

Stênio Nunes Alves

EFEITOS DA IVERMECTINA EM LARVAS DE
Culex quinquefasciatus (Say, 1823).

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia para obtenção do Título de *Magister Scientific*.

Viçosa
Minas Gerais - Brasil
2000

Stênio Nunes Alves

EFEITOS DA IVERMECTINA EM LARVAS DE
Culex quinquefasciatus (Say, 1823).

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia para obtenção do Título de *Magister Scientific*.

Aprovada: 29 de Setembro de 2000

PROF. LÚCIO A. O. CAMPOS
(CONSELHEIRO)

PROF. PAULO DE MARCO JÚNIOR

PROF. ÂNGELO PALLINI FILHO

PROF. ALAN LANE DE MELO

PROF. JOSÉ EDUARDO SERRÃO
(ORIENTADOR)

O saber científico resulta num equilíbrio de espírito contemplativo e de espírito prático.

E. Agazzi

À minha esposa Alessandra e ao meu futuro herdeiro que
está chegando.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Eduardo Serrão pela orientação, seriedade, confiança e amizade demonstrada durante a elaboração deste trabalho.

Ao amigo e professor Giovani Mocelin pela confiança e incentivo ao início deste trabalho.

Ao Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes pelas discussões, conselhos e incentivos antes e durante a minha estada na Universidade Federal de Viçosa.

Ao Prof. Alan Lane de Melo pela amizade, discussões, conselhos, incentivos durante o desenvolvimento deste trabalho e pela disponibilidade de seu laboratório.

Ao Prof. Lúcio Antônio Oliveira Campos por aconselhar este trabalho.

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Entomologia na pessoa de seu atual coordenador Prof. Dr. Og Francisco Fonseca de Souza.

Aos novos amigos e colegas de curso Alfredo, Bergin, Carlos, Daniel, Ivênio, Paula, Pedro e Rafael, entre outros, pela sincera amizade e companheirismo durante o período em Viçosa.

Aos funcionários do Setor de Entomologia Agrícola Ana Paula, Francisco e José Evaristo pela amizade, acolhida e atenção.

Aos funcionários Alberto Geraldo dos Santos, Airton Lobo, Atenágoras Nascimento Silva, Florence Mara Rosa, José Carlos dos Santos, Selma de Souza e Zenir de Souza pelo espírito cooperativo e amizade durante a realização deste trabalho nos laboratórios do GIDE.

À Wanderlany Amâncio Martins, Rosilene Siray Bicalho e Magno Augusto Zazá Borges pela convivência, apoio e discussões nos laboratórios do GIDE.

À Adriana, Gustavo e Kazu pela agradável convivência e ajuda durante a realização deste trabalho nos laboratórios do GIDE.

Ao Sr. Rubens Miranda, do Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, pelos cortes histológicos e pela atenção dispensada.

À Profa. Liléia Diotaiut, do Laboratório de Triatomíneos do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, pela disponibilidade de seu laboratório para a realização das medidas de Assimetria Flutuante.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Juca Bianchini pela amizade e auxílio na correção do texto.

Ao Sr. Dilermânio, sua esposa Nely e seus familiares por me abrigarem em Viçosa e principalmente pela amizade e atenção dispensada.

Aos meus pais Jairo e Adélia pelo apoio e estímulo valiosos.

Aos professores, pesquisadores e funcionários que acompanharam, incentivaram, sugeriram e que foram responsáveis pela minha formação e pelos valiosos conhecimentos adquiridos.

E às demais pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Stênio Nunes Alves, filho de Jairo Candido Alves e Adélia Nunes Alves, nasceu em Formiga, estado de Minas Gerais, aos 16 de setembro de 1969.

No período de 1991 a 1997, cursou Ciências Biológicas na Universidade Federal de Minas Gerais, obtendo os graus de Bacharel com ênfase em Parasitologia em julho de 1995 e de Licenciatura em julho de 1997. Iniciou seus trabalhos acadêmicos no ano de 1994, na área de Parasitologia, como bolsista do PIBIC/CNPq, sendo Prof. Substituto do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG no período de maio de 1996 à abril de 1997.

Ingressou no curso de mestrado em entomologia na Universidade Federal de Viçosa em outubro de 1998, sob a orientação do Prof. Giovani Mocelin, que posteriormente se transferiu para a Universidade Federal do Paraná, passando sua orientação ao Prof. José Eduardo Serrão, com conclusão da dissertação em outubro de 2000.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO -----	x
ABSTRACT-----	xii
1. INTRODUÇÃO -----	1
2. MATERIAL E MÉTODOS -----	8
3. RESULTADOS -----	13
4. DISCUSSÃO -----	43
5. CONCLUSÕES -----	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	52

RESUMO

ALVES, Stênio Nunes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2000.

Efeitos da ivermectina em larvas de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823).

Orientador: José Eduardo Serrão. Conselheiros: Raul Narciso Carvalho Guedes e Lúcio Antônio Oliveira Campos.

O presente trabalho tem por objetivo verificar, nos parâmetros morfológicos e biológicos, após a exposição das larvas de *Culex quinquefasciatus* à concentração de 1,5 ppb de ivermectina, o comportamento e a sobrevivência de *C. quinquefasciatus*, as possíveis alterações morfológicas no corpo gorduroso das larvas, as possíveis alterações no número de ínstar, número médio de ovos por postura da fêmea, duração do período larval e a assimetria flutuante nos adultos. Na sua execução foram utilizadas 601 larvas de 3º e 4º instar do mosquito como material biológico, que foram obtidas de criação semi natural. As larvas foram colocadas em recipientes plásticos num período de 30 minutos de exposição à droga. Após a exposição à solução do fármaco, foram lavadas em água desclorada e colocadas em gaiolas teladas para acompanhamento do desenvolvimento. Após a postura, os ovos foram separados e as larvas eclodidas, contadas. Algumas larvas

submetidas a 1,5 ppb de ivermectina, foram utilizadas para o preparo de amostras para estudos em histologia. Para a análise de assimetria flutuante, 40 machos e 43 fêmeas adultas do grupo controle e 39 machos e 40 fêmeas adultas, sobreviventes das larvas expostas à concentração de 1,5 ppb de ivermectina, foram selecionados e destes, retiradas suas asas para posterior observação através do microscópio estereoscópico com câmera de vídeo acoplada. Foram realizadas medidas de comprimento das nervuras R_3 , R_{4+5} , M_1 , M_2 , M_{3+4} e do perímetro das nervuras M_1 e M_2 . Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a ivermectina na concentração de 1,5 ppb causou paralisia nas larvas com 73,38% de mortalidade, aumento das gotículas de lipídios no corpo gorduroso larval e uma diminuição do número de posturas. Foi verificado também, alteração na assimetria flutuante (AF), sendo maior no grupo controle e nas fêmeas.

ABSTRACT

ALVES, Stênio Nunes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, september of 2000.

Effects of the ivermectin on *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) larvae.

Advisor: José Eduardo Serrão. Committee members: Raul Narciso Carvalho Guedes and Lúcio Antônio Oliveira Campos.

The present work aims to investigate the behavior and the survival rate of *Culex quinquefasciatus*, and to determine the lethal effect of ivermectin based on morphologic and biologic parameters of a 1.5 ppb concentration of *C. quinquefasciatus* larvae, and possible alterations of their fat body. Larvae of mosquito were obtained from semi-natural breeding as biologic material. Changes in the number of instars, average number of eggs per laying, length of the larval stage and fluctuating asymmetry (FA) were studied in adults. For this experiment, 601 larvae of 3rd and 4th instars of the mosquito were obtained and placed in plastic containers and exposed for 30 minutes. The laid eggs were separated and the hatched larvae were counted. Some larvae submitted to 1.5 ppb of ivermectin were used to prepare samples for histologic study. For asymmetry analyses, 40 floating males and 43 adult females of the control group which survived exposure to 1.5 ppb

of ivermectin were selected and from them, the posterior observation through stereoscopic microscope with video camera mounting. R_3 , R_{4+5} , M_1 , M_2 , M_{3+4} nervures and the perimeter of M_1 and M_2 nervures were measured. The results obtained show that ivermectin in a concentration of 1.5 ppb caused paralysis to the larvae with a mortality rate of 73.38%, an increase in the number of lipid droplets in the fat body and an reduction of the number of egg layings in the adult. It was also observed that the FA is larger in females than in males and also larger in the treated group than in the control one.

1. INTRODUÇÃO

Os mosquitos são insetos dípteros pertencentes à família Culicidae, conhecidos também como pernilongos, muriçocas ou carrapanãs. Os adultos são alados, possuem pernas e antenas longas e na sua grande maioria são hematófagos, enquanto as fases imaturas são aquáticas. Entre os Culicidae encontramos a maior subfamília, Culicinae, com cerca de 3000 espécies divididas em 10 tribos que reúnem 34 gêneros. Destes, os gêneros *Aedes* e *Culex* são os de maior importância sanitária no Brasil, por serem os vetores do dengue e filariose, respectivamente (PESSÔA & MARTINS, 1988).

Culex quinquefasciatus (Say, 1823) é o mosquito mais conhecido pelos habitantes das vilas rurais e das cidades, sendo considerado tropicopolito e, também, altamente antropofílico. Seus criadouros preferenciais são os depósitos naturais ou artificiais, no solo ou em recipientes, com água rica em matéria orgânica em decomposição e detritos, de aspecto sujo e mal cheirosa (FORATTINI, 1965). É freqüente nos meses quentes e chuvosos, pois a água da chuva que se acumula no solo e nos recipientes amplia seus criadouros. De acordo com SINTON & SHUTE (1938), a duração de vida dos mosquitos é influenciada por fatores intrínsecos como nutrição larval, metabolismo do adulto, postura de ovos e hibernação, e fatores extrínsecos referentes a temperatura, umidade e outras variáveis ambientais. VIANNA *et al.* (1996a) observou, em

condições ambientais, a longevidade do ciclo aquático de *C. quinquefasciatus* e verificou que a temperatura teve influência inversamente proporcional ao período aquático, cuja variação foi de 8 a 48 dias. Durante seus experimentos a temperatura variou de 6,7°C a 29°C, sendo a temperatura ótima entre 20°C e 29°C, para períodos variáveis de incubação (1 a 8 dias), larval (6 a 31 dias) e pupal (1 a 9 dias). RIBEIRO (1993) obteve resultados semelhantes. No ciclo do adulto, VIANNA *et al.* (1996b) mostrou que a temperatura média ambiental maior que 20°C diminui a longevidade e o tempo letal médio, mas favorece o aumento no número de posturas de ovos, enquanto que uma temperatura média ambiental entre 15 e 20°C prolonga a longevidade e o tempo letal médio do *C. quinquefasciatus* na fase adulta e favorece a postura de ovos ao mesmo tempo.

O hábito hematófago de fêmeas de *C. quinquefasciatus*, usualmente necessário para que se processe a maturação dos ovos, resulta na capacidade de transmissão de diversas moléstias tanto para o homem como para outros animais, sendo uma espécie de grande importância na saúde pública e animal, por ser o principal vetor de *Wuchereria bancrofti* no Brasil (PESSÔA & MARTINS, 1988). Além de causar considerável incômodo pelas suas picadas, as fêmeas, pela preferência em sugar sangue durante à noite, facilitam em muito o contato de microfilárias com esse culicídeo, uma vez que no período noturno há aumento da microfilaremia periférica, o que torna o inseto mais eficaz que os outros mosquitos transmissores (SUBRA, 1980).

Segundo CONSOLI & OLIVEIRA (1994), *C. quinquefasciatus* tem sido também incriminado como vetor de arboviroses dentro de vilas rurais e cidades. Foi naturalmente encontrado infectado com vírus causadores de encefalites. No Brasil, é também responsável pela veiculação do vírus Oropouche, sendo considerado vetor secundário dessa arbovirose (o vetor primário é o ceratopogonídeo *Culicoides paraensis*) em áreas do estado do Pará, onde a doença tem causado epidemias. A sua presença também foi associada com a transmissão de várias arboviroses em aves, eqüinos, canídeos e felinos (HURLBUT, 1950; MEYERS *et al.*, 1960; HARWOOD & JAMES, 1979).

Anteriormente à descoberta dos inseticidas residuais sintéticos na década de 40, várias metodologias para controlar mosquitos foram adotadas em diversas partes do mundo com variados graus de sucesso. Após a descoberta destes inseticidas, as metodologias para o controle de mosquitos vetores de doenças foram revistas, possibilitando a sua maior padronização (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994). Atualmente os inseticidas sintéticos continuam sendo o principal suporte dos programas de controles (WRIGTH, 1971; MARICONI, 1980). Inseticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides têm sido largamente empregados para controlar mosquitos vetores de doenças em diversas partes do mundo. Alguns deles, como o DDT (Dicloro-difenil-tri-cloro-etano), trata-se de produto relativamente barato, moderadamente tóxico e com elevado poder residual. Este composto não é biodegradável sendo acumulativo nas gorduras de animais de sangue quente, pode interferir no metabolismo de sódio-potássio e mostrou-se carcinogênico em camundongos, (ALDRIDGE, 1979; MARICONI, 1980).

O uso indiscriminado de inseticidas usados para o controle de populações larvais de mosquitos e o tempo de exposição prolongado do inseto à droga podem selecionar indivíduos resistentes a essas substâncias. A resistência de insetos aos inseticidas comuns como organoclorados, carbamatos e piretróides (OMS, 1976; PEIRIS & HEMINGWAY, 1990; BISSET *et al.*, 1991; CHANDRE *et al.*, 1997) e uma certa tolerância ao methoprene - um análogo do hormônio juvenil (ORTEGA *et al.*, 1991) tem sido freqüentemente detectadas, requerendo um constante aumento das doses de aplicação dos inseticidas (WHO, 1970; SUBRA, 1980).

O uso constante dos inseticidas diretamente nos criadouros, em altas concentrações, faz com que o combate aos vetores torna-se dispendioso economicamente (ABERCROMBIE & BERG, 1978; LASALLE, 1993), além de destruir uma importante e rica fauna associada nos criadouros, que pode, juntamente com fatores climáticos, reduzir a presença destes vetores (SILVEIRA *et al.*, 1989). Outro aspecto importante também a considerar é o destino no meio ambiente dos inseticidas e outros compostos químicos, uma vez que o emprego

de moléculas estáveis e persistentes podem levar a deterioração do ambiente na superfície e no fundo d'água (HALLBERG, 1989; RICHARDS & BAKER, 1993; LUNDBERGH *et al.*, 1995).

Desde os primeiros inseticidas organofosforados usados contra as pragas de importância médica, veterinária e agrícola, novas gerações de inseticidas cada vez mais potentes tem sido pesquisadas e desenvolvidas. A ivermectina, derivado 22-23-dihidro da avermectina B₁, é um grupo de lactonas macrocíclicas com baixa solubilidade em água e que é produzida pelo processo de fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermectilis* (BURG, *et al.*, 1979; EGERTON *et al.*, 1979; MILLER *et al.*, 1979; CHABALALA *et al.*, 1980). A ivermectina tem sido utilizado como anti-parasitários no tratamento de animais domésticos (AZIZ *et al.*, 1982; CAMPBELL *et al.*, 1983). Estudos preliminares têm comprovado que a ivermectina é bastante eficaz em vários invertebrados [*Dugesia tigrina* (ALVES, *et al.*, 1996a), *Pomacea haustum* e *Physa* sp. (ALVES, *et al.*, 1996b), *Biomphalaria glabrata* (FARIA *et al.*, 1993), *Belostoma anurum* (HORTA *et al.*, 1994a), *Martarega uruguayensis* (HORTA *et al.*, 1994b) e *C. quinquefasciatus* (FREITAS *et al.*, 1996)]. As avermectinas levam à morte os adultos e estádios imaturos de insetos pertencentes à várias ordens (STRONG & BROWN, 1987). A sua ingestão não é necessária, uma vez que o contato com o mesmo já é efetivo na maioria dos casos (STRONG, 1992).

FREITAS *et al.* (1996) observaram os efeitos da ivermectina em larvas de *C. quinquefasciatus* expostas às concentrações de 1, 5 e 10 ppm, em tempos variados de exposição. As larvas expostas à droga apresentaram os fenômenos de ataxia e paralisia progressiva em todas as larvas, inclusive naquelas que não morreram no período de tempo de 48 horas após a exposição larval à solução de ivermectina. Esses fenômenos foram mais claramente observados nos grupos expostos às concentrações de 5 e 10 ppm, em comparação com os demais grupos.

Mortalidade e paralisia causadas pela ivermectina em adultos de *Aedes fluviatilis*, *Aedes aegypti*, *Anopheles quadrimaculatus* e outras espécies de mosquitos também têm sido relatadas (CONSOLI *et al.*, 1986; TESH &

GUZMAN, 1990; FOCKS *et al.*, 1991; JONES, *et al.*, 1992; GARDNER, *et al.*, 1993).

Em algumas ordens, principalmente Diptera e Coleoptera, há relatos de acúmulo de água nos indivíduos em consequência da ação das avermectinas. Isto possivelmente ocorre pela interferência da droga na função dos túbulos de Malpighi e dos hormônios relacionados com o balanço hídrico nos insetos (STRONG, 1993).

É possível que as avermectinas afetem outros tecidos incluindo o corpo gorduroso (STRONG & BROWN, 1987). Em mosquitos, ele se apresenta como uma placa de células aderidas à parede corporal do tórax e abdome estendendo-se pela cavidade corporal, às vezes circundando certos órgãos (CLEMENTS, 1996). É o principal órgão de metabolismo intermediário em insetos, funcionando como órgão armazenador de proteínas, lipídios e carboidratos (CHAPMAN, 1998). O total de carboidratos e lipídios presentes no adulto provém das reservas energéticas armazenadas durante o estágio larval (CLEMENTS, 1996). O corpo gorduroso de larvas e adultos de dípteros possuem funções específicas relacionadas ao estágio de desenvolvimento. Por exemplo, sintetizando proteínas da hemolinfa em larvas e em adultos, além disso, nas fêmeas, este órgão produz os polipeptídeos do vitelo. Há indícios, também, do seu envolvimento na resposta de defesa. De fato, peptídeos, entre os primariamente produzidos no corpo gorduroso, são secretados na hemolinfa (HOFFMANN *et al.* 1999). Encontram-se, entre eles, a defensina, um grupo de moléculas compactas (3 a 5 kDa) protease-resistentes com 3 ou 4 pontes dissulfetos com atividade direta na resposta imune natural contra várias bactérias, fungos e vírus encapsulados (ZANETTI *et al.*, 1997).

A indução rápida e consistente de genes peptídicos antimicrobianos em células do corpo gorduroso de *Drosophila* sp., depois de um dano séptico, tem sido utilizada de modelo para a análise da imunidade natural destas espécies (HOFFMANN *et al.* 1999). Isso poderia ser útil num estudo de controle integrado para várias espécies vetoras de doenças como o *C. quinquefasciatus*.

Outro aspecto de importância relevante que se pode observar contra os insetos é o efeito de concentrações sub-letais de drogas. Isso recai dentro de três categorias: inibição alimentar, anormalidades do desenvolvimento e distúrbios reprodutivos (STRONG & BROWN, 1987). Neste sentido, SEIF *et al.* (1997) observaram o efeito da concentração sub-letal para alguns inseticidas em larvas de *C. pipiens* e constatou que o desenvolvimento de *Wuchereria bancrofti* foi prejudicado quando os insetos foram expostos a estas concentrações, já que resíduos de inseticidas nas larvas podem perdurar no adulto afetando os fatores nutricionais no mosquito e, conseqüentemente, afetando o desenvolvimento da larva do nematóide.

