

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



**Jairo Campos Gaona**

## **ANÁLISE CITOLÓGICA DE POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (DIPTERA, CULICINAE)**

|                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Este exemplar corresponde à redação final<br>da tese defendida pelo(a) candidato (a)<br><u>JAIRO CAMPOS GAONA</u><br><br>e aprovada pela Comissão Julgadora. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Biologia Celular Estrutural na  
área de Biologia Celular.

Orientador: Prof.Dr. Carlos Fernando Salgueirosa de Andrade

Co-orientadora: Profa.Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel

|                                                   |
|---------------------------------------------------|
| UNICAMP<br>BIBLIOTECA CENTRAL<br>SEÇÃO CIRCULANTE |
|---------------------------------------------------|

|            |                                     |
|------------|-------------------------------------|
| UNIDADE    | BC                                  |
| Nº CHAMADA | T/UNICAMP                           |
|            | G159a                               |
| V          | EX                                  |
| TOMBO BC/  | 51827                               |
| PROC.      | 16-83+-02                           |
| C          | <input type="checkbox"/>            |
| D          | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO      | R\$ 11,00                           |
| DATA       | 16/12/02                            |
| Nº CPD     |                                     |

CM00177093-2

BIB ID 272471

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

~~C1574~~

G159a

**Campos Gaona, Jairo**

Análise citológica de populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1976) e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera, Culicinae)/ Jairo Campos Gaona. -- Campinas, SP: [s.n.], 2002.

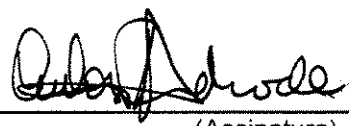
Orientador: Carlos Fernando Salgueirosa de Andrade  
Co-Orientadora: Shirlei Maria Recco-Pimentel  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1.Cromossomos politênicos. 2.Inseticidas. 3.Resistência.  
I.Andrade, Carlos Fernando Salgueirosa de. II.Recco-Pimentel, Shirlei Maria. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

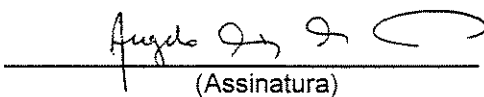
Data de Defesa: 30/09/2002

Banca Examinadora

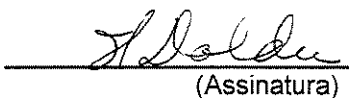
Prof. Dr. Carlos Fernando Saigueirosa de Andrade (Orientador)

  
(Assinatura)

Prof. Dr. Angelo Pires Prado

  
(Assinatura)

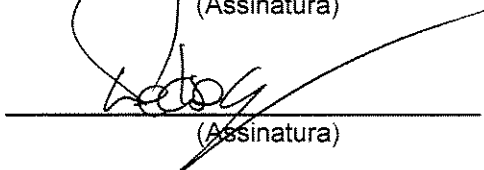
Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

  
(Assinatura)

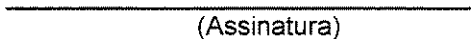
Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva

  
(Assinatura)

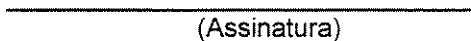
Prof. Dr. Wedson Desidério Fernandes

  
(Assinatura)

Prof. Dr. João Vasconcelos Neto

  
(Assinatura)

Prof. Dr. José Roberto Trigo

  
(Assinatura)

64385202

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando S. Andrade, pela orientação na realização do presente trabalho, pela confiança depositada, pelo incentivo e apoio sempre presentes, pela amizade e oportunidade oferecidas e por toda a sua contribuição na minha formação acadêmica e o auxílio incondicional como profissional e como pessoa.

À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, por a co-orientação neste trabalho, pelas sugestões no decorrer do mesmo e pelo seu exemplo de dedicação e interesse constante como profissional.

À Capes pelo auxílio financeiro.

Ao Laboratório de Entomologia do Instituto Nacional de Saúde da Colômbia (INS) na pessoa do Dr. Victor Olano e ao MSc. e médico veterinário Rómulo Campos Gaona da Universidade Nacional da Colômbia, Seccional de Palmira, VA por terem facilitado material entomológico para análise.

À pesquisadora Maria de Lourdes G. Macoris da SUCEN, Marília, SP pelo subministro da linhagem Rockefeller, ao laboratório de Culicidologia e ao Dr. Délsio Natal da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP) por terem disponibilizado a linhagem IAL.

Às Universidades Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e Estadual de Campinas (UNICAMP), ao Centro de Controle de Zoonoses (Cuiabá, MT) pelo uso das instalações e laboratórios.

Ao Prof. Dr. Angelo Pires Prado do Departamento de Parasitologia da UNICAMP pelas análises prévias do trabalho na forma de relatório bem como na sua versão de pré-banca. Assim mesmo aos Profs. Drs. Mário Antônio Navarro da Silva da UFPR e Wedson Desidério Fernandes da UFMS, pela revisão criteriosa do texto e pelas sugestões na forma de pré-banca que ajudaram a melhorar o trabalho e sua compreensão.

Ao MSc. Andrés Pablo Salanova pela revisão dos textos em inglês.

À Bióloga Klélia A. Carvalho, técnica do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, pela atenção e auxílio durante a realização do estudo.

Aos colegas do Departamento de Biologia Celular e do Departamento de Zoologia, pelos auxílios e contribuições prestados.

À UNICAMP e aos funcionários dos Departamentos de Biologia Celular e Zoologia pelo auxílio e serviço prestado ao longo destes anos, em especial a Lílíam A.S Panagio, secretária do Departamento de Biologia Celular, pelo carisma e desempenho incondicional.

À Eliana e aos amigos pela colaboração, a paciência e as tertúlias que amenizaram o trabalho, tornando-o mais humano.



## Sumário

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| Resumo                                           | 6  |
| Abstract                                         | 7  |
| I. Introdução                                    |    |
| 1. As espécies                                   | 8  |
| 2. Citologia                                     | 9  |
| 3. Inseticidas                                   | 12 |
| 4. Resistência                                   | 13 |
| 5. Objetivos                                     | 14 |
| II. Materiais e Métodos                          |    |
| 1. Material Biológico                            | 15 |
| 2. Coletas                                       | 15 |
| 3. Provas de Susceptibilidade aos Inseticidas    | 15 |
| 4. Técnicas Citológicas                          | 16 |
| 4.1. Material Biológico Trabalhado               | 17 |
| 5. Técnicas Moleculares                          | 20 |
| 6. Documentação                                  | 20 |
| III. Resultados e Discussão                      |    |
| 1. Avaliação da susceptibilidade aos Inseticidas | 20 |
| 2. Citologia                                     | 24 |
| 2.1. Cérebro e Intestino                         | 25 |
| 2.2. Tecido do Sistema Reprodutor                | 26 |
| 2.3. Cromossomos Politênicos                     | 26 |
| IV. Conclusões                                   |    |
| 1. Conclusões Gerais                             | 41 |
| 2. Conclusões Específicas                        | 41 |
| V. Recomendações                                 | 42 |
| VI. Bibliografia                                 | 43 |
| Anexo 1, Artigo                                  | 49 |
| Anexo 2, Artigo                                  | 55 |
| Anexo 3, Artigo                                  | 64 |
| Anexo 4, Artigo                                  | 71 |
| Anexo 5, Capítulo de Livro                       | 81 |

## RESUMO

No presente estudo foram feitas avaliações da susceptibilidade de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas organofosforados, carbamato e piretróides por meio de bioensaios. Isto permitiu monitorar a resistência em populações destas espécies em Campinas, SP, Campo Grande, MS e Cuiabá, MT. Adicionalmente, foi realizada uma avaliação citológica dos cromossomos politênicos dos túbulos de Malpighi em larvas, pupas e adultos de *A. aegypti* para as populações de Campinas, SP (Aea-Campus, Aea-Lab, Aea-Unicamp) e Campo Grande, MS (Aea-UFMS, Aea-cemitério)- Brasil, para as populações Aea-INS-Bogotá e Aea-Palmira, VA-Colômbia, e para a linhagem padrão Rockefeller. Da mesma forma foram avaliados os cromossomos politênicos de *C. quinquefasciatus* em populações de Campinas, SP (UNI-R1, UNI-R2), Campo Grande, MS (UFMS-R) e Cuiabá, MT (Cuiabá-R)- Brasil, nas populações Cxq-Palmira, VA e Cxq-INS-Bogotá- Colômbia, e na linhagem padrão IAL.

A partir de larvas criadas em baixas temperaturas (18-24°C), bem alimentadas e com pouco estresse por alta densidade populacional foram feitos estudos citológicos usando a técnica convencional de coloração com orceína. Os melhores resultados na obtenção e reproducibilidade dos cromossomos politênicos de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* foram alcançados com túbulos de Malpighi de pupas fêmeas grandes recém formadas (0-4h/18-24°C). Lâminas adequadas também foram obtidas com imagos fêmeas e larvas de 4º estágio avançado. Pode-se considerar que as dificuldades registradas na literatura para estas espécies foram contornadas em 80% para as linhagens avaliadas neste trabalho.

Mapas dos cromossomos politênicos para *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* foram elaborados. Isto permitiu identificar marcadores cromossômicos para uso na diferenciação dos cromossomos e caracterização citológica das espécies. Em *C. quinquefasciatus* as regiões centroméricas e a região organizadora do nucléolo são os principais marcadores para identificar os cromossomos, outros grupos de bandas e *puffs* são característicos nesta espécie como assinalado. O grau de politenia variou entre as linhagens de *C. quinquefasciatus*, sendo menor na linhagem padrão. Embora o padrão de bandas em *C. quinquefasciatus* apresente maior resolução que aquele de *A. aegypti*, nas duas espécies foi possível identificar marcadores cromossômicos característicos e específicos.

Nos mapas das linhagens resistentes de *C. quinquefasciatus*, foi observado na seção 31 do cromossomo 2L, marcador cromossômico do gene amplificado para esterases já associado com a resistência aos organofosforados. Discute-se que o monitoramento de populações de mosquitos de importância médica pode ser viável por meio de bioensaios bem como citologicamente, evidenciando mudanças na susceptibilidade aos inseticidas e levantando a necessidade de vigilância da resistência nas populações avaliadas. Sugere-se que desta forma, estudos populacionais e mapeamento físico de genes poderão ser realizados com cromossomos politênicos de espécies de Culicinae.

## ABSTRACT

In the present study, evaluations of the susceptibility to organophosphorus, carbamate and pirethroid insecticides of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* were made by means of bioassays. This allowed monitoring the resistance in populations of these species in Campinas, SP, Campo Grande, MS and Cuiabá, MT. Moreover, a cytological evaluation of the polytene chromosomes from Malpighi tubules was undertaken in larvae, pupae and adults from *A. aegypti* populations: Campinas, SP (*Aea-campus*, *Aea-Lab*, *Aea-Unicamp*) and Campo Grande, MS (*Aea-UFMS*, *Aea-cemetery*) - Brazil, for the populations *Aea-INS-Bogota* and *Aea-Palmira*, VA - Colombia, and for the Rockefeller susceptible standard strain. In the same way the polytene chromosomes from *C. quinquefasciatus* populations were appraised: Campinas, SP (UNI-R1, UNI-R2), Campo Grande, MS (UFMS-R) and Cuiabá, MT (Cuiabá-R) - Brazil, *Cxq-Palmira*, VA and *Cxq-INS-Bogota* - Colombia, and in the IAL susceptible standard strain.

Starting with larvae reared in low temperatures (18-24°C), well fed and with little stress due to overcrowding, cytological studies were made using the conventional technique of orcein staining. The best results for obtaining and reproducing the polytene chromosomes of *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* were reached with Malpighi tubules of recently emerged big female pupae (0 to 4 h / 18-24°C). Adequate slides were also obtained with female adults and 4th advanced instar larvae. It can be considered that the difficulties registered in the literature for these species were avoided in 80% for the strains evaluated in this work.

Polytene chromosome maps from *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* were also elaborated. This allowed identifying chromosomal landmarks for use in the differentiation of the chromosomes and cytological characterization of species. In *C. quinquefasciatus* the centromere regions and the nucleolar organizing region (NOR) are the main landmarks to identify the chromosomes. In this species, other groups of bands and puffs are also characteristic landmarks. The degree of politenization varied among the strains of *C. quinquefasciatus*, being smaller in the standard lineage. Although the pattern of bands in *C. quinquefasciatus* provides greater resolution than that of *A. aegypti*, in the two species identification of characteristic and specific chromosome landmarks was possible.

In the maps of the resistant strains of *C. quinquefasciatus*, chromosomal marker of the amplified gene for esterase was associated with resistance to the organophosphorus insecticides and observed in section 31 of chromosome arm 2L. The monitoring of medically important mosquito populations appears to be viable by means of bioassay as well as cytological evaluations, showing changes in the susceptibility to the insecticides and demonstrating the need of surveillance of resistance in the appraised populations. It is suggested that in this way, population studies and physical mapping of genes in species of Culicinae, can be undertaken based on polytene chromosomes.

## I. INTRODUÇÃO

### 1. As Espécies

Nos insetos da ordem Diptera são conhecidas mais de 150.000 espécies agrupadas em cerca de 130 famílias, sendo os mais importantes do ponto de vista médico, as moscas e mosquitos vetores de doenças. Para os mosquitos da família Culicidae, são registradas cerca de 3.600 espécies em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae. As subfamílias hematófagas Anophelinae e Culicinae contêm espécies vetores de arboviroses, filarioses e malária, destacando-se na subfamília Culicinae as espécies sinantrópicas *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. Estas espécies de mosquitos com distribuição mundial, estão também implicadas na transmissão dos agentes causadores de doenças nas Américas (Estrada-Franco & Craig, 1995), vírus de dengue e febre amarela no caso do *A. aegypti*, vírus de encefalites e nematódeos da filariose bancroftiana no caso do *C. quinquefasciatus* principalmente.

Nas Américas, só o Canada e Bermudas não registravam a presença do *A. aegypti* até janeiro de 2002. A rápida expansão deste mosquito e as recentes epidemias principais de dengue ocorridas nas Américas nas últimas décadas -Jamaica, 1977; Cuba, 1977, 1981, 1997; Brasil, 1981 a 2002 (Boa Vista, 1981/82; Rio de Janeiro, 1986, 1990, 1998, 2002; Alagoas e Ceará, 1986; Salvador, 1991, 2002; Ribeirão Preto, 1990/1991, 1995/1999; Santos, 1999/2002, Campinas, 1998/2002); Argentina, 1998/1999; Bolívia, 1987; 1999/2000; Colômbia, 1992, 1997; 2001/2002; Equador, 1988, 1998; Paraguai, 1988, 1998; Peru, 1990, 1998; México, 1995, 1998; Venezuela, 1989, 1990/1991, 1997/1998; (CDC, 1989, 1991; Alvarez *et al.*, 1993; Luna & León, 1993; OPS, 1995; Ibañez *et al.*, 1997; Duarte, 1998; Sucen, 2001; Funasa, 2002)- junto com os altos índices populacionais do mosquito vetor, e a prevalência e aumento dos casos de dengue hemorrágica nas Américas, sem precedentes em 1998 e 2001/2002 (WHO, 2002a), são enorme motivo de preocupação e devem estimular pesquisas que abordem o problema. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 2,5-3 bilhões de pessoas habitando as áreas tropicais estejam em risco potencial de contrair a dengue (Chastel, 1997; WHO, 2002a) e destas, uma quinta parte (500 milhões) encontra-se na América tropical e subtropical.

Na América tropical, a filariose bancroftiana é endêmica do Brasil, Costa Rica, Guiana, Haiti e Suriname (WHO, 2002b). Outros países como Colômbia, Guatemala, Guiana Francesa, México e algumas ilhas do Caribe têm distribuição da *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877), o agente causador da parasitose. Os vetores principais desta filariose são o *C. quinquefasciatus* e o *Anopheles darlingi* Root, 1926 (CIDEIM, 1994; Lozovei, 2001).

A capacidade vetorial de uma espécie é definida quantitativamente por componentes ambientais, comportamentais, celulares, bioquímicos e genéticos (competência do vetor). Interações

destes fatores, a densidade populacional e a longevidade do vetor influenciam a associação entre o patógeno, o vetor e o hospedeiro vertebrado (Beerntsen *et al.*, 2000). Entre os componentes ambientais, fatores de estresse tipo inseticidas podem exercer mudanças na tolerância aos parasitas e à temperatura. Em Sri Lanka, linhagens de *C. quinquefasciatus* resistentes a inseticidas organofosforados mostraram menor capacidade de transmitir filarias do que linhagens susceptíveis. O aumento da atividade de esterases nos mosquitos resistentes pode afetar o desenvolvimento de larvas L1 de *Wuchereria bancrofti* (McCarroll *et al.*, 2000), mas isto não é conclusivo por causa de resultados contrastantes na Tanzânia. Segundo o pesquisador Chris Curtis, só algumas esterases têm esta propriedade (Andy Coghlan, *Resistance is useful*, 25-10-2000 [latestnews@newscientist.com](mailto:latestnews@newscientist.com)). Já a pré-exposição de larvas de *A. aegypti* a concentrações subletais de Propoxur (um inseticida carbamato) conferiu tolerância cruzada a temperaturas altas. Neste caso, a resposta adaptativa às condições de estresse teve envolvimento das proteínas de choque, o que implica que verões severos e/ou que o uso de inseticidas possam aumentar a capacidade vetorial por causa de maior probabilidade na sobrevivência diária em condições adversas (Patil *et al.*, 1996).

Dentro dos componentes intrínsecos da espécie para veicular um parasita ou um patógeno (capacidade do vetor), vários dos componentes genéticos devem estar associados a determinantes próprios de um grupo de indivíduos (população e/ou subespécie). *A. aegypti* apresenta atualmente três subespécies em função de critérios morfológicos e eco-etológicos: *A. aegypti formosus*, selvagem (a forma primitiva de coloração escura), *A. aegypti queenslandensis* (de coloração mais pálida) e *A. aegypti aegypti* (de coloração intermediária). Por causa do transporte humano, esta última é a forma que existe no mundo tropical e temperado, e é o vetor principal de arbovírus particularmente o vírus da dengue (Failloux *et al.*, 1999).

No complexo de mosquitos *Culex pipiens* as subespécies mais nomeadas, *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 (s.str.), *C. p. quinquefasciatus* Say, 1823 e *C. p. molestus* Forskal, 1775 se diferenciam uma das outras primariamente na sua fisiologia, comportamento e distribuição (Olejníček & Gelbic, 2000). Citologicamente o padrão de bandas dos cromossomos politênicos tem sido útil, e pode diferir entre as subespécies deste complexo (Kanda, 1970). Estes cromossomos são excelente material no mapeamento físico de genes de interesse médico e de biologia aplicada, entre outros.

## 2. Citologia

Desde a década de 30 a citologia e a citogenética de mosquitos têm sido ferramentas importantes na análise de várias espécies, tendo seu maior desenvolvimento nas décadas de 60 e 70. Estas análises visavam o melhor conhecimento das espécies vetores, interesse taxonômico e estudos evolutivos. Das 3.600 espécies conhecidas na família Culicidae, só para cerca de 200 é conhecido seu cariótipo (White, 1980; Kumar & Rai, 1993; Bello *et al.*, 1996), incluindo as espécies

mais importantes na área médica e veterinária. Desta forma, muita atenção tem sido dada às espécies dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*, com diferentes tipos de abordagem citológica. Com o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas, as abordagens moleculares em cromossomos têm contornado parte das dificuldades apresentadas no passado.

Os mosquitos Culicidae apresentam um cariótipo com  $2n=6$  cromossomos, em um arranjo usual de dois pares de cromossomos maiores, metacêntricos ou submetacêntricos e um par menor de cromossomos metacêntricos e determinantes do sexo. A única exceção até o momento é o anofelino *Chagasia bathana* (Dyar),  $2n=8$  (Kitzmiller, 1976; Kreutzer, 1978; Knudson *et al.*, 1996). Em geral, utilizava-se a numeração 1 para o par menor e 3 para o par maior de cromossomos. Atualmente alguns autores mantêm esta classificação para *Culex* (Achary, 1994; Zambetaki *et al.*, 1998) enquanto outros (Dev & Rai, 1984; Kumar & Rai, 1990a; Malcolm *et al.*, 1998) adotam a nomenclatura proposta para *A. aegypti* por McDonald & Rai (1970) na qual o cromossomo menor é designado como 1, o maior como 2 e o mediano como 3, reconhecida por convenção para os Culicinae (Clements, 1992). Segundo Rai & Hartberg (1975), para *A. aegypti* os pares menor e maior são metacêntricos enquanto o par mediano é submetacêntrico. A caracterização citológica das espécies *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* já foi feita amplamente por diferentes autores (Trager, 1937; Sutton, 1942; Kitzmiller & Clark, 1952; Gillham, 1957; McDonald & Rai, 1970; Motara & Rai, 1977; Rai, 1980; Marchi & Rai, 1986; Lima-Catelani & Bicudo, 1994; Sousa, 1998; entre outros). Apesar da detecção de inversões e translocações entre subgêneros de *Aedes*, nenhuma foi registrada em três espécies relacionadas do subgênero *Stegomyia* – *A. aegypti*, *A. albopictus* (Skuse, 1895) e *A. scutellaris* Walker- (Matthews & Munstermann, 1994).

Uma característica comum de algumas espécies de mosquitos é apresentar alterações cromossômicas muitas vezes associadas a mudanças ambientais e ao uso de inseticidas como foi registrado para *A. aegypti* e *Ochlerotatus fluviatilis* (Lutz, 1904) (Lima-Catelani & Bicudo, 1994, 1995; Puttaraju, 1994). No Brasil, pouco é conhecido da citogenética e do desenvolvimento de resistência aos inseticidas em *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Embora algum monitoramento de resistência seja feito para os transmissores de malária (*Anopheles*) este não é rotineiro, e para os Culicíneos (*Culex* e *Aedes*), quando prévio às aplicações de inseticidas, este é escasso. Em populações de *A. aegypti* já foram observadas variações no padrão de bandamento heterocromático indicando possíveis interações ambientais com inseticidas (Sousa & Bicudo, 1999). O conhecimento da variação intra-específica em vetores é importante para se esclarecer a transmissão, a epidemiologia da doença e o seu controle (Tabachnick & Black IV, 1995; Failloux *et al.*, 1999).

Os estudos citogenéticos de Diptera têm-se desenvolvido mais ainda por causa da presença de cromossomos politênicos (Swanson *et al.*, 1981; Sorsa, 1988; Zhimulev, 1996, 1997, 1999), os quais têm providenciado excelente material para os estudos estruturais e funcionais dos cromossomos, para caracterizar atividades temporárias dos genes, para avaliar rearranjos cromossômicos, para estabelecer a organização genômica, realizar estudos citotaxonômicos, e mais recentemente para mapeamento direto de seqüências de nucleotídeos por hibridação *in situ* (Kumar & Collins, 1994; Heyse *et al.*, 1996; Tomita *et al.*, 1996). A dificuldade de se trabalhar com estes cromossomos em mosquitos tem sido refletida na escassez de pesquisas citológicas de culicíneos comparada com aquelas de anofelinos. Cromossomos politênicos já foram descritos com facilidade para várias espécies em *Anopheles*, com dificuldade para algumas espécies de *Culex*, e com maiores problemas ainda para poucas de *Aedes* (Tewfik *et al.*, 1974; Kitzmiller, 1976; Sharma *et al.*, 1978; Severson, 1994; Zhimulev, 1996; Knudson *et al.*, 1996; Severson *et al.*, 2001).

Poucos são os estudos que apresentam mapas dos cromossomos politênicos das glândulas salivares larvais de *A. aegypti* (Sharma *et al.*, 1978) e *C. quinquefasciatus* (Kanda, 1970; Verma *et al.*, 1987). Recentemente, novas tentativas com os túbulos de Malpighi em adultos de *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus* contornaram algumas das dificuldades encontradas com as glândulas salivares (Achary, 1994; Zambetaki, 1998). Isto pode permitir maior aplicação de técnicas de citogenética molecular aos cromossomos politênicos no complexo *C. pipiens* e outras espécies de culicíneos. Alguns estudos moleculares registraram o uso de hibridação *in situ* em cromossomos de glândulas salivares para este complexo (Heyse *et al.*, 1996; Tomita *et al.*, 1996).

A citogenética molecular em mosquitos tem focalizado o uso de genes ribossomais como marcadores, por meio de hibridação *in situ* em cromossomos metafásicos (Kumar & Rai, 1990a; Marchi & Pili, 1994). Mais recentemente, a aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) nestes cromossomos foi usada na construção de um mapa físico de *A. aegypti* (Brown *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 1996; Brown & Knuson, 1997) e na integração deste com o mapa de ligamento genético (Brown *et al.*, 2001). O uso de marcadores moleculares é uma ferramenta na análise da competência vetorial (Severson, 1994). Desta forma, estudos vêm sendo realizados com os polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) no mapeamento cromossômico da susceptibilidade a parasitas (Severson *et al.*, 1994), na avaliação da variabilidade genética da refratariedade a parasitas (Yan *et al.*, 1997) e no mapeamento molecular dos genes de resistência aos inseticidas (Severson *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1998), entre outros.

A estrutura genética de espécies e populações de mosquitos influencia a transmissão de patógenos e parasitas aos humanos. Avanços técnicos na biologia molecular estão permitindo

abordar melhor a biologia, ecologia e evolução de vetores. Embora para culicíneos, resultados importantes estejam embasados na aplicação de técnicas com uso de cromossomos metafásicos, os cromossomos politênicos podem ser usados no mapeamento físico de genes. Os cromossomos politênicos, a princípio, apresentam grandes limitações, devido à dificuldade de obtenção de bons preparados, ocasionada pelo pouco espalhamento deles. Aparentemente, isto é causado por pareamento ectópico resultante de regiões de DNA altamente repetitivo (Severson *et al.*, 2001).

O fato dos cromossomos politênicos serem resistentes às influências químicas e/ou físicas das preparações em espécies de interesse médico e veterinário, limita seu uso em aproximações de biologia molecular, especificamente no mapeamento físico de genes e na comparação com mapas de ligamento genético.

### 3. Os Inseticidas

Os inseticidas têm significado ferramenta muito importante no controle de insetos vetores de doenças. Assim, embora importantes avanços continuem a serem feitos no desenvolvimento de medidas alternativas de controle (Beaty & Marquardt, 1996) os inseticidas ainda se mantêm como parte vital dos programas de controle integrado (Ferrari, 1996). Devido aos casos de resistência aos inseticidas registrados no mundo todo para as espécies *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* (Brown, 1986; Georghiou *et al.*, 1987; Mazzarri & Georghiou, 1995; Rawlins & Wan, 1995; Sames *et al.*, 1996, Suárez *et al.*, 1996; DeSilva *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 1997; Brogdon & McAllister, 1998; Morales & Suárez, 1998; Kasai *et al.*, 1998), é importante fazer um adequado monitoramento nas populações visando otimizar as campanhas de saúde. No Brasil também já existem registros de resistência a inseticidas em populações de *A. aegypti* (Andrade & Modolo, 1991; Dinardo-Miranda, 1994; Macoris *et al.*, 1995; Macoris *et al.*, 1999; Galardo *et al.*, 2000; Campos & Andrade, 2001) e em *C. quinquefasciatus* (Yébakima *et al.*, 1995; Bracco *et al.*, 1997, 1999; González *et al.*, 1999, Campos & Andrade, *submetido*).

Informação local a respeito da resistência é essencial para se fazer um controle efetivo dos mosquitos, especialmente no verão e/ou durante as epidemias. Esta informação e o conhecimento dos mecanismos de resistência são úteis na formulação das estratégias de controle. Assim, no caso do *A. aegypti* a borrifação de DDT pode ter reduzido a eficácia potencial dos piretróides em algumas populações, mesmo antes deles serem introduzidos (Severson *et al.*, 1997). Da mesma forma, níveis altos de resistência como consequência do uso residencial de piretróides, já foi observado na ausência de campanhas de controle com piretróides contra *C. quinquefasciatus* e sem correlação nenhuma com o uso agrícola (Chandre *et al.*, 1998).



No Brasil e na área de saúde pública, o uso intensivo de inseticidas tem pelo menos seis décadas. Monitoramento da eficiência dos inseticidas quase nunca foi feito antes de uma aplicação maciça, mesmo que na verdade, precisasse ser feito como rotina dentro dos planos de controle de vetores. Recentemente foi reconhecida a resistência a inseticidas químicos em *Aedes aegypti* nos Estados do Rio de Janeiro (Galardo *et al.*, 2000) e Espírito Santo, além da já registrada em Goiás e São Paulo (Macoris *et al.*, 1995; Macoris *et al.*, 1999; Campos & Andrade, 2001). A situação em outros Estados não é conhecida publicamente. Inclusive resistência ao *Bacillus sphaericus* já foi desenvolvida por *Culex quinquefasciatus* em Recife (Silva-Filha *et al.*, 1995) onde esta espécie transmite a *Wuchereria bancrofti*, agente causante da elefantíase. Desta forma, produtos em uso e outros que podem vir a ser usados como alternativos nos programas de controle devem obviamente ser avaliados.

#### 4. Resistência

A resistência aos inseticidas é um problema na saúde pública que vêm sendo registrado desde a década de cinquenta (Andrade, 1989). Genética da resistência ao DDT, ao Dieldrin, aos organofosforados e aos carbamatos para as espécies de nosso interesse já foi abordada em amplas revisões (Georghiou, 1969; Brown, 1986). Molecularmente, os genes de resistência aos inseticidas se espalham entre e dentro das populações por processos de mutação, que introduzem novos alelos bem adaptados aos inseticidas, de migração, que permitem aos genes nos mosquitos se deslocarem geograficamente e de seleção, que é o fator que escolhe entre os diferentes alelos aqueles melhor adaptados dentro do contexto ecológico e geográfico (Berge *et al.*, 1996). Nos insetos são descritos dois mecanismos principais de resistência aos inseticidas: modificação no sítio alvo e alteração na taxa de detoxificação (Hemingway & Karunaratne, 1998). Os principais alvos moleculares dos inseticidas são: acetilcolinesterases para organofosforados e carbamatos, canais de Na<sup>+</sup> voltagem-dependentes para piretróides e DDT, e, ainda receptores do ácido gama butírico (GABA) para ciclodienos. Já as principais enzimas de metabolização dos inseticidas em invertebrados são: esterases, monooxidasas (MFO) do citocromo P450 e glutathione S-transferases (GST) (Berge *et al.*, 1996).

Na década de 90 com ajuda da bioquímica e da biologia molecular, genes de resistência aos inseticidas foram localizados nos cromossomos de mosquitos. Para o complexo *C. pipiens*: o gene de amplificação da esterase não específica B, conferindo resistência metabólica aos organofosforados foi localizado no cromossomo "2" (Heyse *et al.*, 1996; Tomita *et al.*, 1996). O gene alvo de acetilcolinesterase insensitiva aos organofosforados e carbamatos (Malcolm *et al.*, 1998) localizado no grupo de ligação 3 (cromossomo mediano 2 segundo Heyse *et al.*, 1996 *apud* Malcolm *et al.*, 1998) do cromossomo mediano 3 (Kumar & Rai, 1990a). Algumas esterases (EstB1) foram associadas também com resistência a piretróides em *C. quinquefasciatus* (Rodriguez *et al.*, 1997).

Para *A. aegypti* foram registrados: o gene “*para*”, conferindo resistência ao DDT e aos piretróides, o gene *Dld* ou *Rdl*, conferindo resistência aos ciclodienos, os genes de esterases específicas e não específicas, de oxidases de função mista (MFOs) e de acetilcolinesterase conferindo resistência aos carbamatos e organofosforados (Mazzarri & Georghiou, 1995; Ferguson *et al.*, 1996; Vaughan *et al.*, 1997). Resistência metabólica ao DDT foi localizada no cromossomo 2 (o maior) como um único loco principal que regula a expressão da glutathione S-transferase (Grant & Hammock, 1989; Grant & Hammock, 1992; Severson *et al.*, 1997). Resistência alvo ao DDT e piretróides tem sido localizada no cromossomo 3 (gene *para*), a ciclodienos no cromossomo 2 (gene *Rdl*) (Thompson *et al.*, 1993; Severson *et al.*, 1997) e a organofosforados e carbamatos indiretamente no cromossomo 1 (gene *Ace*) (Vaughan *et al.*, 1997).

Resistência a inseticidas é um problema em todos os grupos de insetos que servem como vetores de doenças emergentes, e embora os mecanismos envolvidos sejam similares nos *táxons*, cada problema de resistência é potencialmente único e pode envolver um padrão complexo de focos de resistência (Brogdon & McAllister, 1998; Pasteur *et al.*, 2001; Campos & Andrade, 2002). Assim, há evidências de que os elementos transponíveis (TE) responsáveis em parte pela variabilidade e biodiversidade das populações de insetos (Salvado *et al.*, 1994) possam estar implicados como iniciadores da resistência a inseticidas (Wilson, 1993). Desta forma foi sugerido seu papel na evolução do genoma hospedeiro, e como fonte de diversidade genética permitindo resposta a mudanças ambientais (Kidwell & Lisch, 2000). Assim, é necessário o monitoramento das populações por meio de bioensaios, estudos citológicos, bioquímicos e moleculares.

## 5. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo a análise citológica inter e intrapopulacional de algumas populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, visando ampliar os estudos geográficos destas espécies e avaliar a associação dos inseticidas com a presença de marcadores cromossômicos. O esforço do presente trabalho objetiva contornar as limitações até agora existentes na obtenção de lâminas adequadas de cromossomos politênicos em *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

O trabalho objetiva especificamente:

- 1.- Avaliação de amostras populacionais de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* por meio de bioensaios de susceptibilidade a inseticidas organofosforados e piretróides.
- 2.- Elaboração de mapas dos cromossomos politênicos de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.
- 3.- Identificação de marcadores cromossômicos relacionados com a resistência, e
- 4.- Adicionalmente, elaboração de um protocolo sobre a avaliação da susceptibilidade a inseticidas por meio de Bioensaios.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Material Biológico

Larvas de 3º e 4º estágio, pupas e adultos das espécies *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* foram analisadas. A identificação das espécies foi feita segundo as chaves e as descrições de Forattini (1964), Sirivanakarn & White (1978) e Consoli & Lourenço de Oliveira (1994). Colônias de campo e colônias padrão foram mantidas em sala de criação: Aea-Unicamp/97 e Rockefeller/57 para *A. aegypti*, UNI-R1/99, UNI-R2/2001 e IAL-S (Instituto Adolfo Lutz, Iguape, SP-83) para *C. quinquefasciatus*. A criação de *A. aegypti* no Departamento de Zoologia foi iniciada com indivíduos coletados no Campus Universitário entre setembro e novembro de 1997, com o objetivo de monitorar esta espécie que até 1996 não estava presente no Campus (relatórios internos do grupo da Vigilância Entomológica do Dengue-VED, Departamento de Zoologia, Unicamp) e que não era transmissora da dengue na região de Campinas. As condições da criação foram: temperatura de  $29\pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $70\pm 10\%$ .

### 2. Coletas

As coletas de *A. aegypti* (Aea) e *C. quinquefasciatus* (Cxq) foram feitas em Campinas, SP em áreas onde ainda não foi feito controle químico (Aea-Campus, Aea-Lab), e onde se tem utilizado frequentemente o controle com inseticidas químicos, como nas cidades de Campo Grande, MS (Aea-UFMS, Aea-cemitério, UFMS-R) e Cuiabá, MT (Aea-Cuiabá, Cuiabá-R) no Brasil, e em Palmira, *Valle del Cauca* na Colômbia (Aea-Palmira; Cxq-Palmira). Também foram utilizadas amostras das colônias de laboratório do *Instituto Nacional de Salud* (INS), Santafé de Bogotá - Colômbia (Aea-INS; Cxq-INS). Quando possível, as larvas e pupas foram trazidas vivas ao laboratório e/ou fixadas em Carnoy modificado (Etanol: Ácido Acético, 3:1) ou etanol 70% e mantidas em "freezer" ( $-15$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) para análise citológica. Os adultos trazidos vivos, foram fixados em álcool 70% e conservados em "freezer" quando necessário até o processamento das amostras.

### 3. Provas de Susceptibilidade aos Inseticidas

Bioensaios com larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* foram realizados em Campinas, SP (linhagens Aea-Unicamp, Aea-FEF, UNI-R1 e UNI-R2), Campo Grande, MS (linhagens Aea-UFMS e UFMS-R) e Cuiabá, MT (linhagens Aea-Cuiabá e Cuiabá-R) para se determinar o nível de susceptibilidade das populações aos produtos usados no seu controle (Brown, 1986). Em cada bioensaio utilizou-se no mínimo 300 larvas para cada produto (pelo menos quatro concentrações com três repetições de no mínimo 20 larvas por concentração). Duas linhagens padrão susceptíveis – Rockefeller de *A. aegypti* e IAL de *C. quinquefasciatus* - foram usadas como controles (Cf. protocolo Anexo 5). Os bioensaios foram feitos com os organofosforados: Temephos (500E, Larvin 1G e Fersol 1G) e Fenitrothion 40WP, com o carbamato Propoxur 20CE, e com os piretróides: Cipermetrina

25CE, Ciflutrina 5CE e  $\beta$ -Ciflutrina 1,25SC. A partir de uma dissolução dos produtos comerciais para uma solução mãe 50 ou 100 partes por milhão de ingrediente ativo (ppm) foram elaboradas as concentrações a serem avaliadas (Campos & Andrade, 2001 – Anexo 1; Campos & Andrade, *submetido* – Anexo 2). A mortalidade final foi corrigida quando necessário (acima do 5% no controle) pela fórmula de Abbott (1925). Os valores das respostas às concentrações foram submetidas à análise *probit* usando-se o programa POLO-PC (Russell *et al.*, 1977; LeOra Software, 1987), de forma a calcular as concentrações letais (CL). As razões de resistência (RR) foram estimadas com base nas respostas das linhagens padrão (Campos & Andrade, 2001; Campos & Andrade, *submetido*).

