

NADJA BIONDINE MARRIEL

**EFEITOS SUBLETAIS DA DELTAMETRINA NO COMPORTAMENTO LARVAL E
NOS ENÓCITOS PUPAIS DE *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M359e
2015
Marriel, Nadja Biondine, 1989-
Efeitos subletais da deltametrina no comportamento larval e nos
enócitos pupais de *Aedes aegypti* / Nadja Biondine Marriel. - Viçosa,
MG, 2015.
vi, 42f. : il. (algumas color.) : 29 cm.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.33-42.

1. *Aedes aegypti*. 2. Inseto - Comportamento. 3. Larvas. 4.
Enócitos. 5. Produtos químicos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em
Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

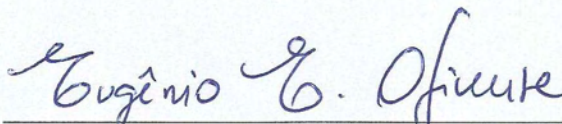
CDD 22. ed. 595.772


NADJA BIONDINE MARRIEL

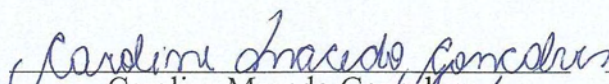
**EFEITOS SUBLETAIS DA DELTAMETRINA NO COMPORTAMENTO
LARVAL E NOS ENÓCITOS PUPAIS DE *Aedes aegypti***

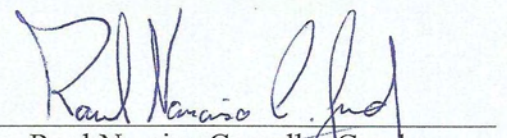
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

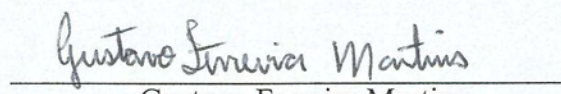
APROVADA: 28 de julho de 2015.


Eugênio Eduardo de Oliveira


José Marcelo Ramalho Ortigão


Caroline Macedo Gonçalves


Raul Narciso Carvalho Guedes
(Coorientador)


Gustavo Ferreira Martins
(Orientador)

DEDICATÓRIA

*“Porque se chamavam homens também se chamavam sonhos
e sonhos não envelhecem...” (Marcio Borges, Lô Borges e Milton Nascimento)*

*Dedico
Aos meus pais, Mauro e Lúcia,
e aos meus irmãos Lucas e Thais,
Pelo apoio, confiança, dedicação,
e companheirismo.
Eu amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

- Ao Gustavo, Hudson e Raul pelo carinho, companheirismo, paciência, excelente orientação e pelo aprendizado adquirido ao trabalhar com vocês! Muito Obrigada!
- À toda equipe do Núcleo de Microscopia pelo carinho, aprendizado e oportunidade de realização dos meus trabalhos.
- Ao Ademir Martins da Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ RJ por gentilmente ceder os ovos de *Aedes aegypti* resistente para que eu pudesse realizar meu trabalho.
- À FAPEMIG pela bolsa de mestrado.
- Aos meus pais Mauro e Lúcia e ao meu irmão Lucas pelo amor incondicional, apoio e confiança. Foi através dos princípios e ensinamentos aprendidos com vocês que fui capaz de chegar até aqui. Sei que não mediram esforços e sempre estiveram ao meu lado acompanhando cada passo, me incentivando, apoiando e alertando durante esse percurso. Obrigada por me ajudarem a tornar esse sonho realidade! Amo vocês!
- À Thais, que contribuiu muito para meu crescimento! Independente da distância, sempre presente em minha vida, ela é muito importante para mim, durante essa jornada me acompanhou e vibrou comigo nas vitórias e me ajudou nos momentos difíceis. Muito obrigada pela paciência apoio e carinho.
- À Luiza, Gabriela, Bárbara, Rayane, Thiago, Vivianne, Thalita, Mirna, Andreza, Camila e Narjara, pelo companheirismo, amizade, carinho e principalmente compreensão e paciência por entender pela minha ausência. Já compartilhamos aflições e vitórias ao longo de nossa caminhada e muito sucesso ainda está por vir para todos nós.
- À Raquel, pela amizade sincera, ensinamentos, risos e companheirismo, sem dúvidas a jornada do mestrado foi mais leve pois você esteve ao meu lado. Muito obrigada por tudo! Ps: Te odeio!
- À Renata, Tales, Samira, Juliana, Henrique, Franciane, Carol e Kenner por tornarem mais leve essa caminhada, por me permitir fazer parte de um time vencedor. Muito obrigada pelo aprendizado, preocupação e momentos de alegria.

Obrigada a todos vocês por contribuírem para essa realização, assim sigo meu caminho na certeza de que nunca caminharei sozinha!

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A dengue.....	1
1.2 O <i>Aedes aegypti</i>	3
1.3 Controle da Dengue	5
1.4 Piretroides	5
1.5 Inseticidas e resistência em mosquitos	6
1.6 Enócitos	8
1.7 Comportamento	9
2. JUSTIFICATIVA.....	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral	12
3.1.1 Objetivos específicos	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Insetos	12
4.2 Curva de sobrevivência	12
4.3 Comportamento	13
4.3.1 Análises Estatísticas	14
4.4 Dissecção das pupas	14
4.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	14
4.6 Microscopia de fluorescência	15
4.6.1 Reação de Tunel	15
5. RESULTADOS	16
5.1 Curva de sobrevivência	16
5.2 Comportamento da atividade locomotora.....	18
5.3 Reação de TUNEL	20
5.4 Microscopia eletrônica de transmissão	22
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÕES	32
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

RESUMO

MARRIEL, Nadja Biondine, M Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Efeitos subletais da deltametrina no comportamento larval e nos enócitos pupais de *Aedes aegypti***. Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

O *Aedes aegypti* é o principal vetor dos vírus causadores da Dengue. Uma das formas de se controlar a transmissão da doença é o combate desse vetor através do uso de inseticidas. Um dos mecanismos de resistência pode estar ligado ao metabolismo de inseticidas por diferente órgãos ou células, incluindo os enócitos. Os enócitos são células de origem ectodérmica ricas em retículo endoplasmático liso e responsáveis pelos processos de metabolismo de lipídeos e desintoxicação. Nosso trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos subletais da deltametrina no comportamento larval e nos enócitos pupais e do inseto em duas populações diferentes, susceptível e resistente, de *A. aegypti*. Para isso foram utilizados larvas de quarto instar (L4) e pupas de populações resistente e susceptível a deltametrina. L4 das duas populações foram submetidas a diferentes concentrações do inseticida: 0,001; 0,003; 0,005; 0,007 ppm e a sobrevivência foi aferida. Após a exposição ao inseticida, L4 foram submetidas a bioensaios comportamentais. Pupas com dois dias de idade após a pupação foram dissecadas e os grupos de enócitos processados para microscopia eletrônica de transmissão (MET) e reação de TUNEL de insetos expostos a 0,003 e 0,005 ppm de inseticida. A 0,007 ppm a deltametrina apresentou efeitos letais sobre as L4 susceptível, enquanto que as resistentes sobreviveram a todas as concentrações testadas. L4 susceptíveis apresentaram um comportamento letárgico e taxa de atividade e natação bem menor do que o controle. Provavelmente, isso ocorreu devido a ação neurotóxica do inseticida. Já nas L4 resistentes observou-se hiperexcitação a 0,005 ppm de deltametrina. Não foram observados efeitos subletais e morte celular significativos tanto em enócitos da população susceptível quanto da resistente expostas à deltametrina. Nossos resultados contribuem para o melhor entendimento das diferentes respostas à exposição subletal à deltametrina em populações susceptíveis e resistentes de *A. aegypti* e sua relação com o comportamento das formas aquáticas e a estrutura dos enócitos nessa espécie.

ABSTRACT

MARRIEL, Nadja Biondine, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Sublethal effects of deltamethrin in the larval behavior and pupal oenocytes of *Aedes aegypti*.** Adviser: Gustavo Ferreira Martins.

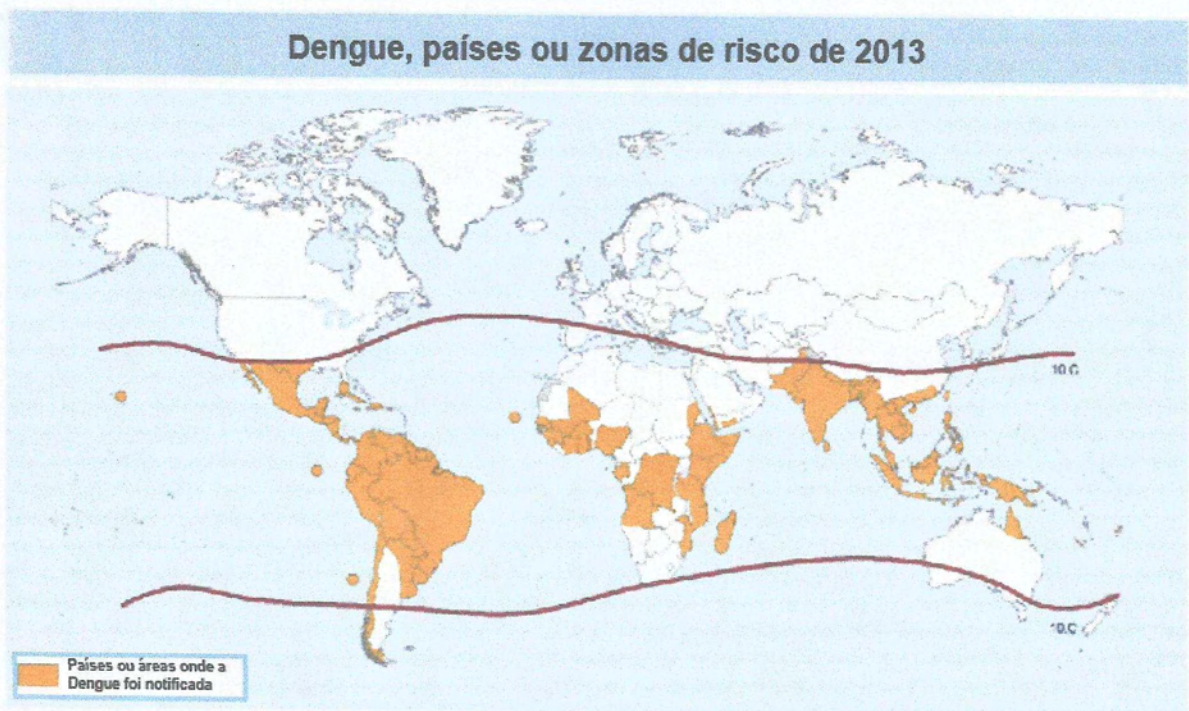
The mosquito *Aedes aegypti* is the main vector of Dengue virus. One strategy to control the transmission of these pathogens by this vector is by means insecticide use. The major problems related to this strategy is the emergence of resistance. The mechanisms of resistance may be linked to the metabolism of insecticides by different cells, including oenocytes. The oenocytes are ectodermal cells rich in smooth endoplasmic reticulum and responsible for lipid metabolism and detoxification. This work aimed at evaluating the sublethal effects of deltamethrin on the behavior and structure of oenocytes in immature mosquitoes, of susceptible and resistant *A. aegypti* strains. Fourth instar larvae (L4) of both strains were exposed to different concentrations of deltamethrin: 0.001; 0.003; 0.005; 0.007 ppm, and the survival rate was measured. After exposition, L4 of both populations were subjected to behavioral bioassays with the aid of the program View Point Application Manager-Video Track. To study the effects of insecticide in the ultrastructure and cell integrity after insecticide exposure (0.003 and 0.005 ppm), two-days old pupae after pupation were dissected and their oenocytes were processed for transmission electron microscopy (TEM) and TUNEL. The concentration of 0.007 ppm had lethal effects on susceptible L4, while the resistant L4 survived under all the tested concentrations. Susceptible L4 are lethargic and had the swimming activity much lower than control. This probably was due to neurotoxic action of the insecticide. On the other hand, the resistant L4 were hyperexcited under the treatment with 0.005 ppm. This might result from the inhibitory action of the insecticide on the neurotransmitter GABA. There were no sublethal effects and significant cell death in both susceptible and resistant oenocytes exposed to deltamethrin. Our results revealed the different responses of susceptible and resistant strains of *A. aegypti* under deltamethrin sublethal exposures, and how these two different strains differs in terms of immature stage behaviors and the structure of oenocytes under exposures.

INTRODUÇÃO

1.2 A dengue

A dengue é uma infecção viral transmitida pelo *Aedes aegypti* um mosquito de grande importância para a saúde pública. Esta doença atinge principalmente, aqueles que vivem em áreas urbanas de países tropicais e subtropicais (Guzman *et al.*, 2010). Nas últimas décadas a incidência de dengue cresceu dramaticamente em todo o mundo. Os números de casos de dengue são subnotificados e muitos casos são classificados erroneamente (WHO, 2015 a).

Estima-se que 3,9 bilhões de pessoas estejam em áreas de risco de transmissão da doença (tendo ocorrido 390 milhões de infecções por dengue por ano, das quais 96 milhões se manifestam clinicamente (Brady *et al.*, 2012; Bhatt *et al.*, 2013). A Figura 1 mostra a distribuição geográfica dos casos de dengue registrados em 2013 e pode-se observar que os casos se concentram na região dos trópicos e quase todos os países da América Latina estão



afetados.