Outros insetos têm sido usado para observar o efeito de concentrações sub-letais de avermectinas como, fêmeas de *Rhodnius prolixus* que, expostas à solução de avermectina, apresentaram redução de 86% na produção de ovos (De AZAMBUJA *et al.*, 1985). Já em *Chrysomya bezziana* e *Calliphora vomitoria* as concentrações sub-letais do inseticida, inibiram a pupariação e o desenvolvimento de adultos (SPRADBERY *et al.*, 1985; STRONG, 1986; BORGES & MELO, 2000). No entanto, pouco se conhece sobre a concentração sub-letal da 22,23-dihidroavermectina B₁ [MK-933 (Ivermectina – Ivomec®)] em larvas de *C. quinquefasciatus*.

Além do pouco conhecimento do efeito da concentração sub-letal da ivermectina em larvas de *C. quinquefasciatus*, pouco se conhece, também, da assimetria flutuante (AF) nesse mosquito quando exposto a algum tipo de inseticida. A AF pode ser definida como pequenos desvios da perfeita simetria bilateral para uma característica morfológica (VAN VALEN, 1962). Esses desvios, freqüentemente aparecem quando um estresse genético ou ambiental desestabiliza o processo de desenvolvimento de um ser vivo.

A AF tem um padrão que pode ser determinado por um caráter em uma população, sendo, este caráter, representado pela distribuição de freqüências da diferença entre os lados do caráter, em uma distribuição normal com média zero, evidenciando a tendência natural dos indivíduos apresentarem caracteres simétricos. A alteração deste padrão pode indicar um aumento na freqüência de

indivíduos assimétricos na população. As outras formas de assimetria existentes são adaptativas, ocorrendo em caracteres que são naturalmente mais desenvolvidos em um dos lados, de forma casual (antissimetria) ou não (assimetria direcional). Enquanto a antissimetria é representada por uma curva de distribuição de frequências bimodal, a simetria direcional é representada por uma curva com desvio para um dos lados (PALMER & STROBECK, 1986).

Desta forma, a assimetria flutuante tem sido usada como um indicador da quantidade do efeito estressante (PARSONS, 1990), podendo ser detectada através de efeitos de medidas em algumas partes corporais do organismo, como tíbias, nervuras ou áreas das asas nos insetos. Para realizar essas medidas, tem-se usado um analisador de imagens, que tem demonstrado maior eficiência sobre outros métodos de medidas da AF (KOKKO *et al.* 1996). A análise de imagem é aceita como método, pois gera um satisfatório grau de medição, objetividade, precisão e repetições (YU *et al.*, 1992; KOKKO *et al.* 1993a-c, 1995). Neste sentido, o analisador de imagens pode reduzir os erros de medidas no estudo da AF.

No sentido de determinar ou conhecer o efeito sub-letal da ivermectina na concentração de 1,5 ppb em larvas de *C. quinquefasciatus* nos parâmetros morfológicos e biológicos, o presente trabalho tem por objetivo verificar, o comportamento e a sobrevivência de *C. quinquefasciatus*, as possíveis alterações morfológicas no corpo gorduroso das larvas, as possíveis alterações no número de ínstars, número médio de ovos por postura da fêmea, duração do período larval e a assimetria flutuante nos adultos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos Espécimens

As formas imaturas de *Culex quinquefasciatus* foram obtidas segundo GERBERG (1979) com ligeiras modificações, da criação mantida nos laboratórios do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE) no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Para tanto, as posturas foram transferidas para cubas plásticas (50 X 40 X 25 cm) contendo água de torneira desclorada. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas com ração rotineiramente utilizada para a alimentação de camundongos.

2.2. Exposição das larvas em concentração de 1,5 ppb e 1 ppm

Um mil duzentas e duas larvas de 3^o e 4^o ínstar de *C. quinquefasciatus* foram colocadas em recipientes plásticos e divididas em 20 por recipiente. A metade das larvas foi exposta à concentração de 1,5 ppb de ivermectina (22,23-Dihydroavermectina B₁) para um volume de 100ml de solução num período de 30 minutos de exposição à droga. A outra metade foi usada para o grupo controle. O mesmo foi feito para 80 larvas expostas à concentração de 1 ppm.

2.3. Manutenção dos insetos após exposição à droga

As larvas de 3^o e 4^o ínstar de *C. quinquefasciatus* expostas a 1,5 ppb de ivermectina, após lavagem em água de torneira desclorada, foram transferidas para recipientes plásticos contendo água sem cloro. As larvas foram alimentadas com ração rotineiramente utilizada para a alimentação de camundongos até se transformarem em adultas.

Cinco casais do grupo controle e tratado, sobreviventes do experimento, foram colocados em gaiolas teladas e alimentados com mel e água em concentração de 10%, e além disso, as fêmeas tiveram *Nothura minor* (codornas) *in natura* como fonte para hematofagia. Todo o experimento foi conduzido em temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. Neste tratamento foram analisados os seguintes parâmetros biológicos: número de ovos por postura da fêmea; duração do período de eclosão larval; duração do ciclo aquático, número de posturas por fêmea e duração da emergência do adulto.

2.4. Amostras Histológicas

Foram retiradas 10 larvas de 3^o e 4^o ínstar de *C. quinquefasciatus* do grupo controle e dos grupo expostos a 1,5 ppb e a 1 ppm de solução de ivermectina, ambos por 30 minutos de exposição, para serem utilizadas no preparo de amostras para estudos em histologia. Logo após serem retiradas da exposição às soluções de iveremctina, as amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato pH 7,2 a 0,1M. As amostras fixadas, foram desidratadas em série alcóolica de 70, 80, 90, 95 °Gl e absoluto, incluídas em historesina (Leica) para posterior microtomia, com espessura de 4 µm, realizada com navalhas de vidro. As secções foram submetidas às seguintes colorações: (1) PAS para evidenciação de polissacarídeos neutros e glicoproteínas conjugadas, (2) azul de bromofenol para proteínas totais, (3) sulfato azul de nilo para lipídeos, (4) azul de Toluidina-borax a 1% e (5) verde de metila-pironina para evidenciação da presença de morte celular. Todos os testes de coloração foram feitos de acordo com PEARSE

(1968), seguindo-se pequenas adaptações para o uso em historesina. A seguir as secções foram analisadas e fotografadas sob microscópio óptico.

2.5. Assimetria Flutuante

Para a análise de assimetria flutuante foram selecionados 40 machos e 43 fêmeas adultas do grupo controle e 39 machos e 40 fêmeas adultas, sobreviventes das larvas expostas a concentração de 1,5 ppb de ivermectina. Suas asas foram retiradas para posterior montagem entre lâmina e lamínula em bálsamo do Canadá e observadas através do microscópio estereoscópico com câmera de vídeo acoplada. As imagens captadas pela câmera foram digitalizadas e as medidas tomadas, utilizando o software de análise de imagem “KS 300” da Zeiss®. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Triatomíneos do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz em Belo Horizonte.

Foram realizadas medidas de comprimento das nervuras R_3 , R_{4+5} , M_1 , M_2 , M_{3+4} e do perímetro das nervuras M_1 e M_2 (Figura 1), num total de 1944 medidas. Estas medidas foram feitas usando objetivas de aumento 25x para asas de insetos fêmeas e 32x para machos. As medidas foram feitas em ensaio cego, com as lâminas numeradas sem indicar sexo ou tratamento.

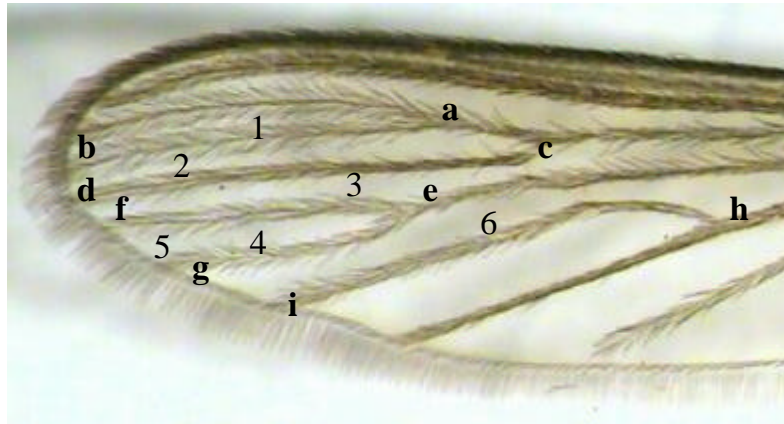


Figura 1: Asa de *C. quinquefasciatus* utilizadas para análise da assimetria flutuante dos mosquitos emergentes das larvas expostas à concentração de 1,5 ppb de ivermectina. As letras indicam os pontos marcados para a realização das medidas, enquanto os números correspondem às nervuras. 1 – R_3 , ponto a – b; 2 – R_{4+5} , ponto c – d; 3 – M_1 , ponto e – f; 4 – M_2 , ponto e – g; 5 – perímetro da M_1 e M_2 , pontos e – f – g – e; 6 – M_{3+4} , ponto h – i.

2.6. Análise Estatística

Para verificar os parâmetros biológicos foi usado o teste t para verificar se houve ou não diferença entre o grupo exposto à solução de 1,5 ppb de ivermectina por um período de 30 minutos e o grupo controle.

A presença da AF em cada medida foi verificada através de teste de normalidade [teste W de Shapiro-Wilk (STATSOFT, 1999)], utilizando os valores da diferença entre o lado esquerdo e o direito. A média do lado esquerdo e do direito foi utilizada como índice de tamanho e realizou-se uma regressão linear desta média pela assimetria absoluta, para verificar se o aumento da assimetria estava ligada ao aumento do tamanho.

A assimetria da amostra foi calculada pela fórmula da assimetria absoluta (PALMER & STROBECK, 1986):

$$A = \frac{\sum |E - D|}{N}$$

Onde, A = assimetria absoluta; E = medida do comprimento do lado esquerdo do caráter; D = medida do comprimento do lado direito do caráter; N = número de indivíduos da amostra.

Foi realizada uma análise de variância de duas vias para cada medida e para cada espécie da assimetria em relação ao tratamento e ao sexo.

Usou-se também o PCA para verificar se houve assimetria flutuante no conjunto das medidas.

3. RESULTADOS

3.1. Mortalidade larval

Os resultados referentes à mortalidade larval estão dispostos na Figura 2. Um total de 1202 larvas, divididas igualmente, foram utilizadas para o experimento com o grupo controle e tratado apresentando 30,78% e 71,71% de mortalidade respectivamente. O grupo tratado foi exposto à solução de 1,5 ppb durante 30 minutos e todos os insetos mortos deste grupo, apresentaram paralisia progressiva. A média de mortalidade dos grupos controle e tratado foram de 6,30 e 14,33 espécimes respectivamente, com $p < 0,001$.

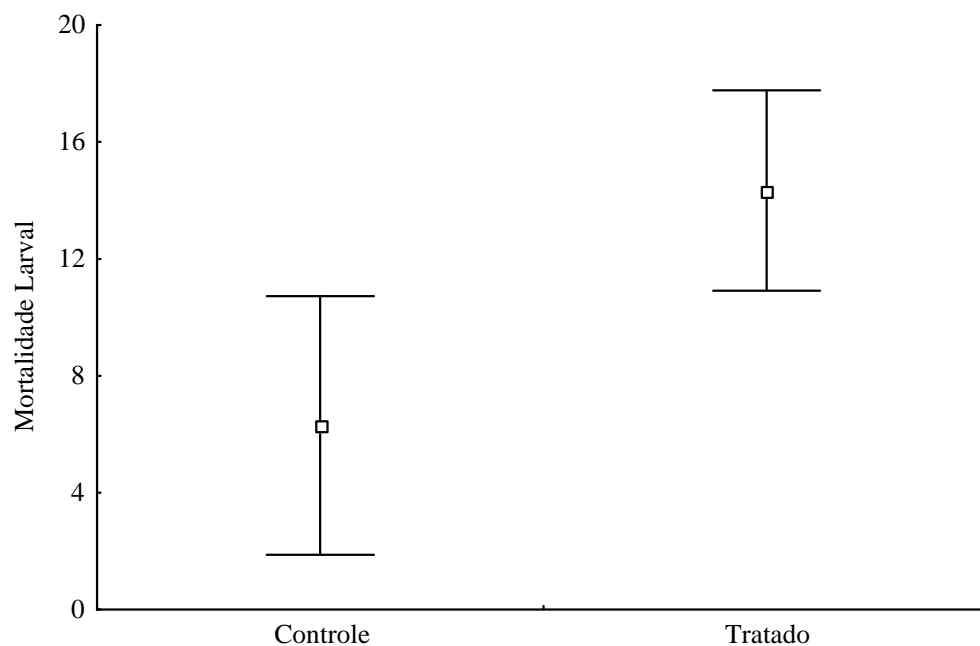


Figura 2. Mortalidade média de larvas de *Culex quinquefasciatus* expostas à 1,5 ppb de solução de ivermectina por um período de 30 minutos. Barras representam desvio padrão.

3.2. Número de adultos emergidos

O número de adultos emergidos durante o teste do grupo exposto à solução de ivermectina foi de 170 de um total de 601 larvas, sendo 44,12% machos e 55,88% fêmeas. De um total de 416 adultos emergidos, de 601 larvas do grupo controle, 46,63% foram machos e 53,37% foram fêmeas. A análise de variância (Tabela 2) mostra um efeito do tratamento na emergência dos adultos, não havendo interação com o sexo. A média de emergência foi maior no grupo controle (Figura 3).

Tabela 1: Análise de variância para a emergência de adultos de *Culex quinquefasciatus* após exposição à 1,5 ppb de solução de ivermectina por um período de 30 min. São analisadas as variáveis tratamento e sexo. Foram analisados os grupos controle e tratado.

	Efeito do gl	Efeito do MS	Erro do gl	Erro do MS	F	p
Tratamento	1	22,94484	116	0,3134	73,123	$p < 0,001$
Sexo	1	0,92222	116	0,3134	2,939	0,0891
Interação	1	0,00005	116	0,3134	F < 0,001	0,9896

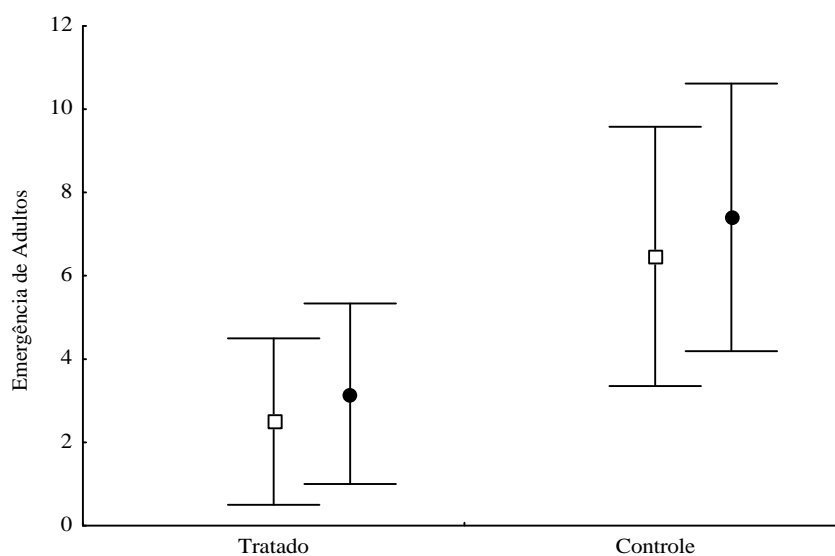


Figura 3. Média de emergência de adultos de *Culex quinquefasciatus* após exposição à 1,5 ppb de solução de ivermectina por um período de 30 minutos.

- Machos; ● - Fêmeas. Barras representam desvio padrão.

3.3. Parâmetros biológicos

Cinco casais de mosquitos que emergiram das pupas sobreviventes à exposição de solução de ivermectina, foram transferidos para uma gaiola telada e alimentados com solução de glicose a 10%, tendo as fêmeas se alimentado de sangue de codorna para fazerem postura de ovos.

Na Tabela 2 estão representados os valores do teste t com cálculo de variâncias separadas para a média do número de ovos por postura dos grupos controle e tratado para adultos emergentes das larvas expostas à solução de 1,5 ppb de ivermectina. O cálculo com variâncias separadas foi necessário pois, o teste de homogeneidade de variâncias foi significativo, o que implica numa diferença das variâncias entre os grupos controle e tratado, já que o número total de posturas por fêmeas foi duas vezes menor no grupo tratado, que apresentou 3 posturas, enquanto o grupo controle apresentou 6 posturas. O número de ovos/postura variou de 84 à 134, num total de 319 ovos no grupo tratado e de 94 à 114, num total de 607 ovos no grupo controle.

Tabela 2: Teste t com cálculo de variâncias separadas para a média do número de ovos por postura dos grupos controle e tratado para adultos de *Culex quinquefasciatus* emergentes das larvas expostas à solução de 1,5 ppb de ivermectina

	Média do Controle	Média do Tratado	t – estimativa das variâncias separadas	gl	p de 2-vias
Número de ovos	101,167	106,333	- 0,343	2,232	0,762

Na tabela 3 estão representados os valores do teste t para os seguintes parâmetros biológicos: número de dias da eclosão larval; duração, em dias, do ciclo aquático; número de dias da emergência do adulto após o ciclo aquático e o número de dias da emergência do adulto, respectivamente, dos grupos controle e tratado após a oviposição das fêmeas emergentes das larvas expostas à solução de 1,5 ppb de ivermectina. Em todas as tabelas o valor de t está mostrando que não houve diferenças significativas entre os grupos controle e tratado.

Tabela 4: Teste t para os parâmetros biológicos analisados para o grupo controle e tratado com solução de 1,5 ppb de ivermectina em *Culex quinquefasciatus*.

Parâmetros Biológicos	Média do Controle	Média do Tratado	t	gl	p
Número de dias para eclosão	3,833	3,667	0,333	7	0,748
Ciclo aquático	11,167	10,667	0,284	7	0,785
Duração da emergência do adulto	5,1667	4,000	1,985	7	0,087
Número de emergência do adulto	7,333	7,000	0,198	7	0,848

3.4. Análise Histológica

As secções coradas pelo azul de toluidina-borax, mostraram que o corpo gorduroso segue o padrão morfológico descrito para outros insetos, ou seja, células bem desenvolvidas com citoplasma apresentando considerável granulação (**Figuras 4-6**). Testes histoquímicos mostraram que esta granulação consiste de lipídios, carboidratos e proteínas. Entretanto, quando se comparou os trofócitos das larvas que foram expostas à solução de ivermectina, notou-se o surgimento de uma granulação mais fina e evidente no citoplasma destas células (**Figura 7**). Os testes histoquímicos mostraram que estes grânulos apresentavam a mesma constituição daqueles maiores e mais homogêneos observados nas células do corpo gorduroso de larvas não tratadas (**Figuras 8-10**).

A análise com verde metila-pironina, não indicou diferença significativa na taxa de morte celular, entre os grupos controle e tratado. Entretanto, foram evidenciadas umas poucas células com aspecto de morte nos dois grupos analisados.

Além das análises do corpo gorduroso, outros órgãos foram observados e não foram verificadas variações decorrentes do tratamento com ivermectina. Neste sentido, o intestino médio apresentou-se formado por um epitélio simples de células colunares com bordo estriado bem evidente (**Figura 11**). A membrana peritrófica sempre esteve presente no interior do intestino médio, formando os espaços endo e ectoperitróficos, os quais mostraram constituintes diferentes, sugerindo uma membrana peritrófica em perfeitas condições (**Figura 12**).

Os túbulos de Malpighi formados por células com núcleos esféricos evidentes e cromatina relativamente condensada, não apresentaram acúmulo de qualquer substância na sua luz, que se mostrou bastante estreita.