#### 4. Técnicas Citológicas

Para as duas espécies, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, as lâminas foram preparadas baseando-se em vários protocolos (French *et al.*, 1962; Jost, 1971; Motara & Rai, 1977; Marchi & Rai, 1986; Rao & Rai, 1987a; Imai *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 1995; Heyse *et al.*, 1996) para se padronizar as técnicas. Utilizando-se larvas, pupas e adultos (Tabela 1 a 5) foram feitas lâminas para obtenção dos cromossomos de gânglios cerebrais, glândulas salivares, ovários, testículos e/ou túbulos de Malpighi, pela técnica convencional de coloração com Orceína Lacto-Acética (OLA) (French *et al.*, 1962; Jost, 1971) sem pré tratamento com colchicina e com algumas modificações das técnicas de Achary (1994), Heyse *et al.* (1996), della Torre (1997) e Zambetaki *et al.* (1998).

Os melhores resultados foram obtidos com túbulos de Malpighi de pupas fêmeas grandes com idade de  $2 \pm 2$  h /  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, a partir de larvas criadas em baixas temperaturas ( $18-24^\circ\text{C}$ ), bem alimentadas com levedo de cerveja, e com pouco estresse por alta densidade populacional ( $\sim 2$  ml de água e  $0,3\text{ cm}^2$  de superfície por larva). Lâminas adequadas também foram obtidas com imagos fêmeas e larvas de 4º estágio avançado. A dissecação do tecido foi feita em solução salina 0,85-0,9% ou solução Ringer fria ( $2-4^\circ\text{C}$ ), isolamento dos túbulos em banho adicional desta solução, hipotônica ou não de 2-10 min em água destilada ou de torneira fria ( $2-4^\circ\text{C}$ ), fixação rápida (1-3 min) em Carnoy fresco frio 3:1 (etanol absoluto: ácido acético glacial), banho adicional ou não de ácido acético frio 60-100% 2-40 min, coloração com OLA 1-2% 2-3 min, adição de ácido acético glacial - ácido láctico puro frio (0,45:0,55) por 20 h no mínimo (até 10 dias) a  $0-4^\circ\text{C}$ , adição de ác. acético frio 60-100% com dissecação cuidadosa do tecido até isolamento dos núcleos retirando a maior parte dos componentes citoplasmáticos antes do esmagamento suave e delicado e vários banhos de ác. acético 60% na lâmina permitiram espalhamento dos cromossomos com análise completa do padrão de bandas.

#### 4.1. Material Biológico Trabalhado

Utilizando-se um total de 2084 indivíduos, trabalhou-se com as fases de larva, pupa e imago de *Aedes aegypti* (1383 para túbulos de Malpighi) e *Culex quinquefasciatus* (588 para túbulos de Malpighi), Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5.

Tabela 1. Relação do Material Biológico trabalhado no primeiro semestre de 1998.

| Coletas<br>Local (Coleta#) / data | Espécie                    | Número de<br>Espécimes (lâminas) | Fase   |
|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------|
| Aea-Unicamp C1 / 30-04-98         | <i>A. aegypti</i>          | 62                               | Larvas |
| Aea-Unicamp C1a / 1-07-98         | <i>A. aegypti</i>          | 4 (8)                            | Pupas  |
| Aea-Unicamp C1b / 15-07-98        | <i>A. aegypti</i>          | 10 (20)                          | Pupas  |
| Aea-UFMS C2 / 18-05-98            | <i>A. aegypti</i>          | 2 (4)                            | Imagos |
| UFMS-R C3 / 18-05-98              | <i>C. quinquefasciatus</i> | 44                               | Larvas |

Unicamp, Depto. Zoologia Campinas, SP. UFMS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

Tabela 2. Relação do Material Biológico utilizado, II-1998 / I-1999.

| Coletas<br>Local (C#) / data | Espécie                    | Número de<br>Espécimes (lâminas) | Fase   |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------|
| Aea-Unicamp C1a / 30-04-98   | <i>A. aegypti</i>          | 4 (8)                            | Larvas |
| Aea-Unicamp C1c / 13-08-98   | <i>A. aegypti</i>          | 29 (57)                          | Pupas  |
| Aea-Unicamp C1d / 30-09-98   | <i>A. aegypti</i>          | 4 (6)                            | Pupas  |
|                              | <i>A. aegypti</i>          | 1 (2)                            | Larva  |
| Aea-Unicamp C1e / 31-03-99   | <i>A. aegypti</i>          | 2 (2)                            | Imagos |
| Aea-Unicamp C1f / 22-04-99   | <i>A. aegypti</i>          | 4 (6)                            | Larvas |
|                              | <i>A. aegypti</i>          | 7 (7)                            | Pupas  |
|                              | <i>A. aegypti</i>          | 2 (3)                            | Imago  |
| Aea-Unicamp C1g / 2-06-99    | <i>A. aegypti</i>          | 1 (2)                            | Larva  |
|                              | <i>A. aegypti</i>          | 27 (25)                          | Pupas  |
|                              | <i>A. aegypti</i>          | 16 (16)                          | Imagos |
| Aea-Unicamp C1h / 2-08-99    | <i>A. aegypti</i>          | 5 (1)                            | Pupas  |
|                              | <i>A. aegypti</i>          | 1 (1)                            | Imago  |
| UNI-R1 C10 / 9-06-99         | <i>C. quinquefasciatus</i> | 5 (5)                            | Imagos |
| UNI-R1 C11 / 7-07-99         | <i>C. quinquefasciatus</i> | 57 (36)                          | Pupas  |
|                              | <i>C. quinquefasciatus</i> | 3 (3)                            | Imagos |
| UFMS-R C3 / 18-05-98         | <i>C. quinquefasciatus</i> | 2 (4)                            | Imagos |
| C3,2 / 25-05-98              | <i>C. quinquefasciatus</i> | 1 (1)                            | Pupa   |
| Aea-UFMS C8 / 12-03-99       | <i>A. aegypti</i>          | 4 (12)                           | Larvas |
| Aea-UFMS C8 / 12-03-99       | <i>A. aegypti</i>          | 7 (7)                            | Imagos |

|                              |                            |         |        |
|------------------------------|----------------------------|---------|--------|
| Aea-UFMS C8 / 12-03-99       | <i>A. aegypti</i>          | 1 (2)   | Pupa   |
| Aea-cemitério C9 / 14-03-99  | <i>A. aegypti</i>          | 4 (7)   | Imagos |
| C9 / 14-03-99                | <i>A. aegypti</i>          | 4 (12)  | Larvas |
| Cxq-Palmira C5 / 16-01-99    | <i>C. quinquefasciatus</i> | 9 (27)  | Larvas |
| C5 / 16-01-99                | <i>A. aegypti</i>          | 1 (3)   | Larva  |
| Aea-INS-Bogotá C6 / 22-01-99 | <i>A. aegypti</i>          | 22 (22) | Pupas  |

Cemitério, Campo Grande, MS. INS, Instituto Nacional de Saúde, Colômbia; Palmira, Valle-Colômbia.

Tabela 3. Relação do Material Biológico utilizado, II-1999 / I-2000.

| Coletas<br>Local (C#) / data               | Espécie                                                  | Número de<br>Espécimes (lâminas) | Fase            |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------|
| Aea-Unicamp C1i / 22-30, 11-1999           | <i>A. aegypti</i>                                        | 21 (21)<br>1 (1)                 | Pupas<br>Imago  |
| Aea-Unicamp C1i / 13-22, 12-1999           | <i>A. aegypti</i>                                        | 7 (11)<br>14 (14)                | Larvas<br>Pupas |
| Aea-Unicamp C1j / 14-18, 01-2000           | <i>A. aegypti</i>                                        | 13 (13)<br>2 (2)                 | Pupas<br>Imagos |
| UNI-R1 C12a / 14-22, 01-2000               | <i>C. quinquefasciatus</i>                               | 22 (22)                          | Pupas           |
| UNI-R1 C12b / 22-26, 03-2000               | <i>C. quinquefasciatus</i>                               | 5 (5)<br>1 (1)                   | Pupas<br>Imago  |
| UNI-R1 C12c / 9-31, 05-2000                | <i>C. quinquefasciatus</i>                               | 9 (9)<br>34 (34)                 | Imagos<br>Pupas |
| UNI-R1 C12c / 1-2, 06-2000                 | <i>C. quinquefasciatus</i>                               | 10 (10)                          | Pupas           |
| UNI-R1 C12d / 10-27, 06-2000               | <i>C. quinquefasciatus</i>                               | 9 (9)<br>9 (9)                   | Pupas<br>Imagos |
| UNI-R1 C12d,e 06 a 07-2000                 | <i>C. quinquefasciatus</i><br><i>C. quinquefasciatus</i> | 54 (54)<br>1 (1)                 | Pupas<br>Imago  |
| UFMS-R C3,2 / 25-05-98 (Jan-2000, lâminas) | <i>C. quinquefasciatus</i>                               | 13 (13)                          | Pupas           |

Tabela 4. Relação do Material Biológico utilizado no período: setembro 2000 / agosto 2001.

| Coletas<br>Local (C#) / data | Espécie                                         | Número de<br>Espécimes (lâminas) | Fase             |
|------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------|------------------|
| Palmira C5 / 16-01-1999      | <i>A. aegypti</i><br><i>C. quinquefasciatus</i> | 10 (13)<br>5 (7)                 | Larvas<br>Larvas |
| Palmira C14 / 16-11-2000     | <i>A. aegypti</i><br><i>A. aegypti</i>          | 22 (24)<br>19 (19)               | Larvas<br>Pupas  |

|                              |                            |         |        |
|------------------------------|----------------------------|---------|--------|
|                              | <i>C. quinquefasciatus</i> | 11 (21) | Larvas |
|                              | <i>C. quinquefasciatus</i> | 5 (5)   | Pupas  |
| Cxq-INS-Bogotá C6 / 22-01-99 | <i>C. quinquefasciatus</i> | 10 (20) | Larvas |
|                              | <i>C. quinquefasciatus</i> | 10 (10) | Imagos |
| Cuiabá-R C13 / 4 09-2000     | <i>C. quinquefasciatus</i> | 22 (27) | Larvas |
|                              | <i>C. quinquefasciatus</i> | 14 (14) | Pupas  |
| UFMS-R C3,2 / 25-05-98       | <i>C. quinquefasciatus</i> | 20 (40) | Larvas |
|                              | <i>C. quinquefasciatus</i> | 6 (6)   | Pupas  |
| UNI-R2 "C15" / 03 a 08-2001  | <i>C. quinquefasciatus</i> | 9 (15)  | Larvas |
|                              | <i>C. quinquefasciatus</i> | 94 (94) | Pupas  |
|                              | <i>C. quinquefasciatus</i> | 80 (86) | Imagos |
| Rockefeller / 06 a 08-2001   | <i>A. aegypti</i>          | 98 (99) | Pupas  |
|                              | <i>A. aegypti</i>          | 5 (5)   | Imagos |

Tabela 5. Relação do Material Biológico utilizado no período: outubro 2001 / julho 2002.

| <b>Coletas<br/>Local (C#) / data</b> | <b>Espécie</b>             | <b>Número de<br/>Espécimes (lâminas)</b> | <b>Fase</b> |
|--------------------------------------|----------------------------|------------------------------------------|-------------|
| Rockefeller / 10 a 12-2001           | <i>A. aegypti</i>          | 263 (193)                                | Pupas       |
|                                      | <i>A. aegypti</i>          | 8 (9)                                    | Larvas      |
|                                      | <i>A. aegypti</i>          | 43 (15)                                  | Imagos      |
| IAL-S / 12-2001                      | <i>C. quinquefasciatus</i> | 24 (17)                                  | Pupas       |
|                                      | <i>C. quinquefasciatus</i> | 1 (1)                                    | Imagos      |
| Rockefeller / 01 a 05-2002           | <i>A. aegypti</i>          | 504 (249)                                | Pupas       |
|                                      | <i>A. aegypti</i>          | 3 (3)                                    | Larvas      |
| Aea-Unicamp / 01 a 04-2002           | <i>A. aegypti</i>          | 92 (47)                                  | Pupas       |
| Aea-Lab C16 / 01 a 03-2002           | <i>A. aegypti</i>          | 75 (46)                                  | Pupas       |
| Aea-Campus C18/ 04 a 05-2002         | <i>A. aegypti</i>          | 28 (12)                                  | Pupas       |
| IAL-S / 01 a 05-2002                 | <i>C. quinquefasciatus</i> | 32 (18)                                  | Pupas       |
| Cxq-Palmira C17 / 24-03-2002         | <i>C. quinquefasciatus</i> | 2 (2)                                    | Larvas      |

## 5. Técnicas Moleculares

5.1. Hibridação *in situ* para localização do DNAr foi feita com a sonda pDm 238, recombinante contendo um inserto de uma unidade completa de DNAr de *Drosophila melanogaster* Meigen. Para esta técnica foram seguidos os protocolos de Viegas-Péquignot (1992) e Boehringer Mannheim (1992).

## 6. Documentação

As melhores lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio marca Olympus de contraste de fase e fluorescência, com capacidade para captura de imagem digital (câmara de vídeo CCD), utilizando-se filme Kodak HQ ASA 25 e Ektachrome ASA 100. As cópias feitas em papel plastificado Kodak-F3 e os diapositivos foram escaneados e armazenados em arquivos digitais.

## III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Avaliações da Susceptibilidade aos Inseticidas (Tabela 6)

Nas provas de avaliação da susceptibilidade aos organofosforados, carbamato e piretróides a linhagem Aea-Unicamp de *A. aegypti* apresentou 100% de mortalidade à concentração diagnóstico C.D.=0,08 ppm de Fenitrothion, e C.D.=0,01 ppm de Cipermetrina (Campos & Andrade, 2001 – Anexo 1). Para o organofosforado Temephos foi registrada inicialmente resistência nesta linhagem à C.D.=0,04 ppm (97,3% de mortalidade) e à concentração de 0,0125 ppm (75,5% de mortalidade) (Campos *et al.*, 1998; Campos & Andrade, 2001 - Anexo 1; Tabela 6). O que pôde ser ratificado quando comparados estes resultados com a C.D.=0,012 ppm (WHO, 1992), com a concentração 95% letal  $CL_{95}$ =0,011 ppm de uma população susceptível (Mazzarri & Georgiou, 1995) e com os testes de monitoramento para resistência feitos pela Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN com uma população de Campinas, 96,5% de mortalidade para uma C.D.=0,012 ppm (Takaku *et al.*, 1998).

Já em 1987 em Campinas, avaliando o tempo letal mediano ( $LT_{50}$ ) em larvas de coletas realizadas na cidade (Andrade & Modolo, 1991) encontraram mortalidade inferior a 16% para um período de exposição de duas horas com concentrações de 0,025 e de 0,05 ppm de Temephos. No presente trabalho em 1998, pelo teste de concentração múltipla verificou-se uma mortalidade de 75,5% a uma concentração de 0,0125 ppm e 96,4% para 0,0625 ppm no mesmo período de exposição, mortalidade maior com concentrações menores ou pouco maiores (dados não apresentados). Isto mostra mudanças nas respostas no tempo e no espaço para cada população. Macoris *et al.* (1995) também registraram mudanças na susceptibilidade ao Temephos, encontrando mortalidade de 100, 98,5 e 91,45% para a concentração diagnóstico de 0,02 ppm em populações de Bauru, Marília (SP) e Goiânia, (GO) e mortalidade de 96,3, 97,9 e 57,1% para a C.D.=0,01 ppm



respectivamente. Em avaliações recentes foi verificada susceptibilidade para a linhagem de laboratório Aea-Unicamp e na linhagem de campo Aea-FEF (Campos & Andrade, *submetido*).

Para as populações de *A. aegypti* de Campo Grande (Aea-UFMS, 1998 e 1999) foi registrada susceptibilidade à Cipermetrina (C.D.=0,01 ppm) e ao Temephos (C.D.=0,04 ppm). Em Cuiabá a linhagem Aea-Cuiabá foi susceptível ao Temephos (C.D.=0,012 e 0,024 ppm). Já para *C. quinquefasciatus* das mesmas localidades no testes diagnósticos de Temephos (C.D.=0,04 e 0,012 ppm) foi registrada resistência (Campos & Andrade, *submetido* – Anexo 2). A dose diagnóstico usada em Campo Grande foi 20 vezes aquela recomendada pela OMS (WHO, 1992). Quando comparados os resultados de Cuiabá com os obtidos para a linhagem padrão de *C. quinquefasciatus* (IAL-S) em Campinas, *a priori* encontramos uma  $RR_{95} \cong 4$ . Para larvas de colônia desta espécie em Campinas (linhagem UNI-R2) foi estabelecida uma  $CL_{50}=0,0076$  ppm i.a. e uma  $CL_{95}=0,0144$  ppm i.a. de Temephos. Com base nos resultados da linhagem-padrão IAL, as razões de resistência foram  $RR_{50}=6,36$  e  $RR_{95}=4,94$  (Campos & Andrade, *submetido* – Anexo 2).

As avaliações da susceptibilidade para três piretróides (Cipermetrina, Ciflutrina e  $\beta$ -Ciflutrina) em larvas da linhagem Aea-Unicamp mostraram razões de resistência menores de 3 pela  $CL_{50}$  ( $RR_{50}$ ) e para dois dos piretróides (Cipermetrina e  $\beta$ -Ciflutrina) a resistência ( $RR_{95}$ ) foi menor de 4 quando comparadas com a linhagem padrão Rockefeller (Campos & Andrade, 2001 – Anexo 1). Fernández *et al.* (1999) registraram razão de resistência de 4 ( $RR_{50}$ ) em larvas de *A. aegypti* para a Ciflutrina na Venezuela quando comparadas as respostas com aquelas da linhagem padrão Rockefeller, e indicaram aumento das esterases como mecanismo envolvido na resistência aos piretróides na linhagem avaliada. Embora estes inseticidas químicos possam ser usados no controle dos mosquitos seu uso deve ser monitorado. Segundo Macoris (*com. pessoal*) quando a SUCEN começou, recentemente, a fazer testes de susceptibilidade ao Temephos em *A. aegypti*, notou que material vindo dos chamados "pontos estratégicos" (borracharias e ferro velho) como os indicados em Andrade & Modolo, 1991, mostrara de fato, diferentes níveis de resistência. Estes níveis, típicos de uma população localmente adaptada e que na verdade, não se observava quando os testes eram feitos para um "pool" de mosquitos (larvas) vindos de vários pontos da cidade, não freqüentemente expostos ao inseticida. A resistência aos piretróides pode ser consequência de prévia exposição destes mosquitos a inseticidas clorados e piretróides de uso agrícola e/ou domiciliar. É importante notar que a colônia foi mantida sem pressão de seleção por dois anos e meio (na data dos testes).

Com larvas de *C. quinquefasciatus* provenientes de coletas realizadas na Unicamp (linhagem UNI-R1) foi feito um teste com Cipermetrina (C.D.=0,0096 ppm) apresentando mortalidade de 11%, o que pode estar representando resistência desta população ao produto se comparada com dados de

populações susceptíveis ( $DL_{50}=0,0016$  ppm, Bisset *et al.*, 1998;  $DL_{50}=0,0008$  ppm, González *et al.*, 1999) mesmo com uma perda de 30% da potência do produto como foi verificado com a linhagem Aae-Unicamp. Um problema que pode acontecer no decorrer dos experimentos com concentrações baixas é a perda do inseticida químico, que tem ocorrido com concentrações menores de 0,001 mg/l de Cipermetrina com perdas de até 30% em um período de exposição de 24 horas (Muirhead-Thomson, 1987) mas isto não se aplica no presente trabalho.

Avaliações preliminares com Ciflutrina em *C. quinquefasciatus* (linhagem UNI-R2) indicaram resistência ao produto (47% de mortalidade à C.D.=0,03 ppm) quando comparado com uma linhagem padrão Rockefeller (Tabela 6), uma vez que em geral a sensibilidade aos inseticidas em linhagens padrão é maior para *C. quinquefasciatus* do que para *A. aegypti* (Cutkomp & Subramanyam, 1986; WHO, 1992). As  $CL_{50}$  da Ciflutrina e da Cipermetrina em *A. aegypti* (Campos & Andrade, 2001 – Anexo 1) e de Cipermetrina e outros piretróides em linhagens parentais e colônias resistentes de *C. quinquefasciatus* (Bisset *et al.*, 1998; González *et al.*, 1999) são menores que as concentrações avaliadas contra as linhagens UNI-R1 e UNI-R2. Reyes-Lugo & Neus (2000) fizeram provas de susceptibilidade para este inseticida em *C. quinquefasciatus* da Venezuela, sem registro de resistência.

Embora a resistência a concentrações de produtos organofosforados como Malathion, Fenthion, Fenitrothion (sumithion), Chlorpyrifos e Temephos ou piretróides como Permetrina tenha sido registrada em espécies como *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* no Caribe e nas Américas em geral (Brown, 1986; Rawlins & Wan, 1995; Mazzarri & Georghiou, 1995; Georghiou *et al.*, 1997) estas concentrações (ppm de ingrediente ativo i.a.) podem mudar em função da espécie, da população e da formulação do produto usado mesmo em condições padrão de temperatura, alimentação e estágio avaliados (Brown, 1986; Helson & Surgeoner, 1986; Rawlins & Wan, 1995; Mazzarri & Georghiou, 1995). Desta forma quando populações de campo são avaliadas e comparadas com populações padrão, as mudanças na resposta aos inseticidas ( $CL_{50}$  e  $CL_{95}$ ) da ordem de até três vezes nas razões de resistência (RR) podem ser consideradas como tolerância; de 3 a 5 vezes, resistência baixa; de 5 a 10, moderada; de 10 a 20, média e acima de 20, uma resistência alta.

Tabela 6. Relação de locais de coleta, época, espécies e resultados das avaliações da susceptibilidade a inseticidas empregados no controle de mosquitos.

| Local / Data            | Espécie e estágio larval          | Tipo de ensaio <sup>1</sup> | Inseticida <sup>2</sup> | Concentração ppm i.a. (mg/l) | % Mortalidade final média (DP) |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Unicamp / abril-98      | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°         | C.D.                        | Temephos 500 E          | 0,04                         | 97,14 (2,86)                   |
|                         | 3° e 4°                           | C.M.                        | Temephos 500 E          | 0,0125 a 1,5625              | 75,46 (20,21) – 100            |
| UFMS /maio-98           | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°         | C.D.                        | Temephos 500 E          | 0,04                         | 100                            |
| UFMS-R /maio-98         | <i>C.quinquefasciatus</i> 3° e 4° | C.D. 2X                     | Temephos 500 E          | 0,04 e 0,45                  | 88,09(14,87) e 93,71(5,55)     |
| Unicamp /agosto-98      | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°         | C.D.                        | Fenitrothion 40 WP      | 0,08                         | 100                            |
|                         | 3° e 4°                           | C.M.                        | Cipermetrin a 25 CE     | 0,002 a 0,01                 | 14,71 (16,15) – 100            |
| UFMS /março-99          | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°         | C.D.                        | Cipermetrin a 25 CE     | 0,01                         | 100                            |
| Unicamp /julho-99       | <i>C.quinquefasciatus</i> 4°      | Teste*                      | Cipermetrin a 25 CE     | 0,0096                       | 11,17 (6,26)                   |
| Unicamp /agosto-99      | <i>A. aegypti</i> 4°              | Teste*                      | Cipermetrin a 25 CE     | 0,002 e 0,01                 | 20 (12) – 67 (16)              |
| Unicamp /dezem-99       | <i>A. aegypti</i> 4°              | C.M.                        | Cipermetrin a 25 CE     | 0,002 a 0,008                | 8,92 (2,6) – 81,79 (8,95)      |
| Unicamp /janeiro-00     | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°         | C.M.                        | Cipermetrin a 25 CE     | 0,001 e 0,016                | 0,38 (0,54) –98,96 (1,03)      |
| Unicamp /março-00       | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°         | C.M.                        | Cipermetrin a 25 CE     | 0,001 a 0,01                 | 16,23 (3,85) – 99,12 (1,22)    |
| Rockefeller /março-00   | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°         | C.M.                        | Cipermetrin a 25 CE     | 0,00025 a 0,004              | 10,43 (5,69) – 100             |
| Unicamp /março-00       | <i>A. aegypti</i> 3°              | C.M.                        | Propoxur 20 CE          | 0,4975 a 13,79               | 2,76 (3,28) – 100              |
| Rockefeller /março-00   | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°         | C.M.                        | Propoxur 20 CE          | 0,4975 a 3,846               | 11,11 (4,13) – 99,17 (1,86)    |
| Unicamp /6-abril-00     | <i>A. aegypti</i> 4°              | C.M.                        | Ciflutrina 5 CE         | 0,001 a 0,008                | 8,1 (5,78) – 99,41 (1,31)      |
| Rockefeller /6-abril-00 | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°         | C.M.                        | Ciflutrina 5 CE         | 0,0005 a 0,004               | 0,53 (1,18) – 100              |
| Unicamp 24-abril-00     | <i>A. aegypti</i> 4°              | C.M.                        | β-Ciflutrina 1,25 SC    | 0,0005 a 0,016               | 0,57 (1,28) – 91,50 (4,25)     |

|                            |                              |      |                         |                |                               |
|----------------------------|------------------------------|------|-------------------------|----------------|-------------------------------|
| Rockefeller<br>24-abril-00 | <i>A. aegypti</i><br>3° e 4° | C.M. | β-Ciflutrina<br>1,25 SC | 0,0005 a 0,008 | 4,36 (1,62) – 96,96<br>(2,76) |
|----------------------------|------------------------------|------|-------------------------|----------------|-------------------------------|

<sup>†</sup> C.D.= Concentração Diagnóstico, C.M.= Concentrações Múltiplas. (DP ) desvio padrão. \* Teste de potência.

Tabela 6 (cont.). Relação de locais de coleta, época, espécies e resultados das avaliações da susceptibilidade a inseticidas empregados no controle de mosquitos.

| Amostra<br>/ Data          | Espécie e<br>Estágio larval                           | Tipo de<br>ensaio | Inseticida         | Concentração<br>ppm i.a. (mg/l) | % Mortalidade<br>final média (DP) |
|----------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Cuiabá<br>/4-set-2000      | <i>C. quinquefasciatus</i><br><i>A. aegypti</i><br>3° | C.D.              | Temephos<br>1 G    | 0,012, 0,024 e<br>0,06          | 95 a 100                          |
| Rockefeller<br>/4-set-2000 | <i>A. aegypti</i><br>3°                               | C.D.              | Temephos<br>1 G    | 0,012 e 0,024                   | 100                               |
| Unicamp<br>/17-mar-01      | <i>C. quinquefasciatus</i><br>4°                      | C.M.              | Ciflutrina 5<br>CE | 0,002 a 0,016                   | 0,42 (0,8) a 27,4<br>(12,3)       |
| Rockefeller<br>/17-mar-01  | <i>A. aegypti</i><br>3° e 4°                          | C.M.              | Ciflutrina 5<br>CE | 0,0005 a 0,004                  | 4,3 (0,9) a 96,1<br>(3,9)         |
| Unicamp<br>/24-mar-01      | <i>C. quinquefasciatus</i><br>4°                      | C.M.              | Ciflutrina 5<br>CE | 0,012 a 0,03                    | 12,3 (5,9) a 47,5<br>(9,6)        |
| Rockefeller<br>24-mar-01   | <i>A. aegypti</i><br>3° e 4°                          | C.M.              | Ciflutrina 5<br>CE | 0,00075 a 0,006                 | 12,8 (7,9) a 100                  |
| UNI-R2<br>/6-jun-02        | <i>C. quinquefasciatus</i><br>3° e 4°                 | C.M.              | Temephos<br>1 G    | 0,004 a 0,016                   | 5 (5,8) a 100                     |
| IAL-S<br>6-jun-02          | <i>C. quinquefasciatus</i><br>3° e 4°                 | C.M.              | Temephos<br>1 G    | 0,00056 a 0,004                 | 1,25 (2,5) a 95 (10)              |
| Aea-Unicamp<br>/15-jun-02  | <i>A. aegypti</i><br>3° e 4°                          | C.M.              | Temephos<br>1 G    | 0,005 a 0,04                    | 10 (5) a 100                      |
| Aea-FEF<br>/15-jun-02      | <i>A. aegypti</i><br>3° e 4°                          | C.M.              | Temephos<br>1 G    | 0,005 a 0,042                   | 5 (8,7) a 100                     |
| Rockefeller<br>15-jun-02   | <i>A. aegypti</i><br>3° e 4°                          | C.M.              | Temephos<br>1 G    | 0,00125 a 0,02                  | 1,7 (2,9) a 100                   |

<sup>†</sup> C.D.= Concentração Diagnóstico, C.M.= Concentrações Múltiplas. (DP) desvio padrão.

## 2. Citologia

As espécies *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* como a maioria das espécies estudadas da família Culicidae, apresentam um complemento cromossômico 2n=6 (Sutton, 1942; Kitzmiller & Keppler, 1961; Rai, 1967; Jost, 1971; Smith & Hartberg, 1974; Motara & Rai, 1977, 1978; Rai, 1980; Dev & Rai, 1984; Marchi & Rai, 1986; Rai, 1986; Rao & Rai, 1987a; Kumar & Rai, 1990a). No caso do complemento mitótico isto foi observado em cérebro de larva de 4° estágio e pupa de *A. aegypti*

(Figura 1) e em cérebro de larvas de 4º estágio para *C. quinquefasciatus*. Nestes tecidos e estádios fisiológicos foram observadas as diferentes fases da mitose. Os três pares de cromossomos mostraram estreito pareamento somático durante a prófase como é característico de outras espécies de mosquitos (Rai, 1967). As fases da meiose foram observadas em ovário de pupa e testículos de pupas e imagos de *A. aegypti*, e em testículo de imago de *C. quinquefasciatus*. Na prófase I foram observadas as fases de: leptóteno, zigóteno e diplóteno em pupas de *A. aegypti* e paquíteno e zigóteno em imago de *C. quinquefasciatus*. Desta forma foram registrados núcleos em prófase I, espermátides, espermatozóides, representando o início e o fim da espermatogênese em pupas (12-20 horas/25°C) e adulto recém emergido de *A. aegypti*. Em geral as figuras cromossômicas observadas estão em concordância com aquelas apresentadas em outros trabalhos para estas espécies ou espécies próximas (Jost, 1971; Smith & Hartberg, 1974; Lima-Catelani & Bicudo, 1994; Sousa, 1998). Uma poliploidia em células somáticas de tecido do sistema reprodutor foi observada em *A. aegypti* (Figura 2).

## 2.1. Cérebro e Intestino

O complemento cromossômico apresentado na figura 1 mostra os três pares de cromossomos (1, 2 e 3) em metáfase de gânglio cerebral de larva de 4º estágio de *A. aegypti*. Neste tecido e estágio fisiológico, Rai (1967) registrou os comprimentos dos três pares de cromossomos (I, II e III) em metáfase, 5,4µm, 6,9µm e 7,6µm respectivamente. O par III atualmente é designado como o 2 (maior) e o par II como o 3 (intermediário). Comparativamente, o complemento da figura 1 mediu ao todo aproximadamente 20,2µm: 5,9µm o par 1, 7,5µm o par 2 e 6,8µm o par 3. A diferença considerável do par 1 deste trabalho com aquele de Rai (1967) deve ser por causa de um estiramento maior neste par (Figura 1). Adicionalmente, foi observada poliploidia em intestino de uma das populações de laboratório estudadas, linhagem susceptível Rockefeller, evento corriqueiro neste tipo de tecido para insetos. No par 1 (Figura 1), observa-se uma constrição em um dos braços, correspondendo à região organizadora nucleolar (NOR). A figura 3 apresenta marcação desta região com sonda pDm238 de DNAr através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em prometáfases e em núcleos de cérebro de pupa de *A. aegypti*. Marchi & Pili (1994) e Ferguson *et al.* (1996) entre outros tem usado esta técnica para a localização de genes do RNAr em mosquitos.

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com a mesma sonda, também marcou a região organizadora nucleolar (NOR) em núcleos de cérebro de larva de *A. aegypti* (Figuras 4 e 5). Nestas figuras pode ser observado uma ou duas marcações (cor amarelo intenso) por núcleo, os quais aparecem contrastados com iodeto de propídeo (cor vermelha). O DNA ribossomal compreende aproximadamente 0,6% do total do genoma haplóide (Gale & Crampton, 1989). *A. aegypti* tem uma só NOR localizada na metade do braço q do cromossomo 1, 70,6% FLpter (comprimento fracional da

ponta-p) (Brown & Knudson, 1997), já em *C. quinquefasciatus* apresenta-se no braço curto próximo do centrômero no cromossomo 1 (Marchi & Pili, 1994; Kumar & Rai, 1990a). Na figura 5 pode ser visualizado o material corado com iodeto (acima à esquerda), a marcação da sonda com fluorocromo (acima à direita) e os dois juntos com e sem contaminação (em baixo). Note como os pequenos pontos de marcação com sonda (Figuras 3, 4 e 5c,d) aparecem em áreas com intensidade maior para o iodeto de propídeo, em vermelho e laranja (Figuras 3, 4 e 5a). Muito embora o iodeto não seja um corante específico, estas áreas são interpretadas como sendo heterocromáticas, o qual está em concordância com o registro da NOR em áreas heterocromáticas (Brown *et al.*, 2001).

## 2.2. Tecido do Sistema Reprodutor

Pupas e imagos de mosquitos apresentaram excelente material para análise de meiose. O tempo de diferenciação na espermatogênese serve para estabelecer o momento mais adequado das preparações visando o estabelecimento de anomalias cromossômicas. Assim, pupas de menos de 24 horas e imagos recém emergidos apresentaram todas as fases da meiose. Lima-Catelani & Bicudo (1994) registraram anomalias cromossômicas na prófase I desta espécie atribuídas à aplicação de inseticidas para seu controle. Em um estudo posterior na mesma população, o número e a frequência das anomalias foi menor provavelmente devido à diminuição das aplicações de inseticidas (Sousa, 1998). No presente trabalho não foram observadas anomalias como quebras, fendas (gaps), pontes na prófase I ou figuras de cromossomos “atrasados” na anáfase das populações de laboratório (sete meses) Aea-Unicamp, padrão Aea-INS e de campo susceptível Aea-UFMS. Mas no caso da presença de poliploidias em tecido reprodutor, foi observada uma metáfase octoplóide (8n) em ovário de pupa (Figura 2), colônia Aea-Unicamp estabelecida na época (julho/98) há aproximadamente sete meses. Dita poliploidia, seguramente está associada a estresse ambiental causado por aplicação de inseticidas como registrado por outros autores (Lima-Catelani & Bicudo, 1994; Sousa, 1998).

## 2.3. Cromossomos Politênicos

Os cromossomos politênicos, bastante evidentes em alguns Diptera como Chironomidae, Drosophilidae, Sciaridae e Simuliidae, têm sido mais refratários para análise em Culicinae. Mesmo assim, núcleos com cromossomos politênicos já foram detectados em diferentes tecidos como brânquias anais, glândulas salivares, intestino, músculo, oenócitos, papilas anais, traquéia e túbulos de Malpighi em larvas de *A. aegypti* (Trager, 1937; Sutton, 1942; Gilham, 1957), túbulos de Malpighi em pupas de *A. aegypti* e *C. pipiens* (Sutton, 1942) e túbulos de Malpighi em adultos de *A. aegypti* e *C. pipiens* (Sutton, 1942; Gilham, 1957). Embora a literatura normalmente desencoraje a trabalhar este material para mapeamento físico em *A. aegypti* (Brown *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2001) temos observado claramente segmentos bandados e expressão diferencial das bandas nos cromossomos politênicos dos túbulos de Malpighi de pupas de *A. aegypti* (Figuras 6 e 7).

Vários problemas já foram sugeridos como causa para a baixa qualidade nas preparações dos cromossomos politênicos em *Culex* e *Aedes* para serem passíveis de análise: 1. Sutton (1942) sugeriu a presença de pontos fracos, os quais podem ser assumidos agora como sendo áreas heterocromáticas (Redi *et al.*, 2001) onde os cromossomos quebram facilmente (Semeshin *et al.*, 2001). 2. Maior comprimento (Aldighieri, 1961; Kitzmiller, 1963) o que de fato é diferente entre espécies de Culicinae e Anophelinae (Severson *et al.*, 2001) e deve influenciar as interações cromáticas. 3. Ligações intra- e inter- cromossômicas, ou pareamentos ectópicos (French, 1962; Verma *et al.*, 1987) resultantes de DNA repetitivo (Rai & Black IV, 1999, Severson *et al.*, 2001). 4. Adesões de superfície (Rai, 1967 *apud* Sharma *et al.*, 1978), o que tem sido observado em *Anopheles funestus* Giles, sendo dependente de  $\beta$ -heterocromatina (Sharakhov, 2001).

Criação de larvas em baixa temperatura, 18-20°C (Sharma *et al.*, 1978) e as condições fisiológicas das larvas (Verma *et al.*, 1987) podem melhorar o espalhamento e a qualidade das preparações de cromossomos das glândulas salivares, o que foi verificado aqui com *A. aegypti* em túbulos de Malpighi. Observações adicionais em preparações de túbulos de Malpighi em *Aedes albopictus* e *Ochlerotatus fluviatilis* permitiram verificar que o tamanho do genoma e o grau de politenia podem estar influenciando na qualidade das preparações. Para pupas de *A. albopictus*, as preparações foram de baixa qualidade, muito inferior àquelas de *A. aegypti* enquanto para larva de *O. fluviatilis* a preparação apresentou politenia elevada com boa resolução de bandas e espalhamento dos cromossomos, superior às encontradas em *A. aegypti*. É conhecido que populações brasileiras de *A. albopictus* apresentam genomas maiores (Kumar & Rai, 1990b) que aqueles de populações de *A. aegypti* e de outras espécies de *Aedes* (Rao & Rai, 1987b; Knudson *et al.*, 1996). Seguramente isto e a pouca politenia observada tenham determinado a baixa qualidade das preparações em *A. albopictus*, em núcleos politênicos dos túbulos de Malpighi menores e sem espalhamento dos cromossomos. Já em *O. fluviatilis* o grau de politenia observado foi maior ao registrado neste trabalho para *A. aegypti*. *O. fluviatilis*, espécie que pode veicular a febre amarela silvestre (Funasa, 1999) talvez possua um genoma menor que aquele de *A. aegypti*.