Figura 1. Distribuição geográfica da Dengue. Áreas de risco de transmissão em amarelo.

Fonte: Modificado (WHO, 2013)

O principal vetor dos vírus da dengue é o mosquito *Aedes aegypti*, sendo o segundo potencial vetor o *Aedes albopictus* e a transmissão ocorre através da picada de uma fêmea infectada. Existem quatro sorotipos distintos do vírus denominados: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5 os quais pertencem à família Flaviviridae e ao gênero Flavivirus. (Wilder-Smith *et al.*, 2010; WHO, 2012; Mustafa *et al.*, 2015). Indivíduos infectados com um dos quatro sorotipos podem permanecer assintomáticos ou apresentar diferentes quadros clínicos. Como a febre da dengue (FD) que inclui as formas brandas, a febre hemorrágica da dengue (FHD) representa as formas graves da doença ou a síndrome do choque da dengue (SCD) que pode ser fatal (Edelman, 2007; Stephenson, 2005).

Não há um tratamento específico dos sintomas da doença, ela consiste basicamente no acompanhamento do paciente, controle da temperatura, hidratação e demais sintomas. Atualmente, não existem drogas e vacinas licenciadas contra a dengue (Julander *et al.*, 2011). Nesse contexto, várias organizações e grupos de pesquisa estão trabalhando com diversas abordagens para o desenvolvimento de vacinas (WHO, 2015b).

De acordo com o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, em 2015 foram registrados 745.957 casos notificados de dengue no Brasil até a semana epidemiológica nº 15, período compreendido entre 04 e 18 de abril de 2015. A região Sudeste teve o maior número de casos notificados (66,2%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (11,5%), Centro-Oeste (12,4%), Sul (5,8%) e Norte (4,1%). Observa-se que em 2015 houve um aumento significativo no número de casos graves e óbitos quando comparado ao ano anterior. Até a semana epidemiológica nº 15, foram confirmados 404 casos de dengue grave e 5.771 casos de dengue com sinais de alarme. Ao passo que no mesmo período em 2014, foram confirmados 270 casos graves e 3.115 casos de dengue com sinais de alarme. A partir desses dados verifica-se que a situação da dengue no país não está sob controle e faz-se necessário adotar medidas mais consistentes no combate ao vetor.

Não apenas no Brasil, mas globalmente, alterações climáticas, evolução do vírus e fatores sociais tais como a rápida urbanização, crescimento e desenvolvimento da população, questões socioeconômicas e viagens, contribuem para a expansão da transmissão da doença observada ao longo das últimas cinco décadas (Wilder-Smith *et al.*, 2008; Astrom *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2013). Sendo assim, é fundamental o investimento em pesquisas, estratégias terapêuticas e métodos de controle de vetores eficazes no combate à dengue.

1.3 O *Aedes aegypti*

O *A. aegypti*, comumente conhecido como mosquito da Dengue, é uma espécie pertencente à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Culicidae, subfamília Culicinae, tribo Aedini, gênero *Aedes* e subgênero *Stegomyia* (Consoli *et al.*, 1994). Caracteriza-se por ser um mosquito rajado, de coloração escura, com escamas brancas pelo corpo. Sua identificação é facilitada devido ao desenho em forma de lira presente no dorso. Escamas brancas, alternando-se com escamas escuras, são encontradas na região posterior da cabeça e nos segmentos abdominais (Fig. 2) (Rey, 2001).

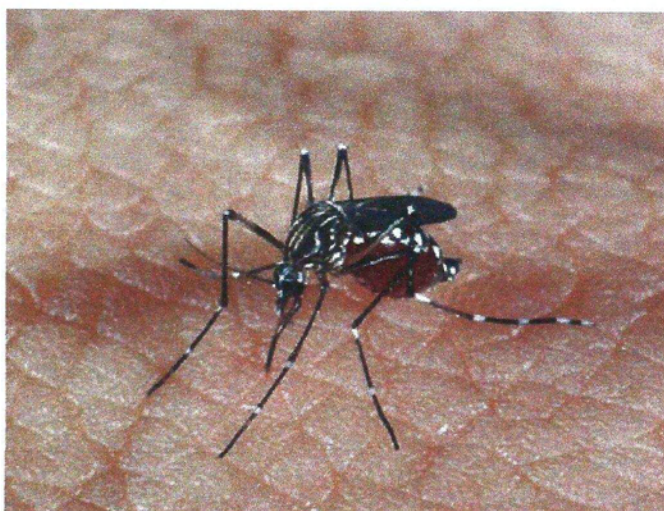


Figura 2: Fêmea de *Aedes aegypti* realizando repasto sanguíneo. Fonte: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/aedesvetoredoenca.html> - Genilton Vieira/IOC. Acesso em 09/07/15

Essa espécie possui um curto ciclo biológico com duração de 15 a 30 dias, que compreende as fases de ovo, quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4), pupa e adultos (Fig. 3) (Bezerra *et al.*, 2006). Os ovos são depositados em lugares quentes e úmidos, próximos a linha d'água, os embriões levam cerca de 2 a 3 dias para se desenvolverem e eclodirem se as condições forem adequadas (Costa, 2001).

O *A. aegypti* é originado do continente africano (Chiaravalloti-Neto, 1997) e foi introduzido no Brasil em consequência do transporte de escravos, durante o período colonial (Chieffi, 1985). A distribuição desse mosquito é cada vez mais abrangente. Está distribuído por quase todo o mundo, com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais (Consoli *et al.*, 1994).

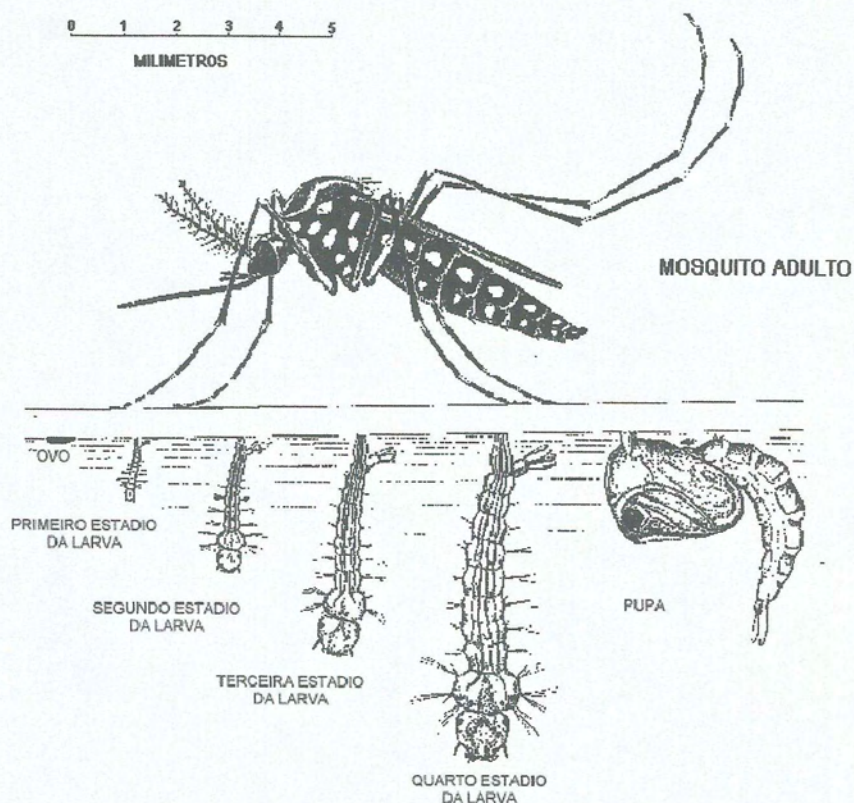


Figura 3: Desenho esquemático mostrando os estágios de desenvolvimento do *A. aegypti*.
Fonte: http://www.dengue.org.br/mosquito_aedes.html Acesso em 05/07/15.

É um mosquito de hábito diurno com atividade no período vespertino, apenas as fêmeas são hematófagas e utilizam as mais diversas categorias de animais, inclusive o homem como fonte de alimento, desde que estejam próximos a seus criadouros e abrigos (Consoli *et al.*, 1994). Atualmente, *A. aegypti* e *Aedes albopictus* são os vetores principais dos vírus da Febre Amarela, Dengue, Chikungunya e Zika. Em conjunto, estes vírus são responsáveis por quase 100 milhões de casos de doenças transmitidas por mosquitos por ano (CDC, 2015). Até o momento, o controle do vetor se apresenta como a única forma de controlar a dengue e as outras doenças transmitidas pelo mosquito.

1.4 Controle da Dengue

Em função da falta de vacinas e drogas contra a dengue, o combate ao vetor torna-se o foco para a prevenção e o controle da doença. Sendo assim, o governo realiza campanhas que estimulam a participação ativa da população e por meio de ações da vigilância sanitária promove a remoção de criadouros larvares (MS-SVS, 2009). Em 2002 foi instituído no Brasil o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) que planeja e põe em prática estratégias de identificação e eliminação de focos, controle do vetor, prevenção e tratamento da doença. Desde então, o programa tem sido modificado e atualizado para melhor atender às necessidades da população (Braga & Valle, 2007).

Contudo, o uso do controle químico com inseticidas de origem orgânica ainda é um dos métodos mais adotados no controle de vetores em Saúde Pública (Rose, 2001). Dentre os compostos orgânicos utilizados destacam-se aqueles pertencentes principalmente aos seguintes grupos: organofosforados, carbamatos e piretroides (Braga & Valle, 2007). Todos esses grupos atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos (Mellon & Georghiou, 1984; Palchick, 1996).

Em casos de epidemia com o objetivo de diminuir a densidade dos mosquitos adultos, utiliza-se o fumacê, no entanto essa técnica pode gerar a falsa sensação de segurança, fazendo com que as pessoas deixem de se comprometer com as suas atividades relacionadas à eliminação dos criadouros. Embora o uso de inseticidas seja a estratégia de controle mais adotada, ela apresenta dois principais problemas: a seleção de populações resistentes de mosquitos a esses produtos e os danos ambientais provocados por seu uso intensivo (Polanczyk *et al.*, 2003; Luna *et al.*, 2004). Esses fatores alertaram a comunidade científica para que haja um devido acompanhamento e uma re-avaliação dos métodos utilizados.

1.5 Piretroides

Os piretroides são os derivados sintéticos das piretrinas, que por sua vez são ésteres tóxicos isolados das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e de espécies relacionadas (Nasuti *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 2001; Valentine, 1990) São efetivos contra um largo espectro de insetos, apresentam baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental. Além disso são necessárias baixas quantidades para sua atuação, possuem meia-vida curta no ambiente e não bioacumulam (Santos *et al.*, 2007).

Estes inseticidas são divididos em dois grupos: tipo I, o qual não possui o grupamento alfa-cianofenoxibenzil como por exemplo a permetrina, e o outro é o tipo II como a deltametrina, que contém o grupamento alfa-cianofenoxibenzil, característica que confere maior eficácia ao inseticida (Fig. 4) (OSTI *et al.*, 2007).

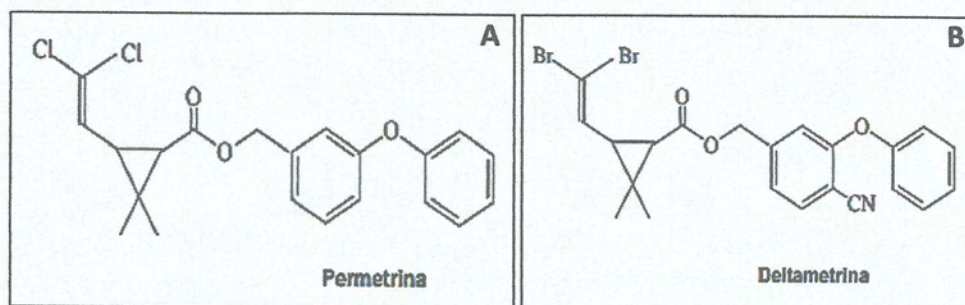


Figura 4: Exemplos de piretroides tipo I: A) Permetrina; Tipo II: B) Deltametrina. Fonte: Santos *et al.*, 2007

Os piretroides apresentam modo de ação similar ao do DDT (diclorodifeniltricloroetano, um tipo de organoclorado), mantendo os canais de sódio das membranas dos neurônios abertos por maior período de tempo. Dessa maneira, afetam o sistema nervoso periférico e central do inseto, estimulando as células nervosas a produzirem descargas repetitivas e, eventualmente, causam paralisia e um efeito de choque denominado *knock down* (Braga & Valle, 2007; Santos *et al.*, 2007).

A deltametrina está entre os seis inseticidas piretroides recomendados pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005). Embora tenha sido utilizada como um larvicida e adulticida contra mosquitos, vários autores têm relatado o desenvolvimento de resistência a esse composto (Gayathri & Murthy, 2006; Perera *et al.*, 2008).

1.5 Inseticidas e resistência em mosquitos

A constante utilização de inseticidas tem provocado a seleção de populações de insetos resistentes, o que acarreta problemas no controle de vetores (Braga & Valle, 2007). Embora haja importantes avanços no desenvolvimento de métodos alternativos, os inseticidas químicos ainda continuam sendo uma importante ferramenta nos programas de controle (Rose, 2001). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), resistência é definida como o desenvolvimento de uma habilidade em uma linhagem de um organismo para tolerar doses de um produto tóxico que é letal para a maioria dos indivíduos em uma população normal da mesma espécie.