Um resultado interessante, foi o aparecimento, em algumas larvas tratadas, de grande quantidade de bactérias que estavam distribuídas por praticamente toda a cavidade celomática do inseto.

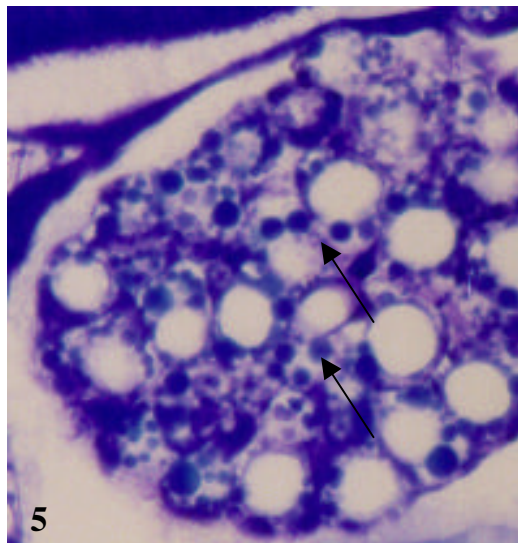
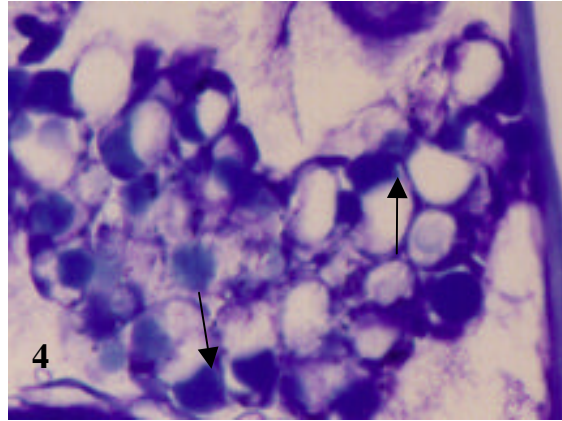


Figura 4 - 5: Secção longitudinal da larva de terceiro ínstar de *Culex quinquefasciatus* em coloração por azul de Toluidina-borax. Aumento de 40 X. **4** – Larva não exposta à ivermectina, mostrando o corpo gorduroso (setas) cujas células estão preenchidas por grânulos grandes e homogêneos. **5** – Larva exposta à 1 ppm de solução de ivermectina, mostrando o corpo gorduroso (setas) cujas células estão preenchidas por pequenos grânulos.

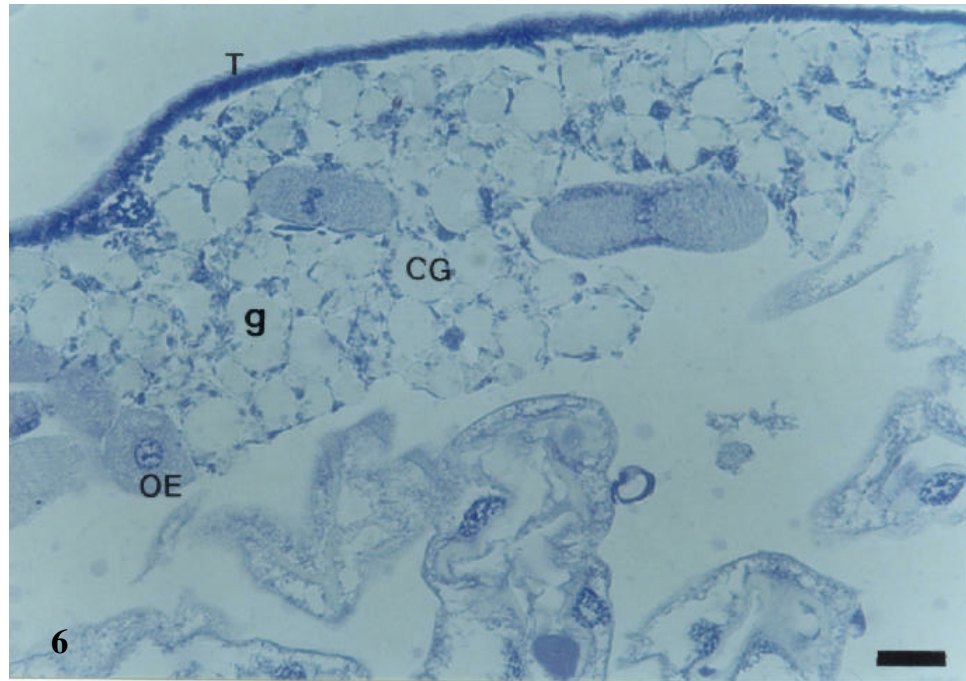


Figura 6: Coloração por azul de Toluidina-borax em secção longitudinal da larva de terceiro ínstar de *Culex quinquefasciatus* não exposta à ivermectina, mostrando o corpo gorduroso (CG) cujas células estão preenchidas por grânulos grandes e homogêneos (g). T – tegumento, OE - oenócito. Barra de escala indica 50 μ m.

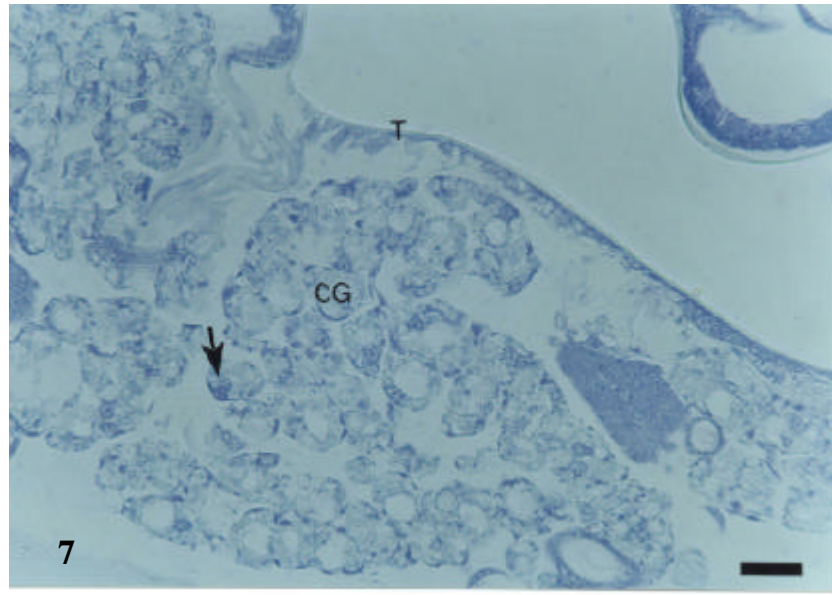


Figura 7: Coloração por azul de Toluidina-borax em secção longitudinal da larva de terceiro ínstar de *Culex quinquefasciatus* exposta à solução de 1,5 ppb de ivermectina durante 30 min mostrando o corpo gorduroso (CG) com células cujo citoplasma apresenta granulação fina (setas). T – tegumento. Barra de escala indica 50 μ

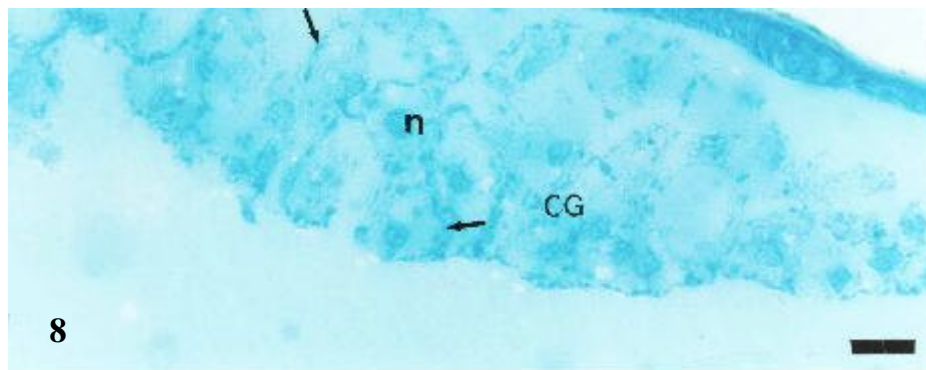
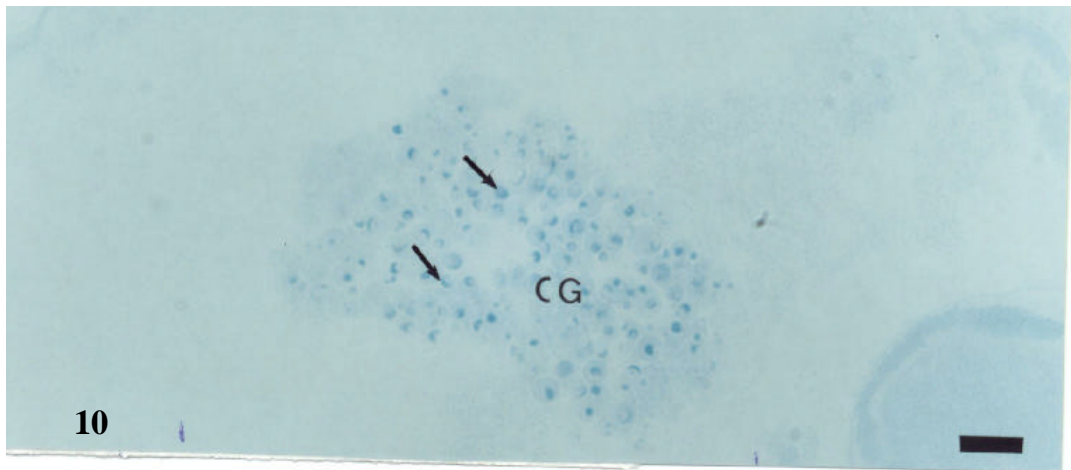
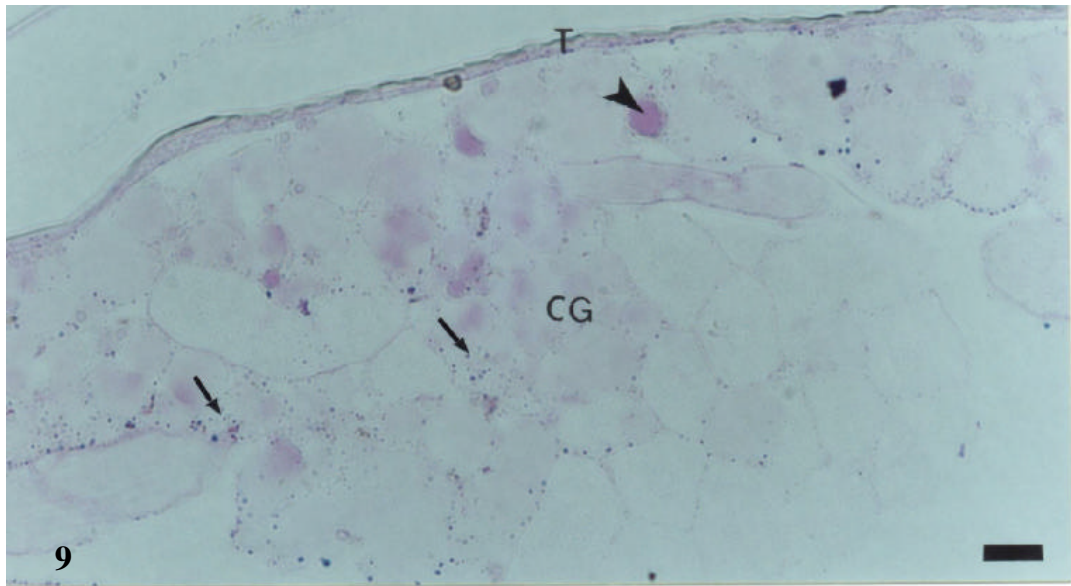
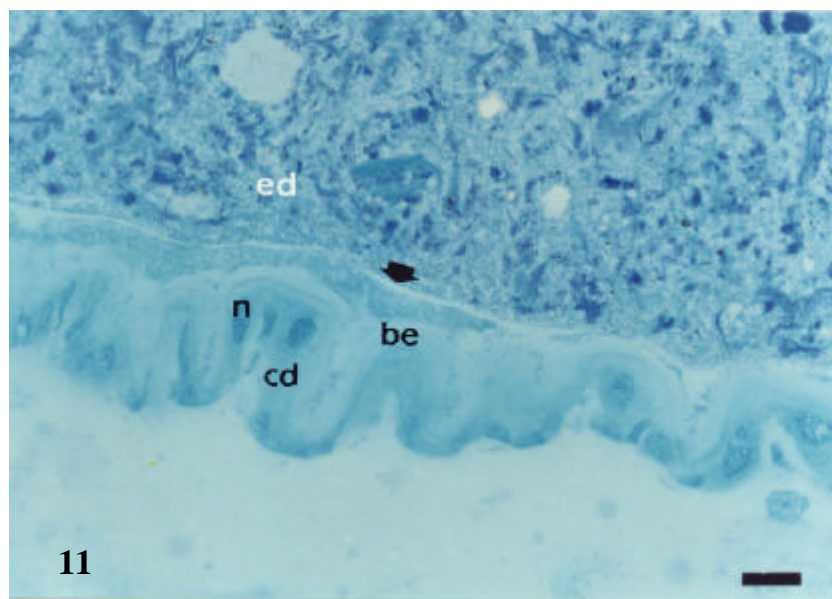


Figura 8: Coloração por azul do nilo em secção longitudinal da larva de terceiro ínstar de *Culex quinquefasciatus* exposta à solução de 1,5 ppb de ivermectina durante 30 min. Corpo gorduroso (CG) com pequenas gotas lipídicas (setas) na periferia celular (azul do nilo). n – núcleo. Barras de escala indicam 20 μ m.



Figuras 9 – 10: Secção longitudinal da larva de terceiro ínstar de *Culex quinquefasciatus* exposta à solução de 1,5 ppb de ivermectina durante 30 min. Teste de PAS mostrando reação positiva em grânulos pequenos (setas) e grandes (ponta de seta) nas células do corpo gorduroso (CG). **10** – Coloração pelo azul de bromofenol mostrando pequenos grânulos protéicos (setas) nas células do corpo gorduroso (CG). Barras de escala indicam 20 μ m.



Figuras 11 – 12: Secção longitudinal do intestino médio da larva de terceiro ínstar de *Culex quinquefasciatus* exposta à solução de 1,5 ppb de ivermectina durante 30 min. **11** – Células digestivas integras (cd) e a membrana peritrófica (seta). **12** – Notar as diferentes constituições do espaço endoperitrófico (ed) e ectoperitrófico (ec). be – bordo estriado; n – núcleo. Barras de escala indicam 50 μm .

3.5. Assimetria flutuante

Nenhum dos caracteres estudados apresentaram assimetria direcional ou assimetria ligada ao tamanho (Fig. 13 à 18) e todos apresentaram distribuição normal (Fig. 19 à 30).

A AF variou entre os sexos e entre os grupos tratado e controle. Os parâmetros M_1 e perímetro das nervuras M_1 e M_2 não tiveram efeito significativo. A **Tabela 1** mostra os dados referentes à análise de variância entre os efeitos do tratamento e do sexo e de suas interações. Os parâmetros M_2 , R_3 e R_{4+5} mostraram um efeito significativo para o sexo, tendo este último parâmetro, apresentado uma outra diferença significativa no efeito da interação entre sexo e tratamento. O parâmetro M_{3+4} mostrou diferença significativa no grupo tratado.

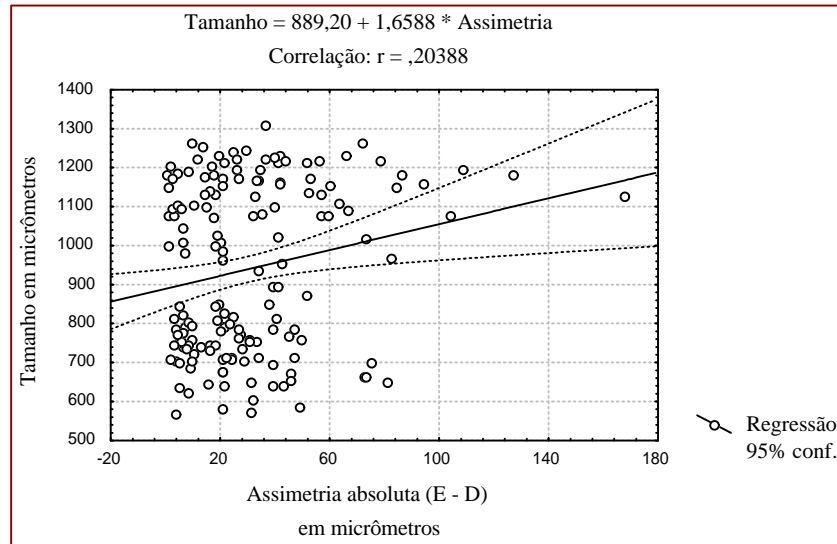


Figura 13. Regressão linear da assimetria absoluta ($|E - D|$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura R_3 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos sobreviventes do grupo controle e tratado, após exposição larval à solução de ivermectina à 1,5 ppb durante um período de 30 minutos.

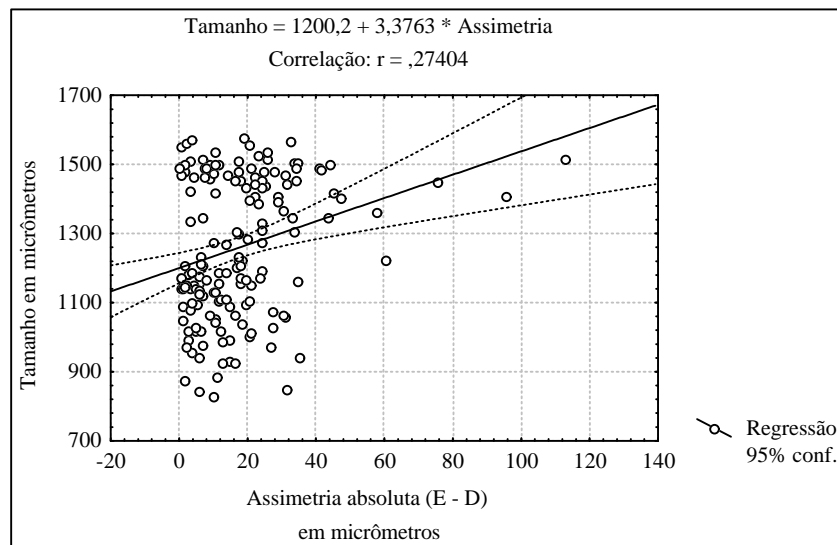


Figura 14. Regressão linear da assimetria absoluta ($|E - D|$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura R_{4+5} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos sobreviventes do grupo controle e tratado, após exposição larval à solução de ivermectina à 1,5 ppb durante um período de 30 minutos.

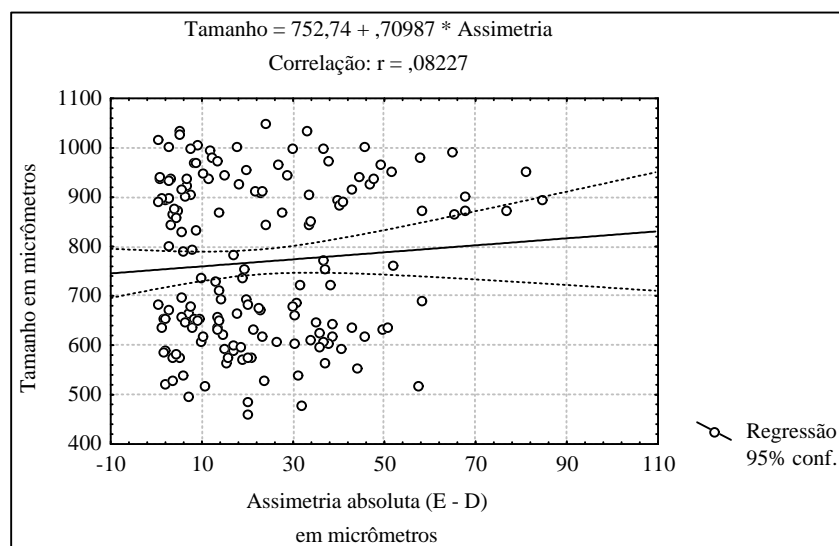


Figura 15. Regressão linear da assimetria absoluta ($|E - D|$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_1 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes dos grupos controle e tratado, após exposição larval à solução de ivermectina à 1,5 ppb durante um período de 30 minutos.

