



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Perfil da suscetibilidade a deltametrina em populações de *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) do Estado de Minas Gerais procedentes de áreas com infestação persistente

por

Grasielle Caldas D`Ávila Pessoa

Belo Horizonte

Agosto de 2012

Perfil da suscetibilidade a deltametrina de populações de *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) do Estado de Minas Gerais em áreas com infestação persistente

por

Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito final para a obtenção do título de doutor(a) em Ciências.

Orientação: Dra. Liléia Diotaiuti

Belo Horizonte

Agosto de 2012

Colaborações:

Bernardino Vaz de Melo – SES/MG

Letícia Sena Dias – LATEC - CPqRR / FIOCRUZ

Dr. Ademir J. Martins – LAFICAVE – IOC/FIOCRUZ

Dra. Denise Valle – LAFICAVE – IOC / FIOCRUZ

Dra. Marcela Lencine Ferraz – SES / MG

*Ao meu grande exemplo de vida, fé e superação,
minha mãe.*

*“Ninguém sabe tudo assim como ninguém ignora tudo.
O saber começa com a consciência do saber pouco.
É sabendo que se sabe pouco que uma pessoa se prepara para saber mais....o homem como ser
histórico, inserido num permanente movimento de procura,
faz e refaz, constantemente o seu saber.”
(Paulo Freire)*

Agradecimentos

A Deus pelas inúmeras possibilidades de amadurecimento que me foram ofertadas durante estes quatro anos de caminhada contribuindo para o meu progresso intelectual, espiritual e emocional.

A Dra. Liléia Diotaiuti, idealizadora deste projeto, pela oportunidade de ingressar na pesquisa junto a equipe do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas -LATEC orientando este trabalho pautado pela confiança, incentivo, ensinamentos e principalmente, compreensão e amizade.

A Dra. Marcela Lencine Ferraz e Dr. Bernardino Vaz de Mello, da SES/MG, pela logística das coletas de campo e ensinamentos.

Aos agentes de saúde que não mediram esforços para realizar todo o trabalho operacional de forma otimizada sob o sol escaldante do norte de Minas e Triângulo Mineiro, em especial ao Sr. Aparício Oliveira, da Gerência Regional de Saúde de Montes Claros.

A Dra. Denise Valle e ao Dr. Ademir M. Santos, bem como a toda sua equipe, em especial a Msc. Priscila Vianna por todos os ensinamentos, perseverança, dedicação e paciência junto aos estudos bioquímicos e da diversidade do gene do canal de sódio.

Ao Dr. Nilton Barnabé, Msc. Paula F. Fernandes, Dra. Carlota J. Belisário, Dra. Elisa Neves Viana, Letícia Sena Dias e Elisângela Monteiro Cóser pela colaboração nos trabalhos com os microssatélites.

A Dra. Marcela Lencine Ferraz, Dr. Flávio Múcio, Dr. Marcos Horácio pelos aconselhamentos e pontuações junto ao processo de qualificação.

Ao Dr. Marcelo Resende e Dr. Ademir M. Santos pela revisão desta tese.

Ao Adelmison de Azevedo pela enorme ajuda com a alimentação e manutenção das colônias de triatomíneos.

Aos amigos do LATEC/ CPqRR-FIOCRUZ, do Laboratório de Ecologia Química - LABEQ ICB-UFMG e do Laboratório de Fisiologia e Controle de Vetores - LAFICAVE / IOC-FIOCRUZ, minha segunda família, pelo acolhimento diário, pelos momentos de convivência e acima de tudo pelo amadurecimento em coletividade. Agradeço de forma muito especial a

Letícia Sena Dias, a Carlota Belisário, a Priscila Vianna e ao Diogo Belinato, pelo companheirismo, pelas palavras de incentivo, pela troca de experiência e amizade sincera construída neste período.

As minhas alunas e colegas de profissão nos estudos com inseticida, Nathália Trevizani, Letícia Sena Dias, Marinely B. Gomes, Josiane V. Lopes, Tamara dos Santos, Mariana Reis, Gabriela Salazar, Renata Santos e Julia Campos, pelo aprendizado na convivência diária e trabalhos desenvolvidos em parceria.

Ao Dr. Edelberto Santos Dias, Dr. Gustavo Paz e Josiane Valadão Lopes pelos ensinamentos e trocas de experiências nos estudos com flebotomíneos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da UFMG pela oportunidade e apoio no curso de doutoramento, em especial a Sumara e Sibebe pelo carinho e apoio constantes.

Aos mestres, em especial ao Dr. Alan Lane de Melo, Dra. Mariângela Carneiro e Dr. Carlos Maurício pelos ensinamentos, mas acima de tudo pelo exemplo de humanização do ensino.

Ao Centro de Pesquisa René Rachou - CPqRR e ao Instituto Oswaldo Cruz - IOC, pelo apoio institucional e pela oportunidade de desenvolver este trabalho em um dos mais conceituados pólos de pesquisa em saúde do país.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq, BAYER e CPqRR/FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

A todos os meus amigos, em especial ao Luiz Araújo, ao meus familiares, em especial aos meus pais, DÂvila e Fátima e a minha irmã, Flávia pela paciência e compreensão nos momentos em que precisei estar ausente e pelo apoio incondicional.

A todos, muito obrigada!

Resumo

Os relatos cada vez mais frequentes de populações triatomínicas com razões de resistência elevadas tem causado grande impacto, desafiando cientistas e sanitaristas na busca de novas alternativas para o controle vetorial. Considerando os casos de resistência de triatomíneos já reportados, é possível que o uso intensivo de inseticidas no Brasil por mais de 30 anos tenha favorecido o aparecimento de novos focos em regiões ainda mais amplas. Deste modo, justifica-se a importância de se investigar este fenômeno levando-se em consideração as condições ambientais nas quais ele se encontra inserido bem como variabilidade genética destes insetos e sua capacidade de alteração na linha do tempo na presença do ativo químico. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil de suscetibilidade/resistência de populações de *T. sordida* de áreas com infestação persistente da região do Triângulo Mineiro e do Norte de Minas Gerais ao piretróide deltametrina. A População utilizada como linhagem referência de suscetibilidade é proveniente de Uberaba. Os ensaios biológicos quali e quantitativos foram conduzidos de acordo com PESSOA (2008) e os bioquímicos de acordo com VALLE *et al.*, (2006) com modificações. A caracterização da estrutura genética das populações foi desenvolvida por meio do estudo de microssatélites por técnica de transposição. As características ambientais e operacionais foram avaliadas por meio de questionário próprio. As variáveis climatológicas (umidade relativa, pluviosidade, temperatura e insolação) foram obtidas por meio de dados disponíveis no Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa - BDMEP. As análises dos bioensaios quantitativos revelaram RR_{50} que variaram de 0,44 a 6,5. De acordo com critério de categorização do status da suscetibilidade/resistência proposto pela OPAS (2005), apenas 1% das populações foi classificada como resistente a deltametrina (TsCJB; RR_{50} : 6,50), enquanto que de acordo com critério de ZERBA & PICOLLO (2002), este valor sobe para 55,5%. Os bioensaios qualitativos revelaram um percentual de mortalidade à Dose Diagnóstica que variou de 43,3% a 100%, sendo 61,2% das populações classificadas como resistentes à deltametrina. Os resultados obtidos nos bioensaios qualitativos e quantitativos não se mostraram correspondentes, reforçando a necessidade de ensaios de campo. A padronização dos ensaios bioquímicos revelou que estes devem ser realizados com insetos de mesma geração e idade, com n amostral de 135 espécimes. A análise dos ensaios bioquímicos utilizando somente o percentil 99 se mostrou deficiente, justificando a necessidade de um teste estatístico em paralelo, a ser escolhido de acordo com o tipo de distribuição dos resultados obtidos. A análise das populações de interesse revelou alteração na maioria das populações para todas as enzimas (alfa-EST, beta-EST, pnpa-EST, OFM e ACHE), exceto de GST. Não foi observada correlação entre as RR encontradas e os resultados dos testes bioquímicos. Não foi observada diferença no padrão das localidades com triatomíneos classificados como resistentes ou suscetíveis em relação a: constituição do intradomicílio, tipo

de ecótopos peridomiciliares, a disponibilidade de esconderijos, e uso de inseticidas pelo próprio morador. Somente na localidade de Barriguda foi relatada utilização das matas no entorno para coleta de lenha. Verificaram-se diferenças nos parâmetros climatológicos insolação, temperatura e pluviosidade em todo o município ($p < 0,05$). O histórico de infestação das UD's e carga de inseticida utilizada revelou-se mais elevado em Barriguda, Jataí II e Jataí I, sendo *T. sordida* (94,5%) a espécie de triatomíneo predominante capturada. O município de Coração de Jesus conta atualmente com três agentes de saúde, com pouco tempo de experiência profissional, não treinados para as atividades de borrifação que afirmam trabalharem em concordância com as preconizações do MS. Os estudos com microssatélites revelaram uma grande diversidade genética. A análise do F_{ST} possibilitou inferir sobre um fluxo de insetos entre as localidades de Jataí I, Jataí II, Boa Vista, com isolamento independente das populações de Barriguda e Bom Jesus. De forma geral, o uso de inseticidas para diversos fins, possíveis falhas operacionais principalmente devidas à falta de capacitação e supervisão dos agentes de saúde, somados a uma degradação irregular do inseticida determinada pelas condições ambientais, pode selecionar indivíduos resistentes justificando a persistência da infestação na região. A diversidade de RR observada dentro da mesma localidade, o fluxo genético observado nos ensaios moleculares, a abundância e diversidade de esconderijos e os diferentes perfis bioquímicos encontrados permitem inferir, inclusive, que a resistência pode estar sendo subestimada.

Palavras-chave: resistência a inseticida, piretróides, deltametrina, Triatominae, *T. sordida*, bioensaios, enzimas detoxificativas, microssatélites.

Abstract

High insecticide resistance ratios on triatomine populations have been frequently reported, causing impact on vector control strategies and challenging scientists and sanitarians on the quest for novel alternatives concerning vector control. Considering the already reported cases of triatomine resistance, it is possible that the intensive use of insecticides in Brazil for over 30 years caused the emergence of new foci in wider geographic areas. Thus, the investigation of the related phenomenon is justified by its importance. Moreover it is necessary to consider the environmental conditions on which the resistance is inserted, the insects genetic variability and the resistance timeline evolution after exposure to chemical assets. The aim of the present study was to characterize the pyrethroid deltamethrin susceptibility/resistance profile of *Triatoma sordida* (Stål, 1859) populations from areas with persistent infestation on the Triangulo Mineiro and on northern Minas Gerais. The qualitative and quantitative bioassays were conducted according to PESSOA (2008) and biochemical assays according to VALLE *et al.*, (2006) with modifications. The genetic characterization of triatomine populations was developed through microsatellites transposition technique. The operational and environmental characteristics were assessed through questionnaires. The climatic variables (relative humidity, pluviosity, temperature and solar radiation) were obtained from BDMEP. The quantitative bioassay analyzes showed RR_{50} ranging from 0.44 to 6.5. According to the criterion of categorization status of susceptibility / resistance proposed by PAHO (2005), only 1% of the population was classified as resistant to deltamethrin (TsCJB; RR_{50} : 6.50), whereas according to ZERBA & PICOLLO (2002) criterion, the value rises to 55.5%. Qualitative bioassays revealed a DD (diagnostic dose) mortality ranging from 43.3% to 100%, with 61.2% of the population classified as deltamethrin resistant. The results in qualitative and quantitative bioassays were not related, emphasizing the need of field trials. The standardization of biochemical assays showed that these must be performed with insects of the same generation and age, with a sample of 135 specimens. The analysis of biochemical assays using only the 99 percentile proved to be deficient, justifying the need of a parallel statistical test, to be chosen according to the statistical distribution of the results. The analysis of triatomine populations showed alterations in most of them for all the enzymes (alpha-EST, beta-EST, PNPA-EST, OFM and ACHE), except GST. No correlation was found between the RR values and the biochemical tests results. Localities with triatomines classified as resistant or susceptible presented similar patterns when considered: intradomiciliary constitution, types of peridomiciliary ecotopes, availability of hiding places, and use of insecticides by the resident. Only on the Barriguda locality was reported the collecting of firewood in surrounding vegetation by residents. Differences in the climatic variables (solar radiation, temperature and rainfall) were verified throughout the municipality ($p < 0.05$). Premises infestation history and used insecticide charge showed to be higher at Barriguda, Jataí Jataí I and Jataí II. *Triatoma sordida* was the predominant species

captured (94.5%). The municipality of Coração de Jesus currently has three health workers with little time of professional experience, not trained to insecticide spraying activities in accordance to ministry of health recommendations. Microsatellites analysis revealed a high genetic diversity. The F_{ST} analysis allowed infer the existence of interchange among insect's populations between Jataí I, II Jataí, Boa Vista localities, and an independent isolation of Barriguda and Bom Jesus populations. Considering the stated results, the use of insecticides for various purposes, possible operational failures mainly due the lack of training and supervision of health workers, in combination with insecticide irregular degradation caused by environmental conditions, may contribute for selection of resistant individuals justifying the persistence of infestation in region. The diversity of RR observed within the same locality, the genetic flow observed in molecular assays, the abundance and diversity of hiding places and different biochemical profiles allow to infer that insecticide resistance may be underestimated.

Keywords: insecticide resistance, pyrethroids, deltamethrin, Triatominae, *T. sordida*, bioassays, detoxifying enzymes, microsatellites.

Lista de símbolos e abreviaturas

$\mu\text{g ia./m}^2$	-	Microgramas de ingrediente ativo por metro quadrado
μm	-	Micrômetros
ACE	-	Acetilcolinesterase
ACTH	-	Iodeto de acetilcolina
AIDS	-	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
alfa-NA	-	Esterase alfa
AMOVA	-	Análise de Variância Molecular
AVAI	-	Anos de Vida Ajustado à Incapacitação
BHC	-	Hexaclorobenzeno
Beta-NA	-	Esterase beta
BDMEP	-	Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa
CB	-	Carbamatos
CGLAB	-	Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública
CIB	-	Comissão Intergestores Bipartite
CIT	-	Comissão Intergestores Tripartite
cm	-	Centímetros
CN	-	Controle Negativo
CPqRR	-	Centro de Pesquisa Rene Rachou
DC	-	Doença de Chagas
DDT	-	Dicloro-difenil-tricloroetano
DENERu	-	Departamento Nacional de Endemias Rurais
DL ₅₀	-	Dose letal 50%
DL ₉₅	-	Dose letal 95%
DL ₉₉	-	Dose letal 99%
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	-	5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
EST	-	Esterases
FE	-	Fenilpirazóis
FUNASA	-	Fundação Nacional de Saúde
GABA	-	Acido Gama-aminobutírico
GPS	-	Sistema de Posicionamento Global
GRS	-	Gerência Regional de Saúde
GST	-	Glutathione-S-Transferase
GSH	-	L glutathione reduzida
H _E	-	Heterozigosidade esperada
H _O	-	Heterozigosidade observada
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCONSUL	-	Iniciativa do Cone Sul
INERu	-	Instituto Nacional de Endemias Rurais
INMET	-	Instituto Nacional de Meteorologia
IPA	-	Iniciativa do Pacto Andino
IPCA	-	Iniciativa dos Países da América Central
JHE	-	Esterases do Hormônio Juvenil
Kdr	-	Resistência Knockdown do inglês "Knockdown resistance"
LATEC	-	Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas
LRS	-	Linhagem referência de suscetibilidade
m	-	Metros
M	-	Molar
m ²	-	Metros quadrados
mg	-	Miligrama
mg ia./m ²	-	Miligramas de ingrediente ativo por metro quadrado
mm	-	Milímetros
MS	-	Ministério da Saúde
NADPH	-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

Cont. Lista de símbolos e abreviaturas

ng i.a./ninfa	-	Nanogramas de ingrediente ativo por ninfa tratada
ng ia./m ²	-	Nanogramas de ingrediente ativo por metro quadrado
ng/μL	-	Nanogramas por microlitro
nm	-	Nanômetros
NA _v	-	Canal de sódio regulado por voltagem
OC	-	Organoclorados
°C	-	Graus Célsius
OFM	-	Oxidase de Função Mista
OP	-	Organofosforados
OPAS	-	Organização Panamericana de Saúde
PA	-	Pesquisa Ativa
p99	-	Percentil 99
pb	-	Pares de Base
PBO	-	Butóxido de piperonila
PCDCh	-	Programa de Controle da Doença de Chagas
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
PI	-	Piretróides
PPA	-	Análise do padrão pontual do ingles “Point Pattern Analysis”
pNPA- EST	-	Esterase PNPA
rpm	-	Rotações por minuto
RR ₅₀	-	Razão de Resistência 50%
RR ₉₅	-	Razão de Resistência 95%
SES/MG	-	Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais
SNC	-	Sistema Nervoso Central
SNM	-	Serviço Nacional de Malária
SSR	-	Repetição de Sequências Simples do inglês “Simple Sequences Repeats”
SUCAM	-	Superintendência de Campanhas de Saúde Pública
SUCEN	-	Superintendência de Controle de endemias
TMBZ	-	3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine dihydrochloride
SVS	-	Secretaria de Vigilância em Saúde
UDs	-	Unidades Domiciliares
UR	-	Umidade Relativa
VE	-	Vigilância Epidemiológica
WHO	-	Organização Mundial de Saúde do inglês “World Health Organization”

Lista de figuras

- 1 - Fêmea de *Triatoma sordida* Stål 1859
- 2 - Mapa político do Estado de Minas Gerais. Destacados os diferentes municípios de captura de *T. sordida* estudadas neste projeto
- 3 - Acondicionamento dos insetos em insetário (A); limpeza quinzenal das colônias para retirada dos ovos (B), acondicionamento dos ovos em placas de petri para acompanhamento diário da eclosão dos mesmos (C) e acompanhamento diário da idade das ninfas para a realização dos bioensaios (D).
- 4 - Registro diário dos experimentos (A); seringa Hamilton acoplada a dispensador automático (B), separação dos triatomíneos com idade adequada para realização dos ensaios biológicos (C).
- 5 - Aplicação tópica do inseticida nos triatomíneos (A), acondicionamento dos insetos pós-tratamento para subsequente registro de mortalidade (B).
- 6 - Acondicionamento dos espécimes no gelo para processamento inicial (A), acondicionamento individual dos espécimes em eppendorf com auxílio de um pistilo acoplado a homogeneizador mecânico (B), maceração dos triatomíneos (C); distribuição das amostras pré-centrifugação nas placas dispostas no gelo para realização dos ensaios de ACHE e OFM (C); centrifugação a 4°C (E); distribuição das amostras pós-centrifugação nas placas para demais ensaios (F); realização dos ensaios bioquímicos em temperatura ambiente (G); exemplo de ensaio colorimétrico (H); leitura dos ensaios em espectrofotômetro (I).
- 7 - Distribuição das localidades de acordo com o *status* da suscetibilidade/ resistência proposto pela OPAS (2005) – A e ZERBA & PICOLLO (2002) – B.
- 8 - Perfil de inclinação da reta dose resposta para populações de *T. sordida*, em escala logarítmica (aplicação tópica de 0,2µL de deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F1 - cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg – registro de mortalidade com 72 horas.) Localidades amostradas: A: Santo Hipólito; B: Buenópolis, C: Várzea da Palma; D: Ibiaí; E: Coração de Jesus; F: Montes Claros
- 9 - Figura 10. Perfil de inclinação da reta dose resposta para populações de *T. sordida*, em escala logarítmica (aplicação tópica de 0,2µL de deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F1 - cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg – registro de mortalidade com 72 horas.) Localidades amostradas: A: Francisco Sá; B: Porteirinha, C: Serranópolis de Minas; D: Monte Azul; E: Mamonas ; F: Espinosa.
- 10 - Perfil de inclinação da reta dose resposta para populações de *T. sordida*, em escala logarítmica (aplicação tópica de 0,2µL de deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F1 - cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg – registro de mortalidade com 72 horas.) Localidades amostradas: A: São João da Ponte; B: Brasília de Minas, C: Luislândia; D: Icaraí de Minas; E: São Francisco; F: Japonvar.
- 11 - Perfil de inclinação da reta dose resposta para populações de *T. sordida*, em escala logarítmica (aplicação tópica de 0,2µL de deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F1 - cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg – registro de mortalidade com 72 horas.) Localidades amostradas: A: Lontra; B: Ibiracatu; C: Vazerlândia; D: Januária; E: Cônego Marinho; F: Montalvânia.
- 12 - Perfil de inclinação da reta dose resposta para populações de *T. sordida*, em escala logarítmica (aplicação tópica de 0,2µL de deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F1 - cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg – registro de mortalidade com 72 horas.) Localidades amostradas: A: São João das Missões; B: Buritis; C: Gurinhatã; D: Limeiro do Oeste; E: Frutal; F: Manga.

- 13 - Perfil de inclinação da reta dose resposta para populações de *T. sordida*, em escala logarítmica (aplicação tópica de 0,2µL de deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F1 - cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg - registre de mortalidade com 72 horas.) Localidades amostradas: A: Barriguda – em vermelho análise feita em 2007 e em azul, em 2009. B: localidades do entorno de Barriguda.
- 14 - Distribuição das localidades de estudo de acordo com o *status* de suscetibilidade/resistência a deltametrina proposto por WHO (1981). Categorização da mortalidade das populações de *T.sordida* frente a dose diagnóstica 1xDL₉₉ da LRS. Em vermelho as populações resistentes a deltametrina e em verde, as suscetíveis.
- 15 - Média das temperaturas (máxima e mínima) e insolação do município de Coração de Jesus, do período de 1970 a 2009.
- 16 - Média da precipitação e umidade relativa do ar do município de Coração de Jesus, do período de 1970 a 2009, incluindo-se intensidade do fenômeno El Nino e La Nina (fraca 100, moderada 200 e forte 300).
- 17 - *Loci* Tb 8124 (A) e T.infest_ms42 (B) visualização em gel de acrilamida corado com nitrato de prata. Nota: controles negativos - CN
- 18 - Quantificação da atividade das enzimas: esterases (com substratos: alfa, beta e pnpa), acetilcolinesterase (atividade total – AchE e inibida – AchI), GST e OFM em ninfas I de *T. sordida* das gerações F1 e F2 (1 dia de idade - jejum - peso 1,2±0,2 mg - população LRS).
- 19 - Quantificação da atividade das enzimas: esterases (com substratos: alfa, beta e pnpa), acetilcolinesterase (atividade total – AchE e inibida – AchI), GST e OFM em ninfas I da geração F1 de *T. sordida* com 1, 3 e 5 dias de idade (jejum - peso 1,2±0,2 mg - população LRS).
- 20 - Quantificação da atividade das enzimas: esterases (com substratos: alfa, beta e pnpa), acetilcolinesterase (atividade total – AchE e inibida – AchI), GST e OFM em ninfas I da geração F1 de *T. sordida* com amostragem de 45, 90 e 135 espécimes (1 dia de idade - jejum - peso 1,2±0,2 mg - população LRS).
- 21 - Quantificação da atividade das enzimas: esterases (com substratos: alfa, beta e pnpa), acetilcolinesterase (atividade total – AchE e inibida – AchI), GST e OFM em ninfas I da geração F1 de *T. sordida* com 5 dias de idade (jejum - peso 1,2±0,2 mg).
- 22 - Análise do percentil 99 referente a quantificação da atividade enzimática relacionada com a resistência a inseticida em populações de *T. sordida* provenientes do município de Coração de Jesus. As cores representam o percentual de indivíduos da população com atividade enzimática acima do percentil 99 da LRS: verde – até 15%, amarelo – entre 15 e 50% e vermelho – acima de 50%. Estes valores correspondem à alteração enzimática na população classifica, respectivamente, como ausente, baixa e alta.

Lista de tabelas

- 1 - Mutações indetificadas no *gene* NA_V de insetos relacionados à resistência a inseticidas
- 2 - Codificação das diferentes populações de *T. sordida* procedentes do Estado de Minas Gerais, 2012
- 3 - DL_{50} , DL_{95} , RR_{50} , RR_{95} e *Slope* da linhagem referência de suscetibilidade (em vermelho) e das populações de campo de *T. sordida* a deltametrina, ranquiados em ordem crescente de RR_{50}
- 4 - DL_{50} , DL_{95} , RR_{50} , RR_{95} e *Slope* da linhagem referência de suscetibilidade e das populações *T. sordida* coletadas nas localidades de entorno de Barriguda (município de Coração de Jesus) ranquiados por RR_{50} em ordem crescente.
- 5 - Mortalidade das populações de *T. sordida* em resposta à dose diagnóstica (DD) $1 \times DL_{99}$ da linhagem referência de suscetibilidade. Total amostrado por população de 30 espécimes.
- 6 - Percentual de mortalidade das populações de *T. sordida* circunvizinhas de Barriguda (Coração de Jesus) em resposta às dose diagnósticas (DD) $1 \times DL_{99}$ da linhagem referência de suscetibilidade ranquiados em ordem crescente de % de mortalidade.
- 7 - Caracterização das UD's em relação a idade média, constituição das paredes, teto e piso das mesmas.
- 8 - Caracterização das UD's em relação a criação de animais domésticos e uso de inseticidas com vistas ao controle de pragas em suas criações.
- 9 - UD's nas quais o morador relatou uso de inseticidas com vistas ao controle de pragas domésticas, especificando local de uso.
- 10 - UD's nas quais se verifica cultivo de grãos, legumes, frutas ou hortaliças.
- 11 - UD's nas quais os montes de lenha, amontoados de tijolos e telhas, cercas e depósitos de máquinas estão presentes no peridomicílio. Distância média entre tais anexos e o intradomicílio em metros e, idade média dos mesmos em anos.
- 12 - UD's nas quais os galinheiros, chiqueiros e currais estão presentes no peridomicílio. Distância média entre tais anexos e o intradomicílio em metros e, idade média dos mesmos em anos e material de construção utilizado.
- 13 - UD's nas quais os paióis estão presentes no peridomicílio. Distância média entre tais anexos e o intradomicílio em metros, idade média dos mesmos em anos e material de construção utilizado.
- 14 - UD's nas quais os fornos de barro estão presentes no peridomicílio. Distância média entre tais anexos e o intradomicílio em metros e, idade média dos mesmos em anos.
- 15 - UD's positivas, UD's trabalhadas, Triatomíneos capturados por UD e Carga de inseticida aplicado por UD em todas as localidades de interesse.
- 16 - Cargas de inseticidas utilizadas pelo PCDCCh nas localidades de interesse no período de 2004 a 2010.
- 17 - Variabilidade genética dos 10 *loci* de microssatélites em populações de *T. sordida*.
- 18 - Variação genética apresentada pelos 10 *loci* de microssatélites nas populações de *T. sordida*
- 19 - Relação dos alelos observados nos 10 *loci* de microssatélites nas populações de *T. sordida* estudadas. Destacados em vermelho os *loci* exclusivos.
- 20 - AMOVA para as amostras de *T. sordida* estudadas através dos 10 *loci* de microssatélites.
- 21 - F_{ST} pareado entre as amostras de *T. sordida* estudadas, calculados através dos 10 *loci* de microssatélite

Sumário

	Página
1. Introdução	19
1.1 Doença de Chagas	20
1.2 Importância epidemiológica de <i>Triatoma sordida</i>	22
1.3 Controle Vetorial da doença de Chagas	24
1.4 Resistência a Inseticidas	31
1.5 Toxicologia de inseticidas	35
1.5.1 Classificação dos inseticidas	35
1.5.1.1 Inseticidas organoclorados	36
1.5.1.2 Inseticidas organofosforados	36
1.5.1.3 Inseticidas carbamatos	36
1.5.1.4 Inseticidas piretróides	36
1.5.1.5 Fenilpirazóis e Ciclodienos	37
1.5.2 Toxicodinâmica	37
1.5.2.1 Acetilcolinesterase	38
1.5.2.2 Canal de sódio regulado por voltagem	39
1.5.2.3 Receptores do ácido Gama-aminobutírico	40
1.5.3 Toxicocinética	41
1.5.3.1 Esterases	42
1.5.3.2 Oxidases de função múltipla	42
1.5.3.3 Glutathione S – Transferase	43
1.6 Estruturação genética de populações naturais avaliada por microssatélite	44
2. Justificativa	46
3. Objetivos	50
3.1 Objetivo Geral	51
3.2 Objetivos Específicos	51
4. Material e Métodos	52
4.1 Inseticida e diluente	53
4.2 Material biológico e área de amostragem	53
4.3 Definição do perfil de suscetibilidade das populações de campo de <i>T. sordida</i> : bioensaios quantitativos	59
4.4 Definição da taxa de mortalidade das populações de campo de <i>T. sordida</i> à dose diagnóstica: bioensaios qualitativos	61
4.5 Caracterização ambiental das localidades de estudo do município de Coração de Jesus	62
4.6 Estruturação genética das populações de <i>T. sordida</i> utilizando marcadores microssatélites	63
4.7 Quantificação da atividade de enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticidas nas populações de <i>T. sordida</i>	65
4.7.1 Determinação da geração ideal dos triatomíneos para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticidas	67
4.7.2 Determinação da idade ideal dos triatomíneos para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticidas	67
4.7.3 Determinação do número amostral ideal para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticidas	68
5. Resultados	69
5.1 Perfil de suscetibilidade das populações de <i>T. sordida</i> estudadas ao piretroide deltametrina	70
5.2 Taxa de mortalidade das populações de <i>T. sordida</i> estudadas em resposta à dose diagnóstica	83
5.3 Caracterização ambiental do município de Coração de Jesus - MG	87

5.3.1	Caracterização das condições climáticas da região de interesse	87
5.3.2	Caracterização das unidades domiciliares avaliadas	89
5.3.3	Histórico de infestação triatomínica e uso de inseticidas na região de interesse	94
5.3.4	Caracterização das atividades prestadas pelos agentes de campo	98
5.4	Ensaio molecular de genética de população	99
5.5	Quantificação da atividade de enzimas relacionadas a detoxificação de inseticidas nas populações de <i>T. sordida</i>	103
5.5.1	Determinação da geração ideal dos triatomíneos para quantificação da atividade enzimática relacionada com detoxificação de inseticidas	103
5.5.2	Determinação da idade ideal dos triatomíneos para quantificação da atividade enzimática relacionada com detoxificação de inseticidas	103
5.5.3	Determinação do número amostral ideal dos triatomíneos para quantificação da atividade enzimática relacionada com a detoxificação de inseticidas	104
5.5.4	Perfil da quantificação da atividade de enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticidas nas populações de <i>T. sordida</i> estudadas	111
6.	Discussão	115
7.	Conclusões	129
8.	Considerações Finais	132
9.	Referências Bibliográficas	134
10.	Anexos	155
10.1	Anexo 1: Relatos na literatura da ocorrência de resistência de triatomíneos a inseticida.	156
10.2	Anexo 2: Mapa de conjunto das localidades de estudo de Coração de Jesus	168
10.3	Anexo 3: Questionário aplicado aos moradores das localidades de interesse visando descrever a unidade domiciliar bem como o possível uso de inseticida com fins domésticos e agrícolas.	169
10.4	Anexo 4: Questionário aplicado aos agentes de saúde que trabalham nas localidades de interesse visando detectar possíveis falhas operacionais no campo.	173
10.5	Anexo 5: <i>Loci</i> de microssatélites descritos para <i>T.brasiliensis</i> (Tb), <i>T.dimidiata</i> (TD), <i>T.infestans</i> (Tinfest_ms) e <i>T.pseudomaculata</i> (Tp).	176
10.6	Anexo 6: Protocolo para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas testadas para <i>T. sordida</i>	177
10.7	Anexo 7: Análise Probit da Linhagem Referência de Suscetibilidade de <i>T. sordida</i> .	180

1.1 Doença de Chagas

Causada pelo *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909, a doença de Chagas (DC) é considerada uma enfermidade tropical, endêmica da América Latina e incluída na lista das doenças negligenciadas pela *World Health Organization* (WHO). A distribuição geográfica da infecção chagásica humana, incluindo reservatórios silvestres e vetores, se estende desde os Grandes Lagos da América do Norte até o sul da Argentina e do Chile (COURA & DIAS, 2009) sendo exceções as espécies do gênero *Linchosteus* e o complexo *Rubrofasciata* (SCHOFIELD & GALVAO, 2009).

De enzoontia à antropozoonose, processo este resultante da ação antrópica, a DC é uma enfermidade dependente das variáveis de natureza primariamente econômicas, comumente associada a condições precárias de vida, mais diretamente relacionadas aos tipos de habitações favoráveis a colonização dos triatomíneos (SILVEIRA, 2000). Por este motivo é considerada uma doença marginalizada, a qual é atribuída pouca, ou mesmo, nenhuma prioridade política.

Ainda hoje é um sério problema de saúde pública representando a principal causa de lesões cardíacas em jovens e adultos economicamente produtivos (MONCAYO & SILVEIRA, 2009). Estima-se que a enfermidade de Chagas acomete cerca de 12 a 14 milhões de pessoas em larga extensão na América Latina, englobando 15 países, com aproximadamente outras 28 milhões expostas ao risco de contaminação (WHO, 2002; SCHOFIELD *et al.*, 2006; MONCAYO & SILVEIRA, 2009). No Brasil, acredita-se que cerca de um milhão e novecentas mil pessoas estejam infectadas (RASSI-JÚNIOR *et al.*, 2010).

A DC é caracterizada por uma fase aguda, assintomática ou sintomática, podendo evoluir para um quadro clínico crônico. A fase aguda é marcada por uma intensa parasitemia no sangue periférico. No início da infecção podem se manifestar reações locais causadas pela penetração do *T. cruzi* - chagoma de inoculação e/ou sinal de Romana - geralmente acompanhadas por processo febril, atrelado ou não de poliadenia, hepatomegalia, esplenomegalia, cefaléia, dores musculares e articulares, anorexia, vômito, diarreia e também insuficiência cardíaca. Ressalta-se que muitas vezes nesta fase o paciente se apresenta assintomático, acompanhado apenas de febre, o que dificulta o diagnóstico médico. Já a fase crônica, caracterizada por diminuição da parasitemia periférica, pode ser categorizada em cinco formas: indeterminada, sintomática, cardíaca, digestiva e neurológica, sendo a primeira a mais comum (TEIXEIRA, 2007).

Para o tratamento apenas dois fármacos estão disponíveis - Nifurtimox e Benzonidazol - cujo uso frequentemente ocasiona o aparecimento de efeitos colaterais inviabilizando sua utilização como droga ideal (URBINA & DOCAMPO, 2003). O percentual de cura destas drogas se apresenta em torno de 60-80% nos casos agudos e, de 10-20% nos crônicos. Um dos principais motivos associados a estas variações nos padrões de cura, são as diferentes

suscetibilidades do parasita a estes medicamentos. Em estudos preliminares recentes, SOUZA *et al.* (2010) demonstraram a eficácia do selênio como uma terapia adjuvante para alterações cardíacas já estabelecidas pela infecção por *T. cruzi*. Atualmente, no Brasil, somente o Benzonizadol está disponível para o tratamento.

Mais de 200 espécies de reservatórios silvestres já foram encontradas infectadas por *T. cruzi*, dentre elas: marsupiais, carnívoros, quirópteros, lagomorfos, roedores e primatas não humanos. Nesse contexto, a DC pode apresentar dois ciclos epidemiológicos distintos: o silvestre e o doméstico. O primeiro ciclo é estritamente enzoótico no qual o parasito circula entre os triatomíneos e em um grande número de reservatórios naturais. No segundo ciclo, doméstico e antropozoonótico, o parasito circula entre o homem e seus animais domésticos por intermédio de um vetor sinantrópico (BARRETTO, 1979; LAINSON *et al.*, 1979). Existe ainda um terceiro ciclo, de caráter peridoméstico, no qual mamíferos como os gambás associam o ciclo silvestre ao doméstico (FORATTINI, 1980; CARCAVALLO, 1985; MORENO & CARCAVALLO, 1999).

A principal forma de transmissão em vastas áreas da América Latina é a vetorial, sendo dela dependentes as demais, tais como a transplacentária e a oral (GRANT *et al.*, 1987; KIRCHHOFF *et al.*, 1987; WHO, 1991; SCHOFIELD, 1994; DIAS, 2006; COURA & DIAS, 2009). Esta última forma de transmissão tem sido registrada com bastante frequência, em áreas anteriormente indenes para transmissão da doença de Chagas humana. Desde as primeiras descrições de casos humanos da DC na Amazônia por SHAW e colaboradores em 1969 ocorreram até o ano 2000, cerca de 205 casos, sendo 178 agudos. Dentre esses 178, cerca de 67 casos apresentaram-se na forma de microepidemias familiares por transmissão oral, geralmente associada ao consumo de suco de açaí contaminado (NÓBREGA *et al.*, 2009). Observa-se um novo cenário epidemiológico nestas áreas com padrões distintos de transmissão: transmissão oral, na qual triatomíneos infectados possivelmente são triturados contaminando diversos alimentos, principalmente o suco de açaí (PEREIRA *et al.*, 2009); transmissão vetorial associada à ocupação profissional (COURA *et al.*, 1994); e transmissão vetorial sem domiciliação.

Recentemente tem sido atribuída atenção especial à transmissão vertical da doença de Chagas em países não endêmicos, nos quais estima-se que o número de pessoas infectadas distribuídas entre os quatro continentes (América do Norte, Europa, Ásia e Oceania) seja superior a 390 mil indivíduos (COURA & VIÑAS, 2010; RASSI-JR *et al.*, 2010). Na Europa, a incidência de casos de DC parece estar relacionada ao intenso fluxo migratório de latinoamericanos chagásicos para estas regiões (DEVELOUX *et al.*, 2010). Neste contexto, para COURA & VIÑAS (2010), os principais mecanismos de transmissão do *T. cruzi* estão ligados a transfusão sanguínea, transmissão vertical e transplante de órgãos.

Pelo exposto, considerando o grande número de reservatórios animais do *T. cruzi*, atrelado a ausência de drogas que possam ser utilizadas em larga escala, verifica-se a impossibilidade do controle na perspectiva do esgotamento das fontes de infecção. A inexistência de imunizantes não permite que se faça o controle pela proteção da população suscetível. Deste modo, resta como alternativa o controle do vetor por meio do emprego regular e sistematizado de inseticidas de ação residual nas habitações infestadas (controle químico) associado à melhoria das mesmas, de modo a tornar a unidade domiciliar (UD) refratária à colonização pelos triatomíneos (controle físico) (VILLELA *et al.*, 2005).

1.2. Importância epidemiológica de *Triatoma sordida*

Os triatomíneos pertencem a ordem Hemiptera, subfamília Triatominae e são conhecidos popularmente no Brasil como barbeiros, bicho de parede, furão, cascudo, percevejão, piolho de piassava, gandério, bicimo, chupão, fincão, bicudo, procotó e vum vum. Possuem hábito alimentar hematofago, embora já tenha sido relatado na literatura o coprofagismo e a hemolinfagia (LENT & WIGODZINSKY, 1979; SANDOVAL *et al.*, 2000). São insetos hemimetábolos e possuem cinco estádios ninfais antes de chegar a fase de adulto sendo que em todos são capazes de transmitir o *T. cruzi* ao hospedeiro vertebrado (mamíferos).

Até o momento foram descritas 141 espécies de triatomíneos distribuídas em seis tribos e 18 gêneros (GALVÃO *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2006; GALVÃO & ANGULO, 2006; BÉRENGER & BLANCHET, 2007; COSTA & FELIX, 2007; MARTÍNEZ *et al.*, 2007). A espécie alvo deste trabalho foi *Triatoma sordida*, Stål 1859.

Trata-se de uma espécie de porte mediano, com comprimento aproximado de 14-19 mm nos machos e 15-20 mm nas fêmeas. Exibe coloração variando entre marrom-claro e escuro, com manchas amarelo-palha na cabeça, pronoto, escutelo, hemiélitros, patas e conexivo. Este último se apresenta claro com manchas escuras que se assemelham a notas musicais (figura 1).



Fonte: Cyro J. Soares

Figura 1. Fêmea de *Triatoma sordida* Stål 1859.

T. sordida apresenta como centro de dispersão as áreas de cerrado brasileiras estendendo-se a Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (FORATTINI, 1980). Possui uma ampla valência ecológica que lhe permite habitar vários ecótopos e utilizar diversas fontes alimentares (FORATTINI *et al.*, 1975; DIOTAIUTI *et al.*, 1993).

No ambiente silvestre, *T. sordida* é encontrado embaixo de cascas e dentro de ocos de árvores secas e esparsadas, típicas da região de cerrado (FORATTINI *et al.*, 1971a ; DIOTAIUTI *et al.*, 1993), podendo secundariamente ser encontrado na copa de palmeiras (BARRETTO *et al.*, 1969). Trata-se de uma espécie nativa do país e, portanto, não erradicável.

T. sordida é encontrado em baixas densidades no meio silvestre e com menor frequência quando a cobertura florestal se mostra mais ampla (FORATTINI *et al.* 1971b ; DIOTAIUTI *et al.*, 1993). O meio natural não é considerado estável para as populações do vetor pela existência de predadores, competição com outros triatomíneos, escassez do encontro de populações de hospedeiros apropriados e seus ninhos, levando-os inclusive a se alimentarem de répteis (DIOTAIUTI *et al.*, 1993). Quando o meio natural é degradado, estes apresentam a tendência de buscar ecótopos mais estáveis tais como o peridomicílio, que oferece abrigo, alimento e condições microclimáticas necessárias para o desenvolvimento de suas populações (FORATTINI *et al.*, 1971b; DIOTAIUTI *et al.*, 1993; SCHOFIELD *et al.*, 1999).

Esta espécie de triatomíneo está frequentemente associada ao peridomicílio e seus anexos sendo, portanto, nestas situações, um transmissor secundário da doença de Chagas. Sua marcada ornitofilia a faz um vetor menos importante que *Panstrongylus megistus* e *Triatoma brasiliensis* ainda que tanto quanto *Triatoma pseudomaculata* (SILVEIRA *et al.*, 1993).

Sobre os padrões de dispersão da espécie, FORATTINI *et al.* (1971b) formularam a hipótese que esta possa ocorrer por meio de dispersão passiva, em montes de lenha, de uma unidade domiciliar para outra. O encontro de ninfas desta espécie entremeadas a penas de pardais sugere dispersão por aves. FORATTINI *et al.* (1975) afirmam que a mobilidade de *T. sordida* é considerável e condiz com sua grande valência ecológica. Apresenta altas taxas de dispersão ativa e o período de invasão das casas por adultos é principalmente no final do primeiro semestre (FORATTINI *et al.*, 1974).

De acordo com um levantamento realizado em 1940 no Estado de Minas Gerais, a espécie *P. megistus* representava 79,8% dos triatomíneos capturados, *T. sordida* 9,7% e *Triatoma infestans* 9,3%, com taxas de infecção pelo *T. cruzi* de 41,3% , 6,0% e 15%, respectivamente. Em 1951, a situação não apresentava mudança substancial, exceto pelo avanço do *T. infestans* para o oeste do Estado (DIOTAIUTI *et al.*, 1997). Em 1979, a infecção global dos triatomíneos era de 6,6% e a espécie prevalente era o *T. infestans* (64,6%). Com a

implantação das atividades de controle, em 1989, chegou-se a uma quase eliminação desta espécie no Estado, e a uma significativa redução na população intradomiciliar de triatomíneos, o que resultou numa taxa global de infecção de 0,6%. As capturas de *T. sordida*, no entanto, já em 1985, mostravam uma forte tendência de elevação, sendo em 1989 cerca de quatro vezes maior que a referida para o ano de 1979 (DIOTAIUTI *et al.*, 1995 a,b).

DIOTAIUTI *et al.* (1998) avaliando as ações de controle no município de Porteirinha, Minas Gerais, revelaram que dentre as 406 UD`s pesquisadas, cerca de 142 (34,9%) estavam infestadas por *T. sordida*, sendo que os ecótopos mais freqüentemente infestados foram montes de madeira, cercas, árvores, montes de telha, galinheiros e chiqueiros, em ordem decrescente. Atualmente, no Brasil, *T. sordida* é a espécie de triatomíneo mais capturada no ambiente artificial, sendo encontrada em Minas Gerais, Goiás, Bahia e sul do Tocantins. No Brasil Central é a espécie que representa maior risco para a transmissão natural da DC (SILVEIRA, 2000).

Recentemente, em Macaúbas, Bahia, foram registrados sete casos agudos de DC, dos quais dois pacientes evoluíram para óbito. A investigação entomológica incriminou *T. sordida* como potencial vetor responsável pela ocorrência dos casos. Foi encontrada uma população intradomiciliar na pia da cozinha, local onde eram armazenados os alimentos que, provavelmente foram contaminados e ingeridos pelos moradores da residência (DIAS *et al.*, 2008). A espécie também está associada à recente ocorrência de transmissão humana ao sul do Estado de Tocantins (Comunicação pessoal – Dra. Liléia Diotaiuti).

1.3. Controle vetorial da doença de Chagas

As primeiras tentativas profiláticas para o controle dos triatomíneos no Brasil ocorreram na década de 20, porém, sem resultados muito satisfatórios. Ensaios incluindo pó de piretro, cianogás, lança-chamas e soda cáustica foram realizados, contudo, todas estas técnicas não foram adotadas de forma sistematizada considerando a impossibilidade de seu uso em larga escala bem como seu pouco efeito residual no ambiente (DIAS, 2002).

De fato, até a década de 40 pouco se avançou na perspectiva do controle dos vetores da DC. Neste contexto, o surgimento dos inseticidas sintéticos representou uma nova possibilidade para o controle vetorial (DIAS *et al.*, 2002).

O marco inicial do controle da DC no Brasil foi a criação do “Centro de Estudos e Profilaxia da Doença de Chagas” pela Fundação Oswaldo Cruz no ano de 1943 em Bambuí (área endêmica em Minas Gerais) – sob coordenação do Dr. Henrique Aragão e chefia do Dr. Emanuel Dias (DIAS *et al.*, 1952). Nesta época foram testados os primeiros inseticidas efetivos contra o vetor domiciliado e realizados novos inquéritos soroepidemiológicos e

eletrocardiográficos. Os grandes programas regionais de controle só adquiriram expressividade nos anos 60, em São Paulo, e ao final da década de 70 no país como um todo.

Os primeiros inseticidas utilizados no controle de triatomíneos no Brasil foram os organoclorados (OC) (PINCHIN *et al.*, 1980). Em 1942 foram realizados os primeiros ensaios biológicos ao Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT). LENT & OLIVEIRA (1944) demonstraram em ensaios de campo que a ação tóxica deste ativo químico se processava mais rapidamente em adultos do que em formas jovens, com lenta penetração do produto no tegumento das ninfas, sem ação ovicida, protegendo as unidades domiciliares de reinfestações triatomínicas por um período de três a quatro meses. DIAS & PELLEGRINO (1948), em parceria com o Departamento Nacional de Endemias Rurais (DENERu), realizaram ensaios de suscetibilidade de triatomíneos com o DDT aspergido em superfície de barro, avaliando também o efeito residual do produto em diferentes concentrações e em diferentes substratos assim como a logística de aplicação em grande escala, nas vizinhanças de Uberaba/MG. Foi constatada sua ineficiência para o controle triatomicida.

Em paralelo ao fracasso do DDT, ensaios de melhoria habitacional e educação sanitária foram incentivados. Neste momento o hexaclorobenzeno (BHC) começou a ser aventado como uma possibilidade no controle químico dos triatomíneos no Brasil. Em 1947, BUSVINE & BARNES verificaram, em condições de laboratório, intensa mortalidade de *Rhodnius prolixus* expostos a este inseticida, contudo, o mesmo apresentou pequena ação residual. DIAS & PELLEGRINO (1948) em ensaios de campo realizados na localidade de Água Comprida no município de Bambuí/MG, comprovaram que esse inseticida, quando aplicado na dose de 1,0 g de ingrediente ativo/m², em no mínimo dois ciclos de borrifações intervalados por 30-60 dias, preservava o domicílio de infestações por triatomíneos até cinco meses após o tratamento.

Como resultado deste e de outros trabalhos em 1950, Emmanuel Dias conduziu a primeira grande campanha utilizando o BHC e o tiofosfato para o controle triatomínico junto ao Serviço Nacional de Malária (SNM), em 125 municípios de Minas Gerais. Foi preconizado um reconhecimento geográfico inicial, com borrifação seletiva, sendo que nas localidades rurais nas quais a maior parte das casas, pelo tipo de construção, favoreciam a colonização intradomiciliar dos triatomíneos, recomendava-se a cobertura integral. Foi realizado um primeiro expurgo em dois ciclos com curto intervalo de tempo, em áreas contíguas, seguindo-se de uma etapa de consolidação e vigilância (DIAS, 1957).

Ressalta-se que as extensas campanhas em Minas Gerais utilizando o BHC (pó molhável: 500 mg i.a. /m²), aplicado em toda a extensão e profundidade de cada fresta ou rachadura, no intra e peridomicílio foram responsáveis pela redução em 90% da população triatomínica após quatro meses de tratamento (PINTO & BICALHO, 1952). Estas experiências foram utilizadas para delinear o planejamento municipal do controle vetorial da DC, no que se

refere aos aspectos administrativos, operacionais e metodológicos para as atividades de rotina (SALGADO & PINTO, 1952; BUSTAMANTE & CARVALHO, 1957).

No Brasil, em meados de 1954, o SNM decidiu testar o dieldrin como uma possibilidade de substituição ao BHC. Os ensaios realizados em duas localidades de Anápolis (Goiás), revelaram a ocorrência de intoxicações graves não só nos aplicadores, mas também nos animais domésticos. Deste modo, devido à elevada toxicidade somado ao alto custo, sua utilização foi descartada (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1956).

Nos anos 50 o Instituto Nacional de Endemias Rurais (INERu), criado na década anterior para o controle geral de endemias, se tornou a instituição responsável pela investigação da doença de Chagas, cujo controle passou a estar a cargo do Departamento Nacional de Endemias Rurais (DENERu), seguido em 1967 pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) e, em 1991 pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) (DIAS, 2002).

Entre 1950 e 1975, as atividades de controle se mostraram pontuais e descontínuas em decorrência de um aporte insuficiente de recursos para dar atendimento a toda a extensa área com transmissão vetorial, exceto em São Paulo. Descontinuidades político-administrativas também contribuíram para este quadro. Certamente, muitos casos de doença de Chagas ocorreram nesse período, contribuindo significativamente para a alta prevalência de chagásicos crônicos que hoje demandam atendimento (SCHOFIELD *et al.*, 2006).

Em 1959, os carbamatos (CB) foram introduzidos no Brasil. O propoxur foi o único inseticida deste grupo que recebeu real atenção visando o controle dos barbeiros. Sua ação tóxica contra triatomíneos foi investigada, tendo sido demonstrada sua eficácia e propriedade ovicida (SHENONE *et al.*, 1972). Outro carbamato que mereceu destaque foi o bendiocarb, que associado ao propoxur foi recomendado no passado pela WHO para o combate triatomínico (PINCHIN *et al.*, 1984).

Em 1973, o malathion foi avaliado em estudos de campo e laboratório por solicitação do INERu, tendo uso recomendado principalmente por apresentar ação ovicida (SHERLOCK & MUNIZ, 1975; SHERLOCK *et al.*, 1976). Contudo, além de sua baixa persistência no ambiente, este produto exigia aplicações em dosagens mais altas do que as utilizadas para os organoclorados BHC e dieldrin. Outros organofosforados (OP) que foram testados com sucesso para o controle de triatomíneos no Brasil, mas que não foram utilizados na prática foram o fenitroton, o clorpirifós e o pirimifós-metila (FOX *et al.*, 1966).

A partir de 1964 foi introduzido as atividades de controle no país o conceito de “arrastão”, que significou o tratamento com inseticida em todas unidades domiciliares da área de interesse. Em 1968, diferentemente do restante do país, São Paulo adotou a metodologia do

“expurgo seletivo” de focos residuais, na qual somente as UDs positivas para a presença de triatomíneos eram borrifadas, o que significava otimização de tempo, recursos, trabalho, além de reduzir a contaminação ambiental e promover a educação sanitária despertando o interesse dos moradores pelas borrficações (PEDREIRA de FREITAS, 1963; WANDERLEY *et al.*, 2006)

Em 1977/78 as ações de controle foram sistematizadas e estruturadas na forma de programa com alcance nacional, no qual foi priorizado de início o controle da transmissão primária vetorial em toda área endêmica do Brasil concentrando o máximo dos esforços no combate ao *T. infestans*. A manutenção de um índice de infestação domiciliar que inviabilizasse a transmissão em áreas com predominância de espécies de maior valência ecológica, tais como *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *T. pseudomaculata*, dentre outras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1980) também foi priorizada. O modelo de controle da DC foi normatizado para o Brasil tendo como componentes quatro fases sucessivas de trabalho: i) fase preparatória; ii) fase de ataque; iii) fase de avaliação (consolidação) e iv) fase de vigilância epidemiológica (DIAS *et al.*, 2002).

Ao final da década de 70, o Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) alcançou bons índices de execução e impacto, com uma cobertura de aproximadamente 60% em atividades de pesquisa entomológica e borrficação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1980). Entre 1979 e 1985, com a priorização do PCDCh, foram atualizadas as informações sobre a distribuição dos triatomíneos e a prevalência da infecção humana. Foram promovidos inquéritos entomológicos e sorológicos, por amostragem, em todo o país. Com base nas informações obtidas foram redesenhadas as áreas endêmicas, identificadas aquelas de maior risco e, a partir daí, priorizadas as ações de controle (DIAS *et al.*, 2002).

