naturais de *Culex quinquefasciatus* coletadas no Estado de Pernambuco (PE) apresentam susceptibilidade alterada ao inseticida químico temephos utilizado no passado e para o atual controle de *Aedes aegypti*.
- As populações de *Culex quinquefasciatus* no Estado de PE representam uma unidade panmítica, com alto fluxo gênico entre elas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Identificar se existem e quais são os mecanismos de resistência a inseticidas químicos presentes em populações naturais de *Culex quinquefasciatus* coletadas no Estado de Pernambuco (PE).

5.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a susceptibilidade *in vivo* de larvas de *Culex quinquefasciatus* ao larvicida organofosforado temephos de seis localidades de PE;
- b) Quantificar a atividade das enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticidas químicos em populações de *C. quinquefasciatus*;
- c) Identificar mutações previamente descritas no gene de resistência da acetilcolinesterase (*ace1*) e estimar suas frequências em populações de *C. quinquefasciatus* de PE;
- d) Descrever o grau de diversidade genética presente neste gene;
- e) Caracterizar a diversidade genética e o grau de diferenciação das populações de *Culex* por meio de marcadores microssatélites;

6 METODOLOGIA

6.1 Áreas de estudo

Os espécimes de *Culex quinquefasciatus* foram obtidos a partir de ovos coletados em bairros situados em seis municípios do estado de Pernambuco (PE), como apresentado no mapa 1. Quatro destes municípios encontram-se na Região Metropolitana do Recife (RMR), onde os bairros selecionados foram: (1) Água Fria (AF) no Recife; (2) Alto da Conquista (AC) em Olinda; (3) Cavaleiro em Jaboatão dos Guararapes (JB) e (4) Nossa Senhora do Ó em Ipojuca (IP) situados a 6 km, 10 km, 24 km e 54 km da cidade do Recife, respectivamente. Os outros dois municípios foram: (5) Glória do Goitá (GG) e (6) Santa Cruz do Capibaribe (SC), localizados a 60 km e 190 km do Recife, respectivamente. As características de cada município estão apresentadas na Tabela 1, e a cobertura de saneamento básico em Pernambuco é de apenas 30% do território, sendo Recife o município que apresenta o maior território coberto (IBGE, 2008). Todos os municípios estão incluídos no Plano Nacional para Controle da Dengue (PNCD), apresentando, portanto, histórico de uso do temephos no controle de *Aedes aegypti*, o mosquito vetor do vírus dengue.

Tabela 1 – Características demográficas e microrregião de seis municípios do Estado de Pernambuco.

Cidade	População (hab.)	Área (Km ²)	Densidade demográfica (hab/ Km ²)	Microrregião
Recife	1.537.704	218,43	7.037,61	Litoral
Olinda	377.779	41,68	9.068,36	Litoral
Jaboatão dos Guararapes	644.620	258,69	2.493,06	Litoral
Ipojuca	83.862	527,10	151,39	Litoral
Glória do Goitá	29.019	231,83	125,17	Zona da Mata
Santa Cruz do Capibaribe	87.582	335,30	261,23	Agreste

Fonte: IBGE, 2010.

6.2 Populações naturais e colônias de mosquitos

A colônia susceptível de laboratório (PX), proveniente do bairro de Peixinhos – Olinda/ PE, tem sido mantida sob condições de laboratório por mais de um ano, aproximadamente 14 gerações e foi utilizada neste estudo como padrão de susceptibilidade ao temephos.

As populações naturais de *C. quinquefasciatus* foram obtidas, entre agosto de 2009 e dezembro de 2010, a partir da coleta de ovos através de armadilhas de oviposição BR-OVT (BARBOSA et al., 2007), instaladas randomicamente no peridomicílio e intradomicílio de 30 residências de cada bairro situado nos municípios citados no item 7.1 (Figura 4). A permanência das armadilhas em campo foi de aproximadamente três semanas consecutivas para coletar, no mínimo, 100 jangadas (conjunto de ovos agrupados) para estabelecer cada população em laboratório. Para o estabelecimento da população de laboratório (PX), foram realizadas coletadas de cerca de 500 jangadas na localidade, nos períodos entre 2007 e 2008. Esta população foi mantida em laboratório por mais de 14 gerações, antes do início deste trabalho.

Todas as colônias foram mantidas sob condições controladas de temperatura ($\pm 26^{\circ}\text{C}$), umidade ($\pm 80\%$) e fotoperíodo (12h:12h luz/escuro) no insetário do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ/PE, como descrito previamente (PEI et al., 2002). Larvas das gerações F1 e F3 foram avaliadas por meio de bioensaios, além disso, fêmeas com até cinco dias de emergência foram estocadas à -70°C para os ensaios bioquímicos e extração de DNA.

A população de AF tem sido avaliada quanto a seu nível de suscetibilidade ao biolarvicida *Bacillus sphaericus* (Bs) (SILVA-FILHA et al., 2008) e um estudo recente mostrou que nenhuma diferença significativa na susceptibilidade a Bs, após 24 tratamentos, foi observada entre a população de AF e a colônia susceptível de laboratório (CHALEGRE et al., 2009).

Mapa 1 – Mapa do Brasil (A) e do Estado de Pernambuco (B).

Nota: Os números indicam as cidades onde as jangadas de *Culex quinquefasciatus* foram obtidas. 1 – Olinda (Peixinhos e Alto da Conquista); 2 – Recife; 3 – Jaboatão dos Guararapes; 4 – Ipojuca; 5 – Glória do Goitá; 6 – Santa Cruz do Capibaribe.

Fonte: AMORIM et al., 2013.

Figura 4 - Instalação da armadilha BR-OVT no intra e peridomicílio de uma residência em Ipojuca, Pernambuco, Brasil.

Fonte: AUTORA, 2013.

6.3 Bioensaio de dose-resposta

O bioensaio é a principal ferramenta para monitorar a susceptibilidade *in vivo* das larvas de culicídeos aos inseticidas empregados para seu controle. Para estimar o nível de susceptibilidade ao temephos em cada população, esses ensaios foram realizados de acordo com o procedimento padrão descrito pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981), com pequenas modificações, como a idade e quantidade das larvas por cada recipiente. Cada ensaio foi realizado utilizando, no mínimo, três replicatas de grupos de 20 larvas do 3º estágio, em recipientes com 100 mL de água destilada, tratados com diluições seriadas do inseticida, compreendendo seis a dez concentrações, além do grupo controle testado apenas com etanol e água. Cada bioensaio foi repetido ao menos três vezes e as médias das concentrações letais para 50% e 95% das larvas (CL_{50} , CL_{95}), expostas durante 24 h ao temephos, foram estimadas pela análise de probit (FINNEY, 1971) usando o programa SPSS 8.0 para Windows.

A razão de resistência (RR) foi determinada a partir dos valores de CL_{50} ou CL_{95} da população de campo e de laboratório (PX). O critério de Mazzarri e Georghiou (1995) foi utilizado para classificar o nível de resistência das populações testadas em: baixa ($RR < 5$), moderada ($5 < RR < 10$) ou alta ($RR > 10$). Todas as populações citadas acima foram avaliadas por bioensaio, com exceção de AC que foi utilizada apenas no sequenciamento do gene da acetilcolinesterase e avaliação da diversidade genética.

6.4 Ensaios bioquímicos

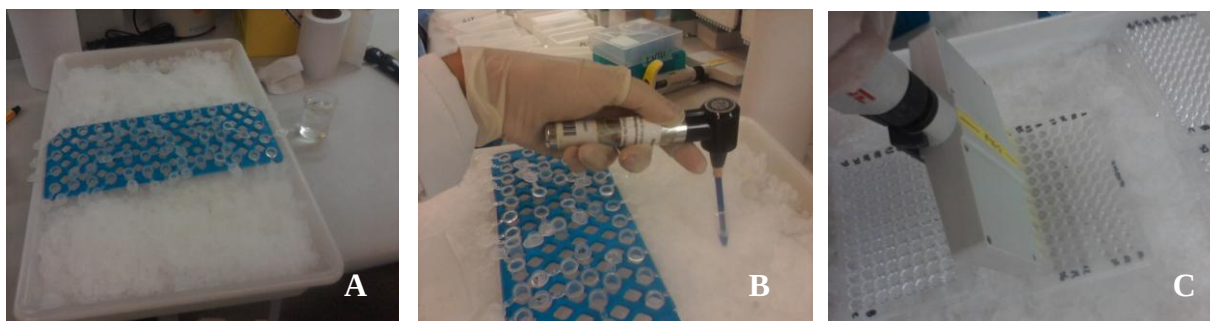
A atividade das enzimas de detoxificação e insensibilidade da acetilcolinesterase foi medida usando, aproximadamente, 120 fêmeas não alimentadas com sangue e com idade de até um dia de emergência. Após os resultados dos bioensaios, para este teste bioquímico foram analisadas apenas amostras da população de campo susceptível (AF) e uma população de campo com resistência moderada ao temephos (SC). As atividades das enzimas esterases (α -, β -esterases e PNPA-esterase), glutathione S-transferases (GST), oxidases de função mista (MFO) e acetilcolinesterase (AChE) foram avaliadas de acordo com o protocolo do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006). Como controle interno, todos os ensaios bioquímicos foram realizados inicialmente com a linhagem de referência susceptível (PX), servindo como parâmetro enzimático comparativo e cada ensaio foi repetido duas vezes. Foram utilizadas

microplacas de 96 poços e, para a leitura da absorbância, foi utilizado o espectrofotômetro leitor de microplacas (Versa-Max, da Molecular Devices).

Para cada ensaio, 40 fêmeas da população testada foram distribuídas individualmente em microtubos de 1,5 mL contendo 30 μ L de água Milli-Q, numerados e acondicionados sobre uma bandeja com gelo (Figura 5a-b). Além destas, cinco fêmeas da população referência de laboratório (PX) foram utilizadas como controle padrão do ensaio. Em seguida, adicionou-se 270 μ L de água em cada tubo e foram distribuídas alíquotas de 25 μ L e 20 μ L para os testes da AChE e MFO, respectivamente (Figura 5c). O restante do homogenato foi centrifugado a 12.000 *g* por 60 segundos e, por fim, as alíquotas de 10 μ L e 15 μ L foram distribuídas para avaliar a atividade das esterases e GSTs, respectivamente. Estes ensaios foram repetidos por mais duas vezes, totalizando uma amostra de 120 fêmeas de cada população e para cada indivíduo, existia uma réplica na placa.

O substrato utilizado em cada ensaio incluiu α e β naphthyl para α -Est e β -Est, respectivamente, p-nitrophenil PNPA para PNPA-Est, glutathiona reduzida para GST, TMBZ (3,3', 5,5'-tetramethyl-benzidine dihydrochloride) para MFO, iodeto de acetilcolina para atividade da AChE, e o inseticida propoxur foi usado para inibir a atividade e medir a insensibilidade da AChE. O percentual de indivíduos analisados com atividade enzimática maior do que o percentil 99 de PX foi usado para classificação da população como inalterada ($\leq 15\%$), alterada ($> 15\%$ e $\leq 50\%$) ou muito alterada ($> 50\%$) (Montella et al., 2007). As análises estatísticas foram realizadas por meio do software GEN5.

Figura 5 - Etapas para homogeneização de fêmeas de *Culex quinquefasciatus*, coletadas no Estado de Pernambuco, para avaliar a atividade das enzimas de detoxificação e insensibilidade da acetilcolinesterase.



Nota: A - Distribuição das fêmeas em microtubos de 1,5 mL, numerado, acondicionados numa bandeja com gelo. B - Homogeneização das fêmeas e C - Distribuição das alíquotas em placas de 96 poços.

Fonte: AUTORA, 2013.

6.5 Extração do DNA genômico

DNA genômico foi extraído de mosquitos fêmeas das populações estudadas, com até cinco dias de emergência, usando DNazol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), como recomendado pelo fabricante. O mosquito foi macerado, individualmente, em 100 µL do reagente DNazol® e homogeneizado por 1 minuto. As amostras foram centrifugadas a 10.000 *g* por 10 minutos. Aproximadamente 130 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e precipitado com 50 µL de etanol ultrapuro, homogeneizado por 30 segundos e centrifugado a 10.000 *g* por 5 minutos. Em seguida, após descarte do etanol, o sedimento contendo o DNA foi lavado em 100 µL de etanol 75% e centrifugado novamente por 1 minuto a 10.000 *g*. Após a retirada do etanol, o sedimento foi deixado para secar a temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras de DNA foram, então, resuspensas em 50 µl TE® (Invitrogen, Carlsbad, CA).

6.6 PCR e sequenciamento do gene *ace1*

A mutação pontual no gene *ace-1* mundialmente conhecida como uma substituição de uma Glicina por uma Serina (G-S) na posição 119 da proteína acetilcolinesterase (G119S), é responsável pela insensibilidade a inseticidas da classe dos OPs e CMs em populações de *Culex*. Para avaliar se esta mutação está presente nas amostras de *Culex* estudadas, exceto em amostras provenientes de GG, foram realizadas reações de PCR utilizando *primers* específicos que amplificam um fragmento de 457 pares de bases (pb), dentro do exon 3 do gene *ace-1*, incluindo a mutação pontual (LABBÉ et al., 2007a): CpExdir 5'-CGA CTC GGA CCC ACT CGT -3' e CpExrev 5'-GAC TTG CGA CAC GGT ACT GCA -3'. As reações foram feitas em volume final de 25 µL contendo 0,2 µM de cada dNTP, 2,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 ng de DNA molde e 1,6 µM de cada *primer*. Cada reação de PCR foi realizada em termociclador BIOMETRA® sob as seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos (94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 2 min), seguido por uma etapa final de 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídeo (10 mg/L) e visualizado em um transiluminador UV (UVP, Upland, CA, EUA).

Os produtos de PCR foram purificados usando o kit GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), de acordo com o fabricante, e sequenciados em ambos os sentidos. O sequenciamento foi realizado utilizando 10 ng de

amplicon e 3,2 pmol de cada *primer* (CpExdir e CpExrev) em sequenciador de 16 capilares ABI 3100 (Applied Biosystems, CA, EUA). A PCR para o sequenciamento baseou-se no método Dideoxi de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSEN, 1997) com a utilização do kit para sequenciamento BigDye Terminator vs 3.1 (Applied Biosystems, CA, EUA) seguindo as indicações do fabricante.

Os cromatogramas das sequências (*reads*) foram analisados usando o PHRED como ferramenta do programa Codon-Code Aligner versão 3.7.1. (CodonCode Corporation, Dedham, MA) e aqueles com qualidade ≥ 20 foram utilizados para geração de sequências consensos pelo programa. O software DnaSP foi usado para estimar a diversidade nucleotídica e haplotípica das sequências (LIBRADO; ROZAS, 2009).

6.7 Caracterização da diversidade genética utilizando marcadores microsatélites

Neste estudo, foram utilizados 16 marcadores microsatélites (Quadro 1) (HICKNER, dados não publicados) para analisar a variabilidade genética entre e dentro das sete populações analisadas. A seleção destes foi realizada considerando os seguintes parâmetros: se estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, não apresentaram desequilíbrio de ligação, não apresentaram alelos nulos e são polimórficos. Foram enviadas amostras de DNA de 50 indivíduos, de cada população, para a Universidade de Notre Dame, porém, para este processo foram analisados 30 indivíduos de cada amostra.

6.7.1 Amplificação e separação dos microsatélites

Para amplificação dos 16 microsatélites, foram utilizados *primers* marcados com fluoróforos NED (amarelo), HEX (verde) ou 6-FAM (azul) (DNA Technologies and Applied Biosystems, EUA), apresentados no Quadro 1 (HICKNER et al., dados não publicados). Os *primers* foram reunidos em grupos multiplex e abrangeram todos os três cromossomos de *C. quinquefasciatus* (Figura 6). As PCRs foram realizadas em placas de 96 poços (Dot Scientific, Burton, MI) em um volume final de 25 μ L. Cada reação continha 1x *Taq buffer* (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 9.0, 0.1% Triton X), 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 5 pmoles de cada *primer*, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase e 20 ng do DNA genômico. Os tamanhos dos amplicons variaram entre 128 e 253 pb. Cada reação foi realizada em um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) sob as seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por um minuto, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 2

minutos; seguidos por uma etapa final de 72 °C por 10 minutos. Para validação de cada multiplex, a detecção dos amplicons foi realizada em gel de agarose 2% para análise dos fragmentos.

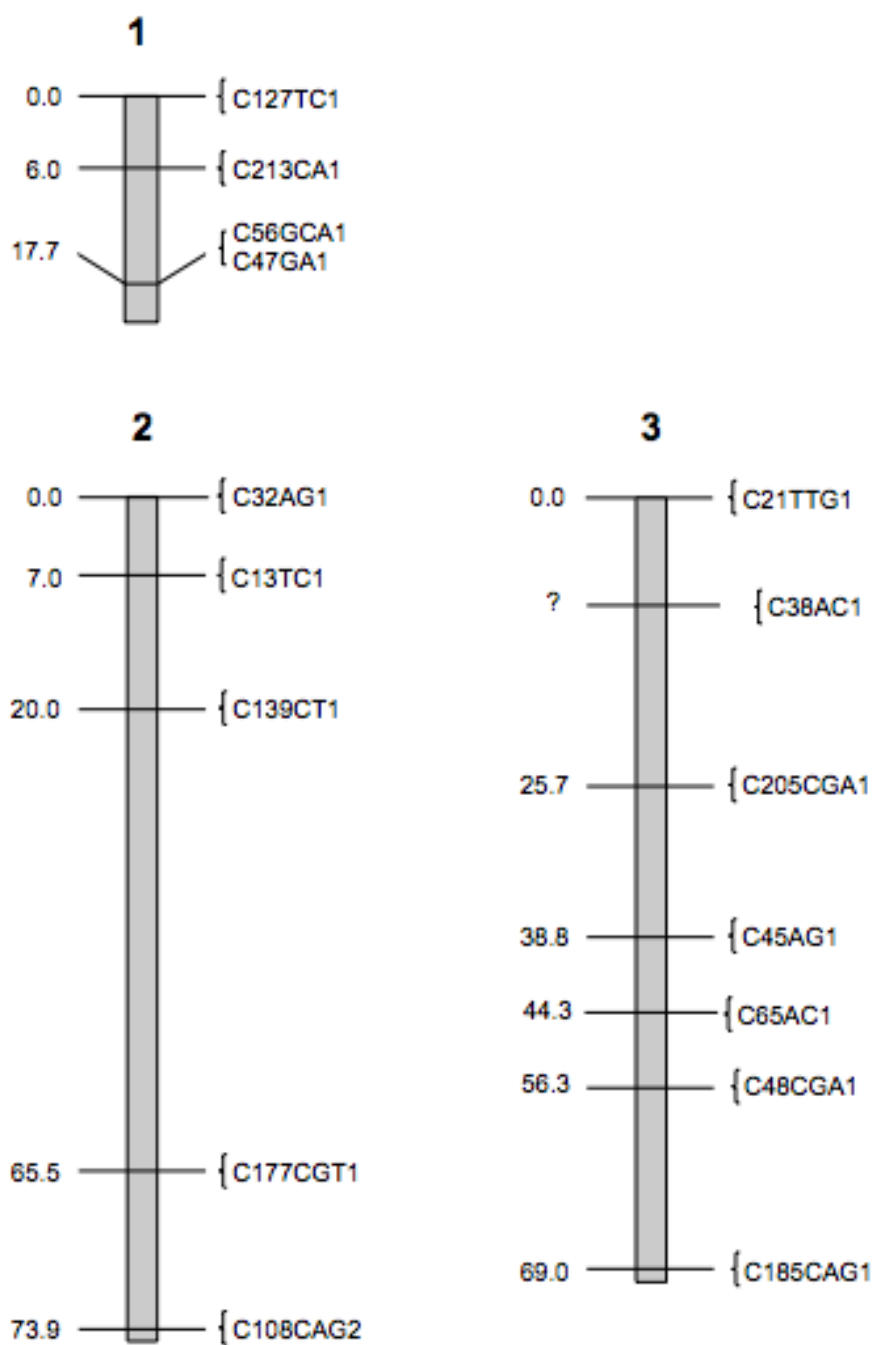
Os produtos de PCR foram diluídos 1:40, em média, em água esterilizada, em seguida, 1 µL da diluição foi adicionada em placas de 96 poços contendo 9 µL de Formamida HiDi Formamide® e Rox 400HD® (ambos da Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). As amostras foram misturadas suavemente e desnaturadas por 2 minutos a 95 °C, e colocadas imediatamente no gelo. Todas as placas foram cobertas, prevenindo a degradação dos *primers* marcados que são sensíveis à luz. As análises dos fragmentos foram realizadas usando o ABI 3730 Genetic Analyzer com o pacote do *software* GeneMapper® v.4.0.

Quadro 1 - Microsatélites utilizados para genotipagem de sete populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas no Estado de Pernambuco.