Tem sido sugerido que a quantidade de heterocromatina e a sua distribuição nos cromossomos seja a causa da falta de resolução de bandas nas preparações de cromossomos politênicos e restrinja o espalhamento deles (Knudson *et al.*, 1996; Rai & Black IV, 1999). Mas os resultados aqui apresentados não estão em concordância com esta idéia, e pode ser assumido que, mais do que um envolvimento direto da heterocromatina, o que determina boas preparações de cromossomos politênicos em Culicíneos tem a ver mais com o grau de politenia, o estado fisiológico e a preparação. O primeiro pode ser próprio da linhagem, portanto determinado geneticamente, como foi observado na linhagem IAL-S de *C. quinquefasciatus*, que apresentou muito menos politenia que

nas linhagens UNI-R1 e UNI-R2. A influência do estado fisiológico no espalhamento não só está relacionada com o grau de politenia mas também com o desenvolvimento em condições ambientais favoráveis (baixa densidade larval por volume e superfície do meio, alimentação e temperatura), que pode determinar que RNA e proteínas nucleares específicas tenham expressão diferencial facilitando o espalhamento. Quando são feitas extrações de DNA sem desproteinização suficiente há envolvimento de resíduos de RNA e proteínas na movimentação do DNA na eletroforese, podendo retê-lo no poço do gel. Essa interação de ácidos nucleicos e proteínas que também influencia o espalhamento dos cromossomos pôde ser reduzida na técnica de preparo das lâminas com um tratamento mais forte a partir da hipotonia do material e sucessivos banhos com ácido acético. Tratamento ácido ajuda no espalhamento dos cromossomos de *C. quinquefasciatus* (Achary, 1994) e isto pode estar associado com proteínas ácidas que são facilmente extraídas com o tratamento. Já no caso da falta de espalhamento em *A. aegypti* pode ter a ver adicionalmente com proteínas não ácidas (não histonas).

Do ponto de vista molecular e embasado nos resultados, pode ser afirmado que, mais do que a quantidade de heterocromatina, o tamanho do genoma, o padrão de interespaçamento (DNA repetitivo / DNA único) e a composição protéica são os principais fatores que influenciam o espalhamento. *C. quinquefasciatus* apresenta um genoma de tamanho intermediário e um padrão de interespaçamento também intermediário, enquanto *A. aegypti* possui um genoma maior com um padrão de interespaçamento curto (Severson *et al.*, 2001). A porcentagem de DNA repetitivo em *C. quinquefasciatus* é maior que em *A. aegypti*, 80% contra cerca de 60% (Warren & Crampton, 1991; Knudson *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2001). Assim, a afirmação de Severson *et al.* (2001) de que o problema da falta de espalhamento nos cromossomos politênicos seja causada por pareamentos ectópicos resultantes de regiões de DNA altamente repetitivo, é pelo menos em parte insustentável por causa das colocações e a observação de melhor espalhamento em *C. quinquefasciatus* do que em *A. aegypti*.

No presente estudo foram obtidos cromossomos politênicos de diferentes tecidos como glândulas salivares, cecos gástricos e túbulos de Malpighi em larvas, túbulos de Malpighi em pupas e túbulos de Malpighi e células de nutrição (trofócitos) do ovário em adultos. Figuras cromossômicas foram observadas para estes tecidos em diferentes estádios fisiológicos (tempo de desenvolvimento) das espécies estudadas. Inicialmente a maioria dos resultados foi pouco consistente e a qualidade das preparações não permitiram análises comparativas com outros mapas, somente um registro do grau de politenia dos diferentes tecidos nos estádios fisiológicos. O diâmetro dos núcleos de túbulos de Malpighi foi 21,2µm em adulto macho, 44,7µm em pupa macho de *A. aegypti*, e 32,8µm em pupa macho de *C. quinquefasciatus* (não apresentado). Trager (1937) registrou um diâmetro de



22,7±2,6µm em núcleos de túbulos para larvas de 4º estágio tardio em *A. aegypti*. Com relação ao diâmetro dos cromossomos foi registrado um tamanho de cerca de 2 a 3 µm para os cromossomos de células de túbulos de Malpighi de pupas machos e fêmeas respectivamente em *A. aegypti* (Figura 8). Para *C. quinquefasciatus* foi registrado um diâmetro de 1µm para os cromossomos das glândulas salivares de larva de 4º estágio e de 3 a 4µm nos cromossomos dos túbulos de Malpighi em pupas (Figura 9). Kitzmiller & Clark (1952) registraram um diâmetro de 3µm nos cromossomos das glândulas salivares de larvas para *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus*. Mas isto pode mudar com a linhagem, sendo de menos de 2µm como observado nos túbulos de Malpighi em pupas da linhagem IAL-S desta espécie (Figura 10).

Os cromossomos de *A. aegypti* foram frágeis, apresentaram menor grau de politenia e alguns pareamentos ectópicos evidentes. Zhimulev (1997) registra as dificuldades de outros autores para obter preparações que permitam visualizar a ocorrência e caracterizar os pareamentos ectópicos, como é feito para outras espécies de Diptera. Os pareamentos ectópicos podem estar relacionados com a organização dinâmica da estrutura da β-heterocromatina e esta com o grau de replicação do DNA em algumas regiões dos cromossomos politênicos (Koryakov *et al.*, 1999). De outra parte, nesta espécie, foi observado nucléolo em núcleo politênico de uma pupa macho. Sutton (1942) registrou o nucléolo em larva e a não visualização desta estrutura em fases posteriores. Embora as preparações tenham permitido uma análise preliminar, poucas apresentaram a qualidade suficiente para estimar vários registros do comprimento dos cromossomos. De forma preliminar registramos para os cromossomos politênicos dos túbulos de Malpighi em *A. aegypti* um comprimento total de aproximadamente 1.380µm: 330µm para o cromossomo 1, 562µm para o 2 e 488µm para o 3 (Figura 8). Algumas estimativas do comprimento entretanto já foram feitas por alguns autores para estas espécies nos cromossomos das glândulas salivares, registrando-se um comprimento no complemento todo de 1.180 µm em *A. aegypti* (Sharma *et al.*, 1978 *apud* Zhimulev, 1996) e de 789 e 1.200µm para *C. quinquefasciatus* (Sharma *et al.*, 1969; Kanda, 1970). As diferenças no comprimento dos cromossomos podem ser próprias das linhagens e de espalhamento diferente nas preparações.

De forma descritiva Kitzmiller & Keppler (1961) registraram o comprimento dos cromossomos politênicos de glândulas salivares (335, 455 e 415µm) e dos cromossomos metafásicos meióticos (6,2, 8,5 e 7,7µm) de larva em *C. pipiens*, sem muita diferença na porcentagem dos três pares 1, 2 e 3. Comparativamente as medições feitas neste trabalho dos cromossomos na metáfase mitótica de cérebro de larva (Figura 1) e dos cromossomos politênicos dos túbulos de Malpighi de pupa em *A. aegypti* (Figura 8) registraram 29,2, 37,1 e 33,7 % e 23,9, 40,7 e 35,4 % respectivamente para os cromossomos 1, 2 e 3. Para metáfase em cérebro, Rai (1967) registrou 27,1, 38,2 e 34,7 % enquanto

nas medições realizadas nos mapas dos cromossomos politênicos de Sharma *et al.* (1978) foi registrado 22, 43,8 e 34,2 % no comprimento dos cromossomos 1, 2 e 3 respectivamente. Embora os tecidos, estádios fisiológicos e as linhagens comparadas sejam diferentes, esperava-se pouca diferença nestas porcentagens como aconteceu com *C. pipiens*. Esta diferença nas porcentagens para cada par de cromossomos e em especial para o cromossomo 1 poderia ser explicada em parte por estiramento diferencial no espalhamento como foi indicado na seção 2.1., por expressão assentuada das bandas configurando uma quantidade maior de puffs nos cromossomos 2 e 3 que no cromossomo 1 e/ou por inconsistência no assinalamento de alguns segmentos aos cromossomos específicos devido às quebras registradas nos braços (Figura 8).

Das lâminas preparadas para 1.972 indivíduos à procura de cromossomos politênicos adequados à análise, foram obtidas cerca de 120 (6%) lâminas passíveis de análise, com melhores resultados para *C. quinquefasciatus* (relação de 1/10 em 589 indivíduos) do que para *A. aegypti* (relação de 1/24 em 1383 indivíduos). *C. quinquefasciatus* apresentou cromossomos com bandas mais conspícuas, presença clara de nucléolo e poucos pareamentos ectópicos. A presença do nucléolo nas células dos túbulos de Malpighi é indicativa da atividade de síntese de RNAr neste tecido. Esta estrutura é um excelente marcador para o cromossomo 1 em *C. quinquefasciatus*, enquanto as regiões centroméricas ajudam na diferenciação dos três cromossomos politênicos, servindo como marcadores na sua identificação (Campos *et al.*, 2000; Campos *et al.*, submetido – Anexo 4). Estádios fisiológicos sucessivos (larva/pupa) apresentaram aumento do grau de politenia, os machos mostrando sempre menor grau de politenia que as fêmeas. Embora em pupas de 12 a 42 horas (25-28°C) fosse observada boa politenia em *C. quinquefasciatus*, o espalhamento em geral foi menos consistente que em pupas mais jovens, o que talvez seja causado por mudanças na composição das proteínas nucleares (tipos e quantidades). Fêmeas de *C. quinquefasciatus* alimentadas com sangue e ovadas (24-36 horas após a refeição sangüínea) apresentaram também cromossomos com boa politenia, mas nem sempre o espalhamento foi adequado à análise. Segmentos sofrendo assinapse foram mais evidentes em *C. quinquefasciatus* do que em *A. aegypti*. Em várias regiões dos cromossomos já foram registradas assinapses para *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus* (Achary, 1994; Zambetaki *et al.*, 1998). No presente trabalho foram observadas estruturas bastante notórias como bandas conspícuas, alguns “puffs” e seqüências de bandas e interbandas (Figuras 8 e 9) que ajudaram na caracterização destes cromossomos, na comparação inter-populacional e na comparação com os mapas destas espécies.

Mapas dos cromossomos politênicos das glândulas salivares foram publicados como preliminares para *A. aegypti* (Sharma *et al.*, 1978). Mapas mais consolidados para *C. quinquefasciatus* também são conhecidos (Sharma *et al.*, 1969; Kanda, 1970; Verma *et al.*, 1987).

Sutton (1942) registrou resultados satisfatórios com cromossomos politênicos utilizando túbulos de Malpighi de larva, pupa e adulto de *A. aegypti* e *C. pipiens*, mesmo assim, este tecido tem sido pouco explorado. Algumas análises foram feitas nos cromossomos de túbulos de Malpighi em fêmeas ovadas (24 horas após a refeição sangüínea) de *C. pipiens* e *C. quinquefasciatus* (Achary, 1994; Zambetaki, 1998). No presente trabalho, túbulos de Malpighi de pupas fêmeas nas duas espécies deram resultados adequados à análise, de forma geral com boa politenia e diferenciação de bandas. Estes resultados vão permitir a análise citológica e a marcação molecular, contornando muitos dos problemas apresentados no passado na obtenção e análise deste tipo de cromossomos nessas espécies. Parte destes problemas como assinalaram outros autores (Achary, 1994; Zambetaki et al., 1998) está associada ao estado fisiológico.

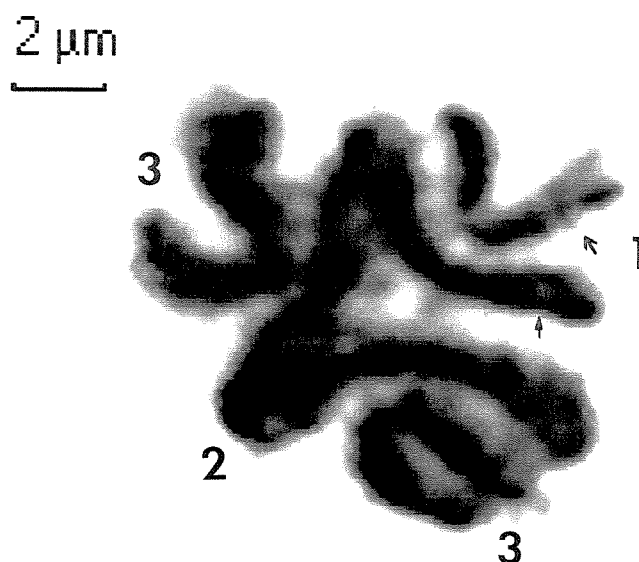
A linhagem padrão IAL-S de *C. quinquefasciatus*, permitiu a comparação com os mapas já existentes como população susceptível controle. Desta forma foi identificada por meio de diferenciação cromossômica nos cromossomos politênicos das linhagens UFMS-R, UNI-R1, UNI-R2 de *C. quinquefasciatus*, a área de localização dos genes responsáveis pela alta produção de esterases que conferem resistência aos organofosforados, sendo determinada como uma área amorfa na seção 31 do cromossomo mediano "2" enquanto na linhagem IAL-S aparece uma banda (Figura 10), o que está em concordância com outros estudos no complexo *Culex pipiens* (Heyse et al., 1996; Tomita et al., 1996; Zambetaki, 1998).

Relações evolutivas podem ser traçadas comparando mudanças na organização do genoma (Heckel, 1993; Knudson et al., 1996; Mustermann & Conn, 1997). Por causa dos cromossomos manterem uma organização linear da seqüência de pares de bases de DNA que formam os genes funcionais e "não funcionais", as espécies com diferenças menores na seqüência linear podem ser consideradas mais estreitamente relacionadas. Assim para genes muito conservados, homologias cromossômicas podem ser traçadas em nível taxonômico superior (Heckel, 1993), inclusive a conservação de braços cromossomais entre taxa superiores de Diptera é relativamente comum (Munstermann & Conn, 1997). Mapas de ligamento comparativos para os mosquitos *C. pipiens* e *A. aegypti* indicaram que o cromossomo 1 é altamente conservado entre as duas espécies e vários loci homólogos existem entre os braços dos cromossomos 2 e 3 (Mori et al., 1999). A partir do presente trabalho será feita a comparação entre os mapas cromossômicos de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* estabelecendo analogias com aqueles dos mapas de ligação. Desta forma pode ser avaliada a associação de braços entre estas espécies por meio da existência de homologias de marcadores cromossômicos e grupos de bandas.

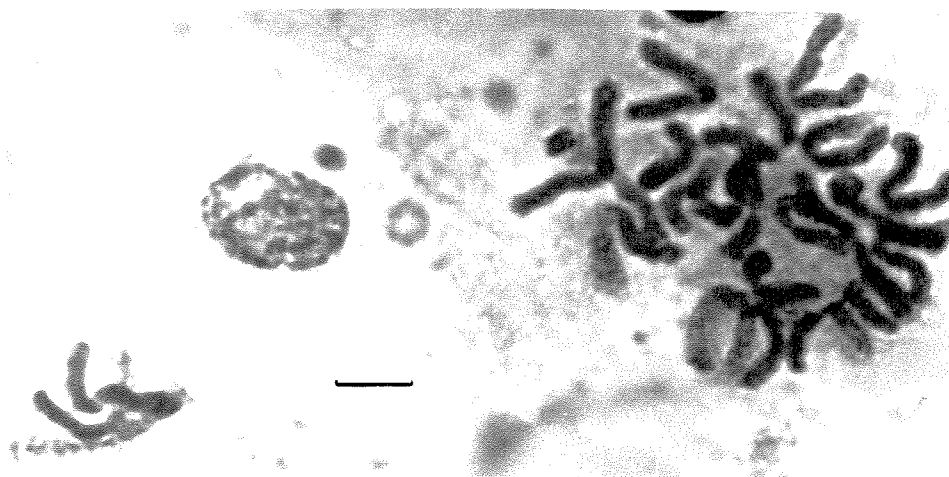
Um dos principais desafios tem sido a reproducibilidade das técnicas para obtenção de

lâminas adequadas à análise. Embora os mapas cromossômicos de *C. quinquefasciatus* tenham sido elaborados e apresentados em comunicação científica (Campos *et al.*, 2000), reproduzir tais resultados tem sido difícil. Isto implicou em diversificação de diferentes passos na criação do material biológico e na técnica citológica. Para *A. aegypti*, lâminas com complementos cromossômicos passíveis de análise foram obtidas com túbulos de Malpighi de pupas fêmeas grandes recém emergidas da linhagem Rockefeller, Aea-Unicamp e amostras de campo, dissecando o tecido inclusive desde o momento da fixação até a separação dos núcleos da maior parte dos componentes citoplasmáticos. Os resultados detalhados de padronização da técnica para obtenção dos cromossomos politênicos de *A. aegypti* são apresentados na forma de comunicação científica (Campos *et al.*, *submetido* – Anexo 3). Diferença de expressão nos cromossomos homólogos foi observada na forma de heterobanda (Hb) pelo menos em uma ocasião (1/60 lâminas) na linhagem susceptível Rockefeller (Figura 11). Igualmente foram observadas duas inversões (2/60 lâminas) nesta linhagem (não apresentado).

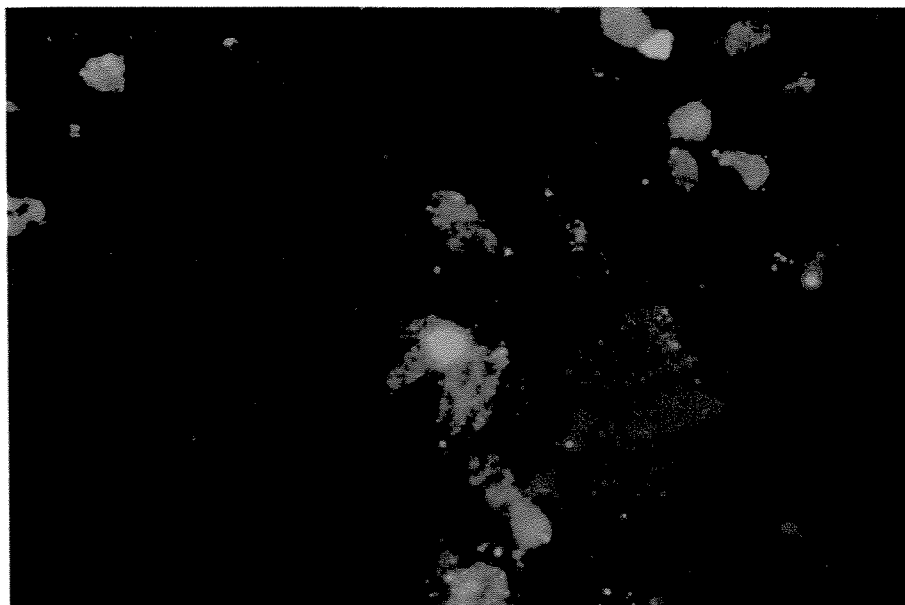
Este método permitirá a obtenção de lâminas de cromossomos politênicos para hibridação com sondas de DNA e assim contornar as dificuldades que este tipo de material tem apresentado para análise citológica e molecular. Usando-se técnicas de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com estes cromossomos, a resolução das sondas pode melhorar as já registradas para cromossomos metafásicos ou em núcleos interfásicos (Severson, 1994). O primeiro mapa integrado, físico e de ligação genética usando amplificação de sinal com FISH em cromossomos metafásicos foi recentemente publicado (Brown *et al.*, 2001). Com este procedimento foi possível mapear sondas pequenas (do tamanho de DNAC). Os autores afirmam que a ligação genética representa a região eucromática do genoma, e que grandes regiões do mapa físico provavelmente representam regiões heterocromáticas. Juntos os cromossomos politênicos e os procedimentos de amplificação de sinal, poderão melhorar ainda a resolução destes mapas e ajudar a esclarecer vários pontos da estrutura dos cromossomos e da função de vários genes responsáveis pela competência do vetor aos parasitas e patógenos.



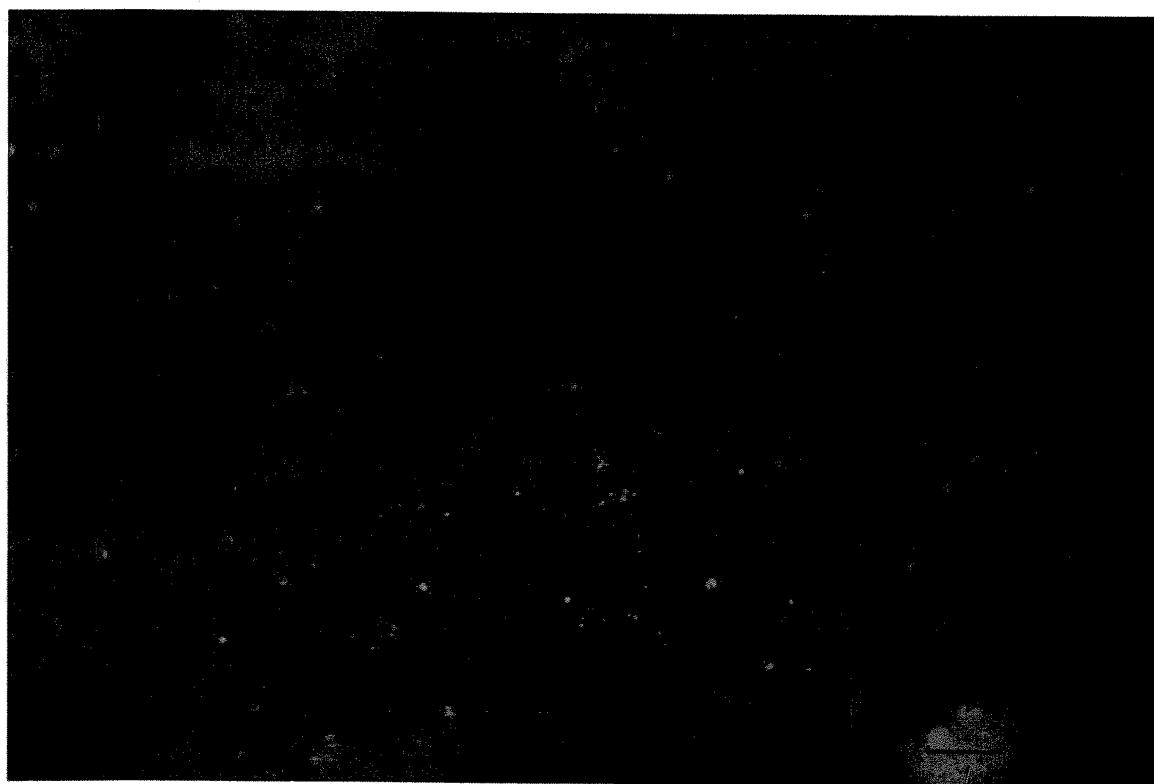
**Figura 1.** Metáfase de gânglio cerebral de *Aedes aegypti*, larva de 4º estágio, *Aea*-Unicamp, Campinas. Coloração: OLA. As setas estão indicando constrição secundária (NOR) no braço q do par 1.



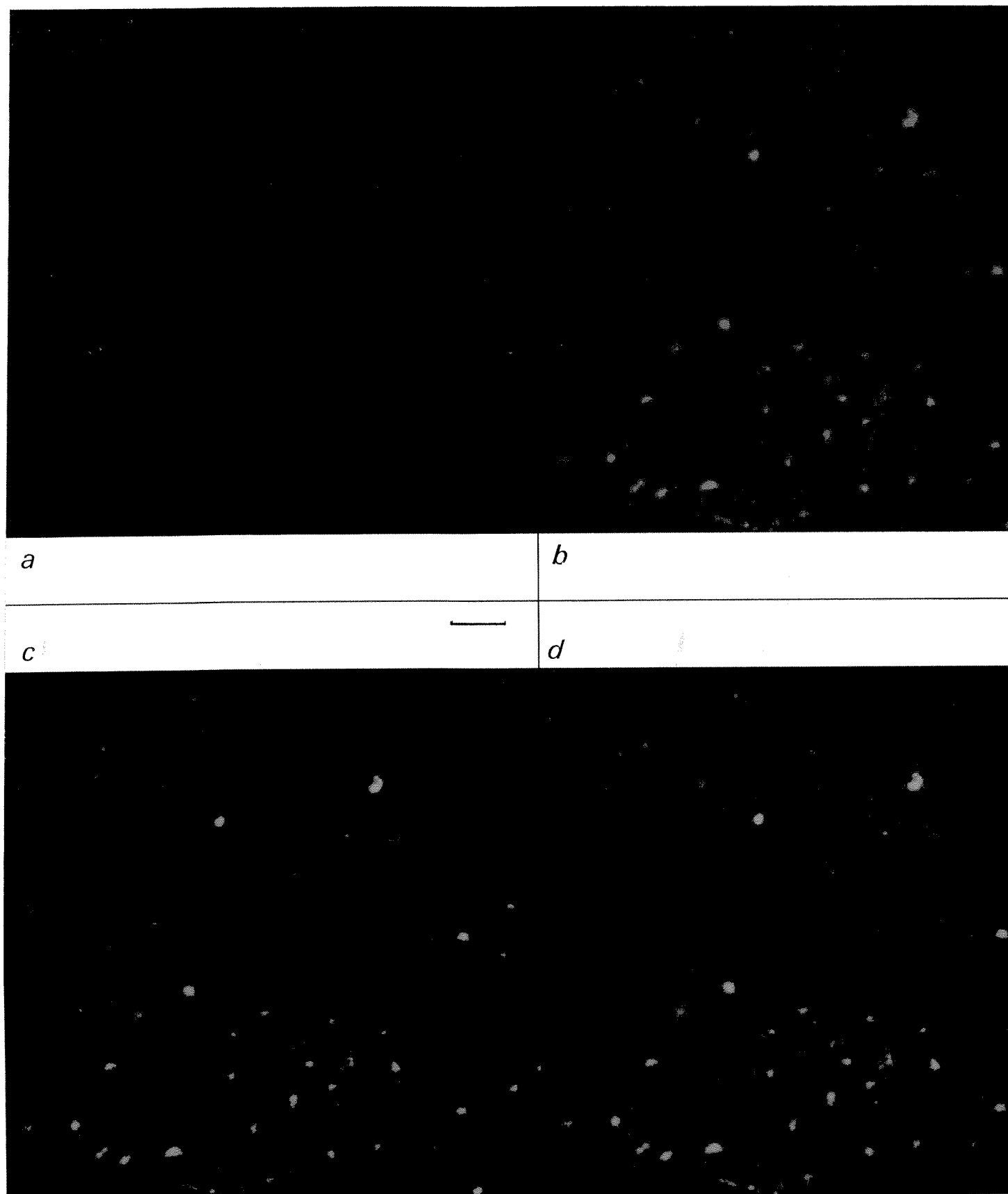
**Figura 2.** Poliploidia em tecido do sistema reprodutor de *Aedes aegypti*, metáfase (8n) em ovário de pupa fêmea, ~24 horas 28°C / *Aea*-Unicamp. Coloração OLA. Barra= 4,3μm.



**Figura 3.** Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) em células de cérebro de *Aedes aegypti*, pupa macho, ~24 horas 28°C / *Aea*-Unicamp. Imagem em microscópio de fluorescência. Núcleos corados com iodeto de propídio, marcação fluorescente com sonda pDm 238 de DNAr com biotina. A detecção da sonda biotinilada foi feita com antibiotina (Vector, SP 3000) e anti-goat IgG-FITc (Vector, FI 5000). Barra= 11,2µm.



**Figura 4.** Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) em cérebro de larva de *Aedes aegypti*/ *Aea*-Unicamp. Imagem em microscópio de fluorescência. Núcleos corados com iodeto de propídio e hibridação com sonda pDm 238 biotinilada e marcada com antibiotina (Vector, SP 3000) e anti-goat IgG-FITc (Vector, FI 5000). Barra= 9,4µm.

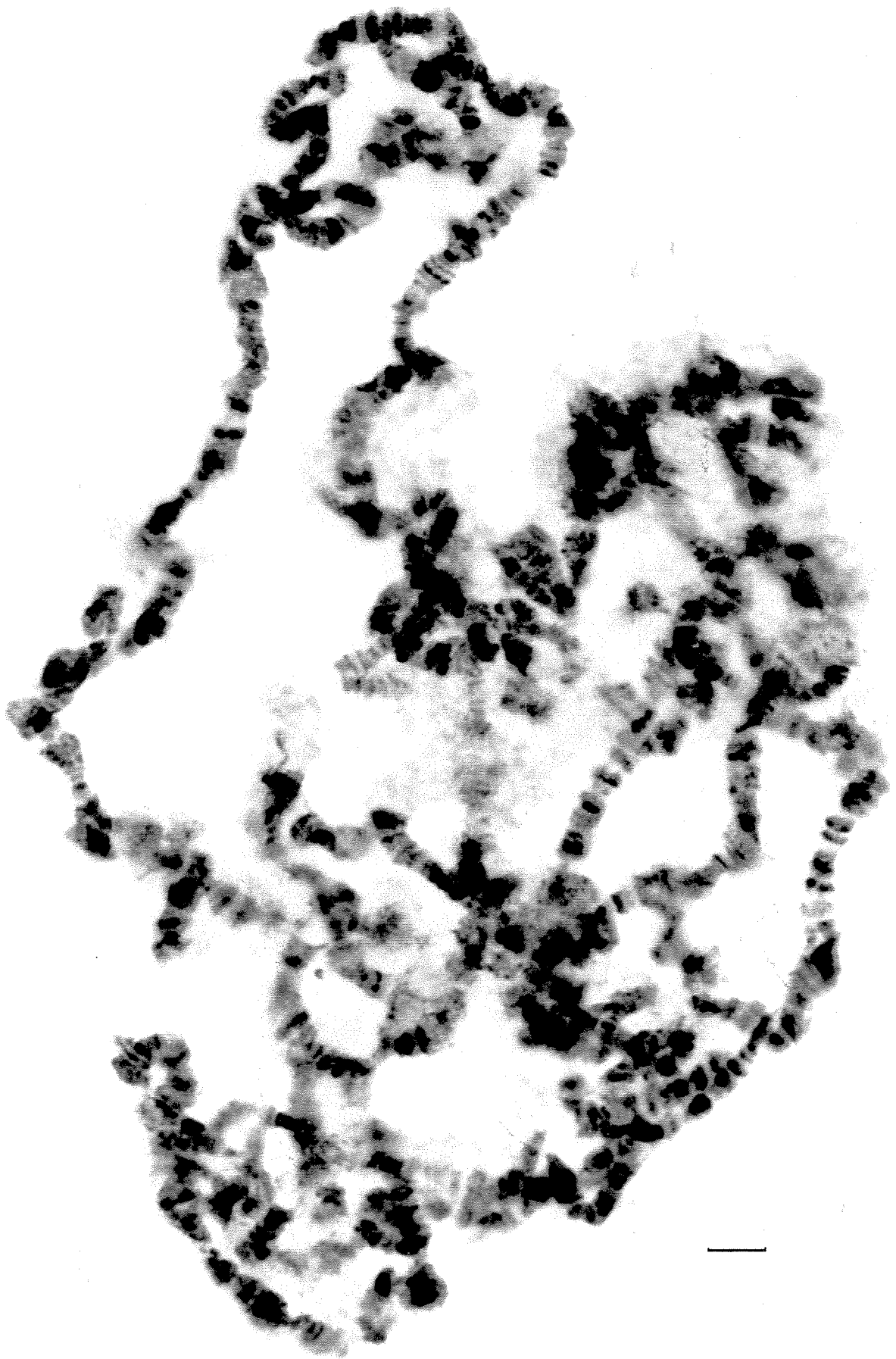


**Figura 5.** Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) em cérebro de larva de *Aedes aegypti*, Aea-Unicamp. Imagens em microscópio confocal de fluorescência. a, Núcleos corados com iodeto de propídio; b, núcleos com sonda pDm 238 biotinilada e marcada; c e d, núcleos com iodeto de propídio e sonda marcada. Barra= ~10µm.

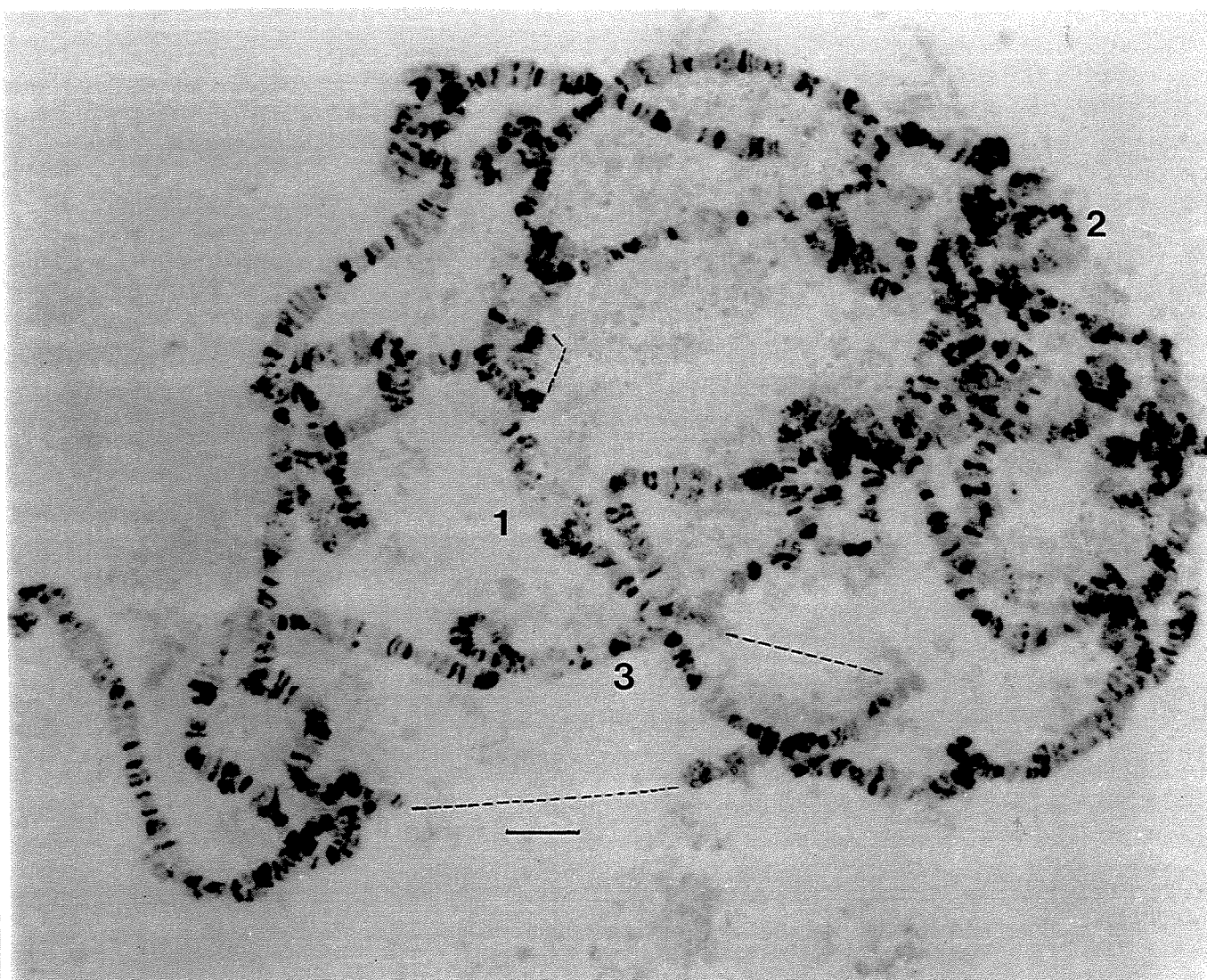


**Figura 6.** Cromossomos politênicos de túbulos de Malpighi de *Aedes aegypti*, pupa fêmea ~16 horas 28°C / *Aea*-Unicamp. Coloração OLA. As setas estão sinalando a continuação do cromossomo. Barra= 4,3µm.





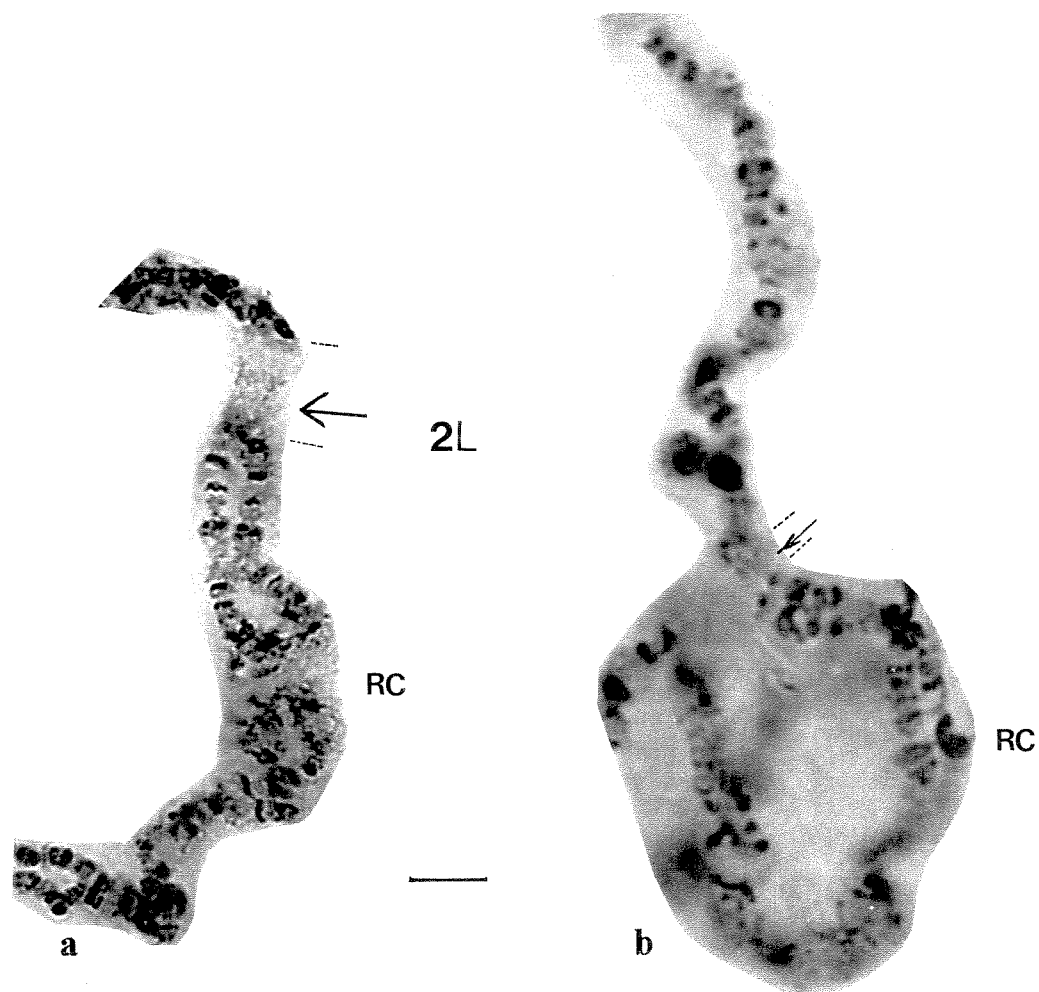
**Figura 7.** Cromossomos politênicos de túbulos de Malpighi de *Aedes aegypti*, pupa fêmea ~12 horas 20°C / *Aea*-Rockefeller. Coloração OLA. Barra= ~6,4µm.