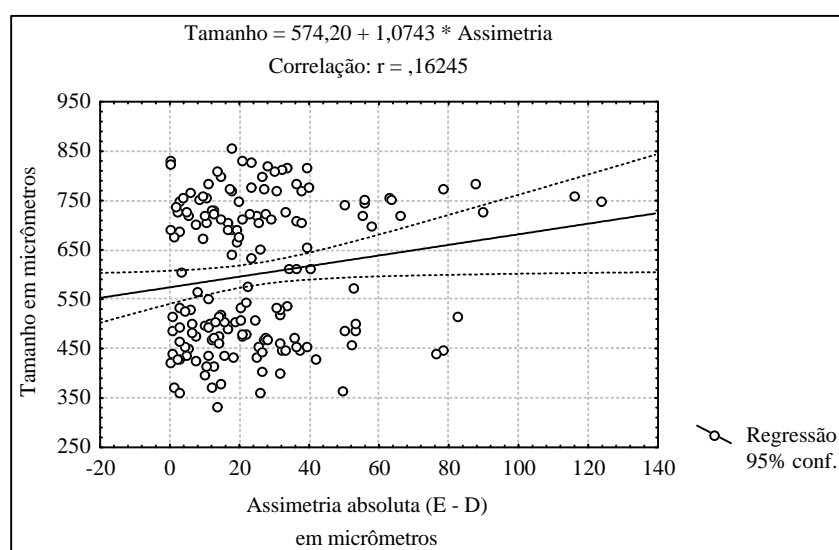


Figura 16. Regressão linear da assimetria absoluta ($|E - D|$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos sobreviventes do grupo controle e tratado, após exposição larval à solução de ivermectina à 1,5 ppb durante um período de 30 minutos.

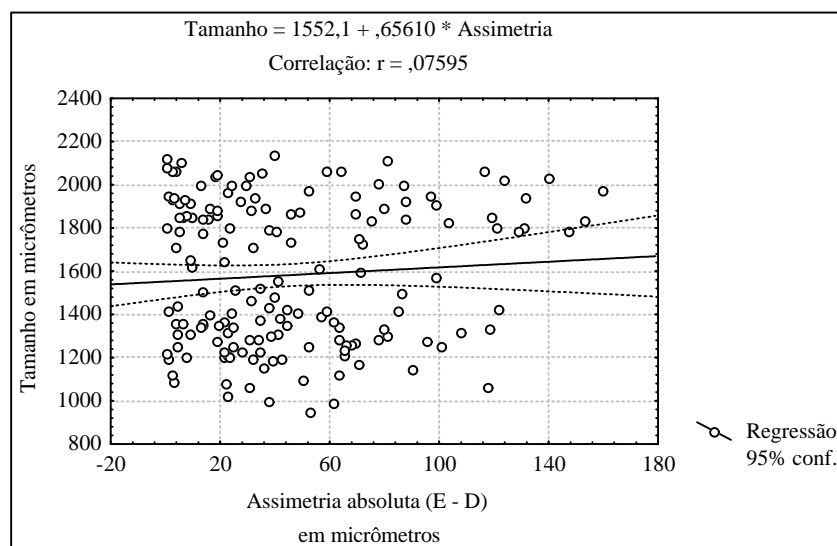


Figura 17. Regressão linear da assimetria absoluta ($|E - D|$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento do perímetro entre as nervuras M_1 e M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos sobreviventes do grupo controle e tratado, após exposição larval à solução de ivermectina à 1,5 ppb durante um período de 30 minutos.

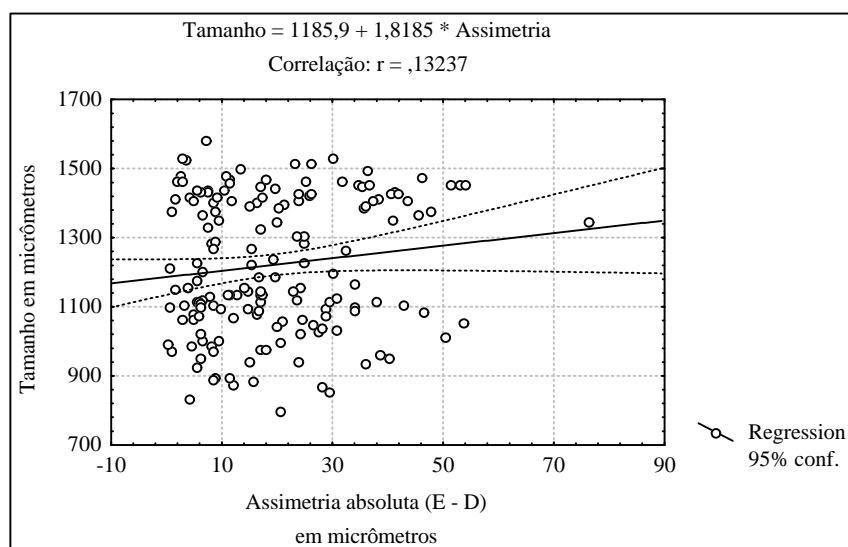


Figura 18. Regressão linear da assimetria absoluta ($|E - D|$) pelo tamanho ($E + D/2$) do comprimento da nervura M_{3+4} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos sobreviventes do grupo controle e tratado, após exposição larval à solução de ivermectina à 1,5 ppb durante um período de 30 minutos.

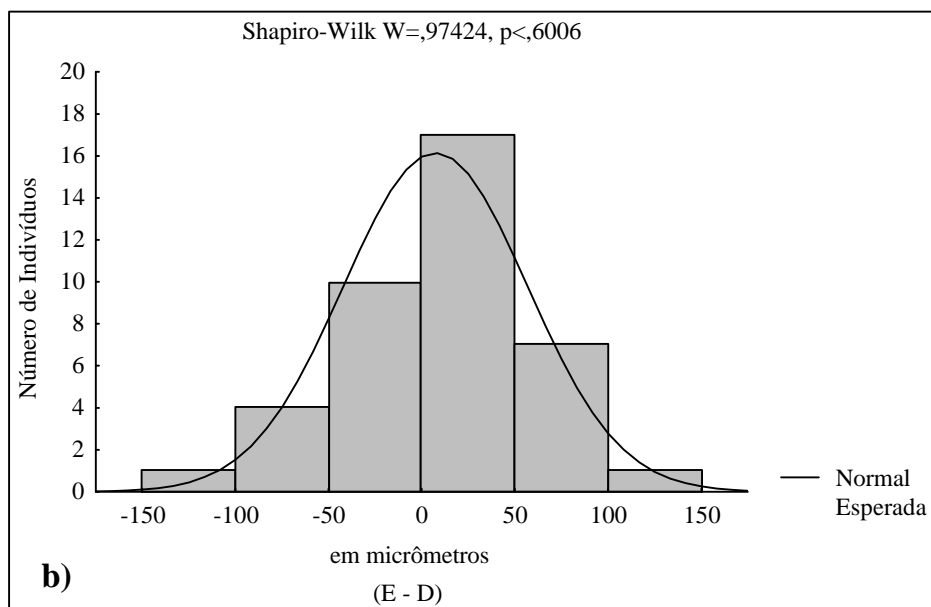
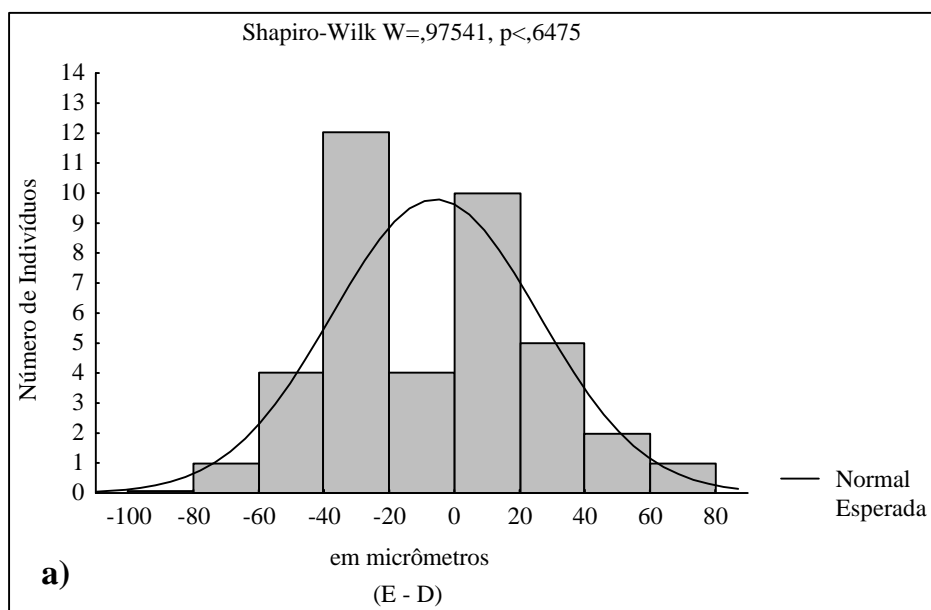


Figura 19. Distribuição da diferença entre o lado esquerdo e o direito (E - D) da nervura R₃ da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes do grupo tratado, após exposição larval à solução de ivermectina na concentração de 1,5 ppb durante um período de 30 minutos. **a)** macho; **b)** fêmea.

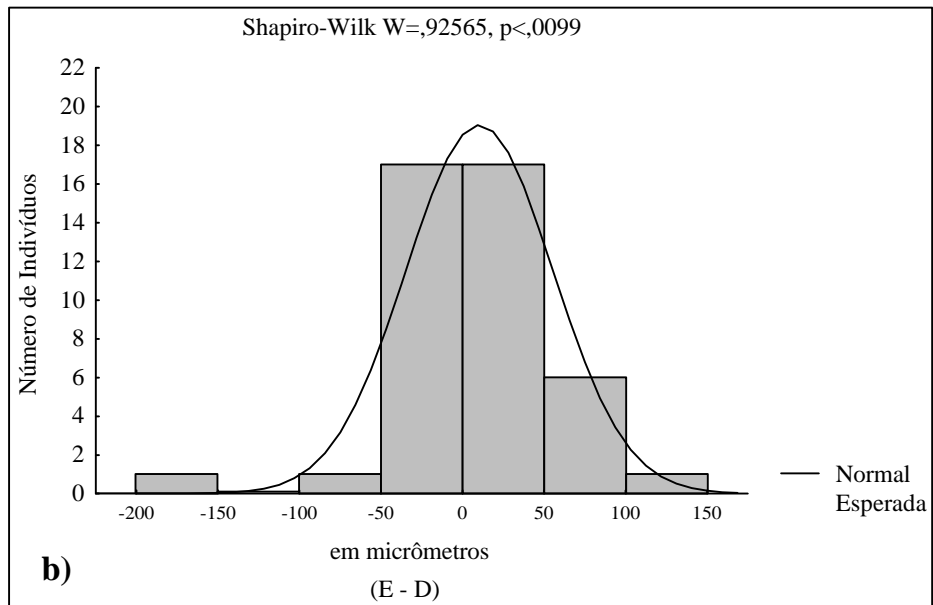
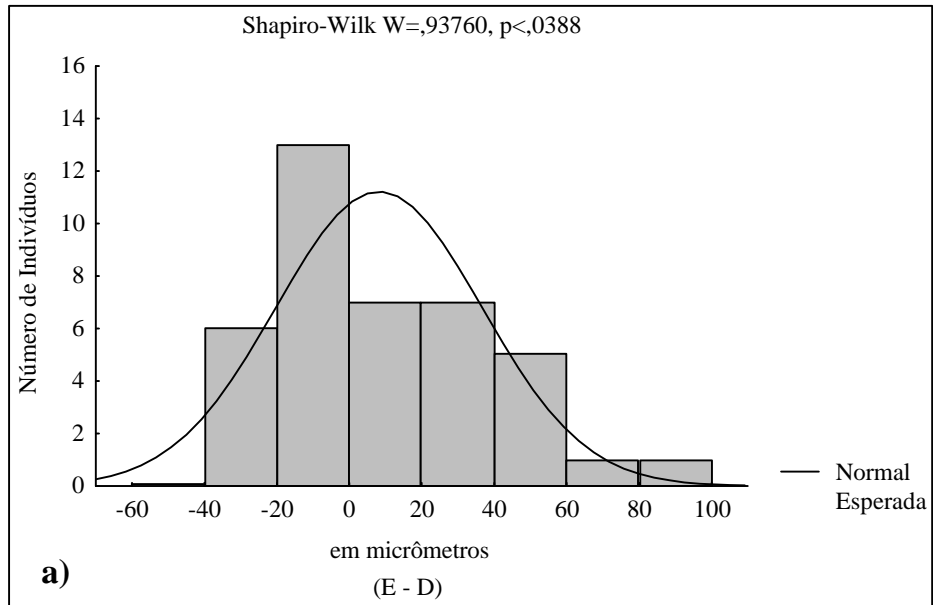


Figura 20. Distribuição da diferença entre o lado esquerdo e o direito (E - D) da nervura R_3 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes do grupo controle. **a)** macho; **b)** fêmea.

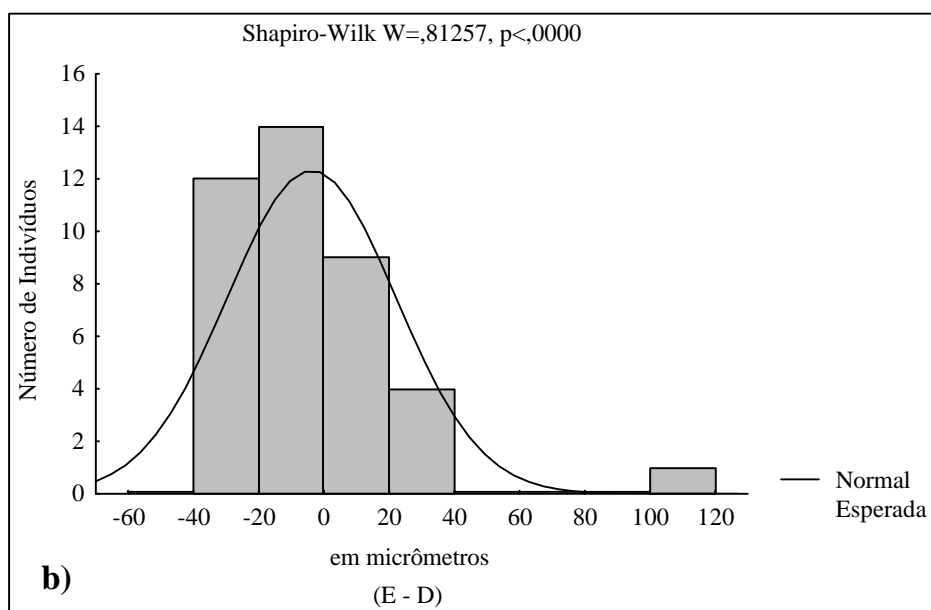
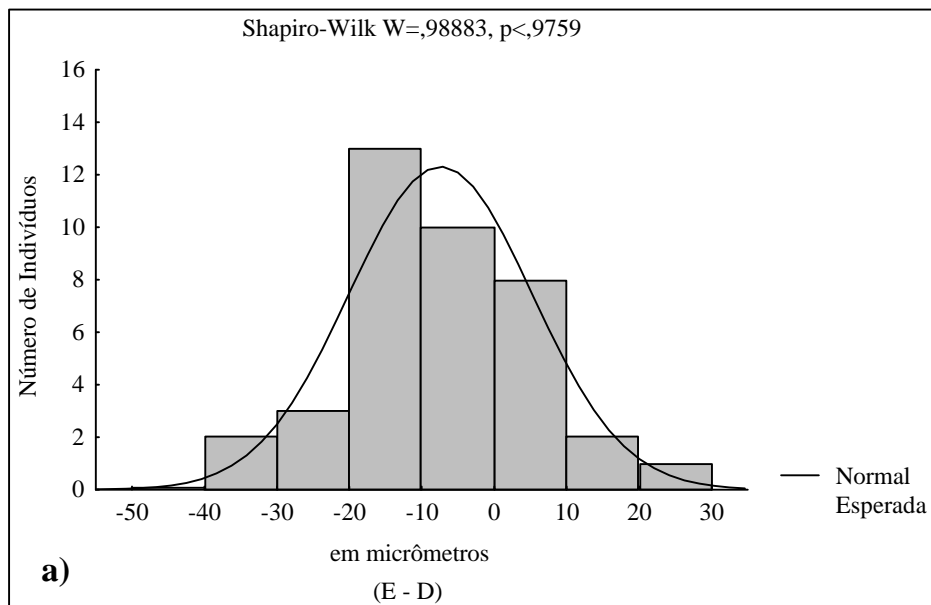


Figura 21. Distribuição da diferença entre o lado esquerdo e o direito (E - D) da nervura R_{4+5} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes do grupo tratado, após exposição larval à solução de ivermectina na concentração de 1,5 ppb durante um período de 30 minutos. **a)** macho; **b)** fêmea.

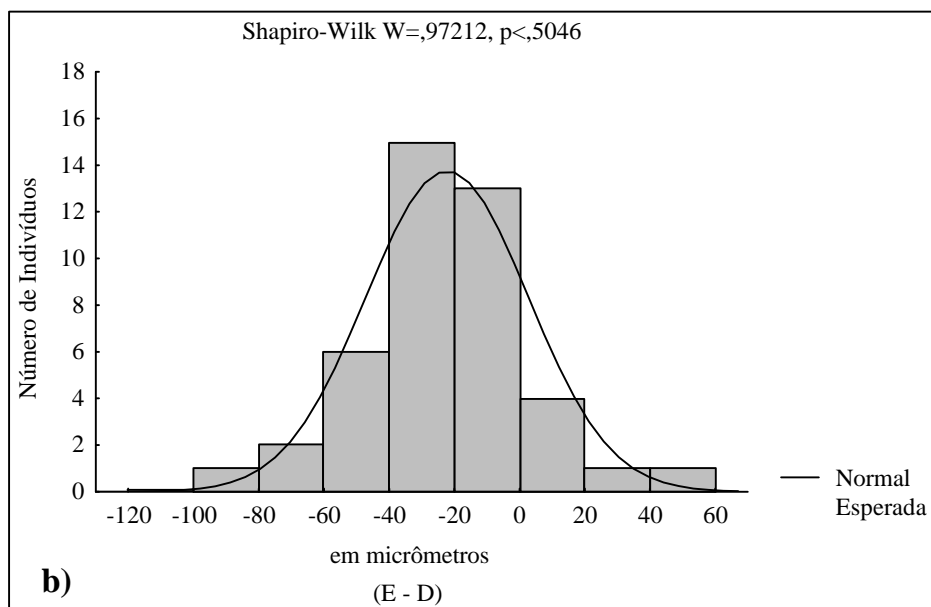
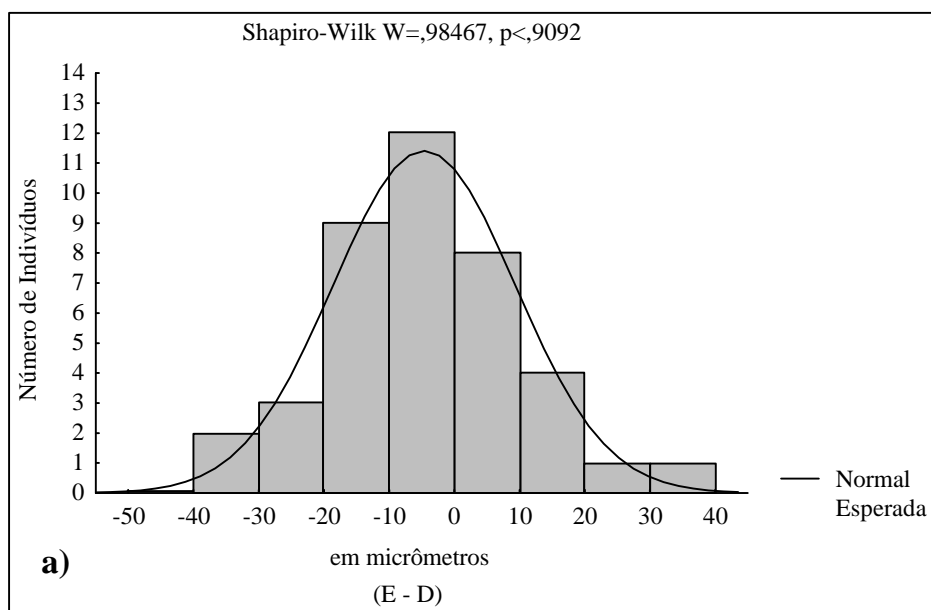


Figura 22. Distribuição da diferença entre o lado esquerdo e o direito (E - D) da nervura R_{4+5} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes do grupo controle. **a)** macho; **b)** fêmea.