No Brasil, o inquérito sorológico nacional realizado entre 1975 e 1980, por amostragem da população rural, residente em área endêmica e não endêmica para DC, indicou uma soroprevalência média para o país de 4,2%. Em escolares de 7 a 14 anos, residentes de municípios da área endêmica, a soro-reatividade era de aproximadamente 0,2%, entre 1986 e 1991. *T. infestans*, encontrado inicialmente em 711 municípios, estava reduzido a 98 municípios, acompanhado de diminuída densidade triatomínica (SILVEIRA & VINHAES, 1998).

Na década de 80, a área endêmica original da DC compreendia 18 países, nos quais *T. infestans* (países do Cone Sul) e *R. prolixus* (países Andinos e da América Central) eram as espécies mais adaptadas ao domicílio. A prevalência humana pela infecção de *T. cruzi* era de 17 milhões de casos, com cerca de 100 milhões de pessoas expostas ao risco de contaminação, representando aproximadamente 25% de toda a população da América Latina (DIAS, 2009). No mesmo período, 36% do território brasileiro era considerado endêmico para a DC. Essa área correspondia a 2.493 municípios distribuídos nos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito

Santo, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Sergipe e Tocantins (MONCAYO & SILVEIRA, 2009).

Em 1983, o PCDCCh alcançou a totalidade das áreas com triatomíneos domiciliados e o controle vetorial foi exercido em caráter pleno. O programa foi priorizado com recursos financeiros de um fundo social do governo federal denominado FINSOCIAL, que representou um acréscimo orçamentário de aproximadamente 45%, destinados para a contratação de recursos humanos e aquisição de insumos. Com esse complemento orçamentário, o programa atingiu, pela primeira vez, cobertura integral da área endêmica do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1985).

A partir de 1986, devido ao surgimento de epidemias de Dengue, observou-se uma redução nas atividades de combate aos triatomíneos, contudo, a borrifação foi mantida em amplas áreas do país (NOGUEIRA *et al.*, 1999; SCHATZMAYR, 2000; BARBOSA da SILVA *et al.*, 2002). Neste mesmo período, verificou-se a eficácia de vários piretróides (PI) com comprovada ação triatomicida, sendo a partir de então adotados no PCDCCh (DIOTAIUTI *et al.*, 1994; DIAS, 2002).

Paralelamente à eliminação dos focos intradomiciliares, a infestação peridomiciliar assumiu maior importância e se tornou o maior desafio a ser enfrentado no controle vetorial, considerando como elementos importantes no combate triatomínico: a conservação da unidade domiciliar, o manejo/ordenação do peridomicílio e a detecção de exemplares em baixas densidades. Surgem os primeiros trabalhos sobre vigilância epidemiológica, tanto de forma passiva e participada, envolvendo a comunidade, quanto de forma ativa e institucional, iniciada em São Paulo (DIAS E GARCIA 1976; ROCHA & SILVA, 1979).

Entre as décadas de 80 e 90, o PCDCCh se estendia a 2450 municípios da área endêmica. No início da década de 80, no Estado de Minas Gerais, relatórios oficiais indicavam que *T. infestans* era responsável por 64,6% dos triatomíneos capturados pelo PCDCCh, seguido por *T. sordida* e *P. megistus*. Em 1989, após nove anos de borrifação, verificou-se uma redução de 68% na quantidade de exemplares de *T. infestans* capturados e um aumento no índice de *T. sordida*, seguido por *P. megistus* (FUNASA, 1995). Neste mesmo período, São Paulo alcançou a eliminação virtual do *T. infestans* e da transmissão vetorial decorrente desta espécie (DIAS, 2002).

Ressalta-se que entre as décadas de 50 a 90 várias alternativas biológicas para o controle triatomínico foram testadas, contudo sem sucesso. Dentre elas, tem-se uso de nematóides, fungos e himenópteros predadores de ovos (DIAS & SCHOFIELD, 1999).

Na década de 90, segundo o Banco Mundial, o peso relativo da DC, comparado com

outras enfermidades transmissíveis endêmicas da América Latina e Caribe, e medido por “Anos de Vida Ajustado à Incapacitação” (AVAI), só era inferior ao conjunto das enfermidades diarreicas, doenças respiratórias e da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (DIAS, 2000, 2001). Análise dos PCDCh revelou que entre 1975 e 1995 teriam sido prevenidas 2.339.000 novas infecções e 337.000 óbitos por doença de Chagas, o equivalente a 11.486.000 AVAI. Estes números indicam ganho da ordem de US\$ 17,00 para cada US\$1,00 aplicado nas atividades de controle, o que classifica a DC na categoria das intervenções com alta efetividade (AKHAVAN, 1998).

Sob essa perspectiva em 1991, Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai, apoiados pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS), criaram uma Comissão Intergovernamental conhecida como a Iniciativa do Cone Sul (INCOSUL) com vistas a erradicar a infestação domiciliar por *T. infestans* e interromper a transmissão do *T. cruzi* por via transfusional (SCHOFIELD *et al.*, 2006). Em 1997, foram estabelecidas mais duas iniciativas: a Iniciativa do Pacto Andino (IPA), composta pela Colômbia, Equador, Peru e Venezuela, e a Iniciativa dos Países da América Central (IPCA), formada por El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Belize, Costa Rica, México e Panamá. Em ambos os casos, foram priorizadas a eliminação de *R. prolixus* e *Triatoma dimidiata*, junto com *Rhodnius pallescens* no Panamá e *Rhodnius equadoriensis* no Norte do Peru (DIAS, 2002).

A FUNASA, enquanto órgão do Governo Federal, no ano de 1999, acompanhou o processo de descentralização do PCDCh. Este, assim como outros programas de combate a endemias, foi reformulado com a redefinição das atribuições dos diferentes níveis de governo no planejamento e execução do mesmo. Com a publicação da portaria de n.º 1.399, do Ministério da Saúde de 15 de dezembro de 1999 e, posteriormente, da portaria de n.º 1.172, do Ministério da Saúde de 15 de julho de 2004, a execução de ações diretas do PCDCh passou a ser pactuada e desempenhada pelos municípios, cabendo aos níveis regional e estadual a fiscalização das ações, e ao nível federal o financiamento e a complementação de atividades deficitárias dos Estados. Tais pactuações foram metas estabelecidas entre os três níveis de gestão por meio das Comissões Interegadores Bipartite (CIB) e Comissões Interegadores Tripartite (CIT) baseadas na classificação de risco para a transmissão da DC. Cabe a CIB e a CIT estipular um percentual mínimo de UDs que devem ser visitadas em cada um dos municípios e nas quais se procederia uma busca ativa (Pesquisa Ativa – PA) de triatomíneos. Também prevê a borrifação de todas as UDs que apresentem foco triatomínico, seja esse confirmado por meio de PA ou de atendimento às notificações (BRASIL, 1999; BRASIL, 2004).

Entre 1980 e 2000 verificou-se uma progressiva eliminação do *T. infestans* em vários Estados brasileiros somada a uma redução significativa nos índices de infestação intradomiciliar por triatomíneos em todo o país. Neste momento apareceram como desafios a manutenção da

vigilância epidemiológica e o controle triatomínico no âmbito peridomiciliar, local onde se encontravam os principais focos residuais (DIAS, 2002).

Em 2005, em decorrência de 24 casos de infecção humana por *T. cruzi* via oral em Santa Catarina, foi realizada uma redefinição das áreas de risco embasada em variáveis entomológicas, ambientais, demográficas e de morbidade com objetivo de readequar os antigos modelos de vigilância epidemiológica aos novos padrões de transmissão (CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005).

Atualmente, o PCDCCh está inserido dentro da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS). Passados 19 anos após a criação do INCOSUL as estratégias de controle da DC contribuíram para a redução significativa do índice de incidência que, na década de 90, registrava 700.000 novos casos por ano e, em 2006 diminuiu para 41.500 casos. As mortes foram reduzidas de 45.000 para 12.500 e o número de países endêmicos, de 18 para 15 (WHO, 2006). O controle nos bancos de sangue atingiu 100% de cobertura e o índice de infestação das casas por *T. infestans* foi reduzido de 166.000 insetos capturados para pouco mais de 40 exemplares em 2005, o que corresponde a uma redução de infestação de 99,7% para essa espécie (DIAS, 2006; FERREIRA & SILVA, 2006; MONCAYO & SILVEIRA, 2009).

Deste modo, em 2006 o Brasil recebeu da OPAS a “Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da doença de Chagas por *T. infestans*” (DIAS, 2006). Contudo, ressalta-se que considerando a diversidade da fauna triatomínica brasileira com espécies nativas de comprovada importância epidemiológica, a vigilância epidemiológica (VE) é ferramenta fundamental para a manutenção nos níveis de controle vetorial obtidos até então, bem como a reduzida taxa de novos casos.

Pelo exposto, é possível concluir que o controle químico dos triatomíneos tem se mostrado factível e eficaz, quando executado com apuro técnico e rigor metodológico e operacional necessários. Contudo, contradizendo as expectativas de alguns pesquisadores, em 2008 o encontro de três populações de *T. sordida* de Minas Gerais com suscetibilidade alterada a deltametrina alertou para a necessidade em se desenvolver estudos referentes ao potencial genético da resistência de triatomíneos a inseticidas de modo a definir a frequência com que este fenômeno vem ocorrendo, as áreas afetadas bem como identificar os mecanismos envolvidos (PESSOA, 2008).

Desde novembro de 2009, a legislação que define diretrizes para a Vigilância em Saúde e seus diversos constituintes, dentre elas a Vigilância Epidemiológica, é a Portaria de n.º 3.525, que pautada nas diretrizes do Pacto pela Saúde, delineia o papel da VE e determina a sua inserção no contexto da Atenção Básica à Saúde. Em relação as portarias anteriores também foi alterado o processo de certificação dos municípios que até então era realizado por meio de uma

comprovação da capacidade técnica do mesmo para conduzir as ações de VE, sendo substituída pela adesão ao Pacto pela Saúde (BRASIL, 2009).

Hoje, existem quatro grandes desafios referentes a doença de Chagas: i) a sustentabilidade dos níveis de controle atingidos, uma vez que com a descentralização das ações de controle da DC para a gestão municipal poderá ocorrer uma redução da prioridade das ações; ii) a perda de reconhecimento da importância da doença; iii) os novos padrões de transmissão cada vez mais comuns no Norte do país e iv) os relatos recentes, contudo cada vez mais constantes, de resistência a inseticida.

1.4. Resistência a inseticidas

Nas últimas décadas, o controle químico de populações de insetos com importância em saúde pública tem sido prejudicado pela emergência de populações com elevados níveis de resistência a inseticida destacando-se: *Blattella germanica* (ZHAI & ROBINSON, 1992; ANSPAUGH *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 2000), *Pediculus humanus capitis* (LEE *et al.*, 2003; VASSENA *et al.*, 2003), *Cimex hemipterus* e *Cimex lectularius* (LOFGREN *et al.*, 1958; MYAMBA *et al.*, 2002), *Haematobia irritans* (GUGLIELMONE *et al.*, 2002), *Anopheles sacharovi* (HEMINGWAY *et al.*, 1992), *Anopheles arabiensis* (MATAMBO *et al.*, 2007), *Anopheles gambiae* (BROOKE *et al.*, 2006), *Anopheles funestus* (HARGREAVES *et al.*, 2000), *Culex tritaeniorhynchus* (TAKAHASHI & YASUTOMI, 1987; KARUNARATNE & HEMINGWAY, 2000), *Culex quinquefasciatus* (MAGNIN *et al.*, 1988; BISSET *et al.*, 1991; BRACCO *et al.*, 1999), *Aedes aegypti* (GEORGHIOU *et al.*, 1987; RAWLINS & WAN, 1995; KUMAR *et al.*, 2002; BRENGUES *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2003; BRAGA *et al.*, 2004; PEREIRA da CUNHA *et al.*, 2005; VALLE *et al.*, 2006; BRAGA & VALLE, 2007; MARTINS *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2009).

A resistência a um inseticida se traduz em uma diminuição da mortalidade observada na população submetida a um tratamento constante. Trata-se de uma característica, que se manifesta com o predomínio de indivíduos que toleram doses letais sobre indivíduos chamados sensíveis nas primeiras aplicações do produto, ocasionando pressão de seleção nas populações. Este fenômeno tem como base a variabilidade genética de populações naturais, a partir da qual, por pressão do inseticida, determinados fenótipos podem ser selecionados e, conseqüentemente, aumentarem em frequência (TABASHNIK & ROUSH, 1990).

Até recentemente, a resistência de triatomíneos a inseticida era considerada pontual e com pouca probabilidade de ocorrer já que o ciclo destes insetos é bastante longo, apresentando menor oportunidade de selecionar indivíduos resistentes (BROWN & PAUL, 1971; CHAMP & DYTE, 1976; GORLA & SCHOFIELD 1989; SCHOFIELD 1989; PACHECO *et al.*, 1990;

GORLA 1991; GORLA 1994).

A primeira evidência bem documentada deste fenômeno foi a de populações venezuelanas de *R. prolixus* ao dieldrin, no Estado de Trujillo. Durante 1976 e 1977, populações de *R. prolixus* e *Triatoma maculata* revelaram resistência ao dieldrin e ao propoxur (GONZÁLEZ-VALDIVIESO *et al.*, 1971; COCKBURN, 1972; NOCERINO & HERNANDEZ, 1986). Na Venezuela, NELSON & COLMENARES (1979) relataram populações de *R. prolixus*, provenientes da localidade de Santo Domingo, resistentes ao dieldrin e ao BHC. Na Colômbia, FOX *et al.* (1966) encontraram populações de *R. prolixus* com indicativo de resistência ao dieldrin e ao malathion. Populações de *T. infestans* do sul do Peru demonstraram alta sobrevivência ao dieldrin FOX *et al.* (1966). VASSENA *et al.*, (2000) relataram população brasileira de *T. infestans* resistente a deltametrina (razão de resistência - RR 7,0), β -ciflutrina (RR 3,6) e a cipermetrina (RR 3,3) e de *R. prolixus* venezuelana resistente a cipermetrina (RR 12,4). Na Argentina, VASSENA & PICOLLO (2003) registraram níveis de resistência incipiente a deltametrina em quatro amostras de *T. infestans* procedentes das províncias de Catamarca (RR 2,6), San Luis (RR 3,0), Mendoza (RR 3,8) e Salta (RR 5,6) atribuída ao aumento da atividade de esterases e oxidases de função mista GONZÁLEZ-AUDINO *et al.* (2004). PICOLLO *et al.* (2005) demonstraram resistência a deltametrina em *T. infestans* provenientes de El Chorro (RR 99,0), La Toma (RR 86,9), El Sauzal (RR 50,5), e Salvador Mazza (RR 133,1) atribuída ao aumento de esterases (SANTO-ORIHUELA *et al.* 2008). TOLOZA *et al.* (2008) relataram resistência em ovos de *T. infestans* oriundas de Salvador Mazza (RR 114,28). No Brasil, PESSOA (2008) relatou níveis de resistência incipiente a deltametrina em populações de *Triatoma sordida* capturadas nos municípios de Presidente Juscelino (RR₅₀ 5,5), Bocaiúva (RR₅₀ 6,2) e Coração de Jesus (RR₅₀ 6,8), no Estado de Minas Gerais. GERMANO *et al.* (2010) avaliaram a suscetibilidade de populações de *T. infestans* da região do Gran Chaco, coletadas na Bolívia, Argentina e Paraguai a deltametrina e ao fipronil. As populações argentinas se mostraram altamente resistentes a deltametrina (RR₅₀ 247,7 a 541,6) diferentemente das bolivianas (RR₅₀ 0,9 a 133,1) e paraguaia (RR₅₀ 3,7). Com relação ao fipronil um perfil diferente foi observado, com altos valores de resistência para Bolívia (RR₅₀ 0,19 a 92,7) e baixos para Argentina (RR₅₀ 1,09 a 1,9). ACEVEDO *et al.* (2011) relataram populações dos vales andinos bolivianos de *T. infestans* resistentes a deltametrina (RR₅₀ 1,9 a 17,4) e ao fipronil (RR₅₀ 0,5 a 139,2). A persistência atual de *T. infestans* e a transmissão contínua da doença de Chagas nos vales Andinos e no Gran Chaco na Bolívia tem sido questionadas considerando que são exatamente as regiões nas quais populações silvestres destes vetores têm sido encontradas. Essas observações poderiam indicar uma possível relação entre os dois acontecimentos (NOIREAU, 2009).

AMELOTTI *et al.* (2011) estudando uma população de insetário de *T. infestans*, avaliou a suscetibilidade de ninfas geradas por fêmeas individuais, com idades distintas, a deltametrina.

Foi observado que as fêmeas mais velhas geravam proles mais suscetíveis enquanto as mais jovens, proles mais resistentes. Os autores, partindo de tal observação, inferiram que os resultados dos bioensaios para verificação do status de suscetibilidade destes vetores a inseticidas podem variar dependendo da estação do ano, na qual a coleta dos insetos for realizada considerando a dinâmica do ciclo de vida destes insetos em concordância com condições ambientais.

A dinâmica da evolução da resistência depende da biologia populacional da espécie em estudo, do nível de exposição a um inseticida e de como que estes fatores serão influenciados pela quantidade de indivíduos sem contato com o inseticida somado ao fluxo gênico entre as populações da área tratada e não tratada. Numerosos estudos sobre a herança da resistência a inseticidas para piretróides demonstram que este fenômeno é herdado de maneira autossômica, com distintos graus de dominância ou recessividade incompleta. GERMANO *et al.*, (2010) demonstraram em estudos realizados com *T. infestans*, que se trata de um caráter herdado de maneira autossômica e semidominante. Quanto ao número de genes envolvidos no fenômeno da resistência, existem evidências que indicam ser este poligênico.

A resistência a inseticidas é o resultado de alguma modificação que pode afetar características fisiológicas ou comportamentais dos insetos. Independente do caráter mono ou polifatorial da resistência, os mecanismos responsáveis por ela podem ter origem comportamental, fisiológica e/ou bioquímica além da modificação do sítio alvo (BROGDON & MCALLISTER, 1998).

A resistência de origem comportamental se refere a capacidade do inseto em evitar a presença do inseticida, por meio de modificações genéticas nos receptores periféricos dos estímulos e/ou nos sistemas centrais de processamento dos mesmos (LINES *et al.*, 1987; MBOGO *et al.*, 1996; MATHENGE *et al.*, 2001). Compostos do tipo DDT e PI podem induzir mudanças comportamentais nos insetos como, por exemplo, redução da proporção de mosquitos que entram nas habitações e mudança no período de maior atividade dos mesmos (HEMINGWAY *et al.*, 2004). LOKWOOD *et al.* (1984) e ROBERTS & ALECRIM (1991) relataram alteração comportamental de *Anopheles darlingi* em resposta ao DDT na Amazônia. Dois meses após a aplicação do produto foi observada seleção de fêmeas que entravam nas habitações, efetuavam o repasto sanguíneo, contudo, saíam rapidamente sem pousar nas paredes. Sabe-se também que vários insetos podem evitar contato, por exemplo, com plantas tóxicas típicas de seu nicho ecológico. Esse tipo de mecanismo pode ser determinado geneticamente (como a escolha por sítio de postura) ou pode ser resultado de um processo de aprendizagem (como a escolha, por larvas, de plantas não tóxicas, ou ainda de um estágio da planta em que a toxina se encontra em baixos níveis – ou mesmo ausente) (DEPRÉS *et al.*,

2007).

A resistência de origem fisiológica se relaciona com a redução da penetração do inseticida por alteração da cutícula do inseto e/ou na armazenagem/excreção do inseticida (APPERSON & GEORGHIOU, 1979). O espessamento da cutícula dos espécimes e/ou a alteração de algumas de suas características físicoquímicas, podem ocasionar diminuição de permeabilidade e conseqüente, redução da taxa de penetração (GEORGHIOU, 1994), podendo conduzir a resistência a vários xenobióticos. A taxa de penetração no tegumento varia consideravelmente entre as espécies e os estádios de vida. Segundo BRAGA & VALLE (2007a,b) este mecanismo normalmente está associado a um baixo nível de resistência atrelado a outros mecanismos. Tais alterações podem contribuir para a ocorrência de resistência cruzada.

MOUGABURE CUETO *et al.* (2005) investigaram a atividade inseticida de 1-dodecanol sobre o desenvolvimento da cutícula em *R. prolixus* e *T. infestans*. As ninfas I recém eclodidas (1-3 horas de idade) foram mais sensíveis que as mais velhas (24-36 horas de idade) indicando a cutícula como uma importante variável na intoxicação dos triatomíneos e uma primeira barreira a ser vencida pelo inseticida para o encontro do mesmo com seu sítio alvo. Ensaio realizados com adultos não revelaram diferenças da atividade inseticida quando o efeito da barreira da cutícula foi anulado.

Recentemente, PEDRINI *et al.* (2009) demonstraram por microscopia eletrônica de varredura que populações resistentes de *T. infestans* apresentavam maior espessura do exoesqueleto ($32,1 \pm 5,9 \mu\text{m}$), quando comparadas com populações suscetíveis ($17,8 \pm 5,4 \mu\text{m}$), sugerindo o mecanismo de penetração como o participante pela resistência de populações naturais argentinas de *T. infestans* a deltametrina.

Os mecanismos bioquímicos da resistência se fazem perceber por um aumento significativo da atividade de enzimas detoxificativas, em especial, oxidases de função mista (OFM) e esterases (EST) (RANSON *et al.*, 2002; ZERBA, 2002; HEMINGWAY *et al.*, 2004). Trata-se de uma resistência bastante plástica uma vez que estas enzimas tem funções parcialmente redundantes somado ao fato de serem codificadas por superfamílias gênicas (RANSON *et al.*, 2002).

WOOD *et al.*, (1982) e SILVORI *et al.* (1997) estudando *T. infestans* encontraram correlação entre os níveis de expressão de GST e a resistência a inseticida. CASABÉ & ZERBA (1981) relataram resistência de *T. infestans* a organofosforados devido ao aumento da atividade de esterases. VASSENA *et al.* (2000) atribuíram a resistência de *T. infestans* à deltametrina a um aumento da atividade detoxificativa de oxidases de função mista. AUDINO *et al.* (2004) atribuíram as esterases uma possível causa de resistência de *T. infestans* ao piretróide

deltametrina. SANTO-ORIHUELA *et al.*, (2011) incriminaram o aumento da atividade de esterases (avaliadas com os substratos alfa e pNPA) como mecanismo causal da resistência a deltametrina em populações argentinas de *T. infestans*.

Alterações nos sítios alvo (canal de sódio, acetilcolinesterases e receptores GABA) foram relatadas como mecanismo causal de resistência a inseticidas (DEVONSHIRE & MOORES, 1984; BROGDON & MCALLISTER, 1998).

Uma característica da resistência é que os indivíduos resistentes apresentam um custo adaptativo, ou seja, são menos aptos que os suscetíveis quando o produto químico não é utilizado. Este menor valor adaptativo dos indivíduos resistentes pode estar associado a uma menor viabilidade total, menor fecundidade, maior tempo para o desenvolvimento, menor competitividade para o acasalamento, maior suscetibilidade para os inimigos naturais, etc, sendo assim, o restabelecimento da suscetibilidade pode ser observado em situação em que um determinado produto não é utilizado por um certo período de tempo (GEORGHIOU, 1972).

Em contrapartida, existem mecanismos de resistência que podem ter um efeito positivo no *fitness* dos insetos. A expressão de GST, por exemplo, pode influenciar na longevidade de *Drosophila melanogaster*, provavelmente devido a proteção de tecidos contra espécies reativas de oxigênio (MCELWEE *et al.*, 2007; RIVIERO *et al.*, 2010).

A imigração de indivíduos suscetíveis de áreas não tratadas para as tratadas pode contribuir na diminuição da frequência do alelo resistente (OBARA, 2010). A rapidez com que este restabelecimento se processa depende de vários fatores, dentre estes, a espécie de inseto, o produto químico, o mecanismo de resistência, e o ecossistema (GEORGHIOU, 1972).

1.5. Toxicologia de inseticidas

1.5.1. Classificação dos inseticidas

São consideradas inseticidas as substâncias químicas utilizadas para matar insetos, sendo sua descoberta, isolamento, síntese, avaliação toxicológica e quantificação de impacto ambiental um vasto tópico de pesquisas no mundo inteiro (MARICONI, 1963).

As principais classes de ativos químicos utilizados no controle de vetores de doenças são: os organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides e fenilpirazóis (FE).

1.5.1.1. Inseticidas organoclorados

Os organoclorados são inseticidas que contém, principalmente cloro, hidrogênio e carbono em sua composição, apresentando estabilidade química elevada atribuída a existência de várias ligações dos tipos H-C, C-Cl e C-C nas moléculas. São classificados em quatro grupos: difenilalifáticos, hexaclorociclohexano, ciclodienos e policloroterpenos (D'AMATO *et al.*, 2002; WARE & WHITACRE, 2004; BLOOMQUIST, 2009). Os produtos mais conhecidos e amplamente utilizados pertencentes a este grupo são o DDT e o BHC.

1.5.1.2. Inseticidas organofosforados

Os inseticidas organofosforados derivam do ácido fosfórico e sua classificação depende dos átomos que estão unidos diretamente ao fósforo central. As subclasses mais importantes são a dos fosfatos que apresenta um oxigênio ligado a um átomo de fósforo; dos fosforotionatos ou fosforoditioatos, que apresentam enxofre; dos fosforoamidotionatos, que tem um átomo de nitrogênio, e fosfonato, que tem um átomo de carbono ligado ao fósforo central da molécula. Estes inseticidas são subdivididos em três grupos: alifáticos, derivados de fenil e heterocíclicos. Os ativos químicos mais comumente conhecidos pertencentes a este grupo são malathion, parathion, fenitrothion e temephos.

1.5.1.3. Inseticidas carbamatos

Os inseticidas carbamatos são ésteres de ácido carbâmico. Tratam-se de produtos solúveis em solventes orgânicos, inodoros, sistêmicos para as plantas, além de instáveis o que lhes confere uma rápida degradação no meio ambiente com persistência de um a três meses. Os mais utilizados em saúde pública são: o propoxur, o carbaril e o bendiocarb (CECCHINE *et al.*, 2000).

1.5.1.4. Inseticidas piretróides

Os piretróides são compostos sintéticos derivados das piretrinas naturais cuja variação está baseada na modificação na estrutura das piretrinas de tipo I e II. A maioria dos piretróides possuem dois ou três centros quirais, o que leva ao aparecimento de quatro a oito isômeros geométricos e ópticos determinando diferenças na atividade biológica (ZLOTKIN, 1999). Os piretróides mais estáveis foram obtidos mediante substituição dos centros fotolábeis dos compostos originais por derivados sintéticos com maior fotoestabilidade e uma menor toxicidade para mamíferos. São exemplos de ativos químicos deste grupo a lambdacialotrina,

cipermetrina, alfa-cipermetrina e deltametrina.

1.5.1.5. Fenilpirazóis e ciclodienos

Os fenilpirazóis (FE) pertencem a uma classe química que possui grande atividade inseticida e cuja efetividade diferencial é determinada pela adição de diversos substituintes. O modo de ação destes compostos é similar ao dos inseticidas policlorocicloalcanos bloqueando os canais de cloro dependentes do ácido gama-aminobutírico (GABA). Este efeito de envenenamento sobre o sistema nervoso central se produz mediante o antagonismo com o neurotransmissor GABA. Normalmente, quando o GABA é liberado na porção terminal da fenda pré-sináptica se une a um receptor proteico pós-sináptico que contém intrinsecamente um canal de íon de cloro. Quando o GABA se une a seu receptor, os canais se abrem e os íons de cloro fluem para dentro da fenda pós-sináptica. Esta permeabilidade do cloro pode hiperpolarizar (tornar mais negativo) a membrana fazendo com que seja mais difícil alcançar o limiar para disparo do impulso nervoso. A otimização dos fenilpirazóis e compostos afins para atividade inseticidas levou ao desenvolvimento do fipronil (BLOOMQUIST, 1996).

Os inseticidas ciclodienos, como clordano, aldrin e dieldrin, surgiram após a Segunda Guerra Mundial. A maioria deles é persistente e estável no solo; e estável, quando exposta à luz solar ou ultravioleta. Por essas características, foram usados principalmente como inseticidas para o controle de térmitas e outros insetos cujas fases larvares alimentam-se nas raízes de plantas. Os ciclodienos inibem o receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA), que, após ligação do neurotransmissor, aumenta a permeabilidade dos neurônios aos íons cloreto. Ao contrário do DDT e dos HCH, os ciclodienos apresentam uma correlação positiva entre temperatura e toxicidade.

Ressalta-se que apesar do avanço industrial na síntese de diferentes análogos dos inseticidas, com conseqüente aumento da complexidade de suas moléculas, não houve ainda nenhuma mudança no sítio alvo de ação dessas substâncias, que continuam sendo desenhadas para interferir no receptor de GABA, no canal de sódio ou sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (ACE).

1.5.2. Toxicodinâmica

A interação das moléculas de inseticidas com seus sítios de ação e suas conseqüências é o objeto de estudo da toxicodinâmica (STARK & BANKS, 2003).

Os diversos tipos de inseticidas atuam no sistema nervoso central dos insetos, contudo, de acordo com suas propriedades químicas, apresentam sítios de ação específicos. Existem três

principais alvos: a enzima ACE (alvo dos OP e CA) codificada pelo gene *Ace*; o canal de sódio (alvo de PI e OC tipo DDT) codificado pelo gene *NA_v*; e os receptores GABA (alvo dos FE) codificado pelo gene *Rdl*. Mudanças em resíduos de aminoácidos em sítios específicos modificam a sensibilidade do sítio-alvo comprometendo a ligação do inseticida com o mesmo, diminuindo ou anulando assim seus efeitos (BROGDON & McALLISTER, 1998).

1.5.2.1. Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (ACE) faz parte da superfamília das Serino-esterases, exibindo em seu sítio catalítico uma tríade formada por resíduos de serina, histidina e glutamato. A maior parte das ACEs é ativa na forma de dímeros e possui reação rápida: uma única enzima hidrolisa cerca de 10^4 moléculas de substrato por segundo (SOREQ & SEIDMAN, 2001). Trata-se de uma enzima essencial no sistema nervoso de todos os animais, estando presente nas membranas pós-sinápticas, e seu principal papel é interromper a transmissão nervosa, reduzindo a concentração de acetilcolina na fenda sináptica, hidrolisando-a em colina e acetato, produtos que não mais estimulam o neurônio pós-sináptico. No caso de resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos verifica-se uma alteração ou diminuição à sensibilidade da acetilcolinesterase (VILLATE & BACHMANN, 2002). Esses inseticidas não serão mais capazes de inibir à ACE permitindo a interrupção normal do estímulo.

Em insetos, além do envolvimento da ACE na neurogênese em *Drosophila melanogaster* (HUCHARD *et al.*, 2006), muito pouco se sabe sobre suas funções. Comparação de sequências e análises filogenéticas indicam que a maioria dos insetos apresenta dois genes *ace*, denominados *ace-1* e *ace-2* (WEILL *et al.*, 2002; KAKANI *et al.*, 2011). O papel fisiológico de cada um deles ainda não está claro. *Ace-1* está relacionado com a resistência a inseticida na maioria dos insetos, com exceção das moscas uma vez que estas perderam este gene ao longo da sua evolução (WEILL *et al.*, 2002; HUCHARD *et al.*, 2006).

A mutação “clássica” de *ace-1* em mosquitos que confere resistência a inseticida é a G119S que consiste na substituição de uma glicina por uma serina (WEILL *et al.*, 2003). O fato de estar presente em pelo menos duas espécies de *Anopheles* e de *Culex* (WEILL *et al.*, 2004; LABBÉ *et al.*, 2007) sugere grande conservação estrutural e funcional (HUCHARD *et al.*, 2006). Estudos desenvolvidos com populações de *Culex pipiens* em Montpellier, França, indicaram que a mutação só é vantajosa na presença do ativo químico e na época da borrifação, com diminuição do *fitness* destes mosquitos, referida pelos autores como um “custo” da resistência, quando na ausência do inseticida (LENORMAND *et al.*, 1999; LENORMAND & RAYMOND 2000; LEBBÉ *et al.*, 2007). Há indícios de que as mutações estejam próximas ao sítio catalítico da enzima.

Outras substituições no gene *ace-1* associadas com resistência a inseticidas em mosquitos são: F331W, em *Culex tritaeniorhynchus*, que consiste na substituição de uma fenilalanina por um triptofano (HEMINGWAY *et al.*, 2004; NABESHIMA *et al.*, 2004) e a substituição de uma fenilalanina por uma valina na posição 290 verificada em uma população de *C. pipiens* da Ilha do Chipre (ALOUT *et al.*, 2008). Recentemente, a resistência a inseticidas também foi associada à deleção de três glutaminas na região C-terminal da cadeia peptídica da enzima ACE, longe de seu sítio catalítico (KAKANI *et al.*, 2011). Até o momento, em triatomíneos não existem relatos de mutações na acetilcolinesterase relacionados com a resistência a inseticidas.

1.5.2.2. Canal de sódio regulado por voltagem

No início da década de 50, poucos anos após o início da utilização do DDT como inseticida, foram descritas linhagens de moscas domésticas resistentes. Estes insetos, ao serem expostos ao DDT, ou não sofriam paralisia seguida de morte ou apresentavam uma paralisia momentânea seguida de total recuperação motora. O fenótipo ficou conhecido como Kdr (do inglês *Knockdown resistance*) (BUSVINE & BARNES, 1957; MILANI, 1954). Desde a introdução dos piretróides, foram observados insetos resistentes exibindo o fenótipo *kdr*, por pressão seletiva prévia exercida pelo DDT, caracterizando-se em resistência cruzada entre estes compostos (HEMINGWAY & RANSON, 2000). O mecanismo de resistência *kdr* ocorre devido a uma redução na sensibilidade do alvo ao inseticida, de 10 a 20 vezes. Linhagens *Kdr* de algumas espécies podem ter aumento de até 100x na resistência, efeito que é denominado *super-kdr*. Os alelos que conferem resistência *kdr* e *super-kdr* são recessivos e podem persistir em baixos níveis na população (DAVIES *et al.*, 2007).

Cerca de três décadas após a identificação do efeito *Kdr*, estudos eletrofisiológicos em células ou tecidos neuronais sugeriram que os sítios de ação dos piretróides seriam os canais de sódio dependentes de voltagem (NA_V). Estes trabalhos indicavam que a resistência cruzada entre piretróides e DDT poderia estar relacionada a este canal (PAURON *et al.*, 1989). Paralelamente foi clonado e sequenciado o gene *paralytic (para)* de *D. melanogaster*, que está situado no locus relacionado a alterações de comportamento e paralisia a altas temperaturas semelhantes aquelas produzidas por piretróides e DDT (*Knockdown*) (LOUGHNEY *et al.*, 1989). Comparações com sequências de vertebrados revelaram que *para* é homólogo a genes codificantes de NA_V (LOUBHNEY & GABETZKYM, 1989). Em seguida, ficou também evidenciado em uma linhagem de moscas domésticas resistentes ao DDT, que o locus homólogo ao *para* estava fortemente ligado ao fenótipo *Kdr* (WILLIAMSON *et al.*, 1993; KNIPLE *et al.*, 1994). Esta evidência se estendeu a outras espécies de insetos pragas ou vetores.

A primeira mutação identificada com ligação ao fenótipo *Kdr* foi a substituição de uma

leucina por uma fenilalanina (Leu1014Phe) no segmento S6 do domínio II do gene *NA_v* de *Musca domestica* (INGLES *et al.*, 1996), e em vários outros modelos biológicos (tabela 1).

Tabela 1. Mutações identificadas no gene *NA_v* de insetos relacionadas à resistência a inseticidas.

Espécies	Mutações identificadas	Referências
<i>Aedes aegypti</i>	I1011M	Martins <i>et al.</i> (2005)
	I1011M +G923V	Brengues <i>et al.</i> (2003)
	I1011M+L982T	Brengues <i>et al.</i> (2003)
	V1016I	Martins <i>et al.</i> (2009)
	I1011V; V1016I; V1016G	Saavedra-Rodrigues <i>et al.</i> (2007); Rajatileka <i>et al.</i> (2008)
<i>Anopheles gambiae</i>	L1014F	Martinez-Torrez <i>et al.</i> (1998)
	L1014S	Ranson <i>et al.</i> (2000); Pinto <i>et al.</i> (2006)
<i>Bemisia tabaci</i>	M918V; L952I	Morin <i>et al.</i> (2002)
<i>Blatella germanica</i>	L1014F	Miyazaki <i>et al.</i> (1996); Dong (1997)
	L1014F+M918T	Martinez-Torres <i>et al.</i> (1997)
	L1014F+E435K+C785R	Liu <i>et al.</i> (2000)
	L1014F+D59G+C785R+ P1999L	Liu <i>et al.</i> (2000)
<i>Boophilus microplus</i>	F1538I	He <i>et al.</i> (1999)
<i>Ctenocephalides felis</i>	T929C; T929V	Bass <i>et al.</i> (2004)
<i>Culex pipiens</i>	L1014F; F1014S	Martinez-Torrez <i>et al.</i> (1999 ^a)
<i>Culex quinquefasciatus</i>	L1014F	Xu <i>et al.</i> (2005)
<i>Drosophila melanogaster</i>	I253N; A1410V; A1494V, M1524I	Pittendrigh <i>et al.</i> (1997)
<i>Frankliniella occidentalis</i>	T929C; T929V	Forcioli <i>et al.</i> (2002)
<i>Helicoverpa armigera</i>	D1549V+E1533G	Head <i>et al.</i> (1998)
<i>Heliethis virescens</i>	L1014H	Park & Taylor (1997)
	V410M	Park <i>et al.</i> (1997)
	D1549V+E1533G	Head <i>et al.</i> (1998)
<i>Haematobia irritans</i>	L1014F+M918T	Guerrero <i>et al.</i> (1997)
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	L1014F	Lee <i>et al.</i> (1999b)
<i>Musca domestica</i>	L1014F; L1014F+M918T	Ingles <i>et al.</i> (1996); Miyazaki <i>et al.</i> (1996); Williamson <i>et al.</i> (1996); Martinez-Torres <i>et al.</i> (1997); Davies <i>et al.</i> (2007)
	L1014F	Martinez-Torrez <i>et al.</i> (1999b)
<i>Myzus persicae</i>	L1014F	Martinez-Torrez <i>et al.</i> (1999b)
<i>Pediculus capitis</i>	T929I+L932F	Lee <i>et al.</i> (1999b)
<i>Plutella xylostella</i>	L1014F+T929I	Schuler <i>et al.</i> (1998)
	L1014F+M918T	Martinez-Torres <i>et al.</i> (1997)
<i>Triatoma infestans</i>	L1014F	Fabro <i>et al.</i> (2012)

FABRO *et al.* (2012) partindo do genoma de *R. prolixus* clonaram e sequenciaram a região IIS6 do canal de sódio de *T. infestans*. Em um estudo com dez ninfas de primeiro estágio suscetíveis e resistentes a deltametrina (RR 35,7), foi observado respectivamente genótipo e fenótipo selvagem e substituição no sítio 1014 de uma leucina por uma fenilalanina.

1.5.2.3. Receptores do ácido Gama-aminobutírico

Nos insetos, os receptores do ácido gama-aminobutírico estão presentes nas junções neuromusculares e no SNC. Em condições normais, esses receptores desencadeiam o mecanismo inibitório que restabelece o estado de repouso do SNC. Após a transmissão normal

de um impulso nervoso ocorre a ligação de GABA ao seu receptor pós-sináptico provocando um aumento da permeabilidade da membrana e conseqüentemente a entrada de íons cloreto (HEMINGWAY & RANSON, 2000).

Os inseticidas ciclodienos e policloroterpenos, assim como as avermectinas, atuam sobre os receptores GABA impedindo a entrada de íons cloreto para o meio intracelular, antagonizando o efeito “inibitório” de GABA e provocando impulsos espontâneos que geram convulsões, paralisia e morte. A resistência ocorre pela diminuição da sensibilidade dos receptores de GABA aos inseticidas (HEMINGWAY & RANSON, 2000).

1.5.3. Toxicocinética

A toxicocinética é a ciência que estuda a interação entre o inseto e o inseticida, contemplando os mecanismos de absorção, penetração, armazenamento, metabolização e excreção (STARK & BANKS, 2003).

A partir do primeiro contato do inseto com o inseticida, o mesmo será interiorizado através dos mecanismos de penetração, ingestão e/ou inalação pelos espiráculos. A penetração é o mecanismo mais comum, uma vez que a maioria dos inseticidas sintéticos apresentam características lipofílicas (MATSUMURA, 1963; GRISSON *et al.*, 1989). Alguns autores afirmam que a velocidade com que determinados inseticidas atingem o sítio alvo é favorecida pelas rotas de penetração via espiráculos (GEROLT, 1965, 1969; SUGIURA *et al.*, 2008).

Logo após a entrada do ativo químico é disparado um processo de biotransformação responsável por sua transformação em outra substância com propriedades diferentes da droga original, com características mais hidrofílicas passíveis de serem eliminadas (GOODMAN & GILMAN, 2006). Tais reações são catalizadas por um sistema multienzimático no qual as principais enzimas participantes são as esterases, oxidases de função mista e glutatona S-transferases (SHEEHAN *et al.*, 2001). Neste processo, três fases estão envolvidas: a fase I (de modificação química da molécula exógena), a fase II (de conjugação) e a fase III (compartimentalização e/ou excreção dos metabólitos não tóxicos gerados) (FROVA, 2006). As enzimas de fase I, como as OFM e EST, introduzem um grupo reativo polar na molécula de inseticida, por reações de oxidação e hidrólise, respectivamente. Os produtos resultantes dessa reação podem ser excretados diretamente ou sofrer reações de conjugação (Fase II – enzima GST), até se tornarem moléculas solúveis passíveis de serem eliminados. Todas essas enzimas agem de maneira integrada, diminuindo a quantidade do xenobiótico e seu tempo de permanência no organismo do inseto (SHEEHAN *et al.*, 2001).

O aumento na atividade das enzimas detoxificativas pode resultar de uma série de alterações (HEMINGWAY & RANSON, 2000; HEMINGWAY *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2007),

que incluem: amplificação gênica, expressão gênica alterada e mudança estrutural.

1.5.3.1. Esterases

As esterases apresentam dobramento alfa/beta, incluindo as lipases, colinesterases, fosforotriesterases e proteases, dentre outras. É uma família bastante versátil, compreendendo proteínas com funções muito especializadas, com grande seletividade por substratos (como ACE e hormônio juvenil esterase) e outras menos específicas, com preferência por diferentes substratos (NARDINE & DIJKSTRA, 1999; HOTELIER *et al.*, 2004; MONTELLA *et al.*, 2012).

Em geral, a atividade das EST depende de uma tríade catalítica constituída por um resíduo de serina, um de histidina e um glutamato ou aspartato. O processo pelo qual estas enzimas clivam ligações éster envolve a formação e degradação de um complexo “acil-enzima”. Inicialmente ocorre a formação de um intermediário enzima-substrato. A porção alcoólica deste é liberada resultando na formação do complexo “acil-enzima”. A hidrólise posterior deste complexo libera a porção ácida do substrato e regenera a enzima (GLYNN 1999, WHEELLOCK *et al.*, 2005; SATOH & HOSOKAWA 2006).

Existem evidências de que as esterases participam de processos endógenos, que ocorrem naturalmente nos insetos, como por exemplo o processamento de sinais relacionados com a percepção de caimônios e feromônios (OAKESHOTT *et al.*, 2010). É bem descrito na literatura o papel dessas enzimas na regulação dos títulos de hormônio juvenil nos estádios larval e pupal dos insetos (ANSPAUGH & ROE, 2005; ANAND *et al.*, 2008), sendo conhecidas por Esterases do Hormônio Juvenil (JHE).

1.5.3.2. Oxidases de função múltipla

As oxidases de função múltipla (também conhecidas como citocromo P450 monooxigenase, monooxigenase polisubstrato, proteína heme tiolato) formam uma superfamília de enzimas, presente em todos os organismos aeróbicos (SCOTT, 1999; HEMINGWAY & RANSON, 2000), podendo ser encontradas no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (FEYEREISEN, 1999).

As OFM se ligam ao oxigênio molecular e recebem elétrons do agente redutor de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para introduzir um átomo de hidrogênio no substrato e reduzir o outro átomo à molécula de água (BERGÉ *et al.*, 1998).

Nos insetos, essas enzimas estão envolvidas com a resistência a pesticidas, tolerância a toxinas de plantas, síntese e degradação de hormônios esteróides reguladores do crescimento,

hormônios juvenis e com os do metabolismo de feromônios (BERGÉ *et al.*, 1998). Além da capacidade das OFM promoverem resistência e tolerância a inseticidas e aleloquímicos, elas podem também estar envolvidas com a bioativação de alguns inseticidas OP administrados na forma de pró-inseticidas (FUKUTO, 1990; FEYREISEN, 1999). Há também indícios de que as OFM participem do processamento de sinais relacionados com a recepção e biossíntese de odores (MAILBÉCHE-COISNE *et al.*, 2005; OAKESHOTT *et al.*, 2010).

1.5.3.3. *Glutathione S-Transferase*

Nos insetos, até o presente momento foram identificados somente GSTs citosólicas e microsossomais, sendo as primeiras as mais importantes por concentrar um maior número de enzimas com capacidade de detoxificar xenobióticos, dentre eles os inseticidas. Apesar da divergência nas sequências dos nucleotídeos, todas as proteínas GST apresentam níveis significativos de conservação estrutural, exibindo uma organização dimérica e de dobramento tridimensional (FROVA, 2006).

A função primária da glutathione-S-transferase consiste na catálise da conjugação glutathione, um tripeptídeo endógeno com algum substrato lipofílico, formando um produto mais solúvel e não tóxico, de maneira que este seja mais facilmente excretado ou compartimentalizado pelas enzimas da Fase III da biotransformação. A atividade de conjugação das GSTs pode ainda conferir resistência aos inseticidas OP através da atividade dehidroclorinase (HOLLINGWORTH, 1969; SHEENAN *et al.*, 2001; ENAYATI *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007).

Trata-se de uma superfamília de proteínas multifuncionais que desempenham papéis fundamentais na detoxificação celular de uma grande variedade de compostos endógenos e exógenos. Em plantas e animais são as principais enzimas da fase II dos processos de detoxificação metabólica, atuando, inclusive na detoxificação de inseticidas (RODRIGUEZ *et al.*, 1999; DING *et al.*, 2003; ENAYATI *et al.*, 2005; FROVA 2006; LUMJUAN *et al.*, 2007; STRODE *et al.*, 2008; KASAI *et al.*, 2009). Estas enzimas parecem também estar envolvidas com a biossíntese de hormônios esteróides e a degradação de aminoácidos aromáticos (HAYES *et al.*, 2005, FROVA 2006). LUMJUAN *et al.*, (2007) descreveram a capacidade da GST de se ligar a hematina, sugerindo função protetora no intestino médio do mosquito *Aedes aegypti*, por meio da redução da toxicidade do heme ingerido durante o repasto sanguíneo. Alguns autores sugerem ainda a participação desta enzima na resposta adaptativa ao estresse celular (HUNAITI *et al.*, 1995; SINGH *et al.*, 2000; PONGJAROENKIT *et al.*, 2001, FROVA 2006; LI *et al.*, 2007).

1.6. Estruturação genética de populações naturais avaliada por microssatélites

Marcadores moleculares são proteínas ou seqüências de DNA polimórficas que podem ser usados como indicadores de variação do genoma. Neste contexto se inserem os microssatélites também conhecidos por “*simple sequences repeats*” (SSR).

Os microssatélites são regiões do genoma de organismos eucariontes que possuem repetições de 2 a 6 nucleotídeos em cadeia. Distribuídos aleatoriamente no genoma, em uma densidade de aproximadamente 1 microssatélite a cada 10 a 15Kb, dependendo da espécie, são caracterizadas por um elevado polimorfismo (taxa de mutação estimada em 10^{-2} a 10^{-3} , por *locus* por gameta por geração), contudo, são flanqueados por seqüências únicas e por isso podem ser amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (LI *et al.*, 2002; 2004, OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O número de repetições, o tipo de repetição, a seqüência flanqueadora e a recombinação são fatores que influenciam na evolução dos microssatélites. Há padrões específicos de distribuição dos diferentes modelos repetitivos nos diferentes tipos de seqüências: codantes, não codantes, íntrons e regiões intergênicas. Esses padrões ainda variam entre táxons, em termos da frequência de microssatélites e de tipos de repetições preferenciais. Esta especificidade pode ser explicada, em parte pela interação de mecanismos evolutivos por meio da seleção diferencial em regiões do genoma nas diferentes espécies (ZHU *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2002).

Cada microssatélite, independentemente do elemento repetitivo constitui um *locus* genético altamente variável, multialélico e que lhe proporciona conteúdo informativo a cerca da dinâmica de populações. Cada segmento amplificado de tamanho diferente (geralmente de várias dezenas até algumas centenas de pares de bases - pb) representa um alelo diferente do mesmo *locus*. Esta variabilidade tem como consequência a geração de alelos polimórficos que podem ser utilizados em uma variedade de estudos genéticos populacionais, em sistemática e no mapeamento genômico. Por este motivo, toda população pode ser utilizada como referência para estudos de ligação e mapeamento genético, sendo que a escolha não precisa ser embasada na maximização da distância genética, mas sim, visando a população mais informativa do ponto de vista das características biológicas de interesse. Dada a sua alta taxa de mutação, em alguns casos podem ser utilizados como uma ferramenta para o estudo dos meios pelos quais a taxa de mutação genômica global pode ser afetada por fatores externos (SCHOTTERER, 2000).

Na área da entomologia, os microssatélites vêm sendo utilizados principalmente para o estudo de genética populacional. Podem ser úteis nos estudos de epidemiologia e controle das enfermidades fornecendo informações importantes sobre o fluxo gênico, a capacidade do vetor em invadir o peridomicílio e o intradomicílio e o entedimento para o processo de domiciliação; bem como avaliação taxonômica dos vetores. Neste contexto torna-se importante a realização de

uma análise multifatorial que também contemple estudos eco-epidemiológicos.

Recentemente tais marcadores tem sido empregados em estudos macro e microgeográficos com populações triatomínicas (HARRY *et al.*,1998; ANDERSON *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 2004; MARCET *et al.*, 2006; PEREZ DE ROSAS *et al.*, 2007; RICHER *et al.*, 2007; HARRY *et al.*, 2008; PEREZ *et al.*, 2008; PIZARRO *et al.*, 2008; FITZPATRICK *et al.*, 2009; HARRY *et al.*, 2009; DIAS *et al.*, 2011). Ressalta-se que existem diversos trabalhos científicos que padronizaram a utilização dessa ferramenta, para as seguintes espécies: *Rhodnius pallescens* (HARRY *et al.*,1998), *R. prolixus* (FITZPATRICK *et al.*, 2008; HARRY *et al.*, 2008 a), *T. dimidiata* (ANDERSON *et al.*, 2002), *T. infestans* (GARCIA *et al.*, 2004; MARCET *et al.*, 2006) e *T. pseudomaculata* (HARRY *et al.*, 2008b).

GIORDANO *et al.* (2005) sugerem que os microssatélites podem ser uma ferramenta sensível e eficaz para discernir a estrutura genética das populações e fornecer informações sobre reinfestações subseqüentes às borrições do inseticida. Uma desvantagem quanto à utilização deste tipo de marcador diz respeito à prospecção dos iniciadores para os *loci* desejados, que são caras e trabalhosas. Uma alternativa viável é utilizar *loci* previamente isolados de espécies proximamente relacionadas, chamada de amplificação cruzada, o que possibilita sobrepor a informação genética de uma espécie para outra (PENTEADO *et al.*, 2011). Deste modo, como não existe tal ferramenta molecular padronizada para estudos com *T. sordida*, este trabalho se propôs a testar marcadores desenvolvidos para espécies afins que possam ser utilizadas para a de interesse.

Os relatos cada vez mais frequentes de populações triatomínicas com razões de resistência elevadas tem causado grande impacto, desafiando cientistas e sanitaristas na busca de novas alternativas para o controle vetorial. Considerando os casos de resistência de triatomíneos já reportados na literatura (anexo 1), é possível que o uso intensivo de inseticidas no Brasil por mais de 30 anos tenha favorecido o aparecimento de novos focos em regiões ainda mais amplas. Deste modo, justifica-se a importância de se investigar este fenômeno levando-se em consideração as condições ambientais nas quais ele se encontra inserido bem como a variabilidade genética destes insetos e sua capacidade de alteração na linha do tempo na presença do ativo químico.

Na plenária do “I Seminário sobre técnicas e ferramentas de controle das doenças transmitidas por vetores (SVS-MS, 2003)” e do “II Seminário internacional sobre técnicas e ferramentas de controle das doenças transmitidas por vetores – recomendações (SVS-MS, outubro 2006)” foi discutido que “em muitas localidades, programas de controle de diferentes agravos estão sendo executados de forma simultânea e sem articulação entre si, o que pode contribuir para o aumento indiscriminado e indesejado da resistência a inseticidas. Foi fortemente sugerida a integração das decisões de manejo dos diferentes programas, de forma a garantir o controle racional das endemias/epidemias”.

Deste modo, o aprimoramento dos programas de avaliação do impacto das medidas de controle sobre as endemias/epidemias, como um espaço técnico científico de discussão sobre formas alternativas de controle, assume que:

- o monitoramento da resistência dos vetores aos inseticidas é componente importante, já uma preocupação do Ministério da Saúde e dos técnicos em geral, a ser encarado de maneira objetiva e continuada, de forma institucionalizada e com prioridade;
- o tema não deve ser considerado como uma atividade em separado, mas deve fazer parte do contexto e das macro políticas do controle dos vetores e das enfermidades pertinentes. Neste aspecto é prioridade o reforço de grupos de entomologia em geral, com formação e capacitação de massa crítica, treinamento em diferentes níveis, abertura e incentivo a investigação; e ainda: “os programas em curso não devem ser herméticos e isolados entre si, cada vez mais sendo oportuno e desejável que se integrem e possam compartilhar diferentes tarefas, insumos, informações e tecnologias”.