A resistência é um fenômeno estritamente genético, com mutações que afetam as proteínas alvos dos inseticidas e/ou o seu metabolismo (Li *et al.*, 2007). A pressão seletiva de compostos tóxicos, bem como, a frequência de sua utilização e as características herdadas das espécies envolvidas, contribuem para a propagação de resistência a inseticidas em populações de insetos (Hemingway & Ranson, 2000). Existem diferentes estratégias de resistência a inseticidas nos insetos, tais como: mecanismos comportamentais; fisiológicos: como por exemplo, a redução da penetração do inseticida pela cutícula; e mecanismos bioquímicos que incluem o aumento de destoxicação metabólica e insensibilidade do sítio de ação (Guedes, 2006). Nestes indivíduos há dois principais mecanismos de resistência a piretroide: o aumento da desintoxicação ou mudanças de sensibilidade no sítio de ação.

As três famílias de enzimas que estão, principalmente, envolvidas no metabolismo de resistência são as carboxilesterases, monoxigenases citocromo P450 e GST (glutathione-S-transferase) (Hemingway & Ranson, 2000). Elas estão na linha de defesa enzimática primária contra xenobióticos e são responsáveis pela remoção de muitos subprodutos do metabolismo (Feyereisen, 2005; Ranson & Hemingway, 2005).

Como exemplo de resistência podemos citar a moderada e alta resistência a deltametrina e malation que foram observadas na maioria das populações de *A. aegypti* da Venezuela. Além disso, foi constatado que houve um significativo aumento da expressão de glutathione-S-transferases e das oxidases nos insetos resistentes. Todas as populações apresentaram baixa resistência ao malation, com níveis significativamente mais elevados de alfa-esterases e beta-esterases (Alvarez *et al.*, 2013).

A existência de vetores resistentes a um determinado produto químico pode ocorrer a partir de alterações genéticas ou operacionais, prejudicando as estratégias de controle. Torna-se fundamental a realização de mais estudos que esclareçam os mecanismos de resistência aos inseticidas para que novos métodos possam ser adotados afim de se controlar a população da espécie alvo.

1.6 Enócitos

Enócitos são células de origem ectodérmica e geralmente são encontrados em associação com a epiderme ou células do corpo gorduroso, ou ambos, dependendo das espécies de insetos e estágios de desenvolvimento (Locke, 1969; Hartenstein *et al.*, 1992). Estas células são também encontrados em outros artrópodes, tais como aracnídeos e crustáceos, mas ainda não se sabe se são homólogos aos enócitos dos insetos (Romer & Gnatzy, 1981; Symonova & Smrz, 2009). O tamanho, número e suas localizações variam entre as espécies de insetos (Gould *et al.*, 2001; Martins & Ramalho-Ortigão, 2012). Em algumas espécies os enócitos estão associados à epiderme projetando-se para dentro da cavidade do corpo (Makki *et al.*, 2014).

Em larvas de *A. aegypti* os enócitos estão associados com a epiderme e localizados entre as células parietais do corpo gorduroso (Wigglesworth, 1942). Em contrapartida, nos adultos, os enócitos aparecem na periferia do corpo gorduroso, ou dentro de seus lóbulos, como células individuais ou agrupados de maneira similar ao que é encontrado em outros mosquitos hematófagos (Martins *et al.*, 2011b, c).

Gutierrez *et al.*, (2007) mostraram que essas células são responsáveis pelo acúmulo de gotículas lipídicas durante período de jejum. Os seus resultados forneceram evidências de que algumas funções de processamento de lipídios do fígado de mamíferos são realizadas em *Drosophila melanogaster* pelos enócitos. Em larvas de deste inseto os enócitos sintetizaram ácidos graxos de cadeia longa, necessários para impermeabilização traqueal, e que em adultos os enócitos produziram hidrocarbonetos cuticulares necessários para resistência à dessecação e comunicação por feromônios (Qiu *et al.*, 2012; Parvy *et al.*, 2012). Os enócitos também desempenharam um papel na diferenciação dos neurônios durante a embriogênese de *D. melanogaster*, por meio da secreção de semaforina (Sema2a), um peptídeo que conduz alongamento axonal (Bates & Whittington, 2007).

A morfologia dos enócitos condiz com a de uma célula secretora de lipídeos e participante da homeostase (Locke, 1969; Rinterknecht & Matz 1983; Romer 1974; Wigglesworth, 1933; Gould *et al.*, 2001; Martins & Ramalho-Ortigão, 2012). Além disso, também participam da regulação da composição da hemolinfa, a síntese de cutícula (Wigglesworth 1933; Wigglesworth 1970), a produção de ecdisteroides (Locke, 1969; Romer 1974; Romer & Bressel, 1994) e imunidade inata (Martins *et al.*, 2011a). A partir dessa variedade de funções pode-se observar que se trata de uma célula de intenso metabolismo e que também contribui para a homeostase do inseto.

A característica marcante da ultraestrutura dos enócitos é a presença de um retículo endoplasmático liso (REL) bem desenvolvido, este pode, às vezes, ocupar quase todo citoplasma da célula (Martins *et al.*, 2011d). Em adultos de *A. aegypti*, os enócitos apresentam um único núcleo grande localizado centralmente, com um nucléolo proeminente e a cromatina aparece em grumos granulares e irregulares, especialmente em torno da extremidade do núcleo (Tadkowski *et al.*, 1977; Martins *et al.*, 2011b, d).

As análises do perfil de RNAm mais abundantes encontrados nos enócitos isolados de pupas *A. aegypti* foram correspondentes à superfamília do citocromo P450, cujos membros têm funções primariamente relacionados com a desintoxicação e o metabolismo lipídico. Também foram identificados 18 outros transcritos com funções associadas ao metabolismo (Martins *et al.*, 2011a). Por se tratar de uma célula que possui enzimas que atuam no metabolismo de diferentes moléculas, incluindo aquelas envolvidas na resistência aos inseticidas e tolerância às toxinas de plantas, torna-se imprescindível mais estudos e análises sobre os efeitos de inseticidas nos enócitos.

1.7 Comportamento

O comportamento dos insetos, e todos os animais, é governado por interações entre neurônios, sistema nervoso e o meio ambiente. Há inseticidas que atuam especificamente em locais dentro do sistema nervoso do inseto (Braga & Valle, 2007). Portanto, não é surpreendente que em níveis que não levam à mortalidade, esses inseticidas possam afetar o comportamento dos insetos (Haynes, 1988).

Na abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata*, foram avaliados os efeitos da ingestão por imidaclopride em seu comportamento, sobrevivência, desenvolvimento, neuromorfologia e deslocamento dos adultos. Doses crescentes de imidaclopride foram adicionados à dieta fornecida para larvas de operárias. Nenhum efeito subletal sobre a massa corporal ou tempo de desenvolvimento foi observado, mas o tratamento com este pesticida causou elevada mortalidade e os efeitos subletais dificultaram o desenvolvimento do cérebro e comprometeu a mobilidade na fase adulta jovem desta espécie (Tomé *et al.*, 2012).

Um número crescente de estudos tem documentado que a exposição subletal a pesticidas pode mudar interações presa-predador (Dell’Omo, 2002; Clements & Newman, 2002; Teplitsky *et al.*, 2005; Van Gossum *et al.*, 2009). Larvas da libélula *Enallagma cyathigerum* foram submetidas a doses subletais de endosulfan e Roundup (Janssens & Stoks,

2011), e após a aplicação de endosulfan observou-se que houve redução na velocidade de natação, o que interferiu no comportamento de fuga. Em contraste, a exposição prévia a Roundup proporcionou que as larvas nadassem mais rápido, mas com menor frequência quando atacadas.

Respostas comportamentais podem ser objetivamente e quantitativamente avaliadas por meio de um sistema de teste excito-repelência (Roberts *et al.*, 1997). Dado o seu uso comum, é importante investigar como a deltametrina pode influenciar no comportamento de *A. aegypti*, pois este entendimento permitirá a avaliação do sucesso de programas de controle de vetores (Kongmee *et al.*, 2004)

A irritação por contato é uma resposta comportamental de *A. aegypti* quando expostos diretamente a deltametrina e que a fuga rápida de áreas expostas a pulverizadores de espaço ou superfícies tratadas com piretroides residuais, também pode ter um impacto significativo sobre a eficácia do controle do mosquito adulto e da doença (Kongmee *et al.*, 2004).

Larvas de quarto estágio (L4) e pupas de *A. aegypti* foram expostas a concentrações crescentes dos inseticidas: azadiractina, deltametrina, imidaclopride e espinosade, para a avaliação do comportamento de natação, sobrevivência e morte celular no sistema neuromuscular (Tomé *et al.*, 2014). Todos os inseticidas, exceto azadiractina, reduziram a velocidade de natação e movimentos de contorção. Uma tendência semelhante foi também observada para a pupa, com exceção de imidacloprid, o que aumentou a atividade de natação de pupa. Deltametrina e espinosad foram os principais compostos que exibiram efeitos letais, o que permitiu o controle de larvas de *A. aegypti* e pupas, e prejudicando a sua natação, comprometendo potencialmente o forrageamento e a predação (Tomé *et al.*, 2014).

Tradicionalmente, a determinação da toxicidade aguda de pesticidas para artrópodes baseia-se, em grande parte, no estabelecimento de uma dose letal. No entanto, a dose letal pode ser apenas uma medida parcial dos efeitos deletérios (Desneux *et al.*, 2007). Pois, além de mortalidade direta induzida pelos inseticidas, os efeitos subletais sobre o desempenho do aprendizado, comportamento e neurofisiologia devem ser considerados para uma análise completa do seu impacto.

2. JUSTIFICATIVA

Os indivíduos resistentes, são capazes de degradar xenobióticos em compostos inertes com maior eficácia do que os indivíduos suscetíveis, sendo que nesse processo a ação da enzima P450 é fundamental. Sendo assim, estudos direcionados ao entendimento das diferentes estratégias utilizadas como mecanismo de resistência são fundamentais para elucidar os aspectos fisiológicos dos insetos vetores de interesse epidemiológico.

Tendo em vista que o *A. aegypti* é o principal vetor dos vírus causadores da Febre Amarela, Dengue, Chikungunya e Zika e que dentre as medidas de controle a utilização de inseticidas é a principal, os estudos direcionados ao esclarecimento dos aspectos envolvidos nos mecanismos de resistência adotados pelos insetos são importantes. Sabendo-se que os enócitos são células ricas em retículo endoplasmático liso, organela fundamental nos processos de desintoxicação de moléculas exógenas, e que em seu transcriptoma foi revelado a presença transcritos correspondentes à superfamília do citocromo P450, essa célula torna-se então um potencial alvo de estudo para elucidar ação de inseticidas no inseto, bem como os aspectos de sua fisiologia. Além do mais, esse trabalho contribui com informações para compreensão do papel dos enócitos na homeostase do *A. aegypti*.

Os efeitos subletais dos compostos aplicados em larvas de mosquito pode ter importante efeito sobre as atividades cruciais dos insetos. Várias atividades tais como a respiração, forrageamento, busca de refúgio e evasão, podem ser afetadas quando os insetos são submetidos ao inseticida. Esses efeitos devem ser avaliados para melhor entendimento da biologia do mosquito e a partir desses dados contribuir para uma avaliação dos métodos de controle que estão sendo empregados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar as alterações comportamentais e morfológicas nos enócitos de *A. aegypti* submetidos às concentrações subletais de deltametrina.

3.1.1 Objetivos específicos

- a) Estabelecer a curva de sobrevivência após o tratamento de larvas susceptíveis e resistentes com concentrações subletais de deltametrina;
- b) Comparar o comportamento das larvas das populações susceptíveis e resistentes submetidas a concentrações subletais de deltametrina.
- c) Caracterizar a morfologia e ultraestrutura dos enócitos de pupas originadas de larvas tratadas das duas populações com deltametrina e comparar com o grupo controle;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Insetos

Foram utilizadas larvas de quarto instar (L4) e pupas de *A. aegypti* (cepa PPCampos - Campos dos Goytacazes) provenientes da colônia mantida no insetário do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil) e ovos de *A. aegypti* resistente a piretroide gentilmente doados por Ademir Martins, população F2 Oiapoque (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ). As larvas foram mantidas em um recipiente plástico de 500 ml, preenchidos com 300 ml de água da torneira sem cloro, alimentadas com comida de tartaruga Fed (Reptolife, Alcon Pet, Camburiú, SC, Brasil), sob temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa ($60 \pm 2\%$) e fotoperíodo (12:12 L:D).

4.2 Curva de sobrevivência

Cem larvas L4 de ambas populações foram mantidas em recipientes de vidro de 500mL, com 200mL de água e 5 mg de comida de tartaruga (Reptolife) e foram submetidas às diferentes concentrações de deltametrina (0,001; 0,003; 0,005 e 0,007 ppm). O grupo controle foi submetido aos mesmos tratamentos, exceto pela exposição ao inseticida. Utilizou-se a deltametrina (Decis 25CE, 25 g ia/L, concentrado para emulsão, Bayer CropScience, São Paulo, SP, Brasil). O inseticida foi diluído em água destilada para se obter as concentrações desejadas.

Após a exposição das larvas foram acompanhadas e avaliadas até a emergência de todos os adultos. Esse acompanhamento se estendeu por 12 dias. A partir dos dados coletados foi elaborado um gráfico de curva de sobrevivência utilizando o programa SigmaPlot com estimadores Kaplan Meyer e as curvas foram comparadas pelo teste Holm-Sidak ($P < 0,005$).