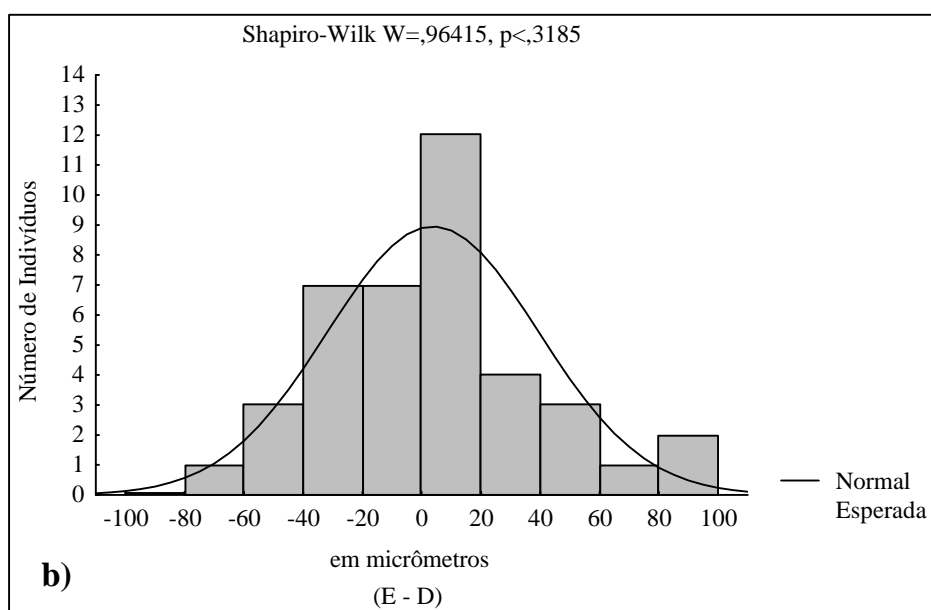
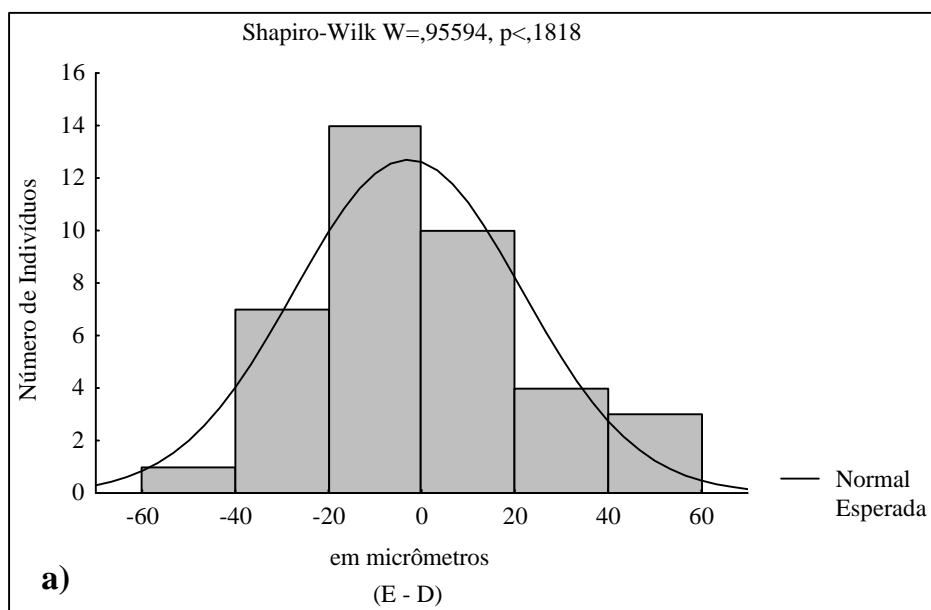


Figura 23. Distribuição da diferença entre o lado esquerdo e o direito (E - D) da nervura M_1 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes do grupo tratado, após exposição larval à solução de ivermectina na concentração de 1,5 ppb durante um período de 30 minutos. **a)** macho; **b)** fêmea.

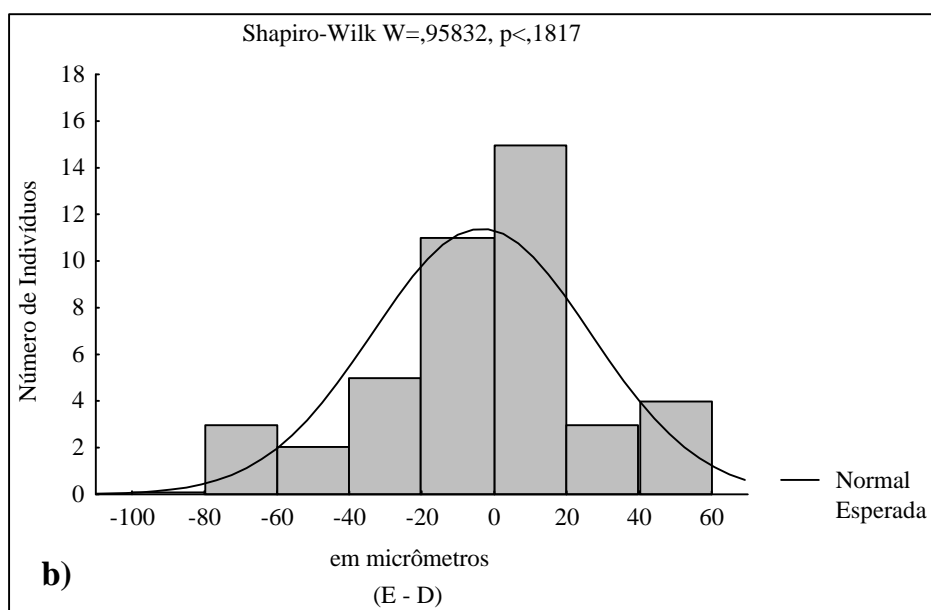
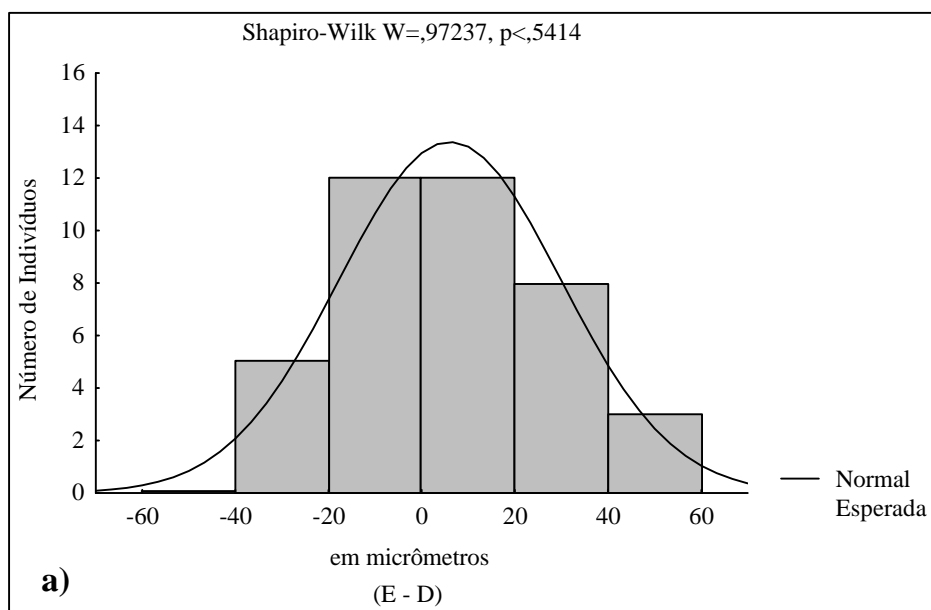


Figura 24. Distribuição da diferença entre o lado esquerdo e o direito (IE - DI) da nervura M_1 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes do grupo controle. **a)** macho; **b)** fêmea.

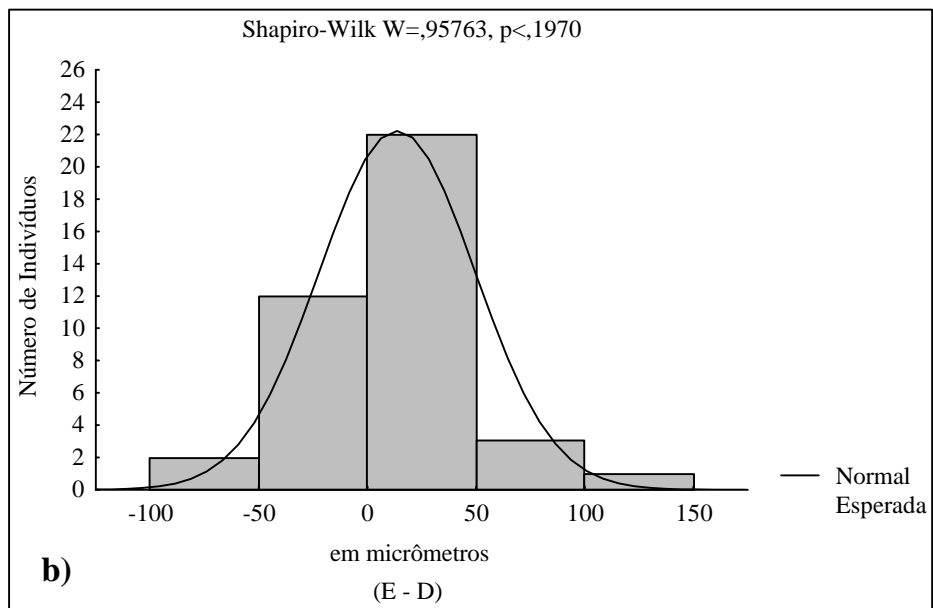
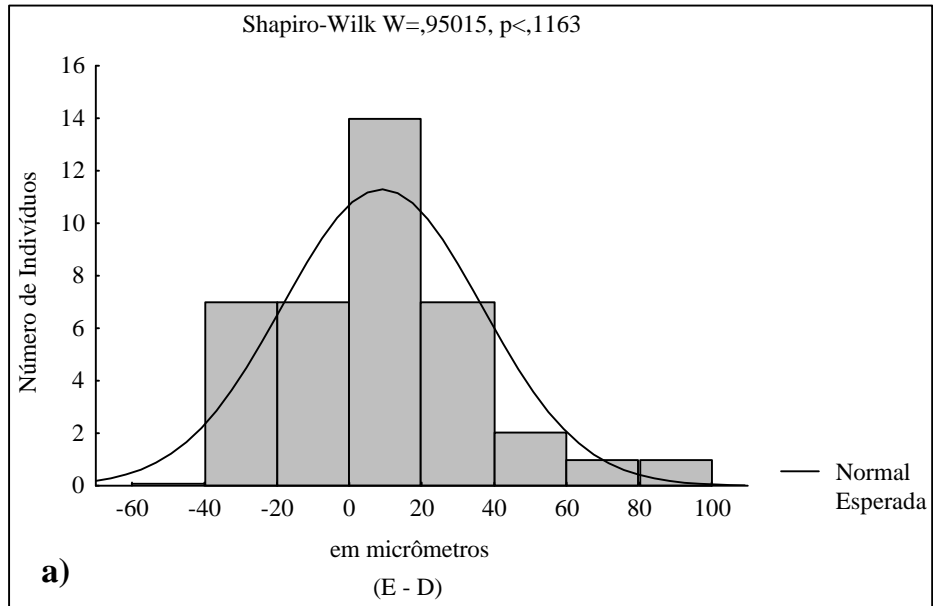


Figura 25. Distribuição da diferença entre o lado esquerdo e o direito (E - D) da nervura M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes do grupo tratado, após exposição larval à solução de ivermectina na concentração de 1,5 ppb durante um período de 30 minutos. **a)** macho; **b)** fêmea.

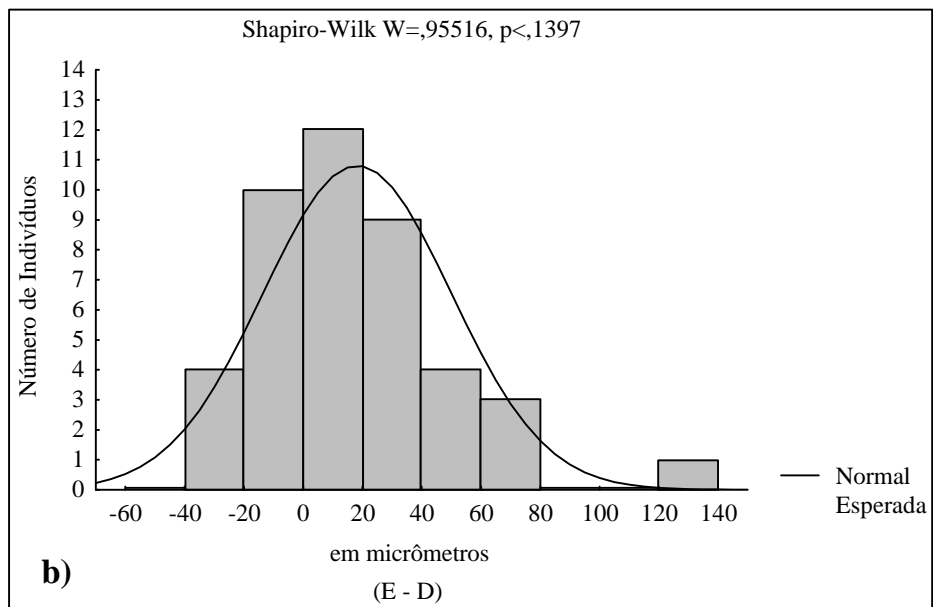
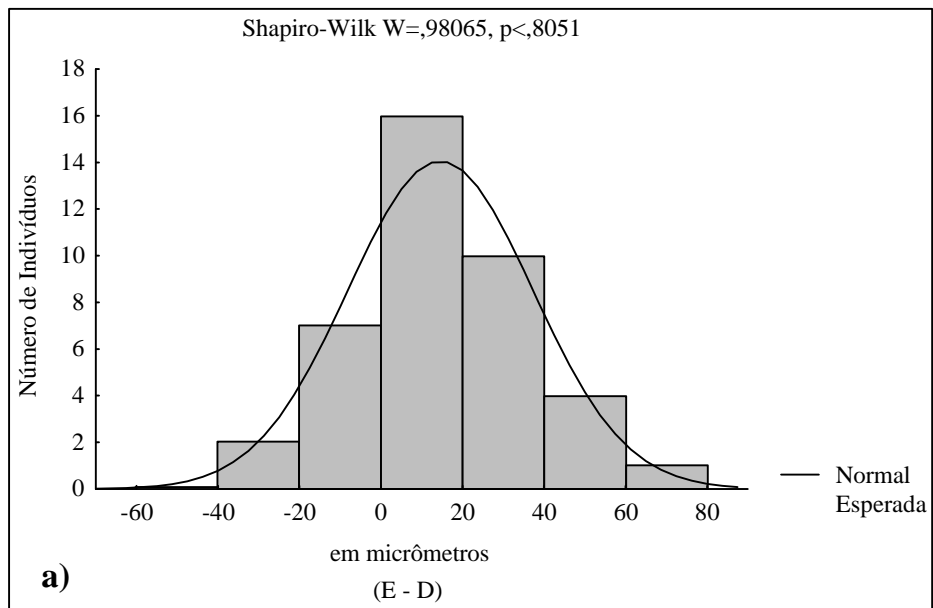


Figura 26. Distribuição da diferença entre o lado esquerdo e o direito (E - D) da nervura M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes do grupo controle. **a)** macho; **b)** fêmea.

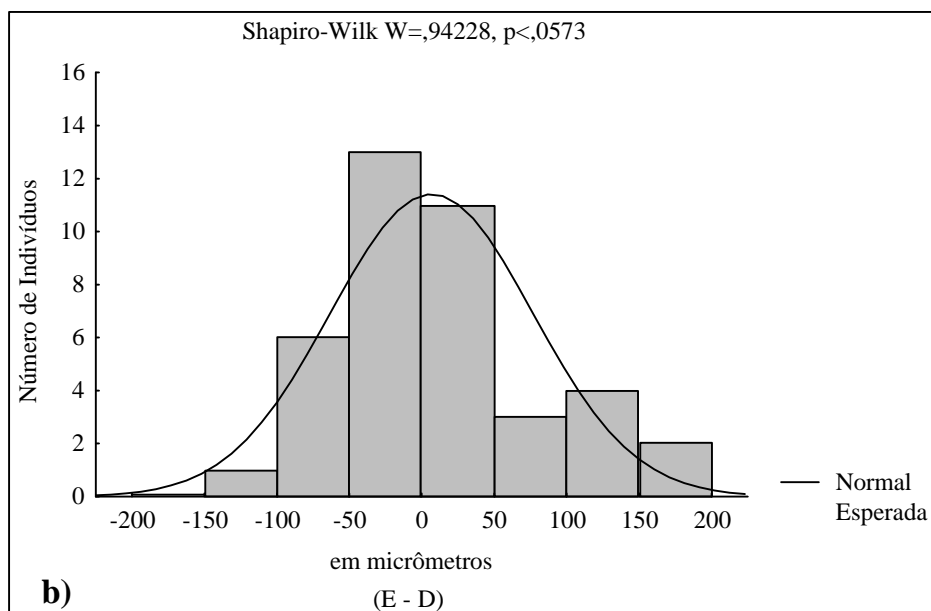
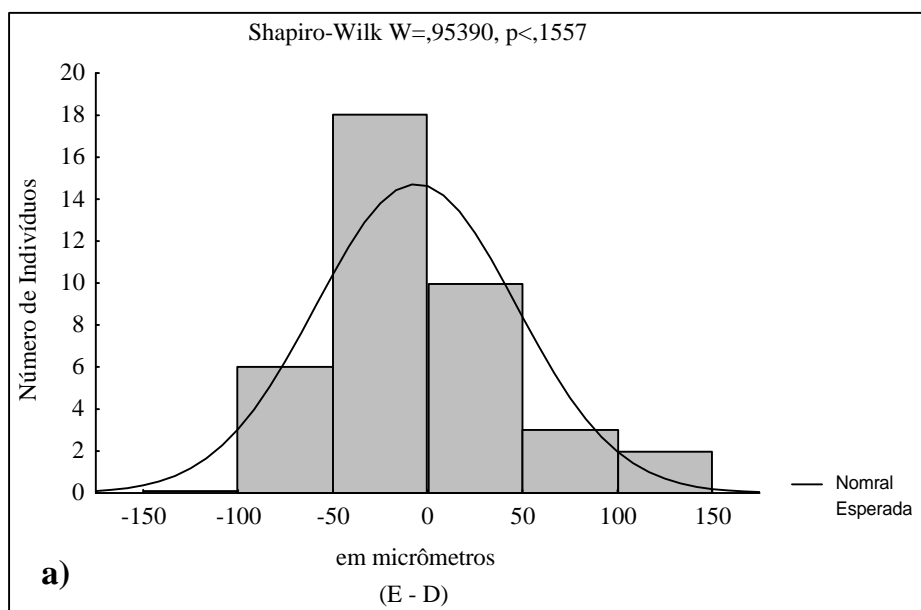


Figura 27. Distribuição da diferença entre o lado esquerdo e o direito (IE - DI) do perímetro das nervuras M_1 e M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes do grupo tratado, após exposição larval à solução de ivermectina na concentração de 1,5 ppb durante um período de 30 minutos. **a)** macho; **b)** fêmea.