Dentro desta perspectiva, em 2005, foi realizada uma reunião em Brasília com alguns pesquisadores da área da doença de Chagas por iniciativa da própria Secretaria de Vigilância em Saúde/MS/PCDCh. Foi consolidado um projeto, creditado por autoridades do setor nacional da saúde, com amarras institucionais, com vistas ao monitoramento da resistência de triatomíneos a inseticidas. O estudo foi encaminhado, contudo não foi aprovado.

A continuidade deste processo foi concretizada em 2009, em uma reunião solicitada à SVS pelo Laboratório de Referência em Triatomíneos e Epidemiologia da doença de Chagas – LATEC - CPqRR/ FIOCRUZ. Participaram possíveis representantes de laboratórios que poderiam integrar a rede de monitoramento da resistência: coordenação do PCDCh, gerências estaduais de saúde do Ceará e Minas Gerais, da Superintendência de Controle de Endemias de São Paulo (SUCEN) e Coordenação Geral de Laboratórios (CGLAB/MS). Em dezembro de 2010, para dar início ao funcionamento da rede de monitoramento, foi realizado um workshop para definir a estrutura da rede, critérios para credenciamento dos laboratórios, definição de competências/habilidades e administração dos recursos. Em 2011 foi aprovado um orçamento no valor de R\$200.000,00 destinado a estruturação dos laboratórios credenciados, capacitação de recursos humanos, estudos de campo para o entendimento dos resultados de laboratório em condições não controladas e, produção de material didático. Contudo, até o presente momento este recurso não foi liberado.

O trabalho aqui proposto é considerado por ROCHA & SILVA (1979) como medida estratégica para o controle destes insetos, podendo auxiliar o PCDCh na eleição de medidas factíveis e eficazes no controle da transmissão vetorial da enfermidade de Chagas.

Segundo a “Reunión Latino-americana de Monitoreo de Resistencia a Insecticidas en Triatomíneos” (OPAS, 2005), realizada no Panamá, o monitoramento da resistência de triatomíneos a inseticida poderá ter desdobramentos importantes, tais como incentivar:

- a recuperação das atividades entomológicas de modo a avaliar as aplicações dos inseticidas nos programas de controle de vetores e, conseqüentemente otimizar as estratégias de controle químico;
- a incorporação do monitoramento e manejo da resistência de triatomíneos a inseticidas, segundo metodologia descrita por PESSOA (2008), como parte das atividades previstas nas iniciativas de interrupção da transmissão vetorial da enfermidade de Chagas;
- a formação de recursos humanos ao nível operativo e técnico que permitam implementar programas de monitoramento e manejo de resistência de triatomíneos a inseticidas;
- o apoio e o fortalecimento dos centros regionais colaboradores da OPAS/WHO, para que atuem formando recursos humanos e validando os procedimentos de monitoramento e manejo de resistência a inseticidas;
- os governos dos países latinoamericanos a incluir no custeio dos programas de controle de vetores de Chagas, recursos destinados a implementação de programas de monitoramento e manejo da resistência de triatomíneos a inseticidas (atividades de laboratório e de campo);

- o fortalecimento dos grupos latinoamericanos locais e regionais de entomologia, para interagir em rede, a fim de melhorar e desenvolver os programas de monitoramento e manejo de resistência de triatomíneos a inseticidas, com o apoio da OPAS e outros organismos nacionais e internacionais;
- a criação, com o apoio e colaboração da OPAS/WHO de um comitê de pesquisadores para o seguimento e atualização dos programas de monitoramento e manejo de resistência a inseticidas, cujos resultados orientem as estratégias de controle em campo;
- a geração de documentos técnicos similares para o monitoramento e manejo da resistência a inseticidas em outros vetores de importância médica.

Deste modo, com a realização deste projeto, a FIOCRUZ amplia o seu papel no âmbito do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde e contribui para uma melhor efetividade das ações de controle de duas importantes doenças no contexto epidemiológico no país.

3.1 Objetivo Geral

- Caracterizar o perfil de suscetibilidade/resistência de populações de *T. sordida* (Stål, 1859) de áreas com infestação persistente do Estado de Minas Gerais ao piretróide deltametrina.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a mortalidade a Dose Diagnóstica, as doses letais, *slope* e as razões de resistência de populações de *T. sordida* a deltametrina;
- Padronizar ensaios bioquímicos para a quantificação de enzimas detoxificativas de inseticida em triatomíneos;
- Definir o perfil de atividade de enzimas detoxificativas para as populações de *T. sordida*;
- Definir a estrutura genética de populações de *T.sordida*, por meio de marcadores microssatélites;
- Caracterizar as variáveis físicas das UD`s, a qualidade das atividades de borrifação pelos agentes de saúde, o uso de inseticida para os diversos fins, as variáveis climáticas relacionadas a degradação do inseticida e informações entomológicas da área de estudo.

4.1. Inseticida e diluente

O inseticida utilizado nos bioensaios foi a deltametrina [(S) – α – ciano – 3 – fenoxibenzil (1R) – cis – 3 – (2,2 – dibromovinil) – 2,2 dimetil ciclopropano carboxilato] com grau de pureza de 99,1% (grau técnico), fornecido pela Bayer®, Brasil e acetona P.A (CH₃)₂CO, da VETEC®.

4.2 Material biológico e área de amostragem

Os triatomíneos foram coletados nas unidades domiciliares de áreas endêmicas do Estado de Minas Gerais, nas quais o PCDCh se manteve ininterrupto nos últimos 30 anos. As coletas foram realizadas em colaboração com as Gerências Regionais de Saúde responsáveis, supervisionadas pela Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais - SES/MG aos cuidados da Dra. Marcela Lencine Ferraz.

A escolha dos municípios para este estudo foi embasada no índice de captura de *T. sordida* do ano de 2008, fornecido pela SES/MG, tendo sido selecionados aqueles que apresentaram altas taxa de infestação. Ressalta-se que a escolha das localidades ficou a critério dos agentes de saúde de modo a contemplar regiões nas quais foram observadas dificuldades no controle das populações triatomínicas com o uso de inseticidas.

A captura dos insetos, realizada em 2009, foi manual, sem a utilização de desalojantes. Foram recebidos um total de 103 populações triatomínicas, originárias de 30 municípios de Minas Gerais (figura 2) da região do Triângulo Mineiro e Região Norte Minas. Ressalta-se que o número de insetos mínimo para a realização dos bioensaios foi de 70 insetos, de acordo com preconização da OPAS (2005).

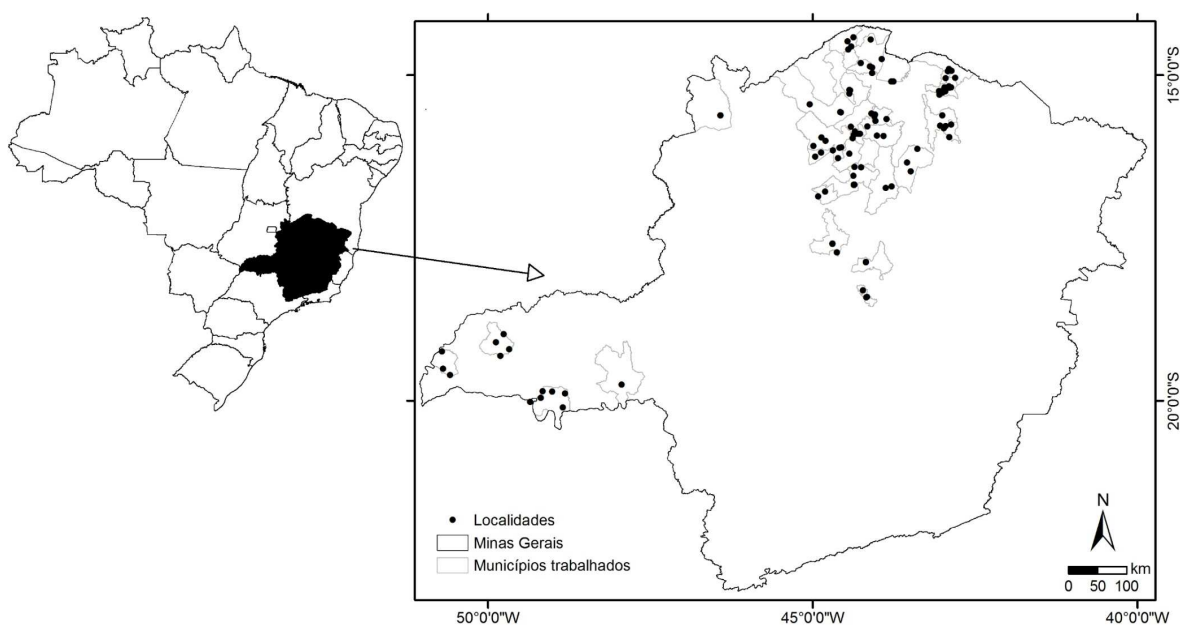


Figura 2. Mapa político do Estado de Minas Gerais. Destacados os diferentes municípios de captura de *T. sordida* estudados neste projeto.

O Triângulo Mineiro é uma área de colonização antiga, desbravada no final do século passado pelos bandeirantes em busca de ouro e pedras preciosas. A região assumiu grande importância econômica com a introdução do gado zebu, tendo sua paisagem natural sofrido profundas transformações nas décadas de 40 e 50 para a formação de áreas de pastagem. Somente a partir da década de 70 a agricultura passou a ter importância com o desenvolvimento de técnicas que permitiriam a cultura de soja em regiões do cerrado (GOODLAND & FERRI, 1979). Atualmente essa região sedia grandes projetos agroindustriais, contudo, ainda assim, a principal atividade econômica do Triângulo é a pecuária, representada, principalmente, por grandes criadores de gado.

O Norte de Minas é uma das regiões mais pobres do Estado, em muitos aspectos semelhante ao nordeste do país, com extensas áreas de transição entre o cerrado e a caatinga. Inúmeros foram os projetos de colonização (irregulares, descontínuos e sem qualquer comprometimento ecológico) implantados na área, resultando em intervenções ambientais descontroladas e estimulando a imigração desassistida de grandes contingentes humanos procedentes de áreas de alta prevalência da DC. Na década de 80, a cultura de algodão expandiu-se, representando quase que a totalidade do investimento agrícola na região. O desmatamento só não atingiu a totalidade da área pela falência da cultura devido a introdução de pragas e falta de financiamento. Dependentes do processo da monocultura aí implantado, o fracasso com a plantação de algodão serviu de estímulo para a migração da população para os centros urbanos. Para a população rural remanescente restou a possibilidade de utilização das matas residuais para a produção de carvão vegetal, ou venda da terra e de mão de obra para o reflorestamento com eucalipto, crescente nos últimos anos na área (IBGE, 1992).

Sob o aspecto ecológico pode-se considerar que o Triângulo Mineiro sofreu profundas alterações ambientais há mais tempo, e hoje apresenta maior equilíbrio entre as suas populações naturais. No Norte de Minas, por outro lado, estas intervenções tem se intensificado nas últimas décadas, resultando em grande pressão sobre as populações de *T. sordida*, justificando-se o seu aumento em ecótopos artificiais nessa região e maior estabilidade das suas taxas de captura no triângulo.

A linhagem referência de suscetibilidade utilizada neste estudo foi uma população de *T. sordida* (Uberaba/MG) – TsREF, procedente do insetário do LATEC, com início de criação em 1992, sem aporte de material externo e nenhum contato com inseticida.

Todas as populações triatomínicas foram mantidas no insetário do LATEC, em condições de temperatura e umidade relativa controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\% \pm 10\%$ UR). Os insetos foram acondicionados em frascos transparentes de polietileno, devidamente identificados (15 cm diâmetro e 20 cm de altura), com fundo recoberto com folhas de papel de filtro para a retenção da umidade produzida pelas fezes e urina dos mesmos. Uma sanfona vertical de cartolina foi

utilizada para aumentar a superfície interna do frasco de modo a permitir maior movimentação dos triatomíneos e facilitar a alimentação destes. A abertura dos frascos foi vedada com pano de malha fina preso por esparadrapo e elástico. A alimentação foi ofertada duas vezes por semana utilizando camundongos (*Mus musculus*) anestesiados com Tionembutal.

A cada 15 dias, os ovos das diferentes populações foram retirados e acondicionados em placas de petri devidamente identificadas (figura 3). Feito isso foram armazenadas e acondicionadas em estufa com umidade, temperatura e fotoperíodo controlados (70% , $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12:12 h (claro:escuro), com objetivo de tornar simultânea a eclosão das ninfas.

Diariamente as eclosões das ninfas foram registradas visando a obtenção da geração F1 padronizada em relação ao tamanho, idade cronológica e fisiológica, para posterior realização dos ensaios biológicos (figura 3).

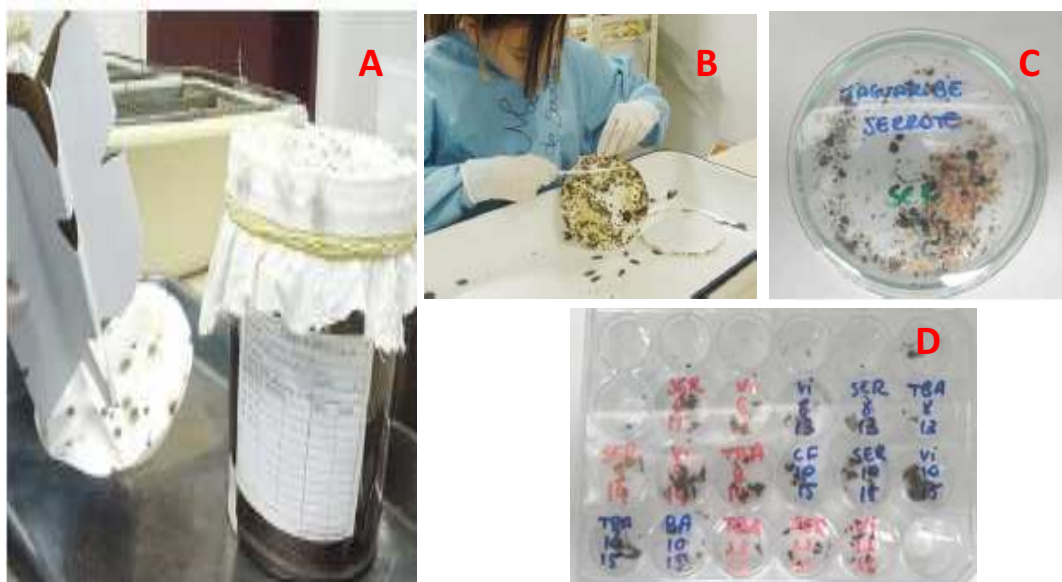


Figura 3. Acondicionamento dos triatomíneos em insetário (A); limpeza quinzenal das colônias para retirada dos ovos (B), acondicionamento dos ovos em placas de petri para acompanhamento diário da eclosão dos mesmos (C) e acompanhamento diário da idade das ninfas para a realização dos bioensaios (D).

As diferentes populações de *T. sordida* foram codificadas com orientação pelas iniciais do nome da espécie estudada, seguida pelo município de origem e pela localidade amostrada (tabela 2). A população utilizada como LRS recebeu terminação “REF”, após as iniciais do nome da espécie – TsREF.

Tabela 2. Codificação das diferentes populações de *T. sordida* procedentes do Estado de Minas Gerais, 2012.

Município	Localidade	Sigla	Coordenada	Fuso	E	N
Brasília de Minas	Capim de Cheiro	TsBMCC	UTM	23S	560858	8207883
Buenópolis	Saco da Cachoeira	TsBSC	UTM	23S	586878	8023628
Buenópolis	Espinho	TsBE	UTM	23S	587031	8023818
Buenópolis	Boa Vista II	TsBBV2	UTM	23S	587012	8023946
Butiris	Bananeira	TsBB	UTM	23S	348195	8272392
Buritis	Mangues	TsBM	UTM	23S	348009	8272691
Buritis	Mandassaia	TsBMA	UTM	23S	348181	8272689
Cônego Marinho	Cabeceira do C. Marinho	TsCMCC	UTM	23S	560679	8309956
Cônego Marinho	Cruz dos Araújo	TsCMCA	UTM	23S	561159	8316090
Cônego Marinho	Sapé	TsCMS	UTM	23S	561932	8315253
Coração de Jesus	Barriguda	TsCJB	UTM	23S	568084	8154673
Coração de Jesus	Boa Vista I	TsCJBV1	UTM	23S	568027	8154542
Coração de Jesus	Borrachudo	TsCJBO	Graus	-	16° 24' 47" S	44° 21' 05" O
Coração de Jesus	Bom Jesus	TsCJBJ	UTM	23S	568658	8155323
Coração de Jesus	Córrego da Água Branca	TsCJAB	Graus	-	16° 25' 02" S	44° 15' 12" O
Coração de Jesus	Jataí I	TsCJJ1	UTM	23S	567639	8155460
Coração de Jesus	Jataí II	TsCJJ2	Graus	-	16° 32' 53" S	44° 22' 15" O
Espinoso	Lagoa dos Patos	TsELP	UTM	23S	730208	8347383
Espinoso	Melada	TsEM	UTM	23S	72516	8351121
Espinoso	Mimoso	TsEMI	Graus	-	15° 02' 36" S	42° 48' 24" O
Francisco Sá	Arroz	TsFSA	UTM	23S	61132	8177581
Francisco Sá	Algodão 1°	TsFSA1	Graus	-	16° 08' 11" S	43° 23' 06" O
Francisco Sá	Baixa Fria	TsFSBF	Graus	-	16° 20' 39" S	43° 32' 42" O
Frutal	A. Nunes Cruz	TsFANC	Graus	-	19° 57' 28" S	49° 10' 57" O
Frutal	Buriti I	TsFB1	Graus	-	20° 06' 17" S	48° 50' 23" O
Frutal	Guilherme F. Correa	TsFGFC	Graus	-	19° 51' 31" S	49° 00' 17" O
Frutal	João Correa	TsFJC	Graus	-	19° 53' 20" S	48° 48' 21" O
Frutal	Matão	TsFM	Graus	-	20° 01' 13" S	49° 20' 45" O
Frutal	São Mateus	TsFSM	Graus	-	19° 51' 21" S	49° 09' 05" O
Gurinhata	Cachoeirão	TsGC	Graus	-	19° 06' 11" S	49° 52' 12" O
Gurinhata	Alceu Mendes	TsGAM	Graus	-	18° 58' 51" S	49° 45' 08" O
Gurinhata	Cor da Mata	TsGCM	Graus	-	19° 18' 43" S	49° 48' 18" O
Gurinhata	Vicente Coelho	TsGVC	Graus	-	19° 12' 38" S	49° 40' 14" O
Ibiaí	Butirizinho Gamela	TsIBG	UTM	23S	509174	8135783
Ibiaí	Várzea de Baixo	TsIVB	Graus	-	16° 47' 32" S	44° 48' 16" O
Ibiracatu	Alforges	TsIA	UTM	23S	597503	8276089

Cont. tabela 2. Codificação das diferentes populações de *T. sordida* procedentes do Estado de Minas Gerais, 2012.

Município	Localidade	Sigla	Coordenada	Fuso	E	N
Ibiracatu	Barras	TsIB	Graus	-	15° 47' 21" S	44° 09' 29"O
Ibiracatu	Capim Vermelho	TsICV	Graus	-	15° 36' 24" S	44° 02' 12"O
Icaraí de Minas	Araçá	TsIMA	Graus	-	16° 09' 25" S	44° 41' 21"O
Icaraí de Minas	Bebedouro	TsIMB	UTM	23S	504646	8203285
Icaraí de Minas	Cabeceira	TsIMC	UTM	23S	513962	8210058
Januária	Cabeceira	TsJC	Graus	-	15° 27' 05" S	45° 02' 30"O
Januária	Barra da Lapa	TsJBL	UTM	23S	546988	8278351
Januária	Barreiro 4	TsJB4	UTM	23S	545639	8278975
Japonvar	Desejado	TsJD	UTM	23S	566436	8234226
Japonvar	Jatobá	TsJJ	Graus	-	15° 47' 35" S	44° 24' 36"O
Japonvar	Pinhão	TsJP	Graus	-	15° 55' 13" S	44° 21' 51"O
Limeiro do Oeste	Alfredo S Maia II	TsLOASM	Graus	-	19° 36' 15" S	50° 34' 46"O
Limeiro do Oeste	Benício Curzedo I	TsLOBC	Graus	-	19° 30' 27" S	50° 41' 02"O
Limeiro do Oeste	José F. Queiroz	TsLOJFQ	Graus	-	19° 14' 47" S	50° 42' 13"O
Lontra	Gangorra	TsLG	UTM	23S	574517	8241679
Lontra	São José	TsLSJ	Graus	-	15° 52' 01" S	44° 20' 52"O
Lontra	São José II	TsLSJ2	Graus	-	15° 54' 00" S	44° 16' 12"O
Luislândia	Abóboras	TsLA	Graus	-	16° 06' 52" S	44° 33' 17"O
Luislândia	Barreiro	TsLB	UTM	23S	544335	8217969
Luislândia	Manhãs	TsLM	Graus	-	16° 16' 35" S	44° 36' 29"O
Mamonas	Melada	TsMM	UTM	23S	720104	8335389
Mamonas	Riacho de Areia	TsMRA	Graus	-	14° 56' 31" S	42° 55' 05"O
Mamonas	Teiú	TsMT	Graus	-	14° 55' 45" S	42° 53' 00"O
Manga	Currálinho	TsMC	UTM	23S	614461	8368229
Manga	Empoeira	TsME	Graus	-	14° 48' 52" S	44° 15' 27"O
Manga	Floresta	TsMF	Graus	-	14° 27' 14" S	44° 06' 12"O
Montalvânia	Batedeira	TsMB	UTM	23S	568014	8405363
Montalvânia	Gergelim	TsMG	Graus	-	14° 29' 07" S	44° 27' 35"O
Montalvânia	Quilômetro	TsMQ	Graus	-	14° 36' 27" S	44° 27' 00"O
Montalvânia	Vereda	TsMV	Graus	-	14° 33' 54" S	44° 24' 18"O
Monte Azul	Barreirinho	TsMAB	UTM	23S	726374	8319107
Monte Azul	Barreirinho I	TsMAB1	UTM	23S	725638	8321187
Monte Azul	Barreiro Grande	TsMABG	UTM	23S	728915	8319651
Monte Azul	Bocaina	TsMABO	Graus	-	15° 11' 24" S	42° 58' 14"O
Monte Azul	Bom Sucesso	TsMABS	Graus	-	15° 15' 46" S	42° 57' 12"O
Monte Azul	Brejinho	TsMABRE	Graus	-	15° 13' 42" S	42° 59' 01"O
Monte Azul	Canabrava	TsMAC	Graus	-	15° 15' 09" S	42° 57' 31"O

Cont. da tabela 2. Codificação das diferentes populações de *T. sordida* procedentes do Estado de Minas Gerais, 2012.

Município	Localidade	Sigla	Coordenada	Fuso	E	N
Monte Azul	Landinho	TsMAL	Graus	-	15° 16' 00" S	42° 59' 43"O
Monte Azul	Perneta	TsMAPE	Graus	-	15° 14' 41" S	43° 03' 07"O
Monte Azul	Porteiras	TsMAPO	Graus	-	15° 18' 04" S	43° 02' 49"O
Montes Claros	Camará	TsMCC	UTM	23S	620224	8149443
Montes Claros	Ponte do Ribeirão	TsMCPR	UTM	23S	629826	8152213
Montes Claros	Ribeirão do Ouro	TsMCRO	Graus	-	15° 06' 01" S	43° 47' 12"O
Porteirinha	Cova da Mandioca	TsPCM	Graus	-	15° 46' 51" S	43° 02' 17"O
Porteirinha	Curral Velho	TsPCV	UTM	23S	719210	8253616
Porteirinha	Furado da Onça	TsPFO	Graus	-	15° 37' 21" S	43° 00' 02"O
S. J da Ponte	Canabral	TsSJPC	UTM	23S	606146	8238616
S. J. da Ponte	Assa Peixe	TsSJPAP	Graus	-	15° 06' 01" S	43° 45' 22"O
S. J. da Ponte	Gentil Gomes	TsSJPGG	Graus	-	15° 56' 16" S	43° 54' 32"O
S. J. Missões	Cotendiba	TsSJMC	UTM	23S	598655	8354329
S. J. Missões	Simão Correa	TsSJMSC	Graus	-	14° 51' 57" S	44° 06' 50"O
S. J. Missões	Traíras	TsSJMT	Graus	-	14° 58' 13" S	44° 04' 49"O
Santo Hipólito	Buracão	TsSHB	UTM	23S	582276	7975994
Santo Hipólito	Caquende	TsSHC	UTM	23S	587207	7964163
Santo Hipólito	Salobo	TsSHS	UTM	23S	588739	7964810
São Francisco	Barreiro Grotá	TsSFBG	UTM	23S	514680	8235628
São Francisco	Croá	TsSFC	Graus	-	16° 05' 28" S	44° 59' 16"O
São Francisco	Espinheiro	TsSFE	Graus	-	16° 00' 38" S	44° 47' 59"O
S. de Minas	Brejo	TsSMB	UTM	23S	716210	8250131
S. de Minas	Cachoeira	TsSMC	Graus	-	15° 57' 08" S	42° 53' 39"O
S. de Minas	Senharol	TsSMS	UTM	23S	728830	8256167
Várzea da Palma	Buritizinho	TsVPB	UTM	23S	532778	8055671
Várzea da Palma	Brejo	TsVPBRE	UTM	23S	532409	8054918
Várzea da Palma	Garça	TsVPG	Graus	-	17° 43' 16" S	44° 37' 24"O
Varzelândia	Lagoa do Jóia I	TsVLJ1	UTM	23S	603738	8263537
Varzelândia	Cruzeiro	TsVC	Graus	-	15° 38' 16" S	44° 03' 00"O
Varzelândia	Lagoa do Jóia	TsVLJ	Graus	-	15° 40' 36" S	43° 51' 45"O

4.3 Definição do perfil de suscetibilidade das populações de campo de *T. sordida*: bioensaios quantitativos

Os bioensaios quantitativos tem por objetivo quantificar o *status* da suscetibilidade/resistência de triatomíneos a inseticidas por meio de ensaios dose resposta, possibilitando o cálculo da RR das populações alvo.

Estes ensaios foram realizados segundo protocolo definido por PESSOA (2008). Diluições seriais de deltametrina foram preparadas e aplicadas no dorso do abdômen de ninfas I da geração F1 (cinco dias de idade, jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg) com auxílio de uma microseringa Hamilton acoplada a dispensador automático de mesma marca (volume de $0,2 \mu\text{L}$ de solução por aplicação). O inseticida foi diluído em acetona na proporção de 1:10, totalizando quatro doses iniciais (0,001; 0,01 ; 0,1; 1,0 ng i.a./ninfa). O intervalo que apresentou mortalidade próxima a 50% foi fracionado em subdoses que cubriram a faixa de 0,05 a 2,5 ng i.a./ninfa. Nos insetos do grupo controle foi aplicada somente acetona. Três repetições, cada uma com 10 ninfas I foram realizadas para cada dose (figuras 4 e 5).

Após a aplicação do inseticida, os triatomíneos foram transferidos para placas de petri forradas com papel filtro e acondicionadas em ambiente com temperatura e umidade controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\% \pm 10\%$ UR).

O registro de mortalidade foi realizado 72 horas após o tratamento com o ativo químico, por um único observador. Adotou-se o seguinte critério de mortalidade: após serem transferidas para uma placa de petri com 7 cm de diâmetro, as ninfas foram colocadas sobre o centro da mesma e estimuladas com auxílio de uma pinça. Consideraram-se vivos (normais) os insetos que não apresentaram alteração na atividade locomotora e alcançaram a borda da placa no período máximo de 50 segundos; e mortos os insetos que apresentaram fortes sintomas de desequilíbrio ou total incapacidade de andar do centro à borda do disco no período de tempo supracitado (OBARA *et al.*, 2002).

Os dados de mortalidade obtidos nos ensaios dose resposta foram analisados com auxílio do programa *Basic Probit Analysis* (FINNEY, 1971), estimando as doses letais 50% (DL_{50}) e 95% (DL_{95}), expressas em nanogramas de ingrediente ativo por ninfa tratada, bem como o *slope*.

O *slope* se refere ao coeficiente angular da reta formada entre as doses de inseticida aplicadas na população e sua conseqüente taxa de mortalidade, fornecendo informações sobre a variabilidade da população em relação à característica estudada (BRONGDON & MCALLISTER, 1998). O cálculo da inclinação da curva dose-resposta para construção de gráfico correspondente foi realizado com auxílio do GRAPH PAD Prism® versão 4.0 (Graph Pad Software INC, San Diego, CA).

As razões de resistência de interesse foram calculadas por meio do quociente da DL específica de cada população de campo, pela correspondente a da LRS.

A caracterização das razões de resistência foi realizada utilizando critérios propostos por ZERBA & PICOLLO (2002) E OPAS (2005).

ZERBA & PICOLLO (2002) propõe a estratégia abaixo como suporte para tomada de decisões na interpretação das razões de resistência encontradas em ensaios para avaliação da suscetibilidade/resistência de triatomíneos a inseticidas em laboratório frisando que se trata de uma estimativa sem confirmação experimental:

- Para $RR \leq 2$ se considera que a alteração de suscetibilidade encontrada é produzida por variações individuais e que não existe resistência a inseticida;
- Para $2 \leq RR < 20$ se considera que existe resistência incipiente, sendo necessário avaliar as falhas de controle no campo;
- Para $RR \geq 20$ se considera que a resistência está estabelecida;

Em contrapartida, a OPAS (2005) propõe o seguinte critério de classificação em resposta a tratamentos com inseticidas:

- Para $RR < 5$ se considera que a alteração de suscetibilidade encontrada é produzida por variações individuais e que não justificam falhas no controle. Recomenda-se, então, continuar o controle com o mesmo inseticida utilizado e manter o monitoramento da resistência;
- Para $5 \leq RR < 20$ se considera que existe resistência incipiente, sendo necessário avaliar as falhas de controle no campo. Caso confirmadas faz-se necessário trocar o inseticida para outro com modo de ação distinto. Caso não se confirmem as falhas no campo deve-se permanecer com o mesmo inseticida e intensificar o monitoramento da resistência realizando avaliações entomológicas com um mês e doze meses após a borrifação;
- Para $RR \geq 20$ se considera que a resistência está estabelecida sendo recomendada a troca do inseticida por outro de modo de ação distinto.



Figura 4. Registro diário dos experimentos (A); seringa Hamilton acoplada a dispensador automático (B), separação dos triatomíneos com idade adequada para realização dos ensaios biológicos (C).

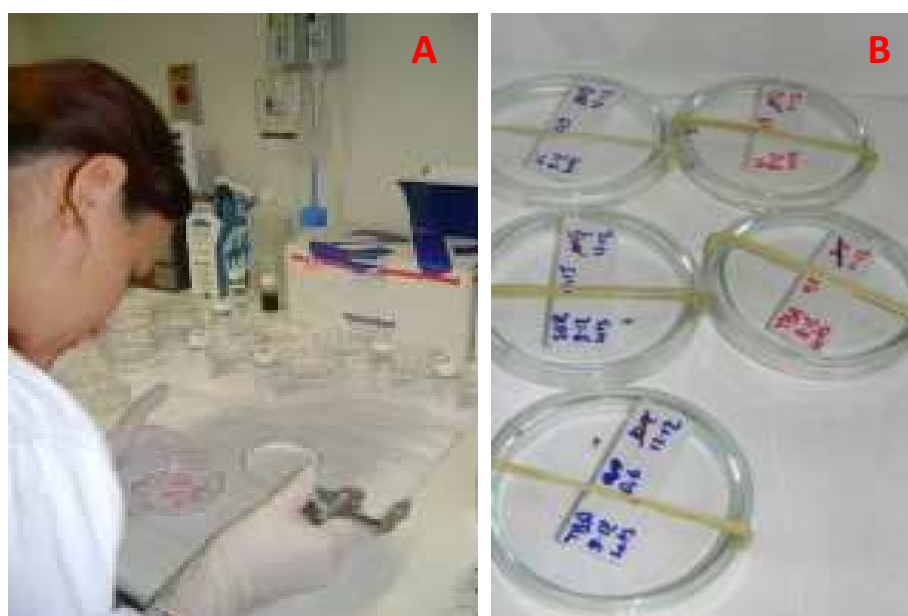


Figura 5. Aplicação tópica do inseticida nos triatomíneos (A), acondicionamento dos insetos pós-tratamento para subsequente registro de mortalidade (B)

4.4. Definição da taxa de mortalidade das populações de campo de *T. sordida* à dose diagnóstica: bioensaios qualitativos

Entende-se por ensaios biológicos qualitativos aqueles primeiros a serem realizados em laboratório, com vistas a separar as populações resistentes das suscetíveis. Tem-se por

princípio a utilização de uma dose única, conhecida por “Dose Diagnóstica” – DD, a ser aplicada na população alvo.

Após definida a linha base de suscetibilidade da população referência de *T. sordida*, 30 ninfas I da geração F1 (cinco dias de idade, jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg) de todas as populações de campo foram submetidas a dose diagnóstica de $1xDL_{99}$ da LRS conforme metodologia apresentada no item “4.3. *Definição do perfil de suscetibilidade das populações de campo de Triatoma sordida em ensaios quantitativos*”. Foi definido o percentual de mortalidade dos insetos e a classificação do padrão da suscetibilidade /resistência foi realizada de acordo com WHO (1994). A sobrevivência, em resposta a essa DD, de no mínimo um inseto em dois dos três ensaios com 10 ninfas I deve ser interpretada como indicativo de resistência justificando a necessidade do estabelecimento das concentrações letais para o consequente cálculo das RRs.

Ressalta-se que a escolha da dose diagnóstica utilizada foi realizada de acordo com preconização da WHO (1994) e OPS (2005) que recomendam o uso de uma dose diagnóstico (DD) referente à $1xDL_{99}$ da linhagem referência de suscetibilidade. A sobrevivência, em resposta a essa DD, de no mínimo um inseto em dois dos três ensaios com 10 ninfas I deve ser interpretado como indicativo de resistência justificando a necessidade do estabelecimento das concentrações letais para esta população, e conseqüente, razões de resistência.

Em 2007 populações de *T. sordida* da localidade Barriguda (município de Coração de Jesus) apresentaram RR_{50} de 6,5. Utilizando mesma metodologia, em 2009 novas capturas foram realizadas na mesma área revelando a manutenção da RR anteriormente encontrada. Na tentativa de elucidar questões referentes a dinâmica da resistência na linha temporal, foi realizada caracterização ambiental, bioquímica e molecular das populações triatomínicas coletadas na região de entorno a área de interesse, sendo elas: Boa Vista I, Bom Jesus, Jataí I e Jataí II, com exceção de Pau Dólio (anexo 2).

4.5. Caracterização ambiental das localidades de estudo do município de Coração de Jesus

Os parâmetros de umidade relativa do ar, temperatura (máxima e mínima), insolação e precipitação referentes ao período de 1970 a 2010, foram obtidos junto ao Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) , sendo em seguida, associados às informações de ocorrência dos fenômenos “*El nino*” e “*La nina*” no país.

Ressalta-se que a intensidade dos fenômenos El Niño e La Niña foi classificada em fraca, moderada e forte utilizando com a média dos Índices Oceânico do Niño (ION) de acordo com preconização do Golden Gate Weather Services (2008).

As unidades domiciliares foram caracterizadas por meio de um questionário próprio (anexo 3), aplicado pelos agentes de saúde, em conformidade com o Comitê de Ética do CPqRR/FIOCRUZ/MS (CAAE: 0 005.0.245.000-11). Foram abordados os seguintes aspectos: 1) estrutura/aspectos físicos das UD's, 2) criação de animais domésticos e uso de inseticidas com vistas ao controle de praga dos mesmos; 3) áreas de cultivo e uso de inseticida com vistas ao controle de pragas das mesmas; 4) uso de inseticidas domésticos para controle de pragas nas UD's; 5) caracterização do peridomicílio e acesso as matas no entorno que possam intercomunicar os ambientes silvestres, domésticos e peridomésticos. Todas essas informações foram digitalizadas por dupla entrada no Excel, seguido da análise dos dados.

A qualidade das atividades de controle desenvolvidas pelo PCDCCh nas localidades de interesse foram investigadas por meio de um segundo questionário (anexo 4) no qual foram abordados: tempo de experiência profissional dos agentes, realização de cursos de capacitação/atualização, procedimentos adotados nas atividades de borrifação, possíveis dificuldades para a execução das atividades (falta de funcionários, veículos, inseticida, etc), intoxicação com ativos químicos.

Para avaliação do histórico de infestação triatomínica nas áreas de interesse e carga de inseticidas utilizadas durante as atividades do PCDCCh no período de 1978 a 1994, foram analisadas as informações disponíveis no CárDEX, bem como dados fornecidos pela SES/MG. O CárDEX é um arquivo organizado pela FUNASA que registra todas as informações sobre os resultados obtidos nas atividades do PCDCCh em municípios de Minas Gerais, onde constam informações de pesquisa, borrifação, infestação e outros parâmetros ao nível de cada localidade, desde a implantação do Programa de Chagas até 1997 (DIOTAIUTI, 2009), quando se deu o início da municipalização do controle de endemias. O consumo de inseticida nos anos de 2000 a 2006 foi obtido diretamente pela SES/MG.

4.6. Estruturação genética das populações de *T. sordida* utilizando marcadores microssatélites

Os indivíduos parentais das populações de *T. sordida* foram armazenados em freezer -20°C até o momento da extração do DNA de acordo com DE QUEIROZ BALBINO *et al.* (2006) com modificações. O músculo alar foi retirado de cada espécime com auxílio de pinça e tesoura, lavado com pbs, e macerado individualmente em 100 µl de “solução de extração” STE

1X (NaCl 0,01M; Tris-HCl 0,1M e EDTA 1M) com auxílio de um pistilo. Após incubação a 90°C por 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante retirado. A quantificação do DNA extraído foi realizada individualmente em espectrofotômetro NanoDrop ND.1.000. O material processado foi mantido a -20°C até o momento do uso.

Para as reações de PCR foram utilizados os iniciadores (anexo 5) descritos para *T. brasiliensis* (HARRY *et al.*, 2009), *T. dimidiata* (ANDERSON *et al.*, 2002), *T. infestans* (MARCET *et al.*, 2005) e *T. pseudomaculata* (HARRY *et al.*, 2008) e Taq DNA Polymerase Recombinant (InvitrogenTM), totalizando um volume final de 10µl contendo: 5ng de DNA, 1µL de Tampão 10x, 1µL de DNTp a 10mM, 1µL de cada iniciador a 1µM, MgCl₂ a 50mM (algumas reações foram realizadas com 0,3µL e outras com 0,6µL de acordo com especificidade do iniciador) e água ultrapura. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycles® Gradient. Após desnaturação do DNA a 94°C por 5 minutos foram realizados 35 ciclos (94°C por 30 segundos, anelamento por um minuto com temperaturas específicas de cada iniciador, 72°C por 45 segundos) seguidos de extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata 0,2% e revelados em solução de NaOH 0,75M e formaldeído 0,1M. O tamanho dos produtos de PCR foram estimados relativamente pelo padrão de peso molecular (DNA do bacteriófago Ø-X174 digerido pela enzima de restrição HaeIII).

As reações que obtiveram amplificação do *locus* esperado foram ressubmetidas a outra PCR com iniciador marcado com sonda bioluminescente específica (InvitrogenTM). Em placas de 96 poços, a cada 2 µL desta reação foram adicionados 8 µl de um mix contendo 7,6 µl de solução Tween 0,1% e 0,4 µL de marcador ET-400 (GE Health Care). Após a desnaturação, as placas foram encaminhadas para a genotipagem na Plataforma do Centro de Pesquisa Rene Rachou- CPqRR. Os dados foram analisados utilizando o programa *Fragment Profiler* versão 1.2.

Para a análise genética foi utilizado o programa Arlequin versão 3.0 (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Para cada *locus* calculou-se o número de alelos, as frequências alélicas observadas, as frequências genotípicas observadas e os valores de heterozigose observada e esperada dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

No programa Arlequin a estrutura genética das populações foi investigada pela análise de variância molecular (AMOVA) que é um método para estimar a proporção da variação devida a cada tipo de agrupamento das populações, e a partir daí permite-se testar hipóteses sobre estas diferenças. Trata-se de um teste de hipóteses que avalia a diferença encontrada dentro de um grupo e entre grupos. Caso não exista diferença, conclui-se pela não estruturação genética da

população, considerando-se a possibilidade de haver fluxo gênico entre elas. Em caso contrário, sugere-se que os grupos estão bem estruturados sendo portanto, populações distintas (EXCOFFIER *et. al.*, 1992).

Para os testes da AMOVA foram realizados os seguintes agrupamentos: Grupo 1 - todas as populações juntas (Barriguda, Boa Vista, Bom Jesus, Jataí I, Jataí II), Grupo 2 - as populações foram divididas em 2 grupos de acordo com o *status* de resistência proposto pela OPAS (2005) (Barriguda e Jataí I, Jataí II, Boa Vista, Bom Jesus) e Grupo 3 - as populações foram divididas em 2 grupos de acordo com o *status* de resistência proposto por ZERBA & PICOLLO (2002) (Resistentes: Barriguda, Bom Jesus e Boa Vista e Suscetíveis: Jataí I, Jataí II). As estatísticas calculadas representaram os índices de fixação (F_{SC} e F_{IS}) originalmente propostos por WRIGHT (1965). Foi gerada uma matriz de distâncias (F_{ST}) entre os pares de populações.

4.7. Quantificação da atividade de enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticida nas populações de *T. sordida*

Os ensaios bioquímicos foram realizados de acordo com VALLE *et al.*, (2006), com modificações. Um total de 150 ninfas I (jejum, 5 dias de idade - peso $1,2 \pm 0,2$ mg) de cada população de interesse foi acondicionado em tubos eppendorf e congelado, ainda vivo, à -70°C . As amostras foram retiradas imediatamente antes do uso, e colocadas no gelo para seu processamento inicial. A trituração dos insetos foi realizada fora do gelo em $30\mu\text{l}$ de água deionizada (Milli Q), durante aproximadamente 10 segundos com o auxílio de um pistilo para microtubos acoplado a um homogeneizador mecânico (Foredom). Após a trituração, elevou-se o volume do homogenato para $300\mu\text{l}$ e a partir daí foram retiradas alíquotas para todos os ensaios. O homogenato de cada inseto foi submetido à quantificação simultânea da atividade das enzimas: esterases, com os substratos acetato de alfa-naftil, de beta-naftil, e de p-nitrofenil; oxidase de função mista; Glutathione-S-Transferase; acetilcolinesterase. Dosagem de proteínas totais de cada indivíduo, utilizando reagente de Bradford, foi realizada para normalização das atividades enzimáticas. Quatro alíquotas por indivíduos, de $25\mu\text{L}$ cada, foram reservadas para dosagem de AChE. Duas outras alíquotas por indivíduo, de $20\mu\text{L}$ cada, foram utilizadas para dosagem de OFM. O restante do homogenato ($\sim 160\mu\text{L}$) foi centrifugado a -4°C a 12.000g por um minuto. Em seguida, os tubos voltaram para o gelo de forma a reduzir a proteólise. O restante do homogenato foi distribuído em placas de 96 poços para a realização dos demais ensaios bioquímicos, conforme descrito no anexo 6 (figura 6).

Após o processamento das amostras e leitura em espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Devices), obteve-se como resultado o valor de absorbância das réplicas de cada

ninfa. Para serem expressos em valores de atividade enzimática, estes dados foram processados e corrigidos quanto: ao volume de homogeneização da ninfa, a quantidade de proteínas totais e a unidade de atividade de cada enzima.

Foram utilizadas planilhas, elaboradas em Excel, que permitiram: 1) a verificação e validação dos resultados obtidos com as duplicatas (foram rejeitadas as amostras cujo desvio padrão entre as réplicas foram superior a 30% de sua média); 2) transformação dos valores de absorbância em atividade enzimática; 3) a correção dos valores de atividade pela quantidade de proteínas totais em cada inseto e 4) a confecção automática de histogramas com o perfil das populações, para cada enzima avaliada.

A classificação do perfil de atividade enzimática das populações de estudo foi realizada por meio da adoção de medidas não paramétricas, tendo sido adotado como ponto de corte o percentil 99 (p99) da LRS. A categorização dos resultados foi feita empregando o percentual das populações que apresentam atividade superior ao ponto de corte utilizado, sendo classificadas como: 1) normal: se até 15% dos indivíduos da população tiver atividade acima do p99 da cepa LRS; 2) alterada: quando de 15 a 50% da população apresentam atividade acima do p99 da cepa LRS, e 3) muito alterada: se mais de 50% da população tiver atividade acima do p99 da cepa LRS.

Além deste critério de classificação foram produzidos gráficos de dispersão com os resultados obtidos para cada população analisada utilizando o programa GRAPH PAD Prism® versão 4.0 (Graph Pad Software INC, San Diego, CA). Neste gráficos, cada indivíduo tem sua atividade representada por um ponto. Adicionalmente, foram marcadas as medianas do perfil de cada população.

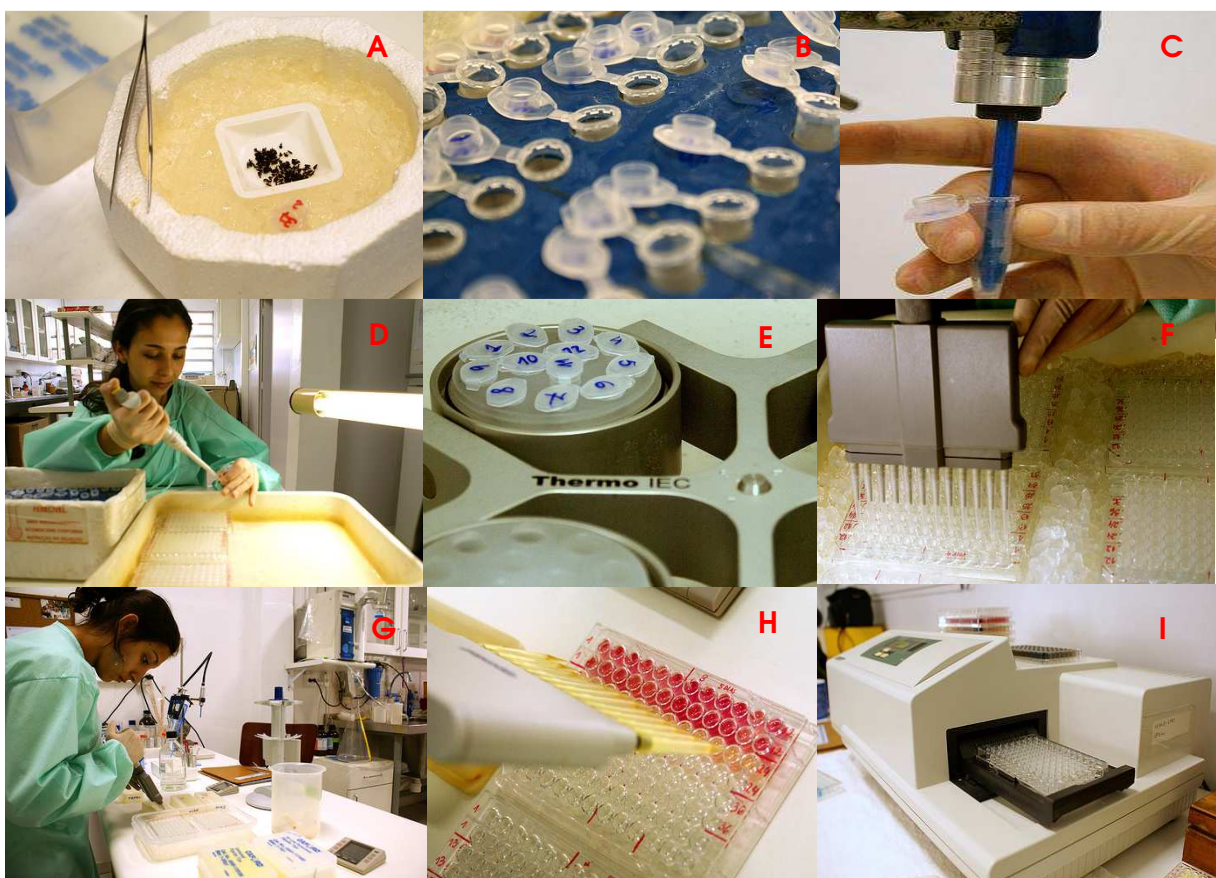


Figura 6. Acondicionamento dos espécimes no gelo para processamento inicial (A), acondicionamento individual dos espécimes em eppendorf (B), maceração dos triatomíneos com auxílio de um pistilo acoplado a homogeneizador mecânico (C), distribuição das amostras pré-centrifugação nas placas dispostas em gelo para realização dos ensaios de ACHE e OFM (C), centrifugação a 4°C (E), distribuição das amostras pós-centrifugação nas placas para demais ensaios (F), realização dos ensaios bioquímicos em temperatura ambiente (G), exemplo de ensaio colorimétrico (H), leitura dos ensaios em espectrofotômetro (I).

Considerando a inexistência de ensaios bioquímicos para quantificação da atividade enzimática com triatomíneos, avaliaram-se os seguintes detalhes técnicos: geração ideal, idade ideal e número amostral ideal para realização dos ensaios.

4.7.1. Determinação da geração ideal dos triatomíneos para quantificação da atividade de enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticidas

Os ensaios foram realizados de acordo com metodologia apresentada no item “ 4.7. Quantificação da atividade de enzimas relacionadas a detoxificação nas populações de *T.sordida*” variando-se a geração dos indivíduos processados. Foram utilizadas 45 ninfas I da LRS das gerações F1 e F2 (cinco dias de idade, jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg).

4.7.2. Determinação da idade ideal dos triatomíneos para quantificação da atividade de enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticidas

Ensaio foram realizados de acordo com metodologia apresentada no item “4.7. Quantificação da atividade de enzimas relacionadas a detoxificação de inseticida nas populações de *T.sordida*” variando-se a idade dos indivíduos processados. Foram utilizadas 45 ninfas I da LRS da geração F2 com um, três e cinco dias de idade (jejum - peso $1,2\pm 0,2$ mg) .

4.7.3. Determinação do número amostral ideal para quantificação da atividade de enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticidas

Ensaio foram realizados de acordo com metodologia apresentada no item “4.7. Quantificação da atividade de enzimas relacionadas a detoxificação de inseticida nas populações de *T.sordida*” variando-se o número amostral de indivíduos processados por análise. Foram utilizados 45, 90 e 135 ninfas I da LRS da geração F2 (cinco dias de idade, jejum - peso $1,2\pm 0,2$ mg).

5.1. Perfil de suscetibilidade de populações de *T. sordida* ao piretróide deltametrina

Os valores calculados para as DL_{50} e DL_{95} da linhagem referência de suscetibilidade, “TsREF”, foram de 0,06498 ng i.a./ninfa e 0,25558 ng i.a./ninfa, respectivamente (anexo 7).

As análises dos ensaios dose-resposta utilizando o programa PROBIT (FINEY, 1971) identificaram RR_{50} que variaram de 0,44 a 6,5 (tabela 3).