4.3 Comportamento da atividade locomotora

Larvas (L4) das populações susceptível e resistente foram submetidas a bioensaios comportamentais. Foram feitas 6 repetições independentes da seguinte maneira: 6 potes de vidro contendo 25 L4 tanto da população susceptível quanto da resistente para o grupo controle e 6 potes de vidro contendo 25 L4 para os grupos tratados com o inseticida nas concentrações de 0,003 e 0,005 ppm de deltametrina.

Após a exposição, durante os intervalos de 1h, 3h, 5h, 7h, 9h e 24 horas, as L4 foram transferidas para uma arena que compreende uma placa de Petri, contendo 20mL de água destilada, sobre uma superfície branca. Este procedimento foi realizado para larvas da população susceptível quanto para a resistente.

Nessa arena, o movimento das larvas foi registado durante 15 minutos através de um sistema de monitoramento de vídeo automatizado equipado com uma câmera CCD (ViewPoint Life Sciences Inc., Montreal, Canadá) conectada a um computador. O parâmetro gravado em cada arena foi o nível de atividade, medido em pixels. A Figura 5 ilustra a disposição da arena, câmera e interface do programa ViewPoint Application Manager – Video Track For Quantization, que foi utilizado para a captura dos movimentos. A cada repetição, os grupos controle e tratado foram colocados de forma aleatória e intercalada nas posições C1, C2, C3 e C4 para evitar que determinado grupo permanecesse em uma mesma posição e isso pudesse influenciar em seu comportamento devido, por exemplo, à intensidade luminosa e temperatura.

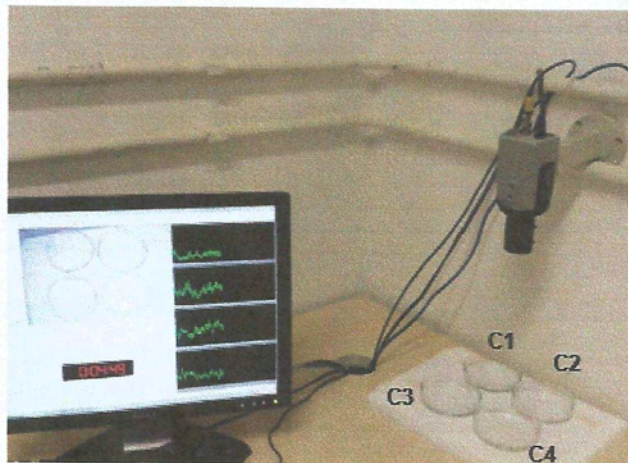


Figura 5: Visão geral do sistema em funcionamento em que há uma arena na qual placas de Petri são apoiadas em uma superfície branca e uma câmera digital que capta o movimento das larvas. C1, C2, C3 e C4 representam as posições ocupadas pelas placas. A interface do programa utilizado está sendo mostrada no monitor de LCD no momento em que os movimentos capturados são transformados em gráficos.

4.3.1 Análises estatísticas

Os dados de atividade das larvas de ambas as populações (susceptível e resistente) foram submetidos a análises de medida repetida, para testar os efeitos das concentrações de deltametrina. Diferenças foram avaliadas pelo teste de Fisher (PROC ANOVA; SAS Institute 2008).

4.4 Dissecção das pupas

Com o auxílio do microscópio estereoscópio (Zeiss), pupas (do grupo controle e experimental) com dois dias de idade foram dissecadas sobre lâminas de vidro e em tampão fosfato (PBS 0.1 M, pH 7,2). O tórax e a cabeça foram separados do abdome com estiletes e pinças. Utilizando os estiletes, o abdome foi comprimido na região da cauda em direção à região próxima do tórax, para expulsar os órgãos viscerais juntamente com o corpo gorduroso. Os grupos de enócitos foram coletados com o auxílio de micropipetas de 1-10 μ l e imediatamente transferidos para tubos de microcentrífuga (1,5ml) contendo 20 μ l PBS e logo após fixados em glutaraldeído, para um posterior processamento para MET (Zeiss EM 109), de acordo com o procedimento descrito por Martins *et al.*, 2011.

4.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os enócitos dos grupos experimental e controle foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, sacarose 2% e tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 por duas horas mantidos em tubos de microcentrífuga (1,5ml) a temperatura ambiente. No intervalo de cada uma das etapas subsequentes, as amostras foram centrifugadas utilizando um breve *spin* (5000 rpm por 5 segundos) para manter as células no fundo do tubo e evitar que ao longo do processamento fossem coletadas e descartadas por engano.

Após a fixação, as amostras passaram por três lavagens de cinco minutos em PBS 1x e então foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% por 2,5 horas ao abrigo da luz. Novamente, lavadas três vezes em PBS 1x e desidratadas em soluções de concentrações crescentes de etanol (60%-100%). As células, então foram incluídas em resina LRWhite (London Resin Company Ltd) em cápsulas de gelatina. Após a polimerização da resina, foram obtidas secções semifinas (700 nm) e ultrafinas (70-90 nm) no ultramicrotomo com o auxílio de navalha de diamante. As secções semifinas foram coradas com azul de toluidina 1% sobre placa aquecida, para verificar se o corte atingiu a região desejada. As secções ultrafinas foram

contrastadas com de acetado de uranila 3% e chumbo por por 15 minutos e oito minutos respectivamente

O material foi observado e fotografado com o auxílio do Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM109 do Núcleo de Microscopia e Microanálises (NMM-UFV) e também pela Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ RJ, com o auxílio do MET JEOL- JEM-1011.

4.6 Microscopia de fluorescência

4.6.1 Reação de TUNEL

Enócitos aderidos em lâminas de vidro foram fixados em solução de paraformaldeído 4% (pH 7,4) durante 25 minutos no gelo e lavados duas vezes em PBS 1x durante 5 minutos à temperatura ambiente. Para a detecção de danos no DNA nuclear, os enócitos foram submetidos à reação de TUNEL utilizando-se o kit de fluoresceína - *In Situ Cell Death* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha) diretamente nas células sobre a lâmina. Para o controle negativo, ou seja, células não tratadas pela reação, foram utilizados enócitos do grupo controle de cada população. As lâminas foram montadas em meio Mowiol *antifading* (Fluka, Steinheim, Alemanha), analisadas e fotografadas utilizando o Microscópio de Fluorescência Zeiss, Axiostar plus, com câmera CCD AxioCam MRm e filtros para Rhod/DAPI/FITC do Núcleo de Microscopia e Microanálises, instalações da Universidade Federal de Viçosa (UFV-NMM).

5. RESULTADOS

5.1 Curva de sobrevivência

As L4 de *A. aegypti* das populações susceptível e resistente foram submetidas às concentrações 0,001 ppm, 0,003 ppm, 0,005 ppm e 0,007 ppm de deltametrina para a avaliação da sobrevivência. De acordo com estimadores Kaplan-Meyer a sobrevivência diferiu significativamente entre as concentrações testadas ($P > 0,05$). O acompanhamento ocorreu desde a exposição ao inseticida até a emergência de todos os adultos sobreviventes em um período de 12 dias como indicado na Fig. 6. Para a população susceptível observou-se que a concentração de 0,007 ppm de deltametrina não apresentou efeito subletal, sendo que somente 42% das larvas estavam vivas no primeiro dia após a exposição (Fig. 6A, linha e). Já no segundo dia, houve uma diminuição brusca na sobrevivência, restando apenas cerca de 15% de sobreviventes e no quarto dia 100% das larvas expostas haviam morrido. Isso significa que 0,007 ppm é uma concentração letal e impede que as larvas cheguem ao estágio adulto.

Para as demais concentrações testadas, os indivíduos susceptíveis apresentaram diferentes níveis de sobrevivência: na concentração de 0,005 ppm, 15% sobreviveram até o final do acompanhamento (Fig. 6A, linha d). No primeiro dia após a exposição, a taxa de sobrevivência aumentou para 70% se comparado ao que foi observado para 0,007 ppm (42%). No segundo dia houve uma diminuição nessa taxa que passou para 40%. Nos dias seguintes a porcentagem de sobreviventes apresentou uma diminuição e a situação se estabilizou a partir do sexto dia em que se mantiveram 15% de indivíduos sobreviventes até o final do experimento (Fig. 6A, linha d).

Para a concentração de 0,003 ppm após o primeiro dia, 85% dos indivíduos susceptíveis permaneceram vivos, uma porcentagem maior do que foi registrado para de 0,005 ppm (70%) e 0,007 ppm (42%). No segundo dia, após a exposição houve uma queda no nível de sobreviventes que passou de 85% para 58%. Nos dias subsequentes a diminuição ocorreu de forma gradativa e a situação começou a se estabilizar a partir do quinto dia após a exposição, um dia antes do que foi observado para os indivíduos submetidos à concentração de 0,005 ppm (Fig. 6A, linha c).

Em comparação às concentrações testadas, a de 0,001 ppm apresentou maior porcentagem de sobrevivência para os indivíduos susceptíveis. Após o primeiro dia, 90% estavam vivos. No segundo dia houve uma diminuição, e 78% continuaram vivos. No

decorrer do tempo observou-se queda gradual até se estabilizar no quinto dia com 61% de sobreviventes.

Durante todo o experimento, o grupo controle se manteve estável (Fig. 6A, linha a). A população resistente submetida ao mesmo tratamento e condições, apresentou uma resposta bem diferente daquela observada na susceptível. Ambos tratado e controle, apresentaram uma taxa constante de sobrevivência de 100%. As L4 não foram afetadas pelas quatro concentrações testadas (Fig. 6B). A partir dos dados obtidos através da curva de sobrevivência, foram escolhidas as concentrações de 0,003 ppm e 0,005 ppm para a avaliação dos efeitos subletais da deltametrina no comportamento e enócitos pupais de *A. aegypti*, pois representam valores de mortalidade média e alta, respectivamente.

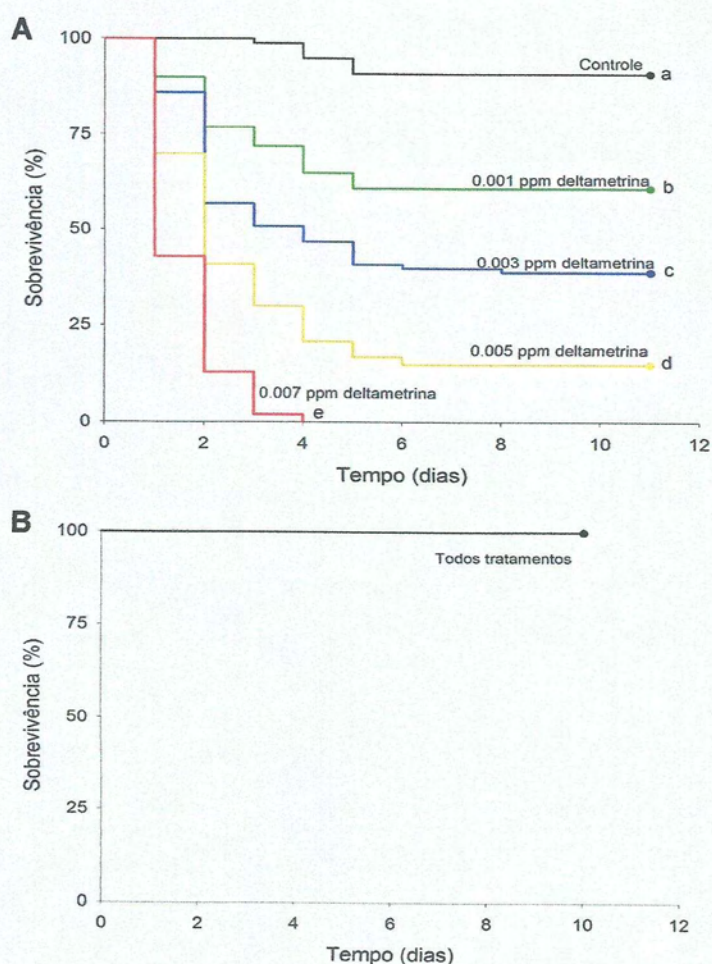


Figura 6: Curvas de sobrevivência para L4 de *A. aegypti* susceptível (A) e resistente (B), submetidas à concentrações subletais crescentes de deltametrina. As agrupadas pela mesma linha não são significativamente diferentes pelo teste Holm-Sidak ($P > 0,05$).

5.2 Comportamento da atividade locomotora

As L4 susceptíveis e resistentes tiveram seu comportamento avaliado e filmado durante os intervalos de 1h, 3h, 5h, 7h, 9h e 24 horas após a exposição à deltametrina. As análises de medida repetida realizadas para atividade locomotora das larvas indicaram diferenças entre os tratamentos (controle vs concentrações de deltametrina: $F_{2,15} = 125,54$, $P < 0,0001$), tempos após exposição (Wilk's $\gamma > 0,11$; $F > 16,69$; $df_{num}/den = 5/11$; $P < 0,0001$), e interação entre as fontes de variação (Wilk's $\gamma > 0,05$; $F > 7,36$; $df_{num}/den = 10/22$; $P < 0,0001$) na população susceptível. As análises de medida repetida também indicaram diferenças entre os tratamentos (controle vs concentrações de deltametrina: $F_{2,15} > 17,28$, $P < 0,0001$), tempos após exposição (Wilk's $\gamma > 0,33$; $F > 4,32$; $df_{num}/den = 5/11$; $P = 0,02$), e interação entre as fontes de variação (Wilk's $\gamma > 0,08$; $F > 5,33$; $df_{num}/den = 10/22$; $P = 0,0005$) na população resistente.