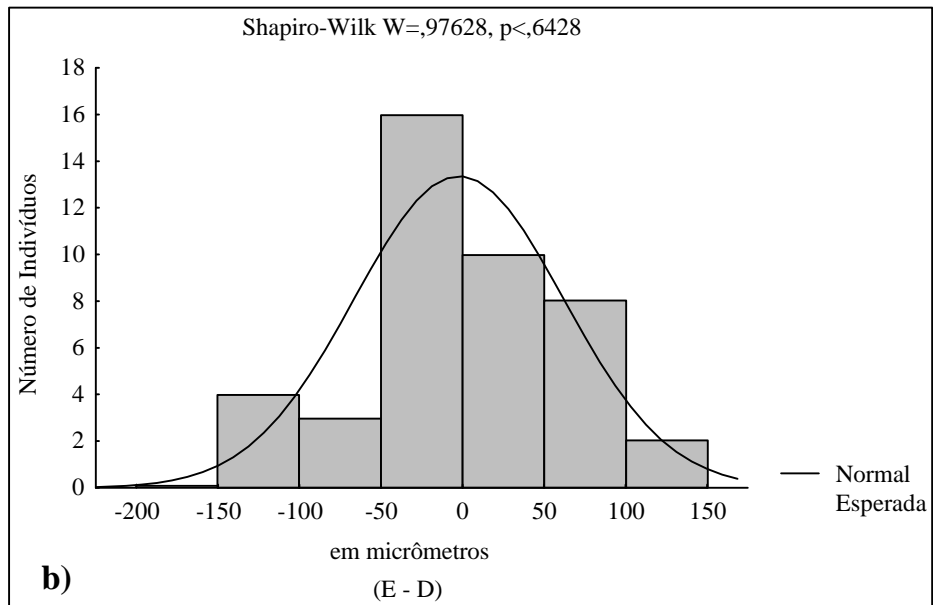
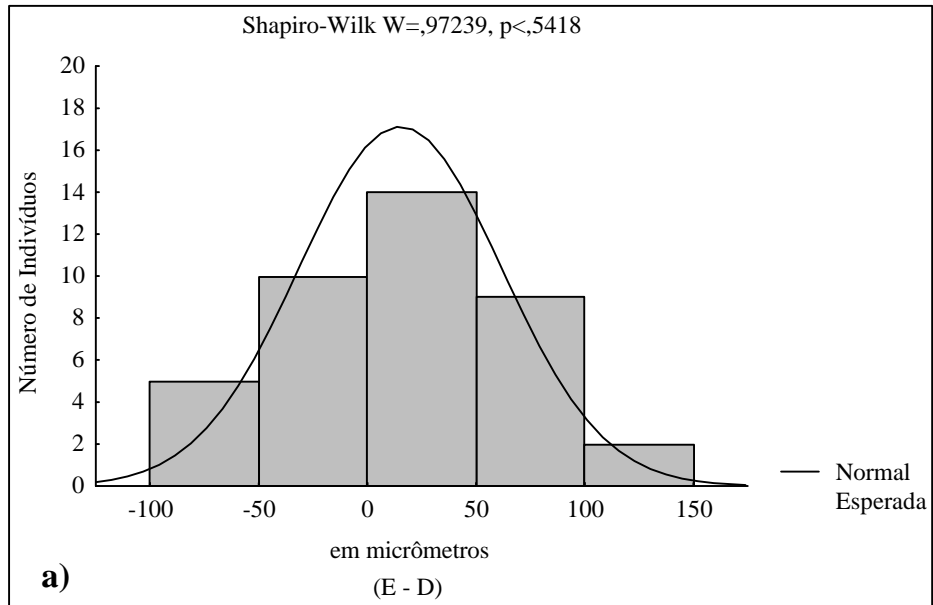


Figura 28. Distribuição da diferença entre o lado esquerdo e o direito (IE - DI) do perímetro das nervuras M_1 e M_2 da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes do grupo controle. **a)** macho; **b)** fêmea.

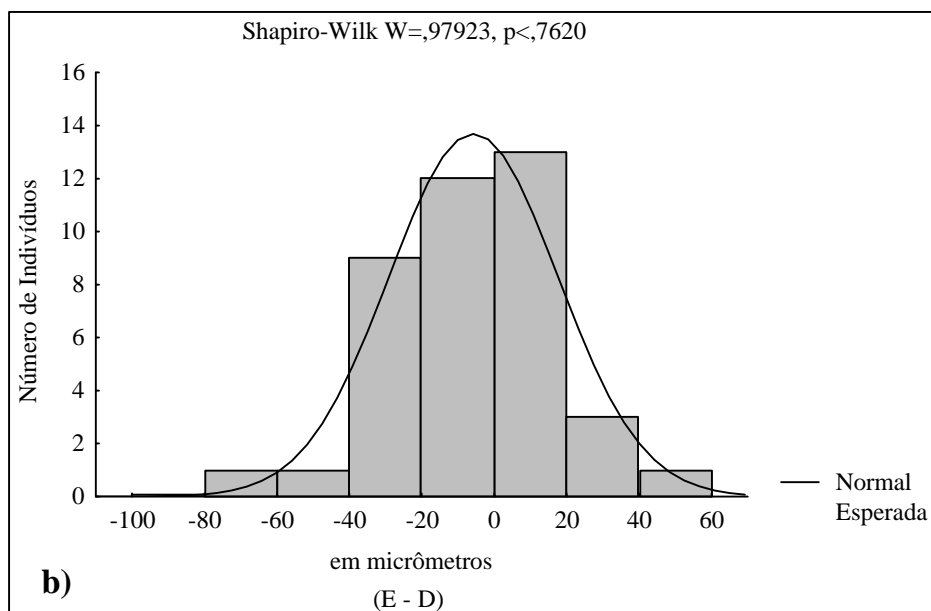
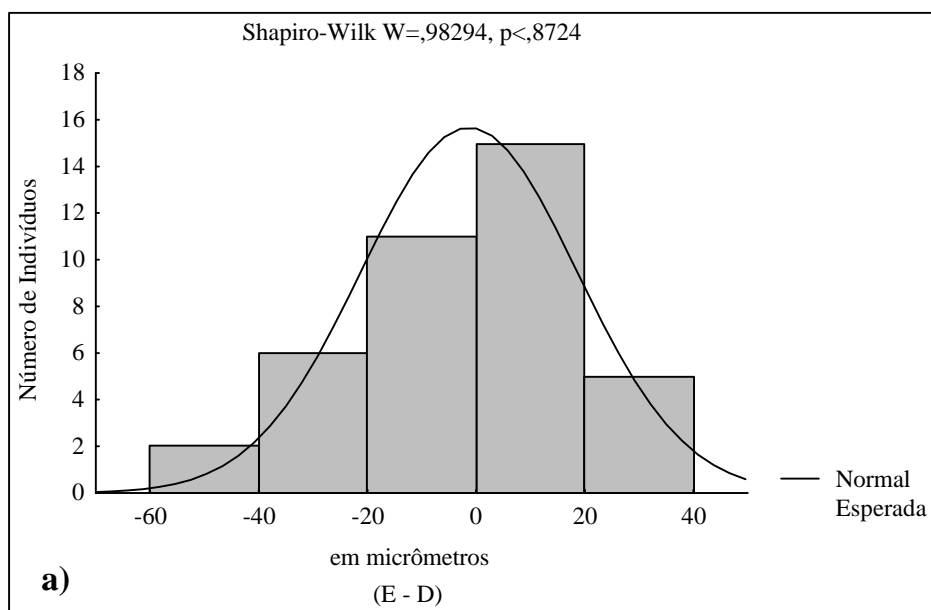


Figura 29. Distribuição da diferença entre o lado esquerdo e o direito (E - D) da nervura M_{3+4} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes do grupo tratado, após exposição larval à solução de ivermectina na concentração de 1,5 ppb durante um período de 30 minutos. **a)** macho; **b)** fêmea.

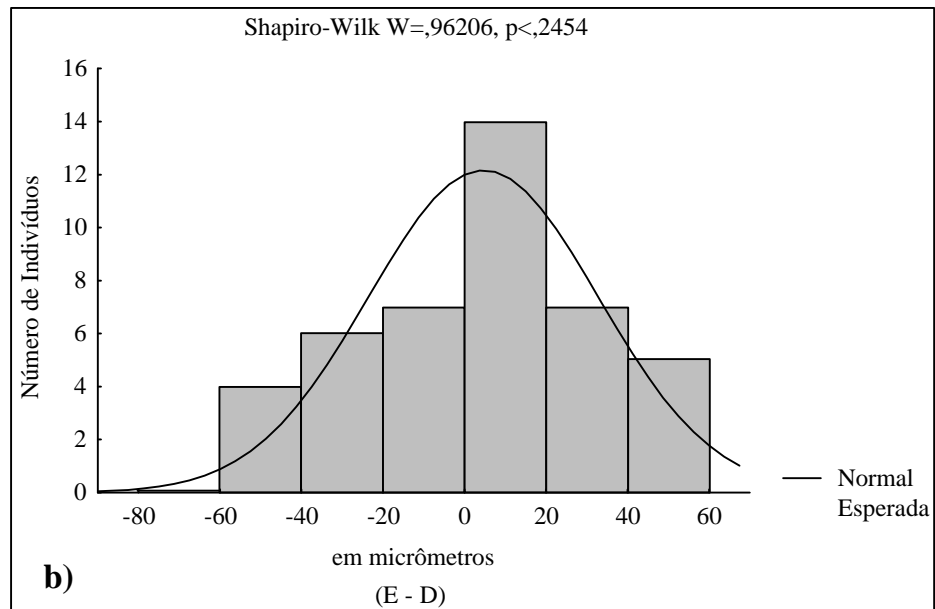
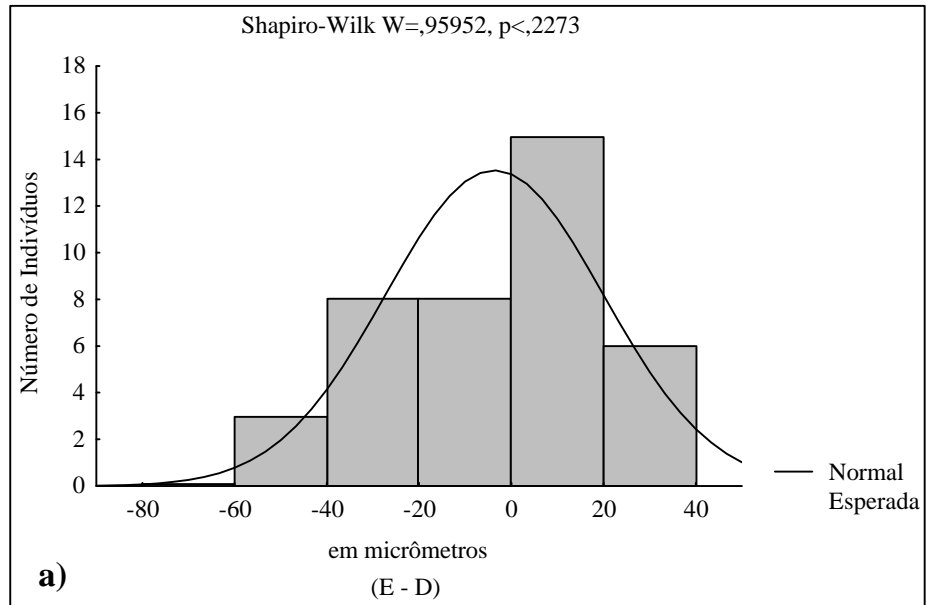


Figura 30. Distribuição da diferença entre o lado esquerdo e o direito (E - D) da nervura M_{3+4} da asa de *Culex quinquefasciatus* dos adultos sobreviventes do grupo controle. **a)** macho; **b)** fêmea.

3.5.1 Efeito da assimetria flutuante sobre o sexo

A AF variou entre os parâmetros e mostrou que as nervuras M_2 , R_3 e R_{4+5} apresentaram maior assimetria absoluta nas fêmeas, independente do grupo controle ou tratado, como mostrado na Figura 31 a, b, c.

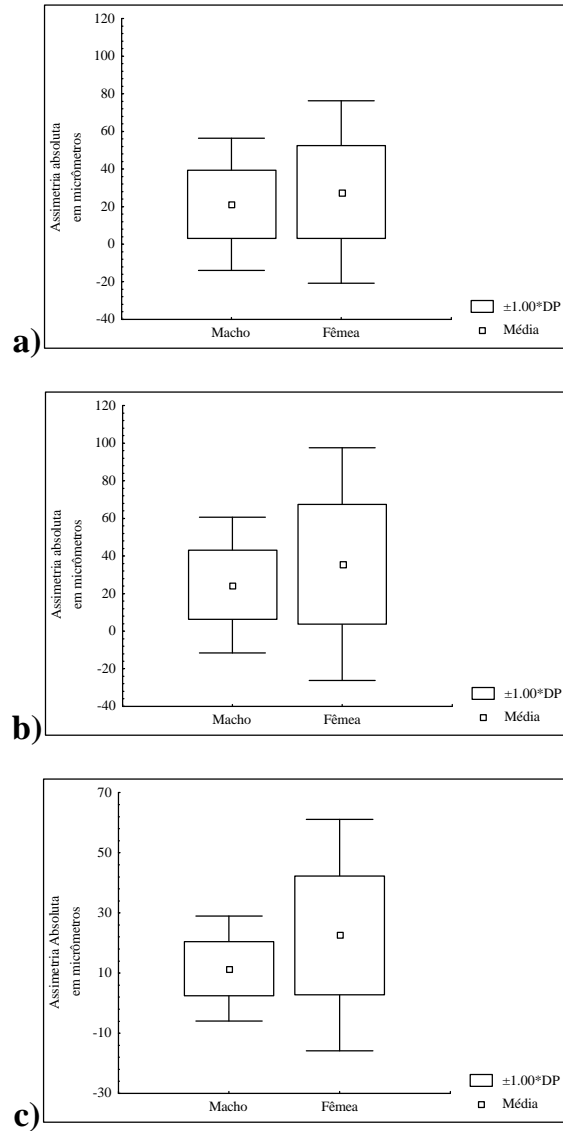


Figura 31: Assimetria absoluta das nervuras das asas de *Culex quinquefasciatus* tendo o sexo como efeito principal. **a)** Nervura M_2 com $p < 0,057$ e $F(1,158) = 3,68$; **b)** Nervura R_3 com $p < 0,007$ e $F(1,158) = 7,51$; **c)** Nervura R_{4+5} com $p < 0,001$ e $F(1,158) = 21,12$

3.5.2. Efeito da assimetria flutuante sobre o tratamento

A figura 32 mostra uma maior assimetria no grupo controle para o parâmetro M_{3+4} , independente do sexo, com $p < 0,042$ e $F(1,158) = 4,22$.

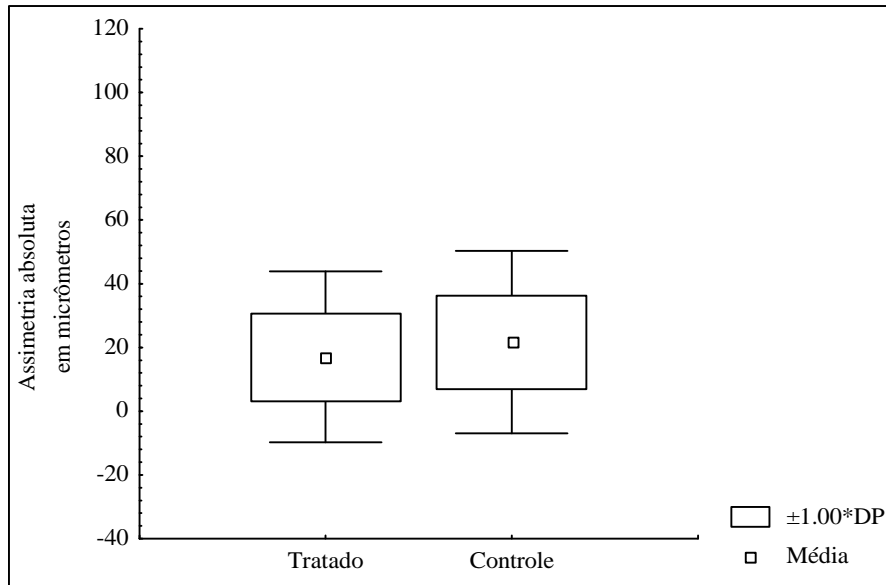


Figura 32: Assimetria absoluta na nervura M_{3+4} das asas de *Culex quinquefasciatus*, tendo o tratamento como efeito principal para as larvas expostas à solução de 1,5 ppb de ivermectina por 30 minutos.

3.5.3. Efeito da assimetria flutuante sobre a interação

Houve uma interação significativa entre os efeitos do tratamento e sexo para a nervura R_{4+5} da asa com $p < 0,052$ e $F(1,158) = 3,81$. (Figura 33)

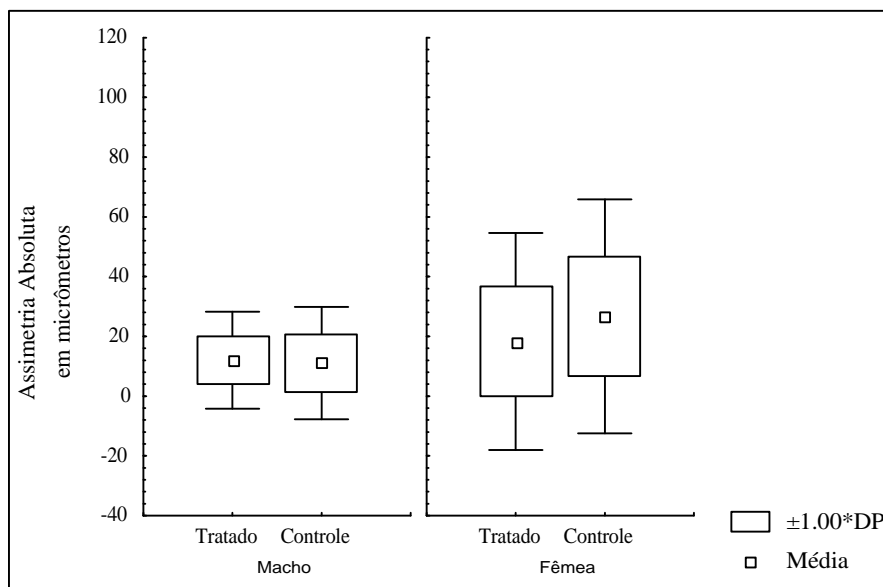


Figura 33: Interação entre tratamento, de exposição de larvas de *Culex quinquefasciatus* à solução de 1,5 ppb de ivermectina por 30 minutos, e sexo da assimetria absoluta do comprimento da nervura R_{4+5} .