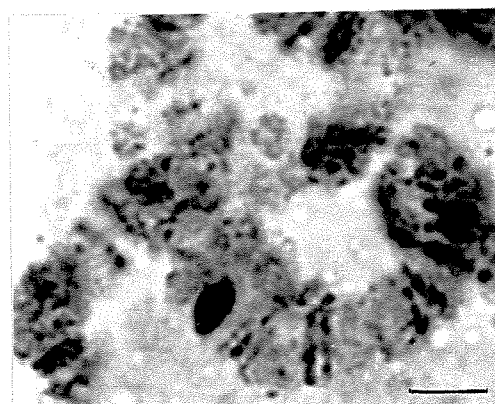
**Figura 8.** Cromossomos politênicos de túbulos de Malpighi de *Aedes aegypti*, pupa fêmea, ~1 hora 18°C / *Aea*-Rockefeller. Coloração OLA. Barra= ~7,7µm.



**Figura 9.** Cromossomos politênicos de túbulos de Malpighi de *Culex quinquefasciatus*, pupa fêmea ~30 horas 29°C / UNI-R1. Coloração OLA. Barra= ~6µm.



**Figura 10.** Segmento cromossômico do braço 2L, túbulos de Malpighi de *Culex quinquefasciatus*. a.pupa fêmea ~30 horas 29°C / UNI-R1 e b.pupa fêmea ~10 min / IAL-S. Coloração OLA. As setas indicam a região amplificada (a) ou não (b) para os genes de esterases. RC, Região Centromérica. Barra= a, ~6µm e b, ~4µm.



**Figura 11.** Heterobanda em cromossomo politênico de túbulos de Malpighi de *Aedes aegypti*, pupa fêmea, ~1 hora 18°C / Aea-Rockefeller. Coloração OLA. Barra= ~4µm.

## IV. CONCLUSÕES

### 1. CONCLUSÕES GERAIS

1. Foi encontrada alteração na resposta a inseticidas organofosforados e piretróides em populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* de Campinas, SP, Campo Grande, MS e Cuiabá, MT.
2. A determinação das concentrações letais 50 e 95% para o Temephos e vários piretróides nas populações avaliadas, permitiu estimar o estado da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.
3. Os cromossomos politênicos de túbulos de Malpighi de *Aedes* e *Culex* são passíveis de análise e permitem o monitoramento de populações de mosquitos.
4. Existem diferenças na complexidade estrutural dos cromossomos politênicos de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*.

### 2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

1. A resistência ao Temephos determinada em *Aedes aegypti* para população de laboratório (Aea-Unicamp) em Campinas, SP em 1998, não foi registrada em amostras dessa colônia quatro anos após.
2. Avaliação da resposta ao Temephos em uma população de campo de *Aedes aegypti* (Aea-FEF) não apresentou diferença marcante quando comparada com a população padrão, e foi susceptível.
3. As populações de *Aedes aegypti* de Campo Grande, MS avaliadas em 1998 e 1999 apresentaram-se susceptíveis ao Temephos e à Cipermetrina.
4. A população de *Aedes aegypti* avaliada em Cuiabá, MT em 2000 foi susceptível ao Temephos.
5. As populações de *Culex quinquefasciatus* de Campinas, SP apresentaram resistência à Cipermetrina em 1999 (parental), à Ciflutrina em 2001 (F1 e F2 de campo) e ao Temephos em 2002 (colônia de 16 meses).
6. A população de *Culex quinquefasciatus* de Campo Grande, MS em 1998 e de Cuiabá, MT em 2000 apresentaram resistência ao Temephos.
7. A técnica para a obtenção de cromossomos politênicos em mosquitos foi melhorada. O sucesso da técnica usada neste trabalho dependeu da espécie, do tamanho de genoma, do grau de politenia e do estado fisiológico (sexo, fase e tamanho), principalmente. A criação de larvas em meio com condições ótimas (espaço, comida e temperatura) facilitou as preparações.
8. Os cromossomos politênicos dos túbulos de Malpighi em larvas, pupas e imagos de *Aedes aegypti* para as populações de Campinas, SP (Aea-Campus, Aea-Lab, Aea-Unicamp e Rockefeller) e Campo Grande, MS (Aea-UFMS e Aea-cemitério) - Brasil e para as populações Aea-INS-Bogotá e Aea-Palmira, VA - Colômbia permitiram avaliação citológica.

9. Os mapas cromossômicos de *Aedes aegypti* apresentaram politenia intermediária configurando uma definição de bandas capaz de definir marcadores para os três cromossomos.
10. Os mapas cromossômicos de *Culex quinquefasciatus* apresentaram politenia maior, o que configurou melhor definição de bandas, regiões centroméricas características, presença de *puffs* e grupos de bandas com resolução suficiente para identificar marcadores e fazer comparações inter populacionais a partir do padrão de bandamento.
11. As linhagens avaliadas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* apresentaram variação no grau de politenia e portanto na definição de bandas entre os sexos, as fases e inter-populacionalmente.
12. Marcador cromossômico de genes amplificados para esterases foi reconhecido na seção 31-2L dos cromossomos politênicos em glândula salivar de larvas (UFMS-R) e túbulos de Malpighi de larva (Cuiabá-R) e pupas (UNI-R1 e UNI-R2) de *Culex quinquefasciatus* de Campo Grande, Cuiabá e Campinas, respectivamente.

## V. RECOMENDAÇÕES

Os resultados aqui apresentados e as discussões de outros trabalhos evidenciam a necessidade de um monitoramento rotineiro dos produtos químicos que forem ser usados no verão no controle de mosquitos como o *A. aegypti* e o *C. quinquefasciatus*. Há necessidade também da elaboração de testes de concentração múltipla que permitam usar concentrações diagnóstico mais reais para as populações brasileiras e determinação do coeficiente angular da linha de regressão (inclinação) para acompanhar as mudanças de tolerância e susceptibilidade aos produtos químicos (Andrade, 1989; Ferrari, 1996).

Análise e monitoramento de populações de mosquitos de interesse médico pode ser feita através do estudo da estrutura dos cromossomos politênicos, visando estabelecer marcadores cromossômicos de estresse fisiológico (alterações metabólicas conferindo adaptação) como diagnóstico de mudanças ambientais. Tal estudo pode ser feito com fêmeas das fases de larva (4 estágio), pupa e adulto a partir de amostras populacionais de campo ou criações de laboratório. O planejamento experimental deve priorizar pontos estratégicos (áreas de controle corriqueiro), amostragem espacial e temporal (diferentes pontos e cidades durante vários verões) e avaliação de centos de indivíduos por amostragem ou criação em condições ideais (espaço, comida e temperatura) até a geração F1 ou F2 para tal fim.



## VI. Bibliografia

- Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-267, 1925.
- Achary, P.M.R. A simple technique for the preparation of polytene chromosomes from *Culex quinquefasciatus*. *J. Am. Mosq. Cont. Ass.* **10**: 112-114, 1994.
- Alvarez, G., López, Y., Montiel, Y., Bolívar, A., Velez, J. & Escobar, J.P. Community participation program for dengue control in the Magdalena River valley, Antioquia Colombia. in: *Mosquito vector control and biology in Latin America-A third symposium*. *J. Am. Mosq. Contol Ass.* **9** (4): 449-450, 1993.
- Aldighieri, J. Contribution a l'etude de la struture des chromosomes salivares chez *Aedes aegypti*. *Bull. Soc. Path. Exot.* **54**: 712, 1961.
- Andrade, C.F.S. & Modolo, M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in integrated control. *Rev. Saúde Públ.*, S. Paulo **25** (3): 184-187, 1991.
- Andrade, C.F.S. Ecologia da supressão de populações de culicídeos e simulídeos. Tese de Doutorado, Área de Ecologia, Instituto de Biologia, UNICAMP. Campinas, 1989. 253 p.+ 89pp.
- Beaty, B.J. & Marquardt, W.C. (eds.). *The biology of disease vectors*, University Press of Colorado, Colorado, 529 p., 1996.
- Beerntsen, B.T., James, A.A. & Christensen, B.M. Genetics of the mosquito vector competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64** (1): 115-137, 2000.
- Bello, F., Neira, M., Olano, V. & Ferro, C. Estudio cariológico de *Psorophora confinnis* (Díptera: Culicidae). *Diogenes Rev. Inv. Cienc. Enseñ. Cienc.* **3** (2): 167-176, 1996.
- Berge, J.B., Chevellion, C., Raymond, M. & Pasteur, N. Résistance des insectes aux insecticides. Mécanismes moléculaires et épidémiologie. *C. R. Soc. Biol.* **190**: 445-454, 1996.
- Bisset, J., Rodríguez, M. & Soca, A. Cross-resistance to malathion in Cuba *Culex quinquefasciatus* induced by larval selection with deltamethrin. *Med. Vet. Entomol.* **12**: 109-112, 1998.
- Boehringer Mannheim, *Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual*. Boehringer Mannheim GmbH - Biochemica. Germany, 1992.
- Bracco, J.E., Barata, J.M.S. & Marinotti, O. Evaluation of insecticide resistance in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94** (1): 115-120, 1999.
- Bracco, J.E., Dalbon, M., Marinotti, O. & Barata, J.M.S. Resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos em população de *Culex quinquefasciatus*. *Rev. Saud. Publ.* **31** (2): 182-183, 1997.
- Brogdon, W.G. & McAllister, J.C. Insecticide resistance and vector control. *Emerg. Infect. Diseases.* **4**(4): 605-613, 1998.
- Brown, A.W.A. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2** (2): 123-140, 1986.
- Brown, S.E. & Knudson, D.L. Fish landmarks for *Aedes aegypti* chromosomes. *Insec. Mol. Biol.* **6** (2): 197-202, 1997.
- Brown, S.E., Menninger, J., Difillipantonio, M., Beaty, B.J., Ward, D.C. & Knudson, D.L. Toward a physical map of *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* **4** (3): 161-167, 1995.
- Brown, S.E., Severson, D.W., Smith, L.A. & Knudson, D.L. Integration of the *Aedes aegypti* mosquito genetic linkage and physical maps. *Genetics* **157**: 1299-1305, 2001.
- Campos, J. & Andrade, C.F.S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Rev. Saúde Pública* **35** (3): 232-236, 2001.
- Campos, J. & Andrade, C.F.S. Resistência em populações de *Simulium* (Diptera, Simuliidae). *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, **18** (3): 661-671, 2002.
- Campos, J. & Andrade, C.F.S. Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. *Rev. Saúde Pública* **submetido**.
- Campos, J., Andrade, C.F.S. & Recco-Pimentel, S.M. Avaliação da susceptibilidade a inseticidas químicos em populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). 1º Workshop Científico dos Pós-Graduandos da Unicamp. Campinas, 01 a 03 de setembro de 1998. Pôster.
- Campos, J. Andrade, C.F.S. & Recco Pimentel, S.M. Polytene chromosomes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). In: XXI International Congress of Entomology, Foz do Iguaçu, August 20th to 26th, 2000. Poster, Abstract Book I, p. 564.
- Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Dengue epidemic-Ecuador, 1988. *MMWR* **38**: 419-21, 1989. [www.cdc.gov/](http://www.cdc.gov/)
- Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). International Notes, Dengue Epidemic-Peru, 1990. *MMWR* **40** (9): 145-47, 1991. [www.cdc.gov/](http://www.cdc.gov/)
- Chandre, F., Daniel, F., Darder, M., Cuany, A., Doannio, J.M.C., Pasteur, N. & Guillet, P. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. *Med. Vet. Entomol.* **12**: 359-366, 1998.

- Chastel, C. Reflexions on two current viral infections: Yellow and dengue fevers. *Ann. Biol. Cliniq.* **55** (5): 415-424, 1997.
- CIDEIM - Centro Internacional de Entrenamento e Investigações Médicas-. *Manual de Entomología Médica para Investigadores de América Latina*. B. L. Travi & J. Montoya-Lerma (eds.). Fundación CIDEIM. Cartopel S.A., Cali, 280 p., 1994.
- Clements, A.N. *The Biology of Mosquitoes, development, nutrition and reproduction*. Vol. 1. Chapman & Hall, London, 509 p., 1992.
- Consoli, R.A.G.B. & Lourenço-de Oliveira, R. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro, 224 p., 1994.
- Cutkomp LK & Subramanyam B. Toxicity of pyrethroids to *Aedes aegypti* larvae in relation to temperature. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **3**: 347-349, 1986.
- della Torre, A. Polytene chromosomes preparation from anopheline mosquitoes. in: *Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A methods manual*. J.M. Crampton, C.B. Beard & C. Louis (eds). Chapman & Hall, London, p. 327-336, 1997.
- DeSilva, D., Hemingway, J., Ranson, H. & Vaughan, A. Resistance to insecticides in insect vectors of the disease: *estα3*, a novel amplified esterase associated with amplified *estβ1* from insecticide resistant strains of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Exper. Parasitol.* **87**: 253-259, 1997.
- Dev, V. & Rai, K.S. Genetics of speciation in the *Aedes (Stegomyia) scutellaris* group (Diptera: Culicidae) V. Chromosomal relationships among five species. *Genetica* **64**: 83-92, 1984.
- Dinardo-Miranda, L.L. Mosquito da dengue resiste a inseticidas. in M.T. Costa (rep.). *Correio Popular*, 1-Cidades, Campinas, 5 de novembro de 1994.
- Duarte, J.R. Dengue uma tragédia anunciada. *Vetores & Pragas* **1** (1): 9-13, 1998.
- Estrada-Franco, J.G. & Craig Jr, G.B. Biología, relaciones con enfermedades y control de *Aedes albopictus*. OPS, Cuaderno Técnico No. 42, 1995, 51 p.
- Failloux, A.B., Vazeille-Falcoz, M., Mousson, L. & Rodhain, F. Genetic control of vectorial competence in *Aedes* mosquitoes. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **92** (4): 266-273, 1999.
- Ferguson, M.L., Brown, S.E. & Knudson, D.L. FISH digital imaging microscopy in mosquito genomics. *Parasitology Today* **12** (3): 91-96, 1996.
- Fernández, D.M., Bisset, J., Rodríguez, M. & Soto, A. Identification of resistance mechanisms in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Venezuela: detoxifying multifunction oxidase. in: *Abstracts of Mosquito Vector Control and Biology in Latin America - A Seventh Symposium*, Salt Lake City, Utah, 25 of March, 1997. p. 24.
- Fernández, D.M., Rodríguez, M. Bisset, J. & Perez, E. Identification of esterase resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from Carabobo State, Venezuela. in: *Summaries of Mosquito Vector Control and Biology in Latin America - A Ninth Symposium*, St. Louis, MO, February, 1999. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **15** (3): 421, 1999.
- Ferrari, J.A. Insecticide resistance. In *The biology of disease vectors*. Beaty, B.J. & Marquardt, W.C. (eds.). University Press of Colorado, Colorado, p. 512-529, 1996.
- Forattini, O.P. *Entomologia Médica*, 2º Vol., Universidade de São Paulo, 506 p., 1964.
- French, W. L., Baker, R.H. & Kitzmiller, J.B. Preparation of mosquito chromosomes. *Mosquito News* **22** (4): 377-383, 1962.
- Funasa. *Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela*. Brasília: Ministério da Saúde - Fundação Nacional de Saúde, 60 p., 1999.
- Funasa. Fundação Nacional de Saúde, 2002. <http://www.funasa.gov.br/>
- Galardo, A.K.R., Braga, L.A. & Soares, S.S. Evaluation of temephos susceptibility in *Aedes aegypti* in Rio de Janeiro, Brazil. Em: XXI International Congress of Entomology, Foz do Iguassu, Brazil, 2000. Abstrac 4976.
- Gale, K. & Crampton, J. The ribosomal genes of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Eur. J. Biochem.* **185**: 311-317, 1989.
- Georgiou, G.P. Genetics of resistance to insecticides in the houseflies and mosquitoes. *Exper. Parasitol.* **26**: 224-255, 1969.
- Georgiou, G.P., Wirth, M., Tran, H., Saume, F. & Knudsen, B. Potencial for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Caribbean area and neighboring countries. *J. Med. Entomol.* **24**: 290-294, 1987.
- Gilham, N.W. Genetic studies in *Aedes*. I. The distribution of polytene chromosomes in *Aedes aegypti*. *Am. Nat.* **91**: 265-268, 1957.
- González, T., Bisset, J.A., Díaz, C., Rodríguez, M.M. & Brandolini, M.B. Insecticide resistance in a *Culex quinquefasciatus* strain from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94** (1): 121-122, 1999.



- Grant, D.F. & Hammock, B.D. Genetic and molecular evidence for *trans*-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Mol. Gen. Genet.* **234**: 169-176, 1992.
- Grant, D.F. & Hammock, B.D. Glutathione S-transferase 1 and 2 in susceptible and insecticide resistant *Aedes aegypti*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **33**: 132-143, 1989.
- Heckel, D.G. Comparative genetic linkage mapping in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **38**: 381-408, 1993.
- Helson BV, Surgeoner GA. Efficacy of cypermethrin for the control of mosquito larvae and pupae, and impact on non-target organisms, including fish. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **2** (3): 269-275, 1986.
- Hemingway, J. & Karunaratne, S.H.P.P. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of the major insecticide resistance mechanism. *Med. Vet. Entomol.* **12**: 1-12, 1998.
- Heyse, D., Catalan, J., Nance, E., Britton-Davidian, J. & Pasteur, N. Unconventional organization of amplified esterase B gene in insecticide-resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **12** (2/1): 199-205, 1996.
- Ibañez-Bernal, S., Briseño B., Mutebi, J.P., Argot, E., Rodríguez, G., Martínez-Campos, C. Paz, R. De La Fuente-San Roman, P., Tapia-Conyer, R. & Flisser, A. First record in America of the *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Med. Vet. Entomol.* **11**: 305-309, 1997.
- Imai, H., Taylor, R.W., Crosland, M.W.J. & Crozier, R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn. J. Genet.* **63**: 159-185, 1988.
- Jost, E. Meiosis in the male of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* and fertilization in the *Culex pipiens*-complex. *Can. J. Genet. Cytol.* **13**: 237-250, 1971.
- Kanda, T. The salivary gland chromosomes of *Culex pipiens fatigans* Wiedemann. *Jpn. J. Exp. Med.* **40**: 335-345, 1970.
- Kasai, S., Weerasinghe, I.S. & Shono, T. P450 monooxygenases are an important mechanism of permethrin resistance in *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **37**: 47-56, 1998.
- Kidwell, M.G. & Lisch, D.R. Transposable elements in host evolution genome. *TREE* **15**: 95-99, 2000.
- Kitzmiller, J.B. Mosquito cytogenetics. *Bull. Wild. Hlth. Org.* **29**: 345-355, 1963.
- Kitzmiller, J.B. Genetics, cytogenetics, and evolution of mosquitoes. *Adv. Genet.* **18**: 315-433, 1976.
- Kitzmiller, J.B. & Clark, C.C. Salivary gland chromosomes in *Culex* mosquitoes. *Genetics* **37**: 596, 1952.
- Kitzmiller, J.B. & Keppler, W.J. Salivary gland chromosomes maps in *Culex p. pipiens*. *Genetics* **46**: 875-876, 1961.
- Knudson, D.L., Zheng, L., Gordon, S.W., Brown, S.E. & Kafatos, F.C. Genome organization of vectors. In: *The biology of disease vectors*. B.J. Beaty & W.C. Marquardt (eds.). University Press of Colorado, Colorado, p. 175-214, 1996.
- Koryakov, D.E., Alekseyenko, A.A. & Zhimulev, I.F. Dynamic organization of the  $\beta$ -heterochromatin in the *Drosophila melanogaster* polytene X chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **260**: 503-509, 1999.
- Kreutzer, R.D. A mosquito with eight chromosomes: *Chagasia bathana* Dyar. *Mosq. News* **38**: 554-558, 1978.
- Kumar, A. & Rai, K.S. Chromosomal localization and copy number of 18S + 28S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse mosquitoes (Diptera, Culicidae). *Hereditas* **113**: 277-289, 1990a.
- Kumar, A. & Rai, K.S. Intraspecific variation in nuclear DNA content among world populations of a mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). *Theor. Appl. Genet.* **79**: 748-752, 1990b.
- Kumar, A. & Rai, K.S. Molecular organization and evolution of mosquito genomes. *Comp. Biochem. Physiol.* **106B** (3): 495-504, 1993.
- Kumar, V. & Collins, F.H. A technique for nucleic acid *in situ* hybridization to polytene chromosomes of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex. *Insect Mol. Biol.* **3** (1): 41-47, 1994.
- LeOra Software, Polo-PC a user's guide to Probit Or Logit analysis. Berkeley, CA, 22p., 1987.
- Lima-Catelani, A.R.A. & Bicudo, H.E.M.C. Chromosome studies in two Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Cytobios* **79**: 241-251, 1994.
- Lima-Catelani, A.R.A. & Bicudo, H.E.M.C. Cytogenetics of *Aedes fluviatilis*. *Cytobios* **81**: 189-194, 1995.
- Lozovei, A.L. Culicídeos (Mosquitos). In: *Entomologia Médica e Veterinária*. C.B. Marcondes (ed.). Atheneu, p. 59-103, 2001.
- Luna, J.E. & León, G. Dengue hemorrhagic epidemic in Bucaramanga, Colombia, 1992. in: *Mosquito vector control and biology in Latin America-A third symposium*. *J. Am. Mosq. Control Ass.* **9** (4): 447-448, 1993.
- Macoris, M.L.G., Camargo, M.F., Silva, I.G., Takaku, L. & Andrighetti, M.T. Modificação da susceptibilidade de *Aedes aegypti* ao Temephos. *Rev. Pat. Trop.* **24** (1): 31-40, 1995.
- Macoris M.L.G., Andrighetti M.T., Takaku L., Glasser C., Garbeloto V.C. & Cirino C.B. Alteração de resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública* **33**: 521-522, 1999.

- Malcolm, C.A., Bourguet, D., Ascolillo, A., Rooker, S.J., Garvey, C.F., Hall, L.M.C., Pasteur, N. & Raymond, M. A sex-linked *Ace* gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Mol. Biol.* **7** (2):107-120, 1998.
- Marchi, A. & Pili, E. Ribosomal RNA genes in mosquitoes: localization by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Heredity* **72**: 599-605, 1994.
- Marchi, A. & Rai, K.S. Chromosome banding homologies in three species of *Aedes* (*Stegomyia*). *Can. J. Genet. Cytol.* **28**: 198-202, 1986.
- Matthews, T.C. & Mustermann, L.E. Chromosomal repatterning and linkage group conservation in mosquito karyotypic evolution. *Evolution* **48**: 146-154, 1994.
- Mazzarri, M.B. & Georgioui, G.P. 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.
- McCarroll, L., Paton, M.G., Karunaratne, S.H.P.P., Jayasurya, H.T.R., Kalpage, K.S.P. & Hemingway, J. Insecticides and mosquito-borne disease. *Nature* **407**: 961-962, 2000.
- McDonald, P.T. & Rai, K.S. Correlation of linkage groups with chromosomes in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Genetics* **66**: 474-485, 1970.
- Morales, C.A. & Suárez, M.F. Evaluación de la susceptibilidad o resistencia de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a temephos (Abate®) en tres localidades de Colombia. *in*: Resúmenes, XXV Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN, Cali, Julio 16-18 de 1998. p. 98.
- Mori, A., Severson, D.W. & Christensen, B.M. Comparative linkage maps for the mosquitoes (*Culex pipiens* and *Aedes aegypti*) based on common RFLP loci. *J. Hered.* **90** (1): 160-164, 1999.
- Motara, M.A. & Rai, K.S. Chromosomal differentiation in two species of *Aedes* and their hybrids revealed by Giemsa C-banding. *Chromosoma* **64**: 125-132, 1977.
- Motara, M.A. & Rai, K.S. Giemsa C-banding patterns in *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. *Chromosoma* **70**: 51-58, 1978.
- Muirhead-Thomson, R.C. *Pesticide impact on stream fauna with special reference to macroinvertebrates*. Cambridge University Press, New York, 275 p., 1987.
- Mustermann, L.E. & Conn, J. Systematics of mosquito disease vectors (Diptera, Culicidae): impact of molecular biology and cladistic analysis. *Ann. Rev. Entomol.* **42**: 351-369, 1997.
- Olejníček, J. & Gelbic, I. Autogeny in the *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. *J. Vect. Ecol.* **25** (1): 118-122, 2000.
- OPS. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, Publicación Científica No. 548, 110 p. 1995.
- Pasteur, N., Nancé, E. & Bons, N. Tissue localization of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **38** (6): 791-801, 2001.
- Patil, N.S., Lole, K.S. & Deobagkar, D.N. Adaptive larval thermotolerance and induced cross-tolerance to propoxur insecticide in mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Med. Vet. Entomol.* **10** (3): 277-282, 1996.
- Puttaraju, H.P. Meiosis and chromosomal effects of thio-TEPA in the ovarian cells of *Aedes aegypti*. *Cytobios* **78**: 221-226, 1994.
- Rai, K.S. Cytogenetics of *Aedes aegypti*. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **36**: 563-565, 1967.
- Rai, K.S. Evolutionary cytogenetics of Aedini mosquitoes. *Genetica* **52/53**: 281-290, 1980.
- Rai, K.S. Genetics of *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Ass.* **2** (4): 429-436, 1986.
- Rai, K.S. & Black IV, W.C. Mosquito genomes: structure, organization, and evolution. *Adv. Genet.* **41**: 1-33, 1999.
- Rai, K.S. & Hartberg, W.K. *Aedes*. *in: Handbook of Genetics*. R.C. King (ed.) V. 3: 311-345, 1975.
- Rao, P.N. & Rai, K.S. Comparative karyotypes and chromosomal evolution in some genera of Nematocerous (Diptera: Nematocera) families. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **80**: 321-332, 1987a.
- Rao, P.N. & Rai, K.S. Inter and intraspecific variation in nuclear DNA content in *Aedes* mosquitoes. *Heredity* **59**: 253-258, 1987b.
- Rawlins, S.C. & Wan, J.O.H. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **11** (1): 59-65, 1995.
- Redi, C.A., Garagna, S., Zacharias, H., Zuccotti, M. & Capanna, E. The other chromatin. *Chromosoma* **110**: 136-147, 2001.
- Reyes-Lugo, M. & Neus, M. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* Say 1823 (Diptera: Culicidae) from Zulia State, Venezuela. *Rev. Cient.-Fac. Cienc. Veter.* **10** (6): 441-447, 2000.
- Rodríguez, M.M., Bisset, J., Rodríguez, I. & Díaz, C. Determination of insecticide resistance and its biochemical mechanisms in 2 strains of *Culex quinquefasciatus* from Santiago de Cuba. *Rev. Cubana Medicina Trop.*

49: 209-214, 1997.

- Russell, R.M., Robertson, J.L. & Savin, N.E. POLO: new computer program for probit analysis. *Bull. Entomol. Soc. Am.* **23**: 209-213, 1977.
- Salvado, J.C., Bensaadi-Merchermek, N. & Mouchès, C. Transposable elements in mosquitoes and other insect species. *Comp. Biochem. Physiol.* **109B** (4): 531-544, 1994.
- Sames, W.J., Bueno Jr., R., Hayes, J. & Olson, J.K. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Lower Rio Grande Valley of Texas and Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **12** (3): 487-490, 1996.
- Semeshin, V.F., Belyaeva, E.S. & Zhimulev, I.F. Electron microscope mapping of the pericentric and intercalary heterochromatin regions of the polytene chromosomes of the mutant *Suppressor of the underreplication* in the *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **110**: 487-500, 2001.
- Severson, D.W. Applications of molecular marker analysis to mosquito vector competence. *Parasitology Today* **10** (9): 336-340, 1994.
- Severson, D.W., Anthony, N.M., Andreev, O. & French-Constant, R.H. Molecular mapping of insecticide resistance genes in the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *J. Heredity* **88** (6): 520-524, 1997.
- Severson, D.W., Brown, S.E. & Knudson, D.L. Genetic and physical mapping in mosquitoes: molecular approaches. *Ann. Rev. Entomol.* **46**: 183-219, 2001.
- Severson, D.W., Mori, A., Zhang, Y. & Christensen, B.M. Chromosomal mapping of two loci affecting filarial worm susceptibility in the *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* **3** (2): 67-72, 1994.
- Sharakhov, I.V., Sharakhova, M.V., Mbogo, C.M., Koekemoer, L.L. & Yan, G. Linear and spatial organization of polytene chromosomes of the African malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Genetics* **159**: 211-218, 2001.
- Sharma, G.P., Mittal, O.P., Chaudhry, S. & Pal, V. A preliminary map of the salivary gland chromosomes of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Culicidae, Diptera). *Cytobios* **22**: 169-178, 1978.
- Sharma, G.P., Parshad, R., Narang, S.L. & Kaur, P. Salivary gland chromosomes of *Culex pipiens fatigans*. *Res. Bull. Panjab Univ. Sci.* **20**: 541-546, 1969.
- Silva-Filha, M.H., Regis, L., Nielsen-LeRoux, C. & Charles, J.F. Low level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus*. *J. Econ. Entomol.* **88**: 525-530, 1995.
- Sirivanakarn, S. & White, G.B. Neotype designation of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* **80**: 360-372, 1978.
- Smith, R.P. & Hartberg, W.K. Spermatogenesis in *Aedes albopictus* (Skuse). *Mosquito News* **34** (1): 42-47, 1974.
- Sorsa, V. *Polytene Chromosomes in Genetic Research*. Edit. Ellis Horwood Limited. Chichester, 1988. 289 p.
- Sousa, R.C. Estudo do nucléolo e da diferenciação longitudinal dos cromossomos de *Aedes aegypti*, por técnicas de coloração. Tese de Mestrado, Área de Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP. São José do Rio Preto, SP, 1998. 108 p.
- Sousa, R.C. & Bicudo, H.E.M.C. Heterochromatin banding pattern in two Brazilian populations of the *Aedes aegypti*. *Genetica* **105** (1): 93-99, 1999.
- Sucen. *Dengue*. Superintendência de Controle de Endemias, 2001. <http://www.sucen.gov.sp.br/>
- Suárez, M.F., González, R. & Morales, C.A. Temephos resistance to *Aedes aegypti* in Cali, Colombia. in: Abstracts of the 45th annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Baltimore, Maryland, December 1-5, 1996. p. 257.
- Sutton, E. Salivary gland type chromosomes in mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **28**: 268-272, 1942.
- Swanson, C.P., Merz, T. & Young, W.J. *Cytogenetics, The Chromosome in Division, Inheritance and Evolution*. Prentice-Hall, London, 1981. p. 162-169.
- Tabachnick, W.J. & Black IV, W.C. Making a case for molecular population genetic studies of arthropod vectors. *Parasitology Today* **11** (1): 27-30, 1995.
- Takaku, L., Macoris, M.L.G. & Andriguetti, M.T.M. Avaliação da suscetibilidade do *Aedes aegypti* a inseticidas por meio de bioensaios utilizando método da Organização Mundial de Saúde. Estado de São Paulo. SUCEN, Relatório de provas, laboratório do Serviço Regional 11-Marília, período 1996-1998. Novembro, 1998.
- Tewfik, H.R. & Barr, A.R. The salivary gland chromosomes of *Culex pipiens* L. *Mosquito News* **34** (1): 47-54, 1974.
- Thompson, M., Shotkoski, F. & French-Constant, R. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: conservation of the gene and resistance associated mutation with *Drosophila*. *FEBS Letters* **325** (3): 187-190, 1993.
- Tomita, T., Kono, Y. & Shimada, T. Chromosomal localization of amplified esterase genes in insecticide resistance *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26** (8-9): 853-857, 1996.

- Trager, W. Cell size in relation to the growth and metamorphosis of the mosquito. *J. Exp. Zool.* **76**: 467-489, 1937.
- Vaughan, A., Rocheleau, T. & French-Constant, R. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. *Exper. Parasit.* **87**: 237-244, 1997.
- Verma, R.K., Paknaik, S., Prasad, R. & Das, C.C. Salivary gland chromosomes of *Culex quinquefasciatus*. *Caryologia* **40** (1-2): 99-108, 1987.
- Viegas-Péquignot, E. *In situ* hybridization to chromosomes with biotinylated probes. in: *In situ hybridization: a practical approach*. D. Wilksmon (ed.). Oxford University Press, IRL Press, 137-158 p, 1992.
- Warren, A.M. & Crampton, J.M. The *Aedes aegypti* genome: complexity and organization. *Genet. Res.* **58**: 225-232, 1991.
- WHO. Vector resistance to pesticides. World Health Organization - *WHO Tech. Rep. Ser.* **818**, 63p., 1992.
- WHO. Dengue prevention and control. *WER* **77** (6): 41-48, 2002a.
- WHO. Lymphatic filariasis. *WER* **77** (17): 125-132, 2002b.
- White, G.B. Academic and applied aspects of mosquito cytogenetics. In: *Insect Cytogenetics*. R.L. Blackman, G.M. Hewitt & M. Ashburner (eds.). Blackwell Scientific, Oxford, p. 245-274, 1980.
- Wilson, T.G. Transposable elements as initiators of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* **86** (3): 645-651, 1993.
- Yan, G., Chadee, D.D. & Severson, D.W. Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics* **148**: 793-800, 1998.
- Yan, G., Christensen, B.M. & Severson, D.W. Comparison of genetic variability and genome structure among mosquito strains selected for refractoriness to a malaria parasite. *J. Heredity* **88**: 187-194, 1997.
- Yébakima, A., Yp-Tcha, M.M., Reiter, P., Bisset, J., Delay, B., Chevillon, C. & Pasteur, N. Detoxifying esterases in *Culex pipiens quinquefasciatus* from the caribbean countries. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **11** (3): 363-366, 1995.
- Zambetaki, A., Pasteur, N. & Mavragani-Tsipidou, P. Cytogenetic analysis of the Malpighian tubule polytene chromosomes of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Genome* **41**: 751-755, 1998.
- Zhimulev, I.F. Morphology and structure of polytene chromosomes. *Adv. Genet.* **34**: 1-497, 1996.
- Zhimulev, I.F. Polytene chromosomes, heterochromatin, and position effect variegation. *Adv. Genet.* **37**: 1-566, 1997.
- Zhimulev, I.F. Genetic organization of polytene chromosomes. *Adv. Genet.* **39**: 1-599, 1999.

## **ANEXO 1**

# Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos\*

## Larval susceptibility to chemical insecticides of two *Aedes aegypti* populations

Jairo Campos\* e Carlos FS Andrade

Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Unicamp. Campinas, SP, Brasil

### Descritores

*Aedes*.<sup>#</sup> Inseticidas derivados do carbamato.<sup>#</sup> Inseticidas organofosforados.<sup>#</sup> Piretróides.<sup>#</sup> Resistência a inseticidas. Controle de mosquitos.

### Resumo

#### Objetivo

A susceptibilidade dos insetos tem sido um dos mais importantes aspectos a ser monitorados em programas de saúde pública que tratam do controle de vetores. O estudo objetiva avaliar a susceptibilidade de larvas de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos em áreas sujeitas ou não a controle.

#### Métodos

Bioensaios foram realizados com concentração de diagnóstico e concentração múltipla, segundo padrão da Organização Mundial de Saúde para as coletas de larvas de *Aedes aegypti*, em uma área não sujeita – Campinas, SP – e em uma outra área sujeita – Campo Grande, MS – a tratamentos químicos de controle.

#### Resultados

Larvas de *Aedes aegypti* coletadas em Campinas indicaram resistência potencial à concentração-diagnóstico (CD) de 0,04 ppm do organofosforado temephos. O teste de concentração múltipla registrou sobrevivência de 24,5% à concentração de 0,0125 ppm. A susceptibilidade dessa mesma linhagem foi avaliada para o organofosforado fenitrothion (CD=0,08 ppm) e o piretróide cipermetrina (CD=0,01 ppm), resultando em valores normais para essas concentrações. Larvas de *Ae. aegypti* coletadas em Campo Grande mostraram susceptibilidade normal ao temephos (CD=0,04 ppm) e à cipermetrina (CD=0,01 ppm). Também foram estabelecidas as CL<sub>50</sub> e as CL<sub>95</sub> de cipermetrina 25 CE, cyfluthrin 5 CE, betacyfluthrin 1,25 SC e propoxur 20 CE para *Ae. aegypti*. Com base nos dados da linhagem-padrão Rockefeller, foram estimadas as razões de resistência de 2,9, 2,2, 2,4 e 1,3, respectivamente, pela CL<sub>50</sub>, e de 3,5, 2,6, 3,9 e 1,3 pela CL<sub>95</sub>.

#### Conclusão

Os resultados reforçam a necessidade de avaliações prévias e monitoramento da efetividade dos inseticidas que devem ser usados em programas de controle de mosquitos.

### Keywords

*Aedes*.<sup>#</sup> Insecticides, carbamate.<sup>#</sup> Insecticides, organophosphate.<sup>#</sup> Pyrethroids.<sup>#</sup> Insecticide resistance. Mosquito control.

### Abstract

#### Objective

*Insect susceptibility has been one of the most important aspects to be monitored in public health programs for vector control. The purpose of the study is to assess the*

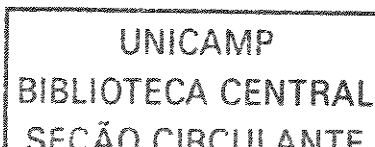
### Correspondência para/Correspondence to:

Jairo Campos  
Departamento de Zoologia, IB, Unicamp  
13084-971 Campinas, SP, Brasil  
E-mail: jairocag@unicamp.br

\*Parte dos resultados foram apresentados no I Workshop dos Pós-Graduandos da Unicamp, Campinas, setembro de 1998.