Tabela 3. DL₅₀, DL₉₅, RR₅₀, RR₉₅ e *Slope* da linhagem referência de suscetibilidade (em vermelho) e das populações de campo de *T. sordida* tratadas com deltametrina, classificados em ordem crescentes de RR₅₀

Sigla	DL₅₀ (IC 95%)	DL₉₅ (IC 95%)	RR₅₀	RR₉₅	<i>Slope</i> ± <i>Desvio padrão</i>
TsMABO	0,02316 (0,01854 - 0,02862)	0,12074 (0,08239 - 0,22552)	0,35	0,42	2,294127 ± 0,3117911
TsMABG	0,02316 (0,01854 - 0,02862)	0,12074 (0,08239 - 0,22552)	0,36	0,47	2,585084 ± 0,3462416
TsMB	0,02703 (0,02264 - 0,03179)	0,11540 (0,08650 - 0,17871)	0,42	0,45	2,609935 ± 0,3075596
TsMABS	0,02878 (0,02366 - 0,03500)	0,14447 (0,10001 - 0,26053)	0,44	0,57	2,348057 ± 0,3037205
TsMAPE	0,03429 (0,022821 - 0,04194)	0,16969 (0,11718 - 0,30493)	0,53	0,66	2,368817 ± 0,2992534
TsMAB1	0,04067 (0,03582 - 0,04609)	0,11103 (0,08790 - 0,16261)	0,63	0,43	3,77233 ± 0,5066604
TsIBG	0,04698 (0,03502 - 0,06145)	0,48518 (0,28753 - 1,15977)	0,72	1,90	1,622538 ± 0,2249861
TsCMCA	0,04687 (0,03668 - 0,05865)	0,31420 (0,21007 - 0,59230)	0,72	1,23	1,990988 ± 0,2529151
TsSHS	0,05714 (0,04449 - 0,07296)	0,45522 (0,28247 - 0,99810)	0,88	1,78	1,825349 ± 0,2464478
TsSMS	0,05695 (0,04260 - 0,07584)	0,67391 (0,36593 - 1,98778)	0,88	2,64	1,533097 ± 0,2312359
TsREF	0,06498 (0,05297 - 0,07711)	0,25558 (0,18773 - 0,43379)	1,00	1,00	2,766234 ± 0,4103722
TsCJBO	0,06644 (0,05198 - 0,8516)	0,50023 (0,31693 - 1,02544)	1,02	1,96	1,876515 ± 0,2345804
TsPFO	0,06791 (0,05344 - 0,08526)	0,51367 (0,34245 - 0,94239)	1,05	2,01	1,872208 ± 0,2134808
TsSMC	0,07325 (0,58630 - 0,09102)	0,50068 (0,33516 - 0,92368)	1,13	1,96	1,970957 ± 0,2319078
TsSFBG	0,07500 (0,05668 - 0,09855)	0,89802 (0,52814 - 2,06372)	1,15	3,51	1,525866 ± 0,1879548
TsCMS	0,07776 (0,06066 - 0,09756)	0,56767 (0,36144 - 1,21667)	1,20	2,22	1,905577 ± 0,2696053
TsBMCC	0,07949 (0,06385 - 0,09740)	0,45157 (0,30949 - 0,82780)	1,22	1,77	2,18076 ± 0,2846758
TsMQ	0,07932 (0,06216 - 0,10150)	0,71648 (0,43847 - 1,56782)	1,22	2,80	1,721247 ± 0,2177378
TsBM	0,08312 (0,06526 - 0,10569)	0,67358 (0,43621 - 1,29174)	1,28	2,64	1,810565 ± 0,2054649
TsMAPO	0,08466 (0,07052 - 0,10082)	0,36033 (0,26325 - 0,58847)	1,30	1,40	2,615409 ± 0,3261687
TsFGFC	0,08499 (0,06499 - 0,10480)	0,50497 (0,34896 - 0,94263)	1,31	1,98	2,12592 ± 0,3079842
TsIVB	0,08695 (0,6990 - 0,10724)	0,48874 (0,33712 - 0,86746)	1,34	1,91	2,194177 ± 0,2681836
TsMCPR	0,09550 (0,07598 - 0,11982)	0,81130 (0,52377 - 1,57173)	1,47	3,17	1,770575 ± 0,2018067
TsBE	0,10271 (0,07733 - 0,13320)	1,17226 (0,70175 - 2,67052)	1,58	4,58	1,555875 ± 0,2008325
TsSHC	0,10253 (0,08124 - 0,13072)	0,76961 (0,46577 - 1,83469)	1,58	3,01	1,879292 ± 0,272835

Cont.tabela 3. DL₅₀, DL₉₅, RR₅₀, RR₉₅ e *Slope* da linhagem referência de suscetibilidade (em vermelho) e das populações de campo de *T. sordida* tratadas com deltametrina, classificados em ordem crescentes de RR₅₀

Sigla	DL₅₀ (IC 95%)	DL₉₅ (IC 95%)	RR₅₀	RR₉₅	<i>Slope</i> ± <i>Desvio padrão</i>
TsELP	0,10271 (0,07733 - 0,13320)	1,17226 (0,70175 - 2,67052)	1,58	4,58	1,555875 ± 0,2008325
TsMAL	0,10261 (0,08322 - 0,13134)	0,55160 (0,34366 - 1,29802)	1,63	2,16	2,25236 ± 0,3500948
TsMT	0,11008 (0,08930 - 0,13497)	0,69030 (0,46779 - 1,26293)	1,69	2,70	2,063389 ± 0,2501181
TsIMC	0,11480 (0,09478 - 0,13851)	0,59758 (0,42397 - 1,00476)	1,77	2,34	2,296312 ± 0,2662443
TsMG	0,11642 (0,09540 - 0,13968)	0,55610 (0,39701 - 0,95471)	1,79	2,18	2,422501 ± 0,3166517
TsSHB	0,11690 (0,09223 - 0,15103)	0,91627 (0,54775 - 2,19232)	1,80	3,59	1,839856 ± 0,258450
TsMRA	0,11722 (0,09524 - 0,14413)	0,74224 (0,49788 - 1,38501)	1,80	2,90	2,052581 ± 0,2509337
TsLSJ	0,11745 (0,9520 - 0,14230)	0,62231 (0,43057 - 1,14039)	1,81	2,43	2,271913 ± 0,3087804
TsJJ	0,11942 (0,09072 - 0,15617)	1,81227 (1,06075 - 4,05402)	1,84	7,09	1,392897 ± 0,1559985
TsBSC	0,11991 (0,09614 - 0,14787)	0,92016 (0,61340 - 1,70535)	1,85	3,60	1,858971 ± 0,2156289
TsVPB	0,12191 (0,09267 - 0,15765)	0,96449 (0,57940 - 2,38214)	1,88	3,77	1,831577 ± 0,280755
TsLG	0,12287 (0,09975 - 0,14922)	0,66315 (0,45388 - 1,24196)	1,89	2,59	2,246997 ± 0,3076005
TsCJCAB	0,12526 (0,09909 - 0,15901)	1,07407 (0,65789 - 2,38571)	1,93	4,20	1,762943 ± 0,2307603
TsSMB	0,12548 (0,09134 - 0,17139)	1,83702 (0,97361 - 5,38784)	1,93	7,18	1,411558 ± 0,1993814
TsICV	0,12792 (0,10157 - 10,16307)	0,89219 (0,56567 - 1,84615)	1,97	3,49	1,950446 ± 0,2486568
TsSJMT	0,12769 (0,10886 - 0,14866)	0,43428 (0,33630 - 0,63749)	1,97	1,70	3,094685 ± 0,3611941
TsIMB	0,12835 (0,10585 - 0,15612)	0,70259 (0,48567 - 1,24090)	1,98	2,75	2,228378 ± 0,2653458
TsLM	0,12893 (0,10429 - 0,15843)	0,77145 (0,53933 - 1,30455)	1,98	3,02	2,117515 ± 0,2319684
TsFM	0,12941 (0,10305 - 0,16427)	1,06651 (0,65051 - 2,40536)	1,99	4,17	1,796065 ± 0,2387321
TsBBV2	0,13147 (0,10885 - 0,15811)	0,91627 (0,54775 - 2,19232)	2,02	3,58	1,831577 ± 0,2501181
TsEM	0,13078 (0,10466 - 0,16648)	1,09804 (0,68060 - 2,30967)	2,01	4,28	1,780396 ± 0,2123702
TsFSA	0,13094 (0,10450 - 0,16262)	0,85504 (0,54959 - 1,81728)	2,02	3,35	2,018894 ± 0,288686
TsMV	0,13147 (0,10885 - 0,15811)	0,75352 (0,53535 - 1,24620)	2,02	2,95	2,169659 ± 0,2351051

Cont.tabela 3. DL₅₀, DL₉₅, RR₅₀, RR₉₅ e *Slope* da linhagem referência de suscetibilidade (em vermelho) e das populações de campo de *T. sordida* tratadas com deltametrina, classificados em ordem crescentes de RR₅₀

Sigla	DL₅₀ (IC 95%)	DL₉₅ (IC 95%)	RR₅₀	RR₉₅	<i>Slope</i> ± Desvio padrão
TsJC	0,13179 (0,10442 - 0,16866)	1,15552 (0,68846 - 2,73717)	2,03	4,52	1,744842 ± 0,236445
TsPCV	0,13302 (0,10752 - 0,16348)	0,78972 (0,51879 - 1,61381)	2,05	3,09	2,126784 ± 0,3024842
TsLSJ2	0,13370 (0,11020 - 0,16129)	0,65940 (0,45943 - 1,18689)	2,06	2,58	2,373962 ± 0,3149217
TsFSA1	0,13558 (0,11142 - 0,16424)	0,69381 (0,47707 - 0,28336)	2,09	2,71	2,320285 ± 0,3123067
TsMCRO	0,13676 (0,11146 - 0,16957)	0,87463 (0,57295 - 1,71103)	2,10	3,42	2,041550 ± 0,255140
TsFSM	0,13662 (0,10788 - 0,17221)	1,31121 (0,81358 - 2,77704)	2,10	5,13	1,675118 ± 0,2053498
TsLA	0,13739 (0,10704-0,17640)	0,97599 (0,59275 - 2,36446)	2,11	3,82	1,93214 ± 0,2946357
TsEMI	0,13762 (0,11336 - 0,16653)	0,69303 (0,47805 - 1,27312)	2,12	2,71	2,343333 ± 0,3138000
TsFB1	0,13873 (0,11149 - 0,17533)	1,04662 (0,64966 - 2,27785)	2,13	4,09	1,874634 ± 0,2452204
TsJD	0,13822 (0,10094 - 0,18133)	1,05175 (0,61592 - 2,98984)	2,13	4,12	1,866702 ± 0,1109403
TsLOJFQ	0,13912 (0,11004 - 0,17588)	1,35352 (0,82681 - 2,96594)	2,14	5,29	1,665056 ± 0,2081881
TsGAM	0,13977 (0,11477 - 0,16994)	0,73233 (0,49784 - 1,38701)	2,15	2,87	2,287267 ± 0,311153
TsVPG	0,14019 (0,11555 - 0,16988)	0,69683 (0,48349 - 1,25549)	2,16	2,73	2,362419 ± 0,3078096
TsJP	0,14102 (0,10983 - 0,18553)	1,61369 (0,92132 - 3,92317)	2,17	6,31	1,554218 ± 0,1917058
TsIA	0,14150 (0,11732 - 0,17050)	0,55770 (0,40814 - 0,90245)	2,18	2,18	2,762036 ± 0,3399455
TsIB	0,14268 (0,11446 - 0,17518)	0,81228 (0,56295 - 1,43675)	2,20	3,18	2,178084 ± 0,2699631
TsFJC	0,14405 (0,11805 - 0,17607)	0,78185 (0,52326 - 1,53041)	2,22	3,06	2,239602 ± 0,3093611
TsLB	0,14755 (0,12214 - 0,17877)	0,72884 (0,50126 - 1,34612)	2,27	2,85	2,371621 ± 0,3170539
TsGVC	0,14735 (0,12157 - 0,17668)	0,77192 (0,54883 - 1,30706)	2,27	3,02	2,287449 ± 0,2756872
TsVC	0,14824 (0,12418 - 0,17729)	0,64617 (0,46165 - 1,10468)	2,28	2,53	2,573088 ± 0,3291464
TsBMA	0,14824 (0,12418 - 0,17729)	0,64617 (0,46165 - 1,10468)	2,28	2,53	2,573088 ± 0,3291464
TsBB	0,14950 (0,11738 - 0,19611)	1,19232 (0,70751 - 2,82645)	2,30	4,66	1,824465 ± 0,2456384
TsVPBRE	0,15078 (0,12599 - 0,18111)	0,67948 (0,47957 - 1,19023)	2,32	2,66	2,516285 ± 0,3262575
TsJBL	0,15051 (0,12614 - 0,18014)	0,64617 (0,46165 - 1,10468)	2,32	2,53	2,762036 ± 0,3399455
TsSJPC	0,15203 (0,12738 - 0,18215)	0,66673 (0,47399 - 1,15117)	2,34	2,61	2,562517 ± 0,3294625
TsMF	0,15255 (0,12673 - 0,18185)	0,61998 (0,46666 - 0,93969)	2,35	2,43	2,701605 ± 0,3016131

Cont.tabela 3. DL₅₀, DL₉₅, RR₅₀, RR₉₅ e *Slope* da linhagem referência de suscetibilidade (em vermelho) e das populações de campo de *T. sordida* tratadas com deltametrina, classificados em ordem crescentes de RR₅₀

Sigla	DL₅₀ (IC 95%)	DL₉₅ (IC 95%)	RR₅₀	RR₉₅	<i>Slope</i> ± Desvio padrão
TsJB4	0,15938 (0,13268 - 0,18961)	0,63384 (0,45317 - 1,13442)	2,45	2,48	2,744123 ± 0,4074209
TsSFC	0,16091 (0,12876 - 0,19817)	1,02991 (0,70583 - 1,83493)	2,48	4,02	2,040651 ± 0,2428582
TsFANC	0,16333 (0,13637 - 0,19480)	0,79077 (0,56853 - 1,31057)	2,51	3,09	2,401844 ± 0,2838995
TsMM	0,16391 (0,13498 - 0,20222)	0,88915 (0,58363 - 1,81203)	2,52	3,47	2,240305 ± 0,3134104
TsSJPGG	0,16452 (0,13779 - 0,19855)	0,73832 (0,51567 - 1,32165)	2,53	2,89	2,523264 ± 0,3306413
TsVLJ1	0,16781 (0,13907 - 0,20567)	0,84729 (0,56775 - 1,65214)	2,58	3,32	2,33951 ± 0,3201323
TsMC	0,17171 (0,13857 - 0,21221)	1,01106 (0,68036 - 1,89540)	2,64	3,95	2,136691 ± 0,2714072
TsLOBC	0,17280 (0,13762 - 0,21792)	1,44048 (0,86617 - 3,45103)	2,66	5,63	1,786408 ± 0,2548225
TsCMCC	0,17315 (0,14373 - 0,20862)	0,91783 (0,63883 - 1,61808)	2,66	3,59	2,271287 ± 0,2780752
TsMCC	0,17689 (0,13729 - 0,23344)	1,86853 (1,06277 - 4,69824)	2,72	7,31	1,60696 ± 0,2105084
TsIMA	0,17652 (0,14786 - 0,21194)	0,89673 (0,63770 - 1,49129)	2,72	3,51	2,330747 ± 0,2587591
TsMAC	0,17689 (0,13729 - 0,23344)	1,86853 (1,06277 - 4,69824)	2,72	7,31	1,60696 ± 0,2105084
TsSJMC	0,17695 (0,14142 - 0,22452)	1,32283 (0,83993 - 2,68003)	2,72	5,17	1,883137 ± 0,2266903
TsSFE	0,18045 (0,14684 - 0,22172)	0,98753 (0,67542 - 1,79351)	2,78	3,86	2,228676 ± 0,2781051
TsLOASM	0,18217 (0,14617 - 0,23089)	1,57904 (0,96774 - 3,43277)	2,80	6,17	1,754118 ± 0,2168159
TsVLJ	0,18337 (0,15084 - 0,22936)	1,00766 (0,64578 - 2,16366)	2,82	3,94	2,22333 ± 0,3175878
TsPCM	0,19576 (0,15846 - 0,24547)	1,25621 (0,82256 - 2,41429)	3,01	4,91	2,037808 ± 0,2421186
TsSJPAP	0,19529 (0,15339 - 0,25241)	1,60671 (0,94817 - 3,98341)	3,01	6,28	1,797522 ± 0,258684
TsME	0,19914 (0,16970 - 0,23274)	0,72906 (0,54726 - 1,14609)	3,06	2,85	2,919085 ± 0,3682901
TsSJMSC	0,20571 (0,17510 - 0,24128)	0,77303 (0,57379 - 1,24240)	3,17	3,02	2,861521 ± 0,3659245
TsFSBF	0,20732 (0,17178 - 0,25142)	0,95338 (0,67496 - 1,62833)	3,19	3,73	2,48284 ± 0,3024829
TsGC	0,215629 (0,17256 - 0,25986)	1,00766 (0,64578 - 2,16366)	3,21	3,94	2,228676 ± 0,2781051
TsGCM	0,21933 (0,18320 - 0,26447)	1,03250 (0,70707 - 1,96113)	3,38	4,03	2,445338 ± 0,3440588
TsMABRE	0,25646 (0,21031 - 0,31007)	1,27922 (0,88636 - 2,34184)	3,94	5,00	2,357295 ± 0,3204596
TsCJB	0,42289 (0,36786 - 0,48405)	1,43181 (1,08906 - 2,24144)	6,50	5,60	3,106183 ± 0,4136599

De acordo com critério de categorização do *status* da resistência proposto pela OPAS (2005), das 99 populações de *T. sordida* estudadas, apenas uma (1%) foi classificada como resistente incipiente a deltametrina (TsCJB; RR₅₀: 6,50 – maior RR encontrada), sendo as demais (99%) suscetíveis (figura 7A). Contudo, de acordo com critério proposto por ZERBA & PICOLLO (2002), 55 populações (55,5%) foram consideradas resistentes (RR₅₀ 2,01 a 6,5), sendo as demais 44 (44,4%) suscetíveis ao ativo químico testado (figura 7B). Utilizando ambos os critérios, 10 populações (10,1%) foram mais suscetíveis ao inseticida avaliado que a própria LRS.

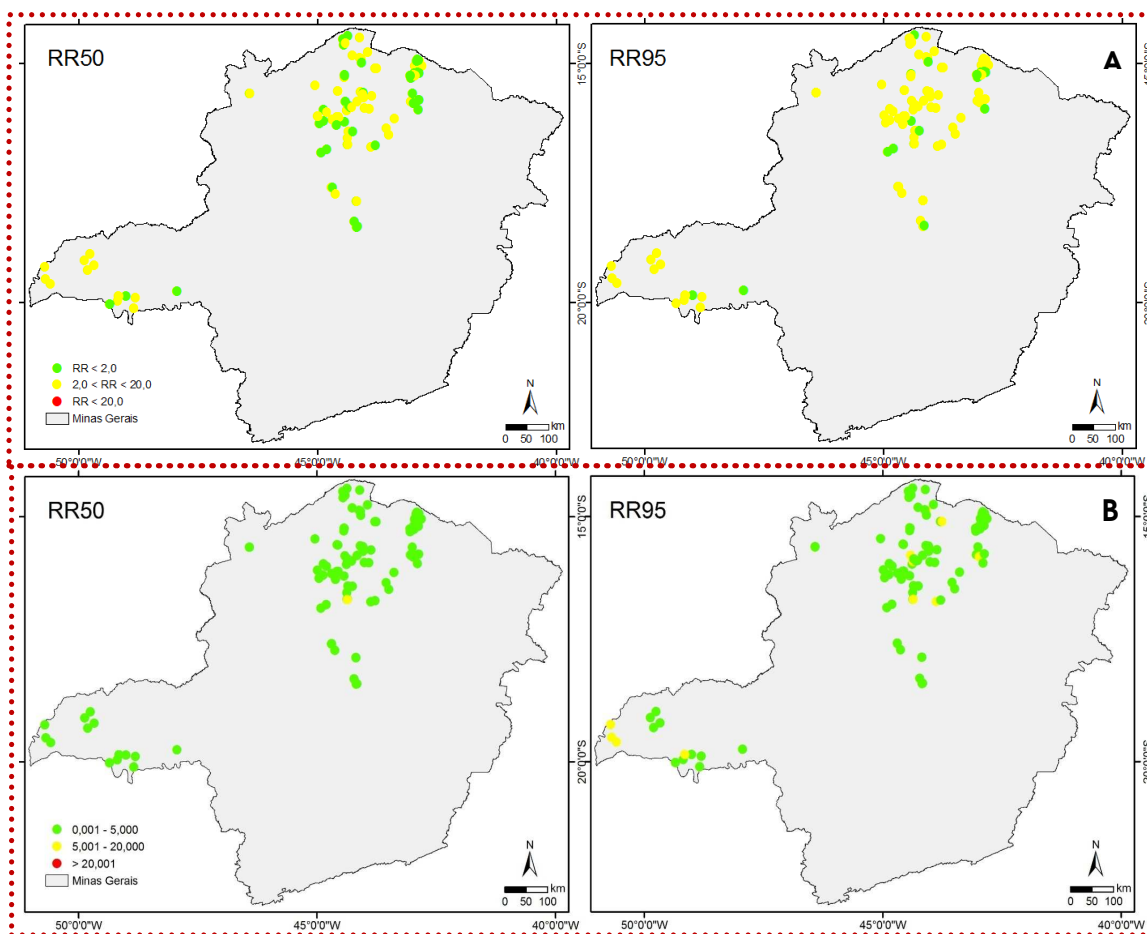


Figura 7. Distribuição das localidades de acrodo com o *status* de suscetibilidade/resistência proposto pela OPAS (2005) – A e por Zerba & PICOLLO (2002) – B.

Das 98 populações estudadas, duas (2,04 %) apresentaram *slope* igual ao da LRS e 4 (4,08 %) maior, refletindo perfis de heterogeneidade iguais ou semelhantes ao da linhagem referência, respectivamente. Contudo, outras 92 populações (93,88 %) apresentaram *slope* inferior a LRS refletindo maior variabilidade das mesmas com relação a esta característica merecendo atenção considerando a capacidade de modificação deste perfil de resposta frente a pressão de seleção com o ativo químico em campo na linha do tempo.

Os perfis de inclinação da reta dose resposta variaram bastante inclusive ao nível de município (figuras 8, 9, 10, 11e 12).

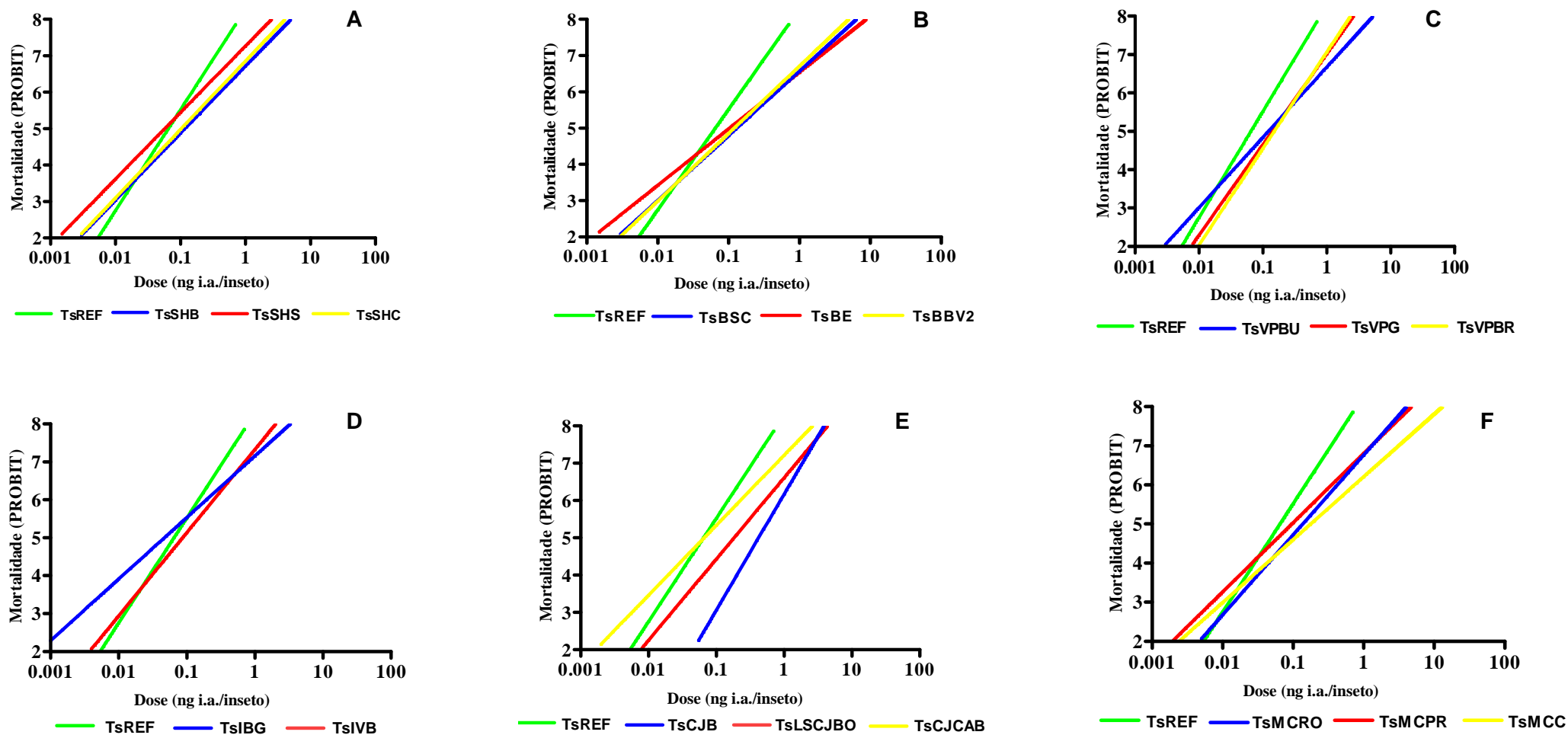


Figura 8. Perfil de inclinação da reta dose resposta para populações de *T. sordida*, em escala logarítmica (aplicação tópica de 0,2 μ L de deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F1 - cinco dias de idade, jejum - peso 1,2 \pm 0,2 mg - registro de mortalidade com 72 horas.) Localidades amostradas: A: Santo Hipólito; B: Buenópolis; C: Várzea da Palma; D: Ibiaí; E: Coração de Jesus; F: Montes Claros.

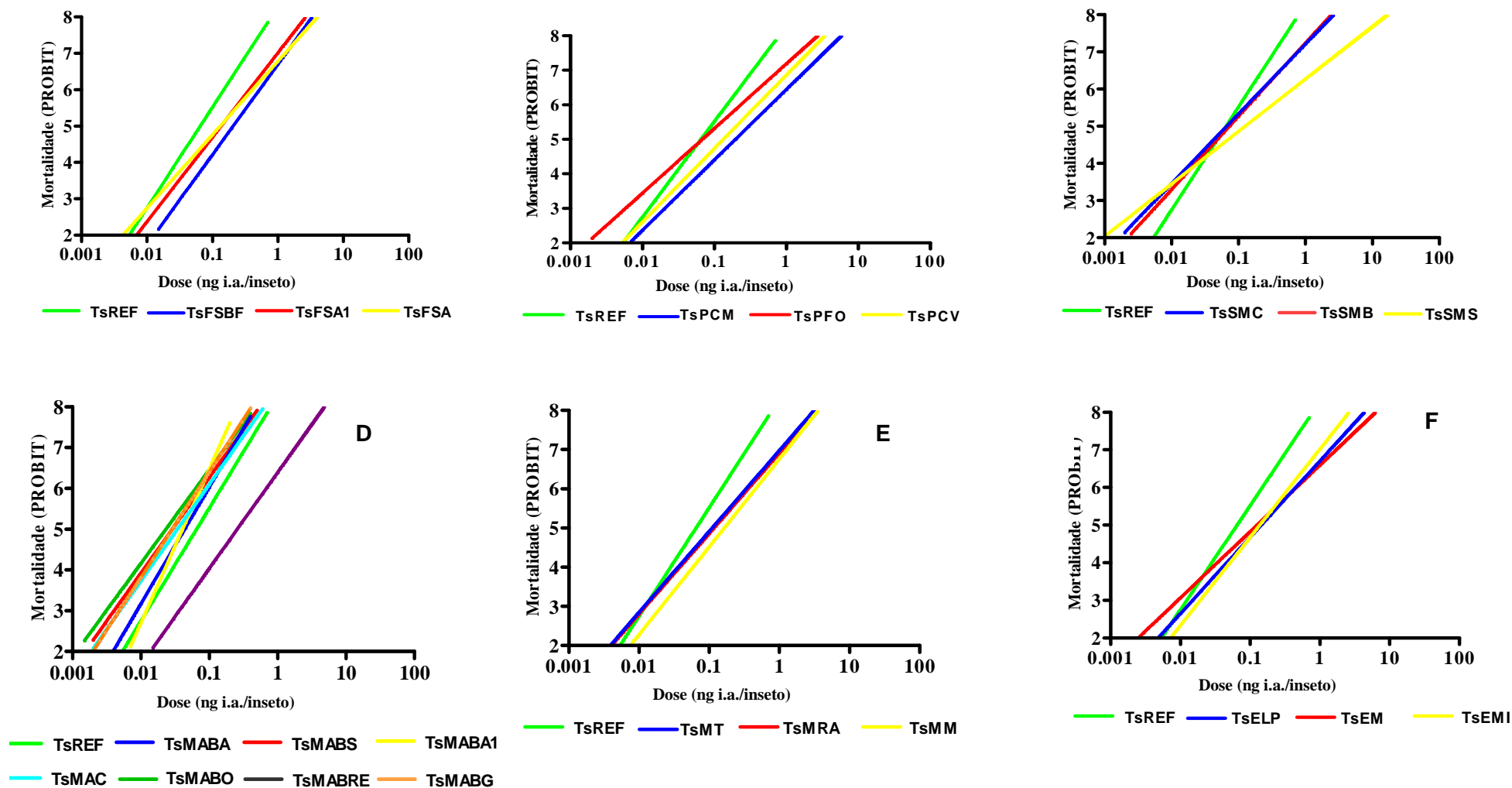


Figura 9. Perfil de inclinação da reta dose resposta para populações de *T. sordida*, em escala logarítmica (aplicação tópica de 0,2µL de deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F1 - cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg - registro de mortalidade com 72 horas.) Localidades amostradas: A: Francisco Sá; B: Porteirinha, C: Serranópolis de Minas; D: Monte Azul; E: Mamonas ; F: Espinosa

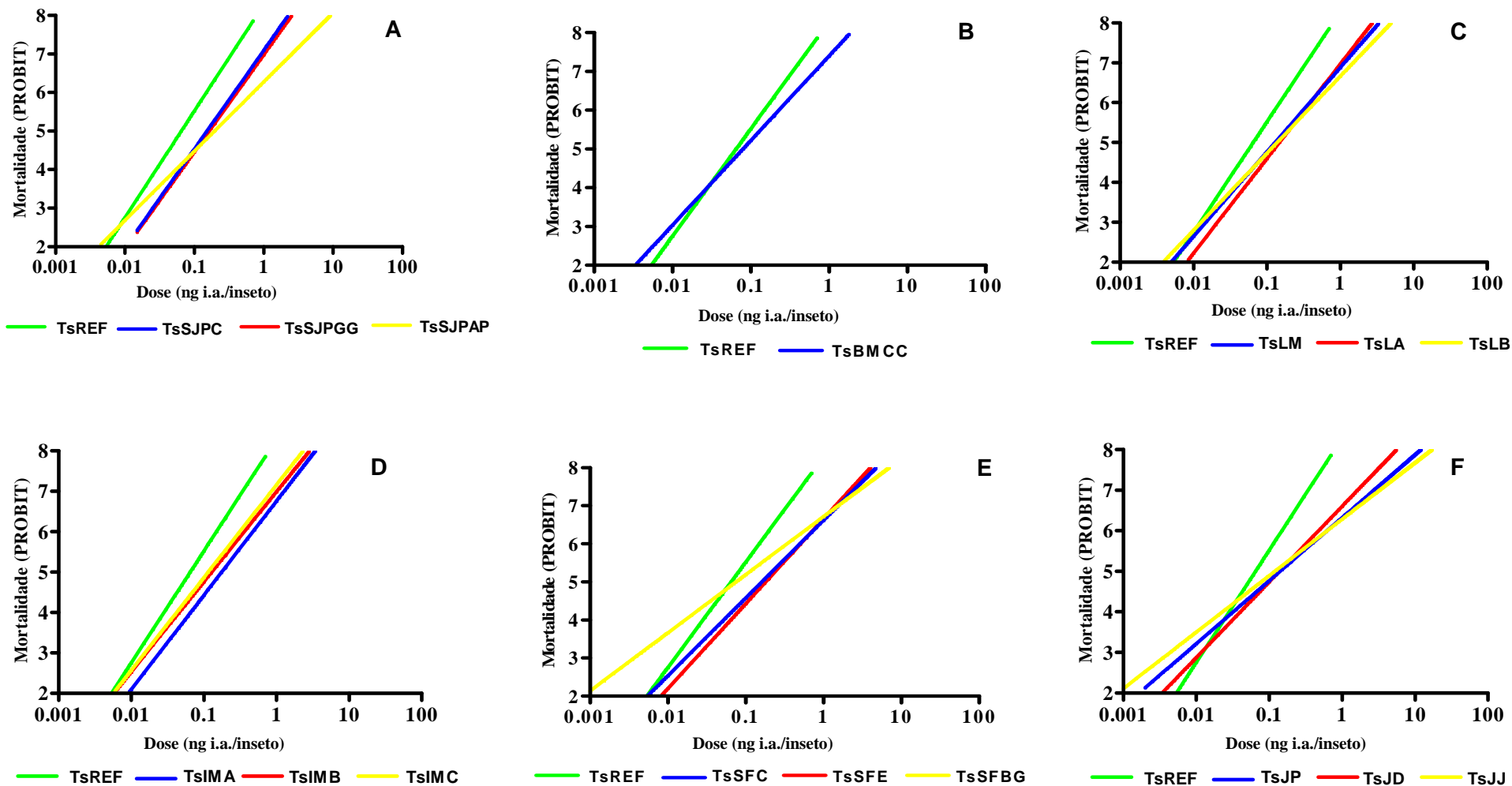


Figura 10. Perfil de inclinação da reta dose resposta para populações de *T. sordida*, em escala logarítmica (aplicação tópica de 0,2µL de deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F1 - cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg - registro de mortalidade com 72 horas.) Localidades amostradas: A: São João da Ponte; B: Brasília de Minas; C: Luislândia; D: Icaraf de Minas; E: São Francisco; F: Japonvar.

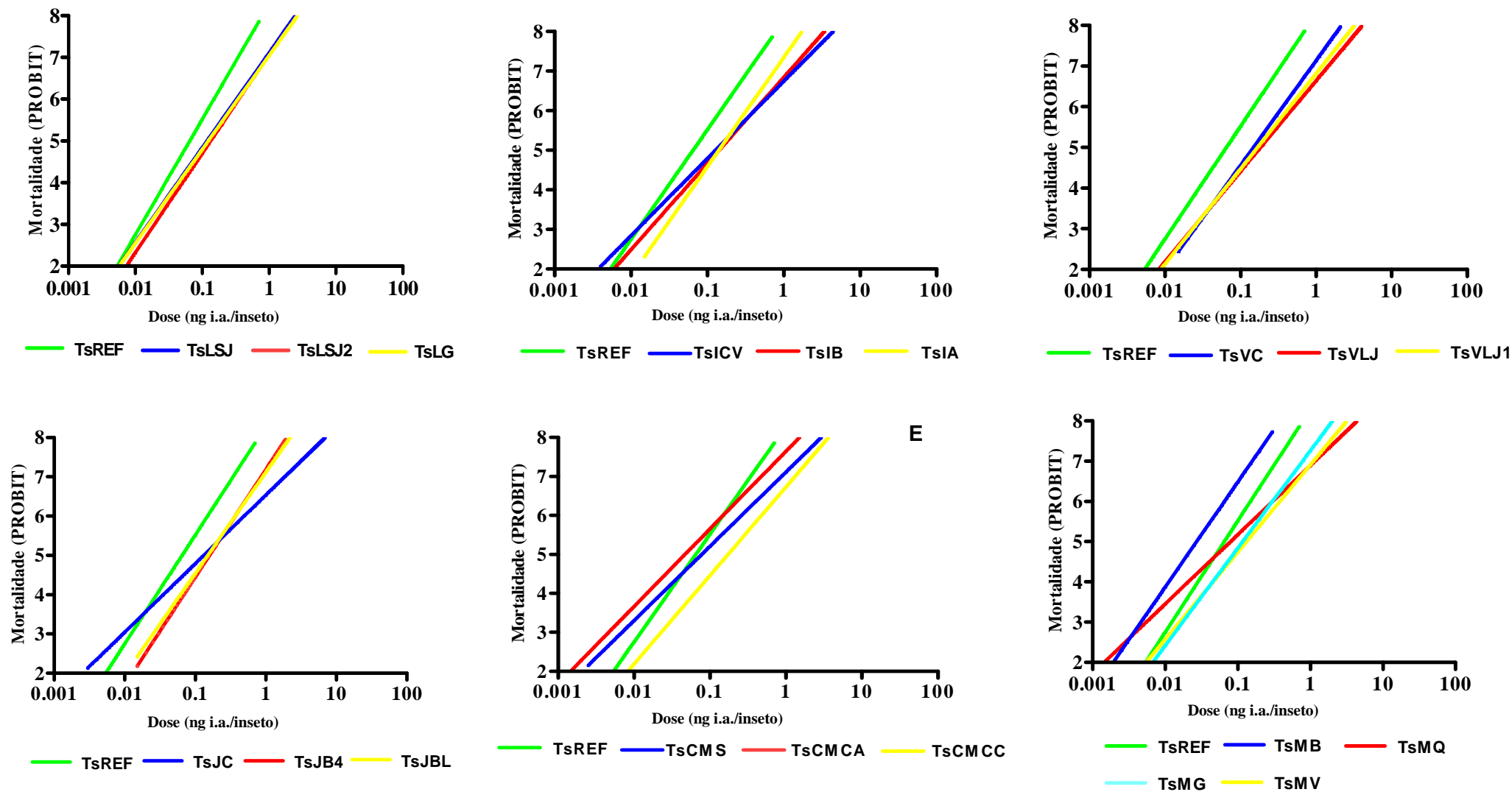


Figura 11. Perfil de inclinação da reta dose resposta para populações de *T. sordida*, em escala logarítmica (aplicação tópica de 0,2µL de deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F1 - cinco dias de idade, *jejum* - peso 1,2±0,2 mg - registro de mortalidade com 72 horas.) Localidades amostradas: A:Lontra; B: Ibiracatu; C: Vazerlândia; D:Januária; E: Cônego Marinho; F: Montalvânia.

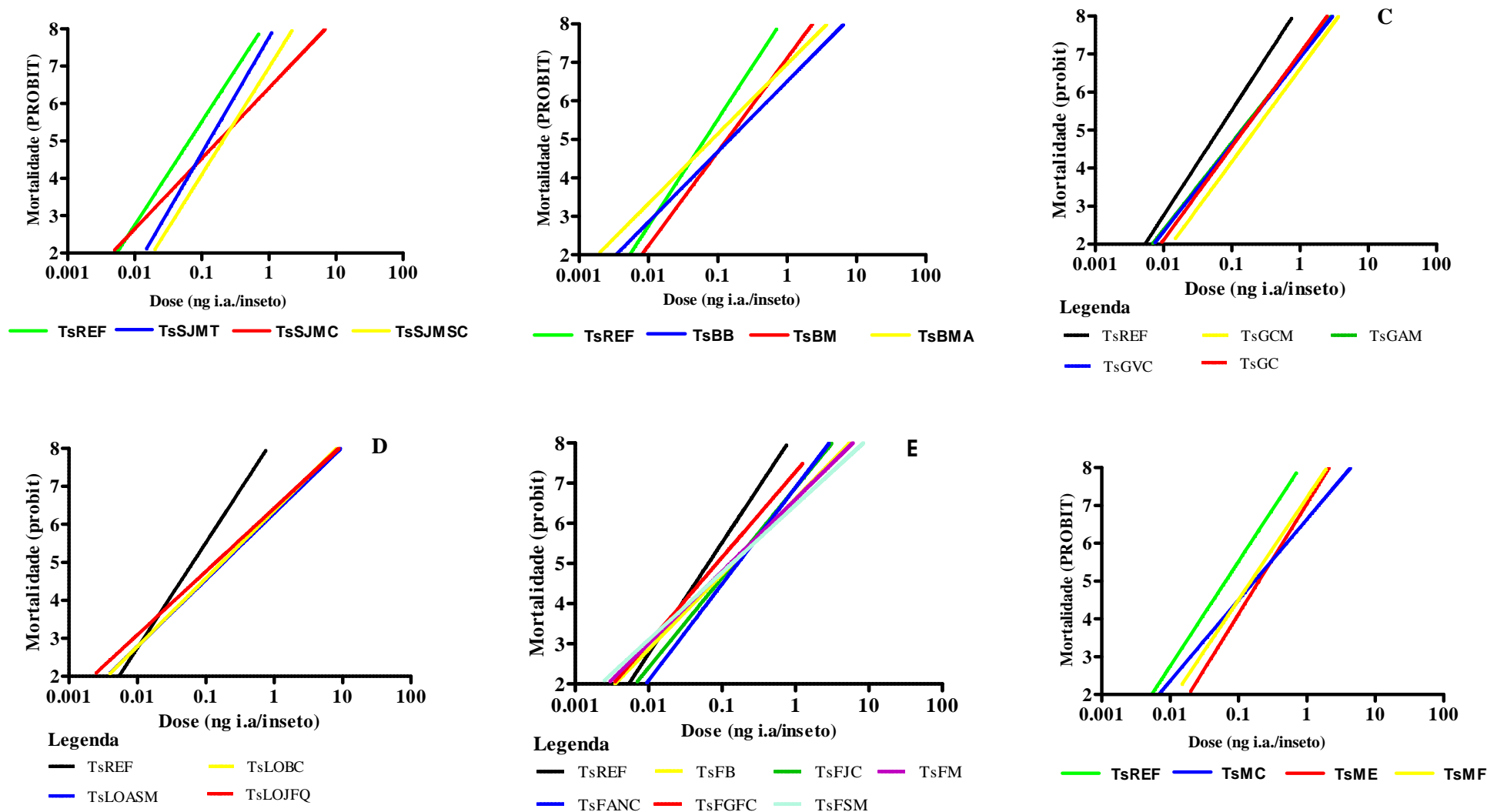


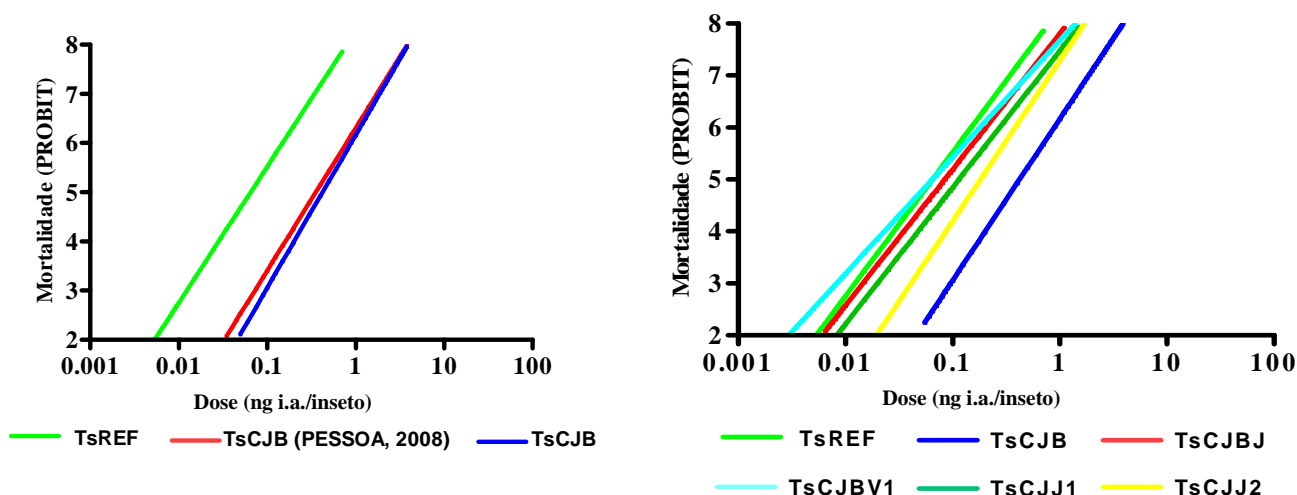
Figura 12. Perfil de inclinação da reta dose resposta para populações de *T. sordida*, em escala logarítmica (aplicação tópica de 0,2µL de deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F1 - cinco dias de idade, jejum - peso 1,2±0,2 mg - registro de mortalidade com 72 horas.) Localidades amostradas: A:São João das Missões; B:Burititis; C: Gurinhata; D: Limeiro do Oeste; E: Frutal; F:Manga.

Para as localidades de entorno de Barriguda as RR_{50} variaram de 1,22 a 2,82 (tabela 4). De acordo com preconização da OPAS (2005), todas as populações são suscetíveis ao inseticida testado, enquanto que de acordo com ZERBA & PICOLLO (2002) duas são suscetíveis (TsCJJ II e TsCJJ I) e outras duas, resistentes (TsCJBJ e TsCJBV1).

Tabela 4. DL_{50} , DL_{95} , RR_{50} , RR_{95} e *Slope* da linhagem referência de suscetibilidade e das populações *T. sordida* coletadas nas localidades de entorno de Barriguda (município de Coração de Jesus), ranquiados por RR_{50} em ordem crescente.

Sigla	DL_{50} (IC 95%)	DL_{95} (IC 95%)	RR_{50}	RR_{95}	Slope
TsCJJ I	0,07949 (0,06385 - 0,09740)	0,45157 (0,30949 - 0,82780)	1,22	1,77	$2,18076 \pm 0,2846758$
TsCJJ II	0,11991 (0,09614 - 0,14787)	0,92016 (0,61340 - 1,70535)	1,85	3,60	$1,858971 \pm 0,2156289$
TsCJBJ	0,14450 (0,11637 - 0,18009)	0,93499 (0,58884 - 2,09696)	2,22	3,66	$2,028811 \pm 0,2992796$
TsCJBV1	0,18339 (0,15155 - 0,22313)	1,04427 (0,70594 - 1,94930)	2,82	4,08	$2,177855 \pm 0,2747436$

Referindo-se ao *slope*, todas as populações apresentaram *slope* inferior a LRS, refletindo maior heterogeneidade destas quando comparada a LRS referindo-se a característica avaliada (figura 13)



0,2µL de deltametrina, solubilizada em acetona, no dorso de abdômen de ninfas I da geração F1 - cinco dias de idade, jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg - registre mortalidade com 72 horas.) Localidades amostradas: A: Barriguda – em vermelho análise feita em 2007 e em azul, em 2009. B: localidades de entorno de Barriguda.

5.2. Taxa de mortalidade das populações de *T.sordida* em resposta à dose diagnóstica

O percentual de mortalidade de ninfas I de *T. sordida* em resposta a dose diagnóstica de $1xDL_{99}$ da LRS variou de 43,3% a 100% (tabela 5). Utilizando-se a dose $2xDL_{99}$ de acordo com WHO (1981) em todas as populações se verificou 100% de mortalidade, indicando suscetibilidade ao ativo testado de acordo com metodologia adotada.

Tabela 5. Mortalidade das populações de *T. sordida* em resposta à dose diagnóstica (DD) 1xDL₉₉ da linhagem referência de suscetibilidade. Total amostrado por população de 30 espécimes.

<i>População</i>	<i>RR₅₀</i>	<i>Número de ninfas I mortas em resposta a 1x DD₉₉ LRS 0,45073 nag i.a./ninfa</i>	<i>% mortalidade</i>	<i>Classificação do status de suscetibilidade</i>
TsCJB	6,5	13	43,3	RESISTENTE
TsMABO	1,81	21	70	RESISTENTE
TsMABRE	3,94	21	70	RESISTENTE
TsGCM	3,38	22	73,3	RESISTENTE
TsLOASM	2,8	23	76,6	RESISTENTE
TsLOBC	2,66	23	76,6	RESISTENTE
TsPCM	3,01	23	76,6	RESISTENTE
TsSJPAP	3,01	23	76,6	RESISTENTE
TsLOJFQ	2,14	24	80	RESISTENTE
TsFSM	2,1	25	83,3	RESISTENTE
TsGVC	2,27	25	83,3	RESISTENTE
TsVPB	1,88	25	83,3	RESISTENTE
TsIBG	0,72	25	83,3	RESISTENTE
TsMCC	2,72	25	83,3	RESISTENTE
TsSMB	1,93	25	83,3	RESISTENTE
TsMRA	1,8	25	83,3	RESISTENTE
TsIMA	2,72	25	83,3	RESISTENTE
TsSFC	2,48	25	83,3	RESISTENTE
TsLG	1,89	25	83,3	RESISTENTE
TsIB	2,2	25	83,3	RESISTENTE
TsCMCC	2,66	25	83,3	RESISTENTE
TsMB	0,42	25	83,3	RESISTENTE
TsSJMC	2,72	25	83,3	RESISTENTE
TsME	3,06	25	83,3	RESISTENTE
TsFANC	2,51	26	86,6	RESISTENTE
TsBSC	1,85	26	86,6	RESISTENTE
TsBE	1,58	26	86,6	RESISTENTE
TsVPG	2,16	26	86,6	RESISTENTE
TsMCRO	2,1	26	86,6	RESISTENTE
TsFSA1	2,09	26	86,6	RESISTENTE
TsFSBF	3,19	26	86,6	RESISTENTE
TsMM	2,52	26	86,6	RESISTENTE
TsELP	1,58	26	86,6	RESISTENTE
TsLA	2,27	26	86,6	RESISTENTE
TsLM	1,98	26	86,6	RESISTENTE
TsSFE	2,78	26	86,6	RESISTENTE
TsJJ	1,84	26	86,6	RESISTENTE

Cont. tabela 5. Mortalidade das populações de *T. sordida* em resposta à dose diagnóstica (DD) 1xDL₉₉ da linhagem referência de suscetibilidade. Total amostrado por população de 30 espécimes.

<i>População</i>	<i>RR₅₀</i>	<i>Número de ninfas I mortas em resposta a 1x DD₉₉ LRS 0,45073 nag i.a/ninfa</i>	<i>% mortalidade</i>	<i>Classificação do status de suscetibilidade</i>
TsJP	2,17	26	86,6	RESISTENTE
TsICV	1,97	26	86,6	RESISTENTE
TsVLJ	2,82	26	86,6	RESISTENTE
TsSJMSC	3,17	26	86,6	RESISTENTE
TsMF	2,35	26	86,6	RESISTENTE
TsFB1	2,13	27	90	RESISTENTE
TsFM	1,99	27	90	RESISTENTE
TsFSA	2,02	27	90	RESISTENTE
TsLB	2,11	27	90	RESISTENTE
TsJD	2,13	27	90	RESISTENTE
TsFJC	2,22	28	93,3	RESISTENTE
TsGC	3,30	28	93,3	RESISTENTE
TsGAM	2,15	28	93,3	RESISTENTE
TsBBV2	2,01	28	93,3	RESISTENTE
TsVPBRE	2,32	28	93,3	RESISTENTE
TsCJCAB	1,93	28	93,3	RESISTENTE
TsMCPR	1,47	28	93,3	RESISTENTE
TsPCV	2,05	28	93,3	RESISTENTE
TsEM	2,01	28	93,3	RESISTENTE
TsSFBG	1,15	28	93,3	RESISTENTE
TsVLJ1	2,58	28	93,3	RESISTENTE
TsJBL	2,32	28	93,3	RESISTENTE
TsJB4	2,45	29	93,3	RESISTENTE
TsBMA	2,3	28	93,3	RESISTENTE
TsFGFC	1,31	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsSHB	1,8	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsIVB	1,34	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsCJBO	1,02	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsMT	1,69	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsEMI	2,12	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsSJPC	2,34	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsSJPGG	2,53	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsIMC	1,77	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsLSJ	1,81	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsLSJ2	2,06	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsIA	2,18	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsVC	2,28	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsJC	2,03	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsMQ	1,22	29	96,6	SUSCETÍVEL

Cont. tabela 5. Mortalidade das populações de *T. sordida* em resposta à dose diagnóstica (DD) 1xDL₉₉ da linhagem referência de suscetibilidade. Total amostrado por população de 30 espécimes.

<i>População</i>	<i>RR₅₀</i>	<i>Número de ninfas I mortas em resposta a 1x DD₉₉ LRS 0,45073 nag i.a/ninfa</i>	<i>% mortalidade</i>	<i>Classificação do status de suscetibilidade</i>
TsMV	2,02	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsMC	2,64	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsBB	1,28	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsBM	1,28	29	96,6	SUSCETÍVEL
TsSHC	1,58	30	100	SUSCETÍVEL
TsSHS	0,88	30	100	SUSCETÍVEL
TsPFO	1,05	30	100	SUSCETÍVEL
TsSMC	1,13	30	100	SUSCETÍVEL
TsSMS	0,88	30	100	SUSCETÍVEL
TsMAB	0,67	30	100	SUSCETÍVEL
TsMAB1	0,63	30	100	SUSCETÍVEL
TsMABG	0,36	30	100	SUSCETÍVEL
TsMABS	0,44	30	100	SUSCETÍVEL
TsMAPE	0,53	30	100	SUSCETÍVEL
TsBMCC	1,22	30	100	SUSCETÍVEL
TsIMB	1,98	30	100	SUSCETÍVEL
TsCMCA	0,72	30	100	SUSCETÍVEL
TsCMS	1,2	30	100	SUSCETÍVEL
TsMG	1,79	30	100	SUSCETÍVEL
TsSJMT	1,97	30	100	SUSCETÍVEL
TsMAL	1,63	30	100	SUSCETÍVEL
TsMAPO	1,3	30	100	SUSCETÍVEL
TsMAC	2,72	28	100	SUSCETÍVEL

De acordo com preconização da WHO (1994), os resultados dos ensaios qualitativos revelaram que 38 populações (38,8%) seriam suscetíveis a deltametrina, sendo todas as demais, resistentes (figura 14)

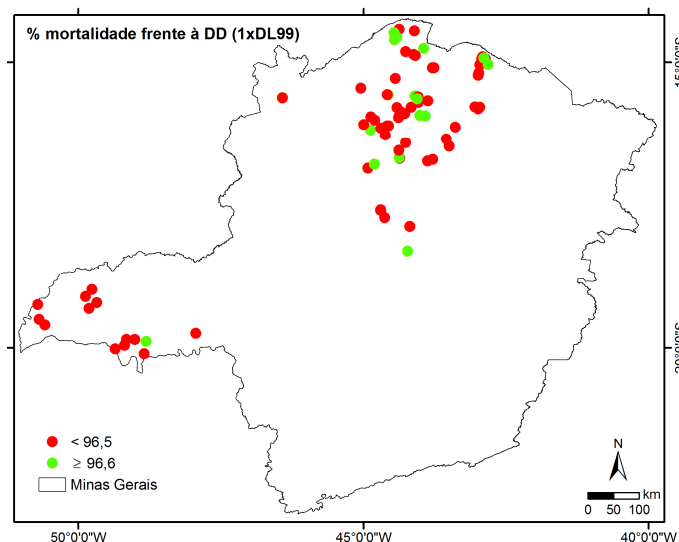


Figura 14. Distribuição das localidades de estudo de acordo com o *status* de suscetibilidade/resistência a deltametrina popostro por WHO (1981). Categorização da mortalidade das populações de *T.sordida* frente a dose diagnóstica 1xDL₉₉ da LRS. Em vermelho as populações resistentes a deltametrina e em verde, as suscetíveis.