Grupo	Locus	Cromossomo	Fluoróforo
CX1	C127TC1	1	NED
	C185CAG1:3	3	HEX
	C205CGA1:3	3	6-FAM
	C56GCA1:2	1	6-FAM
CX2	C48CGA1	3	HEX
	C45AG1:2	3	NED
	C139CT1	2	6-FAM
	C108CAG2	2	HEX
CX3	C32AG1	2	HEX
	C21TTG1	3	6-FAM
	C13TC1	2	NED
	C177CGT1	2	HEX
CX4	C47GA1	1	6-FAM
	C213CA1	1	6-FAM
	C65AC1	3	HEX
	C38AC1	3	6-FAM

Fonte: HICKNER, dados não publicados.

Figura 6 - Localização esquemática dos *primers* de microssatélites mapeados nos três cromossomos do mosquito *Culex quinquefasciatus*.



Fonte: HICKNER, dados não publicados.

6.7.2 Análise dos dados de microssatélite

A variabilidade genética entre as populações de *C. quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco foi estimada através do cálculo da heterozigosidade observada e esperada, além da riqueza alélica (R_s) por *locus*. Desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados usando o programa FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 2005). A diversidade gênica foi estimada pelo cálculo dos três parâmetros da estatística F de Wright (1978) (F_{IS} , F_{IT} e F_{ST}) ou descritos por Weir e Cockerhan (1984), que pode indicar o excesso ou déficit de heterozigoto usando o programa ARLEQUIN v. 3 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005).

O F_{IS} é o coeficiente de endocruzamento intrapopulacional, o F_{IT} é o coeficiente de endocruzamento total dentro de uma população e o F_{ST} é o coeficiente de diversidade genética, a correlação de genes de um indivíduo vindo de diferentes subpopulações. O isolamento por distância foi estimado pelo programa GENEPOP 4.0.7 (ROUSSET, 2008), utilizando a correção entre as distâncias genéticas.

A correção de Bonferroni foi usada para ajustar os valores de probabilidade para testes múltiplos (RICE, 1989). A verificação da existência de *bottleneck* ou gargalo de garrafa nas populações foi realizada com o auxílio do programa BOTTLENECK 1.2.02 (PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999), utilizando o teste mutacional bifásico.

7 RESULTADOS

7.1 Susceptibilidade ao temephos

A susceptibilidade das populações de *Culex quinquefasciatus* ao temephos avaliadas neste estudo foi determinada por meio de bioensaios de dose-resposta, exceto para a população de Alto da Conquista (AC). Indivíduos provenientes de Água Fria (AF) apresentaram CL_{50} similar à colônia susceptível de laboratório (Peixinhos – PX), com $CL_{50} = 0,006$ mg/L e $RR = 1$, o que demonstra sua susceptibilidade ao temephos (Tabela 2). Para a amostra de Glória do Goitá (GG) a susceptibilidade ao temephos apresentou uma pequena alteração comparada à PX. Com $CL_{50} = 0,009$ mg/L e $CL_{95} = 0,023$, resultando em $RR_{50} = 1,5$ e $RR_{95} = 2,3$ vezes, apesar desta diferença, a população de GG mantém seu status de susceptibilidade ao referido inseticida (Tabela 2). Por outro lado, a população de Santa Cruz do Capibaribe (SC) apresentou um nível moderado de resistência ao temephos, com $CL_{95} = 0,072$ mg/L e $RR = 7,2$ (Tabela 2).

Um segundo lote de temephos foi utilizado para avaliação das populações de campo provenientes de Ipojuca (IP) e Jaboatão dos Guararapes (JB) e, por isso, uma nova avaliação de PX foi realizada com o inseticida. O novo lote do inseticida apresentou $CL_{50} = 0,0033$ mg/L (Tabela 2), sendo um pouco mais ativo do que o lote usado para avaliar AF, SC e GG. Os resultados de CL_{50} mostram que as amostras de IP e JB apresentaram-se um pouco mais susceptíveis do que PX devido às variações naturais dos resultados dos bioensaios, porém estas apresentam $CL_{95} = 0,005$, semelhante à PX, com $RR = 1$ (Tabela 2).

Historicamente, as seis localidades usaram diferentes quantidades do inseticida temephos e a tabela 3 apresenta a quantidade total do larvicida (em kg) usado, por localidade, nos últimos cinco anos. Este dado foi fornecido pela Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. É importante ressaltar que SC utilizou mais de 40.000 kg de temephos durante quatro anos (2007-2010). Vale ressaltar que o PNCD sugeriu a substituição do larvicida temephos pela bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) no ano de 2011. Jaboatão e Recife cessaram a utilização do mesmo desde 2002, utilizando apenas o Bti para o controle de *Ae. aegypti*.

Tabela 2 - Toxicidade do temephos contra larvas de 3º/4º estágio de *Culex quinquefasciatus*. As populações analisadas foram: uma colônia de laboratório susceptível (PX) e cinco populações de campo coletadas no Estado de Pernambuco: Água Fria (AF), Santa Cruz do Capibaribe (SC), Glória do Goitá (GG), Ipojuca (IP) e Jaboatão dos Guararapes (JB).

População	Número de larvas	CL ₅₀ (IC 95%) ^a	RR CL ₅₀ ^b	CL ₉₅ (IC 95%) ^a	RR CL ₉₅ ^b
PX	1.140	0,006 (0,005 – 0,006)	1,0	0,01 (0,009 – 0,011)	1,0
AF	1.140	0,006 (0,005 – 0,007)	1,0	0,018 (0,009 – 0,027)	1,8
SC	1.260	0,036 (0,033 – 0,041)	5,8	0,072 (0,064 – 0,083)	7,2
GG	1.080	0,009 (0,008 – 0,011)	1,5	0,023 (0,018 – 0,038)	2,3
PX	1.360	0,0033 (0,003 – 0,0036)	1,0	0,005 (0,005 – 0,006)	1,0
IP	1.020	0,0019 (0,0018 – 0,0022)	0,6	0,005 (0,004 – 0,006)	1,0
JB	1.140	0,002 (0,0012 – 0,0018)	0,57	0,005 (0,003 – 0,009)	1,0

^a Concentração letal (mg/L) para 50% e 95% das larvas após 24 horas de exposição. IC = Intervalo de confiança.

^b Razão de resistência da CL₅₀ e CL₉₅ para a colônia susceptível e as populações de campo.

Fonte: AUTORA, 2013.

Tabela 3 - Utilização do temephos (kg) em seis municípios do Estado de Pernambuco para controle do mosquito *Aedes aegypti* de 2007 a 2011.

Cidade/ Ano	2007	2008	2009	2010	2011
Recife	0	0,745	0,171	0	0,417
Olinda	9.662,8	11.438,1	11.891,9	0	0,002
Jaboatão dos Guararapes	0	0,02	0	0	0
Ipojuca	947,49	1.013,23	905,69	218,28	2,713
Glória do Goitá	1.319,7	1.392,1	1.268,3	1.063,5	836,66
Santa Cruz do Capibaribe	54.829,7	62.619,2	62.029,9	40.770,1	8.504,02

Fonte: Dados fornecidos pela Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, 2013.

7.2 Ensaios bioquímicos

Os resultados dos ensaios bioquímicos realizados com as populações de AF, SC e a colônia de laboratório (PX) estão apresentados na Tabela 4 e Gráfico 1. Indivíduos de AF não mostraram alteração na atividade enzimática quando comparados com a colônia de PX, nem insensibilidade da AChE. Por outro lado, indivíduos de SC mostraram elevada atividade das esterases e insensibilidade da acetilcolinesterase, comparados com PX. Os níveis de atividade das esterases não específicas (PNPA-Est) foram maiores em 55% dos indivíduos de SC, em relação à PX; além destas, 30% e 17% dos indivíduos de SC apresentaram elevada atividade de α - e β -esterases, respectivamente, quando comparadas à PX (Tabela 4, Gráfico 1). A proporção de indivíduos com AChE insensível foi de 15% (Tabela 4, Gráfico 1), enquanto a atividade das GST e MFO não foi significativamente diferente de PX (Tabela 4, Gráfico 1).

Tabela 4 - Atividade enzimática observada em três populações de *Culex quinquefasciatus* provenientes do Estado de Pernambuco, Brasil – Peixinhos (PX): colônia de laboratório susceptível; Água Fria (AF) – colônia de campo susceptível; Santa Cruz do Capibaribe (SC) colônia de campo que apresentou resistência moderada ao temephos mensurada por bioensaios.

População	α -esterase			β -esterase			Esterases-PNPA			GST			MFO			AChE		
	(nmol/mg ptn/min)			(nmol/mg ptn/min)			(Δ abs/mg ptn/min)			(nmol/mg ptn/min)			(nmol/mg ptn/min)			(% act) ^a		
	N	Mediana	% 99	N	Mediana	% 99	N	Mediana	% 99	N	Mediana	% 99	N	Mediana	% 99	N	Mediana	% 99
PX	107	205,7	504,2	111	242,5	654,9	104	6,3	14,6	115	1,8	3,1	116	59,5	82,5	121	17,4	29,3
AF	115	156,5	2,0	119	209,9	2,0	86	4,2	2,0	118	1,6	1,0	114	49,3	4,0	94	13,3	10,0
SC	117	384,2	30,0	112	408,9	17,0	118	16,3	55,0	118	1,6	0	105	46,6	4,0	109	16,7	15,0

Nota: N= número de fêmeas;

% > p99: taxa populacional com atividade enzimática maior do que Peixinhos;

(% > p99) < 15: atividade enzimática inalterada;

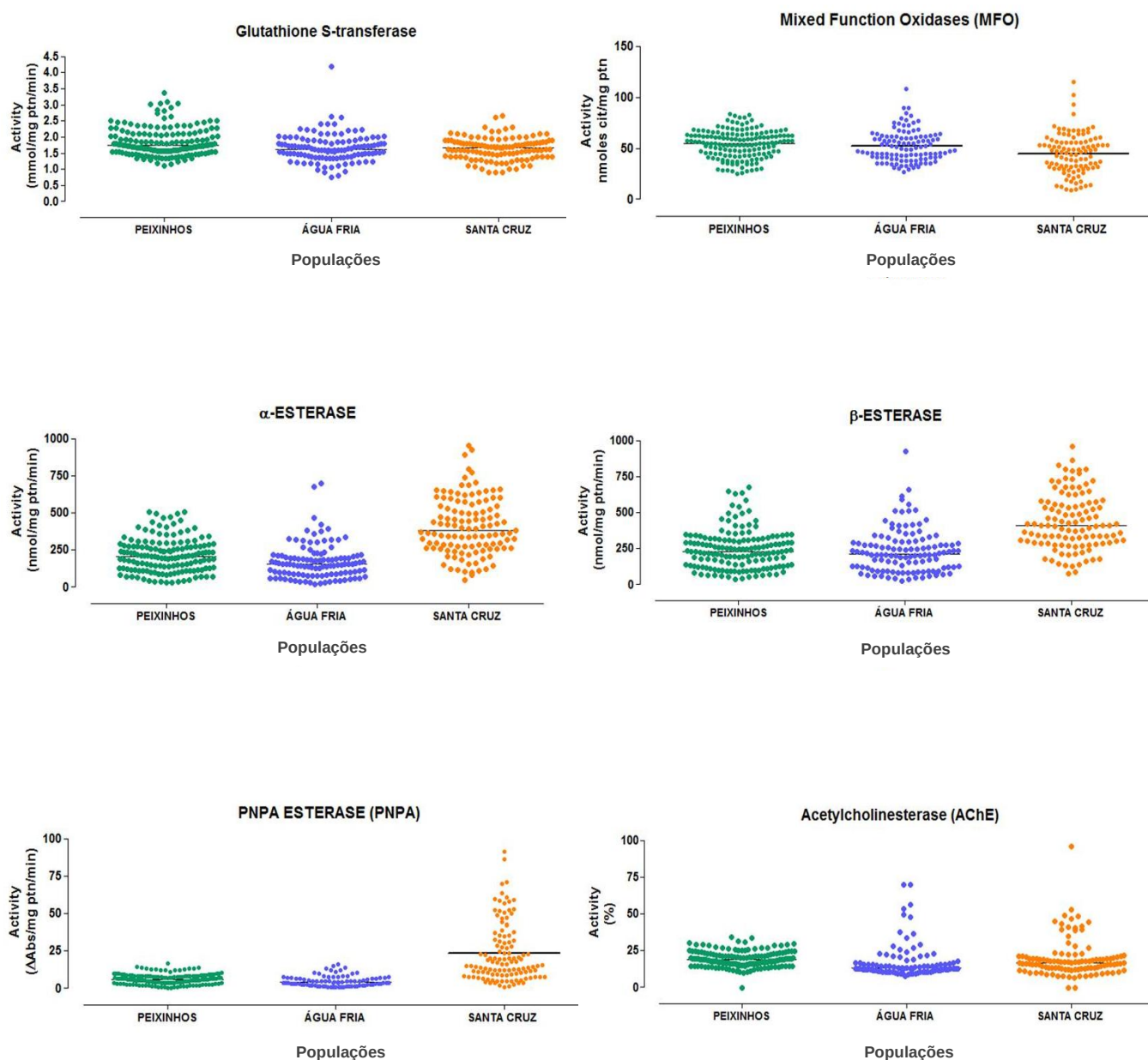
(% > p99) $\geq$ 15 < 50: atividade enzimática alterada;

(% > p99) $\geq$ 50: atividade enzimática altamente alterada;

^ataxa indivíduos com atividade enzimática na presença do inseticida propoxur.

Fonte: AUTORA, 2013.

Gráfico 1 - Perfil da atividade enzimática em populações de *Culex quinquefasciatus* susceptível (Água Fria) e com resistência moderada (Santa Cruz) ao temephos, provenientes do Estado de Pernambuco, Brasil, comparadas com a atividade da população de laboratório susceptível (Peixinhos).



Nota: A linha representa a atividade média para esses indivíduos.

Fonte: AUTORA, 2013.

7.3 Mutação no gene *ace1*

O fragmento de 457 bp do gene *ace-1* foi amplificado em 190 indivíduos das seis populações estudadas, com exceção de GG. Após avaliar a qualidade das sequências e excluir aquelas com baixa qualidade, 115 sequências consenso foram obtidas com 374 bp: 16 de PX, 36 de SC, 19 de AF, 12 de AC, 11 de JB e 21 de IP. Um total de 35 sítios foi polimórfico. Das 115 sequências analisadas, foram identificados 19 haplótipos diferentes (Figura 7). Estas sequências foram submetidas ao GenBank com os números de acesso de JX412929 a JX412947. Não foram detectados indels (inserção ou deleção) nestas sequências. A diversidade haplotípica (H_d) foi $0,842 \pm 0,019$, e a diversidade nucleotídica (π) foi 0,00467. Quatro indivíduos homozigotos para a mutação G-A, que gera a substituição G119S na proteína, foram identificados em SC, com uma frequência do alelo *ace-1^R* = 0,11. Além desta mutação, nove polimorfismos foram observados nas sequências alinhadas, que representam nove mutações sinônimas nos sítios 3, 9, 15, 21, 48, 123, 243, 297 e 312 (Figura 7).

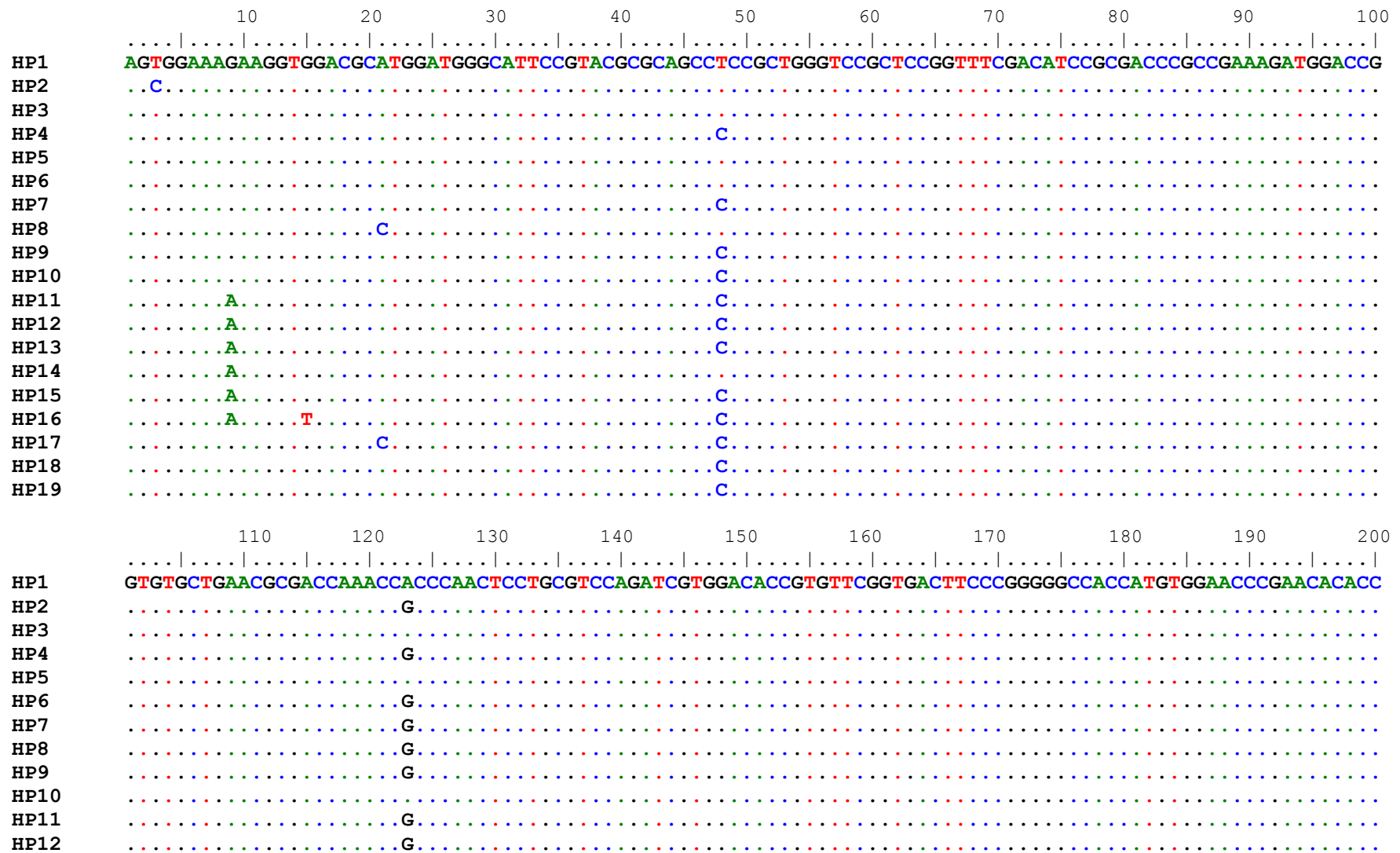
Figura 7 - Diversidade haplotípica no gene *ace1* em populações de *Culex quinquefasciatus* provenientes do Estado de Pernambuco. (Continua)

Figura 7 - Diversidade haplotípica no gene *ace1* em populações de *Culex quinquefasciatus* provenientes do Estado de Pernambuco.
(Continua)