\*Aluno de Pós-Graduação da Unicamp.

Recebido em 22/9/2000. Reapresentado em 9/3/2001. Aprovado em 2/4/2001.



*susceptibility to chemical insecticides of Aedes aegypti larvae in both areas under vector control and no vector control.*

#### **Methods**

World Health Organization standard bioassays for diagnostic concentration and multiple concentrations were performed in mosquito larvae collected in an area under no vector control (Campinas, SP) and an area under vector chemical control (Campo Grande, MS), in Brazil.

#### **Results**

Potential resistance to a diagnostic concentration of temephos (DC=0.04 ppm) was registered for an *Ae. aegypti* larval population collected in Campinas. Multiple concentration tests confirmed the larvae resistance, with 24.5% of them surviving at the 0.0125 ppm concentration. Bioassays with the organophosphate fenitrothion (DC=0.08 ppm) and pyrethroid cypermethrin (DC=0.01 ppm) in the same population revealed their susceptibility to these agents. Bioassays carried out in an *Ae. aegypti* larval population collected in Campo Grande showed their susceptibility to temephos (DC=0.04 ppm) and cypermethrin (DC=0.01 ppm).  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  for cypermethrin (CE25), cyfluthrin (CE5), betacyfluthrin (SC1.25) and propoxur (CE20) were determined for *Ae. aegypti*. Using the Rockefeller standard strain values, ratios of resistance were estimated: 2.9, 2.2, 2.4 and 1.3 for  $LC_{50}$  and 3.5, 2.6, 3.9 and 1.3 for  $LC_{95}$ , respectively.

#### **Conclusion**

The findings reinforce the need for routinely monitoring pesticide efficacy as a very important step in vector control management programs.

## INTRODUÇÃO

Poucas espécies sinantrópicas de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* formam ainda hoje os maiores desafios em saúde pública. Estão implicadas na transmissão, respectivamente, da dengue, da filariose bancroftiana e da malária, de forma particularmente grave, em vários Estados brasileiros.

Os 50 milhões de casos anuais de dengue no mundo e o recrudescimento da filariose e da malária permitem questionar a competência dos responsáveis pelo controle dos vetores no terceiro mundo em relação a um freqüente emprego de inseticidas químicos. No caso da dengue, o uso desses produtos tem sido feito não só em áreas críticas, como cemitérios e ferros-velhos, mas também no ambiente domiciliar, devido à dificuldade da população em eliminar criadouros de mosquito vetor pela mudança de hábitos.<sup>2</sup> Assim, a eficiência dos inseticidas rotineiramente empregados ou o desenvolvimento de resistência por parte dos vetores devem sempre ser avaliados como medida de segurança para a população envolvida e também como uma economia para os cofres públicos.

Embora avanços importantes tenham surgido no desenvolvimento de medidas alternativas para o controle de mosquitos, os inseticidas químicos ainda se mantêm como parte vital dos programas de controle integrado. Dessa forma, diversos casos de resistência têm sido registrados no mundo para espécies de mosquitos vetores<sup>3,6,11,13,14,17</sup> e, mais particularmente,

para populações de *Aedes aegypti* no Brasil.<sup>1,9,10</sup> Além da detecção de resistência para a formulação das estratégias de controle, também é fundamental o conhecimento dos seus mecanismos. Devido ao uso no passado, por exemplo, de DDT ou de inseticidas agrícolas clorados, a resistência cruzada pode reduzir a eficácia de piretróides, mesmo antes de sua introdução no combate a um vetor.

A avaliação rápida da susceptibilidade de mosquitos a inseticidas pode ser feita no laboratório por meio de testes de dose ou concentração-diagnóstico (DD ou CD). Dose, quando se trabalha com uma quantidade conhecida em contato de uma vez com o inseto, e concentração, quando os insetos são expostos a um meio contendo o agente letal por um determinado período. Trabalhando-se com uma colônia de mosquitos susceptível putativa, a CD para larvas é determinada para vários ensaios como sendo a menor concentração com capacidade de matar todos os indivíduos em 24 horas ou a que causa 99,9% de mortalidade ( $CL_{99,9}$ ) em testes de múltiplas concentrações.<sup>3</sup> Dessa forma, a Organização Mundial da Saúde (OMS) indica, por exemplo, uma CD de 0,012 mg/litro (ppm) de temephos para larvas de *Ae. Aegypti*.<sup>18</sup>

No Brasil, tem-se suspeitado ou registrado para *Ae. aegypti* a ocorrência de resistência a organofosforados pelo menos em oito municípios do Estado de São Paulo<sup>1,10</sup> e em Goiás.<sup>9,16</sup> Devido ainda à detecção de resistência ao temephos em municípios do Rio de Janeiro, o controle passou a ser feito com *Bacillus*

*thuringiensis* var. *israelensis* e methoprene a partir de um Fórum Estadual (setembro/2000). O presente trabalho avalia a susceptibilidade de uma colônia de laboratório de *Ae. Aegypti* estabelecida na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e de amostras desse mosquito obtidas em Campo Grande, MS, município com dengue na época e sob tratamento com inseticidas.

## MÉTODOS

As larvas de *Ae. aegypti* avaliadas no presente estudo são de duas origens: da colônia *Aae*-Unicamp (Departamento de Zoologia) formada a partir das primeiras larvas coletadas em armadilhas no Campus, onde previamente não existia a espécie, e de coletas feitas no Campus da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (*Aae*-UFMS), em Campo Grande, MS (maio/98 e março/99). A colônia *Aae*-Unicamp foi iniciada ao final de 1997, assim que a espécie foi detectada no programa de monitoramento de mosquitos no Campus.\* Até essa época, não foram feitas aplicações de quaisquer produtos de controle no campus, e não havia transmissão de dengue no município. Como padrão de referência, foi usada a linhagem Rockefeller, cedida pela Suçen (Superintendência de Controle de Endemias), Marília, SP, e proveniente do CDC (Center for Disease Control) em Porto Rico.

Os inseticidas usados (concentração, nome comercial) foram: o carbamato propoxur (20%, Baygon 20 CE), os organofosforados temephos (50%, Abate 500 E) e fenitrothion (40%, Sumithion PM) e os piretróides à base de cipermetrina (25%, Ciper 250 CE e 25%, Cymperator 25 CE), à base de cyfluthrin (5%, Solfac 5CE) e de betacyfluthrin (1,25%, Responsar 1,25 SC). Esses produtos foram inicialmente diluídos para uma solução estoque à concentração de 100 ppm i.a. em água (ou acetona, para o Solfac 5 CE). A seguir, foram feitas diluições em água destilada para se chegar às concentrações de trabalho.

Para os organofosforados, foram realizados testes de concentração-diagnóstico de resistência ao temephos (CD=0,04 ppm) para as larvas de *Aae*-Unicamp e de *Aae*-UFMS. Para a colônia da Unicamp, foi ainda feito o teste de concentração múltipla (CM=0,0125 a 1,5625 ppm) a esse inseticida. A susceptibilidade ao fenitrothion só foi avaliada para larvas de *Aae*-Unicamp pela CD (=0,08 ppm).

A resistência aos piretróides foi avaliada para a cipermetrina nas larvas de *Aae*-Unicamp, em vários testes de concentração múltipla e concentrações-

diagnóstico tentativas, usando-se os produtos Ciper 250 CE e Cymperator 25 CE. Para *Aae*-UFMS, foi realizado um teste com uma concentração de Ciper 250 CE (0,01 ppm i.a.).

Para a cipermetrina, o cyfluthrin, a betacyfluthrin e o propoxur, foram estabelecidas as concentrações letais mediana (CL<sub>50</sub>) e as CL<sub>95</sub> com larvas de *Aae*-Unicamp.

Os bioensaios foram feitos seguindo os padrões previamente propostos.<sup>3,17,18</sup> Usaram-se grupos de 25 ou mais larvas de terceiro estágio tardio e/ou quarto estágio inicial em copos descartáveis, com as soluções dos inseticidas para três ou mais réplicas. As testemunhas receberam água destilada ou água com acetona (Solfac 5 CE).

Nos testes de concentração múltipla, foram usadas quatro ou mais concentrações, produzindo mortalidade entre 0% e 100%. Durante toda a exposição aos produtos, observaram-se mortalidade ou paralisia das larvas. A mortalidade final foi avaliada 24 horas após o contato com os inseticidas. Os valores médios dos dados foram submetidos à análise probit,<sup>5</sup> usando-se o programa POLO-PC.<sup>8</sup>

As razões de resistência (RR) foram calculadas para as CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub>, comparando-se os valores da colônia *Aae*-Unicamp com aqueles da linhagem susceptível Rockefeller, depois de ter verificado paralelismo nas respostas.<sup>8</sup>

## RESULTADOS

Os testes realizados com larvas da colônia *Aae*-Unicamp indicaram, para o organofosforado temephos, sobrevivência (2,86%) para a CD adotada no presente trabalho (=0,04 ppm). No teste de concentração múltipla, a sobrevivência para a concentração de 0,0125 ppm (= CD adotada pela OMS) foi alta (24,5%). Para o fenitrothion, a mortalidade foi total para a CD adotada (0,08 ppm), e não foi avaliada a resposta dessa colônia à concentração 0,04 ppm, proposta pela OMS como CD. Para a cipermetrina, dois testes de concentração múltipla com essa colônia mostraram mortalidades de 99% e 100% para a concentração 0,01 ppm. As CL<sub>50</sub> e as CL<sub>95</sub> para os piretróides cipermetrina (Cymperator 25CE), cyfluthrin, betacyfluthrin e para o carbamato propoxur, comparadas com os valores obtidos para a linhagem-padrão Rockefeller, encontram-se na Tabela.

Para a população *Aae*-UFMS, foi observada 100% de mortalidade ao temephos (CD=0,04 ppm) e à

\*Relatório Interno - VED, Zoologia/Unicamp; dados inéditos.



**Tabela** - Concentrações letais 50% e 95%, coeficiente angular e razões de resistência para larvas de *Aedes aegypti* da colônia Aae-Unicamp comparado com o padrão susceptível Rockefeller.

| Inseticida<br>linhagem/colônia | LC <sub>50</sub> (ppb i.a.)<br>(IC)* | LC <sub>95</sub> (ppb i.a.)<br>(IC) | Coef. ang.<br>(b) | LC <sub>50</sub> | RR | LC <sub>95</sub> |
|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|------------------|----|------------------|
| Cipermetrina<br>Rockefeller    | 0,626<br>(0,423-0,891)               | 1,684<br>(1,110-5,104)              | 3,8               | —                | —  | —                |
| Aae-Unicamp                    | 1,842<br>(1,569-2,116)               | 5,834<br>(4,824-7,562)              | 3,3               | 2,9              |    | 3,5              |
| Cyfluthrin<br>Rockefeller      | 1,156<br>(0,707-1,710)               | 2,360<br>(1,627-11,047)             | 5,3               | —                | —  | —                |
| Aae-Unicamp                    | 2,577<br>(1,733-4,129)*              | 6,054<br>(3,879-30,027)*            | 4,4               | 2,2              |    | 2,6              |
| Betacyfluthrin<br>Rockefeller  | 2,958<br>(2,246-3,674)               | 8,848<br>(6,473-16,289)             | 3,5               | —                | —  | —                |
| Aae-Unicamp                    | 7,010<br>(4,332-14,221)*             | 34,298<br>(16,04-406,780)*          | 2,4               | 2,4              |    | 3,9              |
| Propoxur<br>Rockefeller        | 1,123<br>(881-1,393)                 | 3,166<br>(2,331-5,591)              | 3,6               | —                | —  | —                |
| Aae-Unicamp                    | 1,462<br>(1,039-2,001)               | 4,088<br>(2,786-9,030)              | 3,7               | 1,3              |    | 1,3              |

\*IC = intervalo de confiança (p=0,05 e 0,10\*).

b = coeficiente angular.

RR = razões de resistência.

cipermetrina (CD=0,01 ppm).

Usando-se a colônia Aae-Unicamp, observou-se diminuição na potência do produto comercial Ciper 250 CE, quando foram comparadas as respostas para 0,01 ppm i.a. espaçadas pelo período de um ano (de 100% para 67%). O produto estava ainda dentro de sua validade e foi adequadamente estocado no laboratório.

## DISCUSSÃO

A colônia Aae-Unicamp pode ser considerada muito tolerante ao temephos ou mesmo resistente, quando comparada com outros trabalhos.<sup>11,13,17</sup> Embora originada de ambiente nunca exposto às aplicações de inseticidas, os mosquitos fundadores dessa colônia podem ter chegado ao campus já na condição de resistentes. Esses mosquitos foram obtidos, ao final de 1997, assim que detectados em armadilhas de larvas e após seis anos de monitoramento sem sua presença. Em meados dos anos 90, Macoris et al<sup>9</sup> trataram como modificação da susceptibilidade ao temephos a resistência de *Ae. aegypti* e, mais recentemente, relataram a resistência em populações de Campinas e Santos, SP, com RRs (CL<sub>50</sub>) de 2,7 e 6,3 (Macoris et al<sup>10</sup>). Andrade & Modolo<sup>1</sup> (1991) já haviam indicado resistência para essa espécie em Campinas, devido à sobrevivência de larvas para concentrações de 0,025 ppm i.a. e de 0,05 ppm i.a. de temephos, em coletas feitas em 1987. Para o carbamato propoxur, as RRs para Aae-Unicamp (cf. Tabela) são menores que as encontradas em populações do Caribe.<sup>6,17</sup>

Os piretróides são mais usados como adulticidas, e, por isso, a cipermetrina tem sido pouco avaliada con-

tra as larvas de *Ae. aegypti*. Ainda assim, algumas CL<sub>50</sub> foram estabelecidas para esse piretróide, tais como 0,16 ppb (a 20°C) e 0,34 ppb (a 30°C) para larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*, usando-se grau técnico.<sup>4</sup> Shajahan,<sup>15</sup> por sua vez, estabeleceu uma LC<sub>50</sub> muito maior (78 ppb i.a.) usando larvas de quarto estágio desse mosquito, mas estranhamente não considerou a colônia resistente, talvez por ter usado o produto comercial (Ripcord 10 CE) que, além de cipermetrina, contém outros inseticidas na sua formulação. De fato, as formulações podem influenciar, e uma diminuição de 5X na toxicidade foi verificada em ensaios com cipermetrina grau-técnico, quando comparados com um concentrado emulsionável 40 CE (LC<sub>50</sub>=0,045 ppb i.a. e 0,233 ppb i.a., respectivamente).<sup>7</sup> No presente trabalho, a toxicidade obtida para a cipermetrina 25 CE (1,842 ppb i.a. [Tabela]) foi menor ainda do que essas mencionadas, sugerindo resistência.

A perda de potência de um produto comercial à base de cipermetrina, detectada usando-se larvas de *Ae. aegypti*, deve-se ao fato dos piretróides em geral serem moléculas pouco estáveis. Mesmo quando armazenadas em temperaturas inferiores a 30°C e protegidas da luz, como foi o caso do produto usado, podem perder potência.

Os resultados obtidos para os mosquitos das áreas sujeitas ou não a tratamentos com inseticidas, Campo Grande e Campinas, e as conclusões apontadas em outros trabalhos asseguram a necessidade de monitoramentos rotineiros. A determinação dos coeficientes angulares e das razões de resistência (RR) permite acompanhar as mudanças temporais de susceptibilidade aos produtos químicos e orienta o plane-

jamento do manejo da resistência e das estratégias de controle a ser aplicadas. Mudanças da  $CL_{50}$  não acompanhadas por mudanças na  $CL_{95}$  podem ser manejadas com a troca temporária do produto. Ou caso seja econômico, pela substituição definitiva do produto por outros que não apresentem risco de resistência cruzada. No caso específico do temephos, a atual opção da Fundação Nacional de Saúde pelo uso do Bti e inibidores de crescimento (methoprene, por exemplo) é indispensável, mas poderia ter sido feito um rodízio monitorado desde o início dos programas oficiais de combate à dengue, em meados da década de 80, no Rio de Janeiro. No caso de *Ae. aegypti*, ao contrário do uso de inseticidas, o que melhor permite baixas populações

são as práticas como educação para mudança de hábito e a participação das comunidades.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pelo uso das instalações; à pesquisadora Maria de Lourdes G Macoris (Sucen/Marília, SP) pelo subministro da linhagem Rockefeller; à Sucen/Campinas, SP, e ao médico veterinário Paulo de Tarso G Rocha, do Centro de Controle de Zoonoses (Hortolândia, SP), pelo fornecimento de inseticidas; ao dr. José Bento do Instituto de Biologia do Exército – (Rio de Janeiro), por facilitar o programa estatístico.

## REFERÊNCIAS

1. Andrade CFS, Modolo M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in integrated control. *Rev Saúde Pública* 1991;25:184-7.
2. Andrade CFS, Souza CE, Santos LU. Dengue: avaliação do conhecimento popular e da voluntariedade em uma campanha no Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP. *Rev Fac Ciênc Méd Unicamp* 1995;5:20-2.
3. Brown AWA. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J Am Mosq Control Assoc* 1986;2:123-40.
4. Cutkomp LK, Subramanyam B. Toxicity of pyrethroids to *Aedes aegypti* larvae in relation to temperature. *J Am Mosq Control Assoc* 1986;3:347-9.
5. Finney DJ. *Probit analysis*. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 1971.
6. Georgioui GP, Wirth M, Tran H, Saume F, Knudsen B. Potencial for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Caribbean area and neighboring countries. *J Med Entomol* 1987;24:290-4.
7. Helson BV, Surgeoner GA. Efficacy of cypermethrin for the control of mosquito larvae and pupae, and impact on non-target organisms, including fish. *J Am Mosq Control Assoc* 1986;2:269-75.
8. LeOra Software. *Polo-PC, probit or logit analysis*. Berkeley (CA); 1987.
9. Macoris MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MT. Modificação da susceptibilidade de *Aedes aegypti* ao temephos. *Rev Patol Trop* 1995;24:31-40.
10. Macoris MLG, Andrighetti MT, Takaku L, Glasser C, Garbeloto VC, Cirino CB. Alteração de resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1999;33:521-2.
11. Mazzarri MB, Georgioui GP. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc* 1995;11:315-22.
12. Mebrahtu YB, Norem J, Taylor M. Inheritance of larval resistance to permethrin in *Aedes aegypti* and association with sex ratio distortion and life history variation. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56:456-65.
13. Rawlins SC, Wan JOH. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *J Am Mosq Control Assoc* 1995;11:59-65.
14. Sames WJ, Bueno Jr-R, Hayes J, Olson JK. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Lower Rio Grande Valley of Texas and Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 1996;12:487-90.
15. Shajahan RM. Effects of insecticide selection pressure on the larvae of the *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bangladesh J Zool* 1996;24:97-102.
16. Silva IG, Camargo MF, Elias CN, Silva HHG, Irata Y, Antunes SM. Provas biológicas para verificar a susceptibilidade do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) ao Cythion. *Rev Patol Trop* 1997;26:31-5.
17. Wirth MC, Georgioui GP. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *J Am Mosq Control Assoc* 1999;15:315-20.
18. World Health Organization. *Vector resistance to pesticides*. Geneva; 1992. (WHO - Technical Report Series, 818).

## **ANEXO 2**

**Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos\***

**Larval susceptibility to chemical insecticides of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations**

Jairo CAMPOS<sup>1</sup> e Carlos F.S. ANDRADE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aluno de Pós-Graduação da Unicamp

<sup>2</sup>Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Unicamp. Campinas, SP, Brasil

Trabalho realizado no Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Unicamp.

Autor para troca de correspondência:

C.F.S. Andrade, Departamento de Zoologia, IB, Unicamp 13084-971 Campinas, SP, Brasil

E-mail: cfeandra@unicamp.br, Fone: 55 (19) 3788-6317, Fax: 55 (19) 3289-3124.

\*Subvencionado pela CAPES.

\*Baseado em tese; Análise citológica de populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicinae), 2002, Unicamp.

## RESUMO

### Objetivo

A avaliação da susceptibilidade a inseticidas químicos de larvas de *Culex quinquefasciatus* provenientes de áreas sujeitas ou não a tratamentos de controle.

### Métodos

Bioensaios com concentração diagnóstico e múltipla de organofosforado e piretróides segundo padrão da Organização Mundial de Saúde para larvas de mosquitos coletadas em uma área não sujeita - Campinas, SP - e em áreas sujeitas - Campo Grande, MS e Cuiabá, MT - a tratamentos químicos de controle.

### Resultados

Em ensaios com larvas parentais de *C. quinquefasciatus* coletadas em Campinas, SP foi verificada baixa mortalidade (11%) ao piretróide cipermetrina (C.D.=0,0096 ppm i.a.). Da mesma forma foi encontrada resistência em larvas F2 pela concentração diagnóstico C.D.=0,03 ppm i.a. do piretróide ciflutrina. Larvas de *C. quinquefasciatus* coletadas em Campo Grande apresentaram sobrevivência de 6,3 e 11,9% ao temephos (C.D.=0,04 ppm i.a.). Para larvas de colônia desta espécie em Campinas foi estabelecida uma CL<sub>50</sub>=0,0076 ppm i.a. e uma CL<sub>95</sub>=0,0144 ppm i.a. de temephos. Com base nos resultados da linhagem-padrão IAL, as razões de resistência foram RR<sub>50</sub>=6,36 e RR<sub>95</sub>=4,94. Adicionalmente, o monitoramento de *Aedes aegypti* mostrou susceptibilidade ao temephos em população de campo e em população de laboratório que previamente tinha apresentado resistência.

## Conclusão

Os resultados indicam resistência a organofosforado e piretróides em *C. quinquefasciatus* e evidenciam a necessidade de avaliações e monitoramento da efetividade dos inseticidas a serem usados nos programas de controle de mosquitos.

**Descritores:** Concentrações diagnóstico. Monitoramento de mosquitos. Inseticidas organofosforados. Inseticidas piretróides. Resistência a inseticidas.

## ABSTRACT

### Objective

The purpose of the study is to evaluate the susceptibility to chemical insecticides of *Culex quinquefasciatus* larvae from areas subjected or not to control treatments.

### Method

World Health Organization standard bioassays for diagnostic concentration and multiple concentrations were performed in mosquito larvae collected in an area not subjected (Campinas, SP) and for larvae collected in areas subjected (Campo Grande, MS e Cuiabá, MT) to chemical control treatments.

### Results

Low mortality (11%) to cypermethrin (D.C.=0.0096 ppm a.i.) was detected in assays with *C. quinquefasciatus* larvae collected in Campinas, SP. Resistance to diagnostic concentration of cyfluthrin (D.C.= 0.03 ppm a.i.) was reported for a F2 larval population of *C. quinquefasciatus* from Campinas, SP. Bioassays with *C. quinquefasciatus* larvae collected in Campo Grande, MS indicated resistance to temephos (D.C.=0.04 ppm a.i.), and 6.3 and 11.9% survival to D.C was recorded.  $LC_{50}$ =0.0076 ppm a.i. and a  $LC_{95}$ =0.0144 ppm a.i. of temephos were determined for *C. quinquefasciatus* from Campinas, SP. Using the IAL-standard strain values, ratios of resistance were estimated:  $RR_{50}$ =6,36 and  $RR_{95}$ =4,94. Moreover, monitoring of temephos from field and laboratory *Aedes aegypti* populations showed susceptibility, this last population had presented previous resistance.

### Conclusion

The present findings indicate resistance to organophosphorus and pyrethroid insecticides in *C. quinquefasciatus* and make evident the need for evaluation and monitoring of pesticide efficiency, as a very important task in mosquito control programs.

**KEYWORDS:** Diagnostic concentration. Mosquito monitoring. Organophosphorus insecticide. Pyrethroid insecticides. Insecticide resistance.

## INTRODUÇÃO

As espécies sinantrópicas de mosquitos *Aedes aegypti* (Linn.) e *Culex quinquefasciatus* Say são de grande importância em Saúde Pública, por estarem implicadas na transmissão respectivamente da dengue e da filariose bancroftiana nas Américas. As recentes epidemias de dengue ocorridas no Brasil (1998, 2002) e a endemicidade da filariose são mais uma vez um desafio administrativo e público no controle de mosquitos. No Brasil já se tem indicação de resistência em populações de *C. quinquefasciatus*.<sup>2,8,10</sup> Assim, no Estado do Ceará foi registrada resistência a organofosforados para *C. quinquefasciatus* em Fortaleza.<sup>10</sup> Essa mesma espécie mostrou-se ainda resistente no Rio de Janeiro<sup>8</sup> e em São Paulo.<sup>2,3</sup> Segundo indicação da Organização Mundial da Saúde, a concentração diagnóstico (C.D.) de temephos para larvas de *Culex quinquefasciatus* é de 0,002 ppm.<sup>11</sup> O presente trabalho avalia a susceptibilidade de populações de campo e laboratório de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a um organofosforado e dois piretróides usados no controle de mosquitos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As larvas de *A. aegypti* avaliadas foram da colônia com quatro anos e meio, linhagem Aea-Unicamp (Departamento de Zoologia) e a F1 de material proveniente do próprio Campus Universitário em Campinas em maio de 2002, linhagem Aea-FEF. Para essa espécie em Cuiabá, MT, foram avaliadas larvas parentais da linhagem Aea-Cuiabá provenientes de ovos coletados em armadilhas pelo Centro de Controle de Zoonoses em 2000. Para as larvas de *C. quinquefasciatus* avaliadas, o material foi de coletas realizadas no Campus da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul em Campo Grande, MS em maio de 1998, linhagem UFMS-R e no Corrego Fundo em Cuiabá, MT em setembro de 2000, linhagem Cuiabá-R. Para *C. quinquefasciatus*, os locais de coleta em Campo Grande e Cuiabá apresentaram histórico de controle com organofosforados. Para as avaliações de *C. quinquefasciatus* em Campinas, SP utilizou-se material de coletas feitas no Campus Universitário em julho de 1999, linhagem UNI-R1 e fevereiro de 2001, linhagem UNI-R2. Até essa época, não foram feitas aplicações de quaisquer produtos de controle no Campus. Como padrão de referência, foram usadas as linhagens Rockefeller de *A. aegypti*<sup>5</sup> e a linhagem IAL-S (Instituto Adolfo Lutz) de *C. quinquefasciatus* originária de Iguape, SP em 1983.<sup>3</sup>

Os inseticidas usados foram o organofosforado temephos (Abate 500E, Larvin 1G e Fersol 1G) bem como os piretróides cipermetrina (Ciper 250CE) e ciflutrina (Solfac 5CE). A partir de uma dissolução estoque à concentração de 100 ppm i.a. desses produtos em água foram feitas diluições adicionais em água destilada para se chegar às concentrações de trabalho. Para o organofosforado temephos foram realizados testes de concentração diagnóstico (C.D.=0,012; 0,04 e 0,06 ppm i.a.) e teste de concentração múltipla (C.M.=0,00056 a 0,016 ppm i.a.). Para os piretróides, foram realizados testes de concentração diagnóstico para a cipermetrina (C.D.=0,0096) e de concentração múltipla

Susceptibilidade em mosquitos

para a ciflutrina (C.M.=0,00075 a 0,03). (cf.Tabela). Para o temephos foram estabelecidas as concentrações letais mediana (CL<sub>50</sub>) e as CL<sub>95</sub> com larvas de *A. aegypti* (Aea-Uni e Aea-FEF) e *C. quinquefasciatus* (UNI-R2).

Os bioensaios foram feitos com larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* seguindo-se padrões previamente propostos.<sup>4,5,11</sup> Usaram-se grupos de 20 larvas ou mais de terceiro e/ou quarto estágio em copos descartáveis, com as soluções dos inseticidas para três ou mais repetições. A mortalidade final foi avaliada 24 horas após o contato com os inseticidas. Os valores selecionados dos dados foram submetidos à análise probit, usando-se o programa POLO-PC. Quando pelo programa, foi verificado o paralelismo nas respostas, as razões de resistência (RR) foram calculadas para as CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub>, comparado-se os valores das linhagens padrão.

## RESULTADOS

A Tabela apresenta uma relação do material biológico utilizado e os resultados dos testes de susceptibilidade. Em ensaios com larvas parentais (linhagem UNI-R1) de *C. quinquefasciatus* coletadas em Campinas, SP foi verificada baixa mortalidade (11%) a uma formulação comercial de cipermetrina (C.D. de 0,0096 ppm i.a.). Da mesma forma foi encontrada resistência em larvas F2 (linhagem UNI-R2) para a concentração diagnóstico (C.D.=0,03 ppm i.a.) do piretróide ciflutrina. Larvas de *C. quinquefasciatus* apresentaram sobrevivência de 6,3 e 11,9% ao temephos (C.D.=0,04 ppm i.a.) na linhagem UFMS-R e de 5% (C.D.=0,012 ppm i.a.) na linhagem Cuiabá-R. Para larvas da colônia (UNI-R2) desta espécie em Campinas foi estabelecida uma CL<sub>50</sub>=0,0076 ppm i.a. e uma CL<sub>95</sub>=0,0144 ppm i.a. de temephos. Com base nos resultados da linhagem-padrão IAL-S, as razões de resistência foram de RR<sub>50</sub>=6,36 e RR<sub>95</sub>=4,94.

Avaliações para o temephos com a linhagem Aea-Cuiabá mostraram tolerância. Os testes realizados recentemente com larvas das linhagens Aea-Unicamp (colônia de 4,5 anos) e Aea-FEF (F1, de campo) de *A. aegypti* indicaram também tolerância ao temephos. Quando comparadas estas linhagens com a linhagem Rockefeller, as razões de resistência foram RR<sub>50</sub>=1,67 e RR<sub>95</sub>=1,85 para Aea-Unicamp, RR<sub>50</sub>=1,92 e RR<sub>95</sub>=1,83 para Aea-FEF; os coeficientes angulares (s) das linhas concentração-resposta foram 4,8±0,6 para Aea-Unicamp, 5,9±0,7 para Aea-FEF e 5,5±0,6 para Rockefeller (cf. Tabela).

## DISCUSSÃO

O resultado do teste com cipermetrina em *C. quinquefasciatus* (UNI-R1) levantou a suspeita de resistência a inseticidas nesta linhagem, uma vez que os registros de letalidade com cipermetrina para esta espécie, são maiores em concentrações menores: CL<sub>50</sub>=0,0016 ppm i.a. para larvas de uma linhagem susceptível e CL<sub>50</sub>=0,004 ppm i.a. para uma linhagem parental com resistência, em

populações Cubanas,<sup>1</sup> e registro de uma  $CL_{50}=0,003$  e uma  $CL_{90}=0,01\pm0,006$  ppm i.a. deste piretróide para uma colônia resistente de *C. quinquefasciatus* no Rio de Janeiro quando comparada com a  $CL_{50}=0,0008$  da linhagem de referência.<sup>8</sup>

Para o piretróide ciflutrina poucos registros de testes são conhecidos com mosquitos. Uma RR de 4 pela  $CL_{50}$  em larvas de *A. aegypti* da Venezuela foi registrada quando comparada com a linhagem padrão Rockefeller,<sup>7</sup> indicando aumento das esterases como mecanismo envolvido na resistência aos piretróides na linhagem avaliada. Provas de susceptibilidade para este inseticida em *C. quinquefasciatus* da Venezuela, não registraram resistência.<sup>9</sup> Nossas provas preliminares em *C. quinquefasciatus* (UNI-R2) indicaram resistência ao produto quando comparadas com a linhagem Rockefeller de *A. aegypti*, uma vez que em geral a sensibilidade aos inseticidas em linhagens padrão é maior para *C. quinquefasciatus* que para *A. aegypti* (Cutkomp & Subramanyam, 1986; WHO, 1992) e se comparado com as  $CL_{50}$  da ciflutrina e da cipermetrina em *A. aegypti* (Campos & Andrade, 2001) e de cipermetrina e outros piretróides em *C. quinquefasciatus*.<sup>1,8</sup>

Da mesma forma os resultados das avaliações com a linhagem UNI-R2 de *C. quinquefasciatus* indicaram resistência baixa ( $RR_{95} < 5$ ) ao temephos quando comparada com a linhagem susceptível IAL-S ( $CL_{95}=0,0029$  ppm i.a.). A dose diagnóstico de temephos usada para *C. quinquefasciatus* em Campo Grande foi 20 vezes superior àquela recomendada pela OMS,<sup>11</sup> e 13,8 vezes a  $CL_{95}$  da IAL-S, portanto sobrevivência indica real resistência da população ao inseticida. Já para as larvas de *C. quinquefasciatus* em Cuiabá foi encontrada resistência baixa a este inseticida. Quando comparados os resultados de Cuiabá com os obtidos para a linhagem padrão de *C. quinquefasciatus* (IAL) em Campinas, *a priori* teríamos uma  $RR_{95}\cong 4$ .

Embora no presente trabalho não tenha sido identificado o mecanismo metabólico envolvido na resistência aos organofosforados, elevação das esterases já foi registrado em populações brasileiras de *C. quinquefasciatus*,<sup>3,10</sup> e temos observado marcadores cromossômicos de amplificação dos genes de esterases associados com resistência aos organofosforados nas linhagens UNI-R1 e UNI-R2 (Campos *et al.*, *no prelo*). Desta forma, as estratégias de controle de *C. quinquefasciatus* com organofosforados e piretróides em Campinas, Campo Grande e Cuiabá, devem monitorar previamente sua eficiência. O desenvolvimento de resistência em estas populações pode estar associado a uso indiscriminado de inseticidas no ambiente domiciliar e agrícola, além dos tratamentos específicos em Campo Grande e Cuiabá.

Os resultados das avaliações com o temephos em larvas de *Aedes aegypti* de Cuiabá, MT, não mostraram resistência (R) quando comparadas com a linhagem padrão Rockefeller. O monitoramento das populações de laboratório (4 anos após) e campo de *A. aegypti* em Campinas não mostraram a resistência registrada em 1998 à C.D.=0,04 ppm i.a. (Campos & Andrade, 2001). Por causa das pequenas diferenças nas respostas ao temephos entre as duas populações e a



sobreposição dos intervalos de confiança, pode-se considerar que não há diferença entre as concentrações letais das linhagens. Assim, a susceptibilidade ao temephos 1G em *A. aegypti* não estaria comprometida, pelo menos para uso se necessário em pontos não estratégicos como os avaliados em Campo Grande, Campinas e Cuiabá. Avaliações dos produtos comerciais são viáveis e devem ser uma prática no monitoramento como demonstrado aqui.

Os resultados obtidos para as áreas sujeitas (Campo Grande e Cuiabá) ou não (Campinas) a tratamentos com inseticidas, evidenciaram resistência baixa a estes produtos em *C. quinquefasciatus* e susceptibilidade em *A. aegypti*. Desta forma quando populações de campo são avaliadas e comparadas com populações padrão, as mudanças na resposta aos inseticidas ( $CL_{50}$  e  $CL_{95}$ ) da ordem de até três vezes nas razões de resistência (RR) podem ser consideradas como tolerância; de 3 a 5 vezes, resistência baixa; de 5 a 10, moderada; de 10 a 20, média e acima de 20, uma resistência alta. Dito conhecimento pode ajudar no planejamento adequado do manejo da resistência e as estratégias de controle a serem aplicadas caso a caso em cada ponto sem comprometer a eficiência dos produtos.

## AGRADECIMENTOS

Às Universidades Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e Estadual de Campinas (UNICAMP), ao Centro de Controle de Zoonoses (Cuiabá, MT) pelo uso das instalações e laboratórios. Ao médico veterinário Gerson Blatt e aos biólogos Leny Bezerra da Costa e Benedito Oscar Fernandes de Campos do CCZ-Cuiabá, MT pela colaboração. Ao laboratório de Culicidologia e ao Dr Délsio Natal da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP) por terem disponibilizado a linhagem IAL.

## REFERÊNCIAS

1. Bisset J, Rodríguez M, Soca A. Cross-resistance to malathion in Cuba *Culex quinquefasciatus* induced by larval selection with delatmethrin. *Med Vet Entomol* 1998;12:109-112.
2. Bracco JE, Dalbon M, Marinotti O, Barata JMS. Resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos em população de *Culex quinquefasciatus*. *Rev. Saúde Pública* 1997;31:182-183.
3. Bracco JE, Barata, JMS, Marinotti O. Evaluation of insecticide resistance in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1999;94:115-120.
4. Brown AWA. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J Am Mosq Control Assoc* 1986;2:123-140.
5. Campos J & Andrade CFS. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Rev Saúde Pública* 2001;35:232-236.
6. Cutkomp LK, Subramanyam B. Toxicity of pyrethroids to *Aedes aegypti* larvae in relation to temperature. *J Am Mosq Control Assoc* 1986;3:347-349.
7. Fernández DM, Rodríguez M, Bisset J, Perez E. Identification of esterase resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from Carabobo State, Venezuela. in: *Summaries of Mosquito Vector Control and Biology in Latin America - A Ninth Symposium*, St. Louis, MO, February 1999. *J Am Mosq Control Assoc* 1999;15:421.
8. González T, Bisset JA, Díaz C, Rodríguez MM, Brandolini MB. Insecticide resistance in a *Culex quinquefasciatus* strain from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:121-122.
9. Reyes-Lugo, M. & Neus, M. Insecticide resistance in *Culex quinquefascitus* Say 1823 (Diptera: Culicidae) from Zulia State, Venezuela. *Rev Cient-Fac Cienc Veter* 2000;10:441-447.

10. Yébakima A, Yp-Tcha MM, Reiter P, Bisset J, Delay B, Chevillon C, Pasteur N. Detoxifying esterases in *Culex pipiens quinquefasciatus* from the caribbean countries. *J Am Mosq Control Assoc* 1995;11:363-366.
11. World Health Organization. Vector resistance to pesticides. Geneva; 1992. (WHO - Technical Report Series, 818).