Para as áreas limítrofes com Barriguda (município de Coração de Jesus) a taxa de mortalidade a DD variou de 80,0% a 100% (tabela 6). De acordo com preconização da WHO (1994) todas as populações seriam resistentes a deltametrina, exceto Jataí I.

Tabela 6. Percentual de mortalidade das populações de *T. sordida* circunvizinhas de Barriguda (Coração de Jesus) em resposta às dose diagnósticas (DD) 1xDL₉₉ da linhagem referência de suscetibilidade ranquiados em ordem crescente de % de mortalidade.

<i>População</i>	<i>RR₅₀</i>	<i>1xDL₉₉ LRS</i> <i>0,45073 nag i.a/ninfa</i>	<i>% mortalidade</i>	<i>Classificação</i> <i>do status de</i> <i>suscetibilidade</i>
TsCJBV1	2,82	24	80	RESISTENTE
TsCJJ2	1,85	26	86,6	RESISTENTE
TsCJBJ	2,22	28	93,3	RESISTENTE
TsCJJ1	1,22	30	100	SUSCETÍVEL

5.3. Caracterização ambiental do município de Coração de Jesus - MG.

5.3.1. Caracterização das condições climáticas da região de interesse

A temperatura máxima variou entre os anos de 1973 (28,6 °C) a 2010 (30,8 °C) em 2.2 °C. Considerando-se a temperatura média normal do período amostrado (29,6 °C), não se observou diferença significativa em relação ao ano de 1989 a partir do qual se verificou tendência de aumento da temperatura máxima ($p < 0,05$) (figura 15).

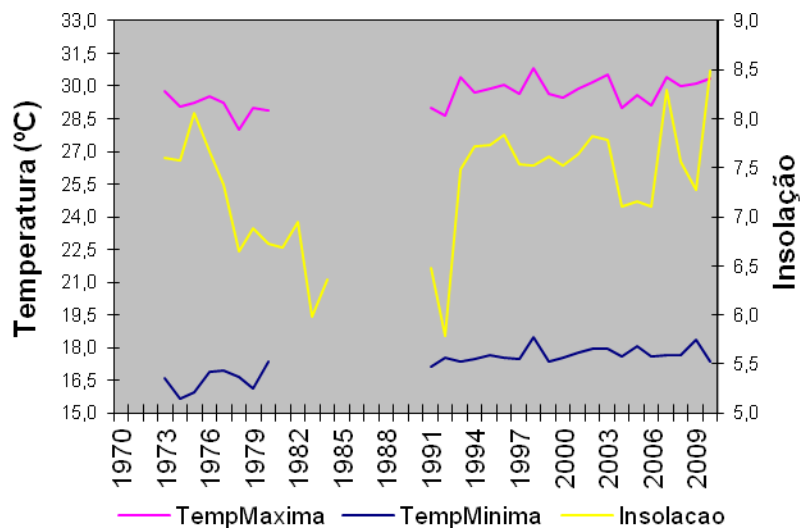


Figura 15. Média das temperaturas (máxima e mínima) e insolação do município de Coração de Jesus, do período de 1970 a 2009.

Observou-se ainda uma tendência de manutenção da temperatura mínima e da umidade relativa do ar (figura 16). Em contrapartida, verificou-se um aumento da insolação (5,8 a 8,5) na região, medida pela incidência da luz solar em horas e décimos (figura 15). Não se verificou, variações no número meio de dias de chuva, sendo o volume anual regularmente controlados pelos fenômenos La Nina e El Nino.

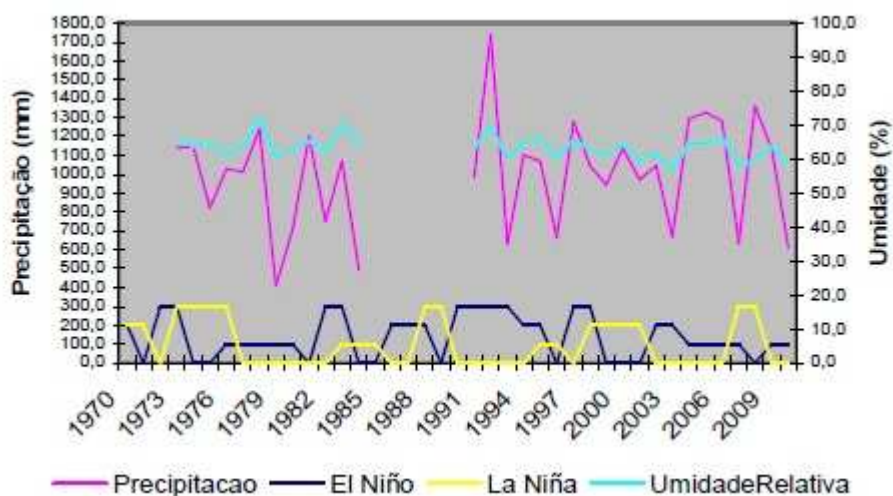


Figura 16. Média da precipitação e umidade relativa do ar do município de Coração de Jesus, do período de 1970 a 2009, incluindo-se intensidade do fenômeno El Nino e La Nina (fraca 100, moderada 200 e forte 300).

5.3.2. Caracterização das unidades domiciliares avaliadas

Todas as unidades domiciliares das localidades de Barriguda (14 UD's), Boa Vista (17 UD's), Bom Jesus (22 UD's), Jataí II (8 UD's) e Jataí I (27 UD's) foram amostradas. A maior parte das residências apresentaram idade média de construção de 1-10 anos (43,2%) ou >21 anos (45,4%). As paredes em sua predominância são constituídas de adobe sem reboco (40,9%) e tijolo com reboco (38,6%). Os telhados são em 98,9% de telhas de barro e o piso, em sua maioria, revestido de ladrilho (45%) e cerâmica (36,4%) (tabela 7). Ressalta-se que em todas as avaliações as casas se encontravam em bom estado de conservação, isentas de buracos e/ou rachaduras, exceto nas casas de pau-a-pique em Jataí I.

Tabela 7. Caracterização das UD's em relação a idade média, constituição das paredes, teto e piso das mesmas.

	Localidades				
	Barriguda RR ₅₀ 6,5	Boa Vista RR ₅₀ 2,82	Bom Jesus RR ₅₀ 2,22	Jataí II RR ₅₀ 1,85	Jataí I RR ₅₀ 1,22
Idade média das UD's (%)					
1-10 anos	42,8	64,7	27,3	62,5	44,4
11-20 anos	14,3	5,9	9,1	12,5	14,8
>21 anos	42,9	29,4	72,7	25,0	40,7
Constituição das Paredes (%)					
Pau a Pique	-	-	-	-	3,7
Adobe sem reboco	28,6	47,1	40,9	62,5	37,0
Tijolo sem reboco	54,2	5,9	45,5	25,0	48,2
Tijolo com reboco	14,3	47,1	13,6	12,5	11,1
Constituição das Telhados (%)					
Telha de amianto	-	-	-	12,5	-
Telha de barro	100	100	100	87,5	100
Constituição dos Pisos (%)					
Terra	28,6	35,3	4,6	75,0	29,6
Cimento	41,9	11,8	81,8	25,0	63,0
Ladrilho/cerâmica	29,6	52,9	13,6	-	7,4

A criação de animais domésticos é uma atividade comum que variou de 90,9% em Bom Jesus a 100% nas UD's em Barriguda e Jataí II, sendo predominantes as galinhas e porcos (tabela 8). Em todas as casas os animais dormem no peridomicílio. Somente nas localidades de Barriguda (21,4%), Jataí I (7,4%) e Bom Jesus (4,5%) os moradores fazem uso de inseticidas para tratamento de pragas em seus animais domésticos sendo eles os cabamatos Lepecide (40%) e Bolfo (40%), bem como Baygon (40%) – combinação de PI e CB. Foi relatado pelos moradores não existir frequência para o uso destes ativos químicos.

Tabela 8. Caracterização das UD's em relação a criação de animais domésticos e uso de inseticidas com vistas ao controle de pragas em suas criações.

	Localidades					Total
	Barriguda RR ₅₀ 6,5	Boa Vista RR ₅₀ 2,82	Bom Jesus RR ₅₀ 2,22	Jatai I RR ₅₀ 1,85	Jatai II RR ₅₀ 1,22	
Criação de animais domésticos (%)	100	94,1	90,2	92,6	100	
Número Total de Animais Domésticos						
Cão	27	37	42	25	8	139
Gato	11	28	22	54	28	143
Galinha	357	418	668	33	5	1.481
Porco	60	32	65	750	19	926
Total	455	512	797	862	60	2686
% de moradores que tratam pragas dos animais domésticos com inseticida	21,4	0	4,5	7,4	0	

Somente nas UD's de Barriguda (35,7%), Bom Jesus (18,2%) e Jataí I (14,8%) foi relatado uso de inseticida com fins domésticos (tabela 9), sendo especificado local de uso. Os produtos utilizados são: o organoclorado BHC (8,3%), o organofosforado Malagran (8,3%), os piretróides Rayd (8,3%), Bolfo (8,3%), K-othrine (24,9%), e a combinação de PI com CB - Colosso (8,3%), Barrage (16,6%), Baygon (16,6%). Quanto a frequência de utilização destes ativos químicos 100% dos moradores declararam fazer uso somente quando se faz necessário combater alguma praga doméstica.

Tabela 9. UD's nas quais o morador relatou uso de inseticidas com vistas ao controle de pragas domésticas, especificando local de uso.

US's nas quais morador faz uso de inseticidas domésticos (%)	Barriguda	Boa Vista	Bom Jesus	Jatai II	Jatai I
	RR ₅₀ 6,5	RR ₅₀ 2,82	RR ₅₀ 2,22	RR ₅₀ 1,85	RR ₅₀ 1,22
Local de uso de inseticidas com fins domésticos					
Peridomicílio	60	-	0	-	50
Intradomicílio	20	-	0	-	25
Intra e Peridomicílio	20	-	100	-	25

O cultivo de grãos, legumes, frutas e hortaliças foi observado em as UD's de todas as localidades estudadas, variando de 52,9 % em Boa Vista a 95,5 % em Bom Jesus (tabela 10). As áreas de plantio apresentam dimensão reduzida (0,5 a 2 hectares). Nenhum agricultor tem acompanhamento junto a EMATER e nem faz utilização de inseticidas com fins agrícolas.

Tabela 10. UD`s nas quais se verifica cultivo de grãos, legumes, frutas ou hortaliças.

	Localidades				
	Barriguda RR₅₀ 6,5	Boa Vista RR₅₀ 2,82	Bom Jesus RR₅₀ 2,22	Jataí II RR₅₀ 1,85	Jataí I RR₅₀ 1,22
% de agricultores	92,9	52,9	95,5	75	63

Formando os anexos peridomiciliares das UD`s de Barriguda (7,1%), Bom Jesus (54,5%) e Jataí 1 (3,7%) foram observados montes de lenhas. Apesar da idade de tais anexos ser semelhante em ambas as localidades (0-2 anos), a distância destes em relação ao intradomicílio variou de 8 metros em Barriguda a 15 metros em Jataí 1 (tabela 11). Apenas em uma UD de Barriguda foi relatado uso da mata no entorno (7,7%) com fins de extração de gravetos de lenha.

Em todas as localidades foram observadas no peridomicílio amontoados de tijolos e telhas, em maior quantidade nas UD`s das localidades nas quais foram coletadas os triatomíneos suscetíveis de acordo com preconização da OPAS (2005), especialmente em Bom Jesus (59,1%) e Jataí I (48,1%). Em contrapartida, observou-se que este tipo de anexo se localiza mais distante dos intradomicílios de Barriguda (13,3 metros) quando comparado as demais localidades. A idade média destes anexos é de aproximadamente 1,5 anos (tabela 11).

Todas as UD`s apresentam em seu peridomicílio cercas constituídas exclusivamente de madeira. A distância média das cercas ao intradomicílio variou de 8,2 metros em Jataí I a 13,8 metros em Bom Jesus. Em Barriguda e Boa Vista as cercas se apresentam mais antigas que as das demais localidades (tabela 11).

Os depósitos de máquinas estão presentes apenas no peridomicílio de Bom Jesus e Jataí I com distância média até o intradomicílio variando de 5 a 8 metros e idade de 7,5 a 10 anos (tabela 11).

Tabela 11. UD's nas quais os montes de lenha, amontoados de tijolos e telhas, cercas e depósitos de máquinas estão presentes no peridomicílio. Distância média entre tais anexos e o intradomicílio em metros e, idade média dos mesmos em anos.

Montes de Lenha	Localidades				
	Barriguda RR ₅₀ 6,5	Boa Vista RR ₅₀ 2,82	Bom Jesus RR ₅₀ 2,22	Jatai II RR ₅₀ 1,85	Jatai I RR ₅₀ 1,22
Presença de montes de lenha no peridomicílio (%)	7,1	-	54,5	-	3,7
Distância média dos montes de lenha ao intradomicílio (metros)	8	-	10,8	-	15
Idade média dos montes de (anos)	2	-	2	-	2
Amontoados de telhas e tijolos					
Presença de amontoados de telhas e tijolos no peridomicílio (%)	21,4	29,4	59,1	25	48,1
Distância média dos amontoados de telhas e tijolos ao intradomicílio (metros)	13,3	9	8,5	6,5	8,8
Idade média dos amontoados de telhas e tijolos (anos)	1,5	1,6	1,8	0,8	16,2
Cercas					
Presença de cercas no peridomicílio (%)	14,3	17,6	18,2	25	22,2
Distância média das cercas ao intradomicílio (metros)	10	11	13,8	9	8,2
Idade média das cercas (anos)	25	20	5,4	7,5	11,2
Depósitos de máquinas e utensílios					
Presença de depósitos de máquinas e utensílios no peridomicílio (%)	-	-	4,5	-	9,1
Distância média dos depósitos de máquinas e utensílios ao intradomicílio (metros)	-	-	5	-	8
Idade média dos depósitos de máquinas e utensílios (anos)	-	-	10	-	7,5

Os galinheiros são anexos peridomiciliares muito comuns em todas as localidades sendo constituídos em sua maioria por madeira. Ressalta-se que em Barriguda são mais distantes do intradomicílio do que os das outras localidades. A idade média destes anexos variou de 2,5 a 4,7 anos (tabela 12).

Nos peridomicílios de todas as localidades foram observados chiqueiros, sendo constituídos em sua maioria por madeira. Esses peridomicílios, particularmente na localidade de

Barriguda, são mais próximos do intradomicílio do que os das demais localidades. A idade média destes anexos variou de 2,2 a 3,6 anos (tabela 12).

Em todas as localidades verificam-se UD's com currais, construídos de madeira ou arame. A distância média dos currais até os intradomicílios variou de 9,6 metros em Barriguda a 16,7 metros em Boa Vista. A idade média dos mesmos variou de 4 a 8,2 anos (tabela 12).

Tabela 12. UD's nas quais os galinheiros, chiqueiros e currais estão presentes no peridomicílio. Distância média entre tais anexos e o intradomicílio em metros e, idade média dos mesmos em anos e material de construção utilizado.

	Localidades				
	Barriguda RR ₅₀ 6,5	Boa Vista RR ₅₀ 2,82	Bom Jesus RR ₅₀ 2,22	Jataí II RR ₅₀ 1,85	Jataí I RR ₅₀ 1,22
Galinheiros					
Presença de galinheiros no peridomicílio (%)	85,7	76,5	81,9	75	70,4
Distância média dos galinheiros ao intradomicílio (metros)	13,6	10,8	11,4	9,5	10,2
Idade média dos galinheiros (anos)	2,9	4,15	4,7	2,5	3,3
Constituição dos galinheiros (%)					
Madeira	91,6	84,6	100	100	89,4
Barro	-	-	-	-	5,30
Terra	8,4	15,4	-	-	5,30
Chiqueiros					
Presença de chiqueiros no peridomicílio (%)	71,4	64,7	72,7	37,5	55,6
Distância média dos chiqueiros ao intradomicílio (metros)	10,7	13,6	11,7	13,3	11,8
Idade média dos paióis (anos)	2,2	3,2	3,6	2,7	2,4
Constituição dos chiqueiros (%)					
Madeira	100	100	94	100	100
Tijolo	-	-	6	-	-
Currais					
Presença de currais no peridomicílio (%)	50	35,3	68,2	12,5	40,7
Distância média dos currais ao intradomicílio (metros)	9,6	16,7	14,3	10	10,4
Idade média dos currais (anos)	5,3	5,5	8,2	4	6,5
Constituição dos Currais (%)					
Madeira	100	84,0	86,4	100	81,8
Arame	-	16,0	13,6	-	18,2

Todas as localidades apresentaram UD's contendo paióis no peridomicílio (tabela 13), construídos em sua maioria de madeira. Em todas elas a distância entre eles e os intradomicílios é semelhante, contudo os paióis de Barriguda são mais velhos que os das demais localidades.

Tabela 13. UD`s nas quais os paióis estão presentes no peridomicílio. Distância média entre tais anexos e o intradomicílio em metros e, idade média dos mesmos em anos e material de construção utilizado.

Paióis	Localidades				
	Barriguda RR ₅₀ 6,5	Boa Vista RR ₅₀ 2,82	Bom Jesus RR ₅₀ 2,22	Jataí II RR ₅₀ 1,85	Jataí I RR ₅₀ 1,22
Presença de paióis no peridomicílio (%)	92,9	64,7	81,8	75	59,3
Distância média dos paióis ao intradomicílio (metros)	8,4	9,1	7,8	9	8,9
Idade média dos paióis ao intradomicílio (anos)	15,7	4,5	3,3	1,7	4,7
Constituição dos paióis (%)					
Madeira	70,0	54,5	94,4	83,4	68,75
Barro	15,0	7,7	6,6	7,6	12,5
Tela	-	-	-	-	6,25
Tijolo	-	-	-	-	6,25
Adobe	15,0	37,8	-	-	6,25

Os fornos de barro estão presentes nos peridomicílios de UD`S de todas as localidades (tabela 14). A distância média destes anexos até o intradomicílio variou de 3 a 6,7 metros enquanto a idade, de 5 meses a 4 anos.

Tabela 14. UD`s nas quais os fornos de barro estão presentes no peridomicílio. Distância média entre tais anexos e o intradomicílio em metros e, idade média dos mesmos em anos.

Fornos de barro	Localidades				
	Barriguda RR ₅₀ 6,5	Boa Vista RR ₅₀ 2,82	Bom Jesus RR ₅₀ 2,22	Jataí II RR ₅₀ 1,85	Jataí I RR ₅₀ 1,22
Presença de fornos de barro no peridomicílio (%)	21,4	17,6	31,8	12,5	29,6
Distância média dos fornos de barro ao intradomicílio (metros)	3	6,7	4,3	5	5,8
Idade média dos fornos de barro (anos)	2,3	4	3,4	0,5	4,1

5.3.3. Histórico de infestação triatomínica e uso de inseticidas na região de interesse

O histórico de infestação das UD`s das localidades estudadas está apresentado na tabela 15. O percentual de unidades domiciliares infestadas com triatomíneos foi semelhante em todas as localidades, apresentando-se mais elevado em Barriguda a partir de 1985. O percentual de UD`s trabalhadas permaneceu próximo a 100% em toda região amostrada. Os índices de captura de triatomíneos foram mais elevados em Barriguda, Jataí I e Jataí II. Quanto ao número de cargas de inseticidas borrifadas verificou-se uma maior utilização Barriguda, Jataí II

e Jataí I, respectivamente. Até 1982, o inseticida de uso era o organoclorado BHC, sendo substituído por K-Othrine até 1993 quando foi iniciado o uso da alfacipermetrina.

As espécies de triatomíneos capturadas foram: *T. sordida* (94,5%), *P. megistus* (1,5%), *R. nasutus* (1,2%), *T. infestans* (1,1%) e *T. pseudomaculata* (0,7%), esta última equivocadamente identificada com *T. maculata*.

Tabela 15: Percentual de UD`s positivas e de UD`s trabalhadas, número bruto de triatomíneos capturados por UD e de carga de inseticida aplicado por UD em todas as localidades de interesse.

Anos	UD`s Positivas / UD`s Trabalhadas / Triatomíneos capturados por UD / Carga de inseticida aplicada por UD																																		
	Barriguda (RR ₅₀ 6,5)				Boa Vista (RR ₅₀ 2,82)				Bom Jesus (RR ₅₀ 2,22)				Jatai II (RR ₅₀ 1,85)				Jatai I (RR ₅₀ 1,22)																		
1980	23,6	/	89,5	/	1	/	2,56	7,14	/	100,0	/	-	/	1,23	13,0	/	88,5	/	-	/	3,8	44,4	/	75,0	/	-	/	0,84	28,7	/	83,1	/	-	/	0,84
1981	55,2	/	86,8	/	1	/	5,04	21,0	/	93,3	/	1	/	1,00	3,9	/	94,6	/	-	/	0,43	50,0	/	68,5	/	-	/	0,72	64,4	/	77,23	/	1	/	3,49
1982	48,0	/	92,5	/	3	/	1,30	7,1	/	85,7	/	-	/	0,30	3,7	/	96,6	/	5	/	0,14	70,5	/	95,8	/	2	/	1,57	36,1	/	86,7	/	2	/	2,13
1983	76,2	/	100,0	/	4	/	1,78	24,4	/	89,3	/	3	/	0,86	24,4	/	97,0	/	8	/	0,28	32,1	/	100,0	/	5	/	5,5	57,9	/	100,0	/	4	/	1,14
1984	29,5	/	95,3	/	2	/	0,75	7,7	/	89,3	/	1	/	0,33	-	/	88,6	/	-	/	0,76	40,2	/	96,2	/	4	/	0,77	18,9	/	96,2	/	3	/	0,6
1985	99,4	/	88,3	/	4	/	6,04	7,7	/	92,9	/	1	/	0,25	3,6	/	93,3	/	4	/	-	36,4	/	95,8	/	6	/	1,03	54,3	/	95,8	/	6	/	1,42
1986	61,9	/	95,5	/	5	/	1,7														27,3	/	84,6	/	4	/	3,3	24,3	/	84,1	/	4	/	0,83	
1987	100,0	/	96,7	/	5	/	3,85														71,0	/	92,3	/	5	/	0,54	44,7	/	90,7	/	10	/	2,57	
1989	69,6	/	90,2	/	4	/	1,98														50,4	/	95,9	/	3	/	3,1	72,8	/	86,7	/	2	/	0,98	
1990	19,1	/	100,0	/	5	/	0,57														5,26	/	100,0	/	3	/	0,88	32,4	/	97,3	/	3	/	0,87	
1991	20,0	/	100,0	/	6	/	0,9														16,7	/	92,3	/	5	/	0,67	18,9	/	90,2	/	4	/	0,9	
1994	70,6	/	89,5	/	4	/	2,32														36,4	/	91,7	/	3	/	1,09	43,4	/	82,1	/	4	/	1,08	

Nota: Nos itens “Triatomíneos capturados por UD” e “Carga de inseticida aplicada por UD” onde existe a simbologia “-“ entende-se que não houve encontro/captura de triatomíneos e não houve aplicação de inseticida, respectivamente.

O uso de inseticidas pelo PCDCh nas localidades de interesse no período de 2004 a 2010 está apresentado na tabela 16. Os maiores consumos de inseticida foram observados em Barriguda seguido de Jataí II. Ressalta-se que o único ativo químico utilizado foi a alfacipermetrina (carga igual a 50 mL para cada dez litros de água).

Tabela 16. Cargas de inseticidas utilizadas pelo PCDCh nas localidades de interesse no período de 2004 a 2010.

<i>Carga do Inseticida</i>		<i>Período (anos)</i>								
Localidade		2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	TOTAL	Carga/UD
Barriguda										
RR₅₀ 6,5		0	0	21	12	0	0	6	39	28,9
Boa Vista										
RR₅₀ 2,82		0	0	11	0	0	0	25	36	9,8
Bom Jesus										
RR₅₀ 2,22		0	0	0	0	0	0	74	74	5,0
Jataí II										
RR₅₀ 1,85		3	0	39	24	0	0	38	82	20,1
Jataí I										
RR₅₀ 1,22		0	0	0	5	0	0	12	17	17,03

5.3.4. Caracterização das atividades prestadas pelos agentes de campo

O município de Coração de Jesus conta atualmente com três agentes de saúde, com tempo de experiência profissional variando de quatro meses a um ano. Apesar de nenhum dos funcionários ter sido treinado para executar atividades de controle dos triatomíneos utilizando inseticidas, os dois com mais tempo de serviço (seis meses e um ano) o fazem. Ambos acreditam que a manutenção da pressão do equipamento seja um fator importante na borrifação. Afirmaram sempre terem utilizado o bico TJET 8002[®] em suas atividades nunca tendo utilizado o bico chapinha. O uso de prego para alterar a saída do bico quando o mesmo entope não foi relatado. A carga do inseticida é medida utilizando as referências da embalagem, sendo a diluição realizada diretamente no pulverizador sem utilização de balde graduado. Em nenhuma campanha de controle eles aplicaram doses do inseticida menores do que as recomendadas ou fizeram uso de ativos químicos vencidos. Em nenhum programa de borrifação foi vivenciada situação que por falta de inseticida, funcionários ou veículos houvesse a necessidade de se excluir algumas UD's das atividades. Os agentes relataram nunca terem trabalhado em alguma localidade que mesmo executando as atividades de borrifação de forma adequada os triatomíneos não morriam ou em que as colônias cresciam mais rápido do que o esperado. Nenhum relatou ter se intoxicado com inseticida.

5.4. Ensaios moleculares de genética de população

Dentre os 21 pares de iniciadores testados apenas 10 apresentaram amplificação satisfatória para amostras de *T. sordida*, sendo eles: Tb 830, Tb 8112, Tb 8124, Tdms 3, Tdms 4, Tp 20, Tp 59, Tp 544, T.infest_ms23, T.infest_ms42 (figura 17).

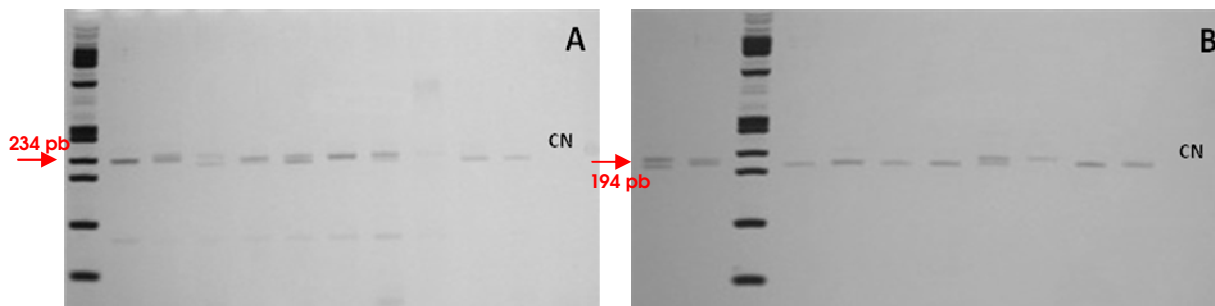


Figura 17. Loci Tb 8124 (A) e T.infest_ms42 (B) visualização em gel de acrilamida corado com nitrato de prata.

Nota: controles negativos - CN

Nas análises dos 44 exemplares de *T. sordida* foram identificados 75 haplótipos com uma diversidade genética média por loci (π_n) de 0,408 (tabela 17).

Tabela 17: Variabilidade genética dos 10 loci de microssatélites em populações de *T. sordida*

Localidade	n	π_n	S	H
Jataí I	10	0.507 ± 0.287	8	15
Bom Jesus	10	0.497 ± 0.282	7	18
Barriguda	7	0.467 ± 0.273	9	14
Jataí II	8	0.430 ± 0.252	8	13
Boa Vista	9	0.530 ± 0.300	9	15
TOTAL	44	0,480 ± 0,278	-	75

n = número amostral; π_n = diversidade genética média por locus; S = número de loci polimórfico; H = número de haplótipos.

A análise individual das populações demonstrou que o número de haplótipos variou de 13 (Jataí II) a 18 (Bom Jesus). As populações de Barriguda e Boa Vista apresentaram o maior número de loci polimórficos (9). A diversidade genética média por loci (π_n) variou de 0,430 (Jataí II) a 0,530 (Boa Vista).

A variação genética apresentada pelos 10 loci de microssatélites nas populações de *T. sordida* estão apresentados na tabela 18. O número médio de alelos por locus variou de 0,8 a 5,6. Os menores valores de heterozigidade média observada e esperada foram observados em

Jataí II ($H_o=0,125$ e $H_e=0,43083$), enquanto que os maiores foram observados em Bom Jesus ($H_o=0,185$ e $H_e=0,71127$). O *locus* Tdms4 se apresentou monomórfico em todas as populações.

Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram observados em pelo menos quatro dos 10 *loci* analisados em todas as populações, revelando déficit de heterozigosidade.

Tabela 18. Variação genética apresentada pelos 10 *loci* de microssatélites nas populações de *T. sordida*.

Localidade	<i>Loci</i>										
	Ti 23	Ti 42	Tdms 3	Tdms 4**	Tb 830	Tb 8112	Tb 8124	Tp 20	Tp 59	Tp 544	
Jataí I	N _A	7	5	2	x	3	x	8	5	4	4
	H _O	0.10000	0.00000	0.00000	x	0.30000	x	0.10000	0.30000	0.00000	0.00000
	H _E	0.84737*	0.77895*	0.33684*	x	0.27895	x	0.85789*	0.63158*	0.73684*	0.61053*
Bom Jesus	N _A	6	5	2	x	4	x	5	6	6	x
	H _O	0.20000	0.00000	0.00000	x	0.50000	x	0.10000	0.30000	0.20000	x
	H _E	0.80000*	0.82105*	0.50526*	x	0.43684	x	0.78421*	0.84737*	0.78421*	x
Barriguda	N _A	4	6	2	x	3	2	3	3	3	4
	H _O	0.00000	0.28571	0.00000	x	0.57143	0.00000	0.57143	0.28571	0.14286	0.14286
	H _E	0.74725*	0.79121*	0.26374	x	0.47253	0.26374	0.53846	0.47253	0.47253*	0.64835*
Jataí II	N _A	6	5	2	x	2	x	3	3	7	2
	H _O	0.37500	0.12500	0.00000	x	0.12500	x	0.00000	0.25000	0.12500	0.00000
	H _E	0.68333*	0.67500*	0.23333	x	0.12500	x	0.63333*	0.56667*	0.89167*	0.50000*
Boa Vista	N _A	5	5	2	x	2	2	9	3	5	4
	H _O	0.00000	0.22222	0.00000	x	0.22222	0.00000	0.33333	0.00000	0.11111	0.11111
	H _E	0.75817*	0.66667*	0.47059*	x	0.36601	0.36601*	0.80392*	0.62745*	0.71242*	0.52941*
Média		5,6	5,2	2,0	0	2,8	0,8	5,6	4,0	5,0	2,8

N_A = número de alelos, H_O = heterozigosidade observada; H_E = heterozigosidade esperada.

* Equilíbrio de Hardy-Weinberg apresentou déficit significativos de heterozigozidade ($p < 0,05$)

** *Locus* monomórfico

Foram identificados 24 alelos exclusivos, sendo: 5 em Jataí I, 4 em Bom Jesus, 2 em Barriguda, 4 em Jataí II e 9 em Boa Vista. Os alelos exclusivos da população resistente segundo OPAS (2005), foram: Tb8112 (alelo 79) e TP544 (alelo 150) (tabela 19).

Tabela 19: Relação dos alelos observados nos 10 *loci* de microsatélites nas populações de *T. sordida* estudadas. Destacados em vermelho os *loci* exclusivos.

Locus	Alelo	Ja I	BJ	Ba	Ja II	BV	Locus	Alelo	Ja I	BJ	Ba	Ja II	BV	
Ti 23	156	x	x	x	x	x	Tb 8124	209					x	
	157		x					210	x	x				x
	158	x	x			x		212	x	x	x	x		
	164	x	x	x	x			213	x	x				
	165	x	x		x			217						x
	168	x	x	x	x	x		218	x		x	x	x	
	169				x			220	x	x	x	x		
	170				x	x		221	x					
	172	x		x		x		222		x				x
	173	x						226						x
Ti 42	205					x	Tp 20	125	x					
	208			x	x			126	x	x	x	x		
	210	x	x	x	x	x		135		x				
	212	x	x	x	x	x		136	x	x	x			
	213				x	x		140		x			x	
	214	x	x	x		x		143	x	x		x	x	
	222		x	x				144	x	x	x	x	x	
	223	x	x	x	x			Tp 59	121					x
	224	x							123		x	x	x	
	Tdms 3	137				x				124	x	x		x
142		x	x	x		x	127		x	x	x	x	x	
143		x	x	x	x	x	128		x	x		x	x	
Tdms 4	160	x	x	x	x	x	129					x		
							130		x		x	x		
Tb 830	119	x	x	x	x	x	131			x				
	120	x	x			x	140					x		
	121	x	x	x	x		149			x				
	122		x	x			Tp 544	142					x	
Tb 8112	78	x	x	x	x	x		148					x	
	79			x				150		x				
	80					x		154	x			x	x	
								156			x	x		
								157	x					
								213	x	x	x		x	

Considerando todas as amostras como pertencentes a um único grupo, a AMOVA revelou uma variação interpopulacional e intrapopulacional de 9,4% e 70%, respectivamente (tabela 20). Tais resultados, de acordo com preconização de WRIGHT (1978), indicaram pequena e grande diferenciação, respectivamente.

O mesmo resultado foi observado considerando as populações como pertencentes a dois grupos distintos de acordo com critério de categorização de suscetibilidade/resistência proposto por OPAS (2005). Verificou-se uma variação entre os grupos de 6,44%, entre populações dentro dos grupos de 6,83% e entre indivíduos dentro das populações de 66,78%. Utilizando critério proposto por (ZERBA & PICOLLO, 2002), verificou-se uma redução na variação entre grupos (6,44%) mantendo-se os demais índices semelhantes a análise proposta pela OPAS (2005).

Tabela 20: AMOVA para as amostras de *T. sordida* estudadas através dos 10 *loci* de microssatélites

Região Geográfica	Hierarquia	Categoria	% Variação	Índice de Fixação	
Coração de Jesus (MG)	Um Grupo	Entre populações	9,40	Fst = 0.09391	
		Dentro das Populações	70		Fis = 0.76991
		Entre indivíduos	21		
Coração de Jesus(MG)	Dois Grupos (Resistentes x Suscetíveis) OPAS (2005)	Entre grupos	6,44	Fsc = 0.07296	
		Entre populações dentro dos grupos	6,83		Fis = 0.76991
		Entre indivíduos dentro dos grupos	66,78		
Coração de Jesus (MG)	Dois Grupos (Resistentes x Suscetíveis) Zerba & Picollo (2002)	Entre grupos	2,70	Fsc = 0.07863	
		Entre populações dentro dos grupos	7,65		Fis = 0.76991
		Entre indivíduos dentro dos grupos	69,02		

Análise de cálculo dos F_{ST} pareados entre as populações estudadas revelaram 70% de significância, demonstrando diferenciação genética entre as populações de *T. sordida* estudadas (tabela 21).

Tabela 21: F_{ST} pareado entre as amostras de *T. sordida* estudadas, calculados por meio dos 10 *loci* de microsatélite

	Jatai I	Bom Jesus	Barriguda	Jatai II
Jatai I	-			
Bom Jesus	0.12273*	-		
Barriguda	0.17204*	0.14751*	-	
Jatai II	0.01905	0.19700*	0.22659*	-
Boa Vista	0.05705	0.16500*	0.17907*	0.08675

* Valores estatisticamente significantes. $p < 0,05$; 110 permutações

Os resultados obtidos permitiram observar três grupos distintos. O primeiro grupo é composto por triatomíneos procedentes das localidades de Jataí I, Jataí II e Boa Vista. O segundo grupo é formado por exemplares de *T. sordida* capturados na localidade de Barriguda. O terceiro é composto por triatomíneos oriundos da localidade de Bom Jesus.

5.5. *Quantificação da atividade de enzimas relacionadas a detoxificação de inseticidas nas populações de T. sordida*

5.5.1. *Determinação da geração ideal dos triatomíneos para quantificação da atividade de enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticidas*

Os ensaios bioquímicos revelaram a inexistência de um padrão único de resposta relacionado a geração de insetos. Foram observados índices mais elevados de alfa-EST, beta-EST e GST em indivíduos da geração F2, enquanto que de pnpa-EST, ACHE, ACHI e OFM em espécimes da F1 (figura 18).

5.5.2. *Determinação da idade ideal dos triatomíneos para quantificação da atividade de enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticidas*

Os ensaios bioquímicos revelaram diferenças significativas entre insetos com idades distintas (figura 19). Para alfa-EST, beta-EST foi observada maior atividade enzimática em espécimes com cinco dias de idade. Para pnpa-EST não foi observada diferença significativa na resposta com insetos diferentes. Para as demais enzimas (ACHE, ACHI, GST e OFM) observou-se uma menor atividade em insetos com três dias de idade e resposta semelhante para os indivíduos de um e cinco dias de vida.

5.5.3. Determinação do número amostral ideal dos triatomíneos para quantificação da atividade de enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticidas

Os ensaios bioquímicos com “n amostral” de 45, 90 e 135 indivíduos revelaram um perfil de resposta mantido para os três grupos (figura 20), exceto OFM, único ensaio cuja mensuração da atividade é feita de forma indireta.

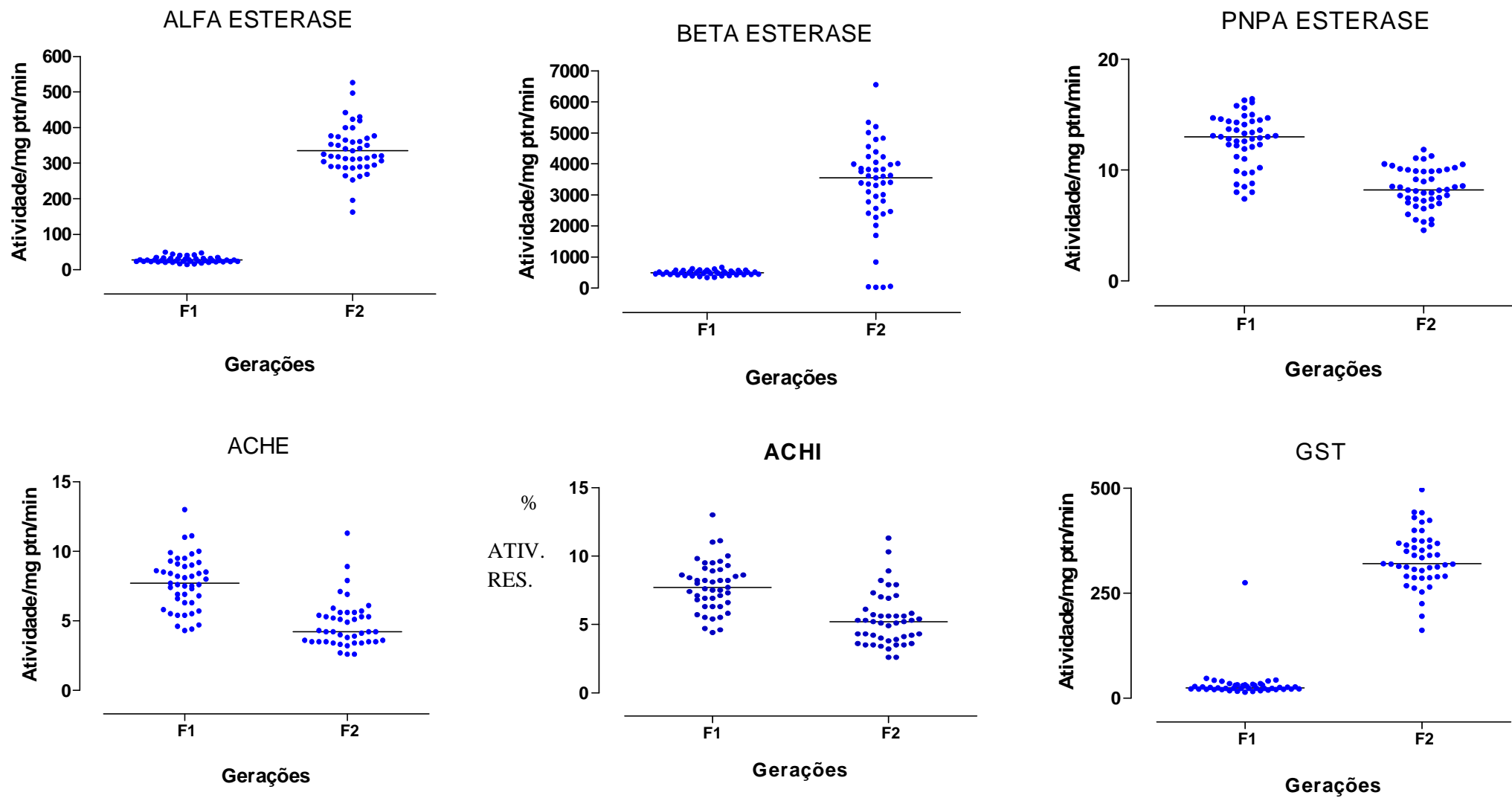
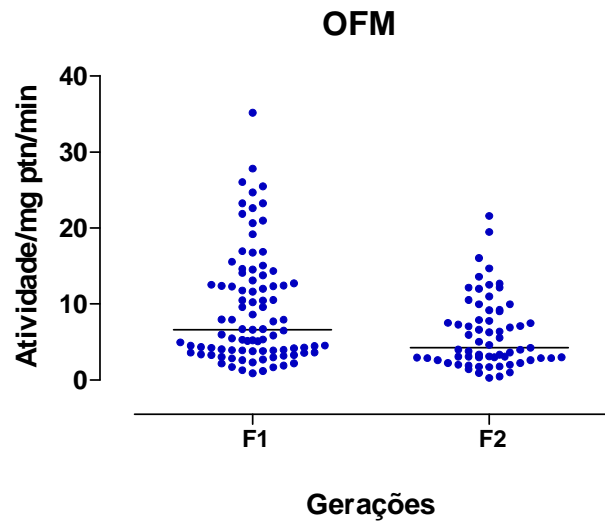


Figura 18: Quantificação da atividade das enzimas alfa-EST, beta-EST, pnpa-EST, ACHE, ACHI, GST e OFM em ninfas I de *T. sordida* das gerações F1 e F2 (1 dia de idade - jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg - população LRS).



Cont. figura 18. Quantificação da atividade das enzimas alfa-EST, beta-EST, pnpa-EST, ACHE, ACHI, GST e OFM em ninfas I de *T. sordida* das gerações F1 e F2 (1 dia de idade - jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg - população LRS).

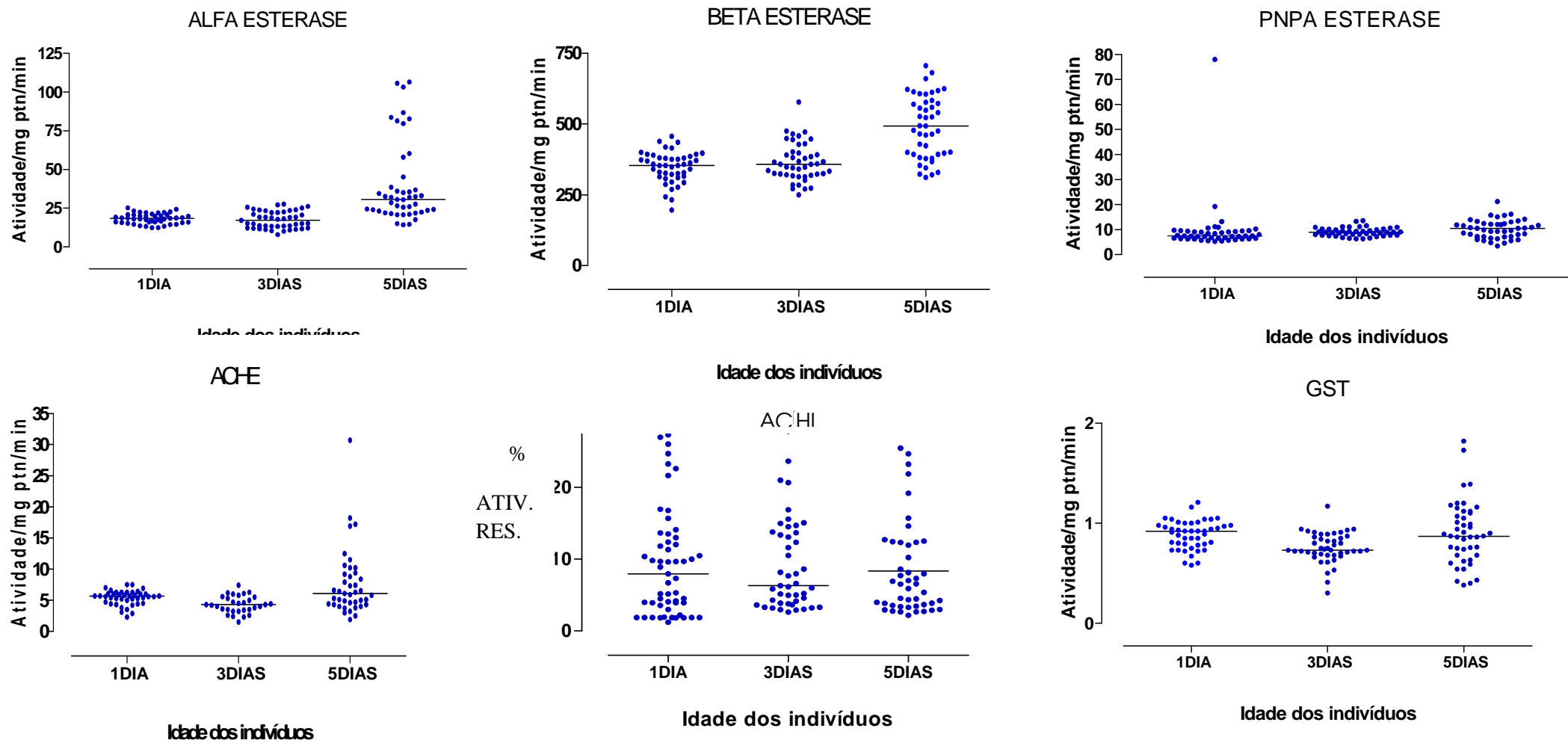
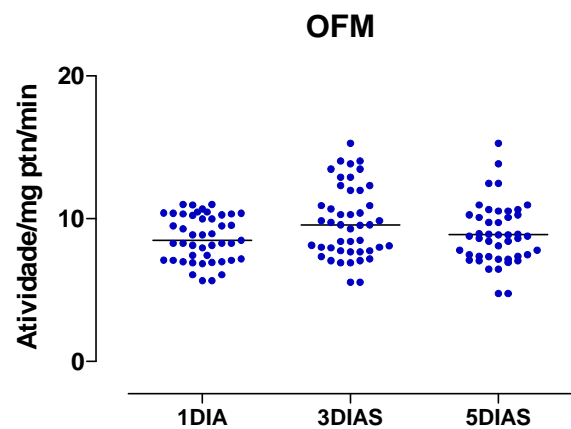


Figura 19. Quantificação da atividade das enzimas alfa-EST, beta-EST, pnpa-EST, ACHE , ACHI, GST e OFM em ninfas I da geração F1 de *T. sordida* com 1, 3 e 5 dias de idade (jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg - população LRS).



Cont. figura 19. Quantificação da atividade das enzimas alfa-EST, beta-EST, pnpa-EST, ACHE , ACHI, GST e OFM em ninfas I da geração F1 de *T. sordida* com 1, 3 e 5 dias de idade (jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg - população LRS).

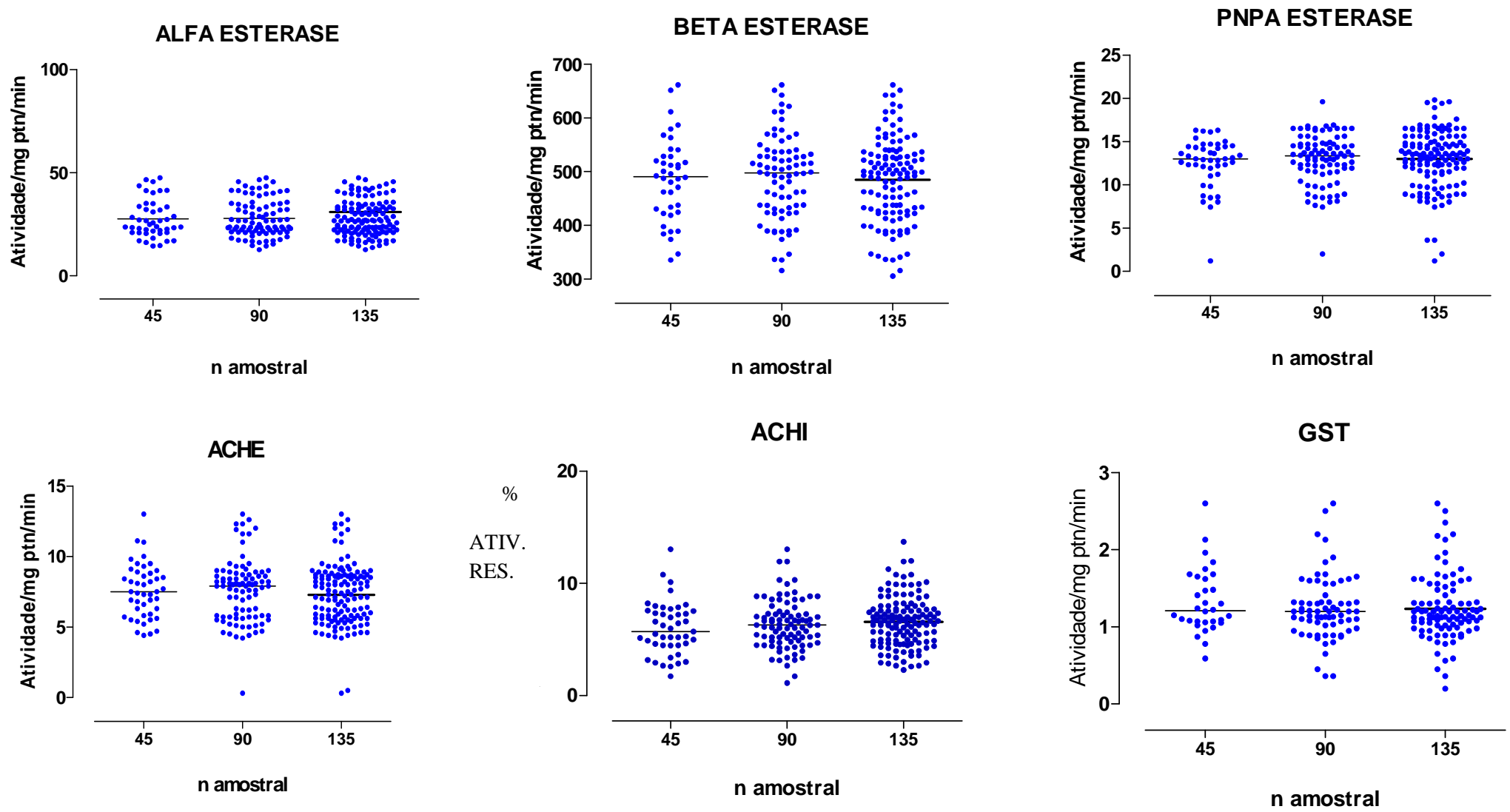
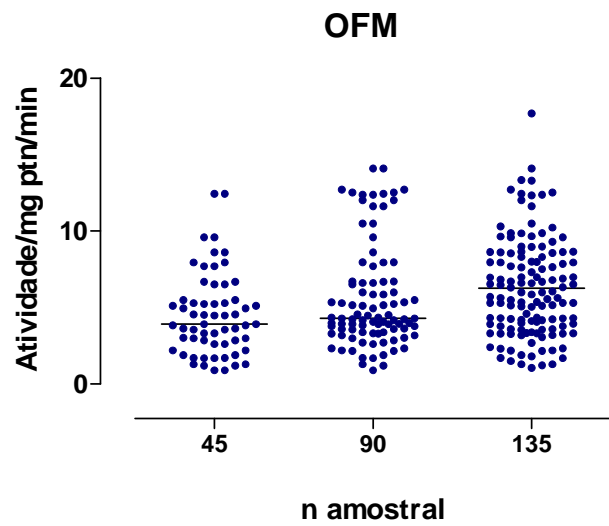


Figura 20: Quantificação da atividade das enzimas alfa-EST, beta-EST, pnpa-EST, ACHE, ACHI, GST e OFM em ninfas I da geração F1 de *T. sordida* com amostragem de 45, 90 e 135 espécimes (1 dia de idade - jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg - população LRS)



Cont. figura 20: Quantificação da atividade das enzimas alfa-EST, beta-EST, pnpa-EST, ACHE, ACHI, GST e OFM em ninfas I da geração F1 de *T. sordida* com amostragem de 45, 90 e 135 espécimes (1 dia de idade - jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg - população LRS)

5.5.4 Perfil da quantificação da atividade de enzimas relacionadas com a detoxificação de inseticidas nas populações de *T. sordida* estudadas.