4. DISCUSSÃO

Existem relatos discutindo a ligação da ivermectina a receptores específicos do GABA. Nesta situação, a droga aumenta a possibilidade do GABA_A, um receptor específico, em ativar canais de Cl⁻ de membranas pré-sinápticas. Isso leva a condução de um influxo de íons cloro e hiperpolarização irreversível com conseqüente inibição de sinais de transmissão (CAMPBELL, 1985; TURNER & SCHAEFFER, 1989). A ivermectina também pode se ligar diretamente a outros canais iônicos específicos seguindo um desarranjo do balanço elétrico. Entretanto, a ação da ivermectina pode estar associada com a liberação de neurotransmissores em conjunção com o antagonista GABA, provavelmente contribuindo para sinais excitatórios de intoxicação (TURNER & SCHAEFFER, 1989; BLOOMQUIST, 1996). No presente estudo, larvas de *Culex quinquefasciatus* expostas à solução de 1,5 ppb de ivermectina, um dos análogos da abamectina, apresentaram ataxia, seguida de 73,38% de mortalidade, o que pode indicar uma ligação deste inseticida aos receptores GABA com conseqüente ação letal da solução de ivermectina aos mosquitos *C. quinquefasciatus*, confirmando os resultados de FREITAS *et al.* (1996).

A ivermectina em contato com as larvas de *C. quinquefasciatus* pode estar atuando também na membrana peritrófica (MP). A MP, acelular e quitinosa, separa o conteúdo intestinal do epitélio intestinal secretor/absortivo (RICHARDS

& RICHARDS, 1977; VOLKMANN & PETERS, 1989; PETERS, 1992; JACOBS-LORENA & OO, 1996; LEHANE, 1997; TELLAM *et al.* 1999), sendo a principal junção entre o alimento e o epitélio intestinal nos insetos. Os mosquitos possuem dois tipos de MP de acordo com seu modo de formação: tipo I e II (WIGGLESWORTH, 1930). Em larvas de mosquitos há a produção do tipo II, enquanto nas fêmeas adultas há a produção do tipo I (STAMM *et al.*, 1978; TELLAM, 1996).

A MP pode proteger o epitélio intestinal de danos mecânicos e contra patógenos, toxinas e outros danos químicos. Ela age como uma membrana semipermeável, regulando a passagem de moléculas entre os diferentes compartimentos do intestino, podendo repartir o lúmen intestinal em diferentes partes fisiológicas (LEHANE, 1997). A perda da MP é resultante do desdobramento de suas estruturas protéicas e do distúrbio da interação proteína-proteína para a manutenção da integridade desta membrana (EDWARDS & JACOBS-LORENA, 2000).

Larvas de *Aedes aegypti* de linhagens resistentes e susceptíveis ao DDT somente excretaram uma MP visível, quando tratadas com DDT, usando esta, como veículo de excreção do DDT (ABEDI & BROWN, 1961). GALLI-VALERIO & ROCHAZ (1906), mostraram que as linhagens resistentes ao DDT, produziram 9 vezes mais MP que a linhagem susceptível, e a MP da linhagem resistente eliminou cerca de 5 a 15 vezes mais DDT que a linhagem susceptível. MAHMOOD *et al.* (1991) observou que em fêmeas adultas de *A. aegypti*, tratadas com sangue contendo ivermectina, apresentaram uma MP mais fina quando comparada ao grupo controle. Segundo CALCOTT & FATIG III (1984), as avermectinas podem inibir a síntese de quitina.

De fato a ivermectina poderia estar atuando na formação de quitina [poly β -(1,4)-N-acetyl-D-glucosamine] através da via glicolítica, tornando-a mais delgada e mais fácil para infecções bacterianas ou então impedindo a produção de defensina que é um peptídeo de cerca de 38 aminoácidos incluindo algumas cisteínas com propriedades antibacterianas.

Por outro lado, Lecitinas de algumas espécies de mosquitos têm implicações na aglutinação de células e inibe a proliferação de patógenos no intestino médio. Pode ser que a ivermectina possa estar atuando na parte catódica de proteínas associadas à MP. Entretanto, nos cortes histológicos, com as colorações testadas, não foram observadas modificações e nem danos à MP, o que somente em estudos posteriores com a utilização de outras técnicas histológicas possa mostrar com maior clareza.

Mudanças no pH ou em concentrações iônicas ao longo do intestino, ou durante o ciclo digestivo, causam mudanças frequentes na densidade e nas formas moleculares de proteoglicanos da MP. Isto afeta as características de filtração da MP, as quais o inseto poderá usar para propósitos fisiológicos (LEHANE, 1976). Desta forma, a ivermectina pode estar causando uma mudança do pH no intestino larval, o que provocaria uma filtração do fármaco pela MP para a cavidade corporal, podendo causar uma hiperpolarização nas membranas do corpo gorduroso nas larvas de *C. quinquefasciatus*, fazendo com que as gotas de lipídios do corpo gorduroso se tornassem menores. Em larvas bem nutridas de mosquitos, as células do corpo gorduroso contém gotas de lipídios, glicogênio e proteínas (WIGGLESWORTH, 1942; 1987).

O aparecimento dessas gotas de lipídios menores no corpo gorduroso pode ter sido provocado também pelo estresse larval quando exposto à solução de ivermectina, mostrando um sinal claro da mobilização desta reserva para a produção de energia para uma possível metabolização do fármaco, já que a resistência de algumas linhagens de larvas de dípteros à inseticidas tem sido propostas pela ação de enzimas destoxicantes (GEORGHIEU & PASTEUR, 1978; KAO *et al.*, 1984).

KOGAN & HAGEDORN (2000), observaram que a síntese de poliaminas é um dos primeiros eventos da formação do vitelo em *A. aegypti*. Quando a síntese de poliaminas sofre diminuição induzida experimentalmente, há redução nos níveis de ácidos nucléicos e proteínas, causando um desenvolvimento ovariano anormal. Entretanto quando há inibição da síntese, ocorre uma diminuição da enzima digestiva tripsina (KOGAN & HAGEDORN, 2000).

A vitelina, maior proteína do vitelo, deriva de uma outra proteína, a vitelogenina (Vg), cuja expressão mostra o desenvolvimento sexual, hormonal e a especificidade do tecido. A síntese de Vg ocorre em um curto período de tempo, envolvendo extensiva remodelagem citológica do corpo gorduroso e ovário (VALLE, 1993). Segundo CLEMENTS (1996), algum aumento no tamanho celular ocorre com o acúmulo de lipídios e glicogênio, e o englobamento de proteínas está associado com um aumento considerável no volume das células do corpo gorduroso. Desta forma, a possível liberação de energia para a metabolização do inseticida, pode ter levado o adulto a diminuir o número de posturas, já que durante a vitelogênese as células do corpo gorduroso sofrem mudanças, passando de células armazenadoras de lipídios e glicogênio para células com uma excessiva síntese de proteínas (RAIKHEL & LEA, 1983, 1987).

TESH & GUSMAN (1990) relataram que a ingestão de sangue contendo doses sub-letais de ivermectina causaram diminuição na produção de ovos e redução na eclosão larval de mosquitos, entre eles o *C. quinquefasciatus*. MAHMOOD *et al.* (1991), mostraram que fêmeas de *A. aegypti* quando ingeriram sangue contendo ivermectina, apresentaram pouco ou nenhum depósito de vitelo nos folículos ovarianos.

Com concentrações sub-letais de ivermectina no sangue de vertebrados, mosquitos sobrevivem, mas há uma redução marcada no número e viabilidade dos ovos deles. Esta infertilidade é temporária, porém, em gerações subsequentes dos insetos poderíamos obter resultado na produção de números normais de ovos férteis. Segundo NASR *et al.* (1996) o nível de ivermectina que produz 76% dos ovos inférteis em *C. pipiens*, após 3 dias de ingestão de sangue com ivermectina, é de 0,4 mg/kg. Esta concentração está dentro do achado em sangue de humanos e animais domésticos, sugerindo que o uso difundido de ivermectina como medicamento veterinário e humano possa ter um efeito residual em populações de mosquitos.

No presente estudo, as larvas de *C. quinquefasciatus* sobreviventes à exposição da solução de 1,5 ppb de ivermectina, originaram adultos num período

de 3 dias em média, não demonstrando um atraso no desenvolvimento quando comparado ao grupo controle, o que sugere a existência de larvas mais resistentes à dose usada. Entretanto, estes adultos, assim como o grupo controle, fizeram postura de ovos quase que simultaneamente, com diferença apenas de um dia. Mas, os resultados mostraram redução no número de posturas das fêmeas tratadas, o que pode sugerir que a ivermectina possa estar afetando a síntese de poliaminas e/ou a vitelogênese em *C. quinquefasciatus*. Além disso, a ivermectina também pode estar afetando o nível de energia armazenada naquelas larvas expostas à solução da droga, com uma possível atuação no corpo gorduroso. Segundo CHAPMAN (1998), este órgão armazena lipídios e proteínas como fonte de energia e como fonte de produção de vitelogenina, proteína importante para a formação do vitelo nos ovos.

O prejuízo no corpo gorduroso causado nas larvas expostas ao inseticida, pode causar um dano também no sistema de defesa no adulto, já que a síntese de proteínas deste órgão é necessária para a produção das células de defesa, como os hemócitos (CLEMENTS, 1996). Algo semelhante parece ter acontecido neste estudo, uma vez que com frequência, foi observada a proliferação de bactérias na cavidade do corpo das larvas, o que sugere uma deficiência das células de defesa destes insetos. Estudos metabólicos do corpo gorduroso poderão indicar se o sistema enzimático está sendo afetado (STRONG & BROWN, 1987), principalmente no corpo gorduroso de larvas, já que segundo TIMMERMANN & BRIEGEL (1999), a maior síntese de lipídios e proteínas acontece no quarto ínstar larval de mosquitos.

O desenvolvimento das gerações F1 do grupo tratado e controle condiz com os resultados de VIANNA *et al.* (1996b), que mostraram uma variação do ciclo aquático entre 8 e 48 dias inversamente proporcional às temperaturas de 6,7°C e 29°C. No entanto, no grupo tratado, essas gerações adiantaram, em média, 2 dias o seu desenvolvimento de ovo a adulto. Esses resultados evidenciam que o período do ciclo aquático desta espécie pode estar sendo influenciado tanto pela temperatura ambiente quanto pela exposição da geração parental à solução de ivermectina, o que pode sugerir que haja uma alocação de

energia maior para o rápido desenvolvimento larval e pupal, no sentido de evitar um possível estresse no meio ambiente.

O ambiente (poluentes, parasitas, baixa oferta alimentar) juntamente com a genética dos indivíduos (elevado endocruzamento, baixa taxa de heterozigose ou hibridação) são dos dois pontos de distúrbios que podem elevar o nível de AF em um caráter

A AF reflete então a habilidade de um organismo em desenvolver caracteres com precisão, enfrentando alterações genéticas ou ambientais. Esta habilidade varia consideravelmente entre indivíduos de uma mesma população (SOULÉ, 1967; WATSON & THORNHILL, 1994). No presente estudo, a geração parental de *C. quinquefasciatus*, a qual foi submetida a um estresse pela ivermectina, mostrou pequenos distúrbios na sua perfeita simetria.

Elevados níveis de AF foram detectados em populações que vinham sofrendo estresse genético ou ambiental (SOULÉ, 1967; PARSONS, 1990; SARRE & DEARN, 1991; MØLLER, 1995; WAUTERS *et al.* 1996). Baixas taxas de heterozigose promovem um decréscimo na homeostase (SOULÉ, 1979; PARSONS, 1990; HUTCHISON & CHEVERUD, 1995; SHERRY & LORD, 1996) e elevados níveis de alterações morfológicas e de AF foram observados em casos em que a heterozigose foi diminuída (WAYNE *et al.* 1986; CLARKE, 1992; HUTCHISON & CHEVERUD, 1995). A qualidade fenotípica é muito importante para a evolução, definida como habilidade esperada de um indivíduo para o sucesso na vida (POLAK & TRIVERS, 1994).

A simetria é útil na variedade do contexto, além da escolha do parceiro; por exemplo, na alocação de recursos para a prole (THORNHILL & GANGESTAD, 1993). Da mesma forma, organismos são esperados a valorizarem a qualidade fenotípica em seus parceiros. O presente estudo não avaliou a integridade genética das populações analisadas, não sendo possível determinar em que nível o estresse genético influenciou a AF nas larvas submetidas à solução de ivermectina. Porém, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, é sugestivo que as fêmeas utilizem a AF em ornamentos, ou caracteres sexuais secundários, como indicador de qualidade

fenotípico dos parceiros, preferindo machos com caracteres simétricos para o acasalamento. Indivíduos mais assimétricos obteriam menor sucesso reprodutivo (MØLLER, 1993; MØLLER & ERIKSON, 1995).

As nervuras do mosquito que apresentaram uma significância para a AF, mostraram alguns efeitos sobre o sexo ou sobre o tratamento ou sobre a interação entre ambos os efeitos. Segundo CLARKE (1993) o estresse que causa um aumento na assimetria é biologicamente relevante e este aumento da AF reflete numa diminuição da média da qualidade dos indivíduos numa população. Os dados deste trabalho sugerem que assim, os mecanismos por trás das relações de qualidade e AF são importantes serem examinados.

Variações na AF foram examinadas em várias partes do corpo de vários organismos, incluindo comprimento de asas e nervuras em dípteros (SOULÉ & COUZIN-ROUDY, 1982; KOKKO *et. al.* 1996). Altos níveis de AF e neoformações na venação de moscas *Scatophaga stercoraria* criadas em fezes de bovinos adicionadas de ivermectina, foram encontrados por STRONG & JAMES (1992).

A interação significativa entre os efeitos do tratamento e sexo para a nervura R_{4+5} sugere que outras características da biologia da espécie, além do sexo, possa estar influenciando as alterações na AF em resposta ao tratamento. Seria necessário, entretanto, maior estudo para se conhecer com maior detalhe outras características destes insetos quando expostos à ivermectina, como por exemplo, sua dieta, seu comportamento de acasalamento e outras alterações na estabilidade do desenvolvimento.

Nem todas as nervuras medidas no presente estudo apresentaram o mesmo efeito. A nervura M_1 e o perímetro da M_1 e M_2 não mostraram resultados significativos para a AF. Entretanto é possível que tais nervuras tenham sofrido alterações na assimetria não evidenciadas com a metodologia usada, o que pode sugerir um caráter sexual secundário, ou talvez um erro de medida. Estes erros podem estar ligados à dificuldade de determinar o exato ponto das medidas nas diversas asas examinadas e/ou ao erro de pixelização provocado pelo analisador de imagem no qual foram feitas as medidas.

Outra explicação para os resultados não significativos para a AF das nervuras M_1 e perímetro da $M_1 + M_2$ das asas de *C. quinquefasciatus* pode se basear na hipótese da “mortalidade diferencial” (FLOATE & FOX, 2000). Esta hipótese tem como princípio básico a assimetria medida em um subconjunto da população estudada, isto é, os indivíduos que se tornam adultos. Se a população for submetida a um pequeno aumento no estresse, o nível de assimetria dos indivíduos susceptíveis aumentará, assim como a média da assimetria de toda a população. Se esta mesma população for submetida a um estresse mediano, os indivíduos susceptíveis não alcançariam a idade adulta e conseqüentemente haveria uma diminuição na AF, uma vez que os resistentes, normalmente mais assimétricos na ausência do inseticida, não apresentam um aumento na assimetria se submetidos a inseticidas.

No entanto, somente estudos posteriores com diferentes dosagens, poderiam indicar se as nervuras M_1 e o perímetro da $M_1 + M_2$ estariam sofrendo ou não com a ação da ivermectina.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho permite concluir que, nas condições experimentais descritas:

1. A ivermectina não altera o desenvolvimento do adulto.
2. A ivermectina induz redução no número de postura de ovos.
3. A ivermectina afeta o corpo gorduroso.
4. A assimetria flutuante tem efeito sobre o sexo, tratamento e a interação destes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDI, Z. H. & BROWN, A. W. A. Peritrophic membrane as a vehicle for DDT and DDE excretion in *Aedes aegypti* larvae. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 54, p.539–542, 1961.
- ABERCROMBIE, J. & BERG, C. O. Malacophagous diptera of South America: Biology and immature stages of *Dictyodes dictyodes* (Sciomyzidae). **Rev. Bras. Entomol.**, v. 22, p.23-32, 1978.
- ALDRIDGE, W. N. Insectidias, past, present and future: practice and the understanding of mechanisms. **Ann. occup. Hyg.**, v. 22, 407 – 409, 1979.
- ALVES, S. N., HORTA, M. A. P. & MELO, A. L. Efeito de benzodiazepínico e ivermectina em *Dugesia tigrina* (Plathyhelminthes - Turbellaria). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 21, 1996, Porto Alegre. **Resumos...**, Porto Alegre: p.15, 1996a.
- ALVES, S. N., HORTA, M. A. P., FARIA, M. A. & MELO, A. L. 1996b. Efeito da ivermectina em *Pomacea haustum* e *Physa* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 21, 1996, Porto Alegre. **Resumos...**, Porto Alegre: p.37, 1996b.
- AZIZ, M. A.; DIOP, I. M.; DIALLO, S.; LARIVIERE, M. & PORTA, M. Efficacy and tolerance of ivermectin in human onchocerciasis. **Lancet**, v. 2, p.171-173, 1982.

- BISSET, J. A.; RODRIGUEZ, M. M.; HEMINGWAY, J.; DIAZ, C.; SMALL, G. J. & ORTIZ, E. Malathion and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba: efficacy of pirimiphos-methyl in the presence of at least three resistance mechanisms. **Med. Vet. Entomol.**, v. 5, p.223-228, 1991.
- BORGES, M. A. Z., MELO, A. L. 2000. Effects of ivermectin on carrion-breeding flies. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21, 2000, Foz do Iguacu. **Resumos...**, Foz do Iguacu: p.665, 2000.
- BLOOMQUIST, J.R. Ion channels as targets for insecticides. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 41, p.163-190, 1996.
- BURG, R.; MILLER, B. M.; BAKER, E. E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, S. A.; HARTMAN, R.; KONG, Y. L.; MONAGHAN, R. L.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC, J. B.; WALLIK, H.; STAPLEY, E. O. OIWA, R. & OMURA, S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents, producing organism and fermentation. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 15, p.361-367, 1979.
- CALCOTT, P. H. & FATIG III, R. O. Inhibition of chitin metabolism by avermectin in susceptible organisms. **J. Antibiot.**, v. 32, p.253-259, 1984.
- CAMPBELL, W. C., FISHER, M. H., STAPLEY, E.O., ALBERS-SHÖNBERG, G & JACOB, T. A. Ivermectin: a potent antiparasitic agent. **Science**, v. 221, p.823-828, 1983.
- CAMPBELL, W. C. Ivermectin: na uptdate. **Parasit. today**, v. 1, p.10-16, 1985.
- CHABALA, J. C.; MROZIK, H.; TOLMAN, R. L.; ESKOLA, P.; LUSI, A.; PETERSON, L. H.; WOODS, M. F.; FISHER, M. H.; CAMPBELL, W. C.; EGERTON, J. R. & OSLIND, D. A. Ivermectin, a new broadspectrum antiparasitic agent. **J. Med. Chem.**, v. 23, p.1134-1136, 1980.
- CHANDRE, F; DARRIET, F.; DOANNIO, J.M.C.; RIVIÈRE, F.; PASTEUR, N. & GUILLET, P. Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in west Africa. **J. Med. Entomol.**, v. 34, n. 6, p.664-671, 1997.

- CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 770p.
- CLARKE, G. M. Fluctuating asymmetry: A technique for measuring developmental stress of genetic and environmental origin. **Acta Zool. Fennica**, v. 191, p.31-35, 1992.
- CLARKE, G. M. Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. **Environ. Pollut.**, v. 82, p.207-211, 1993.
- CLEMENTS, A. N. **The biology of mosquitoes**. London: Chapman & Hall, 1996. v.1
- CONSOLI, R.A.G.B. & OLIVEIRA, R.L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994. 225p.
- CONSOLI, R. A. G. B., PEREIRA, J. P.; SILVEIRA, J. N. & CASTRO, M. M. T. Suscetibilidade de adultos de *Culex quinquefasciatus* (Say) e *Aedes fluviatilis* (Lutz) (Diptera: Culicidae) a diversos inseticidas em laboratório. **Rev. Bras. Ent.**, v. 30, p.79-85, 1986.
- DE AZAMBUJA, P.; GOMES, J. E. P. L.; LOPES, F. & GARCIA, E. S. Efficacy of ivermectin against the bloodsucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 80, p.439-442, 1985.
- EDWARDS, M. J. & JACOBS-LORENA, M. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. **J. Insect Physiol.**, v. 46, p.313–1320, 2000.
- EGERTON, J. R.; OSLIND, D. A.; BLAIR, L. S.; EARY, C. H.; SUHAYDS, D.; CIFELLI, S.; RIEK, R. F. & CAMPBELL, W. C. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents. Efficacy of the B₁ component. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 15, p.372-378, 1979.
- FARIA, M. A.; MELO, A. L. & PEREIRA, L. H. 1993. Efeitos da Ivermectina em *Biomphalaria glabrata*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSOMIASIS, 4, 1993, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: p.234, 1993.

- FISHER, M. H. & MROZIK, H. Chemistry. In: CAMPBELL, W. C., **Ivermectin and Abamectin**. New York: Springer-Verlag, 1989. p.1-23.
- FLOATE, K. D. & FOX, A. S. 2000. Flies under stress: a test of fluctuating asymmetry as a biomonitor of environmental quality. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21, 2000, Foz do Iguaçu. **Resumos...**, Foz do Iguaçu: p.246, 2000.
- FOCKS, D. A.; McLAUGHLIN, R. E. & LINDA, S. B. Effects of ivermectin (MK-933) on the reproductive rate of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Ent.**, v. 28, p.501-505, 1991.
- FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1965. v. 2.
- FREITAS, R. M. C.; FARIA, M. A.; ALVES, S. N. & MELO, A. L. Effects of Ivermectin on *Culex quinquefasciatus* larvae. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 38, p.111-115, 1996.
- GALLI-VALERIO, B; ROCHAZ DE JONGH, J. Ueber die Wirkung von *Aspergillus niger* und *A. glaucus* auf die Larven von *Culex* und *Anopheles*. **Cent. Bl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infekt. krankh.**, v. 38, p.174-77, 1906.
- GARDNER, K.; MEISH, M. V.; MEEK, C. L. & BIVIN, W. S. Effects of ivermectin in canine blood on *Anopheles quadrimaculatus*, *Aedes albopictus* and *Culex salinarius*. **J. Amer. Mosq. Control. Ass.**, v. 9, p.400-402, 1993.
- GEORGHIEU, G. & PASTEUR, N. Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistat and susceptible mosquitoes. **J. Econ. Ent.**, v. 71, p.201-205, 1978.
- GERBERG, E. J. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. **AMCA Bulletin**, n. 5, Ed. Collins, D. L., 1979. 109p.
- HALLBERG, G. R. Pesticide pollution of groundwater in the United State. **Agric. Ecosystems Environ.**, v. 26, p.299-367, 1989.
- HARWOOD, R. F. & JAMES, M. T. **Entomology in human and animal health**. New York: Macmillian Publishing Co., 1979. 548p.

- HOFFMANN, J. A.; KAFATOS, F. C. JANEWAY, C. A. & EZEKOWITS, R. A. B. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, **284**: 1313-1318.
- HORTA, M. A. P.; CUNHA, F. A. F. & MELO, A. L. *Belostoma anurum*: efeitos da predação de *Biomphalaria glabrata* exposta à ivermectina. SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFMG, 3, 1994. Belo Horizonte **Resumos...** Belo Horizonte: p.99, 1994a.
- HORTA, M.A.P., CUNHA, F.A.F., FREITAS, R.M.C. & MELO, A. L. *Martarega uruguayensis*: predação de larvas de *Culex quinquefasciatus* expostas à ivermectina. ENCONTRO DE PESQUISA DO ICB, 4, 1994. Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: p.96, 1994b.
- HURLBUT, H. S. The transmission of Japanese B Encephalitis by mosquitoes after experimental hibernation. **Am. J. Hyg.**, v. 51, n. 3, p.265-268, 1950.
- HUTCHISON, D. W. & CHEVERUD, J. M. Fluctuating asymmetry in Tamarin (*Saguinus*) cranial morphology: Intra- and interespecific comparisons between taxa with varying levels of genetic heterozygosity. **J. Hered.**, v. 86, p.280-288, 1995.
- JACOBS-LORENA, M. & OO, M. M. The peritrophic matrix of insects. In: Beatty, B. J. & Marquardt, W. C. (Eds.), **The Biology of Insect Vectors**. Niwot: University Press of Colorado, 1996.
- JONES, J. W.; MEISH, M. V.; MEEK, C. L. & BIVIN, W. S. Lethal effects of ivermectin on *Anopheles quadrimaculatus*. **J. Amer. Mosq. Control Ass.**, v. 8, p.278-280, 1992.
- KAO, L. R.; MOTOYAMA, N. & DAUTERMAN, W. C. Study on hydrolases in various housefly strains and their role in malathion resistance. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 22, p.86-92, 1984.
- KOGAN, P. H. & HAGEDORN, H. H. Polyamines, and effects from reducing their synthesis during egg development in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **J. Insect Physiol.**, v. 46, p.1079-1095, 2000.

- KOKKO, E. G.; CONNER, R. L.; KOZUB, G. C. & LEE, B. Quantification by image analysis of subcrown internode discoloration in wheat caused by common root rot. **Phytopathology**, v. 8, p.976-981, 1993a.
- KOKKO, E. G.; SCHABER, B. D. & ENTZ, T. Quantification of mandibular wear of female alfalfa leafcutter bees, *Megachile rotundata* (F.) (Hymenoptera: Megachilidae) by image analysis. **Can. Entomol.**, v. 125, p.93-99, 1993b.
- KOKKO, E. G.; VOLKMAR, K. M.; GOWEN, B. E. & ENTZ, T. Determination of total root surface area in soil core samples by image analysis. **Soil Tillage Res.**, v. 26, p.33-43, 1993c.
- KOKKO, E. G.; CONNER, R. L.; KOZUB, G. C. & LEE, B. Effects of common root rot on discoloration and growth of the spring wheat root system. **Phytopathology**, v. 85, p.203-208, 1995.
- KOKKO, E. G.; FLOATE, K. D.; COLWELL, D. D. & LEE, B. Measurement of fluctuating asymmetry in insect wings using image analysis. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 89, n. 3, p.398-404, 1996.
- LASSALE, J. Parasitic Hymenoptera, Biological Control and Biodiversity. *In*: LASSALE, J. & GAULD, I. D. (Eds.), **Hymenoptera and Biodiversity**. Wallingford: CAB, 1993. 350 pp.
- LEHANE, M. J. The formation and histochemical structure of the peritrophic membrane in the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. **J. Insect Physiol.**, v. 22, p.1551–1557, 1976.
- LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 42, p.525–550, 1997.
- LUNDBERGH, I.; KREUGER, J. & JOHNSON, A. Pesticide in Surface Waters. **Council of Europe Report**. Council of Europe Press, 1995. 56 p. (CD-P-SP/T v. 94, n. 87).
- MAHMOOD, F.; WALTERS, L. L.; GUZMAN, H. & TESH, R. Effect of ivermectin on the ovarian development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **J. Med. Entomol.**, v. 28, n. 5, p.701-707, 1991.

- MILLER, T. W.; CHAIET, L.; COLE, D. J.; FLOR, J. E.; GOEGELMAN, R. T.; GULLO, V. P.; KEMPF, A. J.; KRELLWITZ, W. R.; MONAGHAN, R. L.; ORMOND, R. E.; WILSON, K. E.; ALBERS-SCHONBERG, G. & PUTTER, I. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents, isolation and chromatographic properties. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 15, p.368 – 371, 1979.
- MØLLER, A. P. & ERIKSON, M. Pollinator preference for symmetrical flowers and sexual selection in plants. **Oikos**, v. 73, p.15-22, 1995.
- MØLLER, A. P. Patterns of fluctuating asymmetry in sexual ornaments predict female choice. **J. Evol. Biol.**, v. 6, p.481-491, 1993.
- MØLLER, A. P. Patterns of fluctuating asymmetry in sexual ornaments of birds from marginal and central populations. **Am. Nat.**, v. 145, p.316-327, 1995.
- MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 4^a ed. São Paulo: Editora Nobel, 1980. v. 1
- MEYERS, E. G.; LOMIS, E. C.; FUGIMOTO, F. Y. OTA, M. I. & LENNETTE, E. H. Californis encephalitis surveillance program. **Am. J. Hyg.**, v. 71, p.368-377, 1960.
- NASR, N. T.; BODGHDADI, A. M.; ALLAM, K. A. M.; EL-ADAWI, A. I. & SOLIMAN, M. I. Effect of ivermectin on survival and fecundity of *Culex pipiens* the vector of *Wuchereria bancrofti* in Egypt. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, v. 26, n. 1, p.161-168, 1996.
- OMS. Resistencia de vetores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas. **22º informe del Comité de Expertos de la OMS en Insecticidas**. 1976. 585p. (Série de Informes Técnicos).
- ORTEGA, A. N.; MARQUETTI, M. C.; VALDES, S. & GARCIA, F. A. Tolerance of *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) to Methoprene in Cuba. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 4, p.493, 1991.
- PALMER, A. R. & STROBECK, C. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 17, p.391-421, 1986.
- PARSONS, P. A. Fluctuating asymmetry: An epigenetic measure of stress. **Biol. Rev.**, v. 65, p.131-145, 1990.

- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry theoretical and applied.**, 3rd ed. Boston: Little, Brown & Co. , 1968. v. 1
- PEIRIS, H. T. R. & HEMINGWAY, J. Temephos resistance and the associated cross-resistance spectrum in a strain of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) from Peliyagoda, Sri Lanka. **Bull. Entomol. Res.**, v. 80, p.49-55, 1990.
- PESSÔA, S. B. & MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica.** 11^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1988. 872p.
- PETERS, W. **Peritrophic membranes.** New York: Springer Verlag. 1992.
- POLAK, M & TRIVERS, R. The science of symmetry in biology. **Trends Ecol. Evol.**, v. 9, p.122-124, 1994.
- RAIKHEL A. S. & LEA, A. O. Previtellogenic development and vitellogenin synthesis in the fat body of a mosquito: An ultrastructural and immunocytochemical study. **Tissue & Cell**, v. 15, p.281-300, 1983.
- RAIKHEL A. S. & LEA, A. O. Analysis of mosquito yolk protein by monoclonal antibodies. *In*: LAW, J. (Ed.) **Molecular Entomology.** New York: Alan R. Liss Inc., 1987. p.403-13
- RICHARDS, R. P. & BAKER, D. V. Pesticide contamination patterns in agricultural drainage networks in the Lake Erie basin. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 12, p.13-26, 1993.
- RICHARDS, A. G. & RICHARDS, P. A. The peritrophic membranes of insects. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 22, p.219-240, 1977.
- SARRE, S. & DEARN, J. D. Morphological variation and fluctuating asymmetry among insular populations of the sleepy lizard, *Trachydosaurus rugosus* Gray (Squamata: Scincidae). **Austr. J. Zool.**, v. 39, p.91-104, 1991.
- SEIF, A. I. HUSSEINY, I. M.; SOLIMAN, B. A., SOLIMAN, M. A. & EL-KADY, M. A. Development of *Wuchereria bancrofti* in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) exposed in the larval instar to sublethal dosages of insecticides and one insect growth regulator and their influence on reproduction of filaria-infected mosquitoes. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, v. 27, n. 3, p.843-853, 1997.

- SHERRY, R. A. & LORD, E. M. Developmental stability in leaves of *Clarkia tembloriensis* (Onagraceae) as related to population outcrossing rates and heterozygosity. **Evolution**, v. 50, p.80-91, 1996.
- SILVEIRA, G. A. R., MADEIRA, N. G., DE AZEREDO-ESPIN, A. M. L. & PAVAN, C. Levantamento de Microhimenópteros parasitóides de dípteros de importância médico-veterinária no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 84, p.505-510, 1989. Supplementum IV.
- SINTON, J. A. & SHUTE, P. G. A report on the longevity of mosquitoes in the relation to the transmission of Malaria in nature., **Pub. Health & Med. Sub.** Ministry of Health, H. M. S. O., London. 1938. (Rep. n. 85).
- SOULÉ, M. E. & COUZIN-ROUDY, J. Allomeric variation 2. Developmental instability of extreme phenotypes. **Am. Nat.**, v. 120, p.765-786, 1982.
- SOULÉ, M. E. Phenetics of natural populations II. Asymmetry and evolution in a lizard. **Am Nat.**, v. 101, 141-160, 1967.
- SOULÉ, M. E. Heterozygosity and developmental stability: another look. **Evolution**, v. 33, p.396-401, 1979.
- SPRADBERRY, J.P.; TOZER, R.S.; DREWETT, N. & LINDSEY, M.J. The efficacy of ivermectin against larvae of the screw-worm fly (*Chrysomya bezziana*). **Aust. Vet. J.**, v. 62, p.311-314, 1985.
- STAMM, B.; D'HAESE, J & PETERS, W. SDS gel electrophoresis of proteins and glycoproteins from peritrophic membranes of some Diptera. **J. Insect Physiol.**, v. 24, p.1-8, 1978.
- STRONG, L. & BROWN, T. A. Avermectins in insect control and biology: a review. **Bull. Entomol. Res.**, v. 77, p.357-389, 1987.
- STRONG, L. & JAMES, S. Some effects of rearing the yellow dung fly *Scatophaga stercoraria* in cattle dung containing ivermectin. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 63, p.39-45, 1992.
- STRONG, L. Ivermectin prevents head eversion in the blowfly *Calliphora vomitoria* (L.). **Experientia**, v. 42, p.1295-1296, 1986.
- STRONG, L.. Overview: the impact of avermectins on pastureland ecology. *In*: HERD, R., STRONG, L. & WARDHAUGH, K., (Ed.). **Environmental**

- impact of avermectin usage in livestock. Vet. Parasit.** n. 48, p.3-17, 1992 (special issue).
- STRONG, L. Overview: the impact of ivermectin on pastureland ecology. **Vet. Parasit.**, v. 48, p.3-17, 1993.
- STATSOFT, INC. **Electronic Statistics Textbook**. Tulsa: StatSoft, 1999. Disponível em: <http://www.statsoft.com/textbook/stahome.html>. Acesso em agosto de 2000.
- SUBRA, R. Biology and control of *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera - Culicidae) with special reference to Africa. 1980, 40p. (WHO/VBC/80.781).
- TELLAM, R. The peritrophic matrix. In: LEHANE, M. J. & BILLINGSLEY, P. F. (Ed.) **Biological the insect midgut**, London: Chapman & Hall, 1996. 4: p.86-114.
- TELLAM, R.; WIJFFELS, G. & WILLADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 29, p.87-101, 1999.
- TESH, R. B. & GUZMAN, H. Mortality and infertility in adult mosquitoes after the ingestion of blood containing ivermectin. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 43, p.229-233, 1990.
- THORNHILL, R & GANGESTAD, S. W. Human facial beauty: averageness, symmetry and parasite resistance. **Human Nature**, v. 4, p.237-269, 1993.
- TIMMERMANN, S. E. & BRIEGEL, H. Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes. **J. Insect. Physiol.**, v. 45, p.461-470, 1999.
- TURNER, M. J. & SCHAEFFER, J. M. Mode of action of ivermectin. In: CAMPBELL, W.C. (Ed.) **Ivermectin and abamectin**. New York, Springer-Verlag, 1989, pp.73-88.
- VALLE, D. Vitellogenesis in insects and other groups – A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 1, p.1-26, 1993.
- VAN VALEN, L. A study of fluctuating asymmetry. **Evolution**, v. 16, p.125-142, 1962.
- VIANNA, E. E. S.; COSTA, P. R. P. & RIBEIRO, P. B. Longevidade e viabilidade do ciclo aquático do *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera:

- Culicidae) em condições ambientais, em Pelotas, RS. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 5, n. 1, p.53-56, 1996a.
- VIANNA, E. E. S.; COSTA, P. R. P. & RIBEIRO, P. B. Oviposição e longevidade de adultos do *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) em condições ambientais, em Pelotas, RS. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 5, n. 1, p.47-52, 1996b.
- VOLKMANN, A. & PETERS, W. Investigations on the midgut caeca of mosquito larvae – I. Fine structure. **Tissue & Cell**, v. 21, p.243-251, 1989.
- WATSON, P. J. & THORNHILL, R. Fluctuating asymmetry and sexual selection. **Trends Ecol. Evol.**, v. 9, p.21-25, 1994.
- WAUTERS, L. A.; DHONDT, A. A.; KNOTHE, H & PARKIN, D. T. Fluctuating asymmetry and body size as indicators of stress in red squirrel populations in woodland fragments. **J. Appl. Ecol.**, v. 33, p.735-740, 1996.
- WAYNE, R. K.; MODI, W. S. & O'BRIEN, S. J. Morphological variability and asymmetry in the Cheetha (*Acinony jubatus*), a genetically uniform species. **Evolution**, v. 40, p.78-85, 1986.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Techn. Rep. Ser. Resistance of vectors and reservoirs of diseases to pesticides. 1970. Ser., (585).
- WIGGLESWORTH, V. B. The formation of peritrophic membranes in insects, with special reference to the larvae of mosquitoes. **Q. J. Microsc. Sci.**, v. 73, p.593-616, 1930.
- WIGGLESWORTH, V. B. The storage of protein, fat, glycogen and uric acid in the fat body and other tissues of mosquito larvae. **J. Exp. Biol.**, v. 19, p.56-77, 1942.
- WIGGLESWORTH, V. B. Histochemical studies of uric acid in some insects. 2. Uric acid and polyphenols in the fat body. **Tissue & Cell**, v. 19, p.93-100, 1987.
- WRIGHT, J. W. The WHO programme for the evaluation and testing of new insecticides. **Bull. Wld. Hlth. Org.**, v. 44, p.11-22, 1971.

YU, D. S., KOKKO, E. G.; BARRON, J. R.; SCHAALJE, G. B. & GOWEN, B.
E. Identification of Ichneumonid wasps using image analysis of wings. **Syst.
Entomol.**, v. 17, p.389-395, 1992.

ZANETTI, M.; GENNARO, R. & ROMEO, D. The Cathelicidium family of
antimicrobial peptide precursors: A component of the oxygen – independent
defense mechanisms of neutrophils. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 832, p.147-
162, 1997.