Tabela. Relação de locais de coleta, época, espécies e resultados das avaliações da susceptibilidade a inseticidas empregados no controle de mosquitos.

| Linhagem / Data        | Espécie e estágio larval           | Tipo de ensaio <sup>1</sup> | Inseticida <sup>2</sup> | Concentração ppm i.a. (mg/l) | % Mortalidade final (DP)                                                        |
|------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| UFMS-R /maio-98        | <i>C. quinquefasciatus</i> 3° e 4° | C.D. 2X                     | TEM 500E                | 0,04                         | 88,09 (14,87) e 93,71 (5,55)                                                    |
| UNI-R1 /julho-99       | <i>C. quinquefasciatus</i> 4°      | C.D.                        | CIP 250CE               | 0,0096                       | 11,17 (6,26)                                                                    |
| Cuiabá-R /4-set-00     | <i>C. quinquefasciatus</i> 4°      | C.D.                        | TEM 1 G                 | 0,012; 0,024 e 0,06          | 95 a 100                                                                        |
| Aea-Cuiabá 4-set-00    | <i>A. aegypti</i> 3°               | C.D.                        | TEM 1 G                 | 0,012 e 0,024                | 100                                                                             |
| Rockefeller /4-set-00  | <i>A. aegypti</i> 3°               | C.D.                        | TEM 1 G                 | 0,012 e 0,024                | 100                                                                             |
| UNI-R2 /17-mar-01      | <i>C. quinquefasciatus</i> 4°      | C.M.                        | CYF 5 CE                | 0,002 a 0,016                | 0,42 (0,8) a 27,4 (12,3)                                                        |
| Rockefeller /17-mar-01 | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°          | C.M.                        | CYF 5 CE                | 0,0005 a 0,004               | 4,3 (0,9) a 96,1 (3,9)                                                          |
| UNI-R2 /24-mar-01      | <i>C. quinquefasciatus</i> 4°      | C.M.                        | CYF 5 CE                | 0,012 a 0,03                 | 12,3 (5,9) a 47,5 (9,6)                                                         |
| Rockefeller 24-mar-01  | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°          | C.M.                        | CYF 5 CE                | 0,00075 a 0,006              | 12,8 (7,9) a 100                                                                |
| UNI-R2 /6-jun-02       | <i>C. quinquefasciatus</i> 3° e 4° | C.M.                        | TEM 1 G                 | 0,004 a 0,016                | CL <sub>50</sub> =7,6 (6,7-9) <sup>3</sup><br>CL <sub>95</sub> =14,4(11,3-24,8) |
| IAL-S 6-jun-02         | <i>C. quinquefasciatus</i> 3° e 4° | C.M.                        | TEM 1 G                 | 0,00056 a 0,004              | CL <sub>50</sub> =1,2 (0,9-1,5)<br>CL <sub>95</sub> =2,9(2,1-5,6)               |
| Aea-Unicamp /15-jun-02 | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°          | C.M.                        | TEM 1 G                 | 0,005 a 0,02                 | CL <sub>50</sub> =9,8 (8,6-11)<br>CL <sub>95</sub> =21,7(18,1-28,8)             |
| Aea-FEF /15-jun-02     | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°          | C.M.                        | TEM 1 G                 | 0,005 a 0,02                 | CL <sub>50</sub> =11,3 (8,8-14,9)<br>CL <sub>95</sub> =21,4(15,8-48,3)          |
| Rockefeller 15-jun-02  | <i>A. aegypti</i> 3° e 4°          | C.M.                        | TEM 1 G                 | 0,0025 a 0,01                | CL <sub>50</sub> =5,9 (4,9-6,9)<br>CL <sub>95</sub> =11,7(9,3-18)               |

<sup>1</sup> C.D.= Concentração Diagnóstico, C.M.= Concentrações Múltiplas. <sup>2</sup> TEM= temephos, CIP= cipermetrina. CYF= ciflutrina. (DP) desvio padrão. <sup>3</sup> Partes por bilhão (Intervalo de Confiança 95%, ppb).

## **ANEXO 3**

**A technique for preparing polytene chromosomes from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicinae)**

***J. Campos<sup>1</sup>, C.F.S. Andrade<sup>1</sup> & S.M. Recco-Pimentel<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>Dept. of Zoology and <sup>2</sup>Dept. of Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, P.O. Box. 6109, Campinas, SP CEP 13084-971, Brazil. e-mail: jairocag@yahoo.com, cfeandra@unicamp.br, shirlei@unicamp.br <sup>1</sup>Doctoral Fellowship from Capes.

**Abstract**

Polytene chromosome preparations were obtained from larval, pupal and adult female Malpighian tubules of *Aedes aegypti*. The Malpighian tubules of the pupae (0-4 hours old) from larvae reared at 20°C provided the best cytogenetic analysis. The interaction of nucleic acids and proteins that influence the spreading of the chromosomes could be reduced with the preparation technique of the sheets submitted to a stronger treatment starting with the hypotony of tissue and successive bathings with acetic acid. A simple technique should facilitate molecular cytogenetics used in the location of resistance and vector competence genes.

**Introduction**

Studies of the cytogenetic and molecular biology of Anophelinae species can be performed by the analysis of polytene chromosome structure. Preparation of polytene chromosomes in Culicinae species is very difficult and the available techniques are not always reproducible. Although such analyses remained refractory for some species of mosquitoes (e.g. *Aedes aegypti*), Malpighian tubule polytene chromosomes are an excellent material for detailed approaches in the cytogenetic analysis of *Culex quinquefasciatus* (Campos et al., 2000). In the present study, polytene chromosome slides were obtained from pupal Malpighian tubules of *A. aegypti* and compared with published data.

**Materials and methods**

*Aedes aegypti* mosquito eggs (Rockefeller strain) were collected from the laboratory in Marília, São Paulo State, during February 2000 and a colony was maintained at the State University of Campinas, SP, Brazil. Polytene chromosome preparations were obtained using larval, pupal and adult female Malpighian tubules. The individuals were reared under standard conditions (20±2°C, 70±10% RU). For chromosome preparation, eggs were removed from a cage and put in distilled water at 20°C. The larvae were fed *ad libidum* with yeast. Abdomens of larvae, pupae or adults were dissected in Ringer's solution and the Malpighian tubules transferred to a siliconized coverglass with distilled water at 3°C for 1-2 min, then removed and placed in a drop of modified Carnoy's fixative (3:1 95% ethanol: acetic acid) for 1 to 3 min and 60-100% acetic acid added for 2 to 4 min, subsequently stained with 1% aceto-orcein for 4-5 min. The Malpighian tubule cells were dissected in added lactoacetic acid (85% lactic acid-100% acetic acid, 0.55: 0.45) or lactic acid 80%; cell cytoplasmatic components were removed and the chromosomes left for a minimum of 20 to 48 h at 3°C. Finally 60-100% acetic acid

was also added. Squashing was effected by tapping gently and patiently to spread the chromosomes. Several bathings of 60% acetic acid in the slide allowed good spreading of the chromosomes with complete analysis of the banding pattern. The squashed preparations were sealed with nail polish and observed under a photomicroscope. The pupal chromosomes were compared with larval (salivary glands) chromosomes (Sharma et al., 1978).

## Results and Discussion

The Malpighian tubules of the pupae (0-4 hours old) from larvae reared at 20°C provided the best cytogenetic analysis. White, gray or creme pupae with a transparent thorax (<30 min) are the best material. Conspicuous chromosomal banding pattern, amorphous regions and puffs characterized the pupal Malpighian tubule polytene chromosomes of *Aedes aegypti*. The pupal chromosomes, when compared with larval chromosomes (Sharma et al., 1978), show certain technical advantages: 1. Pupal Malpighian tubules are very easy to dissect in comparison with salivary glands of larvae and 2. Higher band resolution in the pupal chromosomes is obtained. The figures show the pupal chromosomes.

The polytene chromosomes obtained in the pupal Malpighian tubules showed fragile structures (Figure 1), however the availability of suitable slides was 58 out of the approximately 1,383 slides. Chromosome polytene physical maps aimed at correlating with genetic linkage maps could be developed, relying on fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques. This is being done for *A. aegypti* with the metaphase chromosomes (Brown & Knudson, 1997; Brown et al., 1995; Brown et al., 2001). The Malpighian tubules are the developmental site for *Dirofilaria immitis*. Despite the importance Malpighian tubules as developmental sites, efforts to discover the gene(s) or the gene product(s) responsible for susceptibility or refractoriness to filarial worm infection in this site have not been extensive (Beerntsen et al., 2000). *A. aegypti* can easily be reared under laboratory conditions and the procedures to obtain polytene chromosomes from its pupal stage have been well described. In this way and based on the approaches already effected with insecticide resistance probes, research on vector competence and the location of the any cytogenetic markers should be explored. Polytene chromosomes provide a distinct advantage in generating and integrating genetic and physical maps (Severson et al., 2001).

The technical difficulties in the preparation of polytene chromosomes of *Aedes* genus are evident (Sharma et al., 1978; Sharma et al., 1986) and are reflected in the lack of papers dealing with this material. Several problems have been already suggested as causal of the low quality of polytene chromosome preparations which could be suitable for analysis in *Aedes* and *Culex*: 1. Sutton (1942) suggested the presence of weak points, which can be assumed now as being heterochromatic areas (Redi et al., 2001) where the chromosomes break easily (Semeshin et al, 2001). 2. The great length of chromosome arms (Aldighieri, 1961; Kitzmiller, 1963) that is in fact different for species of Culicinae

and Anophelinae (Severson et al, 2001) and should influence chromatic interactions. 3. The inter- and intra-/ chromosomal connections, or ectopic pairing (French, 1962; Verma et al., 1987) resulting from regions of highly repetitive DNA (Rai & Black IV, 1999, Severson et al., 2001). 4. Surface adhesions (Rai, 1967 *apud* Sharma et al., 1978) that have been observed in *Anopheles funestus* and is dependent on  $\beta$ -heterochromatin (Sharakhov, 2001) and 5. Asynapsis observed in the polytene complement (Zambetaki *et al.*, 1998).

The larvae reared in low temperature, 18-20°C (Kanda, 1970; Sharma et al., 1978) and the larvae's physiological characteristics (Verma et al., 1987) can improve the chromosome spread and the quality of the salivary gland chromosome preparations. This was verified here with Malpighi tubule chromosomes of *A. aegypti*. Additional observations in preparations of Malpighi tubule chromosomes of *A. albopictus* and *Ochlerotatus fluviatilis* allowed the verification that the genome size and the polyteny degree can influence the quality of the preparations. For pupae of *A. albopictus*, the preparations were of low quality, very inferior to those of *A. aegypti*, while for larvae of *O. fluviatilis* the preparations presented good polyteny with clear resolution of bands and well-spread chromosomes, superior to those found for *A. aegypti*. It is known that Brazilian populations of *A. albopictus* present a larger genome (Kumar & Rai, 1990) than that of *A. aegypti* and another species of *Aedes* (Rao & Rai, 1987b; Knudson et al., 1996). This and the low polyteny observed have surely determined the poorly quality of the *A. albopictus* preparations that present a smaller polytene nucleus in Malpighi tubules, without spread chromosomes. On the other hand in *O. fluviatilis*, the degree of polyteny observed was larger than that registered in this work for *A. aegypti*. This species that can transmit the wild yellow fever (Funasa, 1999) perhaps it possesses a smaller genome than that of *A. aegypti*.

It has been suggested that the amount of heterochromatin and its distribution in the chromosomes are the cause for lack of band resolution in the polytene chromosome preparations and that it restricts their spreading (Knudson et al., 1996; Rai & Black IV, 1999). But the results presented here are not in agreement with this idea. It can be assumed that, rather than a direct involvement of the heterochromatin, the determining factor for good polytene chromosome preparations from Culicinae has to do more with the polyteny degree, the physiologic state and the techniques used. The first can be particular for the strain, therefore genetically determined, as it was observed for *C. quinquefasciatus* strains (Campos *et al.*, *submitted*). The influence of the physiologic state on the spread is not only related to the polyteny degree but also to the development in favorable environmental conditions, low larval density for volume and surface of the medium, feeding and temperature can determine that RNA and specific nuclear proteins have differential expression facilitating the chromosome spread. The interaction of nucleic acids and proteins, that also influence the chromosome spread, could be reduced in the technique preparation of the sheets by a stronger treatment starting with the hypotony of tissue and successive bathings with acetic acid. Acid treatment helps for well spread chromosomes of *C. quinquefasciatus* (Achary, 1994) and this can be associated

with acid proteins that are easily extracted with the treatment. In the case of lack of spreading in *A. aegypti*, this can have to do mostly with non acid proteins (non-histones).

From the molecular view point, based in the above results, it can be affirmed that more than the amount of heterochromatin, the genome size, the interspersed pattern (repetitive DNA / single DNA) and the protein composition are factors that influence the spreading of chromosomes. *C. quinquefasciatus*, has an intermediate genome size and an intermediate to short- or long-interspersed pattern, while *A. aegypti* possesses a larger genome with a short interspersed pattern (Severson et al., 2001). The percentage of repetitive DNA of *C. quinquefasciatus* is larger than in *A. aegypti*, 80% against about 60% (Warren & Crampton, 1991; Knudson et al., 1996; Brown et al., 2001). Thus, the statement of Severson et al. (2001) that the problem of lack of polytene chromosome spreading is caused by highly ectopic pairing, resulting from areas of highly repetitive DNA, is at least, partly unsustainable because of the observation of better spreading in *C. quinquefasciatus* than in *A. aegypti*.

Evolutionary relationships can be traced by comparing changes in the genome organization (Heckel, 1993; Knudson et al., 1996; Munstermann & Conn, 1997). Because the chromosomes maintain a linear sequence of DNA base pairs, species with smaller differences in linear sequence can be considered more closely related. Thus, for very conserved genes, chromosome homologies can be traced at higher a taxonomic level (Heckel, 1993). Besides, the conservation of chromosome arms among higher taxa is relatively common in Diptera (Munstermann & Conn, 1997). Comparative linkage maps for the mosquitoes *C. pipiens* and *A. aegypti*, indicated that the chromosome 1 is highly conserved between the two species and several homologous loci exist among the arms of the chromosomes 2 and 3 (Mori et al., 1999). Starting with the present work, a comparison will be made between the chromosome maps of *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* establishing analogies with those of the linkage maps. In this way, the association of arms can be evaluated among these species by means of the existence of homologies of chromosome landmarks and band groups.

## Conclusion

The pupal Malpighian tubule polytene chromosomes showed conspicuous structural characteristics suitable for their use in the location of resistance and vector competence genes. The chromosome maps are fundamental tools to provide good cytogenetic analyses of this mosquito, which is of medical and economic importance.

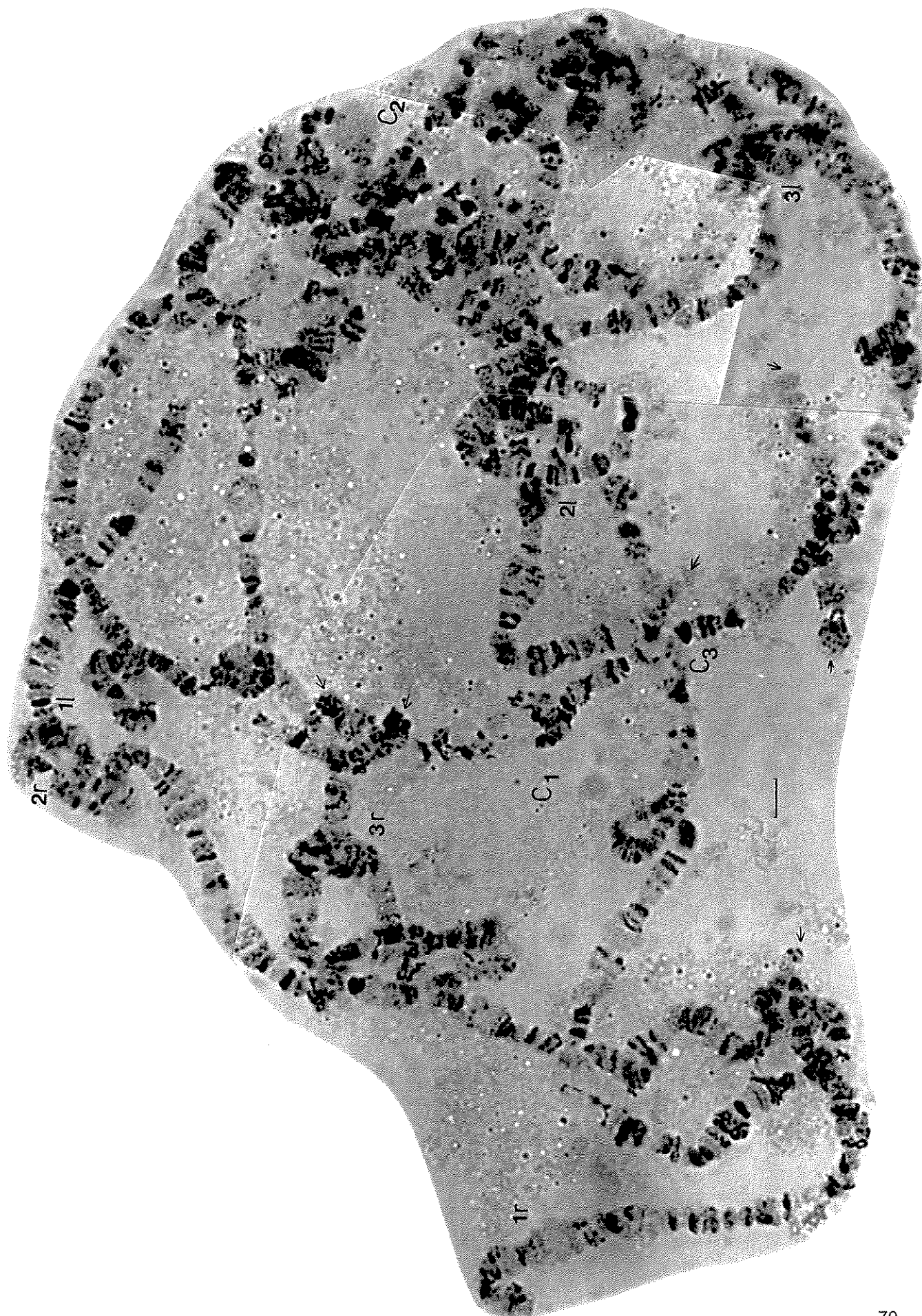
## References

- Achary, P.M.R. A simple technique for the preparation of polytene chromosomes from *Culex quinquefasciatus*. *J. Am. Mosq. Cont. Ass.* **10**: 112-114, 1994.
- Aldighieri, J. Contribution a l'etude de la structure des chromosomes salivaires chez *Aedes aegypti*. *Bull. Soc. Path. Exot.* **54**: 712, 1961.



- Beerntsen, B.T., James, A.A. & Christensen, B.M. Genetics of the mosquito vector competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64** (1): 115-137, 2000.
- Brown, S.E. & Knudson, D.L. FISH landmarks for *Aedes aegypti* chromosomes. *Insec. Mol. Biol.* **6** (2): 197-202, 1997.
- Brown, S.E., Menninger, J., Difillipantonio, M., Beaty, B.J., Ward, D.C. & Knudson, D.L. Toward a physical map of *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* **4** (3): 161-167, 1995.
- Brown, S.E., Severson, D.W., Smith, L.A. & Knudson, D.L. Integration of the *Aedes aegypti* mosquito genetic linkage and physical maps. *Genetics* **157**: 1299-1305, 2001.
- Campos, J. Andrade, C.F.S. & Recco Pimentel, S.M. Polytene chromosomes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). In: XXI International Congress of Entomology, Foz do Iguaçu, August 20th to 26th, 2000. Poster, Abstract Book I, p. 564.
- French, W. L., Baker, R.H. & Kitzmiller, J.B. Preparation of mosquito chromosomes. *Mosquito News* **22** (4): 377-383, 1962.
- Funasa. *Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela*. Brasília: Ministério da Saúde - Fundação Nacional de Saúde, 60 p., 1999.
- Heckel, D.G. Comparative genetic linkage mapping in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **38**: 381-408, 1993.
- Kanda, T. The salivary gland chromosomes of *Culex pipiens fatigans* Wiedemann. *Jpn. J. Exp. Med.* **40**: 335-345, 1970.
- Kitzmiller, J.B. Mosquito cytogenetics. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **29**: 345-355, 1963.
- Knudson, D.L., Zheng, L., Gordon, S.W., Brown, S.E. & Kafatos, F.C. Genome organization of vectors. In: *The biology of disease vectors*. B.J. Beaty & W.C. Marquardt (eds.). University Press of Colorado, Colorado, p. 175-214, 1996.
- Kumar, A. & Rai, K.S. Intraspecific variation in nuclear DNA content among world populations of a mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). *Theor. Appl. Genet.* **79**: 748-752, 1990.
- Mori, A., Severson, D.W. & Christensen, B.M. Comparative linkage maps for the mosquitoes (*Culex pipiens* and *Aedes aegypti*) based on common RFLP loci. *J. Hered.* **90** (1): 160-164, 1999.
- Mustermann, L.E. & Conn, J. Systematics of mosquito disease vectors (Diptera, Culicidae): impact of molecular biology and cladistic analysis. *Ann. Rev. Entomol.* **42**: 351-369, 1997.
- Rai, K.S. Cytogenetics of *Aedes aegypti*. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **36**: 563-565, 1967.
- Rai, K.S. & Black IV, W.C. Mosquito genomes: structure, organization, and evolution. *Adv. Genet.* **41**: 1-33, 1999.
- Rao, P.N. & Rai, K.S. Inter and intraspecific variation in nuclear DNA content in *Aedes* mosquitoes. *Heredity* **59**: 253-258, 1987.
- Redi, C.A., Garagna, S., Zacharias, H, Zuccotti, M. & Capanna, E. The other chromatin. *Chromosoma* **110**: 136-147, 2001.
- Semeshin, V.F., Belyaeva, E.S. & Zhimulev, I.F. Electron microscope mapping of the pericentric and intercalary heterochromatin regions of the polytene chromosomes of the mutant *Suppressor of the underreplication* in the *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **110**: 487-500, 2001.
- Severson, D.W., Brown, S.E. & Knudson, D.L. Genetic and physical mapping in mosquitoes: molecular approaches. *Ann. Rev. Entomol.* **46**: 183-219, 2001.
- Sharakhov, I.V., Sharakhova, M.V., Mbogo, C.M., Koekemoer, L.L. & Yan, G. Linear and spatial organization of polytene chromosomes of the african malaria mosquito *Anopheles funestus*. *Genetics* **159**: 211-218, 2001.
- Sharma, G.P., Mittal, O.P., Chaudhry, S. & Pal, V. A preliminary map of the salivary gland chromosomes of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Culicidae, Diptera). *Cytobios* **22**: 169-178, 1978.
- Sharma, G.P., Chaudhry, S. & Safaya, A. Polytene chromosomes *Aedes vittatus* Bigot (Culicidae: Diptera). *Microb. Letters* **33**: 153-156, 1986.
- Sutton, E. Salivary gland type chromosomes in mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **28**: 268-272, 1942.
- Verma, R.K., Paknaik, S., Prasad, R. & Das, C.C. Salivary gland chromosomes of *Culex quinquefasciatus*. *Caryologia* **40** (1-2): 99-108, 1987.
- Warren, A.M. & Crampton, J.M. The *Aedes aegypti* genome: complexity and organization. *Genet. Res.* **58**: 225-232, 1991.
- Zambetaki, A., Pasteur, N. & Mavragani-Tsipidou, P. Cytogenetic analysis of the Malpighian tubule polytene chromosomes of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Genome* **41**: 751-755, 1998.

**Figure 1.** Pupal chromosome maps for the polytene chromosomes from *Aedes aegypti*, female, ~1 hour 18°C / Aea-Rockefeller. C, Centromere; r, right arm; l, left arm. The arrows indicate break on the arms. Bar= ~4µm.



## **ANEXO 4**

## POLYTENE CHROMOSOMES OF *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: CULICINAE)

J. Campos<sup>1</sup>, C.F.S.Andrade<sup>1</sup> & S.M. Recco-Pimentel<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Dept. of Zoology and <sup>2</sup>Dept. of Cell Biology, Biology Institute, State University of Campinas, P.O. Box. 6109, Campinas, SP CEP 13084-971, Brazil. e-mail: cfeandra@unicamp.br. <sup>1</sup>Doctoral Fellowship from Capes.

### Abstract

Dipteran polytene chromosomes are an excellent material for detailed approaches in species complex determination as well as structural and functional cytogenetics. The species status in the *Culex pipiens* complex has been controversial and the use of polytene chromosomes for cytogenetic analysis has been difficult for the Culicinae subfamily due to methodological problems. The pupal Malpighian tubule polytene chromosomes were obtained for *C. quinquefasciatus* collected and maintained at the University of Campinas campus. The chromosome maps for this species were constructed and compared with published data for *C. pipiens pipiens* and *C. p. quinquefasciatus*. Although the banding patterns are conserved among subspecies, analysis of structural variations for bands and interbands showed differences apparently related to their physiological stages and ecogeographical strain. Configurations for the centromeric regions occurring among larval and pupal chromosomes showed more similarities than those between pupal and adult chromosomes. The Malpighian tubule polytene chromosomes of young (0 to 12 hours, 20°C) and old (20 to 42 hours, 28°C) pupae provided the cytogenetic analysis. Their use for *in situ* hybridization of vector competence probes is discussed.

Key words: cytogenetic, *Culex pipiens*, insecticide resistance, mosquitoes.

### Introduction

Studies on the cytogenetic and molecular biology of Culicidae can be performed by the analysis of their polytene chromosome structure. The *Culex pipiens* is a species complex (Sirivanakarn & White, 1978; Hemingway & Karunaratne, 1998) and the forms most often mentioned in the *Culex pipiens* complex, including *C. pipiens* Linnaeus, 1758 (s.str.), *C. p. quinquefasciatus* Say, 1823 and *C. p. molestus* Forskal, 1775, which differ from each other primarily in the physiology, behavior, and distribution (Olejníček & Gelbic, 2000). The salivary gland polytene chromosomes have been used for cytogenetic analyses of this complex (Sutton, 1942; Kitzmiller & Clark, 1952; Kitzmiller & Keppler, 1961; Denन्हöfer, 1968; Kanda, 1970; Tewfik & Barr, 1974; Verma *et al.*, 1987). Although such analyses can be refractory for some species of mosquitoes (e.g. *Aedes aegypti*), Malpighian tubule polytene chromosomes are an excellent material for detailed approaches in the cytogenetic analysis of *C. quinquefasciatus* (Achary, 1994) e *C. pipiens* (Zambetaki *et al.*, 1998). Currently, salivary gland chromosomes are being evaluated for gene location in relation to insecticide resistance in *Culex* molecular cytogenetic studies (Heyse *et al.*, 1996; Tomita *et al.*, 1996). In the present study, the pupal Malpighian tubule polytene chromosome maps were obtained for *C. quinquefasciatus* and compared with published data for *C. pipiens* and for *C. quinquefasciatus*.

## Materials and methods

The mosquitoes were collected during July 1999 and February 2001, and the colonies (Unicamp resistance strains - UNI-R1 and UNI-R2) were maintained at the State University of Campinas, São Paulo, Brazil. Polytene chromosome preparations were obtained using larval, pupal and adult female Malpighian tubules. The individuals were reared under standard conditions ( $28\pm1^{\circ}\text{C}$ ,  $70\pm10\%$  RU) or variations ( $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ ), dissected in Ringer's solution and the Malpighian tubules transferred to a siliconized coverglass with aceto-alcohol (1:3) for 60-70 sec and subsequently stained with 2% lacto-aceto-orcein for 2-5 min. The cells were dissected in aceto-alcohol (1:3), lactoacetic acid (85% lactic acid-100% acetic acid, 0.55: 0.45) added and finally 60% acetic acid was also added. This process was completed in about  $10\pm2$  min. Squashing was carried out by tapping gently and patiently. The construction of the pupal chromosome maps was based on published photographs and line drawings of *C. pipiens* and *C. quinquefasciatus* polytene chromosomes. The pupal maps were compared with larval (salivary glands) and adult (Malpighian tubules) maps or photographs of *C. pipiens* (Dennhöfer, 1968,1974; Tewfik & Barr, 1974; Zambetaki *et al.*, 1998; Heyse *et al.*, 1996) and *C. quinquefasciatus* (Kanda, 1970; Verma *et al.*, 1987; Achary, 1994; Heyse *et al.*, 1996). The IAL-standard susceptible strain (Adolfo Lutz Institute, IAL-S) originated from Iguape, SP-1983 (Bracco *et al.*, 1999) was used as control.

## Results

The Malpighian tubules of the pupae ( $2\pm2$  hours,  $20^{\circ}\text{C}$ ;  $24\pm2$  and  $30\pm2$  hours old,  $28^{\circ}\text{C}$ ) provided the best cytogenetic analysis. The photographic maps of the polytene chromosomes are presented in Figs. 1 and 2. The chromosomes are numbered as 1 for the shortest, 2 for the intermediate and 3 for the longest of the polytene chromosomes. The polytene chromosome complement is divided into 70 sections according to the others polytene maps of *C. pipiens* complex (Kanda, 1970; Tewfik & Barr, 1974; Verma *et al.*, 1987; Zambetaki *et al.*, 1998). The labeling of maps in the present work is based on the studies of Dennhöfer (1968,1974) with 16, 25 and 29 sections for 1, 2 and 3 chromosomes, respectively.

The Malpighian chromosome complement consists of the three pairs of synapsed, banded chromosomes, but asynaptic regions have been observed (3,4-1R; 26-2R, 30-2L; 62/63-3L). Conspicuous centromeric regions (Ces), amorphous regions and puffs, characterized the pupal Malpighian tubule polytene chromosomes of *C. quinquefasciatus*. The nuclear organizer region (NOR) is located in the 10C section. Other puffs are located in the 4C, 11A, 12D, 36A, 53C, 55D and 61D sections.

Figures 1 and 2 show the pupal chromosome maps for the three polytene chromosomes. Figure 3 shows a third adult Malpighian tubule polytene chromosome (21 day old female). The arrows in figures 2 and 3 indicate the areas with differential expression.

## Discussion

The banding pattern of polytene chromosomes obtained in the pupal chromosomal maps of *C. quinquefasciatus*, showed close similarities to those of maps, photographs and/or drawings of *C. pipiens* and *C. quinquefasciatus* obtained from larval and adult chromosomes. In the present comparisons we are considering two subspecies, three stages (larval, pupal and adult) and two organs (the salivary glands and the Malpighian tubules). The structural differences were apparently due to characteristic physiological processes related to two organs and three stages rather than to real differences among the forms (i.e. *C. pipiens* and *C. quinquefasciatus*).

Configurations for the banding pattern occurring among larval (salivary glands) and pupal (Malpighian tubules) chromosomes, showed more similarities than those between pupal and adult chromosomes (Malpighian tubules). More similarities were seen in the centromeric regions 2 and 3 of pupal and adult *C. quinquefasciatus* than between pupal *C. quinquefasciatus* and adult *C. pipiens*. The similarity of the three centromeric regions for the larval and pupal chromosomes was greater than that for pupal and adult chromosomes independent of subspecies and strain.

Marked differences in the pupal band pattern were observed in relation to larval and adult maps, especially in the 2L (sections 34 to 36), 3R (section 53) and 3L (section 55/56) arms. The band pattern of sections 57-58 (3L arm) was different in the adult *C. pipiens* maps. Differences in the band patterns also might be the result from ecogeographical isolation between strains. Section 31-2L shows an amorphous area or one huge puff in the UNI-R1 and UNI-2 strains. In the IAL-S strain this area is one single band (Fig. 4). In field strains (Cuibá, MT, Campo Grande, MS-Brazil and Palmira, VA-Colombia) this amorphous area also was observed (not showed). This is the region where the esterase genes associated with resistance are located in *C. quinquefasciatus* (Heyse *et al.*, 1996) and *C. pipiens* (Zambetaki *et al.*, 1998). Tomita *et al.* (1996) used a TEM-R1 resistance strain probe of *C. quinquefasciatus* in *C. pipiens molestus* to locate this region on the same 2L arm.

Chromosome polytene physical maps aimed at correlation with genetic linkage maps could be developed, relying on fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques. This is being done for *A. aegypti* with the metaphase chromosome (Brown & Knudson, 1997; Brown *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 2001). The thoracic musculature is the development site for the filarial worms *Brugia malayi* and *B. pahangi*, and the Malpighian tubules are the development site for *D. immitis*. Despite the importance of the thoracic musculature and Malpighian tubules as developmental sites, efforts to discovery the gene(s) or the gene product(s) responsible for susceptibility or refractoriness to filarial worm infection in these sites have not been extensive (Beerntsen *et al.*, 2000). *C. quinquefasciatus* can easily be

reared under laboratory conditions and the procedures to obtain polytene chromosomes from its larval, pupal and adult stages have been well described. In this way and based on the approaches already effected with insecticide resistance probes, research on vector competence and the location of the cytogenetic markers should be explored.

## Conclusion

The larval, pupal and adult Malpighian tubule polytene chromosomes showed conspicuous structural characteristics suitable for their use in the localization of resistance and vector competence genes. The chromosome maps are fundamental tools to provide good cytogenetic analyses of this mosquito, which is of medical and economic importance. The present study of the polytene chromosomes of *C. quinquefasciatus* provides cytogenetic support for future population studies.

## Acknowledgments

We thank Delsio Natal from Public Health Faculty, São Paulo University for provides IAL standard strain.

## References

- Achary, P.M.R. A simple technique for the preparation of polytene chromosomes from *Culex quinquefasciatus*. *J. Am. Mosq. Control Ass.* **10** (1): 112-114, 1994.
- Beerntsen, B.T., James, A.A. & Christensen, B.M. Genetics of the mosquito vector competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64** (1): 115-137, 2000.
- Bracco, J.E., Barata, J.M.S. & Marinotti, O. Evaluation of insecticide resistance in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94** (1): 115-120, 1999.
- Brown, S.E. & Knudson, D.L. FISH landmarks for *Aedes aegypti* chromosomes. *Insec. Mol. Biol.* **6** (2): 197-202, 1997.
- Brown, S.E., Menninger, J., Difillipantonio, M., Beaty, B.J., Ward, D.C. & Knudson, D.L. Toward a physical map of *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* **4** (3): 161-167, 1995.
- Brown, S.E., Severson, D.W., Smith, L.A. & Knudson, D.L. Integration of the *Aedes aegypti* mosquito genetic linkage and physical maps. *Genetics* **157**: 1299-1305, 2001.
- Dennhöfer, L. Die speicheldrüsenchromosomen der stechmücke *Culex pipiens* I. Der normale chromosomenbestand. *Chromosoma* **25**: 365-376, 1968.
- Dennhöfer, L. Die speicheldrüsenchromosomen der stechmücke *Culex pipiens* L. II. Ergänzungen zur kartierung. *Genetica* **45**: 29-38, 1974.
- Hemingway, J. & Karunaratne, S.H.P.P. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of the major insecticide resistance mechanism. *Med. Vet. Entomol.* **12**: 1-12, 1998.
- Heyse, D., Catalan, J., Nance, E., Britton-Davidian, J. & Pasteur, N. Unconventional organization of amplified esterase B gene in insecticide-resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. *J. Am. Mosq. Control Ass.* **12** (21): 199-205, 1996.
- Kanda, T. The salivary gland chromosomes of *Culex pipiens fatigans* Wiedemann. *Jpn. J. Exp. Med.* **40**: 335-345, 1970.
- Kitzmiller, J.B. & Clark, C.C. Salivary gland chromosomes in *Culex* mosquitoes. *Genetics* **37**:596, 1952.
- Kitzmiller, J.B. & Keppler, W.J. Salivary gland chromosomes maps in *Culex p. pipiens*. *Genetics* **46**:875-876, 1961.
- Olejníček, J. & Gelbic, I. Autogeny in the *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. *J. Vect. Ecol.* **25** (1): 118-122, 2000.



- Sharma, G.P., Mittal, O.P., Chaudhry, S. & Pal, V. A preliminary map of the salivary gland chromosomes of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Culicidae, Diptera). *Cytobios* **22**: 169-178, 1978.
- Sirivanakarn, S. & White, G.B. Neotype designation of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* **80**: 360-372, 1978.
- Sutton, E. Salivary gland type chromosomes in mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **28**: 268-272, 1942.
- Tewfik, H.R. & Barr, A.R. The salivary gland chromosomes of *Culex pipiens* L. *Mosquito News* **34** (1): 47-54, 1974.
- Tomita, T., Kono, Y. & Shimada, T. Chromosomal localization of amplified esterase genes in insecticide resistance *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26** (8-9): 853-857, 1996.
- Verma, R.K., Paknaik, S., Prasad, R. & Das, C.C. Salivary gland chromosomes of *Culex quinquefasciatus* *Caryologia* **40** (1-2): 99-108, 1987.
- Zambetaki, A., Pasteur, N. & Mavragani-Tsipidou, P. Cytogenetic analysis of the Malpighian tubule polytene chromosomes of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Genome* **41** (6): 751-755, 1998.

Figure 1. Pupal chromosome maps for the polytene chromosomes 1 and 2. L, left arm; R, right arm; Ce, Centromere; NOR, Nucleolar Organizing Region. Arrow: section 31 showed an amorphous area. This region is associated to resistance to organophosphorus insecticides genes. Bar = 3,9  $\mu$ m.

Figure 2. Pupal chromosome map for the third polytene chromosome. L, left arm; R, right arm; Ce, Centromere. The arrows indicate areas with differential expression. Bar = 3,9  $\mu$ m.

Figure 3 Third adult Malpighian tubule polytene chromosome (21 day old female). L, left arm; R, right arm; Ce, Centromere. The arrows indicate areas with differential expression. Bar = 3,9  $\mu$ m.

Figure 4. Pupal chromosome 31-2L section of UNI-R1 (a) and IAL-S (b) strains. The arrows indicate amorphous area and band respectively. Bar = ~6  $\mu$ m (a) and ~4  $\mu$ m (b).