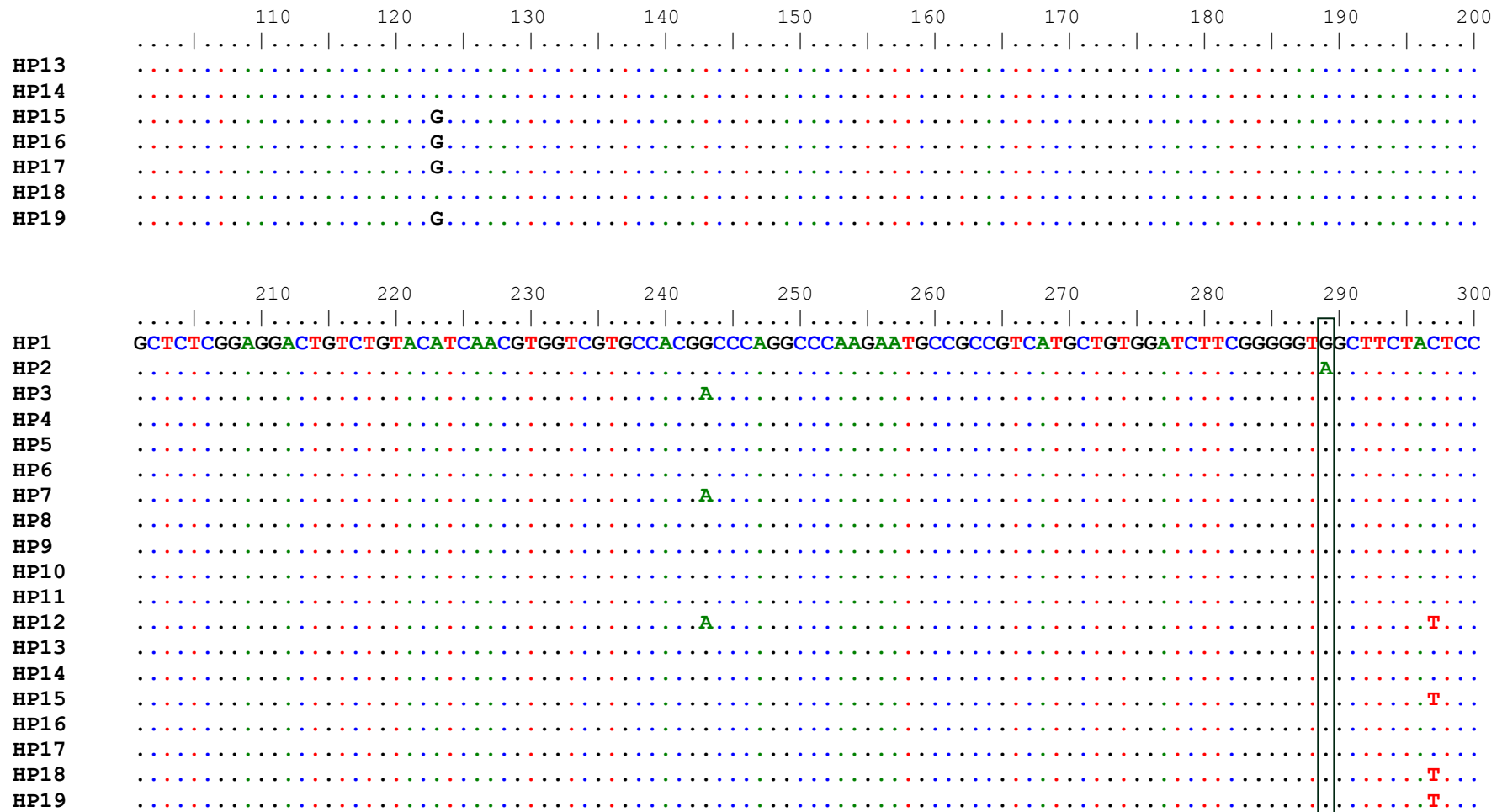
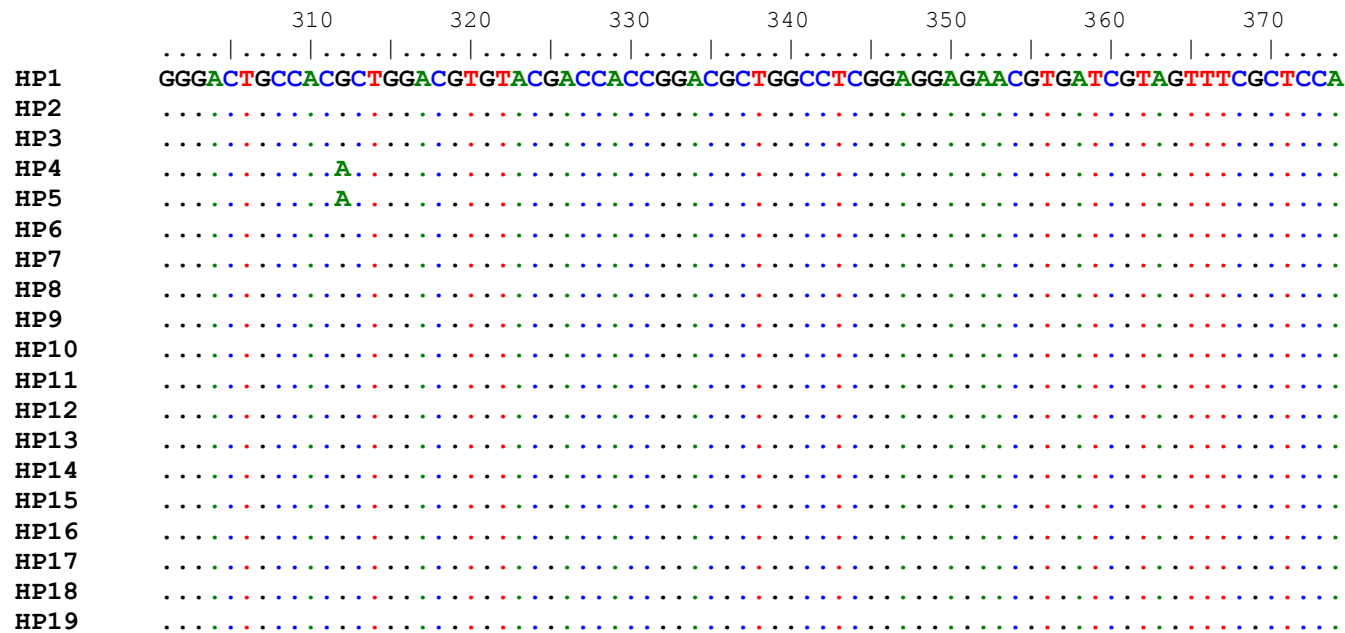


Figura 7 - Diversidade haplotípica no gene *ace1* em populações de *Culex quinquefasciatus* provenientes do Estado de Pernambuco.
(Conclusão)



Nota: A mutação que gera a substituição G119S está destacada.

Fonte: AUTORA, 2013.

7.4 Diversidade genética das populações de *Culex quinquefasciatus* por meio de microssatélites

7.4.1 Variabilidade genética e Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Para mensurar a diversidade genética de populações de *C. quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco, foram analisadas 210 amostras, sendo 30 de cada população (PX, SC, AF, AC, IP, JB e GG), para cada um dos 16 diferentes *loci* de microssatélites para cada um dos 16 diferentes *loci* de microssatélites, a fim de determinar o nível de fluxo gênico entre as populações e avaliar o risco de dispersão dos genes de resistência. Todos os *loci* foram polimórficos para ao menos uma população. Um *locus* é considerado polimórfico quando o alelo mais comum tem frequência inferior a 0,9. Neste caso, o *locus* C48CGA1 foi monomórfico para todas as populações, exceto AC, por isso os resultados foram excluídos das análises finais.

Como a riqueza de alelos (R_s) é uma medida independente do tamanho amostral, os valores da média R_s entre os 15 *loci* foram maiores nas populações de JB e AC, e o menor valor foi observado na população de AF (Tabela 5). Foram encontrados 90 alelos nas amostras estudadas e o número de alelos por *locus* variou de dois (*locus* C56GCA1) a 15 (*locus* C139CT1) (Tabela 5; 6). O tamanho dos alelos variou de 102 pb (*locus* C127TC1) a 307 pb (*locus* C65AC1), como mostra a Tabela 6. Dos 90 alelos possíveis, considerando todos os marcadores, as populações apresentaram: IP (52 alelos), PX (51 alelos), AF (47 alelos), SC (48 alelos), GG (52 alelos), JB (66 alelos) e AC (63 alelos).

Com exceção de GG, todas as populações apresentaram alelos exclusivos, que estão sublinhados na Tabela 6, sendo JB a população que apresentou o maior número (4) IP e AC apresentaram três, AF dois e as populações de SC e PX apresentaram apenas um alelo exclusivo (Tabela 6).

As frequências alélicas para cada *locus* de microssatélite estão apresentadas na Tabela 6 e variaram de 0,0167 a 1,0. O Gráfico 2 apresenta a distribuição das frequências dos alelos dos *loci* de microssatélites analisados. Dos 90 alelos encontrados, foram observados 12 alelos raros (em negrito na Tabela 6), pois, de acordo com a definição de Kimura (1983), apresentaram frequência relativa inferior a 0,01 e, destes, nove são alelos exclusivos.

Tabela 5 - Riqueza de alelos medida para cada *locus* de microsatélite e média da riqueza de alelos entre os 15 *loci* avaliados nas populações de *Culex quinquefasciatus* provenientes do Estado de Pernambuco, baseado no tamanho amostral mínimo de 14 indivíduos.

<i>Locus</i>	N	Riqueza de alelos (Rs)/População						
		IP	PX	AF	SC	GG	JB	AC
C127TC1	9	5,080	4,366	2,000	5,738	3,393	6,058	5,172
C185CAG1	7	2,882	2,963	1,998	3,000	2,995	2,393	3,393
C205GGA1	4	1,998	2,000	2,000	2,000	3,000	3,322	2,837
C56GCA1	2	1,000	1,000	1,000	1,961	1,720	1,926	1,000
C13TC1	3	1,755	1,868	1,000	1,000	1,000	1,982	1,720
C177CGT1	3	1,974	2,393	2,998	3,000	2,995	2,393	2,999
C21TTG1	3	1,000	1,000	2,000	1,908	2,000	2,430	1,996
C32AG1	5	3,000	2,969	3,636	2,993	3,366	3,466	2,996
C108CAG2	9	4,869	3,500	2,995	2,968	3,561	3,889	3,823
C45AG1	4	3,986	3,908	2,979	2,583	3,000	3,000	2,996
C139CT1	15	5,404	5,866	6,388	5,686	5,000	8,499	8,188
C213CA1	6	3,500	2,991	3,934	3,532	4,400	5,539	5,183
C38AC1	6	3,000	3,000	3,729	3,961	3,186	3,466	3,483
C65AC1	10	5,251	5,497	5,715	3,000	3,653	5,958	6,944
C47GA1	4	2,999	2,996	3,000	3,000	2,855	3,737	2,999
Média dos 15 loci	6	3,179	3,087	3,024	3,088	3,074	3,870	3,715

Nota: Ipojuca – IP; Peixinhos – PX; Água Fria – AF; Santa Cruz do Capibaribe – SC; Glória do Goitá – GG; Jaboatão dos Guararapes – JB; Alto da Conquista – AC.

N = número de alelos por *locus*.

Fonte: AUTORA, 2013.

Tabela 6 - Frequência de alelos por *locus* de microssatélite encontrados nas populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco. (Continua)

<i>Locus</i>	<i>Alelo</i>	<i>Tamanho (pb)</i>	<i>IP</i>	<i>PX</i>	<i>AF</i>	<i>SC</i>	<i>GG</i>	<i>JB</i>	<i>AC</i>	<i>Total</i>
C127TC1	1	102	0	0	0	0,1875	0	0,0333	0	0,0208
	2	110	0,0357	0,0333	0,2143	0,0625	0,2000	0,0500	0,0667	0,0964
	3	112	0,6429	0,6000	0,7857	0,2500	0,7167	0,6667	0,6500	0,6406
	4	114	0	0	0	0,0312	0,0667	0,1000	0,1500	0,0521
	5	117	0,0179	0	0	0,0312	0	0	0,0167	0,0078
	6	127	0,1786	0,2667	0	0,4375	0	0,0500	0,0667	0,1224
	7	129	0,0536	0,0667	0	0	0,0167	0,0333	0,0500	0,0339
	8	131	0	0	0	0	0	<u>0,0667</u>	0	0,0104
	9	137	0,0714	0,0333	0	0	0	0	0	0,0156
N			28	30	28	16	30	30	30	196
C185CAG1	1	151	0,4107	0,4833	0,8571	0	0	0	0,7000	0,3641
	2	152	0,0536	0,0833	0,1429	0	0	0	0,2167	0,0744
	3	154	0,5357	0,4333	0	0	0	0	0,0667	0,1538
	4	157	0	0	0	0	0	0	<u>0,0167*</u>	0,0026
	5	227	0	0	0	0,3684	0,1333	0,0167	0	0,0590
	6	230	0	0	0	0,1579	0,1667	0,0667	0	0,0513
	7	233	0	0	0	0,4737	0,7000	0,9167	0	0,2949
N			28	30	28	19	30	30	30	195
C205CGA1	1	123	0,8571	0,6667	0,6852	0,6731	0,5500	0,5333	0,8621	0,6875
	2	125	0	0	0	0	0,2667	0,0167	0,0517	0,0500
	3	126	0,1429	0,3333	0,3148	0,3269	0,1833	0,0500	0,0862	0,2025
	4	136	0	0	0	0	0	<u>0,4000</u>	0	0,0600
N			28	30	27	26	30	30	29	200
C56GCA1	1	200	1,0000	1,0000	1,0000	0,9231	0,9667	0,9333	1,0000	0,9752
	2	207	0	0	0	0,0769	0,0333	0,0667	0	0,0248
N			28	30	28	26	30	30	30	202

Tabela 6 - Frequência de alelos por *locus* de microsatélite encontrados nas populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco.
(Continuação)

<i>Locus</i>	<i>Alelo</i>	<i>Tamanho (pb)*</i>	<i>IP</i>	<i>PX</i>	<i>AF</i>	<i>SC</i>	<i>GG</i>	<i>JB</i>	<i>AC</i>	<i>Total</i>
C13TC1	1	139	0,0357	0,0517	0	0	0	0	0	0,0124
	2	172	0	0	0	0	0	0,1000	0,0333	0,0199
	3	173	0,9643	0,9483	1,0000	1,0000	1,0000	0,9000	0,9667	0,9677
N			28	29	28	26	30	30	30	201
C177CGT1	1	227	0	0,0167	0,2500	0,3684	0,1333	0,0167	0,1667	0,1231
	2	230	0,0893	0,0667	0,1429	0,1579	0,1667	0,0667	0,2833	0,1385
	3	233	0,9107	0,9167	0,6071	0,4737	0,7000	0,9167	0,5500	0,7385
N			28	30	28	19	30	30	30	195
C21TTG1	1	190	1,0000	1,0000	0,8036	0,9423	0,8167	0,9000	0,8667	0,9030
	2	193	0	0	0	0	0	<u>0,0167*</u>	0	0,0025
	3	196	0	0	0,1964	0,0577	0,1833	0,0833	0,1333	0,0945
N			28	29	28	26	30	30	30	201
C32AG1	1	152	0,4821	0,4483	0,5000	0,6346	0,8667	0,5500	0,5833	0,5821
	2	154	0,3393	0,4655	0,4107	0,1154	0,0667	0,2333	0,2833	0,2736
	3	156	0	0	0,0536	0,2500	0,0333	0,2000	0,1333	0,0945
	4	158	0,1786	0,0862	0	0	0	0,0167	0	0,0398
	5	166	0	0	0,0357	0	0,0333	0	0	0,0100
N			28	29	28	26	30	30	30	201
C108CAG1	1	215	<u>0,0385*</u>	0	0	0	0	0	0	0,0054
	2	218	<u>0,0192*</u>	0	0	0	0	0	0	0,0027
	3	219	0,1923	0,2321	0,1481	0	0	0	0,0862	0,0968
	4	222	0,0192	0	0	0	0	0	0,0517	0,0108
	5	228	0	0	0	0	0,0238	0,0833	0	0,0161
	6	234	0	<u>0,0179*</u>	0	0	0	0	0	0,0027
	7	237	0,3462	0,3929	0,7222	0,5600	0,6667	0,6833	0,7586	0,5914
	8	240	0,3846	0,3571	0,1296	0,3600	0,0476	0,1667	0,1034	0,2231
	9	243	0	0	0	0,0800	0,2619	0,0667	0	0,0511
N			26	28	27	25	21	30	29	186

Tabela 6 - Frequência de alelos por *locus* de microsatélite encontrados nas populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco.
(Continuação)

<i>Locus</i>	<i>Alelo</i>	<i>Tamanho (pb)*</i>	<i>IP</i>	<i>PX</i>	<i>AF</i>	<i>SC</i>	<i>GG</i>	<i>JB</i>	<i>AC</i>	<i>Total</i>
C45AG1	1	166	0,6667	0,5192	0,5926	0,2500	0,2273	0,5172	0,5000	0,4716
	2	168	0,0952	0,1923	0,0926	0,7292	0,5227	0,2241	0,3704	0,3125
	3	170	0,1190	0,0577	0	0	0	0	0	0,0227
	4	172	0,1190	0,2308	0,3148	0,0208	0,2500	0,2586	0,1296	0,1932
N			21	26	27	24	22	29	27	176
C139CT1	1	168	0	0	0,0926	0,0435	0,0357	0,0357	0,0800	0,0435
	2	170	0	0	0	0	0	0,1071	0,1200	0,0373
	3	172	0,6842	0,6200	0,3519	0,3913	0,2857	0,5179	0,3800	0,4658
	4	180	0,0263	0,0200	0	0	0	0	0	0,0062
	5	182	0	0	0	0	0	0	<u>0,0200*</u>	0,0031
	6	184	0	0	0	<u>0,2174</u>	0	0	0	0,0311
	7	187	0,1053	0,0800	0	0	0	0,0357	0,0600	0,0404
	8	189	0,0526	0,1400	0,2037	0	0	0,0536	0,2200	0,1056
	9	191	0,0263	0,0800	0	0,0435	0,0714	0,0357	0,0200	0,0373
	10	193	0,1053	0,0200	0,1481	0,2174	0,2500	0,0536	0,0400	0,1087
	11	195	0	0,0400	0	0	0,3571	0,0893	0	0,0528
	12	197	0	0	0	0,0870	0	0,0357	0,0200	0,0217
	13	199	0	0	0,1296	0	0	0,0357	0	0,0280
	14	201	0	0	0,0556	0	0	0	0,0400	0,0155
	15	203	0	0	<u>0,0185*</u>	0	0	0	0	0,0031
N			19	25	27	23	14	28	25	161

Tabela 6 - Frequência de alelos por *locus* de microssatélite encontrados nas populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco.
(Continuação)

<i>Locus</i>	<i>Alelo</i>	<i>Tamanho (pb)*</i>	<i>IP</i>	<i>PX</i>	<i>AF</i>	<i>SC</i>	<i>GG</i>	<i>JB</i>	<i>AC</i>	<i>Total</i>
C213CA1	1	139	0	0	0,0714	0	0,2167	0,0517	0,1667	0,0746
	2	141	0,0179	0	0	0	0,2167	0,0345	0,0167	0,0423
	3	144	0	0	0,1250	0,0192	0,0167	0,1552	0,0333	0,0498
	4	146	0,4286	0,5500	0,6786	0,6346	0,5167	0,4655	0,4667	0,5323
	5	148	0,3393	0,3333	0	0,2308	0,0167	0,2241	0,1500	0,1841
	6	150	0,2143	0,1167	0,1250	0,1154	0,0167	0,0690	0,1667	0,1169
N			28	30	28	26	30	29	30	201
C38AC1	1	161	0	0	0,0893	0,2692	0,0333	0,1667	0,2931	0,1194
	2	163	0,2143	0,3000	0,2679	0,0769	0,2333	0,5333	0,1897	0,2637
	3	165	0,4286	0,3667	0,6071	0,4231	0,7167	0,2833	0,4828	0,4726
	4	166	0	0	0	0,2308	0	0,0167	0,0172	0,0348
	5	167	0,3571	0,3333	0	0	0	0	0,0172	0,1020
	6	169	0	0	0,0357	0	0,0167	0	0	0,0075
N			28	30	28	26	30	30	29	201
C65AC1	1	278	0,0357	0,0357	0	0	0,0167	0,0370	0,1034	0,0333
	2	280	0,4643	0,6071	0,2500	0,2400	0,5167	0,4815	0,4655	0,4359
	3	284	0,1786	0,1786	0,0714	0	0	0,0370	0,0517	0,0744
	4	286	0,1607	0,0179	0,4821	0,4000	0,4167	0,1481	0,1897	0,2590
	5	288	0	0,0179	0,0536	0,3600	0,0333	0,2222	0,0690	0,1026
	6	289	0	0,0357	0	0	0,0167	0,0185	0,0345	0,0154
	7	297	<u>0,0179*</u>	0	0	0	0	0	0	0,0026
	8	303	0,1429	0,1071	0,0714	0	0	0,0556	0,0172	0,0564
	9	305	0	0	0	0	0	0	<u>0,0690</u>	0,0103
	10	307	0	0	<u>0,0714</u>	0	0	0	0	0,0103
N			28	28	28	25	30	27	29	195

Tabela 6 - Frequência de alelos por *locus* de microsatélite encontrados nas populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco. (Conclusão)

<i>Locus</i>	<i>Alelo</i>	<i>Tamanho (pb)</i>	<i>IP</i>	<i>PX</i>	<i>AF</i>	<i>SC</i>	<i>GG</i>	<i>JB</i>	<i>AC</i>	<i>Total</i>
C47GA1	1	232	0,1607	0,1333	0,4464	0,4231	0,2667	0,2931	0,1833	0,2687
	2	234	0,5179	0,4833	0,2143	0,3462	0,6833	0,4655	0,6167	0,4801
	3	236	0,3214	0,3833	0,3393	0,2308	0,0500	0,2069	0,2000	0,2463
	4	238	0	0	0	0	0	<u>0,0345*</u>	0	0,0050
N			28	30	28	26	30	29	30	201

Nota: pb = pares de base.

IP = Ipojuca; PX = Peixinhos; AF = Água Fria; SC = Santa Cruz do Capibaribe; GG = Glória do Goitá; JB = Jaboatão dos Guararapes; AC = Alto da Conquista.

N = número de indivíduos de cada população analisados;

Os valores sublinhados correspondem aos alelos exclusivos e os em negrito aos alelos raros.

*Alelos raros que são exclusivos de uma população.

Fonte: AUTORA, 2013.