A quantificação da atividade enzimática relacionada com resistência a inseticida, para as populações da localidade de Barriguda e regiões limítrofes está apresentado na figura 21.

Analisando os resultados de MFO, observa-se que a LRS obteve o perfil mais homogêneo do gráfico, o que está condizente como esperado. A maioria das populações apresentou grande heterogeneidade em suas distribuições, no entanto apenas as populações de Barriguda e Jataí I foram significativamente diferentes ($p < 0,0001$).

Foram observadas algumas diferenças significativas em relação ao perfil enzimático da LRS para as enzimas alfa, beta e pnpa-EST, além de Ace, principalmente nas populações de Jataí II, Boa Vista e Bom Jesus. O ensaio que mede a inibição da atividade de ACE (AChI) foi pensado de modo a evidenciar alterações da enzima que dificultassem seu acoplamento com o inseticida inibidor, com isso um pequeno percentual de atividade remanescente significa uma grande inibição de atividade. Por isso as diferenças significativas observadas para Barriguda e Jataí I em relação a LRS, não denotam significância biológica. Além disso, aplicando-se o critério de classificação da OMS, que aponta os indivíduos como mais de 30% de atividade remanescente como tendo Ace alterada, observa-se que nenhuma das populações usadas apresenta alteração de Ace.

No gráfico de GST observa-se que a LRS apresentou perfil de atividade maior mais heterogêneo que as populações de campo avaliadas. Justifica-se a falta de homogeneidade da enzima GST devido a problemas operacionais durante a realização dos ensaios e que não foi encontrado.

Uma vez que o perfil de LRS é o resultado da análise de 152 espécimes individuais, cujos resultados foram validados, acredita-se que o perfil visualizado seja representativo da população, o que levanta questionamento sobre a validade da LRS utilizada.

Por outro lado, quando se compara os perfis das populações ensaiadas com a distribuição de Jataí I, perfil menor e mais homogêneo do gráfico, constatou-se que com exceção de Jataí II, todas as demais populações apresentaram diferenças significativas ($p < 0,0001$).

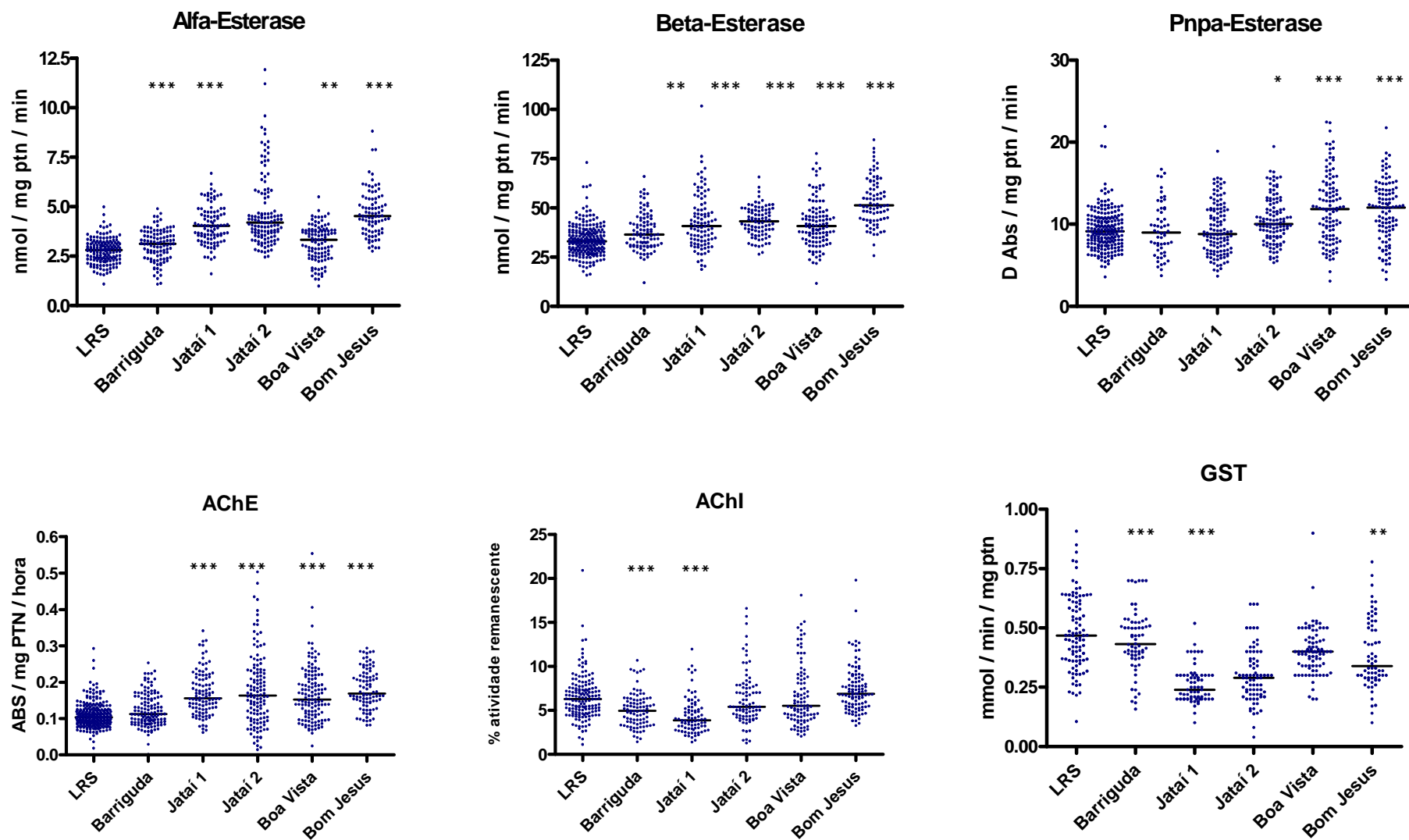
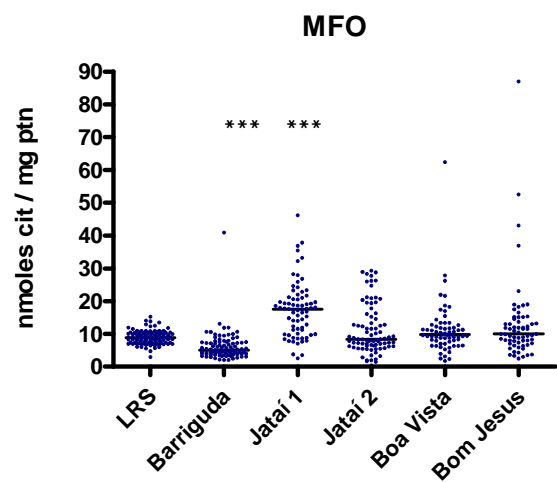


Figura 21. Quantificação da atividade das enzimas alfa-EST, beta-EST, pnpa-EST, ACHE, ACHI, GST e OFM em ninfas I da geração F1 de *T. sordida* com 5 dias de idade (jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg).

Nota: Teste Kruskal wallis e Post test Dunn's - Legenda: * = $p < 0,01$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$



Cont. figura 21. Quantificação da atividade das enzimas alfa-EST, beta-EST, pnpa-EST, ACHE , ACHI, GST e OFM em ninfas I da geração F1 de *T. sordida* com 5 dias de idade (jejum - peso $1,2 \pm 0,2$ mg).

Nota: Teste Kruskal wallis e Post test Dunn`s - Legenda: * = $p < 0,01$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$

Utilizando o método da análise do percentil 99 não foi observada alteração em nenhuma das enzimas avaliadas para a população de Barriguda. Todas as demais populações apresentaram alteração moderada para a enzima ACHE. O mesmo padrão foi observado para OFM, diferindo-se apenas em Jataí I que apresentou grande alteração. Análises das atividades de α -EST revelaram alteração pequena em Boa Vista, moderada em Jataí I e II e grande em Bom Jesus. Apenas a população de Bom Jesus apresentou alteração moderada para β -EST. Não foram observadas alterações para pnpa-EST e GST (figura 22).

ano	População	AChE	AChI	MFO	α NA-Est	β NA-Est	ρ nnpa-Est	GST
2011	Barriguda	5	0	1	4	1	0	0
	Jataí 1	24	0	66	35	11	1	0
	Jataí 2	32	3	27	43	1	1	0
	Boa Vista	25	5	17	8	8	7	1
	Bom Jesus	31	2	25	56	26	2	0

Figura 22. Análise da frequência de indivíduos das populações com atividade enzimática além do percentil 99 da linhagem de referência. As cores representam o percentual de indivíduos da população com atividade enzimática acima do percentil 99 da LRS: verde – até 15%, amarelo – entre 15 e 50% e, vermelho – acima de 50%. Estes valores correspondem a alteração enzimática na população classificada, respectivamente, como ausente, baixa e alta.

Como os gráficos indicavam uma alteração visível em beta-EST e pnpa-EST em várias populações, esta não detectada pelo percentil 99, foram realizados teste de Kruskal Wallis, seguido de Duns's *post test* para comparar a distribuição total entre as populações. Foi verificado que as populações de Boa Vista e Bom Jesus e Jataí II apresentaram alteração para pnpa-EST enquanto, que todas para beta-EST, inclusive Barriguda. Análises de correlação (Sperman) entre as razões de resistência obtidas nos bioensaios e o perfil enzimático de cada população não revelaram correlação significativa .

Os relatos cada vez mais frequentes de populações triatomínicas com razões de resistência elevadas tem causado grande impacto, desafiando cientistas e sanitaristas na busca de novas alternativas para o controle vetorial. Neste contexto, a resistência a inseticidas tem assumido prioridade no cenário da doença de Chagas demandando uma melhor caracterização e delimitação.

Os bioensaios quantitativos realizados com as 99 populações de *T. sordida* avaliadas neste projeto revelaram que as RR_{50} variaram de 0,44 a 6,5. De acordo com critério de categorização do *status* da suscetibilidade/resistência proposto pela OPAS (2005), apenas 1% das populações foi classificada como resistente a deltametrina (TsCJB; RR 6,50), enquanto que de acordo com critério de ZERBA & PICOLLO (2002), este valor aumentou para 55,5%. Utilizando ambos os critérios, 10 populações (10,1%) foram mais suscetíveis que a própria LRS ao inseticida avaliado revelando que esta linhagem utilizada se mostra inadequada a sua função: ser referência de suscetibilidade. Isto pode ser comprovado recalculando-se as razões de resistência 50% para as mesmas amostras estudadas, considerando-se como LRS a população TsMABO por ser esta a mais sensível e apresentar *slope* semelhante a TsREF. Neste caso as RR_{50} variaram de 2,86 a 18,3. A mesma observação pode ser verificada em estudo desenvolvido por OBARA (2010) quando as RR_{50} das populações estudadas de *T. sordida* que eram de 1,05 a 2,71 se alteraram para 26,3 a 68,7 em função da troca da linhagem referência de suscetibilidade.

Uma das grandes dificuldades em se desenvolver estudos de resistência de triatomíneos a inseticidas tem sido determinar uma linhagem suscetível que possa ser utilizada como referência. De acordo com preconização da OPAS (2005) entende-se por linhagem referência de suscetibilidade aquela há mais de cinco gerações em laboratório, sem contato com inseticida e sem aporte de material externo ou aquela coletada em local onde nunca houve tratamento com inseticida. Neste estudo foi escolhida uma linhagem proveniente de Uberaba, atendendo aos requisitos solicitados. Contudo nos ensaios quantitativos de laboratório 10 populações de campo se mostraram mais suscetíveis a deltametrina que a própria LRS, motivo pelo qual se mostrou inadequada para este fim.

Para a estruturação da Rede de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* – MoReNAa foi vivenciada a mesma dificuldade. Inicialmente, utilizando critérios similares aos estabelecidos pela OPAS (2005) foi escolhida uma LRS que se mostrou ao longo do tempo menos suscetível que as populações de campo estudadas. Deste modo, posteriormente esta linhagem foi trocada pela cepa *Rockefeller*, colônia esta que vem sendo utilizada há vários anos (comunicação pessoal – Dra. Denise Valle).

Outra problemática diz respeito à manutenção desta LRS em laboratório *ad infinitum* para que a mesma possa ser utilizada como referência em todos os estudos desenvolvidos com a

espécie de interesse, considerando as dificuldades em se manter colônias viáveis por longos períodos de tempo em insetário sem aporte de material externo. Novamente, referindo-se a rede MoReNAa, a dificuldade supracitada não foi vivenciada, considerando as características biológicas do modelo estudado, sendo a mesma utilizada como referência de controle interno em todos os laboratórios que integram a rede ao nível nacional (comunicação pessoal – Dra. Denise Valle).

Referindo-se aos ensaios qualitativos com triatomíneos, a WHO (1994) e OPAS (2005) preconizam o uso de uma dose diagnóstica (DD) referente a $1xDL_{99}$ da linhagem referência de suscetibilidade. A sobrevivência, em resposta a essa DD, de no mínimo um inseto em dois dos três ensaios com 10 ninfas I deve ser interpretado como indicativo de resistência justificando a necessidade do estabelecimento das concentrações letais para esta população, e conseqüente, razões de resistência.

No caso dos ensaios com mosquitos, a dose diagnóstica utilizada é de $2xDL_{99}$ da linhagem referência de suscetibilidade. Mortalidade superior a 98% e inferior a 80% indicam suscetibilidade e resistência estabelecida, respectivamente. Mortalidade entre 80 e 98% sugere resistência incipiente, apontando para a necessidade de vigilância entomológica e monitoramento da resistência desta população (WHO, 1981).

HEMINGWAY *et al.* (2004) acreditam que a eleição de uma dose diagnóstica de $2xDL_{99}$ da população referência de suscetibilidade elimina mais de 50% dos indivíduos resistentes, comprometendo, deste modo a eficiência dos bioensaios. Nestes casos o melhor método de monitoramento para detectar resistência é o uso de uma dose que mate 99% dos suscetíveis, que é um compromisso entre a baixa sobrevivência dos suscetíveis e a baixa mortalidade dos resistentes. O aumento da dose discriminante para duas ou três vezes a DL_{99} representa risco de alta mortalidade dos resistentes, como verificado em estudos feitos por DENNEHY *et al.* (1983).

Com relação aos ensaios biológicos qualitativos realizados neste trabalho, o percentual de mortalidade de ninfas I de *T. sordida* em resposta dose diagnóstica $1xDL_{99}$ variou de 43,3% a 100%. De acordo com categorização proposta por WHO (1994), 61,2% das populações foram classificadas como resistentes a deltametrina, sendo as demais, suscetíveis. Utilizando-se contudo, $2xDL_{99}$ da LR, não se verificou sobrevivência alguma, sendo todas as populações estudadas classificadas como suscetíveis ao inseticida testado.

A dose diagnóstica permite discriminar o vigor da linhagem referência de suscetibilidade (laboratorial) e o da população de campo. A dificuldade está em se definir qual o limiar de risco acima do qual há comprometimento do controle em campo. Observando as razões de resistência obtidas neste trabalho e considerando que, segundo OPAS (2005), somente $RR > 5$ indica

resistência, uma possibilidade operacional seria usar $1xDL_{99}$ como DD e considerar percentuais de sobrevivência diferentes dos preconizados pela WHO(1994) como indicativo de resistência, contudo essa informação só poderá ser obtida a partir da realização de ensaios de campo.

Uma possível causa das RRs verificadas neste trabalho pode ser atribuída ao uso contínuo de piretróides no Brasil desde a década de 80, como descrito por VASSENA *et al.* (2000) em estudos realizados com populações de *T. infestans* procedentes do Rio Grande do Sul. Na ocasião, foram observadas RR 7,0 a deltametrina, 3,6 a β -ciflutrina e a 3,3 a cipermetrina. A possibilidade de resistência cruzada com outros inseticidas com mesmo sítio de ação não deve ser descartada, como verificado em estudos com *Blattella germanica* que apresentou resistência cruzada entre piretróides e DDT por meio do mecanismo de resistência do tipo *Knockdown resistance* - kdr (SIEGFRIED & SCOTT, 1992). Neste contexto, pode-se considerar ainda os inseticidas utilizados com fins agrícolas e domésticos. Possíveis falhas operacionais também devem ser avaliadas.

Com relação a heterogeneidade das populações verifica-se que das 99 estudadas, 46 (46,5%) apresentaram *slope* inferior a LRS refletindo maior diversidade genética referente a característica avaliada quando comparado a mesma. Interessante destacar grande variação inclusive ao nível de município.

A escolha das localidades amostradas neste trabalho permitiu uma comparação dos resultados obtidos neste estudo com os de PESSOA (2008) referentes à localidade de Barriguda (município de Coração de Jesus). Em coleta realizada em 2007, PESSOA (2008) encontrou, utilizando as mesmas condições experimentais, RR_{50} de 6,5 para Barriguda (Coração de Jesus). Em outra amostragem realizadas em 2009, foi observada manutenção deste valor. Com intuito de compreender tal fenômeno, coletas das populações triatomínicas das áreas de entorno foram realizadas em 2010 para definição do perfil de suscetibilidade a deltametrina, sendo elas: Boa Vista 1 (TsCJBV1), Bom Jesus (TsCJBJ), Jataí 2 (TsCJJ2) e Jataí 1 (TsCJJ1). As RR_{50} encontradas foram de 2,82; 2,22; 1,85; 1,22, respectivamente. De acordo com preconização da OPAS (2005), todas as populações são suscetíveis ao inseticida testado, enquanto que de acordo com ZERBA & PICOLLO (2002) duas são suscetíveis (TsCJJ2 e TsCJJ1) e outras duas resistentes (TsCJBJ e TsCJBV1). Para as áreas limítrofes com Barriguda a taxa de mortalidade a DD variou de 43,3 a 100%. Referindo-se ao *slope*, todas as populações apresentaram coeficiente inferior ao da LRS, refletindo maior variabilidade genética que a última, e conseqüentemente necessidade de monitoramento do perfil de suscetibilidade na linha do tempo.

A comparação dos resultados dos ensaios biológicos qualitativos e quantitativos obtidos neste trabalho permitiu verificar falta de correspondência entre eles no que diz respeito a

discernir diferentes perfis de suscetibilidade. Os critérios utilizados para categorização das populações triatomínicas em resistentes ou suscetíveis é bastante arbitrário e empírico sem fundamentação teórico-prática, revelando a necessidade da realização de ensaios de laboratório e de campo de forma simultânea e complementar, de modo a permitir estabelecer uma correlação entre ambos para fornecer um melhor entendimento da real relação existente entre eles e consequentemente de se compreender o que é resistente e o que é suscetível. A partir daí, será possível estabelecer pontos de corte funcionais e operacionais referentes ao percentual de mortalidade frente a dose diagnóstica e a categorização das RR junto ao *status* de suscetibilidade. Consequentemente, em uma instância operacional, estes estudos permitirão a adoção de medidas de intervenção em momento oportuno de forma a não comprometer o sucesso do controle vetorial obtido no país até o momento. Trata-se de uma realidade já verificada por nosso grupo de pesquisa em outros estudos.

Outro ponto importante a ser ressaltado se refere a escolha das razões de resistência a serem utilizadas como critério para classificação de suscetibilidade/resistência a inseticidas. Em nenhuma das duas preconizações faz-se menção quanto a utilização da RR₅₀ ou da RR₉₅. Ressalta-se que na grande maioria dos artigos não é informado qual o critério utilizado o que de certa forma dificulta, ou até mesmo, inviabiliza a interpretação dos resultados e comparação dos mesmos. No caso da RR₉₅ ser o critério adotado para categorização do *status* de suscetibilidade/resistência, o número de populações resistentes segundo a preconização de ZERBA & PICOLLO (2002) e OPAS (2005) sobe de 55% e 1% para 83,5% e 11,7%, respectivamente, fato este muito preocupante. Contudo, o que se verifica na prática é que apenas uma das RR não é elemento suficiente para definir critérios e avaliar condutas a serem tomadas. Deste modo recomenda-se a adoção da interpretação de ambas as razões atrelada as informações fornecidas pelo *slope*.

Referindo-se as inferências sobre a grande variabilidade em relação à característica estudada da maior parte das populações, com base no *slope*, estes resultados corroboram com estudos moleculares que demonstram que em áreas com tratamento químico a diversidade genética é menor que em áreas não tratadas (ROJAS DE ARIAS *et al.*, 2003; 2004; PEREZ DE ROSAS *et al.*, 2007; 2008; CERCERE *et al.*, 2007; MARCET *et al.*, 2009).

Na tentativa de se compreender o real significado dos resultados obtidos em laboratório para a localidade de Barriguda e seu entorno foi realizado um levantamento das características ambientais da região de interesse, do histórico de infestação triatomínica da região bem como o número de cargas de inseticidas aplicadas no local, da qualidade da borrifação desenvolvida pelos agentes de saúde, de possíveis usos de inseticida com fins agrícolas e domésticos, da estrutura física das UD's e do perfil bioquímico e molecular das populações de interesse.

Informações referentes a precipitação, temperatura, umidade e insolação da área de interesse foram avaliadas entre os períodos de 1970 a 2010, com vistas a realização de possíveis inferências sobre um padrão de degradação do inseticida uma vez que todas estas condições influenciam neste fenômeno. Justifica-se tão longo período de observação pelo fato da região de interesse – o Norte de Minas - ter sofrido intensas modificações ambientais ao longo das últimas décadas com potencial de alteração das condições macro e microambientais. Observou-se variação significativa nos parâmetros de temperatura, pluviosidade e insolação ($p < 0,05$). Todas essas variações climatológicas, podem ser responsáveis pela degradação do inseticida de forma irregular na linha do tempo, em períodos diferentes dos preconizados pelos fabricantes destes ativos químicos e dos gestores de saúde envolvidos no delineamento e programação das atividades de borrifação, expondo triatomíneos a subdoses e selecionando, por conseguinte, insetos menos suscetíveis.

A toxicidade do DDT e piretróides é significativamente afetada pela temperatura (VINSON & KEARNS, 1952). ALZOGARAY & ZERBA (1993) demonstraram que os piretróides são menos ativos em altas temperaturas. Outra observação relevante a ser considerada é que estes inseticidas utilizados nas campanhas para o controle dos triatomíneos apresentam em geral, pouco efeito residual, uma vez que as doses recomendadas produzem alto impacto inicial nas populações, mas as doses letais não se mantem nas superfícies tratadas mais do que alguns meses exatamente por conta dessas condições climáticas (OLIVEIRA FILHO, 1983; PINCHIN et al., 1984; OLIVEIRA FILHO & MELO, 1987). Este fato é esperado, pois as formulações convencionais mais usadas são os pós molháveis e as suspensões concentradas, que representam somente um veículo para os princípios ativos e não fornecem proteção contra o ar, radiação ultravioleta e umidade, bem como fatores físicos, tais como chuva, vento e outros agentes, inclusive seres humanos e animais domésticos, os quais promovem a erosão das superfícies tratadas removendo o inseticida aí depositado. No caso dos piretróides, a perda química pode ser esperada em superfícies altamente alcalinas ou expostas a radiação ultravioleta. Como consequência aplicações repetidas dos inseticidas fazem-se necessárias, em especial quando os triatomíneos presentes podem viver também nas áreas silvestres ao redor das habitações humanas, de onde invadem constantemente o peridomicílio, e daí as casas.

Todas estas variáveis ambientais são importantes e influenciam diretamente na velocidade de degradação do inseticida e na consequente necessidade de reaplicações de modo a manter as UD's livres de infestações triatomínicas. Contudo, verifica-se nas atividades de rotina a impossibilidade de se avaliar tais variáveis ponto a ponto, redefinindo frequências específicas de tratamento para cada macroregião do Estado. Deste modo, o aporte de indivíduos externos, bem como um resíduo triatomínico sobrevivente das aplicações e da eclosão dos ovos,

recolonizam as casas sendo responsáveis pela considerável diversidade genética observada. Esta imigração implica também em uma possível diluição das razões de resistência observadas, que neste caso podem estar sendo subestimada.

Com o objetivo de avaliar o padrão de infestação das localidades de interesse e da quantidade de cargas de inseticida utilizada, de modo a correlacionar com a pressão de ativo químico aplicada na região, foram extraídos dados do Cárdez referentes ao período de 1978 a 1994. O percentual de unidades domiciliares infestadas com triatomíneos foi semelhante em todas as localidades, apresentando-se mais elevado em Barriguda a partir de 1985. O percentual de UD`s trabalhadas permaneceu próximo a 100% em toda região amostrada . Os índices de captura de triatomíneos foram mais elevados em Barriguda, Jataí II e Jataí I, locais estes nos quais a quantidade de inseticida borrifada também foi maior ($p < 0,05$), sendo *T. sordida* (94,5%) a espécie predominantemente capturada. Os inseticidas foram BHC, K-Otrhrine e alfacipermetrina. Para o período de 2004 a 2010 verificou-se uma maior uso de inseticida também em Barriguda, com utilização exclusiva de alfacipermetrina.

Ressalta-se que o Cárdez apresentou duas falhas: 1) referente a informação do número bruto de triatomíneos coletados, sendo informado na ficha apenas a espécie encontrada, o que impossibilitou maiores afirmações e 2) apenas o nome do ativo químico foi informado não detalhando a quantidade utilizada. Excluídas as possíveis falhas supracitadas, pode-se pensar na possibilidade de uma maior captura nas localidades mais borrifadas, talvez devido ao efeito desalojante do ativo químico, e/ou da maior experiência do agente de campo que executou a busca ativa.

De forma geral, a localidade de Barriguda sofreu maior pressão com inseticida para o controle de triatomíneos que as localidades vizinhas.

Referindo-se as taxas de infestação, a região do Norte de Minas é uma área caracterizada como de alto risco de transmissão da DC pela SVS/MS (2005) considerando a grande abundância de triatomíneos presentes, destacando-se a espécie *T. sordida* nas áreas de cerrado e caatinga (GURGEL-GONÇALVES, 2011). Observando-se a linha temporal na qual é apresentado o número de insetos, pode-se inferir que a fase de ataque em 1980 surtiu efeitos limitados referente a *T. sordida* o que pode ser verificado na pequena redução do número destes insetos após a introdução do controle químico. Por se tratar de uma espécie autóctone, os resultados apresentados, ainda que fragmentados revelam a necessidade de se implementar uma vigilância entomológica ativa atrelada as atividades de borrfiação quando necessárias.

PRATA (1981) e VILLELA (2007) atribuíram a irregularidade com que as campanhas tem sido conduzidas, por motivos de ordem administrativa, e orçamentária principalmente, a

persistência das endemias. Esta falta de rigor metodológico – seja na falta da borrifação ou, atividade feita de forma errônea - expõe insetos a subdoses selecionando os menos suscetíveis.

Com o objetivo de se identificar possíveis falhas operacionais no trabalho dos agentes de saúde que possam interferir na qualidade da borrifação, e conseqüentemente na pressão do ativo químico sobre as populações triatomínicas, um questionário de confecção própria foi aplicado aos agentes de saúde para sondar a qualidade das atividades desenvolvidas. O município de Coração de Jesus conta atualmente com três agentes de saúde, com tempo de experiência profissional variando de quatro meses a um ano. Apesar de nenhum dos funcionários ter sido treinado para executar atividades de controle dos triatomíneos utilizando inseticidas, os dois com mais tempo de serviço (seis meses e um ano) o fazem de acordo com preconização do PCDCCh. Referindo-se a borrifação, foi relatado que em nenhuma campanha de controle eles aplicaram doses do inseticida menores do que as recomendadas ou fizeram uso de ativos químicos vencidos. Em nenhum programa de borrifação foi vivenciada situação que por falta de inseticida, funcionários ou veículos houvesse a necessidade de se excluir algumas UD's das atividades. Os agentes relataram nunca terem trabalhado em alguma localidade que mesmo executando as atividades de borrifação de forma adequada os triatomíneos não morriam ou em que as colônias cresciam mais rápido do que o esperado. Até o momento nenhum deles se intoxicou com inseticida.

Pelo exposto, concluiu-se que a qualidade dos trabalhos prestados pelos agentes de saúde pode estar comprometida considerando a complexidade das atividades de borrifação, a conseqüente necessidade de treinamento e a ausência do mesmo. No contexto operacional, pode-se atribuir a este fato a possibilidade de ocorrência de falhas de controle. As falhas de controle segundo OPAS (2005), podem ser ocasionadas pela ausência de eficácia do inseticida, por falhas operacionais e/ou por condicionantes ambientais. A ausência de eficácia do inseticida está relacionada a má qualidade do ingrediente ativo e/ou formulação inadequada. As falhas operacionais abrangem erros de diluição do inseticida, falhas nas aplicações bem como, problemas com as máquinas de borrifação.

Esta falta de capacitação dos agentes e a grande rotatividade dos profissionais devido a falta de incentivos, inexistência de planos de carreira, baixos salários associados as dificuldades diárias para a execução das atividades desestimulam os agentes a permanecerem no cargo, o que pode de fato comprometer todas as atividades desenvolvidas. O processo de descentralização do PCDCCh tem sido responsável por uma perda gradativa de reconhecimento da importância da doença e manutenção dos índices entomológicos obtidos após 50 anos de trabalho, priorizando outras endemias (VILLELA *et al.*, 2005). Fato esse revelado pela existência de agentes executando atividades de borrifação sem treinamento prévio, como observado neste trabalho.

De acordo com Portaria de nº. 1.399, do Ministério da Saúde de 15 de dezembro de 1999 e posteriormente, da Portaria de nº. 1.172 do Ministério da Saúde de 15 de Julho de 2004, cabe a GRS não só a preparação dos agentes de saúde contratados pelo município a partir da realização de cursos de capacitação, como também da supervisão e avaliação das ações de controle da endemia. Uma das dificuldades deste sistema é que embora a descentralização se justifique em pressupostos teóricos, não existe tradição deste controle em níveis municipais, o que dificulta a transferência de encargos e o cumprimento continuado do programa. Tendo em vista as informações obtidas nos questionários esta parece não ser a realidade vivenciada pelo município de Coração de Jesus, o que pode estar comprometendo a continuidade das ações em tal região resultando na fragmentação e pouca produtividade de trabalho.

Os resultados das campanhas de borrifação para o controle da doença Chagas em regiões de ocorrência de *T. sordida* no Brasil apontam para indiscutível persistência deste triatomíneo no ambiente peridomiciliar apesar das borrifações sucessivas de inseticidas na linha do tempo. Esta “resistência” deve ser relacionada a aspectos comportamentais deste triatomíneo, como sua prevalência em montes de lenha, galinheiros, paióis, etc., cujas superfícies, permitindo a permanência de exemplares livres do contato com os mesmos e capazes de se multiplicar nestes ecótopos, ou mesmo, permitindo a sua reinfestação por exemplares de procedência silvestre (DIOTAIUTI & PINTO, 1991). Deste modo, associado ao controle químico reforça-se a necessidade do controle físico, voltado a organização deste peridomicílio.

Com o objetivo de se caracterizar as UD`s das localidades de interesse na tentativa de identificar possíveis fatores isolados ou combinados que pudessem estar associados aos diferentes perfis de suscetibilidade a deltametrina observados, questionários foram aplicados em 100% das residências. A caracterização dos materiais utilizados na construção das UD`s, entendendo-se neste caso intra e peridomicílio – esteve voltada a investigação de possíveis diferenças que pudessem influenciar na penetração do inseticida nestas superfícies bem como na velocidade de degradação do mesmo, tais como porosidade, alcalinidade, etc. A caracterização dos anexos peridomiciliares teve como objetivo avaliar a complexidade do peridomicílio e estado de conservação e distância deste ao intradomicílio e as matas de entorno, com vistas a inferir sobre a abundância de possíveis esconderijos para os triatomíneos e fluxo entre os ambientes peridomésticos e silvestre.

A maior parte das residências apresentaram idade média de construção de 1-10 anos (43,2%) ou >21 anos (45,4%), com paredes em sua predominância constituídas de adobe sem tijolo (40,9%) e tijolo com reboco (38,6%). Os telhados são em 98,9% de telhas de barro e o piso, em sua maioria, revestido de ladrilho (45%) e cerâmica (36,4%). Em todas as localidades verificou-se a criação de animais domésticos, contudo apenas naquelas com maior RR₅₀ (Barriguda, Bom Jesus e Jataí I) foram detectados moradores que relataram uso de inseticidas

piretróides e carbamatos com fins ao controle de pragas em seus animais e até mesmo em suas residências. Em ambos os casos foi relatado não existir peridomicidade para tal utilização. A agricultura de subsistência é comum em todas as localidades não tendo sido relatados o uso inseticidas com fins agrícolas. De forma geral, o peridomicílio se mostrou bastante complexo com grande diversidade de ecótopos, constituídos por diferentes materiais sendo em sua maioria madeira. Na prática estes ambientes representam uma infinidade de refúgios para os triatomíneos frente a presença do ativo químico.

De acordo com a natureza das estruturas (porosidade e alcalinidade), percebe-se diferentes mecanismos de penetração e absorção do inseticida. Deste modo, em superfícies porosas o ativo químico se deposita e parece perder a atividade mais rapidamente que em outras superfícies tais como placas de madeira e cerâmicas. Atrelado a isso, ressalta-se que a pressão de inseticida pode ser diferente entre as localidades variando inclusive entre os ambientes domésticos e peridomésticos (ROJAS DE ARIAS *et al.*, 2003; 2004; GURTLER *et al.*, 2004).

Referindo-se a Barriguda, foi observado o maior número de UD`s com amontoados de lenhas, com a maior proporção de galinheiros e paióis sendo estes mais distantes do intradomicílio que as demais localidades e conseqüentemente mais próximas das matas no entorno, permitindo um fluxo de insetos entre esses dois ambientes. Este fato pode ser agravado pelo uso das matas limítrofes por alguns moradores de Barriguda com vistas a retirada de lenha e madeira, permitindo o fluxo de insetos entre esses ecótopos. As cercas de madeira são as mais antigas. Neste contexto, ressalta-se que peridomicílios mais antigos puderam refletir um pior estado de conservação e conseqüentemente maiores e melhores esconderijos para os triatomíneos de modo a possibilitar o contato com em suas sub-doses. Nossas observações são concordantes com resultados observados por DIOTAIUTI *et al* (1998), DIOTAIUTI & DIAS (1988) e DIOTAIUTI & PINTO (1991).

A sobrevivência de triatomíneos a borrifação confirma a limitação desta técnica na eliminação completa dos insetos peridomiciliares. As características do peridomicílio estudadas nesta tese desmonstram a grande variedade de ecótopos existentes, correspondendo a um número infinito de esconderijos, nas quais foram observadas a criação de inúmero animais, tais como: galinhas, porcos, cães, gatos, etc. A borrifação desse peridomicílio é um trabalho exaustivo para o qual o desempilhamento de todo o material aí acumulado é operacionalmente impossível de ser realizado pelo agente de campo responsável. Em conseqüência, um resíduo de barbeiros permanece após a aplicação do inseticida no fundo de montes de lenha que as vezes atingem muitos metros cúbicos, nos telhados de paióis e em vários outros esconderijos quase inacessíveis livres de contato com o ativo químico e/ou em contato com subdoses favorecendo a sua multiplicação nestes ecótopos. Neste contexto, a falta de cobertura ou descontinuidade de

ciclos de borrifação também deve ser considerado. Além disso, o aporte de material externo vindo do ambiente silvestre pode participar desta reconstrução populacional sendo que tal fluxo pode ocorrer em ambas as direções: do ambiente silvestre para o peridomicílio e vice-versa. A grande disponibilidade de alimento existente, representada principalmente por galinhas, transforma o peridomicílio num lugar de excelência para a manifestação de toda a valência ecológica do *T. sordida*, no que resulta ser essa a espécie de triatomíneo mais capturada no Brasil. As experiências de campo, tem revelado que a recolonização das casas tratadas, pode perfeitamente fazer-se às custas das novas gerações, advindas de ovos de geração anterior, não afetadas pelo inseticida (DIOTAIUTI *et. al.*, 1998).

Referindo-se a utilização de inseticidas para os diversos fins, verificou-se o uso de PI e CB para o controle de pragas em animais domésticos e para a proteção do intradomicílio contra insetos diversos. Ressalta-se neste contexto que a utilização de diversos tipos de inseticidas com finalidades distintas, ocasionando uma pressão de seleção sobre a população triatomínica fora a programada pelo PCDCh, pode contribuir para a seleção de indivíduos menos suscetíveis. De acordo com a SES/MG, não existe sobreposição de programas de controle de endemias na área de interesse.

PORCASI *et. al.*, (2006) atribuíram a persistência de *T. infestans* na região do Gran Chaco (Argentina) a interrupções nos programas de controle locais, mas frisando também a boa adaptação destes triatomíneos as características ambientais da região. GURTLER *et. al.*, (2004) atribuíram a dificuldade de eliminação de *T. infestans* em áreas do semi-árido do Chaco tratadas, às altas densidades de infestação, numerosas estruturas peridomésticas constituídas de material que pode ser refúgio para os triatomíneos, altas temperaturas, exposição ao sol e chuva, dosagens inapropriadas de inseticidas, frequência e tempo de aplicação. Contexto ambiental este muito semelhante ao observado neste trabalho.

Todo este cenário de sobrevivência de triatomíneos menos suscetíveis, atrelado a dinamicidade do fluxo de insetos nos ambientes silvestres, peridomésticos e domésticos reforçado pela alta capacidade de dispersão de *T. sordida* podem subestimar os resultados obtidos neste estudo.

Uma limitação deste trabalho foi que a avaliação da suscetibilidade/resistência foi realizada ao nível de localidade e não de UD, considerando o grande número de ninfas I necessário a ser utilizado nos ensaios biológicos partindo de uma geração parental bastante reduzida. Deste modo, não foi possível investigar as características das casas, ponto a ponto, discernindo diferenças físicas e estruturais nos quais insetos suscetíveis e resistentes foram amostrados.

A utilização de imagens de satélite junto a esta análise pode ser uma ferramenta útil no conhecimento das modificações ambientais das décadas anteriores até o momento atual –

período este de grandes alterações ambientais em virtude do cultivo de algodão. Neste contexto, podem ser investigados aspectos referentes ao uso e ocupação do solo, índice de cobertura vegetal, proximidade e intercomunicação do ambiente silvestre com o doméstico, bem como isolamento geográfico de algumas populações.

Com o objetivo de verificar alterações bioquímicas que possam estar correlacionadas aos diferentes perfis de suscetibilidade a deltametrina observados, foram desenvolvidos ensaios bioquímicos voltados a quantificação de enzimas detoxificativas. Para a realização destes ensaios por se tratar de uma metodologia ainda não padronizada para barbeiros, considerou-se pertinente redefinir alguns detalhes técnicos. Foi observado não existir um padrão de resposta para insetos de geração e idades diferenciadas contudo, para o “n amostral” os resultados revelaram a manutenção de um perfil de resposta, exceto da quantificação de OFM na qual se observou uma grande diversidade. O ensaio para esta enzima específica, aos moldes do realizado neste trabalho, é bastante criticado considerando a mensuração indireta da atividade enzimática. Considerando-se esta ressalva apenas para OFM, a partir demais ensaios recomenda-se a execução deste estudos com “n” de 45 indivíduos.

Dentre as problemáticas que precisam ser repensadas, destacam-se: 1) o processo de maceração dos triatomíneos aos moldes do realizado neste trabalho, considerando a dificuldade de trituração completa do inseto e o aquecimento da amostra em virtude do tempo de manipulação junto ao pistilo e conseqüente, degradação enzimática; 2) a avaliação dos tempos de incubação das enzimas e conseqüente performance das leituras e 3) o uso de insetos da LRS como controle interno junto aos ensaios considerando a dificuldade de manutenção das colônias *ad infinitum*.

Outro ponto relevante a ser ressaltado é sobre a necessidade de também se verificar se há resistência a outras classes de inseticidas, principalmente aquelas que se sabe que foram utilizadas, como os CB. Os mecanismos de resistência são revelados de maneira geral, cabendo aos responsáveis pelos ensaios interpretá-los e associá-los com as classes de inseticidas, sendo mais fácil caso não se encontre resistência múltipla.

A análise do percentil 99 referente a quantificação da atividade enzimática relacionada com detoxificação de inseticida das populações de *T. sordida* revelou que todas elas apresentaram alteração moderada na expressão da enzima ACHE, exceto Barriguda. As mesmas quatro revelaram alteração moderada para OFM, sendo que em Jataí I foi observada grande alteração. Nas análises das atividades de α -EST observou-se pequena alteração em Boa Vista, moderada em Jataí I e II e grande em Bom Jesus. Apenas a população de Bom Jesus apresentou alteração moderada para β -EST. Não foram observadas alterações para pnpa-EST e GST em nenhuma das populações. Deste modo, foi feito um teste de Kruskal Wallis, seguido de Dun`s

post test para verificar alterações. Foi verificado que as populações de Boa Vista e Bom Jesus e Jataí II apresentaram alteração para pnpa-EST enquanto, que todas para beta-EST, inclusive Barriguda. Todas estas alterações enzimáticas observadas nos ensaios podem estar correlacionadas ao uso de inseticidas pertencentes a todas as classes como relatado nos questionários para o controle de pragas nas criações domésticas e demais insetos, bem como OP e PI junto as atividades do PCDCh.

Referindo-se a metodologia de análise por meio do p99 verificou-se limitação desta técnica por mascarar alteração enzimática em algumas populações, recomendando-se que ela esteja atrelada outras análises estatísticas de modo a assegurar a validade dos resultados. Contudo, de antemão deve-se considerar primeiro a limitação da LRS escolhida.

A análise dos resultados obtidos neste projeto demonstrou falta de correlação entre os resultados dos ensaios biológicos e dos bioquímicos, problemática esta também enfrentada pela rede MoReNAa nos estudos com *Aedes aegypti*. Apesar disto, os dados indicam que alteração na atividade de ALFA-EST e BETA-EST parecem contribuir para uma menor suscetibilidade de triatomíneos a PI e de ACE a CB. No entanto, não se tem aqui elementos suficientes para apontar o grau de contribuição de cada uma dessas alterações para o fenótipo de resistência.

As diferenças encontradas nos ensaios biológicos e bioquímicos podem estar relacionadas a estrutura genética das populações de *T. sordida* como observado para *T. infestans* (MONTEIRO *et al.*, 1999; MARCET *et al.*, 2008; PEREZ DE ROSAS *et al.*, 2007; 2008, PICCINALI *et al.*, 2009). Pelas baixas razões de resistência observadas as alterações de suscetibilidade podem ser devido a múltiplos mecanismos, isolados ou combinados, dentre os quais se destacam o espessamento cuticular, alterações bioquímicas e comportamentais.

Ainda neste contexto, outro ponto a ser considerado se refere a utilização de um limitado número de substratos em tais ensaios enzimáticos, frente a grande infinidade existente nos insetos, atrelado ao fato das enzimas avaliadas serem multifuncionais. Deste modo, não necessariamente as alterações observadas se referem a eventos relacionados com a resistência a inseticidas, revelando falta de especificidade. O mesmo foi observado por SAAVEDRA-RODRIGUES *et al.* (2012) através da técnica do microarray utilizando um maior número de substratos enzimáticos em estudos com *Aedes aegypti*. Deste modo, acredita-se que os estudos mais promissores voltados para esta linha de pesquisa estejam em investigações no sítio-alvo dos ativos químicos e nas ferramentas de bioinformática.

Apesar da distribuição focal dos triatomíneos, com colônias geralmente compostas por poucos indivíduos e longo ciclo evolutivo, fatores estes determinantes na variabilidade genética, foi observado na análise dos microssatélites uma grande diversidade intrapopulacional. A diversidade entre as populações foi moderada revelando inclusive possível fluxo gênico,

independente dos tipos de agrupamentos. Em todas as populações foram identificados haplótipos e alelos exclusivos. Pelos resultados obtidos é possível inferir um possível fluxo de insetos entre as localidades de Jataí I, Jataí II e Boa Vista. As populações de Barriguda e de Bom Jesus se mostraram bastante diferenciadas das demais indicando um possível isolamento independente de ambas. Estudos com um maior número amostral e com imagens de satélite seriam ferramentas úteis no esclarecimento desta questão.

GIORDANO *et al.*, (2005) sugerem o uso dos microssatélites como uma ferramenta útil no estudo de populações submetidas a diferentes pressões com inseticida, contudo, o que observamos foi que tal ferramenta não discerniu populações com diferentes perfis de suscetibilidade. Observou-se grande diversidade genética suportando a hipótese de que o rápido crescimento da população pode estar associado a recolonização por insetos sobreviventes ao tratamento com inseticida, sugerindo possíveis falhas no controle operacional (MARCET *et al.*, 2006; PEREZ DE ROSAS *et al.*, 2007; RICHER *et al.*, 2007; PIZARRO *et al.*, 2008).

Os marcadores moleculares utilizados foram desenhados antes da disponibilidade das informações do genoma *Rhodnius prolixus*, por predição aleatória. A análise de similaridade destes marcadores com os dados disponíveis neste genoma podem revelar relação destes com genes envolvidos com a resistência a inseticida, contudo esta análise não ainda foi realizada. Recomenda-se nos próximos estudos o desenho destes iniciadores com base nas informações deste banco de dados com fragmentos de DNA ligados a genes envolvidos com a resistência a inseticida.

Os resultados aqui obtidos precisam, em definitivo, ser reavaliados em condições de campo para se compreender o real significado das razões de resistência observadas, não podendo ser transpostos para outras espécies de triatomíneos e nem outras populações (OLIVEIRA FILHO 1999).

- As análises dos bioensaios quantitativos revelaram RR_{50} que variaram de 0,44 a 6,5. De acordo com critério de categorização do *status* da suscetibilidade/resistência proposto pela OPAS (2005), apenas 1% das populações foi classificada como resistente a deltametrina (TsCJB; RR_{50} : 6,50), enquanto que de acordo com critério de ZERBA & PICOLLO (2002), este valor representa 55,5%. As definições de resistência propostas por ZERBA & PICOLLO (2002) e OPAS (2005) não se mostraram concordantes, revelando percentuais de resistência distintos.
- Apesar da inexistência de informações mais consistentes sobre o que realmente as razões de resistência significam em campo, até que os ensaios de campo voltados a esta finalidade sejam realizados, o indicativo de resistência a inseticida utilizando critério preconizado pela OPAS (2005), recomenda-se para o município de Barriguda, que a SES/MG realize uma avaliação das ações de controle de campo.
- Os bioensaios qualitativos revelaram um percentual de mortalidade a DD $1 \times DL_{99}$ que variou de 43,3% a 100%, sendo 61,2% das populações classificadas como resistentes à deltametrina. Os resultados obtidos nos bioensaios qualitativos e quantitativos não se mostraram correspondentes.
- A padronização dos ensaios bioquímicos revelou que estes ensaios devem ser realizados com insetos de mesma geração e idade considerando-se a inexistência de um padrão único de resposta que seja passível de comparação. Referindo-se ao número amostral, recomenda-se a utilização de no mínimo de 45 insetos, considerando uma possível diversidade genética das populações. A análise dos ensaios bioquímicos utilizando somente o percentil 99 se mostrou deficiente, justificando a necessidade de um teste estatístico em paralelo, a ser escolhido de acordo com a distribuição dos dados.
- De forma geral, independente do *status* de suscetibilidade/resistência, foi observada alteração na maioria das populações para todas as enzimas, exceto de GST. Não foi observada correlação entre as RR encontradas e os resultados dos testes bioquímicos.
- Não foi observada diferença no padrão das localidades com triatomíneos classificados como resistentes ou suscetíveis em relação a: constituição do intradomicílio, tipo de ecótopos peridomiciliares, a disponibilidade de esconderijos, e uso de inseticidas pelo próprio morador.
- Verificou-se acompanhando no período amostrado, diferenças nos parâmetros climatológicos (insolação, temperatura e pluviosidade) em todo o município ($p < 0,05$). Este fato pode contribuir para a degradação do inseticida de forma inconstante ao longo do tempo, em um período diferente do planejado pelo gestor responsável pela borrfiação, expondo o domicílio a possíveis reinfestações.

- Dentre as localidades avaliadas foi observado maior infestação e uso de inseticidas na localidade de Barriguda, sendo *T. sordida* (94,5%) a espécie predominantemente coletada.
- Não existe sobreposição de programas de controle na região. O município de Coração de Jesus conta atualmente com três agentes de saúde, com pouco tempo de experiência profissional, não treinados para as atividades de borrifação que afirmaram ter trabalhado em concordância com as preconizações do MS.
- Os estudos com microssatélites revelaram uma diversidade genética média por *loci* (π_n) de 0,408. Foram identificados 75 haplótipos e 24 alelos exclusivos. Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram observados revelando déficit de heterozigosidade. Independente da constituição dos grupos, a AMOVA revelou uma pequena variação interpopulacional e uma grande intrapopulacional. A análise do F_{ST} possibilitou inferir sobre um fluxo de insetos entre as localidades de Jataí I, Jataí II, Boa Vista. As populações de Bom Jesus e Barriguda se mostraram diferenciadas das demais indicando um possível isolamento independente.
- Os microssatélites se mostraram úteis na caracterização da estrutura genética das populações, contudo não se trata de uma ferramenta que possibilite discernir populações com *status* de suscetibilidade diferenciado.
- De forma geral, o uso de inseticidas para diversos fins, possíveis falhas operacionais principalmente devidas à falta de capacitação dos agentes de saúde, somados a uma degradação irregular do inseticida determinada pelas condições ambientais, pode estar contribuindo para a persistência da infestação na região. A diversidade de RR observada dentro da mesma localidade, o fluxo genético observado nos ensaios moleculares, a abundância e diversidade de esconderijos e os diferentes perfis bioquímicos encontrados justificam a necessidade de estudos mais detalhados.

Considerações finais

Os resultados encontrados nos bioensaios para triatomíneos brasileiros até o momento não apontam a resistência a inseticida como um problema grave. Contudo, a detecção de “alteração de suscetibilidade”, ainda que em pequenos níveis, evidencia a necessidade de implementação de estratégias de manejo de modo a preservar a vida útil dos produtos utilizados na área domissanitária e garantir todo o sucesso de controle vetorial adquirido desde o início do PCDCCh.

Neste contexto, torna-se mais do que necessário o aperfeiçoamento da vigilância entomológica dentro da estrutura do SUS contemplando as nuances sociais, ambientais e eco-epidemiológicas da saúde. Somado a isto ressalta-se também a necessidade da avaliação das atividades técnicas, operacionais e de gestão desenvolvidas em relação às normas técnicas já definidas por parte dos municípios que fazem o controle dos triatomíneos.

Várias perguntas e questionamentos existem em que se refere ao estabelecimento de uma rotina de monitoramento de suscetibilidade/resistência em laboratório, revelando real demanda do desenvolvimento de técnicas e políticas a serem assumidas pelas gestões e políticos deste país.

Para tal faz-se necessária e prioritária a realização de ensaios de laboratório e de campo de forma simultânea e complementar, de modo a permitir uma correlação entre ambos e o consequente entendimento da relação existente entre eles e da compreensão do que é resistente e do que é suscetível. Identificar as particularidades toxicológicas, bioquímicas e genéticas de cada população “resistente” tem relação direta com o ótimo manejo da resistência e o monitoramento do controle que permitirá: 1) conhecer os fatores operacionais e biológicos que possibilitam o desenvolvimento da resistência em cada população, 2) elaborar estratégias de manejo da resistência específica de cada foco detectado e 3) proceder em momento oportuno para a manutenção dos índices entomológicos existentes atualmente adquirido as custas de anos de esforços dos funcionários e gestores do PCDCCh.

Com a realização deste projeto, a FIOCRUZ amplia o seu papel no âmbito do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde e contribui para uma melhor efetividade das ações de controle de uma importante doença no contexto epidemiológico no país.

Acevedo GR, Mougabure Cueto GA, Germano M, Orihuela PS, Cortez MR, Noireau F, Picollo MI & Vassena C 2011. Susceptibility of sylvatic *Triatoma infestans* from Andean Valleys of Bolivia to deltamethrin and fipronil. *Journal of Medical Entomology* 48: 830-835.

Akhavan D 1998. Análise de custo efetividade do Programa de Controle da Doença de Chagas no Brasil: relatório final. Dariush Akhavan, Brasília, Programa de desenvolvimento de recursos humanos/OPAS, 271 pp.

Alout H, Djogbénu L, Berticat C, Chandre F, Weill M 2008. Comparasin of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetylcholinesterase 1 biochemical properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol Part B* 150: 271-7.

Anand A, Crone EJ, Zera AJ 2008. Tissue and stage-specific juvenile hormone esterase (JHE) and epoxide hydrolase (JHEH) enzyme activities and the transcript abundance in lines of the cricket *Gryllus assimilis* artificially selected for plasma JHE activity: implications for JHE microevolution. *J Insect Physiol* 54: 1323-31.

Anaspaygh DD & Roe RM 2005. Regulation of JH epoxide hydrolase versus JH esterase activity in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, by juvenile hormone and xenobiotics. *J Insect Physiol* 51: 523-35.

Anderson JM, LAI JE, Dotson EM, Cordon-Rosales C, Ponce C, Norris De, Beard CD 2002. Identification and characterization of microsatellites markers in the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *Infection, Genetics and Evolution* 1: 243-248.

Anspaugh DD, Rose RL, Koehler PG, Hodgson E, Roe RM 1994. Multiple mechanisms of pyrethroid resistance in the german cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pestic biochem Physiol* 50: 138-148.

Apperson CS, Georghiou GP 1979. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. *J Econ Biochem* 68: 63-781.

Assis GFM 2006. *Avaliação do programa de controle da doença de Chagas no município de Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil, oito anos após implantação da vigilância entomológica*, Dissertação, Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.

Audino PG, Vassena C, Barrios S, Zerba E, Picollo M 2004. Role of enhanced detoxification in a deltamethrin-resistant population of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 335-339.