Figure 1



Figure 2

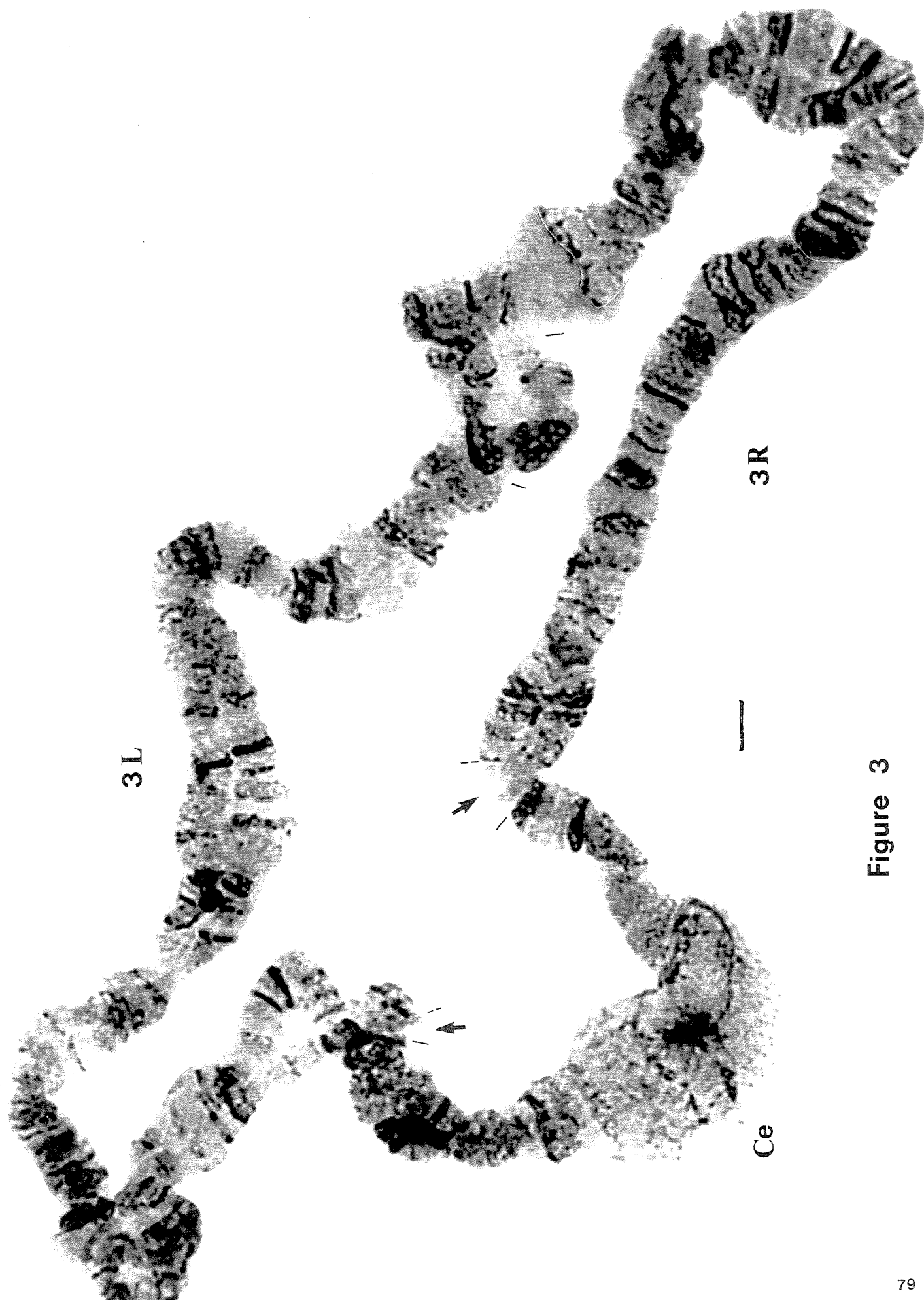
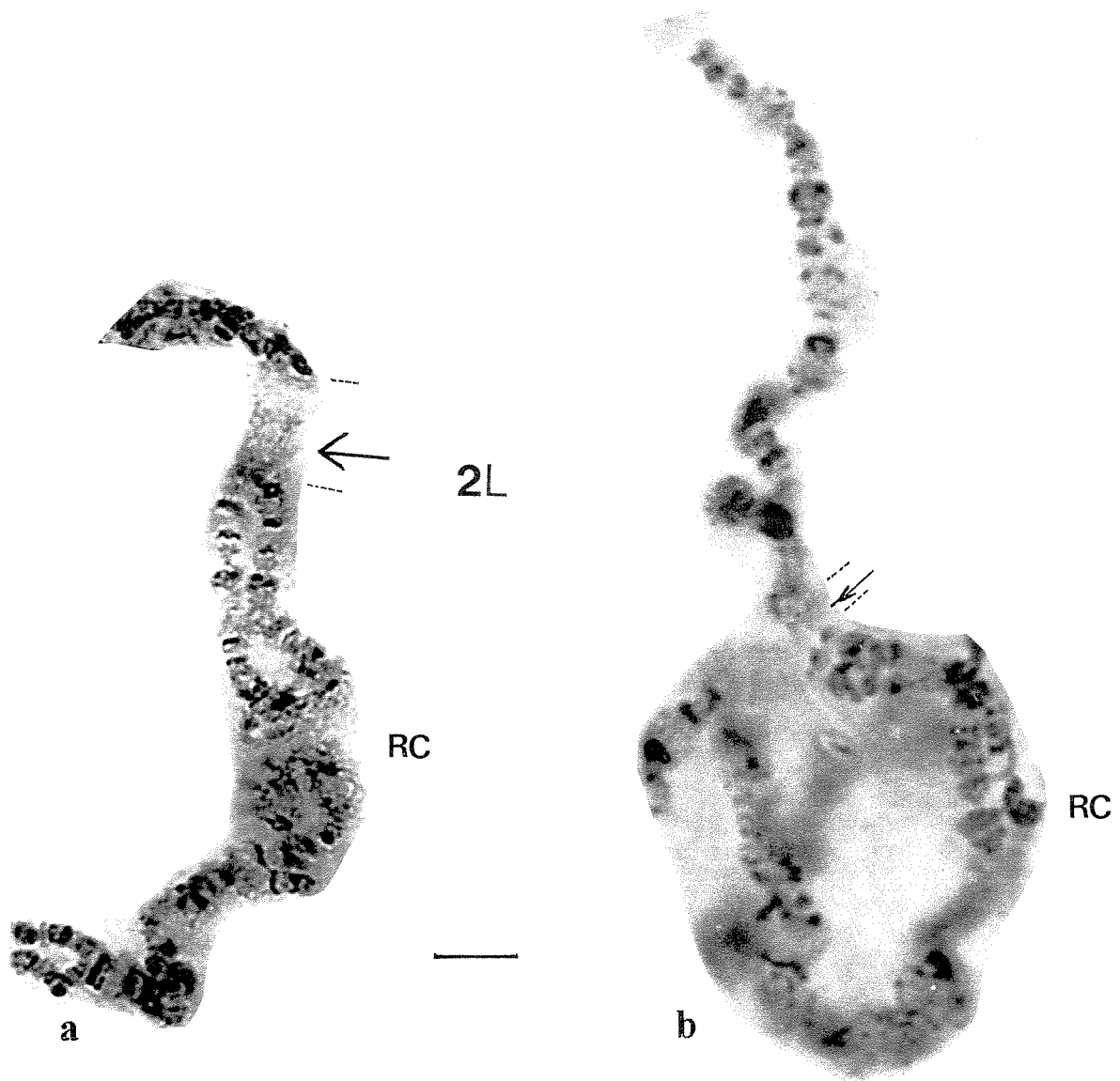


Figure 3

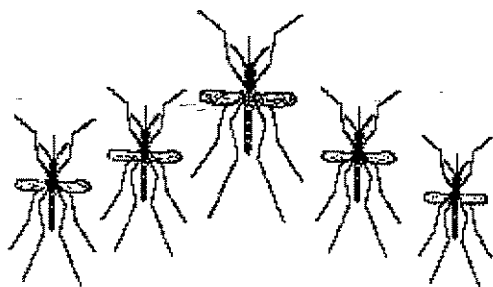


**Figure 4**

## **ANEXO 5**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
UNICAMP**

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A INSETICIDAS EM *Aedes aegypti*, *A. albopictus* e *Culex quinquefasciatus* POR MEIO DE BIOENSAIOS**



**PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DE SUSCEPTIBILIDADE E MONITORAMENTO DA RESISTÊNCIA A INSETICIDAS QUÍMICOS USADOS NO CONTROLE / 4ª ed.**

**Jairo Campos & Carlos F. S. Andrade**

**Laboratório de Patologia de Insetos, Departamento de Zoologia  
Instituto de Biologia – UNICAMP  
Campinas, julho 2002**

## Introdução

O controle de insetos pode ser feito com compostos naturais (extratos vegetais principalmente), compostos químicos inorgânicos, toxinas biológicas ou compostos derivados de petróleo por síntese orgânica. Entre os compostos orgânicos há grande quantidade de produtos classificados em diferentes grupos. Cada composto podendo apresentar isômeros e vários tipos de formulação atendendo às necessidades de aplicação (local, perifocal, espacial). Desta forma podemos ter pós, grânulos, pós molháveis, pós solúveis, iscas, concentrados emulsionáveis, soluções, suspensões aquosas e aerossóis entre outras em concentrações variadas de ingrediente ativo, com adição ou não de adjuvantes, surfactantes e inclusive sinergistas na sua formulação.

Os inseticidas químicos têm sido usados intensiva e indiscriminadamente para o controle de insetos nos últimos 60 anos. A falta de monitoramento, a suspensão prematura dos programas e as falhas no planejamento entre outras causas não facilitado que muitas espécies de insetos, inclusive insetos não alvo do controle desenvolvam resistência a vários inseticidas. Pelo menos 504 espécies de insetos e ácaros têm apresentado resistência (WHO, 1992; Ferrari, 1996) mas há falha nos registros e podemos estimar que mais de 1000 espécies de insetos pragas agrícolas e de importância médica e veterinária já desenvolveram resistência aos produtos químicos usados no seu controle, embora possam ser menos de 100 as espécies que apresentam altos níveis de resistência (RR<sub>95</sub> acima de 20 vezes).

Fala-se em resistência ao controle químico dos insetos pragas ou vetores de doenças, quando se apresenta diminuição progressiva do controle feito com as concentrações recomendadas. Quer dizer, o produto não tem a efetividade que esperar-se-ia. Diferentes avaliações têm permitido verificar a resistência aos produtos organofosforados como malathion, fenthion, fenitrothion, chlorpyrifos e temephos ou mesmo a piretróides como cipermetrina e permetrina em espécies como *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* no Caribe e nas Américas em geral (Brown, 1986; Georgiou et al., 1987; Rawlins & Wan, 1995; Mazzarri & Georgiou, 1995; González et al., 1999; Small et al., 1999 Wirth & Georgiou, 1999). O critério de **resistência operacional** é a sobrevivência de 20% ou mais dos indivíduos testados em campo com as **concentrações diagnóstico** dos inseticidas de uso corriqueiro no controle de insetos. Uma dose diagnóstico é aquela concentração mais baixa que têm mostrado capacidade de matar 100% das larvas de uma população susceptível testada em campo ou em laboratório. Para o temephos a concentração diagnóstico recomendada pela Organização Mundial da Saúde é de 0,012 mg de ingrediente ativo (i.a.) por litro (ou partes por milhão, ppm) em larvas de *A. aegypti* e de 0,002 mg i.a./l em larvas de *C. quinquefasciatus* (Amin & White, 1984; Brown, 1986; WHO, 1992). A sobrevivência de qualquer larva a estas concentrações de inseticida pode ser considerada como resistência, Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações Diagnóstico, mg i.a./l (ppm) para larvas de mosquitos de 3º ou 4º estágio.\*

| Inseticida                | <i>Aedes aegypti</i> | <i>Aedes albopictus</i> | <i>Culex quinquefasciatus</i> |
|---------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Bti                       | 0,25                 |                         |                               |
| Methoprene (p/4º estágio) | 0,11                 |                         | 0,02                          |
| Temephos                  | 0,012                | 0,012 e 0,04            | 0,003                         |
| Permetrina                | 0,01                 |                         |                               |
| Deltametrina              |                      |                         |                               |
| λ-Cyhalotrina             | 0,01                 |                         |                               |
| Cipermetrina              | 0,012                |                         |                               |
| Ciflutrina                | 0,012                |                         |                               |
| β-Ciflutrina              | 0,05                 |                         |                               |
| Propoxur                  | 10                   |                         |                               |

\* Dados de Amin & White (1984), Wesson (1990), OMS (1992), Mazzarri & Georgiou (1995), Campos & Andrade (2001), Campos & Andrade (no prelo) ou estimados sobre dados da CL<sub>90</sub> ou CL<sub>95</sub> de linhagens de campo.

A concentração diagnóstico também pode ser determinada usando a linha de regressão (escala log-*probit*) da resposta (mortalidade em escala *probit*) a diferentes concentrações (em escala logarítmica), aplicadas em amostras de uma população de campo ou colônia de laboratório que não tenha sido exposta ao inseticida usado nas campanhas de controle. Aquela concentração produzindo mortalidade acima do 99,9% é considerada a concentração diagnóstico (Brown, 1986). As concentrações a serem testadas (recomenda-se no mínimo quatro) devem permitir estimar a mortalidade entre 0 e 100%. A linha de regressão determinada com estas concentrações permite a estimação de concentrações letais (e.g. 50% e 95%) as quais servem para comparar populações. Para *A. aegypti* tem-se registrado uma concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>) de 0,0071 miligramas por litro (mg. l<sup>-1</sup>) ou partes por milhão (ppm) de ingrediente ativo (i.a.) de **temephos** e uma CL<sub>95</sub> de 0,011 ppm em populações do Caribe e da Venezuela (Mazzarri & Georghiou, 1995; Rawlins & Wan, 1995) mas estas concentrações podem mudar dependendo da população e da espécie. A **linha-base** de um produto inseticida é aquela concentração de ingrediente ativo de produto grau técnico (em geral) que produz uma mortalidade determinada em populações reconhecidamente susceptíveis (ou nunca expostas direta ou indiretamente ao produto). Esta linha base para a CL<sub>50</sub> de **temephos** em *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) é de 0,00056 ppm e 0,00039 ppm respectivamente (Brown, 1986). A Tabela 2, apresenta uma relação de concentrações letais em bioensaios de laboratório, com linhagens padrão (susceptíveis) aos produtos mais recomendados e seguros para uso em controle de mosquitos.

Tabela 2. Concentrações Letais Medianas (CL<sub>50</sub>) e Concentrações Letais 95% (CL<sub>95</sub>) em ppm de i.a. de produtos comerciais ou grau técnico para larvas de 3º ou 4º estágio de mosquitos.

| Inseticida                           | <i>Aedes aegypti</i> |                    | <i>Aedes albopictus</i> |                  | <i>Culex quinquefasciatus</i> |                      |
|--------------------------------------|----------------------|--------------------|-------------------------|------------------|-------------------------------|----------------------|
|                                      | LC <sub>50</sub>     | LC <sub>95</sub>   | LC <sub>50</sub>        | LC <sub>95</sub> | LC <sub>50</sub>              | LC <sub>95</sub>     |
| <b>Bti</b> <sup>1</sup>              | 0,06                 | 0,37*              | 0,0692                  | 0,1174*          | 0,046                         | 0,18                 |
| <b>Methoprene</b> <sup>&amp;</sup>   | 0,00017              |                    | 0,002                   | 0,0081*          | 0,0023                        | 0,009*               |
|                                      | 0,00033              | 0,0013*            |                         |                  |                               |                      |
| <b>Pyriproxyfen</b> <sup>&amp;</sup> | 0,00033              | 0,0026 e<br>0,0005 | 0,00011                 | 0,00038*         | 0,000018                      | 0,00016              |
| <b>Temephos</b>                      | 0,0071               | 0,011              | 0,0033                  | 0,0050*          | 0,001196 <sup>2</sup>         | 0,00292 <sup>2</sup> |
| <b>Permetrina</b>                    | 0,001                | 0,004              |                         |                  |                               |                      |
| <b>Deltametrina</b>                  |                      |                    | 0,0015                  | 0,0047*          | 0,003                         |                      |
| <b>λ-Cyhalotrina</b>                 |                      | 0,0053             |                         |                  | 0,001                         | 0,0027               |
| <b>Cipermetrina</b>                  | 0,00062              | 0,0017             |                         |                  | 0,0008                        |                      |
| <b>Ciflutrina</b>                    | 0,0012               | 0,0024             |                         |                  |                               |                      |
| <b>β-Ciflutrina</b>                  | 0,0029               | 0,0088             |                         |                  |                               |                      |
| <b>Propoxur</b>                      | 1,1                  | 3,2                |                         |                  |                               |                      |

Obs.: As CL<sub>50</sub> e a CL<sub>95</sub> são de registros na literatura para linhagens padrão (Henrick, 1982; Amin & White, 1984; Brown, 1986; Schaefer et al., 1988; Who, 1992; Mazzarri & Georghiou, 1995; Rawlins & Wan, 1995; González et al., 1999; Wirth & Georghiou, 1999; Small et al., 1999; Amalraj et al., 2000; Campos & Andrade, 2001; Gaven et al., 2001; Who, 2001; Campos & Andrade, *no prelo*), não são necessariamente da mesma linhagem ou experimento.

<sup>1</sup>Vectobac 12AS, <sup>2</sup>Temephos 1G, \*CL<sub>90</sub>/IE<sub>90</sub>. <sup>&</sup>contra 4º estágio e verificado como a inibição de emergência (IE) de adultos normais.

No estado de São Paulo tem-se suscitado ou registrado a resistência a organofosforados para *A. aegypti* pelo menos em Campinas (Andrade & Modolo, 1991; Macoris et al., 1999), Ribeirão Preto, Guariba e Barretos (Dinardo-Miranda, 1994) Bauru e Marília (Macoris et al., 1995) e para *C. quinquefasciatus* em São Paulo (Bracco et al., 1997, 1999). No estado de Goiás foi registrada resistência para *A. aegypti* em Goiânia (Macoris et al., 1995; Silva et al., 1997). Adicionalmente, a imprensa tem noticiado a resistência de *A. aegypti* nos estados de Rio de Janeiro, Espírito Santo e Acre. No Rio de Janeiro, RJ foi registrada resistência a DDT, um carbamato, três organofosforados, e três piretróides para *C. quinquefasciatus* (González et al., 1999).



A avaliação da susceptibilidade aos produtos químicos empregados rotineiramente pode ser feita por meio de testes em larvas e adultos, de concentração única e/ou múltipla das formulações comerciais dos produtos a serem usados nas estratégias de controle, e seguindo-se o padrão da OMS (Brown, 1986). Recomenda-se que no possível sejam verificadas as concentrações destes produtos comerciais com produtos grau técnico em curvas de calibração e avaliar adicionalmente estes últimos comparativamente como testemunhas positivas. Cabe lembrar que os testes tem que ser padronizados, isto quer dizer que é muito importante levar em conta vários fatores como características e histórico das linhagens que estão sendo usadas criando e executando os bioensaios em condições homogêneas sem estresse ambiental. Caso o material biológico for de campo é aconselhável fazer os testes com a geração  $F_1$  ou  $F_2$  para homogeneizar as respostas e garantir a premissa que fatores ambientais não estão influenciando a resposta ou é insignificante. Desta forma é aconselhável também, estocar ovos (no mínimo dois dias) para sincronizar o desenvolvimento das larvas. As larvas não podem ser mantidas em um volume de água inferior a 1 ml por larva em bandeja com pelo menos  $0,4 \text{ cm}^2$ /larva, devem ser suficientemente alimentadas com levedo de cerveja, leite em pó desnatado ou comida para peixes, pó de ração para cachorro ou gato (triturada, dissolvida e filtrada para evitar excesso de gordura e resíduos) uma o duas vezes por dia inclusive 0,2 a 1 mg/larva/dia. É recomendado criar quantidades inferiores a 1000 larvas por recipiente para evitar o canibalismo em ambientes com temperatura e umidade controlados. Comida insuficiente e densidades larvais altas, retarda o crescimento, aumenta o ciclo larval e origina adultos pequenos os quais não são uniformes em tamanho (Cf. Smith, 1966; Beaty & Marquardt, 1996). Usar larvas de terceiro (3º) estágio tardio ou quarto (4º) estágio jovem alimentadas duas horas antes de começar os testes pode evitar pupação indesejada e mortalidade influenciada por falta de comida antes de 24 horas (em geral, tempo de leitura final do bioensaio).

As diluições devem ser feitas a partir de uma solução padrão e para grandes volumes (1 litro no mínimo) usando no possível micropipetas com ponteras descartáveis ou pipetas calibradas (com estas é aconselhável não manusear volumes inferiores a 0,1 ml). Diluições separadas para cada repetição e concentração podem introduzir variação, por causa disto é aconselhável fazer um volume suficiente da concentração inicial desejada para todas as repetições de uma concentração determinada e de forma a sobrar para se fazer a seguinte concentração. Para não introduzir erros nas concentrações a serem testadas quando são colocadas as larvas é preferível trabalhar com, no mínimo, 100 ml de solução por repetição e no possível separar as larvas nos recipientes antes, colocando a solução depois (uma diluição calculada para 100 ml pode ser feita só com 99 ml de solução, o restante é colocado antes com as larvas, ~1 ml e/ou é completado depois). Deve ser registrada a informação dos produtos químicos, como concentração, formulação, lote de produção, validade, condições nas quais foram estocados, marca ou procedência (no caso de produtos grau técnico). Como já foi colocado, é recomendável a análise química do produto a ser avaliado para verificar a pureza dele, lotes de produção costumam ter variações acima ou abaixo da concentração declarada no rótulo do produto, e/ou condições de transporte e estoque podem prejudicar a validade do mesmo. Variações nas respostas da mesmas linhagens podem ter a ver em parte com estes fatores, outras variações nas respostas podem ser ocasionados pelo estágio fisiológico, alimentação, vigor das larvas, temperatura dos bioensaios e variação genética de traços quantitativos não associados diretamente com os mecanismos de resposta conhecidos (metabólicos e de sítio alvo). Mesmo assim, é comum encontrar variação nas respostas dos mesmos produtos (inclusive do mesmo lote de produção), nas mesmas concentrações, com a mesma linhagem e nas mesmas condições padronizadas (inclusive feitas pelo mesmo pessoal). Organismos biológicos não tem respostas simplesmente mecânicas e sim mais fisiológicas de interação genótipo-ambiente. Além disto as moléculas de inseticidas apresentam características físico-químicas que podem variar por fatores como formulação, estoque, temperatura, modo de ação e organismo alvo. Conhecemos muito delas mas não conhecemos tudo, por isso temos que monitorá-las antes de usá-las.

### Testes em Larvas

As larvas a serem testadas devem ser criadas de forma padrão à temperatura e umidade do ar constantes (as mesmas nos bioensaios), recomenda-se 1 a 5 ml água/larva, 0,4 a 1 cm<sup>2</sup>/larva (superfície do recipiente) e com alimentação de no menos que 0,2 mg de levedo/larva/dia para evitar efeitos negativos da densidade e nutrição no desenvolvimento (Smith, 1966; Clements, 1992; Consoli & Lourenço-de Oliveira, 1994).

### 1. Teste de Concentração única para diagnóstico rápido

As larvas coletadas em campo serão devidamente identificadas e transportadas ao laboratório para serem triadas e alimentadas antes da sua avaliação. Dependendo do estado fisiológico das larvas, elas poderão ser criadas até o 4º estágio e/ou guardadas em estufa ou geladeira (~16°C) para avaliação posterior. Isto quando não for possível ou procedente a criação em laboratório das linhagens de campo, com objetivo de se fazer as avaliações na geração F1 ou F2. As concentrações a serem usadas com produtos comerciais nos testes diagnósticos são baseadas em bioensaios próprios e em referências bibliográficas (Amin & White, 1984; Who, 1992; Mazzarri & Georgiou, 1995), ver Tabela 1.

#### 1.1. Procedimento:

As avaliações poderão ser feitas para cada população a ser monitorada, em cada município ou no laboratório de referência para tal fim em cada estado.

##### 1.1.1. Tratamento:

- Cada produto (comercial ou grau técnico) deve ser avaliado separadamente com repetições e testemunhas. Para cada avaliação devem ser usados no mínimo três lotes (repetições) de 20 a 25 larvas (3º estágio tardio ou início de 4º estágio), é aconselhável cinco repetições de 33 larvas. Desta forma as larvas serão expostas à concentração única do inseticida por 24 horas, junto com as testemunhas (controle, só água para lotes de 20 a 25 larvas por repetição). Assim, o número total de larvas necessárias para avaliar uma concentração de produto é de 120 a 150 larvas. Quando for testado mais de um produto os lotes testemunha podem ser os mesmos, quer dizer, não são necessárias testemunhas diferentes para cada produto.

- Para se chegar à concentração teste, inicialmente será feita uma concentração mãe (100 ppm i.a.) diluindo-se (Peso/Peso, P/Volume ou V/V) no mínimo 0,1 ml (100µl) ou 0,1 g (100 mg) do produto comercial ou grau técnico (xx% de ingrediente ativo) em xx ml de água (destilada ou mineral) ou solvente orgânico quando preciso (ex. Acetona). Desta concentração mãe será tomada uma quantidade de "xx ml" e diluída em água destilada ou mineral até completar o volume necessário de solução (ex. 1 ou 2,5 litros), esta é a solução teste para cada repetição de 100 ou 250 ml.

- Para cada repetição da concentração única de cada produto a ser avaliado serão usados no mínimo "99" ml por copo de 120 ml ou maior (copo plástico descartável), onde vão ser colocadas (antes ou depois) as larvas de 3º e/ou 4º estágio com ajuda de uma pipeta com tetina, por 24 horas. Cuidar de não colocar mais de um (1) ml de água com as larvas em cada copo repetição e completar com a solução teste até volume final de 100 ml previamente marcado no copo", ou separar as larvas antes "sem água" para cada repetição de 100 ml (ideal 250 ml).

- Nos copos testemunha é colocado só água (100 ml com as larvas). Quando a solução mãe for feita em acetona, etanol ou outro solvente orgânico, as testemunhas levarão água com o solvente orgânico (só) em volume equivalente à quantidade máxima de produto (i.a.) da concentração a ser testada.

##### 1.1.2. Exemplo de diluição:

0,1 ml (100 µl) de Abate 500E (temephos comercial 50%) + 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada  
= **solução mãe 50 mg. l<sup>-1</sup> i.a.** (ou **ppm**) ou 10 µl para 100 ml de água.

Agora: pegamos 0,24 ml da solução mãe + 990 ml de H<sub>2</sub>O destilada ou mineral  
= **solução teste 0,012 ppm** (ou mg. l<sup>-1</sup>)

**1.2.3. Ensaio:**

| Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 | Lote 5 | Total | Produto / concentração teste     |
|--------|--------|--------|--------|--------|-------|----------------------------------|
| 23     | 25     | 25     | 24     | 26     | = 123 | temephos / 0,012 ppm             |
| 20     | 20     | 23     | 21     | 22     | = 106 | Bti / 0,25 ppm                   |
| 22     | 22     | 22     | 24     | 25     | = 115 | methoprene / 0,11 ppm            |
| 24     | 25     | 23     | 22     | 21     | = 115 | permetrina / 0,01 ppm            |
| 25     | 25     | 25     | 25     | 25     | = 125 | cipermetrina / 0,01 ppm          |
| 25     | 25     | 25     | 25     | 25     | = 125 | deltametrina / 0,01 ppm          |
| 25     | 25     | 25     | 25     | 25     | = 125 | $\lambda$ -cialotrina / 0,01 ppm |
| 21     | 24     | 23     | 27     | 28     | = 123 | controle ----                    |

**1.2. Avaliação:**

Às 24 horas serão contadas as larvas mortas. Não necessariamente tem que ser assumida a mortalidade *sensu strictu* das larvas (aquelas com morte fisiológica e as que apresentam enegrecimento dos órgãos internos produto da decomposição). O critério de mortalidade é assumido para aquelas larvas que **não reagem vigorosamente** (como no controle) ao estímulo mecânico com o toque de uma pinça ou pincel, ou todas aquelas com paralisia irreversível ou incapazes de alcançar a superfície ou o fundo do copo. Se existirem dúvidas, deixar mais 24 horas em observação, inclusive alimentando-as. Devem ser descartados para os cálculos aqueles indivíduos que tenham empupado. Os dados serão lançados em uma tabela de acompanhamento (Tabela 3).

**Levar em conta:** - Sobrevivência de qualquer larva à concentração diagnóstico indica a possibilidade de resistência na população testada, e será necessário a realização de uma prova de verificação com um teste de concentração múltipla.

- As larvas que empuparem devem ser excluídas da computação dos resultados, caso ocorra com mais do 10%, a repetição deve ser desconsiderada e se for o caso o teste terá que ser repetido. É recomendado o uso de no mínimo cinco repetições com larvas de início de 4º estágio, quatro dias aproximadamente a partir da eclosão quando alimentadas fartamente (no mínimo: 0,2 mg/larva/dia) e a 29±1°C.

- Caso aconteça mortalidade superior aos 20% nos lotes testemunha o teste deve ser repetido.

- Para mortalidade entre 5% e 20% nos lotes testemunha deve-se aplicar a seguinte fórmula de correção proposta por Abbott (1925):

$$\frac{(\% \text{ Mortalidade no teste} - \% \text{ Mortalidade na testemunha})}{100 - \% \text{ Mortalidade na testemunha}} \times 100$$

**1.3. Observações:** Para cada avaliação será feita uma análise dos resultados e sugeridas recomendações técnicas para análises posteriores.

- Larvas sobreviventes que não vão ser analisadas ou criadas até pupas e/ou adultos para análise citogenética e/ou para novas provas de susceptibilidade, devem ser fixadas em Carnoy (ácido acético : etanol, 1:3) fresco (3x) ou etanol 70% e guardadas em geladeira para análise posterior. Ou de outra forma, sacrificadas.

- O manuseio dos químicos (inseticidas) deve ser feito com luvas, evitando inalar os vapores. Não devem ser consumidos alimentos, bebidas ou fumar enquanto monta o experimento e/ou manuseia os químicos.

- Caso aconteça por acidente contato com os químicos, lave imediatamente com água em abundância e só depois use sabão ou sabonete, enxaguando bem. Não use detergentes nem álcool para limpar. De se apresentar irritação na pele ou mal estar procure-se um médico ou o posto de saúde acompanhado das informações técnicas do produto.

**2. Teste de Concentração Múltipla:**

Quando for necessário, ou seja, quando tenha ocorrido sobrevivência de qualquer larva no teste de concentração única serão feitos os testes de concentração múltipla para validar os

resultados iniciais. Estas avaliações permitem determinar concentrações letais para 50 e 95%, entre outras. Estas provas devem ser feitas de preferência com as gerações F1 ou F2 das coletas de campo e tem que ser acompanhadas paralelamente de testes com uma linhagem padrão conhecidamente susceptível, para estimar a efetividade dos produtos e poder determinar os níveis ou as razões de resistência (RR).

A partir da concentração mãe (ver item 1.2) são feitas quatro a seis concentrações menores de cada produto em múltiplo maior de 1 (e.g. 2, 3, 4 ou 5) de mg.i.a.l<sup>-1</sup> ou ppm dependendo da suspeita de resistência ou do histórico de uso de químicos na área, ou inclusive fator de 1,2 podendo existir concentrações intermediárias:

|                                   |      |       |       |       |       |        |        |         |         |  |
|-----------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|---------|---------|--|
| <b>Bti (1200 AS)</b>              | 1,25 | 0,625 | 0,125 | 0,025 | 0,005 | 0,0025 |        |         |         |  |
| <b>Methoprene</b>                 | 1,25 | 0,625 | 0,125 | 0,025 | 0,005 | 0,001  | 0,0002 | 0,00004 |         |  |
| <b>Temephos (50 CE)</b>           |      | 0,625 | 0,125 | 0,025 | 0,005 | 0,001  | 0,0002 |         |         |  |
| <b>Cipermetrina (25 CE)</b>       |      | 0,032 | 0,016 | 0,008 | 0,004 | 0,002  | 0,001  | 0,0005  | 0,00025 |  |
| <b>Ciflutrina (5CE e 1,25 SC)</b> |      | 0,032 | 0,016 | 0,008 | 0,004 | 0,002  | 0,001  | 0,0005  |         |  |

Obs.: para permetrina, deltametrina e  $\lambda$ -cialotrina podem ser as mesmas concentrações que para cipermetrina.

Para cada concentração de cada produto serão avaliados no mínimo três lotes de 20 a 25 larvas com três testemunhas; total por concentração (60 a 75 larvas) e por produto (360 a 450 larvas, seis concentrações). Exemplo: total nos cinco produtos e nas testemunhas (1860 a 2325 larvas). Se tiver poucas larvas pode-se tentar fazer só com três lotes de 10 larvas para cada repetição e três a quatro concentrações, total para um produto e testemunhas (lote controle) (~150 larvas). Recomenda-se cinco repetições de 30 larvas para cada concentração. Maior número de repetições e de larvas por repetição darão respostas mais consistentes e com maior peso estatístico nas análises.

**Obs.:** Para elaborar as soluções mãe de cada produto (comercial ou grau técnico) os cálculos tem que ser refeitos, assim como para as diluições levando em conta que devem ser de preferência 10 repetições (5 para a população teste e 5 para a padrão que serve como referência, ex. *Aedes aegypti* Rockefeller).

Para as diluições a partir da solução mãe (ex. 100 ppm i.a.) pode-se fazer cada concentração separadamente em volume suficiente para 10 repetições (5 para a população teste e 5 para a padrão) ou fazer mais solução (ex. o dobro), o que permite diluições constantes (ex., tipo 1:2 ou 1:5) de forma a usar 1000 ml (para 10 repetições de 100 ml da nova concentração) e sobrar solução para a seguinte diluição, assim até chegar na última concentração teste.

O Procedimento e a Avaliação são praticamente os mesmos dos itens 1.2 e 1.3. Os dados serão lançados em uma tabela (como na Tabela 3) mas aqui podem ser feitas avaliações adicionais ao longo do bioensaio com tempos em múltiplos de dois ou três, até completar as 24 horas. Exemplo: 17,7 min, 53,3 min; 160 min (2,66 hs); 8 hs e 24 hs. Alguns piretróides têm efeitos rápidos (knock-down) sobre as larvas, que dependendo da concentração podem ser reversíveis. Os dados serão usados para análise Probit e determinação da concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>) e CL<sub>95</sub> com seus respectivos intervalos de confiança e a inclinação da curva.

Tabela 3. Registro dos Resultados Obtidos na Avaliação de Susceptibilidade a: \_\_\_\_\_ em  
 larvas de: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ estágio, da linhagem: \_\_\_\_\_ (proveniente de  
 \_\_\_\_\_), Bairro: \_\_\_\_\_, Distrito: \_\_\_\_\_  
 Cidade / Data: \_\_\_\_\_

|                                                                                                                    |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------|--|--|--|--|--|--|--|
| Data da última aplicação na área (bairro ou distrito) / produto                                                    |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Cidade e data de coleta/<br>Fase coletada/<br>Origem (criadouro)                                                   |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Espécie testada                                                                                                    |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Estádio (instar)                                                                                                   |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Obs.: Alimento:<br>Luminosidade:                                                                                   |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Data Teste/ T°C / U.R.                                                                                             |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>Inseticida Testado:</b>                                                                                         |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Nome comercial                                                                                                     |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Número de partida                                                                                                  |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Data Fabric./Data Valida.                                                                                          |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Concentração (ppm i.a.)                                                                                            | Controle | 0,xxx ppm |  |  |  |  |  |  |  |
| Período de exposição                                                                                               |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| #larvas expostas/#larvas mortas                                                                                    |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Repetição 1                                                                                                        |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Repetição 2                                                                                                        |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Repetição 3                                                                                                        |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Repetição 4                                                                                                        |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Repetição 5                                                                                                        |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| % mortalidade média                                                                                                |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Desvio padrão                                                                                                      |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| % mortalidade(corrigida)*                                                                                          |          |           |  |  |  |  |  |  |  |
| Observações/tempo:<br>15-20 min<br>60 min<br>2 horas<br>4 horas<br>8 horas<br>24 horas<br>Pupas:<br>Recomendações: |          |           |  |  |  |  |  |  |  |

\* Se maior que 5% no controle (Abbott, 1925).

Obs.: Tabela adaptada da OMS (1992).

### Exemplos de diluição:

#### Propoxur (Baygon 20 CE) ou 20% i.a.

0,25 ml (250 µl) de propoxur 20 % + 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>

= **sol. padrão 100 µl/l, "mg l<sup>-1</sup>" (ou ppm i.a.)**

##### 1) Sol. 16 ppm (opcional):

160 ml da sol. mãe (100 ppm) + 830 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, pegar 99 ml para cada repetição, colocar as larvas (com no mais que 1 ml) e completar até 100 ml (se precisar).

(ou se fazer mais sol. de forma a sobrar para a concentração seguinte. Ex., fazer o dobro, 2 l de solução, 320 ml da sol. 100 ppm + 1680 ml de água; separar as larvas para cada repetição, praticamente sem água, usa 1l de sol.).

##### 2) Sol. 8 ppm:

80 ml da sol. mãe (100 ppm) + 910 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, pegar 99 ml para cada repetição, colocar as larvas (com no mais que 1 ml) e completar até 100 ml (se precisar).

(ou pegar 1l da sol. 16 ppm e dilui até 2l, usa 1l para 10 repetições de 100 ml, da mesma forma anterior).

##### 3) Sol. 4 ppm:

40 ml da sol. mãe (100 ppm) + 950 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, pegar 99 ml para cada repetição, colocar as larvas (com no mais que 1 ml) e completar até 100 ml (se precisar).

(Ou pega 1l da sol. 8 ppm e dilui até 2l, ...o resto da mesma forma anterior).

##### 4) Sol. 2 ppm:

20 ml da sol. mãe (100 ppm) + 970 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, pegar 99 ml para cada repetição, colocar as larvas (com no mais que 1 ml) e completar até 100 ml (se precisar). (Ou diluindo 1l da sol. 4 ppm até 2 l, da mesma forma.....)