Gráfico 2 - Distribuição das frequências dos alelos encontrados para os *loci* de microsatélites analisados nas populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas no Estado de Pernambuco.
(Continua)

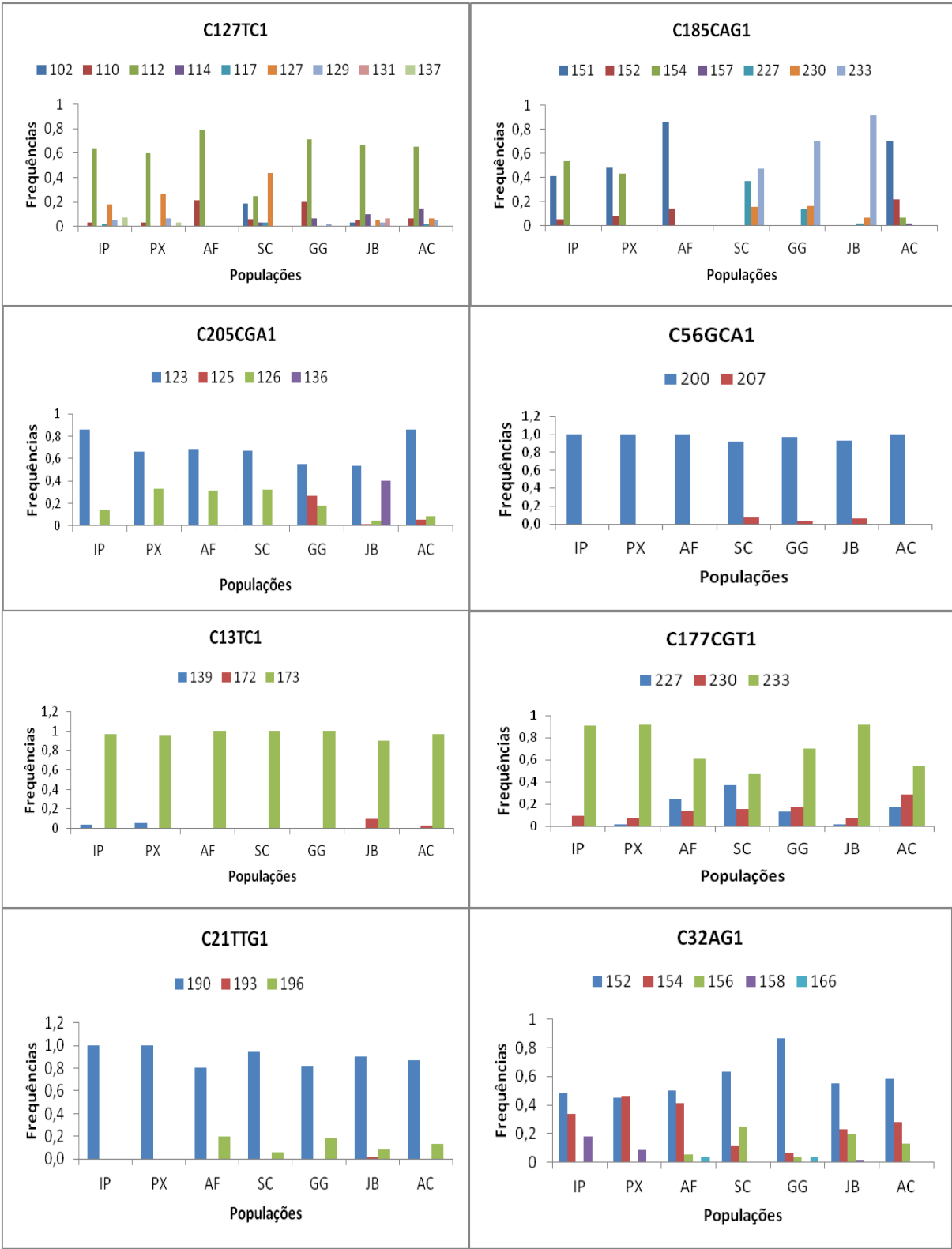
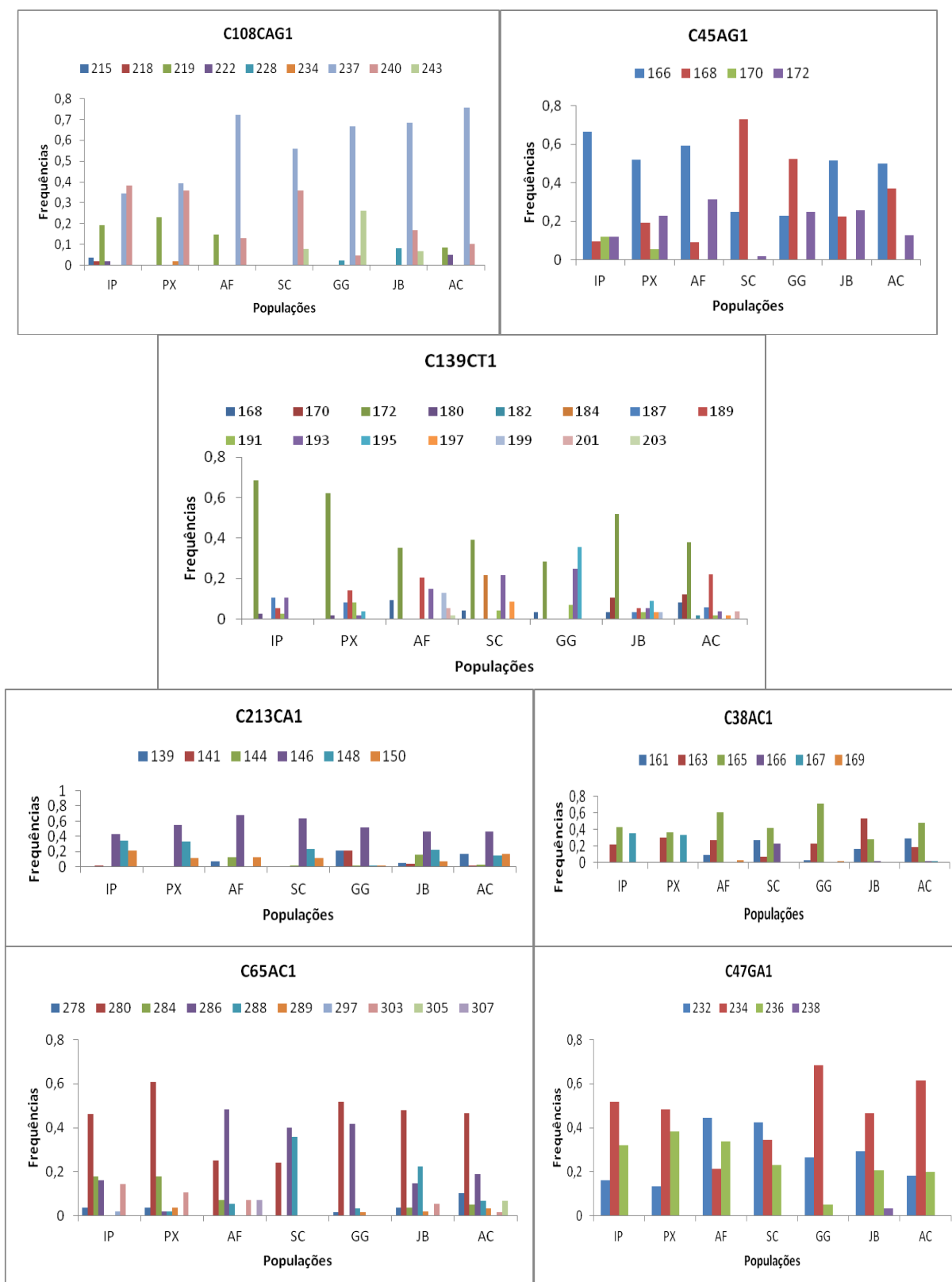


Gráfico 2 - Distribuição das frequências dos alelos encontrados para os *loci* de microsatélites analisados nas populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas no Estado de Pernambuco. (Conclusão)



Nota: Ipojuca – IP; Peixinhos – PX; Água Fria – AF; Santa Cruz do Capibaribe – SC; Glória do Goitá – GG; Jaboatão dos Guararapes – JB; Alto da Conquista – AC.

Fonte: AUTORA, 2013.

Os resultados da heterozigosidade observada e esperada (H_O e H_E), além do coeficiente de endogamia intrapopulacional (F_{IS}) estão apresentados na tabela 7. A H_O variou de 0,06 em GG (C56GCA1) e AC (C13TC1) a 0,88 em AC (C139CT1) e JB (C65AC1). Já a H_E variou de 0,06 em GG (C56GCA1) e AC (C13TC1) a 0,79 em AF e AC (C139CT1). O F_{IS} é estimado com base na heterozigosidade observada e esperada, e para cada *locus* houve excesso ou deficiência de heterozigotos, dependendo da população. Em seis populações houve excesso de heterozigotos (valores negativos), exceto em JB, no qual houve uma deficiência de heterozigotos (Tabela 7).

PX, IP e SC mostraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para todos os *loci* estudados (Tabela 7). A população GG apresentou desvio do EHW para o *locus* C32AG1 e C139CT1, no qual se verificou valores de F_{IS} positivos, indicando deficiência de heterozigotos que provavelmente foi a causa dos desvios. Por outro lado, a população de AF apresentou desvio no *locus* C139CT1, porém, com valores de F_{IS} negativos, indicando excesso de heterozigotos (Tabela 7). A análise realizada pelo programa BOTTLENECK demonstrou que todos os *loci* apresentaram-se em equilíbrio mutação-deriva, considerando-se o modelo TPM no teste de WILCOXON, não sendo detectado efeito de gargalo recente.

Tabela 7 – Análise intrapopulacional de populações de *Culex quinquefasciatus* provenientes do Estado de Pernambuco.

<i>Locus</i>	IP			PX			AF			SC			GG			JB			AC		
	H _O	H _E	F _{IS}	H _O	H _E	F _{IS}	H _O	H _E	F _{IS}	H _O	H _E	F _{IS}	H _O	H _E	F _{IS}	H _O	H _E	F _{IS}	H _O	H _E	F _{IS}
C127TC1	0,67	0,55	-0,22	0,56	0,57	0,01	0,42	0,34	-0,25	0,87	0,72	-0,21	0,46	0,44	-0,04	0,60	0,54	-0,11	0,50	0,55	0,09
C185CAG1	0,53	0,55	0,02	0,60	0,58	-0,03	0,28	0,24	-0,14	0,47	0,63	0,25	0,50	0,47	-0,06	0,13	0,15	0,15	0,60	0,46	-0,29
C205GGA1	0,28	0,24	-0,14	0,60	0,45	-0,33	0,25	0,43	0,41	0,34	0,44	0,23	0,73	0,60	-0,22	0,33	0,56	0,08	0,24	0,25	0,04
C56GCA1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,15	0,14	-0,06	0,06	0,06	-0,02	0,13	0,12	-0,05	ND	ND	ND
C13TC1	0,07	0,07	-0,02	0,10	0,09	-0,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,13	0,18	0,27	0,06	0,06	-0,02
C177CGT1	0,10	0,16	0,35	0,16	0,15	-0,05	0,53	0,55	0,04	0,47	0,63	0,25	0,50	0,47	-0,06	0,13	0,15	0,15	0,60	0,50	-0,00
C21TTG1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,25	0,32	0,22	0,12	0,11	-0,04	0,36	0,30	-0,21	0,16	0,18	0,10	0,26	0,23	-0,14
C32AG1	0,75	0,63	-0,19	0,72	0,58	-0,24	0,64	0,58	-0,09	0,65	0,53	-0,23	0,16	0,24	0,33	0,53	0,61	0,13	0,66	0,57	-0,17
C108CAG2	0,57	0,70	0,18	0,64	0,67	0,05	0,48	0,44	-0,07	0,40	0,56	0,29	0,61	0,49	-0,25	0,53	0,50	-0,06	0,44	0,41	-0,09
C45AG1	0,61	0,53	-0,17	0,57	0,64	0,11	0,44	0,55	0,19	0,54	0,41	-0,31	0,86	0,62	-0,39	0,44	0,62	0,28	0,59	0,60	0,02
C139CT1	0,63	0,51	-0,22	0,68	0,59	-0,15	0,85	0,79	-0,06	0,86	0,75	-0,15	0,50	0,74	0,34	0,75	0,71	-0,05	0,88	0,79	-0,11
C213CA1	0,64	0,66	0,03	0,66	0,58	-0,14	0,60	0,51	-0,18	0,57	0,54	-0,07	0,60	0,64	0,08	0,75	0,71	-0,06	0,76	0,71	-0,07
C38AC1	0,50	0,65	0,23	0,70	0,67	-0,03	0,64	0,56	-0,15	0,76	0,70	-0,09	0,46	0,43	-0,07	0,43	0,61	0,30	0,44	0,65	0,35
C65AC1	0,78	0,71	-0,09	0,67	0,59	-0,14	0,82	0,69	-0,17	0,72	0,66	-0,08	0,60	0,56	-0,06	0,88	0,70	-0,27	0,68	0,73	0,06
C47GA1	0,75	0,61	-0,22	0,63	0,61	-0,03	0,78	0,65	-0,21	0,69	0,66	-0,05	0,60	0,46	-0,29	0,62	0,66	0,07	0,63	0,55	-0,14
Média	0,52	0,50	-0,04	0,56	0,52	-0,07	0,53	0,51	-0,04	0,54	0,53	-0,02	0,50	0,46	-0,07	0,43	0,46	0,09	0,52	0,50	-0,02

Nota: Ipojuca – IP; Peixinhos – PX; Água Fria – AF; Santa Cruz do Capibaribe – SC; Glória do Goitá – GG; Jaboatão dos Guararapes – JB; Alto da Conquista – AC.

Heterozigosidade Observada e Esperada (H_O e H_E); Índice de endogamia (F_{IS}).

ND: Não determinado, pois o *locus* é monomórfico na população. Dados em negrito mostram aqueles que estão em desequilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$).

Fonte: AUTORA, 2013.

7.4.2 Análises Interpopulacionais

A variabilidade genética se distribuiu, conforme avaliado pela AMOVA, em um percentual de variação de 90,85 dentro das populações e 13,38 entre as populações (Tabela 8). Assim, 86,62% da variação total foram atribuídas à diferenciação dentro das populações, no qual a variação restante (13,38%) foi significativamente diferente de zero ($F_{ST} = 0,133$; $p < 0,05$). O F_{IS} obtido indica excesso de heterozigotos ($F_{IS} = -0,48$) e o F_{IT} equivale ao desvio das frequências da H_e sob o pressuposto de Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação à população inteira ($F_{IT} = 0,091$). Os valores de F_{ST} estão apresentados na Tabela 9. Quando comparadas duas a duas, as populações que apresentaram frequências alélicas semelhantes também apresentaram baixo valor de F_{ST} . Portanto, valores altos de F_{ST} significam que as frequências alélicas são muito diferentes. Estes valores foram calculados para 12 loci, pois os loci C108CAG2, C45AG1 e C139CT1 apresentaram muitos dados ausentes para o cálculo, mesmo sendo polimórficos em todas as populações. O valor de F_{ST} mais baixo foi encontrado entre as populações de PX e IP, e o maior foi encontrado entre as populações de JB e AF.

As matrizes de distância genética forneceram dendrogramas com a mesma topologia geral na análise de agrupamento utilizando o algoritmo *Neighbor-Joining*, com dois grupos que apresentaram suporte estatístico (*bootstrap* – 10.000) superior a 50% (Gráfico 3). O grupo, contendo as populações JB, GG e SC, apresentou um suporte estatístico de 85%. Apesar de JB estar geograficamente mais próximo de IP, esta última se agrupou a PX e apresentou um suporte estatístico de 99% (Gráfico 3). As populações de AC e AF estão próximas geograficamente e se agruparam com suporte estatístico de 65% (Gráfico 3).

Tabela 8. Análise de variância molecular para sete populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas em Pernambuco.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Percentagem de variação
Interpopulacional	6	144	13,38
Intrapopulacional	202	518	90,85
Total	208	662	
Índices de fixação	$F_{IS} = -0,048$	$F_{ST} = 0,133$	$F_{IT} = 0,091$

Nota: As populações coletadas foram - Ipojuca; Peixinhos; Água Fria; Santa Cruz do Capibaribe; Glória do Goitá; Jaboatão dos Guararapes; Alto da Conquista. F_{IS} – coeficiente de endocruzamento intrapopulacional; F_{IT} – coeficiente de endocruzamento total dentro de uma população; e F_{ST} – coeficiente de diversidade genética.

Fonte: AUTORA, 2013.

Tabela 9 - Valores de diferenciação genética (F_{ST}) entre as sete populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas no Estado de Pernambuco, obtidos pela estimativa total para os 15 *loci* de microssatélites.

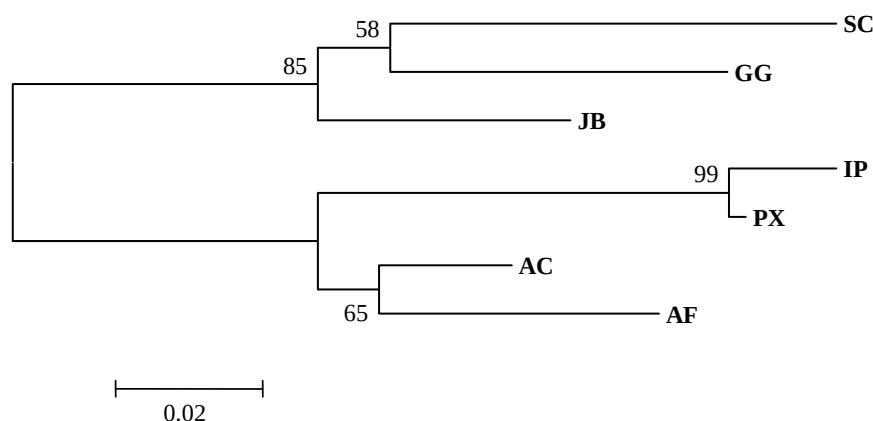
	IP	PX	AF	SC	GG	JB	AC
IP	-						
PX	0,00323	-					
AF	0,13173	0,12503	-				
SC	0,16049	0,16342	0,14585	-			
GG	0,18305	0,19603	0,17719	0,11635	-		
JB	0,16875	0,16722	0,20529	0,12964	0,09799	-	
AC	0,07559	0,08185	0,05837	0,11207	0,13569	0,16113	-

Nota: Ipojuca – IP; Peixinhos – PX; Água Fria – AF; Santa Cruz do Capibaribe – SC; Glória do Goitá – GG; Jaboatão dos Guararapes – JB; Alto da Conquista – AC.

Em negrito está o valor de F_{ST} significativo, após correção de Bonferroni.

Fonte: AUTORA, 2013.

Gráfico 3 – Distância genética entre sete populações de *Culex quinquefasciatus* coletadas no Estado de Pernambuco, avaliadas por meio de 15 *loci* de microssatélites.



Nota: Ipojuca – IP; Peixinhos – PX; Água Fria – AF; Santa Cruz do Capibaribe – SC; Glória do Goitá – GG; Jaboatão dos Guararapes – JB; Alto da Conquista – AC.

O algoritmo de agrupamento utilizando foi *Neighbor-Joining*. Os valores indicam os resultados de *bootstrap* para 10.000 tentativas com suporte acima de 50%.

Fonte: AUTORA, 2013.

8 DISCUSSÃO

Populações de *Culex quinquefasciatus* resistentes a inseticidas químicos têm sido descritas em vários países, inclusive no Brasil (BRACCO et al., 1997; CAMPOS; ANDRADE, 2003; DAABOUB et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 1999; LIU et al. 2004). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que apenas a população proveniente de SC apresentou resistência moderada ao temephos, enquanto as demais populações mostraram uma pequena alteração no padrão de susceptibilidade. De acordo com Robertson et al. (1995), variação natural nos bioensaios pode existir devido a fatores ambientais, como observado em JB e IP, que foram mais susceptíveis do que PX, a colônia de laboratório, e em GG que apresentou uma $RR = 2.3$ vezes, ainda assim considerada susceptível ao inseticida. A alteração no padrão de susceptibilidade de uma população que não é alvo dos programas de controle que usam o temephos como larvicida pode ser resultado do uso intenso do produto na cidade, como mostrado na Tabela 3.

A utilização deste inseticida pelo Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) cobriu todo o país até a emergência de populações de *Ae. aegypti* resistentes em diversos estados (BRAGA; VALLE, 2007). Em Pernambuco, por exemplo, *Ae. aegypti* provenientes de Araripina mostraram uma Razão de Resistência (RR) de 240 vezes para o temephos (MELO-SANTOS et al., 2010), e o uso intensivo deste inseticida pode ter induzido a resistência em *Culex*. Ao avaliarmos os dados da Tabela 1, o município de SC apresenta um dos menores índices demográficos, semelhante a IP e GG, apresentando uma quantidade menor de domicílios, quando comparado a Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes; porém, de acordo com os dados obtidos através da Secretaria Estadual de Saúde, SC utilizou a maior quantidade de temephos entre os anos de 2007 e 2011, como apresentado na Tabela 3, o que pode ter levado ao aparecimento de populações de *C. quinquefasciatus* com resistência moderada ao composto.