De modo geral, em ambas populações as regressões lineares foram não significativas ($p > 0,005$), ou seja, não houve variação na atividade locomotora de ambas populações ao longo do tempo. Nas L4 susceptíveis (Fig. 7A), embora não haja variação ao longo do tempo, a taxa de atividade (medida em pixels) foi bem menor no grupo tratado em comparação ao grupo controle, o que caracteriza um efeito letárgico provocado pelo inseticida (Fig. 7A).

Por outro lado, nas L4 resistentes houve hiperexcitação 24h após tratamento com deltametrina a 0,005 ppm em relação ao controle. Já as larvas tratadas com 0,003 ppm apresentaram uma diminuição da atividade locomotora (Fig. 7B). Na figura 7 C estão agrupados os resultados das duas populações. Apesar de aparentemente os controles da população resistente apresentarem maior atividade que o da susceptível, ao repetir o experimento com os mesmos parâmetros comparando apenas os controles, foi constatado que não há diferença entre eles.

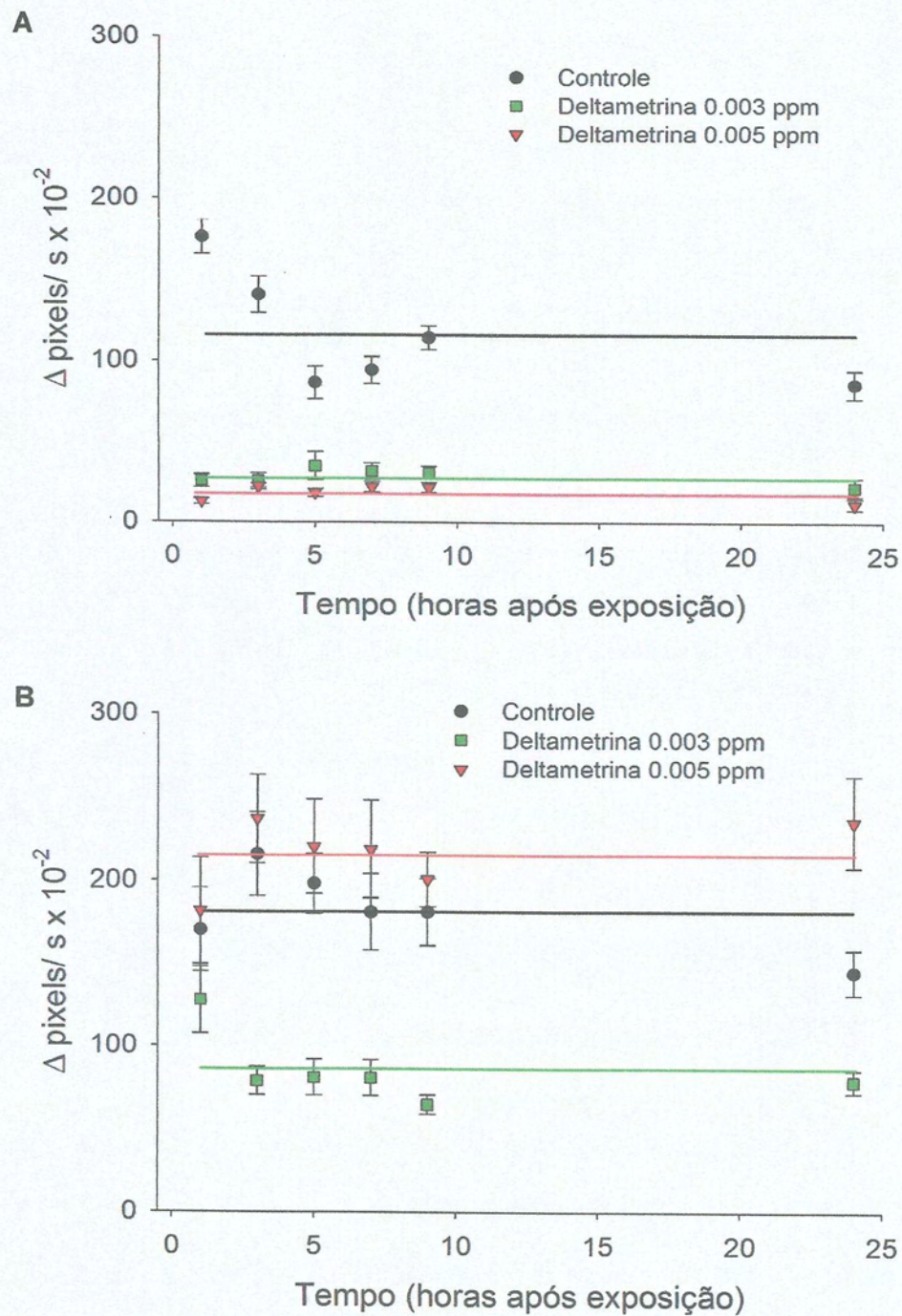


Figura 7: Regressões lineares mostrando variação de pixels ao longo do tempo em L4 de *A. aegypti* susceptível (A) e resistente (B) após 1h, 3h, 5h,7h,9h e 24 h de exposição a deltametrina 0,003 e 0,005 ppm.

5.3 Reação de TUNEL

Após a exposição das L4 ao inseticida, as pupas foram dissecadas, os grupos de enócitos coletados e submetidos à reação de TUNEL. Há poucos enócitos positivos para a reação tanto na população susceptível (Fig. 8A-F) quanto para a resistente (Fig. 8G-L). De modo geral, pode-se observar os grupos de células com citoplasma autofluorescente. O dano celular é evidenciado pela intensa marcação do núcleo (verde), e não houve diferença para a quantidade de células tratadas (600 células) com as concentrações de 0,003 ppm e 0,005 ppm. Nota-se que nas células afetadas (Fig. 8C; D; F; I e J) além da marcação nuclear, o citoplasma apresenta uma tonalidade e aspecto morfológico diferente daquele observado para as demais células não afetadas dentro do mesmo cluster em comparação com as células do controle (Fig. 8 A; B; G e H).

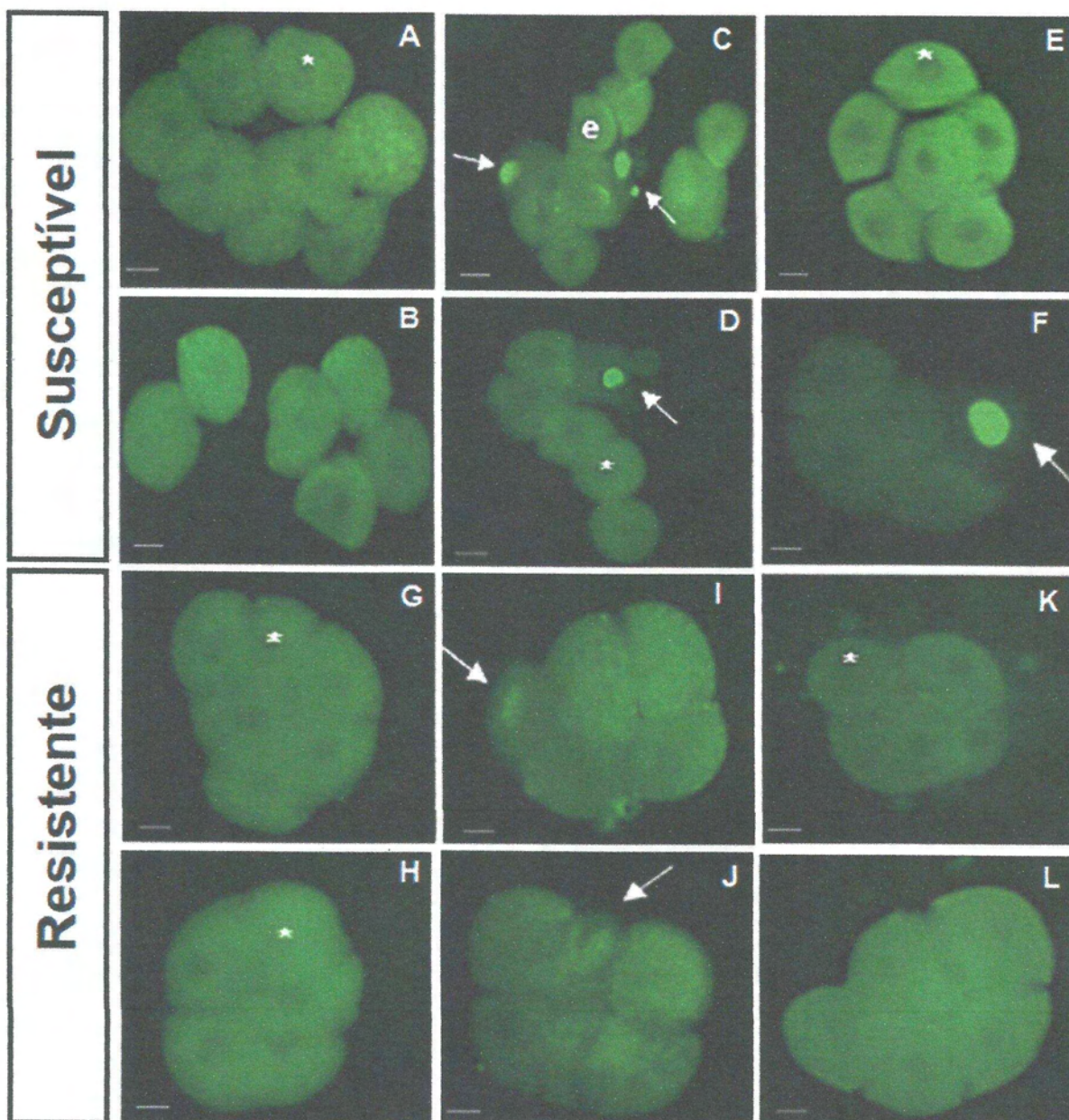


Figura 8: Grupos de enócitos pupais das populações de *A. aegypti* susceptível (A-F) e resistente (G-L) à deltametrina submetidos à reação de TUNEL: A, B, G e H: Enócitos do grupo controle, região nuclear sem marcação identificada pelo asterisco (*). C, D, I e J: Enócitos tratados com deltametrina na concentração de 0,003 ppm. E, F, K e L: Enócitos tratados com deltametrina na concentração de 0,005 ppm. Seta indicam as células com núcleo positivo para a reação de TUNEL. Barras: 200 μ m.

5.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Após a exposição do inseticida nas L4, as pupas foram dissecadas, os enócitos coletados e preparados de acordo com o protocolo para a MET. Tanto os enócitos tratados da população susceptível como os da resistente se apresentam íntegros e sem drásticas alterações em sua ultraestrutura em relação ao controle (Fig. 9 e 10). Observa-se a presença de invaginações da membrana (Figs. 9A, 8B), citoplasma eletrondenso repleto de gotículas lipídicas e mitocôndrias (Fig. 9A-F e 10A-F). Os enócitos apresentam um núcleo central com um nucléolo bem desenvolvido e grande parte da cromatina descondensada, característica de uma célula metabolicamente ativa. (Fig. 9B, C, F e 10A, C, F).

Apenas em algumas células tratadas, de ambas populações, com deltametrina na concentração de 0,005 ppm, danos nas mitocôndrias (Fig 9H; 10H) e no núcleo (Fig 9G) foram observados. Nesse caso específico, a ultraestrutura é característica de morte celular, pois pode-se observar a completa desorganização nuclear com a cromatina e membrana nuclear danificados, além de alterações na morfologia das cristas mitocondriais. Nota-se também que o citoplasma está mais claro em relação ao das células normais (Fig 9 G-H; 10 H).