Barbosa da Silva JR, Siqueira JB JR, Coelho GE, Vilarinhos PT, Pimenta FG JR 2002. Dengue in Brazil: current situation and control activities. *Epidemiol Bull* 23: 3-6.

Barreto MP, Albuquerque RDR, Funayama GK 1969. Estudos sobre os reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi* In: XXXVI *Investigações sobre triatomíneos de palmeiras no município de Uberaba, MG, Brasil*. *Rev Brasil Biol* 29: 577-588.

Barreto MP. 1979. Epidemiologia. In: Brener, Z, Andrade, Z. (Eds.), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, Guanabara Koogan, Brasil, 90-151 pp.

Bass C, Schroeder I, Turberg A, Field M, Williamson MS. 2004. Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of the cat flea, *Ctenocephalides felis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 1305-1313.

- Bérenger JM, Blanchet D 2007. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 733-736.
- Bergé HBM, Feyreisen R, Amicho T M 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353: 1701-5.
- Bisset JÁ, Rodrigueq MM, Hemingway J, Diaz C, SmalL GJ, Ortiz 1991. 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* 5:223-228.
- Bloomquist JR 1996. Ion channels as targets of insecticides. *Ann Rev Entomol* 41: 163-190.
- Bloomquist JR. 2009. Insecticides: Chemistries and Characteristics. In (University of Minnesota's electronic textbook of Integrated Pest Management". Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>. Acesso em 19 Jul 2012.
- Bracco JE, Barata JMS, Marinotti O 1999. Evaluation of insecticide resistance and biochemical mechanisms in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 115-120.
- Braga IA, Lima JBP, Soares SS, Valle D 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the state of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Osw Cruz* 99: 199-203.
- Braga IA, Valle D 2007b. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde* 16: 295 – 302.
- Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol Serv Saúde* 2007a; 16: 279 – 293.
- Brasil. Ministério da saúde/gabinete do ministro. Portaria nº 1172, de 17 de junho de 2004. Disponível em <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-1172.htm>. Acesso em 19 Jul 2012.
- Brasil. Ministério da saúde/gabinete do ministro. Portaria nº 119, de 15 de dezembro de 1999. Disponível em <http://www.saude.ms.gov.br>. Acesso em 19 Jul 2012
- Brasil. Ministério da saúde/gabinete do ministro. Portaria nº 3252, de 22 de dezembro de 2009. Disponível em <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/gm/102068-3252>. Acesso em 19 Jul 2012.
- Bregues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* 17:87-94.
- Brogdon WG, Mcallister JC 1998. Inseticide resistente and vector control. *Emerg Infec Diseases* 4: 605-613.
- Brooke BD, Hunt RH, Matambo TS, Koekemoer LL, Wyk PV, Coetzee M 2006. Dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in Ghana. *Med Vet Entomol* 20: 294-299.
- Brow AQ, Paul R 1971. Insecticide resistance in arthropods. World Health Organization, WHO Monogr Geneva Ser 38.
- Bustamante FM, Carvalho AG 1957. Observações sobre a ação dos inseticidas Dieldrin e BHC contra *Triatoma infestans* no interior das habitações. *Rev Bras Malariol* 9: 305-3111.

- Busvine J, Barnes M 1947. Observations on mortality among insects exposed to dry insecticidal films. *Bull Ent Res* 38:81-90.
- Carcavallo RU 1985. Sinopsis epidemiológica de la enfermedad de Chagas. In: Carcavallo, RU, Rabinovich JE, Tonn, RJ. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas: Tomo I – Epidemiología – Vectores. *Chagas* 2: 19-20.
- Carrilo SJ 1954. El empleo del Dieldrin en Venezuela. *Bol Of San Panam* 37:76-81.
- Casabe N, Zerba E 1981. Esterases of *Triatoma infestans* and its relationship with the metabolism of organophosphorous insecticides. *Comp Biochem Physiol* 68: 255-258.
- Cecchine G, Golomb BA, Hilborne LH, Spektor DM & Anthony CR. 2000. Pesticides. A review of the scientific literature as it pertains to Full War illnesses, Rand Corp Santa Monica CA 8. Disponível em: http://www.fulflink.osd.mil/library/randrep/pesticides_paper/index.html. Acesso em 19 Jul 2012.
- Cercere MC, Vazquez-Prokopec GM, Gürtler RE, Kitron U 2006b. Reinfestation sources for Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, Argentina. *Emerging Infectious Diseases* 12: 1096-1102.
- Cercere MC, Vazquez-Prokopec GM, Gürtler RE, Kitron U 2004. Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) following insecticide spraying in a rural community in a Northwestern Argentina. *Am Trop Med Hyg* 71: 803-810.
- Champ BR, Dyte K. 1976. FAO global survey of pesticide susceptibility of Stored Grain Pests. FAO/UN, Rome.
- Chang C, Shen WK, Wang TT, Lin YH, Hsu EL, Dai SM 2009. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology In Press, Accepted Manuscript*.
- Clarke KC; Osleeb JR; Sherry JM.; Meert JP; Larsson RW 1991. The use of remote sensing and geographic information systems in UNICEF dracunculiasis (Guinea worm) eradication effort. *Prev Vet Med* 11: 229-235.
- Cockburn JM 1972. Laboratory investigations bearing on possible insecticide resistance in triatomine bugs. WHO/72.359.
- Consenso Brasileiro em Doença de Chagas 2005. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. *Rev Bras Med Trop* 38: 1-29.
- Costa J & Felix M, 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 87-90.
- Costa J, Argolo A, Felix M, 2006. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1385: 47-58.
- Coura JR, Barret TV, Arboleda-Naranjo M 1994. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica? *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 251 - 253.
- Coura JR, Dias JCP 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 31-40.

- Coura JR, Viñas PA 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* (Chagas Disease Outlook): S6-S7.
- D'Amato C, Torres JPM, Malm O. 2002. DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. *Química Nova* 25: 995-1002.
- Davies TG, Field LM, Usherwood PN, Williamson MS 2007. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Mol Biol* 16:361-375.
- Dennehy TJ, Granett J, Leigh TF 1983. Relevance of slide-dip and residual bioassay comparisons to detection of resistance in spider mites. *J Entomol* 76: 1225-1230.
- Deprés L, David JP, Gallet C 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol Evol* 22: 298-305.
- Develoux M, Lescure FX, Jaureguiberry S, Jeanne L D, Elghouzzi MH, Gay F, Paris L, Le Loup G, Danis M, Pialoux G 2010. Emergence of Chagas disease in Europe: description of the first cases observed in Latin American immigrants in mainland France. *Med Trop* 70: 38-42.
- Devonshire AL, Moores GD 1984. Characterization of the insecticide insensitive acetylcholinesterase: microcomputer-based analysis of enzyme inhibition in homogenates of individual house-fly (*Musca domestica*) heads. *Pestic Biochem Physiol* 21:341-348.
- Dias E 1957. Profilaxia da doença de Chagas. O hospital. 51: 53-67.
- Dias E, Pellegrino J 1948. Alguns ensaios com o “Gamexanne” no combate aos transmissores da doença de Chagas. *Brasil Medico* 62: 185-190.
- Dias E, Pinto OS, Pellegrino J, Castro JA 1952. Ensaio experimental de luta contra triatomíneos por meio de inseticidas de ação residual. *Rev Bras Malar Doen Trop* 4: 22-46.
- Dias FBS, Silva de Paula A, Belisário CJ, Lorenzo CM, Harry M, Diotaiuti L 2011. Influence of the palm tree species on the variability of *Rhodnius nasutus* Stal, 1829 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Infection, Genetics and Evolution* 11: 869-877.
- Dias JCP 2001. Doença de Chagas: ambiente, participação e Estado. *Cad Saúde Pública*. 17: 165-169.
- Dias JCP 2002. O controle da doença de Chagas no Brasil. In: Silveira AC. O controle da Doença de Chagas nos países do Cone Sul da América: uma iniciativa internacional. Organização Pan-Americana da Saúde / Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, 316pp.
- Dias JCP 2006. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cad Saúde Pública* 22: 2020-2021.
- Dias JCP 2009. Primórdios entomológicos. Assessoria de Comunicação Social/Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz Minas. Ago. 2009. Disponível em <http://www.cpqrr.fiocruz.br>. Acesso em 21 Dez 2009.
- Dias JCP, 2000. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*, 2. ed. Rio Janeiro, Guanabara Koogan, 48-74 pp.
- Dias JCP, Garcia ALR. 1976. Vigilância epidemiológica com participação comunitária. *Rev Inst Educ Saud*. 19: 29-44.

Dias JCP, Machado EMM, Borges EC, Moreira EF, Gontijo C, Azeredo BVM 2002. Doença de Chagas em Lassance, MG. Reavaliação Clínico - epidemiológica 90 anos após a descoberta de Carlos Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*, 35: 167-176.

Dias JCP, Shofield CJ 1999. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas Discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 103-121.

Dias JCP, Bastos C, Araujo E, Mascarenhas AV, Netto EM, Grassi F, Silva M, Tatto E, Mendonça J, Araujo RF, Shikanai –Yasuda MA, Aras R 2008. Acute Chagas disease associated with oral transmission. *Rev Soc Bras Med Trop*. 41: 296-300.

Ding Y, Ortelli F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics* 4: 35.

Diotaiuti L 1997. Alterações ambientais e a colonização peridomiciliar pelo *Triatoma sordida* no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Acta Toxicol Argent* 5: 15-62.

Diotaiuti L, Azeredo BVM, Busek SCU, Fernandes AJ 1998. Controle do *Triatoma sordida* no Peridomicílio Rural do Município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil. *Rev Pan Salud Pública*, 3: 21-25.

Diotaiuti L, Bezerra CM, Ferraz ML, Gomes A 2009. Transmissão do *Trypanosoma cruzi* por espécies secundárias. In: 25ª REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS/13ª REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM LEISHMANIOSES. *Rev Soc Bras Med Trop* 42:81-82

Diotaiuti L, Carneiro M, Loiola CCP, Silveira Neto HV, Coutinho RM, Dias JCP 1988. Alternativa de controle do *Triatoma sordida* no triângulo mineiro. I. Borrifação parcial (intradomicílio) no município de Douradoquara, MG, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 21: 199-203.

Diotaiuti L, Dias JCP 1988. O peridomicílio no controle vetorial da doença de Chagas, com especial referência ao *Triatoma sordida* em Minas Gerais. In: Resumos da V Reunião de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas, Araxá p.79.

Diotaiuti L, Paula OR, Falcão PL, Dias JCP 1994. Evaluation of the Chagas disease vector control program in Minas Gerais, Brasil, with special reference to *Triatoma sordida*. *Bull Pan Americ Health Organization*; 28: 211-219.

Diotaiuti L, Pereira AS, Loiola CF, Fernandes AJ, Schofield JC, Dujardin JP, Dias JCP, Chiari E 1995. Inter-relation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 90: 443-448.

Diotaiuti L, Pinto CT 1991. Suscetibilidade biológica do *Triatoma sordida* e *Triatoma infestans* a deltametrina e lambdacyalotrina em condições de campo. *Rev Soc Bras Med Trop*, 24: 151-155.

Diotaiuti L, Ribeiro de Paula AO, Falcão PL, Dias JCP 1997. Avaliação do programa de Controle da Doença de Chagas em MG, Brasil com referência especial ao *Triatoma sordida*. *Bol Oficina Saint Panam* 118: 211-219.

Diotauti L, Loiola CF, Falcão PL, Dias JCP 1993. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop* 35: 237-245.

- Dong K, Scott JG 1994. Linkage of KDr-type resistance and para-homologous sodium channel genes in German cockroaches (*Blattella germanica*). *Insect Biochem Mol Biol* 24: 647-654.
- Enayati AA, Ranson H, Hemingway J 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol* 14: 3-8.
- Excoffier L, Lawlor S, Schneider S 2005. Arlequin ver.3.0: An integrated software package for population genetics data analysis.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Fabro J, Sterkel M, Capriotti N, Mougabure-Cueto G, Germano M, Rivera-Pomar R, Ons S 2012. Identification of a point of mutation associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas disease. *Infection, Genetics and Evolution* 12:487-491
- Farham AW, Murray AWA, Sawicki RM, Denholm I, White JC 1987. Characterization of the structure activity relationship of kdr and two variants of super Kdr to pyrethroids in the housefly (*Musca domestica*). *Pestic Sci* 19:209-220.
- Ferreira ILM, Silva TPT 2006. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 507-509.
- Feyereisen R 1999. Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol* 44:507-533.
- Fitzpatrick S, Feliciangeli MD, Sanchez-Matin MJ, Moteiro FA, Miles MA, 2008. Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. *Plos Negl Trop Dis.* 2: 1-16.
- Fitzpatrick S, Watt PC, Feliciangeli MG, Miles Ma, Kemp SJ 2009. A panel of ten microsatellite loci for Chagas disease vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution* 9:206-209.
- Focioli D, Frey B, Frey JE 2002. High nucleotide diversity in the para-like voltage-sensitive sodium channel gene sequence in the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *J Econ Entomol* 95: 838-848.
- Forattini, OP 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saúde Pública* 14: 265–299.
- Forattini OP, Ferreira OA, Rocha E Silva EO, Rabello EX 1975. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. VII-Permanência e mobilidade do *Triatoma sordida* em relação aos ecótopos artificiais. *Rev Saúde Publica* 9: 467- 476.
- Forattini OP, Rocha E Silva EO, Ferreira OA, Rabello EX, Pattoli D 1971. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase Americana: III – Dispersão local de triatomíneos, com especial referência a *Triatoma sordida*. *Rev Saúde Pública* 5: 193 – 205.
- Forattini OP; Ferreira OA; Silva EOR, Rabello EX 1974. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. IV. Persistência do *Triatoma sordida* após alteração ambiental e suas possíveis relações com a dispersão da espécie. *Rev Saude Publ* 8: 265-282.

Forattinni OP; Ferreira OA; Silva EOR; Rabello EX & Santos JF 1971. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana. II. Distribuição e dispersão local de triatomíneos em ecótopos naturais e artificiais. *Rev Saude Publ* 5: 163-191.

Fox I, Bayona IG, Orozco HI 1966. The toxicity of DDT, Dieldrin, Malathion, and Fenthion to *Rhodnius prolixus* in the laboratory. *Bull Wld Hlt Org* 35: 974-976.

Frova C 2006. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol Eng* 23(4): 149-69.

Fukuto TR 1990. Mechanism, of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect* 87: 245-254.

Fundação Nacional de Saúde. 1995 Coordenação de Minas Gerais. Relatório Técnico.

Galvão C, Carcavallo R, Silva Rocha D, Jurberg J 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202, 1-36.

Garcia BA, Zheng LO, Perez de Rosas AR, Segura EL 2004. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite locus in the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mol Ecol Notes* 4: 568-571.

Garcia GP, Flores AE, Fernandez-Salas I, Saavedra-Rodrigues K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, Guillermo Bond J, Casas-Martinez M, Ramsey JM, Garcia-Rejon J, Dominguez-Galera M, Ranson H, Hemingway J, Einsen L, Black 4th WC 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *Plos Nel Trop Dis* 3:531.

Georghiou GP 1994. Principles of insecticide resistance management. *Phytoprotection* 75: 51-59.

Georghiou GP, Wirth M, Tran H, Saume F, Knudsen AB 1987. Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Caribbean area and neighboring countries. *J Med Entomol* 24: 290-294.

Germano MD, Acevedo GR, Mougabure Cueto GA, Toloza AC, Vassena CV, Picollo MI. 2010. New findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from the Gran Chaco. *Journal of Medical Entomology* 47: 1077-1081.

Germano MD, Vassena CV, Picollo MI 2010. Autosomal inheritance of deltamethrin resistance in field populations of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from Argentina. *Pest Manag Sci* 66: 705-708.

Gerold P 1969. Mode of entry of contact insecticides. *J Insect Physiol* 563-580.

Giordano R, Cortez JCP, Paulk S, Stevens L 2005. Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolívia base don the mitochondrial cytochrome b gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 753-760.

Glynn P 1999. Neuropathy target esterase. *Biochem J* 344: 625-631.

Golden Gate Weather Services 2008. Disponível em: <http://ggweather.com/enso/oni.htm>. Acessado em 09 de junho de 2012.

Goodland RJA, Ferri MG 1979. Ecologia do cerrado. Belo Horizonte: Itatiaia, 193p.

- Goetz SJ, Prince SD & Small J 2000. Advances in satellite remote sensing of environmental variables for epidemiological applications. *Adv Parasitol* 47: 289-304.
- González-Audino P, Barrios S, Vassena C, Cueto GM, Zerba E, Picollo MI 2005. Increase monooxygenase activity associated with resistance to permethrin in *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *J Med Entomol* 42: 342 – 345.
- González-Audino P, Vassena C, Barrios S, Zerba EN, Picollo MI 2004. Role of Enhanced Detoxication in a Deltamethrin-resistant Population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 335-339.
- González-Valdivieso FE, Diaz BS, Nocerino F 1971. Susceptibility of *Rhodnius prolixus* to chlorinated hydrocarbon insecticides in Venezuela. WHO/VBC/71.264.
- Goodman - Gilman S, Brunton LL, Lazo JS, Parker KL 2006. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11. ed. New York: E. McGraw-Hill.
- Gorla D, Schorfield C 1989. Population dynamics of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in the Argentine chaco. *Med Vet Entomol* 3: 179-184.
- Gorla D 1991. Recovery of *Triatoma infestans* populations after insecticide application: an experimental field study. *Med Vet Entomol* 53: 311-324
- Gorla D 1994. Perspectivas biológicas y ecológicas para el desarrollo de resistencia en triatominos. *Acta Toxicol Argent* 2: 48-51.
- Gorla DE, Catalá SS, Grilli MP 1997. Efecto de la temperatura sobre la distribución de *Triatoma infestans* y el riesgo de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Argentina. *Acta Toxicol Argent* 5: 15-62.
- Gorla DE, Dujardin JP, Schofield CJ 1997. Biosystematics of old world Triatominae. *Acta Trop* 63: 127–140.
- Grant IH, Gold JW, Winter M 1987. Transfusion associated acute Chagas disease acquired in the United States. *Ann Intern Med* 111: 849-851.
- Grisson R, Konno TRR, Motoyama N, Dauterman WC 1989. Comparison between in vivo and in vitro cutaneous penetration of fenvalerate in tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 82: 41-44.
- Guglielmo AA, Castelli ME, Volpogni MM, Ansiani OS, Mangold AJ 2002. Dynamics of cypermethrin resistance in the field in the horn fly *Haematobia irritans*. *Med Vet Entomol* 16: 310-315.
- Gustafson EJ & Gardner RH 1996. The effect of landscape heterogeneity on the probability of patch colonization. *Ecology* 77, 94-107.
- Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Med Vet Entomol* 14: 181-189.
- Harry M, Dupont L, Quartier M, Diotaiuti L, Walter A, Romana C 2009. New perspective for population genetics of Chagas disease vectors in the Northeastern Brazil: isolation of polymorphic microsatellite markers in *Triatoma brasiliensis*. *Infection, genetics and evolution* 9: 633-637

- Harry M, Dupont L, Romana C, Demanche C, Mercier A, Livet A, Diotaitui L, Noireau F, Emperaire L 2008. Microsatellite markers in *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), Chagas`disease vector in Brasil. *Infection, Genetic and Evolution*. 8: 672-5.
- Harry M, Poyet G, Romana CA, Solignac M 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens*. *Mol Ecol* 7: 1784-1786.
- Harry M, Roose CL, Vautrin D, Noireau F, Romana CA, Solignac M 2008. Microsatellite markers from the Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) and their applicability to *Rhodnius species*. *Infect Genet Evol* 8: 381-385.
- Hayes JK, Flanagan JU E Jowsey IR 2005. Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88.
- He H, Chen AC, Davey RB, Ivie GW, George JE 1999. Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochem Biophys Res Commun* 261: 558-561.
- Head DJ, McCaffery AR, Cllaghan A 1998. Novel mutations in the para-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in Heliothine Lepidoptera. *Insect Mol Biol* 7: 191-196.
- Hemingway J, Hawkes LM, Ranson H 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 653-665.
- Hemingway J, Ranson H 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 45:371-91.
- Hemingway J, Small GJ, Monro A, Sawyer BV 1992. Insecticide resistance gene frequencies in *Anopheles sacharovi* populations of the Çukurova plain, Andana Province, Turquia. *Med Vet Entomol* 6: 342-348.
- Hollingworth RM 1969. Dealkylation of Organophosphorus Esters by Mouse Liver Enzymes in Vitro and in Vivo. *J Agric Food Chem* 17: 987-966.
- Hotelier T, Renault L, Cousin X, Negre V, Marchot P, Chatonnet A 2004. Esther, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Res* 32: 145-147.
- Huchard E, Martinez M, Alout H, Douzery EJ, Lutfalla G, Berthomieu A, Berticat C, Raymond M, Weill M 2006. Acetylcholinesterase resistance genes which Diptera: takeover and loss in true flies. *Proc Biol Sci* 273: 2595-604.
- Hugh-Jones, M 1989. Applications of Remote Sensing to the identification of the habitats of parasites and disease vectors. *Parasitol Today* 5: 244-251.
- Hunaiti AA, Elbetieha AM, Obeidat MA, Owais WM 1995. Developmental studies on *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase and its induction by oxadiazolone. *Insect Biochem Mol Biol* 25:1115-9.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 1992. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em 15 Abr 2009.
- Ingles PJ, Adams PM, Knippl DC, Soderlund DM 1996. Characterization of voltage sodium channel gene coding sequences from insecticide-susceptible and knockdown-resistant house fly strains. *Insect Biochem Mol Biol* 26: 319-326.

- Kakani EG, Bon S, Massoulié J, Mathiopoulos KD. 2011. Altered CPI modification of insect AchE improves tolerance to organophosphate insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 41: 150-8.
- Karunaratne SHPP, Hemingway J 2000. Insecticide resistance spectra and resistance mechanisms in populations of Japanese encephalitis vector mosquitoes, *Culex tritaeniorhynchus* and *Cx gelidus*, in Sri Lanka. *Med Vet Entomol* 14:430-436.
- Kasai S, Komaga O, Okamura Y & Tomita T 2009. Alternative splicing and developmental regulation of glutathione transferases in *Culex quinquefasciatus* Say *Pest Biochem Physiol* 94: 21-9.
- Kirchhoff LV, Gam AA, Gillam F 1987. American trypanosomiasis (Chagas disease) in Central American immigrants. *Amer J Trop Med Hyg* 82: 915-920.
- Kumar S, Thomas A, Sahgal A, Verma A, Samuel T, Pillai MKK 2002. Effect of the synergist, piperonyl botoxide, on the development of deltamethrin resistance in yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 50: 1-8
- Labbe P, Berticat C, Berthomieu A, Unal S, Bernard C, Weill M, Lenormand T 2007. Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*. *Plos Genet* 3: 2190-2199.
- Lainson R, Shaw JJ, Frahia H, Miles MA, Draper CC 1979. Chaga's disease in Amazon Basin I. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará, north Brazil. *Trans Royal Soc Med Trop Hyg* 73: 193-204.
- Lardeux F, Depickère S, Cuchon S, Chaves T 2010. Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. *Tropical Medicine and International Health* 15: 1037-1048.
- Lee SH, Dunn JB, Clark JM, Soderlund DM 1999. Molecular analysis of Kdr-like resistance in a permethrin-resistant strain of Colorado potato beetle. *Pestic Biochem Physiol* 63: 63-75.
- Lee SH, Gao JR, Yoon KS, Mumcuoglu KY, Taplin D, Edman JD, Takano-Lee M, Clark M 2003. Sodium channel mutations associated with Knockdown resistance in the human head louse, *Pediculus capitis* (De Geer). *Pestic Biochem Physiol* 75: 79-91.
- Lee SH, Yoon KS, Williamson MS, Goodson SJ, Takano Lee M, Edman JD, Devonshire AL, Clark JM 2000. Molecular analysis of Kdr-like resistance in permethrin-resistant strains of head lice. *Pediculus capitis*. *Pestic Biochem Physiol* 66: 130-143.
- Lenormand T, Bouguet D, Guillemaud T, Raymond M 1999. Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Nature* 400: 861-4.
- Lenormand T, Raymond M 2000. Analysis of clines eighth variable selection and variable migration. *AM Nat* 155: 70-82.
- Lent H & Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Amer Mus Nat Hist*. 163. New York.
- Lent H, Oliveira SJ 1944. Nota preliminar sobre a ação do DDT (dicloro-difeniltricloetana) em insetos transmissores da doença de Chagas. *Rev Bras Biol* 4: 329-331.
- Lesueur D, Binka F, Lengeler C, DE Savigny D, Snow B, Teuscher & Touré Y 1997. An atlas of malaria in Africa. *Afri Health* 19: 23-24.

- Li V, Schuler MA, Berenbaum MR 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Ann Rev Entomol* 52:231-53. Review.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-2465.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E 2004. Microsatellites within genes: Structure, function and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21: 991-1007.
- Lima JB, Da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AK, Soares SS, Braga IA, Ramos RP, Valle D 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 68: 329-333
- Lima JTF 1983. Incremento do programa de controle da doença de Chagas no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 16: 128 - 129.
- Lines JD, Myamba J, Curtis CF 1987. Experimental hut trials of Permethrin-impregnated mosquito nets and curtains against Malaria vectors in Tanzania. *Med Vet Entomol* 1: 37-51.
- Liu Z, Valles SM, Dong K 2000. Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (Kdr) pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 991-997
- Lockwood JA, Sparks TC, Soty RN 1984. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. *Bull Entomol Soc Ame* 30: 41-51.
- Lofgren CS, Keller JC, BurdeN GS 1958. Resistance tests with the bed bugs and evaluation of insecticides for its control. *J Econ Entomol* 51: 241-244.
- Lumjuan N, Stevenson BJ, Prapanthadara LA, Somboon P, Brophy PM, Loftus BJ, Severson DW E Ranson H 2007. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochem Mol Biol* 37:1026-1035.
- MacElwe JJ, Schuster E, Blanc E, Piper Md, Thomas JH, Patel DS, Selman C, Withers DJ, Thornton JM, Partridge L, Gems D 2007. Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genome Biol* 8:R132.
- Magnin M, Marboutin E, Pasteur N 1988. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in West Africa. *J Med Entomol* 25: 99-104.
- Maibèche-Coisne M, Merlin C, François MC, Porcheron P, Jacquin-Joly E 2005. P450 and P450 reductase cDNAs from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male antennae. *Gene* 346: 195-203.
- Marcet PL, Lehmann T, Groner G, Gurtler RE, Kitron U, Dotston EM 2006. Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution* 6: 32-37.
- Mariconi FA. Inseticidas e seu emprego no combate às pragas. Agron Ceres Ltda. 2ed, São Paulo, 1963.
- Martínez E, Chávez T, Sossa D, Aranda R, Vargas B, Vidaurre P 2007. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. *Bol Inst Invest Salud y Desarrollo* 3: 1-11.

- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (Kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 7: 179-184.
- Martinez-Torres D, Chevillon C, Brun-Barale A, Bergé JB, Pasteur N, Pauron D 1999a. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L. mosquitoes. *Pestic Sci* 55: 1012-1020.
- Martinez-Torres D, Devonshire AL, Williamson MS 1997. Molecular studies of knockdown resistance to pyrethroids: Cloning of Domain II Sodium Channel Gene Sequences from Insects. *Pestic Sci* 51: 265-270.
- Martinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Devonshire AL, Williamson MS 1999b. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Mysus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molec Biol* 8: 339-346.
- Martins AJ, Lima LB, Peixoto AA, Valle D 2009. Frequency of Val1010Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Trop Med Int Health* 14: 1351-1355.
- Martins AJ, Lins RMMA, Linss JCB, Peixoto AA, Valle D 2009. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *Am J Trop Med Hug* 81: 108-115.
- Martins Junior A, Lima JB, Peixoto AA, Valle D 2009. Frequency of Val 1016 Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Tropical Medicine and International Health*. 14: 1351-1355.
- Matambo TS, Abdalla H, Brooke BD, Koekemoer LL, Msnzava A, Hunt RH, Cotzee M 2007. Insecticide resistance in the malarial mosquito *Anopheles arabiensis* and association with the kdr mutation. *Med Vet Entomol* 21: 97-102.
- Mathenge EM, Gimning JE, Dolczak M, Ombok M, Irungu LW, Hawley WA 2001. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behaviour, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. *J Med Entomol* 38: 531-536.
- Matins AJ, Belinato TA, Lima JB, Valle D 2008. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Pest Manag Sci* 6: 676-680
- Matsumura F 1963. The permeability of the cuticle of *Periplaneta Americana* (L.) to malathion. *J Insect Physiol* 9:207-221.
- Mbogo CNM, Baya NM, Ofulla AVO, Githure JI, Snow RW 1996. The impact of permethrin-impregnated bednets on Malaria vectors of the Kenyan coast. *Med Vet Entomol* 10: 251-259.
- Ministério da Saúde. Manual de Normas Técnicas da Campanha de Controle da doença de Chagas. Brasília: Superintendência de campanhas de saúde pública; 1980.
- Ministério da Saúde. Superintendência de campanhas de saúde pública. O controle das endemias no Brasil de 1979 a 1984. Brasília, DF; 1985.

- Miyazaki M, Ohyama K, Dumlap DY, Matsumura F 1996. Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet.* 252: 61-68.
- Moncayo A, Silveira AC 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 17 - 30.
- Monteiro FA, Pérez R, Panzera F, Dujardin JP, Galvão C, Rocha D, Noireau F, Schofield C, Beard CB 1999. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:229-238.
- Montella IR 2008. Estudos dos mecanismos bioquímicos da resistência a inseticidas em diferentes populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) do Brasil, PhD Thesis, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 92 pp.
- Montella IR, Chama R, Valle D 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107 (4) : 437-449.
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA, Valle D 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467-77.
- Moreno AR, Carcavallo RU 1998. Enfoque ecológico para epidemiologia da doença de Chagas. In: Atlas of Chagas Disease Vectors on the Americas. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Morin S, Williamson MS, Goodson SJ, Brown JK, Tabashnik BE, Dennehy TJ 2002. Mutations in the *Bemisia tabaci* for sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochem Mol Biol.* 32: 1781-1791.
- Mouganbure Cueto G, Zerba E, Picollo MI 2005. Biological effect of 1-dodecanol in teneral and post-teneral *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 59-61.
- Myamba J, Maxwell CA, Asidi A, Curtis CF 2002. Pyrethroid resistance in tropical bedbugs, *Cimex hemipterus*, associated with use of treated bednets. *Med Vet Entomol* 16:448-451.
- Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwatta Y, Hidoh O, Harada S, Kasai S, Severson DW, Kono Y, Tomita T 2004. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 794-801.
- Nardini M, Dijkstra BW 1999. α/β Hydrolase Fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* 9:732-737.
- Nelson MJ, Colmenares P 1979. Topical application of insecticides to *R. prolixus* (Reduviidae: Triatominae) a Chagas disease vector. *Document WHO/BVC/79.737. Geneva, WHO.*
- Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo WN 2009. Oral transmission of Chagas Disease by consumption of açai Palm Fruit, Brasil. *Emerging Inf Diseases* 15: 653 - 655.
- Nocerino F, Hernández A 1986. Establishment of baseline data on the insecticide susceptibilities of the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus* in Venezuela. *PAHO Bull* 20: 366 – 369.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Santos, FB, Araujo ESM, Filippis AMB, Souza RV, Zagne SMO, Nicolai C, Baran M, Teixeira-Filho G 1999. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil 1986 – 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 297 – 304.

Oakeshott JC, Johnson RM, Berenbaum MR, Ranson H, Cristino AS, Claudianos C 2012. Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol Biol* 19: 147-63.

Oakeshott JC, Papenrecht EA, Boyce TM, Healvy MJ, Russel RJ 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica* 36: 9-10.

Oakeshott JG, Johnson RM, Berenbaum MR, Ranson H, Cristino AS, CLaudianos C 2010. Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol Biol* 19: 147-63.

Obara MT, Barata JMS, Silva NNDA, Ceretti JR. W, Urbinatti PR, Rosa JA, Jurberg J, Galvão C 2007. Estudo de ovos de quatro espécies do gênero *Meccus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), vetores da doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 13-19.

Obara MT. 2010. Caracterização de resistência a inseticidas em populações da subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vetores de *Trypanosoma cruzi*, Chagas, 1909. Tese de doutorado. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP. 246p.

Oliveira EJ, Padua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 29: 294-307.

Omumbo JA, Hay SI, Goetz RWS, Rogers DJ 2002. Updating historical maps of malaria transmission intensity in East Africa using remote sensing. *Photogramm Eng Remote Sensing*, 68: 161-166.

OPAS – Organização Pan Americana de Saúde 2006. 2º Reunião da Inicitativa Intergovernamental de Vigilância e Prevenção da doença de Chagas na Amazônia. Caiena/Guiana Francesa. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 311- 317.

Pacheco IA, Sartori MR, Bolonhezi I 1990. Resistance to Malathion, Pirimiphos-methyl and Fenitrothion in coleoptera from stored grains. Proceedings of the 5th International Working Conference on Stored Product Protection (Ed. By Working Conference on Stored Product). p.1029-1037.

Park Y, Taylor MFJ, Feyereisen R 1999. Voltage-gated sodium channel genes hscp and hDSC1 of *Heliothis virescens* F.genomic organization. *Insect Mol Biol* 8: 161-170.

Pedreira De Freitas JL 1963. Importância do expurgo seletivo dos domicílios e anexos para profilaxia da moléstia de chagas pelo combate aos triatomíneos. *Arq Hig Saúde Públ* 28: 217-272.

Pedrini N, Mijailovsky SJ, Girotti JR, Stariolo R, Cardozo RM, Gentile A, Juarez MP 2009. Control of Pyrethroid-Resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *PLOS Negl Trop Disease* 3: 1 – 11

Penteado PR, KavalcoKF, Pazza R 2011. Amplificação cruzada de seis *loci* microsatélites isolados de *Astyanax mexicanus* para espécies do gênero com distribuição sul americana. *Evolução e Conservação da Biodiversidade* 2: 2-15.

- Pereira da Cunha M, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Osw Cruz* 100: 441-444.
- Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA 2009. Chagas disease as a foodborne illness. *J Food Prot* 72: 441-446.
- Perez AR, Segura EL, Fichera L, Garcia BA 2008. Macrogeographic and microgeographic genetic structure of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Catamarca, Argentina. *Genetica* 133: 247-260.
- Perez de Rosas AR, Segura EL, García BA 2007. Microsatellites analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas disease vector control programmes. *Mol Ecol* 16: 1401-1412.
- Perlowagora-Szumlewicz A 1956. A eficácia do expurgo domiciliário com dieldrin no controle do vetor da doença de Chagas. *Rev Bras Malar Doen Trop* 8: 289- 304.
- Pessoa GCA 2008. *Monitoramento da suscetibilidade ao piretróide deltametrina em populações de Triatoma sordida Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae)*, Dissertação de Mestrado, Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte. 95pp.
- Picollo MI, Cueto GM, Vassena C, Santo Orihuela P, Toloza A, Germano M 2011. Estado actual de la Resistencia a insecticidas en *Triatoma infestans* del cono sur. Centro de Investigaciones dem Plagas e Insecticidas (CONICET_CITEFA). Juan B. de La Salle 4397 (1603). Província de Buenos Aires, Argentina.
- Picollo MI, Vassena C, Orihuela PS, Barrios S, Zaidemberg M, Zerba E 2005. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol* 42: 637-642.
- Pinchin R, Fanara DM, Oliveira Filho AM 1984. A village scale trial of Pirimiphos-methyl (OMS 1424), wettable power and slow-release formulations, in comparison with HCH for the controle of *Triatoma infestans* in Brazil. *World Health Org.*, VBC/82.840, 8ps.
- Pinchin R, Oliveira Filho AM, Pereira ACB 1980. The flushing-out activity of pyrethrum and synthetic pyrethroids on *Panstrongylus megistus*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 74:801-803.
- Pinto J, Lynd A, Elissa N, Donnelly MJ, Costa C, Gentile G, Caccone A, Do R, V 2006. Co-occurrence of East and West African kdr mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon. *Med Vet Entomol* 20: 27-32
- Pinto OS, Bicalho JC 1952. Profilaxia da doença de Chagas no Estado de Minas Gerais por meio de inseticidas. *Rev Bras Malar Doen Trop* 4: 145-156.
- Pittendrigh B, Reenan R, French-Constant RH, Ganezky B 1997. Point mutations in the *Drosophila* sodium channel gene for associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet* 256: 602-610.
- Pizarro JC, Gilligan LM, Stevens L 2008. Microsatellites reveal a high population structure in *Triatoma infestans* from Chuquisaca, Bolivia. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2:1-8.
- Pongjaroenkit S, Jirajaroenrat K, Boonchaay C, Chanama U, Leetachewa S, Prapanthadara L, Ketterman AJ 2001. Genomic organization and putative promoters of highly conserved

glutathione S-transferases originating by alternative splicing in *Anopheles dirus*. *Insect Biochem Mol Biol* 31:75-85.

Porcasi X, Catala SS, Hellac H, Scavuzzo MC, Gorla DE 2006 Infestation of rural houses by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Southern Área of Gran Chaco in Argentina. *Journal of Medical Entomology* 43:1060-1067.

Rajatileka S, Black WC, Assacedra-Rodriguez K, Trongtokit Y, Apiwathnasorn C, McCall PJ, Ranson H 2008. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in thai populations of *Aedes aegypti*. *Acta Trop*. 108: 54-57.

Ranson H, Clauyadianos C, Orтели F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereinsen R 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298:179-181.

Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyn *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol* 9: 491-497.

Rassi-JR A, Rassi A, Marin-Neto JA 2010. Chagas disease. *Lancet* 375: 1388-1402.

Rawlins A, Wan JH 1995. Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *J Amer Mosq Control Assoc* 11: 59-65.

Reyes M, Angulo VM, Sandoval CM 2007. Efecto tóxico de beta-cipermetrina, deltametrina y fenitrotión en cepas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae). *Biomédica* 27

Richer W, Kengne P, Cortez MR, Perrineau MM, Cohuet A, Fontenille D & Noireau F 2007. Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes. *Tropical Medicine and International Health* 12:759-764.

Riviero A, Véxilier J, Weill M, Read Af, Gandon S 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: ehen is insecticide resistance a problem? *Plos Pathog* 6(8): e10010000.

Roberts DR, Alecrim WD 1991. Response of *Anopheles darlingi* to spraying with DDT in Amazonas, Brazil. *Bull of PAHO* 25: 210-217.

Rocha & Silva EO 1979. Profilaxia. In: Brener Z, Andrade Z. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, Guanabara Koogan. 463pp.

Rodriguez MM, Bisset JA, Mila LH, Calvo E, Diaz C, Soca LA 1999. Levels of insecticide resistance and its mechanisms in a strain of *Aedes aegypti* of Santiago de Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 51:83-88.

Rogers DJS; Hay SI & Packer MJ 1996. Predicting the distribution of tse flies in West África using temporal Fourier processed meteorological satellite data. *Ann Trop Med Parasitol* 90: 225-241.

Rojas de Arias A, Lehane MJ, Schofield CJ, Fournet A 2003. Comparative Evaluation of Pyrethroid Insecticide Formulations against *Triatoma infestans* (Klug): Residual Efficacy on Four Sunstrates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 975-980.

Saavedra-Rodriguez K, Suarez AF, Salas IF, Strode C, Ranson H, Hemingway J, Black IV WC 2011. Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* online: doi: 10.1111/j.1365-2583.2011.01113.x.

Salgado AP, Pinto OS 1952. Levantamento dos triatomíneos domiciliários como trabalho preliminar a um programa profilático contra a doença de Chagas. *Rev Bras Malariol Doencas Trop* 4:88-96.

Sandoval CM, Joya MI, Gutierrez R, Angulo VM, 2000. Cleptohaematophagy of the triatomine bug *Belminus herreri*. *Med Vet Entomology* 14: 100-101.

Santo Orihuela PL, Vassena CV, Zerba EN, Picollo MI 2008. Relative Contribution of Monooxygenase and Esterase to Pyrethroid Resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol* 45:298-306.

Santo Orihuela PL & Picollo MI 2011. Contribution of general esterases to pyrethroid resistant *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *Acta Toxicol. Argent.* 19 (1): 32-40.

Satoh T, Hosokawa M 2006. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chem Bio Interact* 162: 195-211.

Schatzmayer HG 2000. Dengue situation by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 179 – 181.

Schofield C 1989. The evolution of insecticide resistance: have the insects won? *Trends Ecol Evol* 4: 336-340.

Schofield CJ, 1994. *Triatominae: Biología y Control*. Eurocommunica Publications: United Kingdom, 80pp.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 22: 583-588.

Schofield CJ; Diotaiuti L; Dujardin JP 1999. The process of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 375-378.

Scholotterer C 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.

Schuler TH, Martinez-Torres D, Thompson AJ, Denholm I, Devonshire AL, Duce IR, Williamson MS, 1998. Toxicological electrophysiological and molecular characterization of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamond back moth *Plutella xylostella* (L.). *Pestic Biochem Physiol* 59: 169-192.

Scott JG 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 757-77.

Sfara V, Zerba EM, Algozagay RA 2006. Toxicity of pyrethroids and repellency of diethyltoluamide in two deltamethrin-resistant colonies of *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101: 89 – 94.

Shaw J, Lainson R, Friha H 1966. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev Saúde Públ* 3: 153-157.

- Sheenan D, Meade G, Floley VM, Dowd CA 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360: 1-16.
- Shenone H, Zomosa E, Villarroel F, Rojas A, Alfaro E, Queiroz M 1972. Acción de 7 formulaciones de insecticidas sobre *Triatoma infestans* criados em laboratório. *Biol Chileno Parasit* 27:14-22.
- Sherlock I, Muniz TM 1975. Combate ao *Panstrongylus megistus* com o malathion concentrado. *Rev Soc Bras Med Trop* 9: 289-296.
- Sherlock I, Muniz TM, Guitton N 1976. A ação do malathion sobre os ovos de triatomíneos vetores de doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 10: 77-84.
- Silveira AC 2000. Profilaxia Doença de Chagas. In Brener Z, Andrade Z, Barral-Neto M, *Trypanozoma cruzi e Doença de Chagas*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2 ed, p.75-87.
- Silveira AC, Souza PC, Silveira Neto HV 1993. Importância de espécies secundárias de triatomíneos na transmissão domiciliar da doença de Chagas no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. In: XXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Fortaleza, p.200.
- Silveira AC, Vinhaes MC 1998. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 50-60.
- Silvori JL, Casabé NB, Woode EJ 1997. Glutathione S-transferases in non-vertebrates and mammals. Its role in detoxifying insecticides. *Acta Bioqu Clin Latinoamericana*, *in press*.
- Singh M, Silva E, Schulze S, Sinclair DA, Fitzpatrick HA, Honda BM 2000. Cloning and characterization of a new theta-class glutathione-S-transferase (GST) gene, *gst-3*, from *Drosophila melanogaster*. *Gene* 247(1-2):167-73.
- Sonoda IV, Dias LS, Bezerra CM, Dias JPC, Romanha AJ, Diotaituti L 2010. Susceptibility of *Triatoma brasiliensis* from state of Ceará, Northeastern Brazil, to the pyrethroid deltamethrin. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105: 348-352.
- Soreq H & Seidman S 2001. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2:294-302.
- Souza AP, Jelicks LA, Tanowitz HB, Olivieri BP, Medeiros MM, Oliveira GM, Pires ARC, Santos AM, Araújo-Jorge TC 2010. The benefits of using selenium in the treatment of Chagas disease: prevention of right ventricle chamber dilatation and reversion of *Trypanosoma cruzi*-induced acute and chronic cardiomyopathy in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 746-751.
- Stark JD, & Banks JE 2003. Population level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annu Rev Entomol* 48: 505-519.
- Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne S, Hemingway J, Black WC E, Ranson H 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 113-123.
- Sugiura M, Horibe Y, Kawada H, Tabaki M 2008. Insect spiracle as the main penetration route of pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol* 91: 135-140.
- Tabashnik BE, Roush RT 1990. Introduction. In: Roush RT, Tabashnik BE, editors. *Pesticide resistance in arthropods*. New York: Chapman and Hall, p.1-3.

- Takahashi M, Yasutomi K 1987. Insecticidal resistance of *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) in Japan: genetics and mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides. *J Med Entomol* 24: 595-603.
- Tautz D, Scholotterer C 1994. Simple sequences. *Curr Op Gen Dev.* 4: 832-837.
- Teixeira A 2007. Doença de Chagas e evolução. 1ed. Brasília, DF: Editora UNB- Finatec, p. 304.
- Tolosa AC, Germano M, Cueto GM, Vassena C, Zerba E, Picollo MI 2008. Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instar of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol* 45: 421-426.
- Urbina JA & Docampo 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology* 19: 495-501.
- Valle D, Montella IR, Ribeiro RA, Viana-Medeiros PF, Martins AJ, Lima JBP 2006. Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticida em *Aedes aegypti*/ Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Publicação em parceria entre Fundação Oswaldo Cruz e Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro e Distrito Federal, Brasil, 128p.
- Vanessa CV, Picollo MI. Monitoreo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, insectos vectores de la enfermedad de Chagas. 2003. [on line 12 maio de 2007]. Disponível em: <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>
- Vassena CV, Cueto GM, Gonzalez-Audino P, Alzogaray RA, Zerba EN, Picollo MI 2003. Prevalence and levels of permethrin resistance in *Pediculus humanus capitis* (De Geer) (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires, Argentina. *J Med Entomol* 40: 447 – 450.
- Vassena CV, Picollo MI, Zerba EN 2000. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med Vet Entomol* 14: 51-55.
- Vazquez-Prokopec GM, Cercere MC, Canale DM, Gurtler RE & Kitron U 2005. Spatiotemporal patterns of reinfestation by *Triatoma guasayana* (Hemiptera: Reduviidae) in a rural community of Northwestern Argentina. *J Med Entomol* 42: 1-10.
- Villate F, Bachmann TT 2002. How many genes encode cholinesterase in arthropods? *Pestic Biochem Physiol* 73: 122 – 129.
- Villela MM, Souza JB, Mello VP, Azeredo BVM, Dias JCP 2005. Vigilância entomológica da doença de Chagas na região centro-oeste de Minas Gerais, Brasil, entre os anos de 2000 e 2003. *Cad Saúde Pública* 21: 878-886
- Wanderley DMC, Carvalho ME, Silva RA, Rodrigues VLCC, Barbosa GL, Curado I. Programa de Controle da doença de Chagas. Boletim Epidemiol Paulista: [ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/outros/suple1_sucen.pdf] 2006 [Citado em 19 Jul 2012] ISSN 1806-4272. 58p. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa37_suple.htm>
- Ware GW & Whitacre DM 2004. An introduction to insecticides (online): Minnesota. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>. Acesso em 19 Jul 2012
- Weill M, Berthomieu A, Berticat C, Lutfalla G, Negre V, Pasteur N, Phillips A, Leonetti JP, Fort P, Raymond M 2004. Insecticide resistance: a silent base prediction. *Curr Biol* 14: 552-3.

- Weill M, Duron O, Labbe, Berthomieu A 2003. La résistance Du moustique *Culex pipiens* aux insecticides 19: 1190-1192.
- Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc Biol Sci* 269:2007-16.
- Wheelock CE, Shan G, Ottea J 2005. Overview of carbonyl esterases and their role in the metabolism of insecticides. *J Pestic Sci* 30: 75-83.
- Wood EJ, Picollo DE, Villar MI, Melgar F, Zerba EN 1982. Mode of action of organophosphorus insecticides in *Triatoma infestans*. *An Assoc Quim Argent* 70: 801.
- World Health Organization 1981. Criteria and meaning of testes for determining the susceptibility or resistance of insects to insecticides. *VBC/81.6*.
- World Health Organization 1994. Taller sobre la evaluación de efecto insecticida sobre triatomíneos. In: Workshop on the insecticide effect evaluation in triatomíneos. Buenos Aires, Argentina. *Acta Toxicol Argentina*; 2 (1):29-33.
- World Health Organization 1991. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series 811, World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization 2002. Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 905:109.
- World Health Organization 2006. Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series Buenos Aires, p. 7.
- Wright S 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 19:395-420.
- Xu Q, Liu H, Zhang L, Liu N 2005. Resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, and possible mechanisms for resistance. *Pesticide and Management Science* 61: 1096-1102.
- Zerba EN 2002. Evolución del control químico y resistencia a insecticidas en triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas In: XI Reunión de INCOSUR/ Chagas, Asunción, Paraguay.
- Zerba EN, Picollo MI 2002. Resistencia a insecticidas piretroides en *Triatoma infestans*. Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN) CITEFA-CONICET. Buenos Aires, Argentina.
- Zhai J, Robinson WH 1992. Measuring cypermethrin resistance in the german cockroach (Orthoptera:Blattellidae). *J Econ Entomol*; 85(2):348-351.
- Zhu Y, Strassmann JE, Queller DC 2000. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Genetics Research* 76:227-236.
- Zlotkin E 1999. The insect voltage – gated sodium channel as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol* 44: 429-55.

ANEXO 1. Relatos na literatura de resistência de triatomíneos a inseticida.

Espécie	País	Município/Localidade	Inseticida	DL ₅₀	RR	RR ₅₀	RR ₉₀	Referência	
<i>T. infestans</i>	Argentina	LRS/CIPEIN	deltametrina	0,1 (0,12 - 0,15)	-	-	-	Germano et al., 2010	
		Salta/Salvador Mazza	deltametrina	31,1 (12,9 - 84,7)	133,1	-	-	Germano et al., 2010	
		Salta/Banda Sur	deltametrina	5,1 (3,07 - 8,70)	39	-	-	Germano et al., 2010	
		Salta/Corralito	deltametrina	0,02 (0,01 - 0,03)	0,1	-	-	Germano et al., 2010	
		Salta/San Carlos	deltametrina	1,1 (0,51 - 2,54)	8,4	-	-	Germano et al., 2010	
		Catamarca/Palo Blanco	deltametrina	0,6 (0,07 - 0,69)	4,5	-	-	Germano et al., 2010	
		Santiago del Estero/Capital	deltametrina	0,5 (0,27 - 0,80)	3,8	-	-	Germano et al., 2010	
		Santiago del Estero/La Noria	deltametrina	0,04 (0,02 - 0,05)	0,3	-	-	Germano et al., 2010	
		Chaco/Taco Pozo	deltametrina	0,5 (0,22 - 0,80)	3,7	-	-	Germano et al., 2010	
		Santa Fé/El Nocherco	deltametrina	0,1 (0,11 - 0,14)	0,9	-	-	Germano et al., 2010	
		Bolivia	Tarija/T.Nuevas	deltametrina	70,1 (26,63 - 1.240,21)	541,6	-	-	Germano et al., 2010
			Tarija/V.El Carmen	deltametrina	56,7 (24,47 - 313,15)	438	-	-	Germano et al., 2010
			Tarija/El Palmar	deltametrina	33,2 (23,40 - 53,80)	299,8	-	-	Germano et al., 2010
			Tarija/Villamonte	deltametrina	32,0 (16,45 - 128,06)	274,4	-	-	Germano et al., 2010
<i>T. infestans</i>	Paraguai	Boqueron/Jerico	deltametrina	0,5 (0,01 - 1,59)	3,7	-	-	Germano et al., 2010	
		LRS/CIPEIN	fipronil	2,1 (1,28 - 3,46)	-	-	-	Germano et al., 2010	
		Argentina	Salta/Salvador Mazza	fipronil	4,9 (3,25 - 5,61)	1,9	-	-	Germano et al., 2010
			Salta/Banda Sur	fipronil	6,2 (4,36 - 8,98)	3	-	-	Germano et al., 2010
			Salta/San Carlos	fipronil	4,9 (2,34 - 12,99)	2,2	-	-	Germano et al., 2010
			Salta/Corralito	fipronil	2,3 (0,36 - 7,52)	1,09	-	-	Germano et al., 2010
			Santiago del Estero/Capital	fipronil	4,5 (2,31 - 9,90)	2	-	-	Germano et al., 2010
		Bolívia	Tarija/ T. Nuevas	fipronil	0,4 (0,20 - 0,60)	0,19	-	-	Germano et al., 2010
			Tarija / V. El Carmen	fipronil	205,9 (148,0 - 267,1)	92,7	-	-	Germano et al., 2010
			Tarija/El Palmar	fipronil	123,1 (50,7 - 215,3)	55,5	-	-	Germano et al., 2010

Cont. ANEXO 1. Relatos na literatura de resistência de triatomíneos a inseticida.