No Brasil, estudos identificaram populações de *C. quinquefasciatus* com níveis de resistência classificados como baixo a moderado aos OPs temephos e malathion, com RR variando de três a seis vezes (BRACCO et al. 1997; BRACCO; BARATA; MARINOTTI, 1999; CAMPOS; ANDRADE, 2003). Além disso, Coto et al. (2000) demonstraram que a utilização do temephos no controle de *Ae. aegypti* selecionou populações de *C. quinquefasciatus* provenientes do Rio de Janeiro resistentes ao inseticida, com $RR > 40$ vezes, enquanto a população alvo permaneceu susceptível ao composto. Os dados mostram que atenção deve ser dada quanto ao uso de OP nos criadouros de *Culex*, para evitar a seleção de

populações altamente resistentes. O surgimento de populações de *Anopheles* resistentes, vetores da malária, devido ao uso de pesticidas agrícolas, como PYs e OPs na cultura do algodoeiro, já foram descritas, indicando que a resistência via seleção de insetos não-alvo pode ser resultado do uso indiscriminado dos inseticidas (YADOULETON et al., 2011).

Neste estudo, um nível de resistência moderado ao temephos foi observado em *C. quinquefasciatus* proveniente de SC e o perfil bioquímico das enzimas de detoxificação nesta população mostrou elevação na atividade das α -esterase, β -esterase e esterase total, com valores de 30%, 17% e 55%, respectivamente, de indivíduos que apresentaram o percentil 99 maior do que o da colônia susceptível (PX). A população de *C. quinquefasciatus* proveniente de Água Fria foi considerada susceptível e não mostrou diferenças na atividade das enzimas quando comparada com PX. Como o habitat preferido das espécies de *Culex* é água rica em matéria orgânica, a presença de análogos químicos nos criadouros das larvas poderia potencializar o sistema de detoxificação, o que pode acelerar o processo de seleção da resistência aos inseticidas (REDDY; LABBÉ; CORBEL, 2012). Contudo, três populações de *C. pipiens* do Egito foram consideradas susceptíveis ao temephos, mas apresentaram elevada atividade de esterases quando comparadas com a colônia de laboratório (ZAYED et al., 2006). *C. quinquefasciatus* proveniente da Ilha da Reunião mostrou um baixo nível de resistência ao temephos e foi observada superprodução de esterase em 76-100% das 11 amostras coletadas (TANTELY et al., 2010); ao passo que, no nordeste da Índia, populações de *Culex* resistentes ao DDT, um inseticida OC, mostraram um elevado nível de atividade das esterases e glutathione S-transferases (SARKAR et al., 2009).

A mutação mundialmente encontrada no gene *ace-1*, que leva à substituição de uma Glicina por uma Serina, na posição 119 (G119S), é responsável pela insensibilidade do inseticida em populações de *Culex* (TOMA et al., 2011; WEILL et al., 2002, 2003) e em muitas outras espécies (ALON et al., 2008; CASSANELLI et al., 2006; JIANG et al., 2009; LEE et al., 2007; MAGANA et al., 2008). Apenas na população de SC a mutação foi encontrada, com frequência do alelo de resistência de 0,11, corroborando os dados bioquímicos, que também mostraram alteração na sensibilidade da enzima acetilcolinesterase em aproximadamente 15% dos indivíduos testados. Em um estudo prévio que buscou identificar esta mutação em diversas localidades do mundo, amostras de *C. quinquefasciatus* foram coletadas em Recife, em 1995, e esta mutação foi também encontrada, indicando que ela está presente em populações naturais da cidade do Recife por mais de uma década (WEILL et al., 2003).

O alelo de resistência, *ace-1^R*, é muito difundido, e diferentes frequências deste alelo foram encontradas em populações de *C. pipiens* na Itália, variando de 0,13 a 0,71 (TOMA et al., 2011), e em baixas frequências em *C. quinquefasciatus* provenientes de Benin, no qual a maioria dos indivíduos eram heterozigotos (99 em 100) (DJOGBENOU et al., 2008). Como a substituição G119S causa redução de até 50-60% no *fitness* de *C. pipiens* (RAYMOND et al., 2001), um elevado número de indivíduos heterozigotos é esperado, mas dentre os 36 indivíduos analisados de SC não foi encontrado nenhum heterozigoto com esta mutação. O locus *ace-1* tem sido duplicado em *C. quinquefasciatus* e em outras subespécies de *C. pipiens*. O evento de duplicação ocorreu independentemente em diferentes populações, e é bem recente (aproximadamente 40 anos) (LABBÉ et al., 2007 a, b). No presente trabalho, não encontramos nenhuma evidência de duplicação do *ace-1* pela análise das sequências de DNA das populações de *C. quinquefasciatus*, e seria necessário executar o protocolo desenvolvido por Labbé et al. (2007a) para confirmar a ausência do alelo *ace-1^D* nestas populações.

Os dados apresentados sugerem que, embora não exista um programa nacional para controlar *C. quinquefasciatus* no Brasil, mecanismos de resistência a inseticidas químicos estão presentes em populações naturais, revelando a seleção indireta ao temephos pela utilização deste inseticida no controle de *Ae. aegypti*. Considerando que esta espécie de mosquito é um vetor importante de diversos patógenos e que o Brasil está sob o risco de introdução de alguns destes patógenos, a presença de alelos de resistência em populações naturais de *Culex* pode representar uma ameaça para futuras estratégias de controle visando esta espécie.

Além disso, a detecção precoce de alelos de resistência é essencial para o sucesso na implementação de estratégias de manejo de resistência, como a rotatividade de inseticidas com diferentes modos de ação. Uma boa opção poderia ser a utilização de *Bacillus sphaericus* (Bs) e *B. thuringiensis* sorovar. *israelensis*, em rotação; o larvicida Bs tem sido utilizado desde 2003 em Recife e ainda não foi reportado alteração no padrão de susceptibilidade (CHALEGRE et al., 2009; SILVA-FILHA et al., 2008). A sustentabilidade dos programas de controle dos vetores deve ser reforçada por outras intervenções ambientais como a limpeza dos drenos, canais, valas e caixas de gordura, e a eliminação dos criadouros, se possível, para melhorar a eficiência dos programas de controle de vetores.

Estudos com colônias de insetos selecionadas para resistência em laboratório mostram que esta característica pode gerar desvantagens reprodutivas, maior susceptibilidade aos inimigos naturais ou ainda um maior percentual de mortalidade (AGNEW et al., 2004; BERTICAT et al., 2002; BOURGUET et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2003;

RODCHAROEN; MULLA, 1997). Porém, em alguns casos, analisando estes mesmos parâmetros, os genes de resistência confeririam um aumento no desempenho biológico, quando cessada a pressão de seleção (AGNEW et al., 2004; GOULD; ANDERSON, 1991).

Bourguet et al. (2004) avaliaram *C. pipiens* em relação aos efeitos pleiotrópicos da resistência a inseticidas organofosforados, e as populações que apresentaram alelos de resistência (acetilcolinesterase, *ace-1*) mostraram um aumento no tempo de desenvolvimento das formas jovens e uma redução do tamanho das asas dos adultos. No nosso estudo, mesmo mantendo a pressão de seleção entre 60 – 70% de mortalidade, não foi possível estabelecer uma população resistente ao temephos em laboratório.

Rivero et al. (2011) observaram que populações de *C. pipiens* que apresentaram superprodução de esterase continham, em média, 30% a menos de reservas energéticas (lipídios, glicogênio, glicose) do que as populações susceptíveis e aquelas que apresentavam o gene de resistência *ace-1^R* continham 20% a menos de reserva. Os autores sugerem que, no caso do gene *ace1*, esta diminuição da reserva de energia seria uma consequência da hiperativação do sistema nervoso (RIVERO et al., 2011).

Os fatores que influenciam a evolução de resistência dos insetos incluem a herança da resistência, a frequência inicial dos alelos de resistência, o comportamento dos insetos, as práticas de manejo e o custo biológico. Martins et al. (2012) avaliaram populações de *Ae. aegypti* resistentes a OPs e PYs, e observaram um elevado custo biológico na população mantida sob pressão de seleção ao PY deltametrina, com diminuição na oviposição, viabilidade dos ovos e no tempo de vida das fêmeas, além do aumento no tempo de desenvolvimento das larvas. A pressão de seleção causa um acúmulo de alelos com efeitos negativos nos diferentes estágios de desenvolvimento dos insetos; além disso, a resistência aos inseticidas está associada a um elevado custo biológico (MARTINS et al., 2012).

A análise do desempenho biológico é algo complexo, sendo necessária a avaliação de diversos parâmetros para se chegar a uma conclusão definitiva (GASSMANN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009). Para melhor análise deste desempenho, além das características biológicas, pode ser avaliada a mudança na frequência dos alelos de resistência nas populações tratadas e não tratadas, pois a diminuição dos alelos, sem a ação de nenhum fator externo, como por exemplo, a migração de indivíduos susceptíveis, indicaria que na ausência da pressão de seleção estes alelos estariam ocasionando algum custo biológico na população (GASSMANN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009).

Eritja e Chevillon (1999) avaliaram como a mudança da pressão de seleção em populações de *C. pipiens* de um município da Espanha afetou a dinâmica dos genes de

resistência aos OPs. Neste caso, as populações de *Culex* foram alvo de programas de controle que utilizavam OPs durante 10 anos, porém, os OPs foram substituídos por *Bacillus*. Os autores observaram que, mesmo após dois anos de interrupção da seleção com OPs, a frequência dos alelos A2-B2 das esterases foi mantida e, em alguns casos, esta frequência aumentou, o que mostra a variabilidade do efeito pleiotrópico dos genes de resistência a pesticidas. Atualmente o Bti está sendo utilizado em SC para o controle de *Ae. aegypti*, por isso, uma nova amostragem de *Culex* deve ser realizada para avaliar se os mecanismos de resistência ainda permanecem nesta população

Um dos principais objetivos da genética de populações é identificar e quantificar a variação observada dentro e entre as populações para o estudo de fluxo gênico, efeitos estocásticos (deriva genética e mutação), sistemas de acasalamento e seleção natural. Os marcadores do tipo microssatélite são utilizados para realizar inferências sobre as forças microevolutivas que estão baseadas nas frequências dos alelos e sua distribuição geográfica (OLIVEIRA et al., 2006). O estudo da genética de população de vetores de doenças é importante, pois tem a habilidade de detectar e compreender a história evolutiva e os fatores responsáveis pela resistência, adaptação dos insetos e, conseqüentemente, a epidemiologia da doença (KOTHERA et al., 2012; MÜLLER; MARCONDES; NAVARRO-SILVA, 2010; YAN et al., 1998). Segundo Müller, Marcondes e Navarro-silva (2010), a utilização de microssatélites em estudos com culicídeos foi iniciada na década de 90 e, desde então, diversos estudos têm sido feitos utilizando esses marcadores moleculares.

Neste estudo foram utilizados 16 microssatélites para avaliar a variabilidade genética e o risco de dispersão dos alelos de resistência entre as sete populações de *C. quinquefasciatus*. Destes microssatélites, apenas o locus C48CGA1 foi monomórfico nas amostras, indicando que esses microssatélites mostraram-se eficientes no estudo da variabilidade genética de *Culex*. Foram encontrados 90 alelos nas amostras estudadas com número e tamanho de alelos por locus variando de dois a 15, e 102 a 307 pb, respectivamente. A riqueza alélica variou de 3,02 a 3,87 e a H_e variou de 0,46 (JB e GG) a 0,53 (SC). Em todos os casos, exceto JB, a $H_o > H_e$. Kothera et al. (2012) caracterizaram 13 populações de *C. pipiens* do Colorado, EUA, utilizando 14 microssatélites. Neste caso, a H_e variou de 0,52 a 0,65, porém $H_o < H_e$, indicando déficit de heterozigotos.

O parâmetro de H_e é o mais apropriado para mensurar a variação genética uma vez que ele pode ser usado independentemente do sistema de reprodução da população. O F_{IS} , medida do grau de endogamia dentro das populações, equivale à média do desvio das frequências genotípicas esperadas sob o pressuposto de Equilíbrio de HardyWeinberg dentro

das populações (OLIVEIRA et al., 2006). Apesar de as amostras de JB apresentarem maior riqueza alélica, esta apresentou a menor H_e , quando comparado com as outras populações, e F_{IS} positivo que indica déficit de heterozigotos. As outras populações apresentaram excesso de heterozigotos.

A deficiência de heterozigotos pode ocorrer devido às diferenças nas frequências alélicas de populações subdivididas ou ainda pode ser consequência do endocruzamento ou da presença de alelos nulos (EDILLO et al., 2007; NEI, 1987; SOLFERINI; SELIVON, 2004). Além disso, quando uma população encontra-se subdividida em várias unidades de reprodução, faz com que as frequências de indivíduos homozigotos sejam maiores do que aquelas em equilíbrio de Hardy-Weinberg, levando ao efeito Wahlund e quanto menor a quantidade de genótipo heterozigoto de uma população, maior o grau de parentesco entre os indivíduos em sucessivas gerações (NEI, 1987; NEI; KUMAR, 2000).

De acordo com Wright (1978), valores de F_{ST} menores do que 0,05 indicam diferenciação genética baixa entre as populações; entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação genética moderada; valores entre 0,15 e 0,25 indicam diferenciação genética alta entre as populações; e valores acima de 0,25 referenciam diferenciação genética muito alta. Além disso, o excesso de heterozigotos pode ser devido a dois fatores principais: presença de alelos deletérios ou genes letais ou a predominância de cruzamentos exogâmicos (MURRAY, 1996). Neste estudo, o valor de $F_{ST} = 0,13$ aponta diferenciação genética moderada entre as populações com excesso de heterozigotos ($F_{IS} = -0,048$), o que significa que de alguma maneira ocorre fluxo gênico entre as populações, que poderia levar a dispersão de alelos de resistência.

Para avaliar o recente estabelecimento de populações de *C. quinquefasciatus* nas ilhas Galápagos, um estudo realizado por Bataille et al. (2009) observou a constante introdução desses insetos trazidos pelos aviões. Os autores utilizaram 11 microssatélites e os valores de F_{ST} mostraram que não houve diferença significativa entre as populações das ilhas e também foram identificados como migrantes do Equador, trazidos para ilha dentro dos aviões (BATAILLE et al., 2009).

Apesar de a população de PX ter sido mantida sob condições de laboratório por mais de 14 gerações, os índices de variabilidade genética foram semelhantes àqueles das populações de campo. Este resultado provavelmente ocorreu devido ao elevado número de jangadas obtidas em campo para fundação da colônia em laboratório. Foram coletadas mais de 500 jangadas em PX, já nas outras localidades foram cerca de 100 jangadas, sendo todos indivíduos irmãos.

As populações de AC e AF estão próximas geograficamente e se agruparam com suporte estatístico de 65%. Apesar de JB estar geograficamente mais próximo de IP, esta última se agrupou a PX e apresentou um suporte estatístico de 99%. Não foi observado o efeito de gargalo nas populações e estudos mostram que as populações de *C. quinquefasciatus* são abundantes nas cidades e o fluxo gênico pode ser intenso (BRASIL, 2011; OLIVEIRA, 1996).

Mesmo a população de *C. quinquefasciatus* proveniente de SC, distante a 190 km de Recife, ter sofrido a ação de programas de controle para o vetor *Ae. aegypti*, a variabilidade genética foi semelhantes às demais populações pela análise dos 15 *loci* de microssatélites. Populações de *An. arabiensis*, distantes a 250 km, apresentaram baixa diferenciação genética entre si, o que levanta a possibilidade de um contínuo fluxo gênico entre elas (SIMARD et al., 2000). Porém, a estruturação de populações de *C. quinquefasciatus* no Havaí, com distância menor que 100 km, pela análise de 12 *loci* de microssatélites mostrou uma redução na diversidade genética naquelas populações provenientes de regiões mais elevadas, quando comparadas àquelas de regiões de menor altitude (KEYGHOBADI et al., 2006).

A população de AF apresentou o menor valor de riqueza alélica (3,02) e nesta localidade o controle de *C. quinquefasciatus* vem sendo realizado desde 2003, com a utilização do biolarvicida Bs e esta população não apresentou nenhuma diferença significativa na susceptibilidade a Bs após 24 tratamentos (CHALEGRE et al., 2009; SILVA-FILHA et al., 2008). Porém, um estudo recente, utilizando cinco marcadores microssatélites, avaliou o impacto das ações deste programa sobre a diversidade genética da população de AF, de junho de 2003 a setembro de 2006, no qual foram detectados um declínio gradual na diversidade genética e uma leve estruturação genética temporal (CARTAXO; AYRES; WEETMAN, 2011).

A avaliação da diversidade gênica e o entendimento da estrutura populacional dos insetos vetores são importantes, pois podem ajudar juntamente com os dados epidemiológicos das doenças, a antecipar a distribuição geográfica final da transmissão dos patógenos, como filariose e VNO, além da elaboração de intervenções na saúde pública mais eficazes contra estes patógenos e da observação precoce da dispersão dos alelos de resistência.

9 CONCLUSÕES

- a) A resistência moderada ao temephos encontrada na população de *Culex quinquefasciatus* proveniente do município de Santa Cruz do Capibaribe (SC) indica que o programa de controle do vetor *Aedes aegypti* empregado nesta localidade está selecionando resistência em espécies não-alvo, como *C. quinquefasciatus*.
- b) Os dois principais mecanismos de resistência aos organofosforados, o aumento da atividade de enzimas de detoxificação e a perda da sensibilidade da acetilcolinesterase, encontrados na população de *C. quinquefasciatus* proveniente de SC, corrobora os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade *in vivo*.
- c) A mutação no gene da acetilcolinesterase, *ace-1* (G119S), foi encontrada na população de SC provavelmente devido ao intenso uso do organofosforado na região.
- d) Os marcadores moleculares do tipo microssatélite mostraram-se eficientes no estudo da variabilidade genética das populações de *C. quinquefasciatus*.
- e) A maior diferenciação genética foi encontrada dentro das populações e não entre elas, ocorrendo fluxo gênico entre as populações, o que poderia levar a dispersão dos alelos de resistência encontrados em Santa Cruz do Capibaribe.
- f) A população de Água Fria apresentou o menor valor de riqueza alélica, provavelmente devido ao tratamento da área com *Bacillus sphaericus*, como observado em estudos prévios.
- g) Apesar dos indivíduos de Peixinhos, colônia de laboratório susceptível, terem sido mantidos sob condições de laboratório por mais de 14 gerações, os índices de variabilidade genética foram semelhantes àqueles das populações de campo, provavelmente devido à obtenção desta colônia por meio de 500 jangadas, diferente das outras populações que foram apenas 100 jangadas, havendo mais indivíduos irmãos.

- h) A obtenção de uma população de laboratório com resistência elevada ao organofosforado temephos não foi alcançada, o que torna necessária a avaliação do custo biológico desta colônia na presença e ausência do inseticida.
- i) Embora não exista um programa nacional para controlar *C. quinquefasciatus* no Brasil, mecanismos de resistência a inseticidas químicos estão presentes em populações naturais do inseto, revelando a seleção indireta da resistência e, além disso, como ocorre fluxo gênico entre as populações, os alelos de resistência podem ser compartilhados entre as mesmas.

REFERÊNCIAS

- ACTION NATURE. **Classe Hexapoda** – Insectes. 1 fotografia. Disponível em: <<http://sxm.fauna.free.fr/Bugs/i-Culex-quinquefasciatus.jpg>>. Acesso em: 12 dez. 2008.
- AGNEW, P. et al. Parasitism increases and decreases the cost of insecticide resistance in mosquitoes. **Evolution**, Colorado, v. 58, n. 3, p. 579-586, 2004.
- ALON, M. et al. Organophosphates' resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 38, n. 10, p. 940-949, 2008.
- ALOUT, H. et al. A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 41-47, 2007.
- ALOUT, H.; LABBÉ, P.; BERTHOMIEU, A.; PASTEUR, N.; WEILL, M. Multiple duplications of the rare *ace-1* mutation F290V in *Culex pipiens* natural populations. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 39, n. 12, p. 884-891, 2009.
- AMORIM, L. B. et al. Development of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* IAB59 needs long term selection pressure. **Biological Control**, San Diego, v. 42, p. 155-160, 2007.
- AMORIM, L. B. et al. Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide temephos in Pernambuco, Brazil. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 4, 2013. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.3502/abstract;jsessionid=E0CC7955BE9A4C6A0F84E4CA448BED87.d04t03>. Acesso em: 10 abr. 2013.
- APPERSON, C. S.; GEORGHIOU, G. P. Inheritance of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis* Coquillett. **Bulletin of the World Health Organization**, Genebra, v. 52, n. 1, p. 97-100, 1975.
- ARENSBURGER, P. et al. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. **Science**, Washington, v. 330, n. 6000, p. 86-88, 2010.
- ASIH, P. B. S. et al. Existence of the *rdl* mutant alleles among *Anopheles* malaria vector in Indonesia. **Malaria Journal**, London, v. 11, n. 57, p. 1-6, 2012.