##### 5) Sol. 1 ppm:

10 ml da sol. mãe (100 ppm) + 980 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, pegar 99 ml para cada repetição, colocar as larvas (com no mais que 1 ml) e completar até 100 ml (se precisar). (Ou da outra forma)

##### 6) Sol. 0,5 ppm:

5 ml da sol. mãe (100 ppm) + 985 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, pegar 99 ml para cada repetição, colocar as larvas (com no mais que 1 ml) e completar até 100 ml (se precisar). (Ou da outra forma)

##### 7) Sol. 0,25 ppm:

2,5 ml da sol. mãe (100 ppm) + 987,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, pegar 99 ml para cada repetição, colocar as larvas (com no mais que 1 ml) e completar com água até 100 ml de solução (se precisar). Ou da outra forma

#### Temephos (50 CE)

0,1 ml (100 µl) de Abate 500E (temephos comercial 50%) + 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada

ou 1 g de Abate 1G (temephos granulado 1%) + 200 ml de H<sub>2</sub>O destilada ou mineral

= **solução mãe 50 mg. l<sup>-1</sup> (ou ppm i.a.)**

Agora: 1) tomamos 12,5 ml da **solução mãe** + 977,5 ml de H<sub>2</sub>O destilada

= **solução teste 0,625 ppm** (ou mg. l<sup>-1</sup>) p'10 repetições de 100 ml, pegar 99 ml + larvas.

(Ou 1250 ml de sol.: 15,63 ml da sol. 50 ppm+1235 ml de água, de forma a sobragem 250 ml para diluir 5x)

2) tomamos 2,5 ml da solução mãe + H<sub>2</sub>O até completar 990 ml

= **solução teste 0,125 ppm** (ou mg. l<sup>-1</sup>) p'10 repetições de 100 ml, pegar 99 ml + larvas.

(Ou pega 250 ml da sol. 0,625 ppm e dilui 5x até 1250 ml, usa 1000 ml e sobram 250 ml para fazer a seguinte)

3) tomamos 0,5 ml da solução mãe + H<sub>2</sub>O (990 ml)

= **solução teste 0,025 ppm** (ou mg. l<sup>-1</sup>), p' 99 ml colocar as larvas (1ml).

(Ou diluindo 5x do que sobro da anterior).

4) tomamos 0,1 ml da solução mãe + H<sub>2</sub>O até completar 990 ml

= **solução teste 0,005 ppm** (ou mg. l<sup>-1</sup>), idem. (Ou da outra forma diluindo).

5) tomamos 0,02 ml (20 µl) da solução mãe + H<sub>2</sub>O até completar 990 ml

= solução teste **0,001 ppm** (ou  $\text{mg. l}^{-1}$ ), idem. (Ou da outra forma diluindo).

6) tomamos 0,01 ml (10  $\mu\text{l}$ ) da solução mãe +  $\text{H}_2\text{O}_d$  até completar 2475 ml

= solução teste **0,0002 ppm** (ou  $\text{mg. l}^{-1}$ ), idem para c/repetição de 100 ml. (Ou da outra forma diluindo).

#### **Fenitrothion (Sumithion) 40% i.a.**

0,125 g de Fenitrothion 40% ( $\cong 0,05 \text{ g i.a.}$ ) + 1000 ml de  $\text{H}_2\text{O}_d$

= **sol. mãe  $50 \text{ mg l}^{-1}$  (ppm)**.

O procedimento das diluições é o mesmo que para o temephos.

#### **Cipermetrina (25CE) ou 25% i.a.**

0,1 ml (100  $\mu\text{l}$ ) de Cipermetrina 25 % + 500 ml  $\text{H}_2\text{O}_d$

= **sol. mãe  $50 \text{ mg l}^{-1}$  (ppm)**

1) **Sol. 0,032 ppm:** (Opcional)

0,64 ml (640  $\mu\text{l}$ ) da sol. mãe (50 ppm)

+ 990 ml  $\text{H}_2\text{O}_d$ , pega 99 ml para cada repetição e coloca as larvas (com no mais que 1 ml)

2) **Sol. 0,016 ppm:**

0,32 ml (320  $\mu\text{l}$ ) da sol. mãe (50 ppm)

+ 990 ml  $\text{H}_2\text{O}_d$ , idem para cada repetição de 100 ml

3) **Sol. 0,01 ppm:**

0,2 ml (200  $\mu\text{l}$ ) da sol. mãe (50 ppm)

+ 990 ml  $\text{H}_2\text{O}_d$ , idem para cada uma das repetições de 100 ml

4) **Sol. 0,008 ppm:**

0,16 ml (160  $\mu\text{l}$ ) da sol. mãe (50 ppm)

+ 990 ml  $\text{H}_2\text{O}_d$  toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

5) **Sol. 0,006 ppm:**

0,12 ml (120  $\mu\text{l}$ ) da sol. mãe (50 ppm)

+ 990 ml  $\text{H}_2\text{O}_d$ , toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

6) **Sol. 0,004 ppm:**

0,08 ml (80  $\mu\text{l}$ ) da sol. mãe (50 ppm)

+ 990 ml  $\text{H}_2\text{O}_d$ , toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

7) **Sol. 0,002 ppm:**

0,04 ml (40  $\mu\text{l}$ ) da sol. mãe (50 ppm)

+ 990 ml  $\text{H}_2\text{O}_d$ , toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

8) **Sol. 0,001 ppm:**

0,02 ml (20  $\mu\text{l}$ ) da sol. mãe (50 ppm)

+ 990 ml  $\text{H}_2\text{O}_d$ , toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

9) **Sol. 0,0005 ppm:**

0,010 ml (10  $\mu\text{l}$ ) da sol. mãe (50 ppm)

+ 990 ml  $\text{H}_2\text{O}_d$ , toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

10) **Sol. 0,00025 ppm:**

0,005 ml (5  $\mu\text{l}$ ) da sol mãe (50 ppm)

+ 990 ml  $\text{H}_2\text{O}_d$ , toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

#### **Ciflutrina (5CE) ou 5% i.a.**

0,5 ml (500  $\mu\text{l}$ ) de Ciflutrina 5 % + 499,5 ml de Acetona PA ou  $\text{H}_2\text{O}_d$ ; ou 0,1 ml (100  $\mu\text{l}$ ) para 99,9 ml de Acetona ou  $\text{H}_2\text{O}_d$ .

= **sol. mãe  $50 \text{ mg l}^{-1}$  (ppm)**

1) **Sol. 0,016 ppm** (opcional):

0,16 ml (160  $\mu\text{l}$ ) da sol. mãe (50 ppm)

+ 495 ml  $\text{H}_2\text{O}_d$ , tomar 99 ml para cada repetição, colocar as larvas (1 ml de água junto)

2) **Sol. 0,01 ppm:**

0,1 ml (100 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 495 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, *idem* para uma repetição de 100 ml

3) **Sol. 0,008 ppm:**

0,16 ml (160 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

4) **Sol. 0,006 ppm:**

0,12 ml (120 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

5) **Sol. 0,004 ppm:**

0,08 ml (80 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

6) **Sol. 0,002 ppm:**

0,04 ml (40 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

7) **Sol. 0,001 ppm:**

0,02 ml (20 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

8) **Sol. 0,0005 ppm:**

0,010 ml (10 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

9) **Sol. 0,00025 ppm (Opcional):**

0,005 ml (5 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

10) **Sol. 0,000125 ppm (Opcional):**

0,005 ml (5 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 1980 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

**β-Ciflutrina (1,25SC) ou 1,25% i.a.**

1 ml (1000 µl) de β-Ciflutrina 1,25 % + 249 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> ou 0,2 ml (200 µl) de inseticida 1,25% para 49,8 ml de água = **sol. mãe 50 mg l<sup>-1</sup> (ppm)**

Pelos resultados prévios com a **ciflutrina CE**, as diferentes concentrações são feitas com algumas concentrações intermediárias.

1) **Sol. 0,032 ppm:**

0,32 ml (320 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 495 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

2) **Sol. 0,016 ppm:**

0,16 ml (160 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 495 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

3) **Sol. 0,008 ppm:**

0,16 ml (160 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

4) **Sol. 0,004 ppm:**

0,08 ml (80 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

5) **Sol. 0,003 ppm (Opcional):**

0,06 ml (60 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

6) **Sol. 0,002 ppm:**

0,04 ml (40 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

7) **Sol. 0,0015 ppm (Opcional):**

0,03 ml (30 µl) da sol. mãe (50 ppm)



- + 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.
- 8) **Sol. 0,001 ppm:**  
0,02 ml (20 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.
- 9) **Sol. 0,00075 ppm (Opcional):**  
0,015 ml (15 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.
- 10) **Sol. 0,0005 ppm:**  
0,010 ml (10 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.
- 11) **Sol. 0,00025 ppm (opcional):**  
0,005 ml (5 µl) da sol. mãe (50 ppm)  
+ 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, toma 99 ml para cada repetição, coloca as larvas e completa até 100.

### 3. Testes com Reguladores de Crescimento dos Insetos (IGRs)

Os reguladores de crescimento dos insetos ou IGRs na verdade são compostos sintéticos, imitadores dos hormônios naturais dos insetos que regulam o crescimento deles. Estes compostos usados em altas concentrações (ppm e ppb) desregulam (inibem) o desenvolvimento normal. Entre eles destacam os análogos dos hormônios juvenis (JHA) que usados em concentrações determinadas têm a capacidade de atrasar o desenvolvimento das larvas, evitar a formação da pupa, inibir a emergência do adulto ou diminuir a sobrevivência dele, inclusive dificultando a reprodução normal (ex. Methoprene e Pyriproxifen). Nos bioensaios com os IGRs trabalha-se mais com uma concentração inibitória (CI) que com uma concentração letal (CL) usando larvas de 3º ou 4º estágio. É recomendado a administração de alimento diariamente após as 24 horas de início do bioensaio, além de completar com água destilada ou mineral o volume evaporado de solução. O tempo de observação de "resposta" pode ser de vários dias, inclusive quando há empupamento. Outra forma de avaliar estes compostos é expondo as larvas de 4º estágio à concentração teste por tempo determinado (ex. seis horas), tem-se encontrado que larvas de 3º estágio são menos sensíveis que as de 4º estágio ao Methoprene (Amin & White, 1984; Henrick, 1982) e ao Pyriproxifen (Schaefer et al., 1988). Inclusive para *C. quinquefasciatus* tem-se usado exposição de 2 h a concentrações de 0,2 ppb de Pyriproxifen em larvas de 4º estágio tardio (que empuparam 0-3 horas depois da exposição), resultando em inibição completa (100%) da emergência dos adultos (Schaefer et al., 1988). A vantagem principal do uso de reguladores de crescimento é sua baixa toxicidade para os mamíferos. Já entre as desvantagens, que eles apresentam, temos o fato de serem específicos, o tempo requerido para agir (evitar emergência) e estabilidade pobre no ambiente.

### 4. Testes usando sinergistas.

A degradação não oxidativa de organofosforados ou carbamatos pode ocorrer pela ação das esterases, glutathione S-transferases, ou ambas (Bourget et al., 1996). Esterases são importantes na resistência a inseticidas organofosforados e ocasionalmente aos piretróides (Roush, 1993). Degradação oxidativa de organofosforados pode ocorrer pela ação metabólica das oxidases de função mista dependentes do citocromo P450.

O uso de sinergistas permite uma aproximação dos mecanismos metabólicos envolvidos com a resistência. Os mais conhecidos e usados são o S.S.S. tributílofosfotritiado (DEF), um inibidor de esterases e o piperonil butóxido (PB), um inibidor de acetilcolinesterase e oxidases de função mista. O PB inibe as oxidases de função mista (MOF) e subseqüentemente reduz a quantidade de moléculas disponíveis para degradar ou ativar, ou os dois, o inseticida (Bourget et al., 1996). Eles devem ser usados 4 horas antes dos testes com as soluções de inseticidas em concentrações de 0,008 a 0,05 para o DEF e 0,5 a 5 ppm para o PB (Bourget et al., 1996; González et al., 1999). A vantagem dos sinergistas é melhorar a atividade do ingrediente ativo do inseticida, promovendo a absorção dele ou interferindo com a sua detoxificação. Uma desvantagem do DEF é o fato de ele ser defolhante.

## 5. Testes em Adultos.

Os testes em adultos são menos sensíveis para detectar mudanças no nível de susceptibilidade do que os testes em larvas. Apesar disso, precisam ser feitos para monitorar o possível desenvolvimento de resistência aos produtos aduicidas usados no controle químico dos insetos vetores.

### 5.1 Procedimento:

Fêmeas adultas com idade de dois dias a uma semana da geração  $F_1$  ou  $F_2$  (no possível), de preferência recém alimentadas com sangue (após 24 a 36 horas a 25 C), em no mínimo três lotes de 10 a 20 indivíduos, são expostas ao inseticida a avaliar (impregnado em papel de filtro) por 1 a 2 horas em frascos de 80 ml (coletor universal) furados na base (furos não maiores de 1 mm de diâmetro) e logo transferidas a um papel limpo em novos frascos coletores por 24 horas.

Os papeis de filtro serão impregnados com concentrações de 1% para propoxur, 0,8% ou 0,5% para malathion, 1% para fenitrothion, e 0,25% para cipermetrina (Brown, 1986; Who, 1992; Mazzarri & Georghiou, 1995) ver a Tabela 4, secados ao ar e colocados na parte interior da tampa do frasco coletor. Três lotes de 10 indivíduos serão as testemunhas (frascos com papel impregnado só com água ou com o solvente orgânico usado na diluição). Quando necessário, as fêmeas capturadas em um aspirador poderão ser resfriadas no congelador por alguns minutos (5 a 10) antes de serem transferidas aos frascos coletores com os papeis impregnados e testemunhas, facilitando o manuseio delas.

Outra forma de fazer os bioensaios com os adultos é pelo método da garrafa impregnada com a solução de inseticida por tempo determinado (uma a duas horas) e repouso por 24 horas em garrafas sem inseticida (Brogdon & McAllister, 1998b). A aplicação tópica individual de uma dose ( $\mu$ l) de inseticida dissolvida em solvente orgânico (acetona) também é usada em um grupo de fêmeas como método alternativo de bioensaio com grupo controle no qual aplica individualmente só o solvente.

Tabela 4. Concentrações (%) de solução de Inseticida Impregnadas nos papeis para avaliar susceptibilidade em adultos e tempo (h) de exposição (% / h).

| Inseticida             | <i>Aedes aegypti</i> | <i>Aedes albopictus</i> | <i>Culex quinquefasciatus</i> |
|------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Propoxur               | 1 / 1                |                         | 0,1 / 2                       |
| Permetrina             | 0,25 / 1             |                         | 0,25 / 3                      |
| Deltametrina           |                      |                         | 0,025 / 1                     |
| $\lambda$ -Cyhalotrina | 0,03 / 1             |                         | 0,025 / 1                     |
| Cipermetrina           |                      |                         |                               |
|                        |                      |                         |                               |
|                        |                      |                         |                               |

Dados de Who (1992), Mazzarri (1995).

### 5.2 Avaliação:

Consideram-se mortos todos aqueles mosquitos incapazes de andar. Se a mortalidade nos frascos controles ultrapassar os 20%, o teste deve ser repetido; se a mortalidade nos controles estiver entre 5% e 20 %, as porcentagens devem ser corrigidas pela fórmula de Abbott. Para estimação de tempos letais ( $TL_{50}$   $TL_{95}$ ), usam-se diferentes períodos de exposição (seis ou oito) à mesma concentração, por exemplo de 15, 30, 60, 120, 240, 480 min (fator 2) ou em outros fatores crescentes de (3, 4, 5, etc) dependendo do produto. Por ex. piretróides tem ação rápida (<15 min). Bioensaios de tempo-mortalidade podem ser mais sensíveis que aqueles de dose-mortalidade na detecção de mudanças na susceptibilidade (Brogdon & McAllister, 1998b).

Os dados serão lançados em uma tabela (Tabela 5).

Para o monitoramento de resistência em adultos os critérios serão (Davison & Zahar, 1973 *apud* Brown, 1986):

|                    |   |                                    |
|--------------------|---|------------------------------------|
| 98% de mortalidade | = | susceptível                        |
| 80-98%             | " | requer verificação                 |
| 80%                | " | presença de indivíduos resistentes |

### 5.3. Teste de Verificação.

As fêmeas sobreviventes são alimentadas com sangue e confinadas em frascos ou gaiolas com água para ovipor; as fêmeas filhas ou F<sub>1</sub> (sem alimentação de sangue) de dois dias a uma semana são testadas como em 5.1. Se elas mostrarem menos mortalidade que a geração parental então pode ser concluído que há resistência.

### 5.4. Discussão

Resistência a inseticidas é um problema em todos os grupos de insetos que servem como vetores de doenças emergentes, se que bem os mecanismos envolvidos são similares nos taxa, cada problema de resistência é potencialmente único e pode envolver um padrão complexo de focos de resistência (Brogdon & McAllister, 1998a). Os Kits da OMS para bioensaios apresentam alguns problemas como caducidade rápida dos papeis impregnados (WHO, 1992). O catálogo, preço e informações adicionais dos quites podem ser obtidos de: Division of Vector Biology and Control, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland. O alto efeito residual do temephos (mais de três meses) em larvas de *A. aegypti* e as doses operacionais de pelo menos 1 a 5 ppm usadas pela SUCEN (Macoris et al., 1995) junto ao indiscriminado uso de inseticidas usados no ambiente doméstico e agrícola urgem o monitoramento corriqueiro e permanente dos níveis de susceptibilidade. Nos bioensaios, recomenda-se usar as gerações F1 ou F2 das amostras de campo para descartar inferências ambientais nas avaliações. Desta forma as respostas aos produtos são mais homogêneas, garantindo a comparação com as linhagens padrão usadas como referência e na estimação das razões de resistência (RR). No planejamento de programas de monitoramento da resistência aos inseticidas tem que ser levadas em conta algumas considerações ao respeito das concentrações diagnóstico e das respostas nos bioensaios para estimação das CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub> (Roush & Miller, 1986).

Embora nos bioensaios seja recomendado a avaliação de produtos grau técnico (verificando a sua pureza) seguindo-se procedimentos padrão (Brown, 1986; WHO, 1992; Ferrari, 1996, Brogdon & McAllister, 1998b), prévio à operacionalização das atividades de controle, as formulações dos produtos comerciais a serem usados devem ser analisadas quimicamente (% i.a.) e/ou avaliadas e monitoradas por médio de bioensaios quanto à sua eficiência em populações padrão (susceptíveis) e alvo (campo). Isto por causa de variações nas formulações e na qualidade dos produtos (fabricante, transporte, armazenamento, tempo de estoque, etc). Os piretróides em geral tem uma correlação negativa com a temperatura, mas outras variações no seu efeito tem a ver com a(s) moléculas (e isômeros destas) e a sua formulação. Uma vez que não seja conhecida uma explicação razoável para esta variação na atividade de moléculas inseticidas dependendo da formulação, a OMS também tem indicado resultados muito variáveis com o uso de piretróides (WHO, 1992). Um problema que pode acontecer no decorrer dos experimentos com concentrações baixas é a perda do químico, que tem ocorrido com concentrações menores de 0,001 mg/l de cipermetrina com perdas de até 30% em um período de exposição de 24 horas (Muirhead-Thomson, 1987).

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na resistência aos produtos químicos por sua vez, tende a ser mais importante quando a RR for entre média e alta (10 a >20). Tal conhecimento pode ajudar no planejamento adequado do manejo da resistência e das estratégias de controle a serem aplicadas. Quando mudanças de susceptibilidade pela CL<sub>50</sub> não são acompanhadas por mudanças também na CL<sub>95</sub>, pode ser recomendada a troca temporária do produto, o que em geral permite regredir a resistência. Outrosim, pode-se de forma mais simples, mas nem sempre mais econômica, substituir definitivamente o uso de produto por outros que não apresentem risco de resistência cruzada.

**Nota:** Todo o material de vidro a ser usado deve ser bem lavado e enxaguado, para garantir que não se tenha contaminação por outros produtos. De preferência usar material novo descartável ou não usar o mesmo material para produtos e concentrações diferentes. Produtos residuais ficam em recipientes plásticos mesmo depois de lavados e enxaguados “bem”. Para descartar as soluções mãe e as dissoluções usadas, acrescentar água sanitária a elas e/ou deixá-las no mínimo 20 min em luz UV antes do descarte em aterro adequado para tal fim. As soluções mãe acrescentadas de água sanitária podem ser deixadas algumas semanas (4 a 8) expostas à luz UV natural antes do descarte final no aterro, nunca despeje na pia ou no esgoto sanitário.

## 6. Análises Estatísticas

Quando duas ou mais variáveis são medidas em cada indivíduo ou grupo de indivíduos, desejamos expressar de forma precisa a natureza das relações entre estas variáveis (regressão e correlação). Com uma análise de **regressão** observamos a relação de uma variável com a outra, expressando uma como função linear da outra (ou outra função mais complexa), em uma análise de **correlação** calculamos o grau no qual duas variáveis variam em conjunto (Sokal & Rohlf, 1979). A regressão ajuda a estabelecer a forma e a significância das relações funcionais entre duas variáveis. Dita relação pode ser  $Y = f(X)$ , onde Y é a variável dependente e X a variável independente. Muitas vezes a relação causa-efeito pode ser estritamente linear, em outras como em curvas de crescimento a função aritmética da regressão não é linear e é preciso transformar uma ou as duas variáveis de tal forma a transformar uma relação curvilínea em uma relação linear. A transformação logarítmica é a mais usada, e é feita para ambas variáveis quando em situações de curvas de tipo crescimento exponencial. De outra parte, algumas curvas acumulativas podem transformar-se em linhas retas por meio da transformação *probit*.

### 6.1. Análise de *Probit* (concentração / resposta).

Dados de resposta quantitativa nos bioensaios de inseticidas são freqüentemente analisados usando um modelo *logit* ou *probit* assumindo respostas distribuídas binomialmente (Preisler, 1988). A análise de *probit* pode ser usada para caracterizar a resposta de uma linhagem de mosquitos a um tóxico (inseticida). Se a porcentagem acumulada da mortalidade é transformada em unidades *probit* e plotadas contra o logaritmo da concentração (ou dose) do inseticida, obtemos uma linha do log da concentração pela mortalidade em *probit* (LC-P). Na transformação o ponto 50% de mortalidade é convertido em zero desvios típicos, o ponto 84,13% é convertido em +1 desvio típico e o ponto 2,27% é convertido em -2 desvios típicos. Os *probits* são desvios equivalentes normais codificados pela adição de 5,0, o que contorna os valores negativos para a maior parte dos desvios. Assim, o valor de *probit* 5,0 corresponde a uma freqüência cumulativa de 50%, um *probit* de valor 6,0 corresponde a uma freqüência cumulativa de 84,13% e um *probit* de valor 3 corresponde a uma freqüência cumulativa de 2,27%, existem tabelas de *probits* que proporcionam os *probits* equivalentes a freqüências cumulativas. Desta forma a linhagem é caracterizada pelas concentrações, doses ou tempos que matam 50% (CL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub> ou TL<sub>50</sub>) e 95% (CL<sub>95</sub>) dos indivíduos tratados. A análise de *probit* dá intervalos de confiança 95% para estes valores tanto quanto o coeficiente angular ou inclinação da linha concentração-mortalidade (LC-P) e o coeficiente de linear. Além disto, a análise *probit* pode confirmar a existência de regressão (teste t) e se a resposta avaliada segue (se ajusta) ao modelo *probit* (teste  $\chi^2$ ), estima a heterogeneidade na amostra e calcula as concentrações (ou doses) efetivas, e a potência relativa destas.

Há programas de computador que efetuam os cálculos para o modelo *probit*, o POLO (Russell et al. 1977; LeOra Software, 1997; Haddad, 1998), o GLIM (Baker & Nelder, 1978) e o SAS (SAS Institute, 1985) entre outros.

#### 6.1.1. Intervalos de Confiança

Os intervalos de confiança para os valores da CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub> podem ser usados na comparação de linhagens ou concentrações diferentes. Se os valores dos intervalos de confiança das concentrações letais de uma linhagem não estão contidos nos valores da outra, as concentrações letais são diferentes.

### 6.1.2. Coeficiente Angular

O coeficiente angular ou inclinação da linha LC-P é uma medida da variabilidade da linhagem. Quanto maior a inclinação da linha, é um indicativo de que a resposta dos indivíduos ao inseticida é mais uniforme. A análise de *probit* é indicada para caracterizar a resposta de um grupo homogêneo de organismos a um tóxico. Diferença grande entre os valores da  $CL_{50}$  e da  $CL_{95}$  sugere que as populações são heterogêneas em sua resposta ao inseticida. Quando uma colônia geneticamente heterogênea (estabelecida recentemente de uma população de campo) é sujeita a um bioensaio de concentração-resposta, a linha LC-P tem uma inclinação pequena, indicando que os indivíduos na amostra variam no seu nível de tolerância ao inseticida (ou são heterogêneos em sua resposta ao inseticida em questão). Depois de selecionar uma linhagem para resistência, e esta se estabiliza é a resistência permanece estável, a linhagem resistente homogênea pode ser comparada com uma linhagem susceptível padrão para determinar seu grau de resistência. Assim, a razão de resistência na  $CL_{50}$  é a  $CL_{50}$  da linhagem resistente dividida pela  $CL_{50}$  da linhagem susceptível. A razão de resistência é usualmente calculada para a  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$  da linhagem.

### 6.1.3. Teste de Semelhança ou Igualdade

Quando são obtidas duas ou mais linhas de regressão a partir de dados análogos (ex. duas linhagens) deseja-se saber se as relações funcionais descritas pelas equações de regressão são as mesmas. O teste prova se os coeficientes lineares e angulares das regressões não são significativamente diferentes.

### 6.1.4. Teste de Paralelismo

A prova ou teste de paralelismo avalia se há diferenças significativas nas respostas de dois grupos aos inseticidas. Especificamente testa a hipótese de que os coeficientes angulares das regressões não são significativamente diferentes. Três possíveis resultados podem ocorrer nos testes de hipóteses para regressão linear: retas paralelas; iguais, nem iguais nem paralelas. Retas paralelas significam que as concentrações (ou doses) efetivas são qualitativamente idênticas, porém quantitativamente diferentes. Retas iguais indicam que as concentrações ou doses efetivas são qualitativamente e quantitativamente não diferentes. Retas nem iguais nem paralelas não devem ser comparadas em relação à concentração ou dose efetiva.

### 6.1.5. Teste de Heterogeneidade

Na análise de *probit* a heterogeneidade da linha de regressão é medida pelo estatístico de bondade de ajuste  $\chi^2$ . Falta de ajuste é usualmente demonstrado por um  $\chi^2$  ou um fator de heterogeneidade grande (Finney, 1971). Valores insignificantes deste estatístico de heterogeneidade para os cálculos da linha de regressão podem indicar que nenhum gene com efeito principal (maior) sobre a susceptibilidade segregou (Amin & White, 1984).

Segundo Preisler (1988) e Preisler et al. (1990) há cinco tipos importantes de causas que podem originar  $\chi^2$  grandes: uma, pontos muito afastados, um destes terá influência maior sobre os resultados, especialmente se ele é observado em um nível de resposta cerca de 0% ou de 100%, mas um destes dados extremos só pode ser descartado se há forte evidência que sugira um erro no registro, no cálculo ou em circunstância semelhante. Dois, quando uma ou várias variáveis que possam afetar a resposta foram omitidas do modelo ou não foram padronizadas, estas podem ser o peso, o sexo, a idade ou variáveis ambientais como a temperatura, a luz, a umidade. Três, falta de ajuste pode acontecer também por mistura de populações ou idades. Uma quarta causa é quando os termos de erro não são independentes (correlação das respostas), por exemplo insetos de uma mesma geração são mais semelhantes que insetos de diferentes gerações, da mesma forma insetos tratados em grupo no mesmo copo ou gaiola podem comportar-se mais uniformemente que insetos tratados em diferentes recipientes. Uma quinta causa é pela existência de variação extra-binomial (os termos de erro não são binomiais), exemplo disto se dá quando variações inexplicadas acontecem entre as repetições, indivíduos na mesma repetição estão no mesmo ambiente possivelmente competem pelos mesmos recursos ou diferenças pequenas na preparação das concentrações ou

doses entre as repetições. Isto pode ser evitado colocando suficiente alimento e usando recipientes grandes (recomenda-se no menos que um a dez ml de solução por larva) no caso de evitar problemas de competição. No caso das concentrações, fazer uma solução homogênea para todas as repetições ou aplicação tópica em cada indivíduo apresenta dispersão menor entre as repetições que experimentos nos quais o inseticida é borrifado ou incorporado dentro da dieta. O bioensaio deve incluir um número grande de indivíduos no grupo controle, por causa das dificuldades estatísticas e computacionais que acontecem se a mortalidade natural necessita ser estimada ao mesmo tempo (Preisler, 1988).

Tabela 5. Testes de adultos. Respostas dos alados a concentrações discriminantes de inseticidas.

Cidade / Data:

Distrito:

Bairro:

|                                                                        |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|------------|--------|----------|--------|----------|--------|-----------|-----------|-----------|---------|----------|
| Data da última aplicação na área (bairro ou distrito) /produto/dosagem |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| Data de coleta/ Sítio de repouso (origem)                              |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| Espécie testada                                                        |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| Sexo / estado fisiológico                                              |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| Data e hora do Teste                                                   |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| <b>Inseticida Testado</b>                                              |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| Lote de produção / data                                                |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| Concentração usada (%)                                                 |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| Período de exposição                                                   |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| Faixa de T(°C)                                                         | exposição |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
|                                                                        | espera    |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| Faixa de UR(%)                                                         | exposição |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
|                                                                        | espera    |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| Grupo Teste                                                            |           | Cont role | Expe rime. | Con tr | Expe rim | Con tr | Expe rim | Con tr | Exper ime | Cont role | Expe rime | Con tro | Expe rim |
| Número de repetições                                                   |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| # adultos expostos                                                     |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| # adultos knocked down                                                 |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| # adultos mortos                                                       |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| % mortalidade média obs. Desvio padrão                                 |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| % mortalidade (corrigida)                                              |           | 0         |            | 0      |          | 0      |          | 0      |           | 0         |           | 0       |          |
| Observações                                                            |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |
| Recomendações                                                          |           |           |            |        |          |        |          |        |           |           |           |         |          |

Obs.: Tabela adaptada da OMS (1992).

**Bibliografia.**

- Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-267, 1925.
- Almaraj et al., *Acta Tropica* **75**: 243-246, 2000.
- Amin, A.M. & White, G.B. Resistance potential of *Culex quinquefasciatus* against the insect growth regulators methoprene and diflubenzuron. *Entomol. Exp. Appl.* **36**: 69-76, 1984.
- Andrade, C.F.S. & Modolo, M. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in integrated control. *Rev. Sau. Públ., S. Paulo*, **25** (3): 184-187, 1991.
- Baker, R.J. & Nelder, J.A. The GLIM manual: release 3. Generalized linear interactive modeling. Numerical Algorithms Group, Oxford, England, 1978.
- Beaty, B.J. & Marquardt, W.C. (eds.). *The biology of disease vectors*, University Press of Colorado, Colorado, 529 p., 1996.
- Bourguet, D., Capela, R. & Raymond, M. An insensitive acetylcholinesterase in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Portugal. *J. Econ. Entomol.* **89** (5): 1060-1066, 1996.
- Bracco, J.E., Barata, J.M.S. & Marinotti, O. Evaluation of insecticide resistance in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94** (1): 115-120, 1999.
- Bracco, J.E., Dalbon, M., Marinotti, O. & Barata, J.M.S. Organophosphorus and carbamate resistance in a population of *Culex quinquefasciatus*. *Rev. Sau. Publ.* **31** (2): 182-183, 1997.
- Brogdon, W.G. & McAllister, J.C. Insecticide resistance and vector control. *Emerg. Infect. Diseases*. **4** (4): 605-613, 1998a.
- Brogdon, W.G. & McAllister, J.C. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time mortality determinations in glass bottles. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **14** (2): 159-164, 1998b.
- Brown, A.W.A. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **2** (2): 123-140, 1986.
- Campos, J. & Andrade, C.F.S. Susceptibilidade larval de duas populações de *Aedes aegypti* a inseticidas químicos. *Rev. Saúde Pública* **35** (3): 232-236, 2001.
- Campos, J. & Andrade, C.F.S. Susceptibilidade larval de populações de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* a inseticidas químicos. *Rev. Saúde Pública*, no prelo.
- Clements, A.N. *The Biology of Mosquitoes, development, nutrition and reproduction*. Vol. 1. Chapman & Hall, London, 509 p., 1992.
- Consoli, R.A.G.B. & Lourenço-de Oliveira, R. *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro, 224 p., 1994.
- Cutkomp, L.K. & Subramanyam, B. Toxicity of pyrethroids to *Aedes aegypti* larvae in relation to temperature. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **2** (3): 347-349, 1986.
- Davidson, G. & Zahar, A.R. The practical implications of resistance of malaria vectors to insecticides. *Bull. W.H.O.* **29**: 475-483, 1973.
- Dinardo-Miranda, L.L. Mosquito da dengue resiste a inseticidas. in M.T. Costa (rep.). *Correio Popular, 1-Cidades*, Campinas, 5 de novembro de 1994.
- Ferrari, J.A. Insecticide resistance. In *The biology of disease vectors*. Beaty, B.J. & Marquardt, W.C. (eds.). University Press of Colorado, Colorado, p. 512-529, 1996.
- Finney D.J. Probit analysis. Cambridge Univ. Press, Cambridge, Uk; 1971.
- Gaven, B., Schaffner, F. & Lagneau, C. Insecticide sensibility of the french strain of *Aedes albopictus*. In: 3<sup>rd</sup> International Congress of Vector Ecology – Barcelona, Spain 16/21 September 2001. Poster presentation: Abstracts book, p.59.
- Georghiou GP, Wirth M, Tran H, Saume F, Knudsen B. Potencial for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Caribbean area and neighboring countries. *J. Med. Entomol.* 1987; **24**: 290-294.
- González, T., Bisset, J.A., Díaz, C., Rodríguez, M.M. & Brandolini, M.B. Insecticide resistance in a *Culex quinquefasciatus* strain from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94** (1): 121-122, 1999.
- Haddad, M.L. Utilização do Polo-PC para análise de Probit. in: Controle microbiano de insetos, (S.B. Alves, ed), 2<sup>a</sup> ed., FEALQ, Piracicaba, p. 999-1013, 1998.
- Helson BV, Surgeoner GA. Efficacy of cypermethrin for the control of mosquito larvae and pupae, and impact on non-target organisms, including fish. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **2** (3): 269-275, 1986.
- Henrick, C. A. Juvenile hormone analogs: structure activity relationships. In: Insecticide Mode of action (J.R. Coats, ed), Academic Press, New York, 315-402, 1982.
- LeOra Software. Polo-PC, probit or logit analysis. Berkeley, CA, 1987.
- Macoris MLG, Camargo MF, Silva IG, Takaku L, Andrighetti MT. Modificação da susceptibilidade de *Aedes aegypti* ao temephos. *Rev. Pat. Trop.* **24**: 31-40, 1995.



- Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T. & Takaku, L. Efeito residual de temephós em larvas de *Aedes aegypti*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **28** (4): 375-377, 1995.
- Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T., Takaku, L., Glasser, C., Garbeloto, V.C. & Cirino, C.B. Alteração de resposta de susceptibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública* **33**: 521-522, 1999.
- Mazzarri, M.B. & Georgioui, G.P. 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.
- Mebrahtu YB, Norem J, Taylor M. Inheritance of larval resistance to permethrin in *Aedes aegypti* and association with sex ratio distortion and life history variation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997; **56**: 456-465.
- Muirhead-Thomson, R.C. *Pesticide impact on stream fauna with special reference to macroinvertebrates*. Cambridge University Press, New York, 275 p., 1987.
- Preisler, H.K. Assessing insecticide bioassay data with extra-binomial variation. *J. Econ. Entomol.* **81** (3): 759-765, 1988.
- Preisler, H.K., Hoy, M.A. & Robertson, J.L. Statistical analysis of modes of inheritance for pesticide resistance. *J. Econ. Entomol.* **83** (5): 1649-1655, 1990.
- Rawlins, S.C. & Wan, J.O.H. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **11** (1): 59-56, 1995.
- Reyes-Villanueva F, Garza-Garza H, Flores-Leal A. Effect of sublethal doses of Abate® on some biological parameters of *Aedes aegypti*. in: *Mosquito vector control and biology in Latin America-A symposium*. *J. Am. Mosq. Control Ass.* 1990; **7**: 639.
- Roush, R.T. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitology Today* **9** (5): 174-179, 1993.
- Roush, R. T. & Miller, G.L. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. *J. Econ. Entomol.* **79**: 293-298, 1986.
- Russell, R.M., Robertson, J.L. & Savin, N.E. POLO: new computer program for probit analysis. *Bull. Entomol. Soc. Am.* **23**: 209-213, 1977.
- Sames WJ, Bueno JrR, Hayes J, Olson JK. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Lower Rio Grande Valley of Texas and Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 1996; **12**: 487-490.
- SAS Institute. SAS user's guide: statistics, version 5. SAS Institute, Cary, N.C.
- Schaefer, C.H., Miura, T., Dupras Jr, E.F., Mulligan III, F.S. & Wilder, W.H. Efficacy, nontarget effects, and chemical persistence of S-31183, a promising mosquito (Diptera: Culicidae) control agent. *J. Econ. Entomol.* **81** (6): 1648-1655, 1988.
- Shajahan RM. Effects of insecticide selection pressure on the larvae of the *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bangladesh J. Zool.* 1996; **24**: 97-102.
- Silva I.G., Camargo M.F., Elias C.N., Silva H.H.G., Irata Y. & Antunes SM. Provas biológicas para verificar a susceptibilidade do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) ao Cythion. *Rev. Pat. Trop.* 1997; **26**: 31-35.
- Small, G.J., karunaratne, H.P.P., Chade, D.D. & Hemingway, J. Molecular and kinetic evidence for allelic variants of esterase Estß1 in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Med. Vet. Entomol.* **13**: 274-281, 1999.
- Smith, C.N (ed.). *Insect Colonization and Mass Production*. Academic Press, New York, 1966, 618 p.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. *Biometria, principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Blume, Rosario, 832 p., 1979.
- Wesson, D.M. Susceptibility to organophosphate insecticides in larval *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **6** (2): 258-264, 1990.
- Wirth MC, Georgioui, GP. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **15**: 315-320, 1999.
- World Health Organization. Vector resistance to pesticides. *WHO Tech. Rep. Ser.* **818**, 63p., 1992.
- World Health Organization. Report of the fourth whopes working group meeting. *WHO/CDS/WHOPES/2001.2*, 102p., 2001.