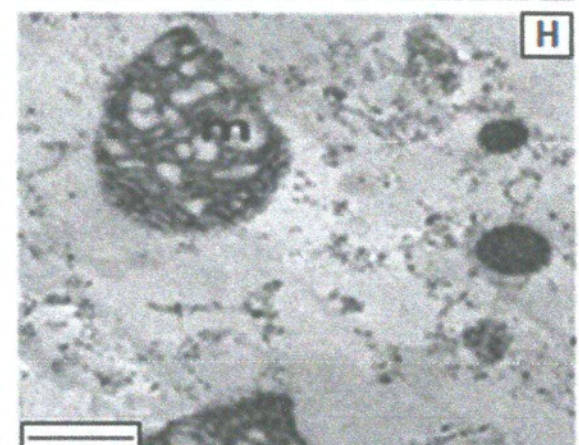
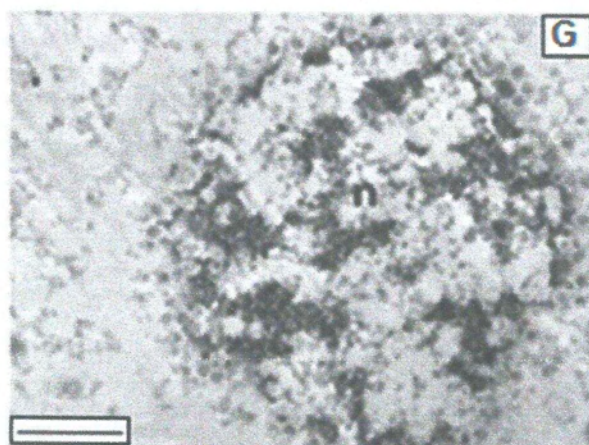
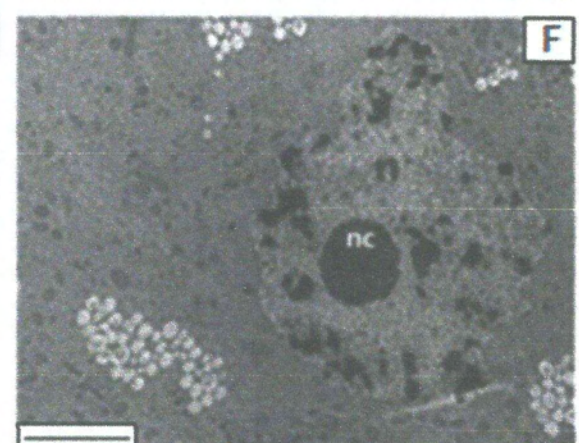
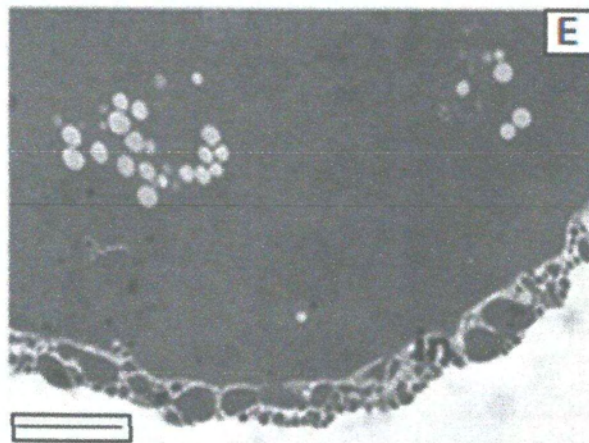
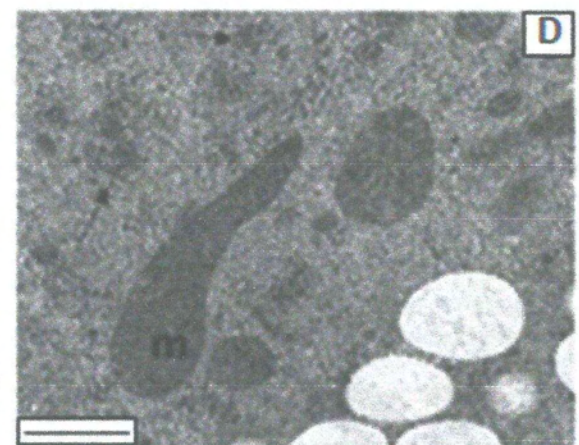
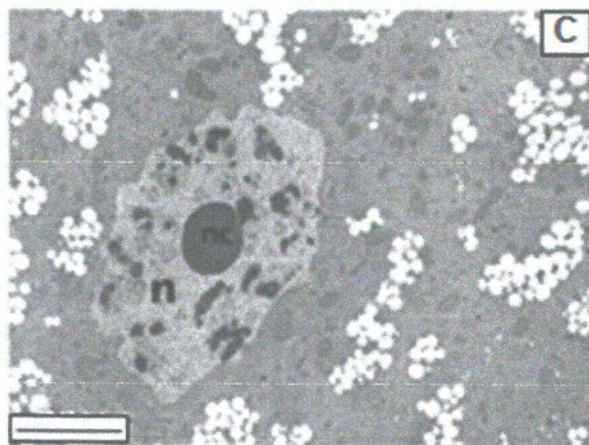
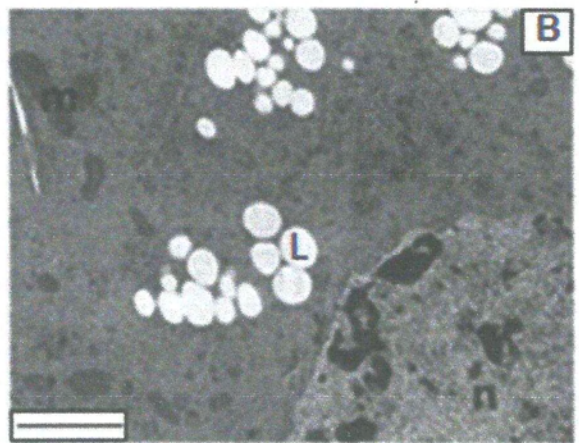
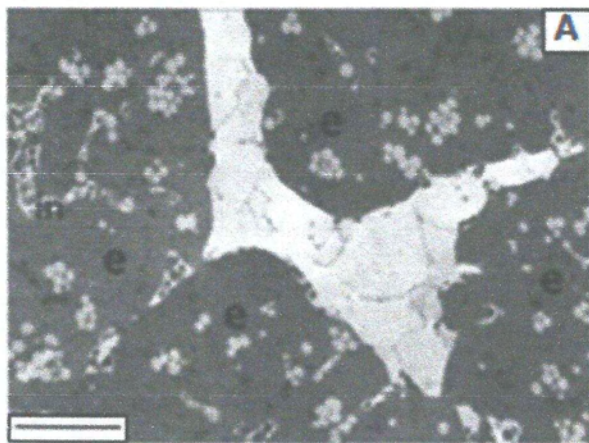


Figura 9: Micrografias eletrônicas de transmissão de enócitos pupais da população de *A. aegypti* susceptível. **A e B:** Enócitos (e) do grupo controle. **C, D e E:** Enócitos tratados com deltametrina 0,003 ppm. **F, G e H:** Enócitos tratados com deltametrina a 0,005 ppm. **A:** Quatro enócitos agrupados, detalhe nas invaginações (in) da membrana. **B, C, F:** Visão geral dos enócitos. Note a integridade celular, núcleo (n) grande, com cromatina descondensada, nucléolo (nc) evidente, citoplasma repleto de vesículas translúcidas que correspondem a gotículas lipídicas (L) e mitocôndrias (m). **D:** Detalhe das mitocôndrias íntegras nas células tratadas com deltametrina 0,003 ppm. Setas indicando retículo endoplasmático rugoso. **E:** Córtex celular e a presença das invaginações (in) da membrana. **G–H:** Desorganização nuclear (n) e mitocondrial (m) nas células tratadas com deltametrina a 0,005 ppm. Note as alterações nos padrões da membrana e cromatina nuclear e das cristas mitocondriais. Barra 1 μm .

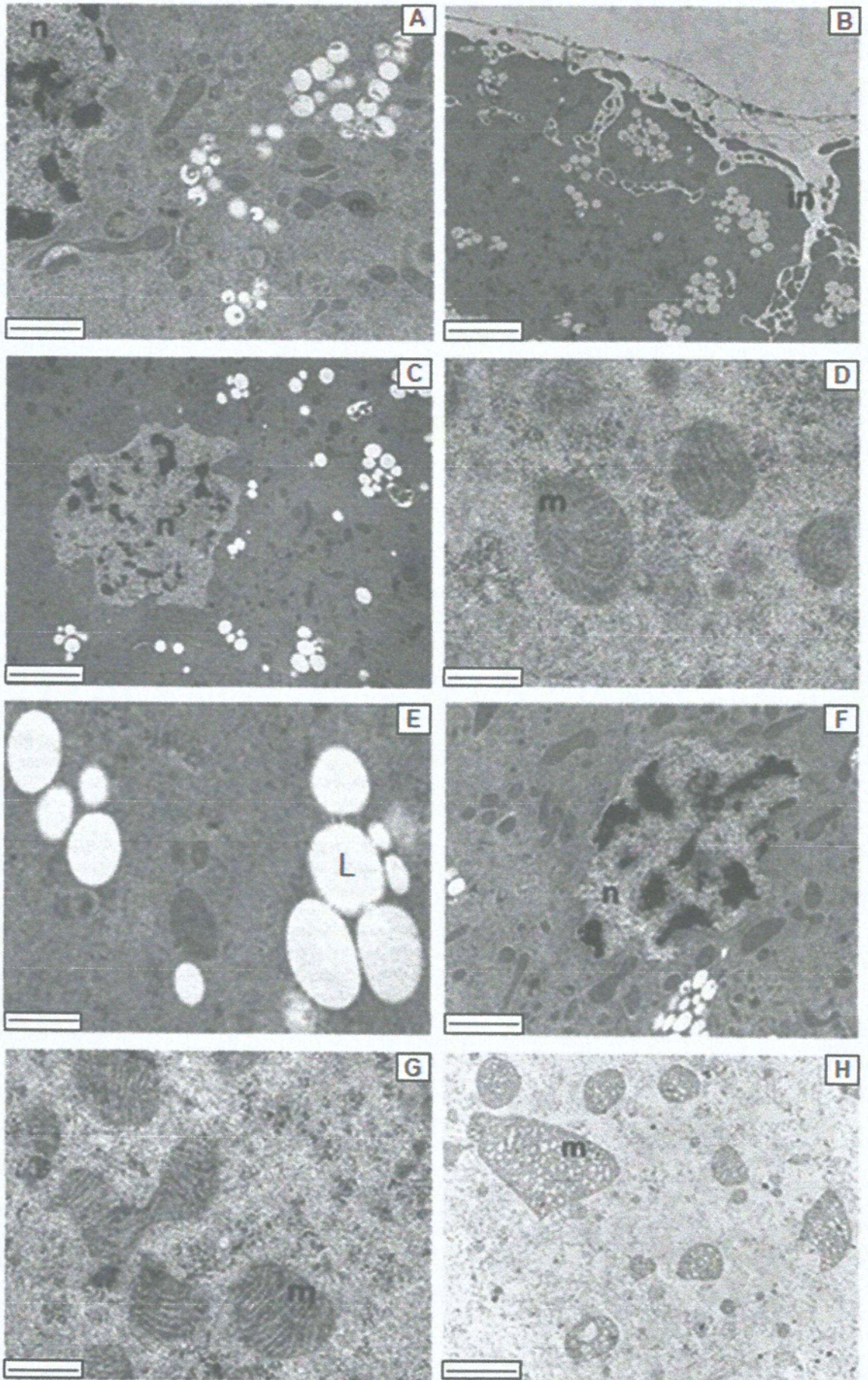


Figura 10: Micrografias eletrônicas de transmissão de enócitos pupais da população de *A. aegypti* resistente. **A e B:** Enócitos (e) do grupo controle. **C, D e E:** Enócitos tratados com deltametrina 0,003 ppm. **F, G e H:** Enócitos tratados com deltametrina a 0,005 ppm. **A, C, F:** Visão geral dos enócitos. Note a integridade celular, núcleo (n) com cromatina descondensada, citoplasma repleto de vesículas translúcidas que correspondem a gotículas lipídicas (L) e mitocôndrias (m). **B:** Detalhe nas invaginações (in) da membrana. **D** Mitocôndrias íntegras nas células tratadas com deltametrina 0,003 ppm. **E:** Detalhe das gotículas lipídicas (L). **G:** Mitocôndrias íntegras nas células tratadas com deltametrina 0,005 ppm. **H:** Desorganização mitocondrial (m) nas células tratados com deltametrina a 0,005 ppm. Note as alterações nos padrões das cristas mitocondriais. Barra 1 μm .

6. DISCUSSÃO

O *A. aegypti* tem sido objeto de inúmeros estudos devido a sua grande importância epidemiológica. Nesse sentido, vários trabalhos têm considerado a relação da utilização de inseticidas e mecanismos de resistência no mosquito (Rodríguez *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2011; Stevenson *et al.*, 2012;). Tendo em vista que, a deltametrina é um dos principais compostos usados na água contra as larvas e pupas do mosquito (Martins *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011), o presente trabalho constitui um estudo comparativo dos efeitos subletais desse inseticida no comportamento (níveis de atividade locomotora) e na ultraestrutura dos enócitos das populações susceptível e resistente de *A. aegypti*.

Para as concentrações testadas (0,001; 0,003; 0,005 e 0,007 ppm) a população susceptível apresentou diferentes níveis de mortalidade, proporcionais ao aumento na concentração do inseticida e identificamos que a dosagem de 0,007 ppm como sendo letal. Nossos dados concordam com os encontrados por Tomé *et al.* (2014) que aponta a deltametrina e spinosad como os inseticidas mais tóxicos e portanto, eficazes no controle do mosquito. Em geral, apesar do piretroides serem pouco absorvidos pelo tegumento, eles são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal após a administração oral ou pelo trato respiratório através da inalação do pó (Soderlund, 2002). Após a absorção, esse inseticida age causando paralisia imediata e mortalidade, efeito de choque denominado “*knock down*” (Santos, 2007).

Em contrapartida, a população resistente não foi afetada e todas as larvas tratadas chegaram ao estágio adulto. Vale ressaltar que, a longo prazo, mesmo sobrevivendo ao tratamento, a população resistente pode apresentar algumas perdas, sendo que ao longo das gerações resistentes, há acúmulo de alelos com efeitos negativos sobre diferentes características de vida tais como: desenvolvimento, longevidade e reprodução, que corroboram a hipótese de que a resistência a inseticida está associada com um custo elevado do *fitness* (Martins *et al.*, 2012 b). Embora no presente trabalho não tenhamos identificado o mecanismo metabólico envolvido na resistência, esse aspecto já foi amplamente descrito para populações de *A. aegypti* e pode estar associado a mutações no sítio alvo ou intensificação da desintoxicação do xenobiótico (Kumar *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2005; Montella *et al.*, 2007; Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009). A partir dos dados obtidos através da curva de sobrevivência, foram escolhidas as concentrações de 0,003 e 0,005 ppm

para a avaliação dos efeitos subletais da deltametrina, pois representam valores de mortalidade média e alta, respectivamente.