BARBOSA, R. M. et al. Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 4, p. 523-529, 2007.

BARTHOLOMAY, L et al. Pathogenomics of *Culex quinquefasciatus* and meta-analysis of infection responses to diverse pathogens. **Science**, Washington, v. 330, p. 88-90, 2010.

BATAILLE, A. et al. Evidence for regular ongoing introductions of the mosquito disease vectors into the Galápagos Islands. **Proceedings of the Royal Society of London – Series B – Biological Sciences**, London, v. 276, p. 3768-3775, 2009.

BECKER, N. et al. **Mosquitoes and their control**. New York: Klumer Academic/Plenum Publisher, 2003. cap. 11, p. 345-375.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 472 p.

BEN C. R. et al. Characterization of a novel high-activity esterase in Tunisian populations of the mosquito *Culex pipiens*. **Journal of Economic Entomology**, College Park, n. 101, p. 484-491, 2008.

BEN, C. R. et al. Genes conferring resistance to organophosphorus insecticides in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Tunisia. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 46, p. 523-530, 2009.

BERGÉ, J. B.; FEYEREISEN, R.; AMICHOT, M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 353, n. 1376, p. 1701-1705, 1998.

BERROCAL, L. et al. West Nile virus; ecology and epidemiology of an emerging pathogen in Colombia. **Revista de Salud Pública**, Bogotá, v. 8, n. 2, p. 218-228, 2006.

BERTICAT, C. et al. A molecular test to identify resistance alleles at the amplified esterase locus in the mosquito *Culex pipiens*. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 56, p. 727-731, 2000.

BERTICAT, C. et al. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens*. **Genetical Research**, London, v. 79, n. 1, p. 41-47, 2002.

BOURGUET, D. et al. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. **Evolution**, Colorado, v. 58, n. 1, p. 128-135, 2004.

BRACCO, J. E. et al. Resistance to organophosphorous and carbamates insecticides in a population of *Culex quinquefasciatus*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 182-183, 1997.

BRACCO, J. E.; BARATA, J. M.; MARINOTTI, O. Evaluation of insecticide resistance and biochemical mechanisms in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 1, p. 115-120, 1999.

BRADLEY, D. J. The particular and general. Issues of specificity and verticality in the history of malaria control. **Parassitologia**, Roma, v. 40, p. 5-10, 1998.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: history of control in Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v.16, n. 2, p. 113-118, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009a. 160 p.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lei proíbe agrotóxico DDT em todo país**. 2009b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/200509.htm>. Acesso em: 24 dez. 2012.

_____. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Metodologia para qualificação de atividades de enzimas relacionados com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti***.: Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 128 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus***. 3ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 76 p.

BROGDON, W. G.; McALLISTER, J. C. Insecticide resistance and vector control. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 4, p. 605-613, 1998.

CAMPOS, J.; ANDRADE C. F. Larval susceptibility of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations to chemical insecticides. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 523-527, 2003.

CARTAXO, M. F. S.; AYRES, C. F. J.; WEETMAN, D. Loss of genetic diversity in *Culex quinquefasciatus* targeted by a lymphatic filariasis vector control program in Recife, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, p. 491– 499, 2011.

CARVALHO, I. M. R. **Estudo dos mecanismos bioquímicos de resistência a inseticidas em diferentes populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) do Brasil**. 2008. 102 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. Golden age of insecticide research: past, present, or future? **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 43, p. 1–16, 1998.

CASSANELLI, S. et al. Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 642-653, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (EUA). **Epidemic/Epizootic West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control**. 3ª ed. Colorado, 2003. 80 p.

Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/publications.htm>>. Acesso em: 12 mar. 2012.

CHALEGRE, K. D. M. et al. Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1044-1049, 2009.

CHARLAT, S.; CALMET, C.; MERCOT, H. On the *mod resc* model and the evolution of *Wolbachia* compatibility types. **Genetics**, Austin, v. 159, p. 1415–1422, 2001.

CHELVANAYAGAM, G.; PARKER, M.W.; BOARD, P.G. Fly fishing for GSTs: a unique nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 133, n.1-3, p. 256–260, 2001.

CHE-MENDOZA, A.; PENILLA, R. P.; RODRIGUEZ, D. A. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: a review. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, p. 1386–1397, 2009.

CHO, S. G. et al. Glutathione S-transferase modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, p. 12749–12755, 2001.

COATS, J. R. Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 87, p. 255-262, 1990.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1994. 225 p.

COTO, M. M. et al. Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after its use in *Aedes aegypti* control programs. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 16, n. 4, p. 324-330, 2000.

CUI, F. et al. Insecticide resistance in Chinese populations of the *Culex pipiens* complex through esterase overproduction. **Entomologia Experimentalis et applicata**, Amsterdam, v. 120, p. 211-220, 2006.

CUI, F. et al. Characterization of novel esterases in insecticide-resistant mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 37, n.11, p. 1131-1137, 2007.

DAABOUB, J. et al. Resistance to pyrethroid insecticides in *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) from Tunisia. **Acta Tropica**, Basel, v. 107, n. 1, p. 30-36, 2008.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 995-1002, 2002.

DE BARJAC, H. et al. *Clostridium bifermentans* serovar *malaysia*, une nouvelle bactérie anaérobie pathogène des larves de moustiques et de simules. **Comptes Rendus des Seances de L'Academie des Sciences**, Paris, série III, v. 310, p. 383-387, 1990.

DELÉCLUSE, A.; ROSSO, M. L.; RAGNI, A. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*, encoding a highly mosquitocidal protein. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 4230-4235, 1995.

DJOGBENOU, L. et al. Characterization of insensitive acetylcholinesterase (ace-1R) in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): resistance levels and dominance. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 44, n. 5, p. 805-810, 2007.

DJOGBENOU, L. et al. Evidence of introgression of the *ace-1R* mutation and of the *ace-1* duplication in West African *Anopheles gambiae* s. s. **PLoS One (Online)**, San Francisco, v. 3, n. 5, p. e2172, 2008.

DOBZHANSKY, T. **Genetics and the origin of species**. 3rd ed. New York: Columbia University

DONG, K. Insect sodium channels and insecticide resistance. **Invertebrate Neuroscience**, Sheffield, v. 7, p. 17-30, 2006.

DU, W. et al. Independent mutations in the *Rdl* locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 14, n. 2, 179-183, 2005.

EDILLO, F. E. et al. A set of broadly applicable microsatellite markers for analyzing the structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) populations. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 44, n. 1, p. 145-149, 2007.

ELLEGREN, H. Microsatellite mutations in the germline: Implication for evolutionary inference. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 16, p. 551-558, 2000.

ELLIOTT, M. et al. A photostable pyrethroid. **Nature**, London, v. 246, p. 169-170, 1973.

ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 14, p. 3-8, 2005.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Temephos RED**, 2009. Disponível em: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/temephos_red.htm. Acesso em: 26 dez. 2012.

ERITJA, R.; CHEVILLON, C. Interruption of chemical control and evolution of insecticide resistance genes in *Culex pipiens*. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 36, p. 41-49, 1999.

EXCOFFIER, L. Analysis of populations subdivision. In: BALDIN, D. J.; BISHOP, M.; CANNINGS, C. (Eds). **Handbook of statistical genetics**. Chichester: John Wiley & Sons, p. 271-307, 2001.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 44, p. 507-533, 1999.

_____. Evolution of insect P450. **Biochemical Society Transaction**, London, v. 34, n. 6, p. 1252-1255, 2006.

FINNEY, D. J. **Probit analysis** – a statistical treatment of the sigmoid response curve. 3rd ed. Cambridge University Press, 1971. p. 50-80.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v. 391, p. 806-11, 1998.

FONTES, G. Filariídea: *Wuchereria bancrofti* – filariose linfática. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Médica**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 35, p. 269-277.

FORATTINI, O. P. et al. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 4-Survey of resting adults and synanthropic behaviour in South-Eastern, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 398-411, 1993.

FOTOSEARCH. **Mosquito (Culex pipiens) pupae**. 1 fotografia. Disponível em: <<http://www.fotosearch.com/AGE020/x06-297093/>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 87, p. 245–254, 1990.

GASSMANN, A. J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B. E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 54, p. 147-163, 2009.

GEORGHIOU, G. P. Resistance potencial to biopesticides and consideration of countermeasures. In: CASIDA, J. E. (Ed.). **Pesticides and alternatives**. Nova York: Elsevier Science Publisher, 1990. p. 409-420.

GEORGHIOU, G. P.; LAGUNES-TAJEDA, A. **The occurrence of resistance to pesticides in arthropods**. Roma: Food and Agricultural Organization of the United Nations, 1991. 318 p.

GOLDBERG, L. H.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News**, New York, v. 37, p. 355-358, 1977.

GOLKAR, L. et al. Variation of larval susceptibility to *Lagenidium giganteum* in three mosquito species. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 62, p. 1-8, 1993.

GONZÁLEZ, T. et al. Insecticide resistance in a *Culex quinquefasciatus* strain from Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n.1, p.121-122, 1999.

GOUDET, J. **FSTAT** (Online). Lausanne, 2005. Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Acesso em: 15 set. 2012.

GOULD, F.; ANDERSON, A. Effects of *Bacillus thuringiensis* and HD-73 Delta-endotoxin on growth, behaviour, and fitness of susceptible and toxin-adapted strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 20, p. 30-38, 1991.

GRAF, J. F. The role of insect growth regulators in arthropods control. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 9, n. 12, p. 471-474, 1993.

GULF COAST MOSQUITO CONTROL. **Mosquitoes egg**. 1 fotografia. Mandeville, 2006. Disponível em: <<http://www.gulfcoastmosquito.com/images/image001.jpg>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

HEMINGWAY, J. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). **Document WHO/CDS/CPC/MAL/98.6**. World Health Organization, Geneva, 1998.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 45, p. 371–391, 2000.

HICKNER, P. V. et al. Genome-based microsatellite development in the *Culex pipiens* complex and comparative microsatellite frequency with *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 9, p. e13062, 2010.

HOFFMANN, A. A. et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. **Nature**, London, v. 476, p. 454-457, 2011.

HOY, C. W.; HEAD, G. P.; HALL, F. R. Spatial heterogeneity and insect adaptation to toxins. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 43, p. 571-594, 1998.

HUANG, K. X. et al. Recent advances in the biochemistry of spinosyns. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 82, n. 1, p. 13-23, 2009.

HUGHES, D. N. et al. Persistence of three organophosphorus insecticides in artificial ponds and some biological implications. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 9, p. 269-279, 1980.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pe&tema=saneamentobasico2008>. Acesso em: 30 mar. 2013.

_____. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo demográfico 2010. @Cidades**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>. Acesso em: 30 mar. 2013.

ILICCIEV, P. **Eliminar a Dengue: um programa de pesquisa internacional**. 2012. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?from_info_index=1&infoid=1592&sid=32. Acesso em: 10 dez. 2012.

JIANG, X. et al. Mutation in acetylcholinesterase1 associated with triazophos resistance in rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 378, n. 2, p. 269-272, 2009.

KARUNARATNE, S. H. P. P; HEMINGWAY, J. Malation resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. **Bulletin World Health Organization**, Geneva, v. 79, p. 1060-1064, 2001.

KASAI, S. et al. Molecular cloning, nucleotide sequence, and gene expression of a cytochrome P450 (CYP6F1) from the pyrethroid-resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, p. 163-171, 2000.

KASAI, S. et al. Alternative splicing and developmental regulation of glutathione transferases in *Culex quinquefasciatus* Say. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 94, p. 21-29, 2009.

KASHI, Y.; KING, D.; SOLLER, M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 13, p. 74-78, 1997.

KAWADA, H. et al. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. **PLoS Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v. 3, n. 10, p. 1-7, 2009.

KELLEN, W. R. et al. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **Journal of Insect Pathology**, New York, v. 5, p. 98-103, 1965.

KENT, R. J.; HARRINGTON, L. C.; NORRIS, D. E. Genetic differences between *Culex pipiens f. molestus* and *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) in New York. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 44, p. 50-59, 2007.

KEYGHOBADI, N. et al. Fine-scale population genetic structure of a wildlife disease vector: the southern house mosquito on the island of Hawaii. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 3919-3930, 2006.

KILPATRICK, A. M. et al. Spatial and temporal variation in vector competence of *Culex pipiens* and *Cx. restuans* mosquitoes for West Nile virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.83, n. 3, p. 607-613, 2010.

KOMAGATA, O.; KASAI, S.; TOMITA, T. Overexpression of cytochrome P450 genes in pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 40, p. 146–152, 2010.

KONO, Y.; TOMITA, T. Amino acid conferring insecticide insensitivity in Ace-paralogous acetylcholinesterase. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 85, n. 3, p.123-132, 2006.

KORSLOOT, A.; VAN GERTEL, C. A. M.; VAN STRAALLEN, N. M. The mixed-function oxygenase system. In: _____ (Ed.). **Environmental stress and cellular response in Arthropods**. Washington: CCR Press, 2004. cap. 6, p. 89-97.

KOTHERA, L. et al. Microsatellite characterization of subspecies and their hybrids in *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) mosquitoes along a North-South transect in the Central United States. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 46, p. 236-248, 2009.

KOTHERA, L. et al. Characterization of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) populations in Colorado, USA using microsatellites. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 10, p. e47602, 2012.

LABBÉ, P. et al. Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 4, p. 1056-1067, 2007a.

LABBÉ, P. et al. Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 3, n. 11, p. e205, 2007b.

LACEY, L. A.; UNDEEN, A. H. Microbial control of black flies and mosquitoes. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 31, p. 265-296, 1986.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 23, n. 2, p. 133-163, 2007.

LAURENCE, B. R.; PICKETT, J. A. An oviposition attractant pheromone in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 75, p. 283-290, 1985.

LEE, D. W. et al. Mutations of acetylcholinesterase1 contribute to prothiofos-resistance in *Plutella xylostella* (L.). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 353, n. 3, p. 591-597, 2007.

LEHMANN, T.; HAWLEY, W. A.; COLLINS, F. H. An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. **Genetics**, Austin, v. 144, n. 3, p. 1155-1163, 1996.

LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 52, p. 231-253, 2007.

LI, Y.-C. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 2453-2465, 2002.

LI, Y.-C. et al. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, n. 6, p. 991-1007, 2004.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LIMA, I. **Workshop Internacional do Projeto Aedes Transgênico reúne pesquisadores de dez países**. 2012. Disponível em:

http://www.saude.ba.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=3706:workshop-internacional-do-projeto-aedes-transgenico-reune-pesquisadores-de-dez-paises&catid=1:noticiascidadaousuario&Itemid=14. Acesso em: 04 dez. 2012.

LISKA, D. J. The detoxification enzyme systems. **Alternative Medicine Review**, Saindpoint, v. 3, n. 3, p. 187-198, 1998.

LIU, H. Q. et al. Insecticide resistance and cross-resistance in Alabama and Florida strains of *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 41, n. 3, p. 408-413, 2004.

LIU, N. et al. Multiple cytochrome P450 genes: their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. **PLoS One (Online)**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. e23403, 2011.

LLINÁS, G. A. et al. Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 1, p. 113-116, 2010.

LUMJUAN, N. et al. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 37, p. 1026–1035, 2007.

LUNA, E. J. A.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, R. P. de. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia? **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 12, n. 1, p. 7-19, 2003.

MAGANA, C. et al. Mechanisms of resistance to malathion in the medfly *Ceratitis capitata*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 38, n. 8, p. 756-762, 2008.

MANSUR, J. F. et al. The effect of lufenuron, a chitin synthesis inhibitor, on oogenesis of *Rhodnius prolixus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 98, p. 59-67, 2010.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate as pragas: com uma introdução sobre o estudo dos insetos**. 7ª Ed. São Paulo: Nobel, v.1, 1988. 304 p.

MARINA, C. F. et al. Spinosad: a biorational mosquito larvicide for use in car tires in southern Mexico. **Parasites & Vectors (Online)**, London, v. 5, n. 95, 2012. Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/95>. Acesso em: 20 dez. 2012.

MARONI, M. et al. Organophosphorus pesticides. **Toxicology**, Amsterdam, v. 143, p. 9–37, 2000.

MARTINEZ-TORRES, D. et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 7, p. 179–184, 1998.

MARTINEZ-TORRES, D. et al. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L. mosquitoes. **Pesticide Science**, London, v. 55, p. 1012–1020, 1999.

MARTINS, A. J. et al. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. **PLoS One (Online)**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e31889, 2012.

MATHENGE, E. M. et al. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behaviour, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 38, n. 4, p. 531–536, 2001.

MAZZARRI, M. B.; GEORGHIOU, G. P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 11, n. 3, p. 315–322, 1995.

MCMENIMAN, C. J. et al. Host adaptation of a *Wolbachia* strain after long-term serial passage in mosquito cell lines. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 22, p. 6963–6969, 2008.

MEDLOCK, J. et al. The impact of transgenic mosquitos on Dengue virulence to humans and mosquitoes. **American Naturalist**, Chicago, v. 174, n. 4, p. 565–577, 2009.

MELO-SANTOS, M. A. et al. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 113, n. 2, p. 180–189, 2010.

MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 206, p. 4393–4412, 2003.

MIKHAILOV, A. T.; TORRADO, M. Carboxylesterases moonlight in the reproductive tract: a functional shift pivotal for male fertility. **Frontiers in Bioscience**, Searington, v. 5, p. 53-62, 2000.

MOLNAR, A. et al. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, p. 7812–7818, 2005.

MONTELLA, I. R. et al. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 467-477, 2007.

MORALES, M. A. et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 10, p.1559-1561, 2006.

MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; FIGUEIRA-MANSUR, J. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. In: INCT-EM (Eds.). **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. 2012. Cap. 15. Online.
Disponível em: <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1>. Acesso em: 26 dez. 2012.

MOUCHÈS, C. et al. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 2574–2578, 1990.

MÜLLER, G. A.; MARCONDES, C. B.; NAVARRO-SILVA, M. A. Aplicação de marcadores microssatélites para o estudo de Culicidae (Diptera): revisão com especial referência a *Haemagogus*. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, Maracay, v. L, n. 2, p. 175-186, 2010.

MUNHENGGA, G. et al. Pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles arabiensis* from Gwave, a malaria-endemic area in Zimbabwe. **Malaria Journal (Online)**, London, v. 7, n. 247, 2008. Disponível em: <http://www.malariajournal.com/content/7/1/247>. Acesso em: 26 dez. 2012.

MURRAY, B. W. **The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data**. Ontario: McMaster University, 1996. Disponível em: <http://helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html>. Acesso em: 20 dez. 2012.

NABESHIMA, T. et al. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*.

Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, v. 313, n. 3, p. 794-801, 2004.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. 1. ed. New York: Columbia University, 1987. 512 p.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. 1. ed. New York: Oxford University, 2000.

NELSON, D. T. The cytochrome P450 homepage. **Human Genomics**, v. 4, p. 59-65, 2009. Disponível em: <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>. Acesso em: 04 jan. 2013.

NERBERT, D. W. Naming related P450 genes, based on divergent evolution. **Current Contents**, Philadelphia, v. 36, n. 22, p. 9-10, 1993.

OAKESHOTT, J. G. et al. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica**, The Hague, v. 90, p.239-268, 1993.

OLIVEIRA, C. M. F. de. **Condições ambientais e densidade populacional do *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae), em áreas urbanas do Recife e Olinda**. 1996. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.

OLIVEIRA, C. M. F. de. et al. Biological fitness of a *Culex quinquefasciatus* population and its resistance to *Bacillus sphaericus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 19, n. 2, p. 125-129, 2003.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, S. M. ; CARVALHO, D. O. ; CAPURRO, M. L. Mosquito transgênico : do *paper* para a realidade. **Revista da Biologia**, São Paulo, v. 6b, p. 38-43, 2011.

OPAS (Organização Pan-americana da Saúde). **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Brasília: Organização Pan-americana da Saúde/OMS, 1996.

ORDUZ, S. et al. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 59, p. 99-103, 1992.

O'REILLY, A. O. et al. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. **Biochemical Journal**, London, v. 396, n. 2, p. 255–263, 2006.

ORLOVA, M. V. et al. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2723–2725, 1998.

OTTESEN, E. A. et al. The global programme to eliminate lymphatic filariasis: health impact after 8 years. **PloS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 10, p. e317, 2008.

PARADKAR, P. N. et al. Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 46, p. 18915–18920, 2012.

PAUVOLID-CORREA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 4, p. 467–474, 2011.

PEI, G. et al. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3003–3009, 2002.

PERRY, T.; BATTERHAM, P.; DABORN, P.J. The biology of insecticidal activity and resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, p. 411–422, 2011.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J.-M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, Washington, v. 90, p. 502–503, 1999.

RANSON, H. et al. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 9, p. 491–497, 2000.

RANSON, H. et al. Identification of a novel class of insect glutathione S transferase in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Biochemical Journal**, London, v. 395, p. 295–304, 2001.

RANSON, H. et al. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. **Science**, Washington, v. 298, p. 179–181, 2002.

RAYMOND, M. et al. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 353, n. 1376, p. 1707-1711, 1998.