Espécie	País	Município/Localidade	Inseticida	DL ₅₀	RR	RR ₅₀	RR ₉₀	Referência	
<i>T. infestans</i>	Argentina	LRS/CIPEIN	deltametrina	0,13 (0,12 - 0,15)	-	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008	
		Salvador Mazza	deltametrina	31,1 (12,9 - 84,7)	133,1	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008	
		Bolivia	Mataral	deltametrina	2,25 (0,28 - 4,80)	17,38	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008
		Sucre	deltametrina	4,05 (2,24 - 6,15)	31,27	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008	
<i>T. infestans</i>	Argentina	Yacuiba	deltametrina	28,42 (18,30 - 53,77)	154,4	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008	
		LRS/CIPEIN	lambda-cialotrina	0,11 (0,09 - 0,56)	-	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008	
		Salvador Mazza	lambda-cialotrina	19,6 (6,6 - 58,8)	106,2	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008	
		Bolivia	Mataral	lambda-cialotrina	0,53 (0,43 - 0,64)	2,9	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008
<i>T. infestans</i>	Argentina	Sucre	lambda-cialotrina	0,51 (0,38 - 0,65)	2,8	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008	
		LRS/CIPEIN	fipronil	2,12 (1,28 - 3,46)	-	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008	
		Salvador Mazza	fipronil	4,96 (3,25 - 5,61)	1,9	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008	
		Bolivia	Mataral	fipronil	859,8 (675,8 - 1099,6)	368,8	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008
<i>T. infestans</i>	Argentina	Sucre	fipronil	1301,2 (968,5 - 1959,3)	585,5	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008	
		LRS/CIPEIN	fenitrotrion	21,6 (5,3 - 67,9)	-	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008	
		Salvador Mazza	fenitrotrion	23,4 (19,8 - 27,8)	1,39	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008	
		Bolivia	Mataral	fenitrotrion	15,32 (9,6 - 22,0)	0,72	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008
<i>T. infestans</i>	Argentina	Sucre	fenitrotrion	21,89 (19,5 - 24,4)	1,03	-	-	Toloza <i>et al.</i> , 2008	
		LRS/CIPEIN	deltametrina	0,999 (0,072 - 0,137)	-	-	-	Gonzales Audino <i>et al.</i> , 2004	
		Catamarca	deltametrina	0,266 (0,181 - 0,385)	2,679	-	-	Gonzales Audino <i>et al.</i> , 2004	
		Mendoza	deltametrina	0,375 (0,180 - 0,773)	3,771	-	-	Gonzales Audino <i>et al.</i> , 2004	
		San Luis	deltametrina	0,199 (0,141 - 0,269)	2,000	-	-	Gonzales Audino <i>et al.</i> , 2004	
<i>T. infestans</i>	Argentina	Salta	deltametrina	0,784 (0,553 - 1,077)	7,891	-	-	Gonzales Audino <i>et al.</i> , 2004	
		LRS/CIPEIN	deltametrina	0,13 (0,12 - 0,15)	-	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005	
		Salta/El Choro	deltametrina	12,8 (11,0 - 14,9)	99,0	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005	

Cont. ANEXO 1. Relatos na literatura de resistência de triatomíneos a inseticida.

Espécie	País	Município/Localidade	Inseticida	DL ₅₀	RR	RR ₅₀	RR ₉₀	Referência
<i>T. infestans</i>	Argentina	Salta/La Toma	deltametrina	11,3 (6,1 - 23,3)	86,9	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/El Sauzal	deltametrina	6,5 (2,3 - 19,4)	50,5	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/Salvador Mazza	deltametrina	31,1 (12,9 - 84,7)	133,1	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
<i>T. infestans</i>	Argentina	LRS/CIPEIN	betacipermetrina	0,24 (0,11 - 0,55)	-	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/El Choro	betacipermetrina	106,5 (73,6 - 164,9)	451,2	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/La Toma	betacipermetrina	63,7 (46,9 - 88,5)	270,1	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/El Sauzal	betacipermetrina	62,2 (35,2 - 118,2)	263,5	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/Salvador Mazza	betacipermetrina	72,8 (62,2 - 87,1)	308,4	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		LRS/CIPEIN	beta ciflutrina	0,46 (0,09 - 1,26)	-	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/El Choro	beta ciflutrina	27,1 (7,6 - 70,7)	171,7	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
<i>T. infestans</i>	Argentina	Salta/La Toma	beta ciflutrina	23,4 (11,9 - 43,5)	148,4	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/El Sauzal	beta ciflutrina	9,5 (5,4 - 16,4)	60,3	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/Salvador Mazza	beta ciflutrina	105,1 (43,0 - 352,2)	667,6	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		LRS/CIPEIN	lambda-cialotrina	0,11 (0,09 - 0,56)	-	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/El Choro	lambda-cialotrina	53,3 (25,7 - 123,9)	288,7	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/La Toma	lambda-cialotrina	26,2 (9,3 - 75,7)	141,7	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/El Sauzal	lambda-cialotrina	11,9 (2,9 - 55,6)	64,5	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
<i>T. infestans</i>	Argentina	Salta/Salvador Mazza	lambda-cialotrina	19,6 (6,6 - 58,8)	106,2	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		LRS/CIPEIN	fenitroton	21,6 (5,3 - 67,9)	-	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/El Choro	fenitroton	27,0 (1,8 - 69,3)	1,29	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/La Toma	fenitroton	25,7 (21,9 - 30,2)	1,54	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/El Sauzal	fenitroton	36,1 (31,8 - 41,1)	1,78	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005
		Salta/Salvador Mazza	fenitroton	23,4 (19,8 - 27,8)	1,39	-	-	Pícollo <i>et al.</i> , 2005

Cont. ANEXO 1. Relatos na literatura de resistência de triatomíneos a inseticida.

Espécie	País	Município/Localidade	Inseticida	DL ₅₀	RR	RR ₅₀	RR ₉₀	Referência
<i>T. infestans</i>	Argentina	LRS/CIPEIN	deltametrina	0,10 (0,06 - 0,16)	-	-	-	Vassena & Picollo, 2003
		San Juan	deltametrina	0,18 (0,14 - 0,24)	1,8	-	-	Vassena & Picollo, 2003
		Mendoza	deltametrina	0,38 (0,20 - 0,66)	3,8	-	-	Vassena & Picollo, 2003
		Catamarca	deltametrina	0,26 (0,14 - 0,52)	2,6	-	-	Vassena & Picollo, 2003
		Salta	deltametrina	0,85 (0,13 - 5,54)	5,6	-	-	Vassena & Picollo, 2003
		San Luis	deltametrina	0,30 (0,24 - 0,34)	3	-	-	Vassena & Picollo, 2003
<i>R. prolixus</i>	Venezuela	LRS/CIPEIN	deltametrina	0,010 (0,007 - 0,016)	-	-	-	Vassena & Picollo, 2003
		Carabobo	deltametrina	0,114 (0,070 - 0,170)	11,4	-	-	Vassena & Picollo, 2003
<i>R. prolixus</i>	Venezuela	Trujillo	deltametrina	0,034 (0,025 - 0,048)	3,4	-	-	Vassena & Picollo, 2003
<i>T. dimidiata</i>	Colombia	Santander/San Joaquin - NI	deltametrina	0,44 (0,38 - 0,51)	-	-	-	Reyes <i>et al.</i> , 2007
		Santander/San Joaquin - NI	betacipermetrina	0,46 (0,39 - 0,52)	-	-	-	Reyes <i>et al.</i> , 2007
		Santander/San Joaquin - NI	fenitrotion	16,45 (15,22 - 17,64)	-	-	-	Reyes <i>et al.</i> , 2007
		Santander/San Joaquin - NV	deltametrina	510,72 (279,49 - 406,23)	-	-	-	Reyes <i>et al.</i> , 2007
		Santander/San Joaquin - NV	betacipermetrina	1623,59 (1322,36 - 1894,34)	-	-	-	Reyes <i>et al.</i> , 2007
		Santander/San Joaquin - NV	fenitrotion	838,91 (791,36 - 887,51)	-	-	-	Reyes <i>et al.</i> , 2007
<i>T. maculata</i>	Colombia	Santander/San José de Miranda - NI	deltametrina	0,07 (0,05 - 0,09)	-	-	-	Reyes <i>et al.</i> , 2007
		Santander/San José de Miranda - NI	betacipermetrina	0,05 (0,05 - 0,07)	-	-	-	Reyes <i>et al.</i> , 2007
		Santander/San José de Miranda - NI	fenitrotion	4,12 (3,56 - 4,78)	-	-	-	Reyes <i>et al.</i> , 2007
<i>T. infestans</i>	Bolivia	LRS/CIPEIN	CIPEIN	0,24 (0,22 - 0,26)	-	-	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca/Barrio Itaty	deltametrina	67,33 (49,02 - 96,83)	-	277	735	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca/Icla	deltametrina	1,69 (1,35 - 2,00)	-	6,9	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca / Jatum Cka Cka	deltametrina	1,29 (0,98 - 1,55)	-	5,2	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca/ Corso	deltametrina	1,44 (1,30 - 1,57)	-	5,9	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca/ El Chaco	deltametrina	2,04 (1,73 - 2,42)	-	8,5	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010

Cont. ANEXO 1. Relatos na literatura de resistência de triatomíneos a inseticida.

Espécie	País	Município/Localidade	Inseticida	DL ₅₀	RR	RR ₅₀	RR ₉₀	Referência
<i>T. infestans</i>	Bolivia	Chuquisaca/ Machareti	deltametrina	8,07 (4,27 - 11,17)	-	33	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca/ Rodeo Porvenir	deltametrina	2,65 (2,31 - 3,03)	-	11	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca/ Pajcha	deltametrina	5,08 (4,25 - 6,37)	-	21	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca/ Sotomayor	deltametrina	3,32 (2,09 - 4,05)	-	14	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca/ Tambo Ackachilla	deltametrina	1,26 (1,02 - 1,47)	-	5	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca/ Tambo Atajo	deltametrina	1,30 (1,01 - 1,54)	-	5	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca/ Tentami	deltametrina	78,44 (61,76 - 103,83)	-	323	936	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca/Tiguipa Estación (intra)	deltametrina	55,98 (34,78 - 90,43)	-	230	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca/Tiguipa Estación (peri)	deltametrina	34,47 (27,13 - 43,43)	-	142	307	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Chuquisaca/ Tihuacana	deltametrina	3,27 (2,14 - 4,07)	-	13	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Cochabamba/ Mataral	deltametrina	3,35 (2,88 - 3,78)	-	14	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		La Paz/ Colopampa	deltametrina	2,31 (1,84 - 2,73)	-	9,5	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		La Paz/ Parani	deltametrina	0,91 (0,80 - 1,04)	-	3,7	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/ Estacion Caiza	deltametrina	49,46 (39,50 - 60,06)	-	204	924	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/Quinchao	deltametrina	31,70 (21,19 - 54,45)	-	131	530	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/ Saladito	deltametrina	23,34 (16,72 - 35,51)	-	96	274	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/ San Antonio	deltametrina	76,37 (62,45 - 96,95)	-	315	1157	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/San Francisco del Inti	deltametrina	7,41 (4,61 - 10,69)	-	30	189	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/Sausal	deltametrina	119,12 (87,00 - 189,04)	-	491	1170	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/ Terra Nuevas	deltametrina	35,82 (30,34 - 42,09)	-	148	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
Tarija/Villa El Carmen	deltametrina	52,00 (41,35 - 64,00)	-	214	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010		
Tarija/Yuchan	deltametrina	8,10 (6,73 - 9,57)	-	33	405	Lardeux <i>et al.</i> , 2010		
		LRS/CIPEIN	CIPEIN	11,15 (10,41 - 11,93)	-	-	-	Lardeux <i>et al.</i>, 2010
		La Paz/Los Sotos	bendiocarb	17,67 (15,86 - 19,70)	-	1,6	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010

Cont. ANEXO 1. Relatos na literatura de resistência de triatomíneos a inseticida.

Espécie	País	Município/Localidade	Inseticida	DL ₅₀	RR	RR ₅₀	RR ₉₀	Referência
<i>T. infestans</i>	Bolívia	Tarija/Barrial	bendiocarb	19,56 (18,56 - 20,66)	-	1,8	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/ Barrety Chaco	bendiocarb	15,18 (12,56 - 17,00)	-	1,4	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/ Estacion Caiza	bendiocarb	17,73 (16,54 - 18,83)	-	1,6	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/San Francisco del Inti	bendiocarb	18,80 (8,54 - 41,32)	-	1,7	3,1	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/T.Nuevas	bendiocarb	20,82 (18,48 - 23,46)	-	1,7	2,5	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/Villa Primavera	bendiocarb	20,70 (19,28 - 22,08)	-	1,8	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/Yuchan	bendiocarb	16,52 (14,30 - 19,09)	-	1,5	2,1	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/ La Grampa	malation	38,81 (33,62 - 45,85)	-	2,2	3,4	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/ Laime	malation	31,14 (28,47 - 35,13)	-	1,8	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
		Tarija/Yuchan	malation	26,67 (26,09 - 27,29)	-	1,5	-	Lardeux <i>et al.</i> , 2010
<i>T. brasiliensis</i>	Brasil	LRS/CIPEIN	CIPEIN	0,19 (0,16 - 0,23)	-	-	-	Sonoda <i>et al.</i> , 2010
		Tauá/ Cachoeira do Julio (Intra)	deltametrina	0,33 (0,29 - 0,38)	1,74	-	-	Sonoda <i>et al.</i> , 2010
		Tauá/ C. das Pedrosas (Intra)	deltametrina	0,22 (0,18 - 0,26)	1,16	-	-	Sonoda <i>et al.</i> , 2010
		Tauá/ Dormideira (Intra)	deltametrina	0,34 (0,27 - 0,39)	1,79	-	-	Sonoda <i>et al.</i> , 2010
		Tauá/Mutuca (Intra)	deltametrina	0,30 (0,26 - 0,39)	1,58	-	-	Sonoda <i>et al.</i> , 2010
		Tauá/ C. das Pedrosas (Peri)	deltametrina	0,24 (0,20 - 0,30)	1,26	-	-	Sonoda <i>et al.</i> , 2010
		Tauá/M. Nova do Tomás (Peri)	deltametrina	0,33 (0,27 - 0,44)	1,74	-	-	Sonoda <i>et al.</i> , 2010
		Tauá/C. das Pedrosas (Silvestre)	deltametrina	0,19 (0,17 - 0,22)	1,00	-	-	Sonoda <i>et al.</i> , 2010
<i>T. infestans</i>	Argentina	LRS/CIPEIN	deltametrina	0,13 (0,12 - 0,15)	-	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i>, 2008
		Salta/El Choro	deltametrina	12,80 (11,00 - 14,86)	99	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		Salta/La Toma	deltametrina	11,27 (6,06 - 23,30)	86,9	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		Salta/El Sauzal	deltametrina	6,54 (2,26 - 19,39)	50,5	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		La Rioja/ C. Esquinas	deltametrina	1,83 (1,01 - 3,3)	14,09	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		La Rioja/ San Antonio	deltametrina	2,79 (1,53 - 5,16)	21,09	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008

Cont. ANEXO 1. Relatos na literatura de resistência de triatomíneos a inseticida.

Espécie	País	Município/Localidade	Inseticida	DL ₅₀	RR	RR ₅₀	RR ₉₀	Referência
<i>T. infestans</i>	Bolívia	Yacuiba	deltametrina	28,42 (18,30 - 53,77)	154,4	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		LRS/CIPEIN	fenitrothion	21,60 (5,3 - 67,93)	-	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i>, 2008
		Salta/El Choro	fenitrothion	26,97 (1,81 - 69,33)	1,29	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
	Argentina	Salta/La Toma	fenitrothion	25,72 (21,88 - 30,24)	1,54	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		Salta/El Sauzal	fenitrothion	36,11 (31,76 - 41,06)	1,78	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		La Rioja/ C. Esquinas	fenitrothion	4,02 (1,08 - 11,14)	0,19	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		La Rioja/ San Antonio	fenitrothion	3,69 (2,30 - 55,98)	0,17	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
	Bolívia	Yacuiba	fenitrothion	17,03 (12,82 - 22,05)	0,79	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		LRS/CIPEIN	fipronil	2,12 (1,28 - 3,46)	-	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i>, 2008
		Salta/El Choro	fipronil	4,02 (2,84 - 5,68)	1,88	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
	Argentina	Salta/La Toma	fipronil	3,44 (2,46 - 4,80)	1,40	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		Salta/El Sauzal	fipronil	4,27 (3,25 - 5,61)	1,80	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		La Rioja/ C. Esquinas	fipronil	2,57 (1,84 - 2,89)	1,16	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		La Rioja/ San Antonio	fipronil	0,54 (0,42 - 0,61)	0,22	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
	Bolívia	Yacuiba	fipronil	3,31 (1,33 - 8,22)	1,46	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		LRS/CIPEIN	bendiocarb	1,45 (1,16 - 1,77)	-	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i>, 2008
		Salta/El Choro	bendiocarb	1,16 (0,44 - 3,01)	0,67	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
	Argentina	Salta/La Toma	bendiocarb	1,71 (1,45 - 2,03)	1,03	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
Salta/El Sauzal		bendiocarb	1,16 (0,99 - 1,59)	0,50	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008	
La Rioja/ C. Esquinas		bendiocarb	0,59 (0,46 - 0,75)	0,45	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008	
<i>T. infestans</i>	Argentina	La Rioja/ San Antonio	bendiocarb	1,66 (1,42 - 1,96)	1,02	-	-	Santo Orihuela <i>et al.</i> , 2008
		Bolívia	Yacuiba	bendiocarb	1,60 (1,35 - 1,89)	1,02	-	-
<i>T. infestans</i>	Argentina	Santiago del Estero - NI	betacipermetrina	0,4 (0,3 - 0,7)	-	-	-	Zerba <i>et al.</i> , 1997
		Santiago del Estero - NV	betacipermetrina	290 (130 - 650)	-	-	-	Zerba <i>et al.</i> , 1997

Cont. ANEXO 1. Relatos na literatura de resistência de triatomíneos a inseticida.

Espécie	País	Município/Localidade	Inseticida	DL ₅₀	RR	RR ₅₀	RR ₉₀	Referência
<i>T. infestans</i>	Argentina	Santiago del Estero - Adulto	betacipermetrina	47 (33 - 76)	-	-	-	Zerba <i>et al.</i> , 1997
		Santiago del Estero - NI	deltametrina	1,3 (0,9 - 1,8)	-	-	-	Zerba <i>et al.</i> , 1997
		Santiago del Estero - NV	deltametrina	550 (310 - 990)	-	-	-	Zerba <i>et al.</i> , 1997
		Santiago del Estero - Adulto	deltametrina	30 (25 - 35)	-	-	-	Zerba <i>et al.</i> , 1997
<i>T. infestans</i>	Brasil	LRS/CIPEIN	deltametrina	0,10 (0,06 - 0,16)	-	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		Rio Grande do Sul	deltametrina	0,70 (0,52 - 1,04)	7	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		LRS/CIPEIN	betacipermetrina	0,26 (0,20 - 0,34)	-	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		Rio Grande do Sul	betacipermetrina	0,24 (0,18 - 0,32)	0,92	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		LRS/CIPEIN	beta ciflutrina	0,10 (0,04 0 0,22)	-	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		Rio Grande do Sul	beta ciflutrina	0,36 (0,24 - 0,54)	3,6	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		LRS/CIPEIN	lambdacialotrina	0,16 (0,06 - 0,26)	-	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		Rio Grande do Sul	lambdacialotrina	0,28 (0,14 - 0,52)	1,75	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		LRS/CIPEIN	cipermetrina	0,40 (0,08 - 0,68)	-	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
Rio Grande do Sul	cipermetrina	1,34 (0,98 - 1,82)	3,35	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000		
<i>R. prolixus</i>	Venezuela	LRS/CIPEIN	deltametrina	0,010 (0,007 - 0,016)	-	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		Carabobo	deltametrina	0,114 (0,070 - 0,170)	11,4	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		LRS/CIPEIN	betacipermetrina	0,036 (0,025 0 0,054)	-	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		Carabobo	betacipermetrina	0,286 (0,0153 - 0,686)	7,9	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		LRS/CIPEIN	beta ciflutrina	0,021 (0,004 - 0,081)	-	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		Carabobo	beta ciflutrina	0,142 (0,093 - 0,215)	6,8	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		LRS/CIPEIN	lambdacialotrina	0,020 (0,011 - 0,029)	-	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		Carabobo	lambdacialotrina	0,091 (0,052 - 0,274)	4,5	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
<i>R. prolixus</i>	Venezuela	LRS/CIPEIN	cipermetrina	0,080 (0,050 - 0,130)	-	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		Carabobo	cipermetrina	0,990 (0,570 - 1,710)	12,4	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000

Cont. ANEXO 1. Relatos na literatura de resistência de triatomíneos a inseticida.

Espécie	País	Município/Localidade	Inseticida	DL ₅₀	RR	RR ₅₀	RR ₉₀	Referência
<i>R. prolixus</i>	Venezuela	LRS/CIPEIN	dieldrin	8,47 (5,77 - 12,07)	-	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
		Carabobo	dieldrin	23,34 (20,09 - 29,37)	3	-	-	Vassena <i>et al.</i> , 2000
<i>T. infestans</i>	Bolivia	LRS/CIPEIN	deltametrina	0,13 (0,11 - 0,15)	-	-	-	Roca Azevedo <i>et al.</i> , 2011
		Cochabamba/ Alquile/ Mataral - D	deltametrina	2,25 (0,28 - 4,80)	17,38	-	-	Roca Azevedo <i>et al.</i> , 2011
		Cochabamba/Alquile/Mataral - S	deltametrina	1,53 (0,53 - 3,34)	11,90	-	-	Roca Azevedo <i>et al.</i> , 2011
		Potosi/ Toro Toro/ Kirus Mayu - S	deltametrina	0,95 (0,49 - 1,66)	7,35	-	-	Roca Azevedo <i>et al.</i> , 2011
		Cochabamba/ 20 de Outubro - S	deltametrina	0,88 (0,08 - 1,84)	6,80	-	-	Roca Azevedo <i>et al.</i> , 2011
		Cochabamba/ Omereque/ Ilicuni - S	deltametrina	0,25 (0,14 - 0,39)	1,92	-	-	Roca Azevedo <i>et al.</i> , 2011
		LRS/CIPEIN	fipronil	2,0 (1,6 - 3,2)	-	-	-	Roca Azevedo <i>et al.</i> , 2011
		Cochabamba/ Alquile/ Mataral D	fipronil	296,0 (160,2 - 414,8)	139,2	-	-	Roca Azevedo <i>et al.</i> , 2011
		Cochabamba/Alquile/Mataral S	fipronil	49,8 (10,2 - 256,0)	23,4	-	-	Roca Azevedo <i>et al.</i> , 2011
		Potosi/ Toro Toro/ Kirus Mayu - S	fipronil	96,86 (32,0 - 332,0)	45,6	-	-	Roca Azevedo <i>et al.</i> , 2011
		Cochabamba/ 20 de Outubro - S	fipronil	1,0 (0,5 - 2,1)	0,5	-	-	Roca Azevedo <i>et al.</i> , 2011
		Cochabamba/ Omereque/ Ilicuni - S	fipronil	11,8 (8,6 - 17,0)	5,5	-	-	Roca Azevedo <i>et al.</i> , 2011
<i>T. infestans</i>	Argentina	LRS/CIPEIN	deltametrina	0,1 (0,1 - 0,3)	-	-	-	Sfara <i>et al.</i> , 2006
		El Choro	deltametrina	>1,400	99,0	-	-	Sfara <i>et al.</i> , 2006
		La Toma	deltametrina	>1,400	86,9	-	-	Sfara <i>et al.</i> , 2006
		LRS/CIPEIN	lambdacialotrina	0,3 (0,2 - 0,3)	-	-	-	Sfara <i>et al.</i> , 2006
		El Choro	lambdacialotrina	23,2 (17,0 - 32,9)	288,7	-	-	Sfara <i>et al.</i> , 2006
		La Toma	lambdacialotrina	14,4	141,7	-	-	Sfara <i>et al.</i> , 2006
		LRS/CIPEIN	tetametrina	270 (133,6 - 404,9)	-	-	-	Sfara <i>et al.</i> , 2006
		El Choro	tetametrina	> 1,400	>5,2	-	-	Sfara <i>et al.</i> , 2006
La Toma	tetametrina	> 1,400	> 5,2	-	-	Sfara <i>et al.</i> , 2006		

Cont. ANEXO 1. Relatos na literatura de resistência de triatomíneos a inseticida.

Espécie	País	Município/Localidade	Inseticida	DL ₅₀	RR	RR ₅₀	RR ₉₅	Referência
<i>T. sordida</i>	Brasil	LRS - Uberaba/ MG	deltametrina	0,0654 (0,0528 - 0,0813)	-	-	-	Pessoa, 2008
		Monjolos / Fazenda Cipó	deltametrina	0,1731 (0,1379 – 0,2254)	-	2,6	3,8	Pessoa, 2008
		Monjolos / P. Tamboril	deltametrina	0,2991 (0,2518 – 0,3689)	-	4,6	4,7	Pessoa, 2008
		Presidente Juscelino/ S. Mandioca	deltametrina	0,3609 (0,2984 – 0,4385)	-	5,5	5,4	Pessoa, 2008
		Buenópolis/ P. Cerrado	deltametrina	0,3609 (0,2984 – 0,4385)	-	3,6	4,0	Pessoa, 2008
		Monte Azul / F. Brejinho	deltametrina	0,2188 (0,1447 – 0,2784)	-	3,3	3,7	Pessoa, 2008
		Monte Azul / F. Tábuas	deltametrina	0,2279 (0,2043 – 0,2546)	-	3,5	1,8	Pessoa, 2008
		Coração de Jesus/ F. Jatobá	deltametrina	0,2644 (0,2206 – 0,3367)	-	4,0	4,1	Pessoa, 2008
		Coração de Jesus/ F. Jat. Cima	deltametrina	0,2369 (0,1827 – 0,2926)	-	3,6	4,4	Pessoa, 2008
		Coração de Jesus/ F. Jataí	deltametrina	0,1905 (0,1495 – 0,2491)	-	2,9	4,2	Pessoa, 2008
		Coração de Jesus/ F. Domingada	deltametrina	0,3551 (0,2972 – 0,4563)	-	5,4	5,2	Pessoa, 2008
		Coração de Jesus/ F. Barriguda	deltametrina	0,4442 (0,3814 – 0,5252)	-	6,5	5,0	Pessoa, 2008
		Bocaiuva/ F. Félix	deltametrina	0,2908 (0,2385 – 0,3426)	-	4,4	3,9	Pessoa, 2008
		Bocaiuva/ F. Félix I	deltametrina	0,4034 (0,3228 – 0,4975)	-	6,2	6,2	Pessoa, 2008
Bocaiuva/ F. Chaves	deltametrina	0,3814 (0,3318 – 0,4543)	-	5,8	3,9	Pessoa, 2008		
<i>Panstongylus megistus</i>	Brasil	LRS - Sento Sé/ Pov. Quixadá	deltametrina	1,02 (0,95 – 1,11)	-	1,00	1,00	Obara, 2010
		Serranópolis do Iguaçu	deltametrina	2,01 (1,90 – 2,13)	-	1,97	1,19	Obara, 2010
<i>T. brasiliensis</i>	Brasil	LRS – Umari/CE	deltametrina	0,68 (0,64 – 0,73)	-	1,00	1,00	Obara, 2010
		Itaporanga/ F. Vaca Morta/	deltametrina	0,68 (0,64 – 0,78)	-	1,00	1,27	Obara, 2010
		Mãe d'Água/ F. Cacimba de Pedra	deltametrina	0,83 (0,75 – 0,90)	-	1,21	1,65	Obara, 2010
		Monteiro/ F. Olho d'Água das Dores	deltametrina	0,82 (0,76 – 0,88)	-	1,20	1,18	Obara, 2010
		Piancó/ S. Junco de Cima	deltametrina	0,81 (0,69 – 0,93)	-	1,19	1,85	Obara, 2010
		Santa Cruz / S. Goiabeira	deltametrina	0,97 (0,89 – 1,04)	-	1,41	1,80	Obara, 2010
		São Francisco/ S. São Luiz	deltametrina	0,74 (0,69 – 0,79)	-	1,09	1,03	Obara, 2010
		São José das Espinharas/ F. Laranjeiras	deltametrina	0,73 (0,67 – 0,78)	-	1,06	1,02	Obara, 2010

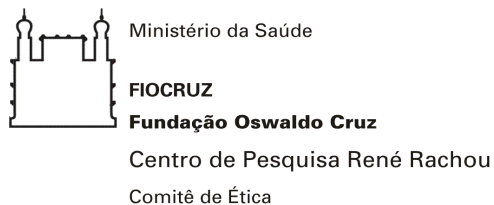
Cont. ANEXO 1. Relatos na literatura de resistência de triatomíneos a inseticida

Espécie	País	Município/Localidade	Inseticida	DL ₅₀	RR	RR ₅₀	RR ₉₅	Referência
<i>T. brasiliensis</i>	Brasil	Lagoa Grande/ F. Morada Nova	deltametrina	1,10 (0,99 – 1,22)	-	1,61	2,15	Obara, 2010
		Petrolina/ F. Lagoas e Pov. Capim	deltametrina	0,79 (0,71 – 0,86)	-	1,16	1,63	Obara, 2010
		Salgueiro/ S. Santana e Quixabeiras	deltametrina	0,77 (0,69 – 0,84)	-	1,13	1,57	Obara, 2010
		Serra Talhada/ F. Jardim e Nova	deltametrina	0,85 (0,77 – 0,95)	-	1,25	1,65	Obara, 2010
		Oeiras/ S. Pau de Chapada	deltametrina	1,12 (1,01 – 1,23)	-	1,66	2,85	Obara, 2010
		Oeiras/ S. Tabocas	deltametrina	1,20 (1,08 – 1,32)	-	1,75	2,88	Obara, 2010
		Oeiras/ S. Formosa II	deltametrina	1,33 (1,20 – 1,46)	-	1,94	3,43	Obara, 2010
		Oeiras/ S. Sapé	deltametrina	1,48 (1,38 – 1,61)	-	2,17	2,61	Obara, 2010
		Caicó/ S. Pedra do Sino e F. Laginha	deltametrina	0,85 (0,76 – 0,93)	-	1,24	1,77	Obara, 2010
<i>T. sordida</i>	Brasil	LRS/ Cordeiros	deltametrina	0,58 (0,54 – 0,63)	-	1,00	1,00	Obara, 2010
		Cafarnaum/ Pov. Boa Vista do Canal	deltametrina	0,77 (0,72 – 0,83)	-	1,32	1,33	Obara, 2010
		Carinhanha/ F. Micaela	deltametrina	0,81 (0,74 – 0,87)	-	1,38	1,71	Obara, 2010
		Malhada/ F. Serra do João Alves	deltametrina	1,46 (1,33 – 1,58)	-	2,49	3,41	Obara, 2010
		Mucugê/ F. Bonfim e Lage	deltametrina	1,59 (1,44 – 1,74)	-	2,71	3,40	Obara, 2010
		Nova Redenção/ F. Alto Verde	deltametrina	0,86 (0,80 – 0,93)	-	1,48	1,71	Obara, 2010
		Palmeiras/ F. Rio Preto e P. Pecuária	deltametrina	1,02 (0,90 – 1,15)	-	1,75	2,21	Obara, 2010
		Rio das Contas/ F. Boa Vista	deltametrina	1,16 (1,10 – 1,23)	-	1,99	1,66	Obara, 2010
		Xique Xique/ A. Roçado I e Gado Bravo	deltametrina	0,61 (0,56 – 0,66)	-	1,05	1,04	Obara, 2010
		Firminópolis/ Pov. Córrego Seco e Diamantina	deltametrina	0,70 (0,63 – 0,78)	-	1,20	1,75	Obara, 2010
		Guarani do Goiás/ F. Samambaia e Barreirão	deltametrina	0,75 (0,70 – 0,80)	-	1,29	1,13	Obara, 2010
		Posse/ F. Emburana	deltametrina	0,86 (0,76 – 0,96)	-	1,48	2,36	Obara, 2010
		São Luis Montes Belos/ F. Empedrado I	deltametrina	0,71 (0,65 – 0,76)	-	1,21	1,29	Obara, 2010
		Poxoréo/ F. Modelo e S. Santa Fé	deltametrina	0,64 (0,57 – 0,71)	-	1,10	1,52	Obara, 2010
		São José do Povo/ S. Serrinha e Cascata	deltametrina	0,70 (0,66 – 0,75)	-	1,20	1,01	Obara, 2010
Campo Grande/ Pov. Aguão	deltametrina	0,61 (0,56 – 0,67)	-	1,05	1,19	Obara, 2010		

Cont. ANEXO 1. Relatos na literatura de resistência de triatomíneos a inseticida

Espécie	País	Município/Localidade	Inseticida	DL ₅₀	RR	RR ₅₀	RR ₉₅	Referência
<i>T. sordida</i>	Brasil	Aparecida do Taboado/ F. José Rodrigues	deltametrina	0,78 (0,70 – 0,86)	-	1,33	1,91	Obara, 2010
		Douradina/ S. Maria Curadeira	deltametrina	0,85 (0,78 – 0,92)	-	1,45	1,60	Obara, 2010
		Rochedo/ F. Estência Ermelinda	deltametrina	0,70 (0,63 – 0,77)	-	1,21	1,28	Obara, 2010
		Terenos/ Pov. Colônia Velha	deltametrina	0,69 (0,61 – 0,77)	-	1,19	1,24	Obara, 2010
		Lontra/ Pov. Rodeador	deltametrina	0,84 (0,77 – 0,92)	-	1,45	1,86	Obara, 2010
		Aurora do Tocantins/ F. Mucambo e Veneranda	deltametrina	1,04 (0,87 – 1,18)	-	1,79	2,56	Obara, 2010
<i>T. infestans</i>	Brasil	LRS – Montes Claros	deltametrina	0,36 (0,241 – 0,410)	-	1,00	-	Sonoda et al., 2009
		Goiás	deltametrina	0,42 (0,321 – 0,515)	-	1,17	-	Sonoda et al., 2009
		Mato Queimado	deltametrina	0,53 (0,354 – 0,710)	-	1,47	-	Sonoda et al., 2009
		Guarani das Missões	deltametrina	0,35 (0,240 – 0,548)	-	0,97	-	Sonoda et al., 2009
		Três de Maio	deltametrina	0,67 (0,520 – 0,925)	-	1,86	-	Sonoda et al., 2009
		Doutor Maurício Cardoso	deltametrina	0,26 (0,199 – 0,356)	-	0,72	-	Sonoda et al., 2009
<i>T. infestans</i>	Bolívia	Yacuiba	deltametrina	10,84 (7,706 – 14,635)	-	30,11	-	Sonoda et al., 2009

ANEXO 3. Questionário aplicado aos moradores das localidades de interesse visando descrever a unidade domiciliar bem como o possível uso de inseticida com fins domésticos e agrícolas.



**PROGRAMA DE CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS
CPqRR - FIOCRUZ/UFMG/GRS – MONTES CLAROS-MG**

I –Dados gerais da casa:

1. Localidade: _____

2. Número da localidade: _____

3. Número da casa: _____

4. Recusa? () 1-sim () 2-não

5. Casa habitada? () 1-sim () 2-não

6. Nome do dono (a) da casa: _____

7. Número de residentes: _____

8. Há quanto tempo mora no domicílio?

Há _____ () anos () meses () semanas () dias

9. Veja atrás da porta de entrada da sua residência a ficha domiciliar. Permite transferir os dados da ficha para este questionário?

Número da visita	Data da visita	Trabalho executado	Produto aplicado

10. Tem animais domésticos na casa ou quintal ?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

11. Se sim, quantos animais domésticos vocês tem? (Marcar o animal e a quantidade ao lado)

- Cão quantos? _____ Gato quantos? _____
 Galinha quantos? _____ Porco quantos? _____
 Vaca quantos? _____ Cabra quantos? _____
 outro : _____ quantos? _____
 NR NS

12. Se você tem animais domésticos em casa, você os trata com venenos para combater pragas como carrapatos, pulgas, piolhos, sarnas, etc?

- 1-sim 2-não 9-NR 0-NS

13. Se sim, qual (is) produto (s) você costuma usar? _____

14. Algum animal dorme dentro de casa?

- 1-sim 2-não 9-NR 0-NS

15. Se sim, quais e quantos?

- Cão quantos? _____ Gato quantos? _____
 Galinha quantos? _____ Porco quantos? _____
 outro : _____
 NR NS

16- Aonde estes animais dormem dentro da casa?

- sala quarto cozinha banheiro varanda (soleira)
 Outro: _____ NR NS

17. Aonde que cada animal dorme no quintal (peridomicílio)?

- Cão local? _____ Gato local? _____
 Galinha local? _____ Porco local? _____
 Vaca local? _____ Cabra local? _____
 outro : _____ local? _____
 NR NS

18. Vocês usam veneno (remédio) contra insetos (baratas, formigas, cupins, etc) ?

- 1-sim 2-não 9-NR 0-NS

19- Dentro de casa?

- 1-sim 2-não 9-NR 0-NS

Se sim, marcar o local:

- sala quarto cozinha banheiro varanda (soleira)
 Outro: _____ NR NS

20. Fora da casa (quintal)?

- 1-sim 2-não 9-NR 0-NS

Se sim, marcar o local:

- telhado cerca chiqueiro galinheiro paiol
 Outro: _____ NR NS

21. Posso ver? Qual veneno (remédio) você usa?

Escrever nome do produto: _____

22. Qual a última vez que você passou veneno na sua casa (fora ou dentro)?

- () Na última semana () No último mês () Há 3 meses atrás
() Há 6 meses atrás () Há 1 ano () outro período: _____
() NR () NS

23. De quanto em quanto tempo você passa veneno em sua casa?

- () uma vez a cada mês () uma vez a cada dois meses
() uma vez a cada seis meses () uma vez ao ano
() não tenho frequência, passo quantas vezes forem necessárias

24. Você tem alguma plantação em sua propriedade?

- () 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, responda: De que?

Qual a área plantada (ha)?

Tem acompanhamento da EMATER? () 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

25. Você usa veneno para controlar alguma praga agrícola?

- () 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, responda: De quanto em quanto tempo você aplica veneno em suas plantações?

- () uma vez a cada mês () uma vez a cada dois meses
() uma vez a cada seis meses () uma vez ao ano
() não tenho frequência, passo quantas vezes forem necessárias

26. Tem algum veneno guardado hoje em sua propriedade?

- () 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, responda:

Qual (is)?

Para que é (são) utilizado(s)?

Você tem prática ou costume de utilizá-lo (s)?

Onde foi (foram) comprado(s)?.....

27. Vocês frequentam as matas aqui perto ou mais longe?

- () 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

28. Como que vocês utilizam essas matas?

- () Coletando lenha () Coletando frutos/sementes () Pesca
() PescaColeta de fibras (alguma atividade artesanal) () Caça
() Outro jeito: _____ () NR () NS

29. Área da casa: _____

30. Idade da casa: _____

31 Tipo de parede:

- Tijolo sem reboco () Tijolo com reboco () Pau-a-pique, barro ()

Adobe sem reboco () Madeira () NS ()
 NR () Se mista, completar: _____
 Com: Fendas, gretas, rachaduras e buracos ()

32. Tipo de teto

Telha de barro () Telha de amianto () Lage ()
 Zinco () Madeira () Capim ()
 Palha (palmeira) () Papelão, plástico, lona () NS ()
 NR () Outro: _____
 Com: Fendas, gretas, rachaduras e buracos ()

33. Tipo de forro

Lage () Madeira () Pano ()
 Esteira () Não tem () NS ()
 NR () Outro: _____

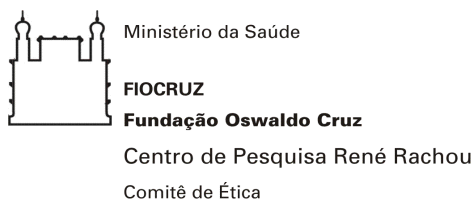
34. Tipo de piso

Ladrilho ou cerâmica () Cimento () Madeira ()
 Terra () NS () NR ()
 Se misto completar _____ Outro _____
 Com: Fendas, gretas, rachaduras e buracos ()

35. Anexos peridomésticos, distância e tempo da estrutura:

Estrutura	Presente	Distância da casa (m)?	Tempo que a estrutura existe?	Material de Construção
Galinheiro				
Chiqueiro				
Curral				
Paio				
Forno de barro				
Depósito de máquinas e utensílios				
Cerca				
Monte de madeira				
Monte de Lenha				
Monte de telha				
Monte de tijolos				
Entulhos				
NA				
NS				
NR				
Outros				

ANEXO 4. Questionário aplicado aos agentes de saúde que trabalham nas localidades de interesse visando detectar possíveis falhas operacionais no campo.



**PROGRAMA DE CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS
CPqRR - FIOCRUZ/UFMG/GRS – MONTES CLAROS-MG**

Caro agente de saúde,

Com o nosso reconhecimento pelo trabalho que você presta a sua comunidade, solicitamos que preencha o questionário abaixo de modo a nos auxiliar na avaliação das atividades prestadas referentes ao controle dos barbeiros, vetores da doença de Chagas.

Contamos com sua colaboração.

Dra. Liléia Diotaiuti e Grasielle Caldas

I –Dados gerais do agente:

1. Município: _____

2. Número do município: _____

3. Nome do agente de saúde: _____

4. CPF do agente de saúde: _____

5. Há quanto tempo trabalha como agente de saúde no município?

Há _____ () anos () meses () semanas () dias

6. Você foi treinado para exercer suas atividades de controle dos triatomíneos utilizando inseticidas?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, informe quando _____

7. Você já fez cursos de reciclagem e atualização junto às secretarias municipal e estadual de saúde ?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, informe quando _____

8. Se você não contar com o bico TJET 8002, você usa outros tipos de bico que não ele?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, informe quais _____

9. Você pulverizou com o bico tipo chapinha (cônico)? É aquele que vem com o pulverizador novo.

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, informe quando _____

10. Você usa balde graduado para medir o volume de água a ser usado na preparação do inseticida?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

11. Você costuma usar arame ou prego para alterar a saída do inseticida, quando o bico entope?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

12. Para você, a manutenção da pressão do equipamento tem importância na borrifação?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

13. Como você prepara a carga de inseticida que coloca no pulverizador?

14. Como você mede ou dosa a carga do inseticida?

15. Você sempre faz assim?

16. Em alguma campanha você já aplicou doses do inseticidas menores do que a recomendada?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, informe quando _____

Quantas vezes? _____

Qual (is) o(s) motivo(s)? _____

17. Por alguma razão você já teve que usar inseticida vencido?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, informe quando _____

Quantas vezes? _____

Qual (is) o(s) motivo(s)? _____

18. Já aconteceu de em alguma campanha ter inseticida em quantidade insuficiente e você ter que optar por borrifar umas casas e outras não?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, informe quando _____

19. Você já se intoxicou com algum inseticida no campo?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, informe quando _____

Quais sintomas você apresentou? _____

Como tratou? _____

Você teve que tirar licença médica por este motivo? () 1-não () 2-sim

20. Você já deixou de borrifar algumas casas desta região por falta de inseticida?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, informe quando _____

Qual(is) localidade(s)? _____

21. Você já deixou de borrifar algumas casas desta região por falta de veículo que desce acesso a mesma?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, informe quando _____

Qual(is) localidade(s)? _____

22. Sua equipe já deixou de borrifar algumas casas desta região por falta de funcionários?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, informe quando _____

Qual(is) localidade(s)? _____

23. Você já trabalhou em alguma localidade que mesmo aplicando inseticida os triatomíneos não morriam ou as colônias cresciam mais rápido do que o esperado?

() 1-sim () 2-não () 9-NR () 0-NS

Se sim, informe quando _____

Qual(is) localidade(s)? _____

24. Se sim, informe o que você fez para resolver o problema

() aplicou inseticida com maior frequência

() aplicou uma dose maior do que a recomendada

() não aplicou mais nenhum inseticida

() recomendou os moradores a organizarem o peridomicílio para acabar com os esconderijos para os barbeiros

() informou aos colegas e ao responsável pela coordenação das campanhas de controle de triatomíneos da região.

ANEXO 5: Loci de microssatélites descritos para *T.brasiliensis* (Tb), *T.dimidiata* (TD), *T.infestans* (Tinfest_ms) e *T.pseudomaculata* (Tp).

<i>Nome do loci</i>	<i>Sequência dos iniciadores (5' - 3')</i>	<i>Arranjo de repetição</i>	<i>Temperatura de anelamento (°C)</i>	<i>Tamanho do Fragmento (pb)</i>
Tb 728	F: NED-CTACAGCGATTTGTCTCG R: TATTGCATCATGTTTATTGG	(GT) ₂ AT(GT) ₁₂	47	300 – 322
Tb 830	F: FAM-GTCAGATGCATGGTGATAC R: CATGGAAGATACCTAAACGG	(AC) ₁₅	53	265 – 292
Tb 860	F: PET-CGTTTTAGTAAGGAATGG R: ATTGTGCCAAAATCAGGT	(CT) ₅ (CA) ₁₀ (CTCA) ₃	47	390 – 420
Tb 7180	F: VIC-TGACCTACCGCCACATTAC R: CAAATTTTCGATACCGCGATAG	(CATA) ₃ (CA) ₈ A(CA) ₁₈ (GA) ₃	54	214 – 260
Tb 8112	F: NED-GAATACGCCTATTACAG R: GGATATGTATTTTAAGGGA	(AC) ₁₁ C(CT) ₆	49	078 – 096
Tb 8124	F: NED-GCCACTGTGTTCTCATTCC R: TGGTGTGATGCTCAGAAGG	(CA) ₁₈	54	209 – 253
TDMS1	F: GGAAATACAGGTTTTACACA R: AATTGCACTTTCGGATGA	(GT) ₅	57	133 – 221
TDMS3	F: TCAGATGACGAGGTGGATTG R: ACGACCTCAACATCCCTTC	(GA) ₄ (TAG) ₃ (TGT) ₃	57	129 – 146
TDMS4	F: CAGTTGTTTCATCAGGAAGTGAATC R: GCTCAGAAAATATGTTCCAGT	(CT)C(CT) ₂₅ G(CT) ₂	55	150 – 186
TDMS9	F: CATTGCAATCGTGTGCGAAAT R: TGCCAAAATTTTCGTGTCT	(GT) ₁₃	57	194 – 230
TDMS11	F: GGTGCACCATGTTTAAAG R: AGCGAATGGTCTGTGAATTG	(CT) ₅ (CA) ₅ (CTCA) ₂ (CT) ₄ (CACTTT)(CT) ₂₀	55	132 – 230
Tinfest_ms3/AY742670	F: GCGGACTGAGAAAGGAACAC R: TTCACCGCTCGTCTACACAC	(GT) ₁₀ G (GT) ₂ GC (GT) ₂ GG (GT) ₂	58	160 - 204
Tinfest_ms5/AY742671	F: ATGCTGATAGTCGCAACACG R: TCGATCTTTTTCCCAAATCG	(CA) ₂₅	58	364 - 396

Cont. ANEXO 5 . Loci de microssatélites descritos para *T.brasiliensis* (Tb), *T.dimidiata* (TD), *T.infestans* (Tinfest_ms) e *T.pseudomaculata* (Tp).

<i>Nome do loci</i>	<i>Sequência dos iniciadores (5´- 3´)</i>	<i>Arranjo de repetição</i>	<i>Temperatura de anelamento (°C)</i>	<i>Tamanho do Fragmento (pb)</i>
Tinfest_ms21/AY742672	F: h: CGCTTTCAACACAACAGGAG R: TTTGTTTAATTACAAAATCCA TACC	(TG) ₂ TT (TG) ₁₄ GGG (GT) ₃	59.5	318 - 320
Tinfest_ms22/AY742673	F: f: CGAGTCAAATTTTCCATGAGG R: CCCATGGTGTACCCAAAAC	(TG) ₉	58	162 - 196
Tinfest_ms23/AY742674	F: h: CTCTTGCTGGTTGTGCACTG R: GTAAACGCCATCCTCACACC	(CA) ₅ CC (CA) ₅ AA (CA) ₂	58	148 - 177
Tinfest_ms27/AY742675	F: h: ATGAAGCCGAAACCACAAAG R: GGG GAAGAGAATGCATTGAG	(CT) ₁₃	58	290 - 314
Tinfest_ms42/AY742683	F: h: GACGCTCCAGCTATCGATTC R: GGCCAATTGGTTTGGTAG TG	(CA) ₁₆	58	206 - 246
Tp57	F: NED-GTTACATTAAGGTTGGATT R: AATTATGCTGTCCTTTCC	(GT) ₉	45	205 - 211
Tp59	F: FAM-ACTTAGGTGGGTATGGA R: CAGAGTAGTAGCGTATTGA	(GT) ₈	45	120 - 128
Tp148	F: VIC-ACCAACTTTGATGCCACT R: GCTTCCTATGACTGCTTT	(AT) ₃ (GT) ₁₀	45	94 - 102
Tp20	F: VIC-ACTGACTCCGAGAAAGTG R: TTCCTAAATCCAAACCCT	(GT) ₁₇ (ATGT) ₇	52	170 - 206
Tp544	F: PET-TGTTAGAATGAATGCCACTA R: GCAATACAATAGAGGACTGA	(GT) ₄ GA(GT) ₅	45	148 - 172

<i>Ensaio enzimático</i>	<i>Reagentes/poço</i>	<i>Tempo de incubação</i>	<i>Leitura</i>
Acetilcolinesterase (AChE)	<ul style="list-style-type: none"> * 25 µL do homogenato (antes da centrifugação) e 25 µL de água nos controles negativos * 145 µL de Triton/Na fosfato * 10 µL de DTNB / Na fosfato * 25 µL de AchE (na placa de AchE) e 25 µL de AchI (na placa de AchI) 	90 minutos em temperatura ambiente	<i>end point</i> a 405 nm
Oxidase de Função Mista (OFM)	<ul style="list-style-type: none"> * 20 µL do homogenato (antes da centrifugação), 20 µL de tampão k fosfato nos controles negativos, 20 µL de solução de citocromo C nos controles positivos * 60 µL de tampão K fosfato * 200 µL de TMBZ/ Na acetato * 25 µL de H₂O₂ a 3% 	90 minutos em temperatura ambiente protegido da luz	<i>end point</i> a 650nm
Esterase alfa (α – EST)	<ul style="list-style-type: none"> * 10 µL do homogenato (depois da centrifugação), 10 µL de água nos controles negativos, 10 µL de alfa-naftol a 0,5 µg/µl (~3,5 nmoles/µL) nos controles positivos * 200 µL de alfa-naftil acetato/Na fosfato * APÓS 15 minutos, 50µL de Fast Blue Salt 	5 minutos em temperatura ambiente	<i>end point</i> a 570 nm

<i>Ensaio enzimático</i>	<i>Reagentes/poço</i>	<i>Tempo de incubação</i>	<i>Leitura</i>
Esterase beta (β – EST)	* 10 µL do homogenato (depois da centrifugação), 10 µL de água nos controles negativos, 10 µL de beta-naftol a 0,5 µg/µl (~3,5 nmoles/µL) nos controles positivos * 200 µL de beta-naftil acetato/Na fosfato * APÒS 15 minutos, 50µL de Fast Blue Salt	5 minutos em temperatura ambiente	<i>end point</i> a 570 nm
Esterase PNPA (ρ – EST)	* 10 µL do homogenato (depois da centrifugação), 10 µL de água nos controles negativos, * 200 µL de PNPA /Na fosfato	imediata	Leitura cinética por dois minutos, intervalada por 15 segundos, a 405 nm
Glutathiona-S-Transferas (GST)	* 15 µL do homogenato (depois da centrifugação), 15 µL de água nos controles negativos * 195 µL de GSH/CDNB * APÒS 15 minutos, 50µL de Fast Blue Salt	imediata	Cinética imediata, por 20 minutos, intervalada por 1 minuto, a 340 nm

ANEXO 7. Análise Probit da Linhagem Referência de Suscetibilidade de *T.sordida*.

Name of the file: Uberaba Referencia Suscetibilidade.
 28/10/09
 Deltametrina

n	Dose	Mort. corr (%)	probit	Total treated	Killed	Killed expected	CHI2 contribution
1	0.0125	0.0	/	30	0	0.72	/
2	0.0300	20.0	4.158544	30	6	5.30	0.1133
3	0.0500	36.7	4.659748	30	11	11.29	0.0122
4	0.0750	53.3	5.083446	30	16	17.05	0.1503
5	0.1000	70.0	5.524002	30	21	20.93	0.0007
6	0.1500	83.3	5.967363	30	25	25.28 *	0.0192
7	0.2000	93.3	6.501385	30	28	27.35 *	0.1760
8	0.2500	100.0	/	30	30	28.42	/

Mortality in the control: 0 % (0 / 30)
 Number of iterations: 2 . Doses in LOG₁₀ units: Yes

CHI2= .4717295 df= 4
 Prob= 2.380569E-02

LC	Level of Confidence	Range
1 = 0.00937	.95	0.00384 < LC < 0.01545
2 = 0.01175	.95	0.00527 < LC < 0.01847
3 = 0.01357	.95	0.00644 < LC < 0.02069
4 = 0.01513	.95	0.00749 < LC < 0.02254
5 = 0.01652	.95	0.00847 < LC < 0.02418
10 = 0.02236	.95	0.01289 < LC < 0.03077
20 = 0.03225	.95	0.02133 < LC < 0.04144
30 = 0.04201	.95	0.03044 < LC < 0.05173
40 = 0.05264	.95	0.04084 < LC < 0.06312
50 = 0.06498	.95	0.05297 < LC < 0.07711
60 = 0.08021	.95	0.06725 < LC < 0.09622
70 = 0.10051	.95	0.08455 < LC < 0.12530
80 = 0.13091	.95	0.10765 < LC < 0.17533
90 = 0.18885	.95	0.14678 < LC < 0.28643
95 = 0.25558	.95	0.18773 < LC < 0.43379
96 = 0.27912	.95	0.20150 < LC < 0.48998
97 = 0.31106	.95	0.21973 < LC < 0.56934
98 = 0.35923	.95	0.24641 < LC < 0.69543
99 = 0.45073	.95	0.29489 < LC < 0.95408

Regression line: $Y = A + \text{Slope} * (X - M)$

A= 5.215376 +/- .1047333 (probit unit)

5.110643 < A < 5.32011

Slope= 2.766234 +/- .4103722

2.355862 < B < 3.176606

M=-1.109362 in LOG₁₀(dose) unit, and 0.0777 in dose unit

Variance of the LC50= 1.566893E-03

heterogeneity= 1