Em nosso estudo avaliamos os efeitos subletais do inseticida no comportamento das larvas de *A. aegypti* das populações susceptível e resistente. Para a população susceptível foi observado que em ambos os tratamentos, as larvas apresentaram baixa atividade em relação ao controle. Esse efeito letárgico está associado ao mecanismo de ação neurotóxico dos piretroides sobre o sistema nervoso (Nahrashi, 1996; Ray & Fry, 2006). Uma vez, que as larvas se encontram em baixa atividade (letárgicas) apresentam dificuldades na natação, o que conseqüentemente pode levar ao comprometimento do forrageamento. Além disso, por não conseguir nadar e se deslocar normalmente, estaria à mercê do ataque de predadores e teria dificuldades na busca de refúgio, diminuindo assim as chances de sobrevivência (Brackenbury *et al.*, 2001; Janssens *et al.*, 2012). Um exemplo disso, foi constatado em larvas de *Culex pipiens molestus*, na qual o tratamento com piretroide comprometeu a resposta de alarme ao predador, o que aparentemente aumentou a mortalidade larval devido a predação (Reynaldi *et al.*, 2011).

Por outro lado, os resultados comportamentais referentes à população resistente diferem daqueles observados para a população susceptível. As L4 tratadas com a concentração de 0,003 ppm apresentaram uma diminuição da atividade locomotora, se comparada ao controle, porém não caracteriza um efeito letárgico como aquele observado nas L4 susceptíveis. Já as L4 resistentes submetidas à concentração de 0,005 após 24h, exibiram um quadro de hiperexcitabilidade ao ser comparada ao grupo controle. Os piretroides além de atuarem sobre os canais de sódio nas células nervosas, também interagem com os receptores do ácido gama amino butírico – GABA, o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (Bradberry *et al.*, 2005; Velisek *et al.* 2006; Santos *et al.*, 2007). Normalmente o GABA liberado pelas terminações nervosas pré-sinápticas ativa um canal de cloro na membrana pós-sináptica, levando então à hiperpolarização da terminação pós-sináptica (Macdonald & Oslen 1994). Uma possível explicação para o ocorrido em nossas larvas tratadas, é que a deltametrina pode ter atuado inibindo essa ação do GABA nas terminações nervosas, o que possivelmente levou ao quadro de hiperexcitabilidade no sistema nervoso central.

Analisando os resultados das populações susceptível e resistente, podemos constatar que para a primeira os impactos negativos foram evidentes, uma vez que houve comprometimento dos movimentos de natação, enquanto que a população resistente embora

tenha apresentado um quadro de diminuição da atividade e um outro quadro de hiperexcitabilidade não apresentou aparentemente implicações negativas, pois todas as larvas se deslocavam normalmente e não foi observado dificuldades na natação e forrageamento. Nossos dados de comportamento corroboram com aqueles encontrados por Tomé e colaboradores (2014) em que foi demonstrado os efeitos negativos provocados por concentrações subletais de deltametrina, imidacloprid e espinosade no deslocamento e natação de L4 de *Ae aegypti*.

Piretroides agem sobre as células nervosas (Narahshi,1985; Soderlund Bloonquist, 1989; Bradyberry *et al.*, 2005). O principal ponto de ação são os canais de sódio. O inseticida provoca alterações nas funções desses canais interferindo na abertura e fechamento deles, prolongando a entrada dos íons Na^+ para o interior da célula nervosa (Nahrashi,1996; Ray & Fry 2006). Esse mecanismo de ação já é bem estudado e descrito na literatura, sendo assim, nosso trabalho direcionou o estudo para análise de possíveis efeitos secundários da deltametrina em outras células. Os enócitos são células ricas em retículo endoplasmático liso, organela fundamental nos processos de desintoxicação de moléculas exógenas e em seu transcriptoma foi revelado a presença marcante de transcritos correspondentes à superfamília do citocromo P450 (mais de 8%) (Martins *et al.*, 2011). Sendo assim, essas características contribuíram para a escolha dessa célula como objeto de estudo.

Sobre os efeitos subletais, foi avaliado se o tratamento causaria morte celular nos enócitos das populações susceptível e resistente. A reação de TUNEL utilizada para a identificação de morte celular, se baseia na incorporação de nucleotídeos (d-UTP = 2' desoxiuridina 5' trifosfato) marcados com um corante fluorescente (isotiocianato de fluoresceína-FITC) na região 3' OH das quebras do DNA. Essa reação é catalisada pela enzima denominada *terminal deoxynucleotidyl transferase*, que polimeriza os nucleotídeos modificados nas regiões de fragmentação de DNA (revisado em Martins *et al.*, 2007). Nossos resultados não identificaram grande quantidade de marcação de enócitos TUNEL positivos tanto para a população susceptível quanto para a resistente.

A MET confirmou os resultados obtidos pela reação de TUNEL, uma vez que tanto os enócitos tratados da população susceptível, quanto os da resistente, não tiveram sua ultraestrutura drasticamente afetada pelo tratamento com o inseticida. Os enócitos se apresentaram íntegros, com núcleo característico de uma célula metabolicamente ativa e o citoplasma repleto vesículas translúcidas, que correspondem ao acúmulo de gotículas lipídicas durante período de jejum (Gutierrez *et al.*, 2007). Assim como apresentado por Jackson &

Locke (1989), nosso trabalho também evidencia a presença de invaginações da membrana, destinadas a aumentar a área da superfície celular. Atrelado a essa característica da membrana, a localização na periferia da gordura corporal no adulto *A. aegypti* e grande rede de retículo endoplasmático liso (Martins *et al.* 2011a, b) sugerem que esse conjunto de fatores revelam um mecanismo evolutivo para otimizar a desintoxicação (Gutierrez *et al.* 2007).

O metabolismo de xenobióticos, basicamente, ocorre em um processo que se passa em até três etapas: na primeira fase, ocorre as chamadas reações de fase I, na qual enzimas como as oxidases (por exemplo as enzimas pertencentes à grande família das citocromo P450) e esterases transformam o composto primário (xenobiótico) por oxidação, redução ou hidrólise em um produto mais hidrossolúvel e menos tóxico que o primário. Posteriormente, na segunda etapa conhecida por reações de fase II, enzimas como as glutathione-s-transferases (GSTs), conjugam o composto resultante da fase I a um aminoácido, açúcar, ou a uma glutathione, com a finalidade de torná-lo mais solúvel em água e reduzir a toxicidade do produto. A última etapa, consiste na conversão dos metabólitos da segunda etapa em conjugados secundários para o transporte extracelular (Parkinson, 2001). As concentrações testadas (0,003 e 0,005 ppm) a deltametrina não provoca danos e morte celular nos enócitos, que de modo geral se mantêm aparentemente íntegros e em funcionamento. Ao continuar em atividade e metabolizando o inseticida, as células contribuem para a sobrevivência das larvas e pupas garantindo assim a homeostase do inseto.

Em enócitos de *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster* também foi revelado alta expressão da cytochrome P450 redutase, confirmando o papel fundamental dessa enzima nos enócitos no metabolismo de inseticidas (Lycett *et al.*, 2006). No entanto, em *A. aegypti* há duzentos e trinta e cinco membros das famílias da citocromo P450, glutathione transferase e carboxiesterase e colinesterase (Strode, 2008). Essa contagem de genes representa um aumento de 58% e 36% em comparação com a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, e *A. gambiae*, respectivamente (Strode, 2008). Estes dados representam uma ampliação da expressão do gene P450 em comparação com as espécies *A. gambiae* e *D. melanogaster* (Nene *et al.*, 2007). Esta superioridade na quantidade de genes e proteínas envolvidos nos mecanismos de desintoxicação em *A. aegypti*, tornam esta espécie adaptável aos de programas de controle baseados na utilização de inseticidas.

Com relação a ação dos inseticidas sobre os insetos, em geral, vários estudos têm sido direcionados para a análise de seus efeitos letais (Pridgeon, 2008; Paul, 2006). Todavia, em nosso trabalho ao avaliarmos os efeitos subletais de tais compostos, constatamos que alvos diferentes (enócitos e sistema nervoso) não respondem da mesma maneira. Diferentemente do que era esperado, os enócitos da população susceptível não foram afetados a ponto de provocar grande quantidade de morte celular, o que demonstra que a integridade dessas células não está relacionada a resistência ao inseticida. Embora a nível ultraestrutural não tenhamos observado alterações e danos nos enócitos, ao nível comportamental observamos para a população susceptível um sério comprometimento das atividades motoras e uma hiperexcitação nas L4 tratadas da população resistente com 0,005 ppm de deltametrina. Sendo assim, nosso trabalho contribui para uma melhor avaliação das respostas referentes à exposição ao inseticida e nos leva a perceber a importância do entendimento dos diferentes efeitos subletais e sua relação com os efeitos neurológicos e fisiológicos que irão refletir diretamente no comportamento, ecologia e biologia do mosquito.

7. CONCLUSÕES

- A concentração 0,007 ppm de deltametrina apresentou efeitos letais sobre as L4 da população susceptível de *A. aegypti*.
- As L4 da população resistente à deltametrina sobreviveram a todas as concentrações a que foram expostas.
- L4 susceptíveis apresentaram comportamento letárgico e menor taxa de atividade se comparada ao controle. Provavelmente, como consequência dos tratamentos com o inseticida e seus efeitos neurotóxicos.
- L4 resistentes submetidas à deltametrina 0,003 ppm apresentaram diminuição dos níveis de atividade locomotora e aquelas submetidas à 0,005 ppm demonstraram um quadro de hiperexcitação. Mesmo assim, não houve comprometimento do comportamento de natação e forrageamento de ambas as L4 tratadas.
- Os danos causados aos enócitos no que diz respeito ao DNA nuclear e à ultraestrutura foram limitados tanto em indivíduos susceptíveis, quanto nos resistentes. O que demonstra que não há efeitos secundários da deltametrina sobre essas células nas condições aqui testadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez L C, Ponce G., Oviedo M, Lopez B, & Flores A E. (2013). Resistance to malathion and deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from western Venezuela. *Journal of Medical Entomology*, 50(5), 1031-1039.
- Åström, C., Rocklöv, J., Hales, S., Béguin, A., Louis, V., & Sauerborn, R. (2012). Potential distribution of dengue fever under scenarios of climate change and economic development. *EcoHealth*, 9(4), 448-454.
- Bates K E, & Whittington P M (2007). Semaphorin 2a secreted by oenocytes signals through plexin B and plexin A to guide sensory axons in the *Drosophila* embryo. *Developmental Biology*, 302(2), 522-535.
- Beserra, E. B., Fernandes, C., Castro Jr, F. P., Santos, J. W., & Santos, T. S. (2006). Biologia e exigências térmicas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. *Neotropical Entomology*, 35, 853-860.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., & Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504-507.
- Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., & Hay, S. I. (2012). Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), e1760.
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological Reviews*, 24(2), 93-106.
- Brackenbury, J. (2001). Locomotion through use of the mouth brushes in the larva of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268(1462), 101-106.
- Braga I A., & Valle D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(4), 279-293.
- CDC (2015). Disponível em:
<<http://www.cdc.gov/cdcgrandrounds/archives/2015/may2015.htm>>

- Chiaravalloti Neto, F. (1997). Descrição da colonização de *Aedes aegypti* na região de São José do Rio Preto, São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(4), 279-285.
- Chieffi, P. P. (1985). Algumas questões decorrentes da reintrodução do *Aedes aegypti* no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 1(3), 385-387.
- Clements, W. H., & Newman, M. C. (2002). *Community Ecotoxicology*. John Wiley & Sons.
- Consoli, R. A., & de Oliveira, R. L. (1994). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. SciELO-Editora FIOCRUZ.
- Costa M A R. (2001). A ocorrência do *Aedes aegypti* na região noroeste do Paraná: um estudo sobre a epidemia da dengue em Paranavaí-1999, na perspectiva da geografia médica [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita/Presidente Prudente.
- DELL'OMO, Giacomo, (2002). Ed. *Behavioural Ecotoxicology*. John Wiley & Sons.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52, 81-106.
- Edelman, R. (2007). Dengue vaccines approach the finish line. *Clinical Infectious Diseases*, 45(Supplement 1), S56-S60.
- Feyereisen R. Insect cytochrome P450. (2005). *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, 177.
- FIOCRUZ - Albuquerque C., Ferreira V. (2014). Disponível em: <<http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/fiocruz-inicia-estudo-com-mosquitos-para-reduzir-transmissao-da-dengue>>
- Floyd, E. Y., Geist, J. P., & Werner, I. (2008). Acute, sublethal exposure to a pyrethroid insecticide alters behavior, growth, and predation risk in larvae of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(8), 1780-1787.
- Gayathri V & Murthy P B. (2006). Reduced susceptibility to deltamethrin and kdr mutation in *Anopheles stephensi* Liston, a malaria vector in India. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(4), 678-688.
- Gould A P, Elstob P R & Brodu V. (2001). Insect oenocytes: a model system for studying cell-fate specification by Hox genes. *Journal of Anatomy*, 199(1-2), 25-33.