RAYMOND, M. et al. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? **Genetica**, The Hague, v. 112-113, n. 1, p. 287-296, 2001.

RECIFE. PREFEITURA (2008). **PCR apresenta novas estratégias de controle da filariose**. Disponível em:

<http://www.recife.pe.gov.br/2008/10/31/pcr_apresenta_novas_estrategias_de_controle_da_filariose_164478.php>. Acesso em: 27 dez. 2010.

REDDY, B. P. N.; PRASAD, G. B. K. S.; RAGHAVENDRA, K. In silico characterization and comparative genomic analysis of the *Culex quinquefasciatus* glutathione S-transferase (GST) supergene family. **Parasitology Research**, Berlin, v. 109, p. 1165–1177, 2011.

REDDY, B. P. N. et al. Identification and classification of detoxification enzymes from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Bioinformation**, Singapore, v. 8, n. 9, p. 430-436, 2012.

REDDY, B. P. N.; LABBÉ, P.; CORBEL, V. *Culex* genome is not just another genome for comparative genomics. **Parasites & Vectors (Online)**, London, v. 5, n. 63, 2012. Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/63>. Acesso em: 26 nov. 2012.

REGIS, L. et al. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 1, p. 115-119, 1995.

REUSKEN, C. et al. First evidence for presence of *Culex pipiens* biotype molestus in the Netherlands, and of hybrid biotype pipiens and molestus in Northern Europe. **Journal of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 35, p. 210–212, 2010.

REY, L. *Wuchereria bancrofti* e filariase linfática. In: _____. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 50, p. 627-638.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, Colorado, v. 43, p. 223-225, 1989.

RIVERO, A. et al. Energetic cost of insecticide resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 48, n. 3, p. 694-700, 2011.

ROBERTS D. R. et al. DDT, global strategies, and a malaria control crisis in South America. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, n. 3, p. 295-302, 1997.

ROBERTSON, J. L. et al. Natural variation: a complicating factor in bioassays with chemical and microbial pesticides. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 88, n. 1, p. 1-19, 1995.

RODCHAROEN, J.; MULLA, M. S. Biological fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) susceptible and resistant to *Bacillus sphaericus*. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 34, p. 5-10, 1997.

ROUSH, R. T.; DALY, J. C. The role of population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R. T.; TABASHNIK, B. E. (Eds.). **Pesticide Resistance in Arthropods**. London: Chapman and Hall, 1990. p. 97-152.

ROUSSET, F. Genepop'007: A complete re-implementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, Malden, v. 8, p. 103-106, 2008.

RUANG-AREERATE, T. et al. Molecular phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on *wsp* gene sequences. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 40, n. 1, p. 1-5, 2003.

SALGADO, V. L.; SPARKS, T. C. The spinosyns: chemistry, biochemistry, mode of action and resistance. In: GILBERT, L. I.; GILL, S. S. (Eds.). **Insect Control**. London: Academic Press, 2010. cap. 6, p. 207-246.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSEN, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SARKAR, M. et al. Insecticide resistance and detoxifying enzyme activity in the principal bancroftian filariasis vector, *Culex quinquefasciatus*, in northeastern India. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 122-131, 2009.

SAWICKI, R. et al. Cloning expression and biochemical characterization of one Epsilon-class (GST-3) and ten Delta-class (GST-1) glutathione S-transferases from *Drosophila*

melanogaster, and identification of additional nine members of the Epsilon class. **Biochemical Journal**, London, v. 370, p. 661–669, 2003.

SILVA-FILHA, M. H. N. L. et al. *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. **Biological Control**, San Diego, v. 44, p. 227-234, 2008.

SIMARD, F. et al. Persistence of *Anopheles arabiensis* during the severe dry season conditions in Senegal: an indirect approach using microsatellite loci. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 9, p. 467-479, 2000.

SINGH, S. P. et al. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 268, p. 912–2923, 2001.

SODERLUND, D. M.; KNIPPLE, D. C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 563-577, 2003.

SOLFERINI, V. N.; SELIVON, D. Polimorfismos de isoenzimas. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2004. p. 137-142.

SOLOWAY, S. B. Naturally occurring insecticides. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v.14, p. 109–117, 1976.

STONE, B. F.; BROWN, A. W. Mechanisms of resistance to fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied. **Bulletin of the World Health Organization**, Genebra, v. 40, n. 3, p. 401-408, 1969.

SUCEN. Superintendência de Controle de Epidemias, 2001. **Segurança em controle químico de vetores**. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/seguranca-do-trabalhador/seguranca-em-controle-quimico-de-vetores>. Acesso em: 20 dez. 2012.

SUN, B. K.; TSAO, H. Small RNAs in development and disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Washington, v. 59, n. 5, p. 725-737, 2008.

TABASHNIK, B. E.; CROFT, B. A. Managing pesticide resistance in crop-arthropod complexes - Interactions between biological and operational factors. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 11, p. 1137-1144, 1982.

TANTELY, M. L. et al. Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Reunion Island. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 317-324, 2010.

THAILAYILA, J. et al. Spermless males elicit large-scale female responses to mating in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 33, p. 13677-13681, 2011.

TOMA, L. et al. Status of insecticide resistance in *Culex pipiens* field populations from north-eastern areas of Italy before the withdrawal of OP compounds. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 67, n. 1, p. 100-106, 2011.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 45, p. 247-268, 2005.

VERMUT, A. M. et al. Evidence for two juvenile hormone esterase-related genes in the Colorado potato beetle. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 327-336, 1998.

VONTAS, J. ; RANSON, H. ; ALPHEY, L. Transcriptomics and disease vector control. **BMC Biology (Online)**, Londres, v. 8, n. 52, 2010.

WALKER, C. H.; MACKENESS, M. I. Esterases: problems of identification and classification. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 32, n. 22, p. 3265-3269, 1983.

WALKER, T. et al. The *wMel* *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. **Nature**, London, v. 476, n. 7361, p. 450-453, 2011.

WEILL, M. et al. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. **Proceedings of the Royal Society of London – Series B – Biological Sciences**, London, v. 269, n. 1504, p. 2007-2016, 2002.

WEILL, M. et al. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. **Nature**, London, v. 423, n. 6936, p. 136-137, 2003.

WEILL, M. et al. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2004.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, Lancaster, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.

WEITZEL, T. et al. Genetic differentiation of populations within the *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) and phylogeny of related species. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 25, p. 6-17, 2009.

WHALON, M. E.; McGAUGHEY, W. H. *Bacillus thuringiensis*: use and resistance management. In: ISHAAYA, I. ; DEHEELE, D. (Eds.). **Insecticides with novel modes of action, mechanism and application**. New York : Springer-Verlag, 1998. p. 106-137.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Instruction for determining the susceptibility of resistance of mosquito larvae to insecticides. In: **World Health Organization Mimeograph**, WHO / VBC/ 81807, 1981.

_____. **Environmental Health Criteria 97** – Deltamethrin. Geneva: International Programme on Chemical Safety – IPCS, 1990.

_____. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. **WHO Informal Consultation**, Geneva, WHO/CDS/CPC/MAL/98.12, 1998. 46 p.

_____. **Temephos in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers**. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva, WHO/HSE/WSH/09.01/1, 2009. 15 p.

_____. Global Programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report on mass drug administration, 2010. **Weekly Epidemiol Record**, v. 86, n. 35, p. 377-388, 2011a.

_____. **Global Malaria Programme: The use of DDT in malaria vector control**, 2011. WHO position statement, WHO/HTM/GMP/2011, p. 1-9, 2011b.

_____. **Temephos**: O,O,O'-tetramethyl O,O'-thiodi-p-phenylene bis(phosphorothioate). WHO specifications and evaluations for public health pesticides. Geneva, 2011c. 44 p. Disponível em: http://www.who.int/whopes/quality/Temephos_eval_only_June_2011.pdf. Acesso em: 26 dez. 2012.

WHYARD, S.; SINGH, A. D.; WONG, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 39, p. 824-32, 2009.

WILDLIFE TRUST. **Shift in feeding behavior of mosquitoes sheds light on West Nile Vírus outbreak.** Nova York, 2006. Disponível em: <http://www.wildlifetrust.org/news/2006/images/culex_mosquitoes.jpg>. Acesso em: 12 dez. 2011.

WILKE, A. B. et al. Control of vector populations using genetically modified mosquitoes. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 869-874, 2009.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K.; KERWIN, J. L. *Lagenidium giganteum* in *Culex tarsalis* larvae: production of infective propagules. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 66, p. 25-32, 1995.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations.** vol. IV. Chicago: University of Chicago Press, 1978.

XI, Z. et al. Generation of a novel *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) via embryonic microinjection. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 35, n. 8, p. 903-910, 2005.

XU, Q. et al. Sodium channel genes and their differential genotypes at the L-to-F kdr locus in the mosquito *Culex quinquefasciatus* **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 407, p. 645-649, 2011.

YADOULETON, A. et al. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in northern Benin. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, n. 60, 2011.

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

YAN, L. et al. Transcriptomic and phylogenetic analysis of *Culex pipiens quinquefasciatus* for three detoxification gene families. **BMC Genomics**, London, v. 13, n. 609, 2012. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/609>. Acesso em: 20 nov. 2012.

YANG, T.; LIU, N. Genome analysis of cytochrome P450s and their expression profiles in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. **PLoS One (Online)**, San Francisco, v. 6, n. 12, p. e29418, 2011.

YUAN, Z. M. et al. Cross-resistance between strains of *Bacillus sphaericus* but not *B. thuringiensis israelensis* in colonies of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 17, p. 251-256, 2003.

ZAYED, A. B. et al. Use of bioassay and microplate assay to detect and measure insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from filariasis endemic areas of Egypt. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 22, v. 3, p. 473-482, 2006.

ZHANG, X.; ZHANG, J.; ZHU, K. Y. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 683-693, 2010.

ZHANG, H. et al. Identification of resistant carboxylesterase alleles in *Culex pipiens* complex via PCR-RFLP. **Parasites & Vectors**, London, v. 5, n. 209, 2012. Disponível em: <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/209>. Acesso em: 20 dez. 2012.

ZHOU, L. et al. Detection of broadly distributed sodium channel alleles characteristic of insect pyrethroid resistance in West Nile Virus vector *Culex pipiens* Complex Mosquitoes in the United States. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 46, n. 2, p. 321-327, 2009.

ZHU, F. et al. Characterization of two novel cytochrome P450 genes in insecticide resistant house flies. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 20, p. 1365-1583, 2008.

APÊNDICE

Apêndice – Artigo publicado na revista Pest Management Science .

Research Article



Received: 25 July 2012

Revised: 30 November 2012

Accepted article published: 10 April 2013

Published online in Wiley Online Library:

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.3502

Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide temephos in Pernambuco, Brazil

Liliane Barbosa Amorim,^{a,b} Elisama Helvecio,^a Cláudia Maria Fontes de Oliveira^a and Constância Flávia Junqueira Ayres^{a,*}

Abstract

BACKGROUND: *Culex quinquefasciatus* is the vector of many agents of human diseases, including *Wuchereria bancrofti*, the parasite that causes bancroftian filariasis, an endemic disease in Pernambuco State, Brazil. Although temephos is not currently used to control *C. quinquefasciatus*, the species might be under a selection process from incidental exposure to this compound. This study aimed to evaluate the susceptibility status of *C. quinquefasciatus* to temephos, using bioassays, and to investigate its putative resistance mechanisms through biochemical assays and screening of the G119S mutation in the acetylcholinesterase gene, which is associated with organophosphate resistance, carried out by PCR and sequencing.

RESULTS: The results showed that only mosquitoes from Santa Cruz do Capibaribe (SC) had an alteration in their susceptibility status (RR = 7.2-fold), while the other populations were all susceptible to the insecticide. Biochemical assays showed increased activity for all esterases in SC, as well as evidence of acetylcholinesterase insensitivity. The G119S mutation was detected in this population with a frequency of 0.11, but it was not found in the remaining populations.

CONCLUSION: These data show that mechanisms of temephos resistance have been selected in natural *C. quinquefasciatus* populations from Pernambuco, which could undermine future control actions.

© 2013 Society of Chemical Industry

Keywords: temephos resistance; *Culex quinquefasciatus*; bioassay; detoxifying enzymes; acetylcholinesterase

1 INTRODUCTION

The mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) is one of the major domestic pests in urban areas. It is a vector of various agents of human diseases and causes great discomfort for the human population because of its nuisance biting. According to the World Health Organization,¹ this species is the only vector of *Wuchereria bancrofti* (Cobbold), a lymphatic filarial worm, in the Americas. This parasite is endemic in many tropical regions, with an estimated 120 million individuals infected in 81 countries and more than 1 billion people at risk of contracting the infection.¹ Active filariasis transmission in the Americas has been found in four countries: Brazil, the Dominican Republic, Guyana and Haiti.¹ In Brazil, the Metropolitan Region of Recife (MRR), located in the State of Pernambuco, still has endemic areas for lymphatic filariasis, which constitutes a major challenge to public health.¹

C. quinquefasciatus is also able to carry many arboviruses of importance to public health. The species was found to be naturally infected with viruses that cause encephalitis, such as St Louis, Venezuelan equine encephalitis and^{2–4} West Nile virus (WNV), an arbovirus of the genus *Flavivirus*, the main hosts of which are migratory birds. Outbreaks have occurred in the United States since 1999, and WNV has been isolated in the Caribbean, Colombia, Argentina and recently in Brazil.^{5–7} Because the spread of WNV may occur through migratory birds, the environmental monitoring of animals acting as reservoirs and vectors has been intensified

to prevent the entry and spread of this virus in the country.⁸ There is an estimated global expansion of the transmission of arboviruses, and *Culex* may play a key role because of its high abundance in urban areas. Vector control can be performed by using physical methods or chemical or biological insecticides, aiming to maintain low levels of insect populations and thus break the cycle of disease transmission and reduce the discomfort caused by insect bites. Since 1940, chemical insecticides have been the most common means of controlling insects. The use of organochlorines (OCs), organophosphates (OPs), carbamates (CMs) and pyrethroids (PYs) for an extended period of time, without any resistance management strategy, led to the emergence of several resistant populations and, consequently, to the resurgence of diseases.⁹

Many chemical insecticides act on the insect's central nervous systems, and two of the most common mechanisms of resistance

* Correspondence to: Constância Flávia Junqueira Ayres, Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE 50670-420, Brazil. E-mail: tans@cpqam.fiocruz.br

a Department of Entomology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife-PE, Brazil

b Postgraduate Programme of Animal Biology/UFPE,

are the increase in metabolic capacity of detoxification enzymes (metabolic resistance), such as esterases (α and β), oxidases and glutathione-S-transferases (GSTs), and the decreased sensitivity of the insecticide target site.^{10,11} Target-site insensitivity is usually caused by mutations that change the amino acid sequence of a given protein, which acts as the target site, preventing binding between the insecticide and its target, without losing the protein's function in the cell. Examples of target-site resistance mechanisms are knockdown resistance¹², known as *kdr*, caused by alterations in the sodium channel, which is the target of DDT and PYs, and the insensitivity of acetylcholinesterase,¹³ which is the target of OPs and CMs.

Culex populations resistant to chemical insecticides have been reported in many countries, including Brazil.^{14–18} Three loci have been described that present the major resistance alleles. Two of these loci, *Est-2* and *Est-3*, have genes that confer resistance to OPs and CMs by overproducing esterases owing to the amplification or the upregulation of the gene.¹⁹ The third locus, *ace-1*, encodes an acetylcholinesterase, the site of action of both OPs and CMs insecticides, and three different amino acid substitutions have been identified so far, resulting in reduced sensitivity to inhibition by the insecticides owing to a single mutation in the gene: G119S in *Culex vishnui* Theobald and *C. pipiens* Linnaeus, F290V in *C. pipiens* and F331W in *C. tritaeniorhynchus* Giles.^{20–23}

In Recife, some districts use the larvicide *Bacillus sphaericus* Neide for the biological control of *C. quinquefasciatus*, and populations with changes in susceptibility to the bacterial toxin have been described; nevertheless, most locations do not use any insecticide to control this vector.^{24,25} However, OPs and PYs are still used to control *Aedes aegypti* (Linnaeus), the vector of dengue and urban yellow fever, and, among OPs, temephos is the most commonly used larvicide in Brazilian control programmes.²⁶ The intensive use of this insecticide may also affect *C. quinquefasciatus* populations. Coto et al.²⁷ demonstrated that the use of OPs in *Ae. aegypti* control induced resistance via natural selection in *Culex* populations, while the target species remained susceptible to the

insecticide. Therefore, the aim of the present work was to evaluate the susceptibility status to temephos in *C. quinquefasciatus* populations from areas with intense use of this compound targeting *Ae. aegypti*.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Study area and mosquito samples

C. quinquefasciatus specimens were collected as eggs from six localities in Pernambuco (PE) State, as shown in Fig. 1. Four sites were located in the Metropolitan Region of Recife (MRR): (1) Água Fria district (AF), a neighbourhood of Recife, the capital of Pernambuco State; (2) Alto da Conquista (AC), located in Olinda, 10 km from Recife; (3) Jaboatão dos Guararapes (JB), located 24 km from Recife; (4) Ipojuca (IP), located 54 km from Recife. AF was the only area evaluated that has been subjected to the Filariasis Control Programme, which has included the utilisation of the biological larvicide *B. sphaericus* in *Culex* breeding sites since 2003.²⁸ A previous study showed that there are no significant differences in susceptibility status to *B. sphaericus* between this population and a laboratory susceptible colony,²⁵ even after 24 rounds of treatments. The remaining two populations were collected in Glória do Goitá (GG) and Santa Cruz do Capibaribe (SC), located in rural districts of Pernambuco, 60 km and 190 km from Recife respectively. In addition, a susceptible colony, Peixinhos (PX), was used as a standard susceptible strain in all bioassays. This colony had been kept under laboratory conditions for 1 year (approximately 14 generations). All the field samples were collected between August 2009 and December 2010. Approximately 100–200 egg rafts were collected by using approximately 30 oviposition traps that were randomly placed in households.²⁹ All colonies were maintained under laboratory conditions in the insectarium at Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, as previously described.³⁰ Information about the amount of insecticide used for the last 5 years, at each site, was obtained from the Secretariat of Health of Pernambuco State.



Figure 1. (A) Map of Brazil. (B) Map of Pernambuco. The numbers indicate the cities where *Culex quinquefasciatus* eggs rafts were collected: 1 – Olinda (Peixinhos and Alto da Conquista); 2 – Recife; 3 – Jaboatão dos Guararapes; 4 – Ipojuca; 5 – Glória do Goitá; 6 – Santa Cruz do Capibaribe.

2.2 Dose-response bioassay

To estimate the level of susceptibility to temephos in each population (apart from AC), bioassays were performed with minor modification of the standard procedure described by WHO,³¹ using third-instar larvae. Each assay was performed with at least three replicate groups of 20 larvae placed in 100 mL of distilled water treated with serial dilutions of insecticide comprising 6–10 concentrations, and a control group tested with ethanol and water only. Each bioassay was repeated at least 3 times, and the mean lethal concentrations of temephos causing 50% and 95% mortality (LC_{50} and LC_{95}) of exposed larvae after 24 h of treatment were estimated through a probit analysis³² using the software SPSS 8.0 for Windows. Resistance ratios (RRs) between the LC values for field populations and the LC values for larvae from the susceptible colony were determined. To evaluate all samples, two different samples of temephos were used, so PX, as a standard susceptible strain, was assayed 2 times to obtain the RR. The Mazzarri and Georgiou³³ criteria were followed to classify the resistance level of each population tested as follows: low ($RR < 5$), moderate ($5 \leq RR \leq 10$) or high ($RR > 10$).

2.3 Biochemical assays

The activity of detoxifying enzymes and insensitive acetylcholinesterase was measured using approximately 100 one-day-old unfed adult females from PX (the laboratory susceptible colony), AF (susceptible to temephos) and SC, with a moderate level of resistance.³⁴ The activities of esterases (α - and β -esterases and PNPA), glutathione-S-transferases (GSTs), mixed-function oxidases (MFOs) and acetylcholinesterase (AChE) were checked according to a protocol from Ministério da Saúde,³⁵ and the results were analysed according to Montella *et al.*³⁶ The substrate utilised in each assay included α - and β -naphthyl for α -Est and β -Est respectively, *p*-nitrophenyl for PNPA, reduced glutathione for GST,

TMBZ (3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine dihydrochloride) for MFO, acetylthiocholine iodide for AChE activity and propoxur to inhibit this activity and measure insensitive AChE. The percentage of individuals with enzyme activity higher than the 99th percentile of the PX strain was used for classifying activity as unaltered ($\leq 15\%$), altered ($> 15\%$ and $\leq 50\%$) or highly altered ($> 50\%$).