- Guedes R N C. Resistência de pragas a pesticidas: princípios e práticas – Mecanismos de Resistência a Inseticidas. (2006). Disponível em <http://www.illac-br.org.br/>
- Gutierrez E, Wiggins D, Fielding B & Gould A P. (2007). Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature*, 445(7125), 275-280.
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J. & Peeling, R. W. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 8, S7-S16.
- Hartenstein A Y, Rugendorff Astrid, Tepass, Ulrich, Hartenstein Volker (1992). The function of the neurogenic genes during epithelial development in the *Drosophila* embryo. *Development*, 116(4), 1203-1220
- Haynes, K. F. (1988). Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annual Review of Entomology*, 33(1), 149-168.
- Hemingway J & Ranson H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45(1), 371-391
- International Travel and Health DENGUE [webpage on the Internet]. Geneva: World Health Organization- WHO. (2013) Disponível em: <http://www.who.int/ith/diseases/dengue/en/index.html>
- Jackson A & Locke M (1989). The formation of plasma membrane reticular systems in the oenocytes of an insect. *Tissue Cell* 21: 463-473.
- Janssens, L., & Stoks, R. (2012). How does a pesticide pulse increase vulnerability to predation? Combined effects on behavioral antipredator traits and escape swimming. *Aquatic Toxicology*, 110, 91-98.
- Julander, J. G., Perry, S. T., & Shresta, S. (2011). Important advances in the field of anti-dengue virus research. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 21(3), 105-116.
- Kongmee M, Prabaripai A, Akranakul P, Bangs M J & Chareonviriyaphap T. (2004). Behavioral responses of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to deltamethrin and possible implications for disease control. *Journal of Medical Entomology*, 41(6), 1055-1063.
- Kumar, S., Thomas, A., Pillai, M. K. K. (2011). Deltamethrin: Promising mosquito control agent against adult stage of *Aedes aegypti* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(6), 430-435.

- Kumar, S., Thomas, A., Sahgal, A., Verma, A., Samuel, T., & Pillai, M. K. K. (2002). Effect of the synergist, piperonyl butoxide, on the development of deltamethrin resistance in yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 50(1), 1-8.
- Li X, Schuler M A & Berenbaum M R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52, 231-253.
- Lima, E. P., Paiva, M. H. S., de Araújo, A. P., Da Silva, E. V., da Silva, U. M., de Oliveira, L. N., & de Melo Santos, M. A. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites and Vectors*, 4(5), 2-12.
- Locke M. (1969). The ultrastructure of the oenocytes in the molting cycle of an insect. *Tissue and Cell*, 1(1), 103-154.
- Luna, J. E. D., Martins, M. F., Anjos, A. F. D., Kuwabara, E. F., & Navarro-Silva, M. A. (2004). Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil. *Revista Saúde Pública*, 38, 842-843.
- Macdonald, R. L., & Olsen, R. W. (1994). GABAA receptor channels. *Annual Review of Neuroscience*, 17(1), 569-602.
- Makki R, Cinnamon E & Gould A P (2014). The development and functions of oenocytes. *Annual Review of Entomology*, 59, 405-425.
- Martins, A. J., de Andrade Lins, R. M. M., Linss, J. G. B., Peixoto, A. A., & Valle, D. (2009). Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(1), 108-115.
- Martins, C. F., Dode, M. N., Bão, S. N., & Rumpf, R. (2007). Método de TUNEL: uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozoides bovinos. Embrapa Cerrados.
- Martins G F & Ramalho-Ortigão J M. (2012a). Oenocytes in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 9, 139-152.
- Martins GF, Ramalho-Ortigão JM, Lobo N, Severson DW, McDowel MA, Pimenta PFP (2011a). Insights into the transcriptome of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. *Memória Instituto Oswaldo Cruz* 106: 308-315.

- Martins, A. J., Ribeiro, C., Bellinato, D. F., Peixoto, A. A., Valle, D., & Lima, J. B. (2012b). Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS One*, 7(3), e31889.
- Martins G F, Serrão J E, Ramalho-Ortigão J M & Pimenta P F P. (2011b). Histochemical and ultrastructural studies of the mosquito *Aedes aegypti* fat body: effects of aging and diet type. *Microscopy research and technique*, 74(11), 1032-1039.
- Martins G F, Serrão J E, Ramalho-Ortigão J M & Pimenta P F P (2011c). A comparative study of fat body morphology in five mosquito species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(6), 742-747.
- Martins G F, Guedes B A M, Silva L M, Serrão J E, Fortes-Dias C L, Ramalho-Ortigão J M & Pimenta P F P. (2011d). Isolation, primary culture and morphological characterization of oenocytes from *Aedes aegypti* pupae. *Tissue and Cell*, 43(2), 83-90.
- MS-SVS 2009. Diretrizes Nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. Ministério da Saúde. Série A. Normas e manuais técnicos, 1ª edição, Brasília/DF.
- Mellon R B, Georghiou G P. Rotational use of insecticides in mosquito control programs. (1984). *Proceedings and papers of the fifty-second annual Conference of the California and Vector Control Association*, 65-67.
- Ministério da saúde. (2015) Disponível em:
<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/maio/04/2015-016---Boletim-Dengue-SE15-2015.pdf>>
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, et al. (2007) Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 467-477. 12.
- Murray, N. E. A., Quam, M. B., & Wilder-Smith, A. (2013). Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical Epidemiology*, 5, 299.
- Mustafa, M. S., Rasotgi, V., Jain, S., & Gupta, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(1), 67-70.
- Narahashi, T. (1985). Nerve membrane ionic channels as the primary target of pyrethroids. *Neurotoxicology*, 6(2), 3.

- Narahashi, T. (1996). Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology & Toxicology*, 79(1), 1-14.
- Nasuti C, Cantalamessa F, Falcioni G & Gabbianelli R. (2003). Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. *Toxicology*, 191(2), 233-244.
- Nene, V., Wortman, J. R., Lawson, D., Haas, B., Kodira, C., Tu, Z. J & Li, S. (2007). Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*, 316(5832), 1718-1723.
- Osti, S. C., Varoli, F., Matushima, E., & Bernardi, M. (2007). Comparative studies of deltamethrin acute toxicity in exotic and Brazilian fish. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 2, 101-6.
- Palchick S. *Chemical Control of Vectors*. (1996). *The Biology of Disease Vectors*. Colorado: University Press of Colorado.
- Parkinson, A. (2001). *Biotransformation of xenobiotics* (pp. 133-224). New York: McGraw-Hill.
- Parvy J P, Napal L, Rubin T, Poidevin M, Perrin L, Wicker-Thomas C & Montagne J. (2012). *Drosophila melanogaster* Acetyl-CoA-Carboxylase Sustains a fatty acid-dependent remote signal to waterproof the respiratory system. *PLoS Genetics*, 8(8), 1002925.
- Paul, A., Harrington, L. C., & Scott, J. G. (2006). Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 43(1), 55-60.
- Perera M D B, Hemingway J & Karunaratne S P. (2008). Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected in anopheline vectors of malaria in Sri Lanka. *Malaria Journal*, 7(1), 168.
- Polanczyk, R. A., Garcia, M. D. O., & Alves, S. B. (2003). Potential of *Bacillus thuringiensis israelensis* Berliner for controlling *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública*, 37(6), 813-816.
- Prakash S (2001) Deltamethrin tolerance & associated cross resistance in *Aedes aegypti* from Mysore. *Indian Journal of Medical Research* 113, 103-107.
- Pridgeon, J. W., Pereira, R. M., Becnel, J. J., Allan, S. A., Clark, G. G., & Linthicum, K. J. (2008). Susceptibility of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Say, and *Anopheles*

- quadrifasciatus* Say to 19 pesticides with different modes of action. *Journal of Medical Entomology*, 45(1), 82-87.
- Qiu Y, Tittiger C, Wicker-Thomas C, Le Goff G, Young S, Wajnberg E. & Feyereisen, R. (2012). An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), 14858-14863.
- Ranson H Hemingway J. (2005). Mosquito glutathione transferases. *Methods in Enzymology*, 401, 226-241.
- Ray, D. E., & Fry, J. R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(1), 174-193.
- Rey, L. (2001). Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. In *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 2001. 856p.
- Reynaldi, S., Meiser, M., & Liess, M. (2011). Effects of the pyrethroid fenvalerate on the alarm response and on the vulnerability of the mosquito larva *Culex pipiens molestus* to the predator *Notonecta glauca*. *Aquatic Toxicology*, 104(1), 56-60.
- Rinterknecht E & Matz G. (1983). Oenocyte differentiation correlated with the formation of ectodermal coating in the embryo of a cockroach. *Tissue and Cell*, 15(3), 375-390.
- Ritchie, S. (2014). Rear and release: a new paradigm for dengue control. *Austral Entomology*, 53(4), 363-367.
- Roberts, D. R., Chareonviriyaphap, T., Harlan, H. H., & Hshieh, P. (1997). Methods of testing and analyzing excito-repellency responses of malaria vectors to insecticides. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13(1), 13-17.
- Rodríguez, M. M., Bisset, J. A., De Armas, Y., & Ramos, F. (2005). Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(4), 437-445.
- Romer F. (1974). Ultrastructural changes of the oenocytes of *Gryllus bimaculatus* DEG (Saltatoria, Insecta) during the moulting cycle. *Cell and Tissue Research*, 151(1), 27-46.
- Romer F, Bressel H U. Secretion and metabolism of ecdysteroids by oenocyte-fat body complexes (OEFC) in adult males of *Gryllus bimaculatus* DEG (Insecta). (1994). *Zeitschrift für Naturforschung*. 49,871-80.

- Romer F & Gnatzy, W. (1981). Arachnid oenocytes: ecdysone synthesis in the legs of harvestmen (Opilionidae). *Cell and Tissue Research*, 216(2), 449-453.
- Rose R I. (2001). Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1), 17.
- Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores A E, *et al.* (2007) A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 16: 785-798. 16.
- Santos, M. D., Areas, M. A., & Reyes, F. G. R. (2007). Piretróides – uma visão geral. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 18(3), 339-349.
- SAS Institute (2008) SAS/STAT User's Guide. USA.
- Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1989). Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Entomology*, 34(1), 77-96.
- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D & Weiner, M. L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171(1), 3-59.
- Spencer C I, Yuill K H, Borg J J, Hancox J C & Kozlowski R Z. (2001). Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3), 1067-1082.
- Stephenson, J. R. (2005). Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(4), 308-314.
- Stevenson, B. J., Pignatelli, P., Nikou, D., & Paine, M. J. (2012). Pinpointing P450s associated with pyrethroid metabolism in the dengue vector, *Aedes aegypti*: developing new tools to combat insecticide resistance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), e1595.
- Strode, C., Wondji, C. S., David, J. P., Hawkes, N. J., Lumjuan, N., Nelson, D. R., & Ranson, H. (2008). Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(1), 113-123.
- Symonová R & Smrž J. (2009). First record of hemocytes and oenocytes in freshwater ostracodes. *Journal of Crustacean Biology*, 29(1), 18-25

- Tadkowski T M, Jones J C & Firman J. (1977). The fine structure of the imaginal oenocytes of *Aedes aegypti*. *Annals of the Entomological Society of America*, 70(6), 837-840
- Teplitsky, C., Piha, H., Laurila, A., & Merilä, J. (2005). Common pesticide increases costs of antipredator defenses in *Rana temporaria* tadpoles. *Environmental Science & Technology*, 39(16), 6079-6085.
- Tomé, H. V. V., Martins, G. F., Lima, M. A. P., Campos, L. A. O., & Guedes, R. N. C. (2012). Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata* anthidioides. *PloS One*, 7(6), e38406.
- Tomé, H. W., Tales, V., Pascini, T. V., Dângelo, R. A., Guedes, R. N., & Martins, G. F. (2014). Survival and swimming behavior of insecticide-exposed larvae and pupae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*, 7, 195.
- Valentine W M. (1990). Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. *The Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice*, 20(2), 375-382.
- Van Gossum, H., Bots, J., Snijkers, T., Meyer, J., Van Wassenbergh, S., De Coen, W., & De Bruyn, L. (2009). Behaviour of damselfly larvae (*Enallagma cyathigerum*) (Insecta, Odonata) after long-term exposure to PFOS. *Environmental Pollution*, 157(4), 1332-1336.
- Velisek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodova, Z., Dobsikova, R., Novotny, L., & Dudzik, M. (2006). Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinarni Medicina*, 51(10), 469.
- WHO Safety of pyrethroids for public health use. Document WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.10. Geneva: WHO (2005)
- WHO -Immunization, Vaccines and Biologicals. (2015) Disponível em: <http://www.who.int/immunization/research/development/dengue_vaccines/en/>
- Wigglesworth V B. (1933). Memoirs: the physiology of the cuticle and of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Triatomidae, Hemiptera); with special reference to the function of the oenocytes and of the dermal glands. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 2(302), 269-318.
- Wigglesworth V B. (1942). The storage of protein, fat, glycogen and uric acid in the fat body and other tissues of mosquito larvae. *Journal of Experimental Biology*, 19(1), 56-77.
- Wigglesworth V B. (1970). Structural lipids in the insect cuticle and the function of the oenocytes. *Tissue and Cell*, 2(1), 155-179.

Wilder-Smith, A., & Gubler, D. J. (2008). Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Medical Clinics of North America*, 92(6), 1377-1390

Wilder-Smith, A., Ooi, E. E., Vasudevan, S. G., & Gubler, D. J. (2010). Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. *Current Infectious Disease Reports*, 12(3), 157-164.

World Health Organization (WHO). (2012) *Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012–2020*. Geneva: WHO Press.