2.4 PCR and sequencing of the *ace-1* gene

Genomic DNA was extracted from individual five-day-old mosquito females by using DNazol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA), as recommended by the manufacturer. PCR was performed using specific primers: CpExdir 5'-CGA CTC GGA CCC ACT CGT-3' and CpExrev 5'-GAC TTG CGA CAC GGT ACT GCA-3', designed to amplify a 457 base pair (bp) fragment of exon 3 of the *ace-1* gene that includes position 119.³⁷ PCR products were purified using the GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and sequenced using an ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The sequences were edited and analysed using the CodonCode Aligner v.3.7.1 (CodonCode Corporation, Dedham, MA). Both sense and antisense sequences with quality scores higher than 20 were assembled in contigs, and they were compared. DnaSP software³⁸ was used to estimate the nucleotide and haplotype diversity.

3 RESULTS

3.1 Susceptibility to temephos

All populations except AC were assessed for susceptibility to temephos by dose-response bioassays. Individuals from AF presented an LC_{50} value similar to that obtained for PX, with $LC_{50} = 0.006 \text{ mg L}^{-1}$ and $RR = 1$, and showed no change in susceptibility to temephos (Table 1). GG showed a slight difference when compared with PX ($LC_{50} = 0.009 \text{ mg L}^{-1}$ and

Table 1. Toxicity of temephos against *Culex quinquefasciatus* third-instar larvae from a susceptible laboratory colony (PX) and field populations: Água Fria (AF), Santa Cruz do Capibaribe (SC), Glória do Goitá (GG), Ipojuca (IP) and Jaboatão dos Guararapes (JB)

Population	Number of larvae	LC_{50} (CI 95%) ^a	RR LC_{50} ^b	LC_{95} (CI 95%) ^a	RR LC_{95} ^b
PX	1140	0.006 (0.005–0.006)	1.0	0.01 (0.009–0.011)	1.0
AF	1140	0.006 (0.005–0.007)	1.0	0.018 (0.009–0.027)	1.8
SC	1260	0.036 (0.033–0.041)	5.8	0.072 (0.064–0.083)	7.2
GG	1080	0.009 (0.008–0.011)	1.5	0.023 (0.018–0.038)	2.3
PX	1360	0.0033 (0.003–0.0036)	1.0	0.005 (0.005–0.006)	1.0
IP	1020	0.0019 (0.0018–0.0022)	0.6	0.005 (0.004–0.006)	1.0
JB	1140	0.002 (0.0012–0.0018)	0.57	0.005 (0.003–0.009)	1.0

^a Lethal concentrations (mg L^{-1}) for 50% and 95% of larvae after 24 h exposure.

^b Resistance ratio between the LC_{50} and LC_{95} towards the susceptible and field colonies.

Table 2. Temephos utilisation (kg) in six cities of Pernambuco for *Aedes aegypti* control from 2007 to 2011

Localities	Year				
	2007	2008	2009	2010	2011
Recife	0	0.745	0.171	0	0.417
Olinda	9662.8	11 438.1	11 891.9	0	0.002
Jaboatão dos Guararapes	0	0.02	0	0	0
Ipojuca	947.49	1013.23	905.69	218.28	2.713
Glória do Goitá	1319.7	1392.1	1268.3	1063.5	836.66
Santa Cruz do Capibaribe	54 829.7	62 619.2	62 029.9	40 770.1	8504.02

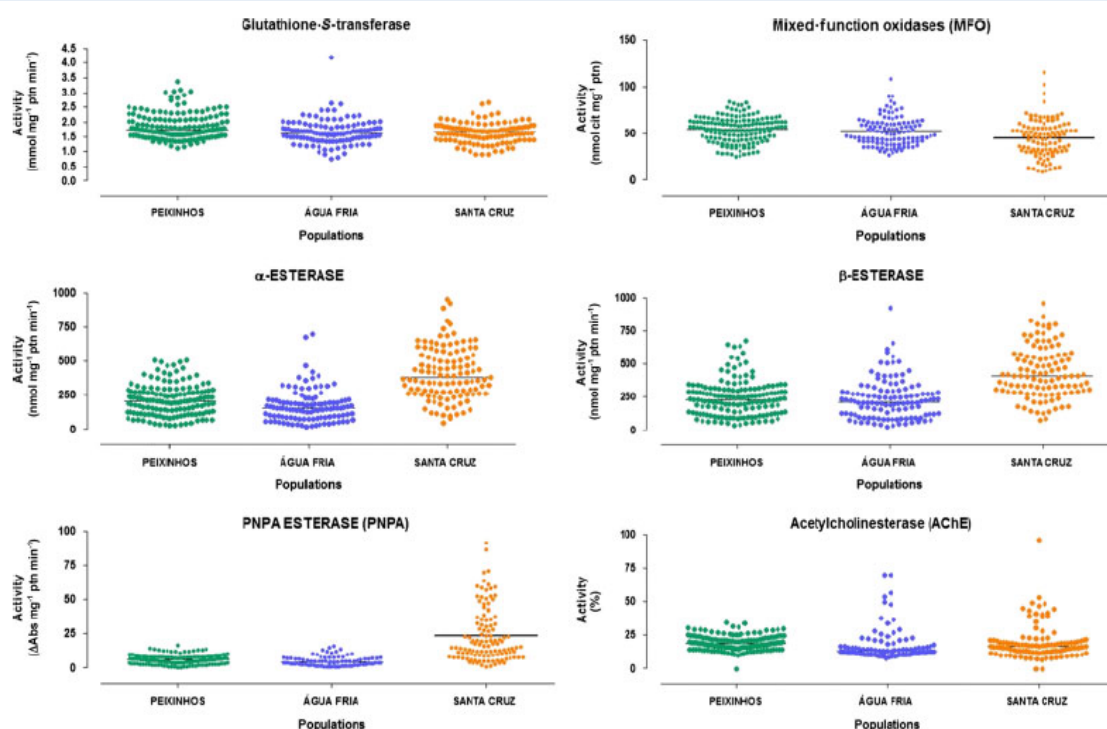


Figure 2. Profiles of enzyme activity in *Culex quinquefasciatus* populations susceptible (Água Fria) and with a moderate resistance (Santa Cruz) to temephos from Pernambuco, compared with the susceptible laboratory population (Peixinhos). The line represents the median activity for these individuals.

$LC_{95} = 0.023 \text{ mg/L}^{-1}$), with $RR_{50} = 1.5$ -fold and $RR_{95} = 2.3$ -fold, but this population is still considered to be susceptible. On the other hand, SC showed a moderate level of resistance to temephos, with $LC_{95} = 0.072 \text{ mg L}^{-1}$ and $RR = 7.2$ (Table 1). This population is being kept under selection pressure for further study. Another temephos sample was used to evaluate PX, IP and JB, because the first sample was exhausted, and PX showed an LC_{50} of 0.0033 mg L^{-1} (Table 1). IP and JB were a little more susceptible than PX owing to natural variations in bioassay results (Table 1).

Historically, the six localities have used different amounts of insecticides. Table 2 shows the total amount of temephos (in kg) used, per locality, in the last 5 years. One locality, SC, used more than 40 000 kg of temephos during the last 4 years (2007–2010). These data were provided by the Secretariat of Health of Pernambuco State.

3.2 Biochemical assays

The results of microplate assays with populations from AF and SC and the laboratory colony (PX) are presented in Fig. 2. Individuals from AF showed no alteration of enzyme activity when compared with the PX strain. On the other hand, individuals from SC showed higher esterase activities compared with PX, with 55% of individuals showing high non-specific esterase (PNPA) activity levels and 30% and 17% of the individuals showed α and β -esterases higher activity than PX, respectively. Moreover, 15% of individuals from SC displayed insensitive AChE, whereas the activity of GST and MFO was not significantly different from PX.

3.3 ace-1 mutation

The 457 bp fragment of the *ace-1* gene was amplified in 190 individuals from the six populations studied. After measuring the quality of sequences and excluding those of poor quality, 115 consensus sequences 374 bp long were obtained: 16 from PX, 36 from SC, 19 from AF, 12 from AC, 11 from JB and 21 from IP. A total of 35 sites were polymorphic. From the 115 sequences analysed, 19 different haplotypes were identified (Fig. 3). These sequences are available on GenBank under the accession numbers JX412929–JX412947. No indels (insertion or deletion) were detected in these sequences. The haplotype diversity (H_d) was 0.842 ± 0.019 , and the nucleotide diversity (π) was 0.00467. Four homozygous individuals for the G119S mutation were identified in SC, with an *ace-1^R* frequency of 0.11. In addition to this mutation, nine polymorphisms were observed in the aligned sequences, which represent nine synonymous mutations at sites 3, 9, 15, 21, 48, 123, 243, 297 and 312 (Fig. 3).

4 DISCUSSION

The results obtained in the present study showed that only mosquitoes from SC exhibited resistance to temephos, while the other populations showed a slight change in susceptibility status. According to Robertson *et al.*,³⁹ natural variation in bioassays may exist owing to environmental factors, as observed in JB and IP, which were more susceptible than PX, the lab colony. The susceptibility status alteration in a population not directly targeted by control programmes that use temephos as larvicide may result from the intense use of this product in the city, as shown



Figure 3. *ace1* gene haplotype diversity in *Culex quinquefasciatus* populations from Pernambuco. G119S mutation is highlighted.

in Table 2. The National Programme of Dengue Control (Programa Nacional de Controle da Dengue – PNCD) in Brazil used temephos as its main insecticide and covered the whole country until the emergence of *Aedes aegypti*-resistant populations in different states.²⁶ In Pernambuco, for example, *Ae. aegypti* from Araripina showed a resistance ratio (RR) of 240-fold⁴⁰ for temephos, and the intensive use of this insecticide may have also induced resistance via selection in *Culex*.

Previous studies have reported *C. quinquefasciatus* populations with low to moderate levels of resistance to the organophosphates temephos and malathion in Brazil, with resistance ratios ranging from three- to sixfold.^{14,18,41} Moreover, Coto *et al.*²⁷ demonstrated that the use of temephos in controlling *Ae. aegypti* led to resistance via selection in *C. quinquefasciatus* from Rio de Janeiro, Brazil, with RR > 40-fold, while the target species remained susceptible to the insecticide. The data show that attention should be given to the use of organophosphates in *Culex* breeding sites to prevent the selection of highly resistant populations. The emergence of resistance in malaria vectors (*Anopheles* species) owing to the use of agricultural pesticides such as PYs and OPs in cotton crops has been reported,⁴² indicating that resistance via selection in non-target insects can result from the indiscriminate use of insecticides.

In this study, a moderate level of temephos resistance was observed in *C. quinquefasciatus* from SC, and the biochemical profile of detoxification enzymes showed increased activity for

α -esterase, β -esterase and total esterase, in 30, 17 and 55% of the individuals compared to the susceptible colony's 99th percentile. *C. quinquefasciatus* from AF was considered to be susceptible and showed no difference in enzyme activity compared with the laboratory colony. As polluted water is the preferred habitat of *Culex* species, the presence of chemical analogues in the larval breeding sites could enhance their detoxification system, which may accelerate the selection process of insecticide resistance.⁴³ However, three *C. pipiens* field populations from Egypt were susceptible to temephos and showed higher esterase activity when compared with the laboratory colony.³⁴ *C. quinquefasciatus* from La Réunion Island showed a low level of resistance to temephos, and overproduced esterases were observed in 76–100% of 11 collected samples;⁴⁴ meanwhile, in north-east India, *Culex* populations resistant to DDT, an OC insecticide, have shown a high level of esterase and glutathione-S-transferase activity.⁴⁵

The widespread mutation in the acetylcholinesterase (*ace-1*) gene, leading to G119S substitution, is responsible for insensitivity to OP and CM insecticides in *Culex* populations^{46–48} and in many other species.^{49–53} This mutation was found only in SC, with an allele frequency of 0.11, which supports biochemical data showing changes in acetylcholinesterase sensitivity in approximately 15% of the individuals sampled. In a previous study that investigated this mutation in several populations around the world, G119S was found in *C. quinquefasciatus* samples collected in Recife in



Figure 3. continued

1995, indicating that this mutation has been present in natural populations for more than one decade.⁴⁶

The resistance allele, *ace-1^R*, is widespread, and it was found at different frequencies in Italian *C. pipiens* populations, varying from 0.13 to 0.71,⁴⁸ and at very low frequencies in *C. quinquefasciatus* in Benin, where most individuals were heterozygous (99 out of 100).⁵⁴ As G119S substitution causes a fitness reduction of up to 50–60% in *C. pipiens*,⁵⁵ a high number of heterozygous individuals would be expected, but, among the 36 individuals from SC analysed, no heterozygous ones carrying this mutation were found. The *ace-1* locus has been duplicated in *C. quinquefasciatus* and in the subspecies *C. pipiens*. The duplication events occurred in different populations independently,³⁷ and they are very recent (approximately 40 years ago).⁵⁶ In the present study, no evidence of *ace-1* duplication in *C. quinquefasciatus* populations was found by analysing the DNA sequences; however, it would be necessary to perform the Labbé *et al.*³⁷ protocol to confirm the lack of *ace-1^D* in these populations.

The data presented here suggest that, although there is no national programme to control *C. quinquefasciatus* in Brazil, resistance mechanisms to chemical insecticides are present in natural populations, revealing indirect selection to temephos by the use of this insecticide to control *Ae. aegypti*. Considering that this mosquito species is an important vector of several pathogens and that Brazil is under the risk of introducing some of these pathogens, the presence of resistance alleles in

Culex natural populations could represent a threat for future control strategies targeting this species. In addition, the early detection of resistance alleles is essential for the successful implementation of insecticide resistance management strategies, such as the rotation of insecticides with different modes of action. A good option would be the use of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis israelensis*, in rotation, which has been used since 2003 in Recife with no resistance reported.^{24,25} Moreover, the sustainability of the vector control programme should be enhanced by other environmental interventions such as cleaning of drains, canals, ditches and grease traps and elimination of breeding sites where possible to improve the efficiency of vector control programmes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors thank the Programme for Technological Development in Tools for Health/PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities, and the team from the insectarium of the Department of Entomology (CPqAM-FIOCRUZ) for technical support. They are indebted to Claudenice Pontes and Daniela Anastácio from the Secretaria of Health of Pernambuco State for providing the data about temephos use, and Vladimir Silveira Filho for map drawing.



REFERENCES

- WHO global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report on mass drug administration, 2010. *Wkly Epidemiol Rec* 86(35):377–388 (2011).
- Reisen WK, Epidemiology of St Louis encephalitis virus. *Adv Virus Res* 61(1):139–183 (2003).
- Flores FS, Diaz LA, Batallan GP, Almiron WR and Contigiani MS, Vertical transmission of St Louis encephalitis virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cordoba, Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(10):999–1002 (2010).
- Weaver SC, Ferro C, Barrera R, Boshell J and Navarro JC, Venezuelan equine encephalitis. *Annu Rev Entomol* 49(1):141–174 (2004).
- Berrocal L, Pena J, Gonzalez M and Mattar S, West Nile virus; ecology and epidemiology of an emerging pathogen in Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota)* 8(2):218–228 (2006).
- Morales-Betoulle ME, Morales H, Blitvich BJ, Powers AM, Davis EA, Klein R *et al*, West Nile virus in horses, Guatemala. *Emerg Infect Dis* 12(6):1038–1039 (2006).
- Pauvolid-Correa A, Morales MA, Levis S, Figueiredo LT, Couto-Lima D, Campos Z *et al*, Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(4):467–474 (2011).
- Luna EJA, Pereira LE and Souza RP, Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia? *Epidemiol Serv Saúde* 12(1):7–19 (2003).
- Brogdon WG and McAllister JC, Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis* 4(4):605–613 (1998).
- Hemingway J and Ranson H, Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 45(1):371–391 (2000).
- Li X, Schuler MA and Berenbaum MR, Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52(1):231–253 (2007).
- Soderlund DM and Knipple DC, The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33(6):563–577 (2003).
- Hemingway J and Georgiou GP, Studies on the acetylcholinesterase of *Anopheles albimanus* resistant and susceptible to organophosphate and carbamate insecticides. *Pestic Biochem Physiol* 19(2):167–171 (1983).
- Campos J and Andrade CF, Larval susceptibility of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations to chemical insecticides. *Rev Saude Publica* 37(4):523–527 (2003).
- Daaboub J, Ben Cheikh R, Lamari A, Ben Jha I, Feriani M, Boubaker C *et al*, Resistance to pyrethroid insecticides in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Tunisia. *Acta Trop* 107(1):30–36 (2008).
- Gonzalez T, Bisset JA, Diaz C, Rodriguez MM and Brandolini MB, Insecticide resistance in a *Culex quinquefasciatus* strain from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(1):121–122 (1999).
- Liu H, Cupp EW, Micher KM, Guo A and Liu N, Insecticide resistance and cross-resistance in Alabama and Florida strains of *Culex quinquefasciatus*. *J Med Entomol* 41(3):408–413 (2004).
- Bracco JE, Dalbon M, Marinotti O and Barata JM, Resistance to organophosphorus and carbamate insecticides in a population of *Culex quinquefasciatus*. *Rev Saude Publica* 31(2):182–183 (1997).
- Raymond M, Chevillon C, Guillemaud T, Lenormand T and Pasteur N, An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353(1376):1707–1711 (1998).
- Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hido O, Harada S *et al*, An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochem Biophys Res Commun* 313(3):794–801 (2004).
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquie M *et al*, The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* 13(1):1–7 (2004).
- Alout H, Berthomieu A, Hadjivassilis A and Weill M, A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochem Mol Biol* 37(1):41–47 (2007).
- Alout H, Labbé P, Berthomieu A, Pasteur N and Weill M, Multiple duplications of the rare *ace-1* mutation F290V in *Culex pipiens* natural populations. *Insect Biochem Mol Biol* 39(12):884–891 (2009).
- Cartaxo MF, Ayres CF and Weetman D, Loss of genetic diversity in *Culex quinquefasciatus* targeted by a lymphatic filariasis vector control program in Recife, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105(9):491–499 (2011).
- Chalegre KD, Romao TP, Amorim LB, Anastacio DB, de Barros RA, de Oliveira CM *et al*, Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. *Appl Environ Microbiol* 75(4):1044–1049 (2009).
- Braga IA and Valle D, *Aedes aegypti*: history of control in Brazil. *Epidemiol Serv Saúde* 16(2):113–118 (2007).
- Coto MM, Lazzano JA, de Fernandez DM and Soca A, Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after its use in *Aedes aegypti* control programs. *J Am Mosq Control Assoc* 16(4):324–330 (2000).
- Silva-Filha MH, Chalegre KD, Anastacio DB, de Oliveira CM, da Silva SB, Acioli RV *et al*, *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. *Biol Control* 44(2):227–234 (2008).
- Barbosa RM, Souto A, Eiras AE and Regis L, Laboratory and field evaluation of an oviposition trap for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(4):523–529 (2007).
- Pei G, Oliveira CM, Yuan Z, Nielsen-LeRoux C, Silva-Filha MH, Yan J *et al*, A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Appl Environ Microbiol* 68(6):3003–3009 (2002).
- Instruction for determining the susceptibility of resistance of mosquito larvae to insecticides. World Health Organisation Mimeograph WHO/VBC/81807 (1981).
- Finney DJ, *Probit Analysis – a Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve*. Cambridge University Press, Cambridge, UK (1971).
- Mazzarri MB and Georgiou GP, Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc* 11(3):315–322 (1995).
- Zayed AB, Szumilas DE, Hanafi HA, Fryauff DJ, Mostafa AA, Allam KM *et al*, Use of bioassay and microplate assay to detect and measure insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from filariasis endemic areas of Egypt. *J Am Mosq Control Assoc* 22(3):473–482 (2006).
- Metodologia para qualificação de atividades de enzimas relacionados com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*. Ministério da Saúde, Brasília (2006).
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA and Valle D, Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77(3):467–477 (2007).
- Labbe P, Berthomieu A, Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T *et al*, Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol* 24(4):1056–1067 (2007).
- Librado P and Rozas J, DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11):1451–1452 (2009).
- Robertson JL, Preisler HK, NG SS, Hickie LA and Gelernter WD, Natural variation: a complicating factor in bioassays with chemical and microbial pesticides. *J Econ Entomol* 88(1):1–19 (1995).
- Melo-Santos MA, Varjal-Melo JJ, Araujo AP, Gomes TC, Paiva MH, Regis LN *et al*, Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Trop* 113(2):180–189 (2010).
- Bracco JE, Barata JM and Marinotti O, Evaluation of insecticide resistance and biochemical mechanisms in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(1):115–120 (1999).
- Yadouleton A, Martin T, Padonou G, Chandre F, Asidi A, Djogbenou L *et al*, Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in northern Benin. *Parasit Vectors* 4(60):1–11 (2011).
- Reddy BN, Labbe P and Corbel V, *Culex* genome is not just another genome for comparative genomics. *Parasit Vectors* 5(63):1–4 (2012).
- Tantely ML, Tortosa P, Alout H, Berticat C, Berthomieu A, Rutee A *et al*, Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Reunion Island. *Insect Biochem Mol Biol* 40(4):317–324 (2010).
- Sarkar M, Bhattacharyya IK, Borkotoki A, Goswami D, Rabha B, Baruah I *et al*, Insecticide resistance and detoxifying enzyme activity in