

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**RESISTÊNCIA “*KNOCKDOWN*” A INSECTICIDAS EM
POPULAÇÕES DE *ANOPHELES GAMBIAE* GILES, 1902 DE
ANGOLA, ÁFRICA AUSTRAL**

YOLANDA MARINA VENANCIO REBELO CARDOSO

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

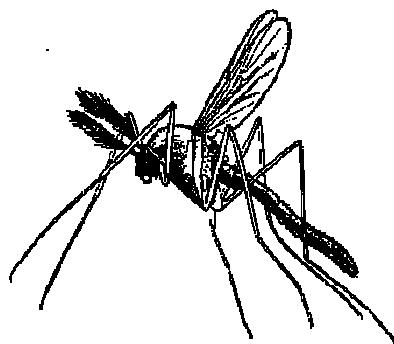
2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**RESISTÊNCIA “KNOCKDOWN” A INSECTICIDAS EM
POPULAÇÕES DE *ANOPHELES GAMBIAE* GILES, 1902 DE
ANGOLA, ÁFRICA AUSTRAL**

YOLANDA MARINA VENANCIO REBELO CARDOSO



MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2007

Orientação:

Doutor João Pedro Soares da Silva Pinto, Centro de Malária e outras Doenças Tropicais
(IHMT/UNL)

Professora Doutora Maria Teresa Ferreira Ramos Nabais Oliveira Rebelo (DBAS/FCUL)

Dedicatória:

Ao meu marido e aos meus filhos, por tudo.

Agradecimentos

A Deus por renovar as minhas forças a cada manhã.

Ao Doutor João Pinto, meu orientador externo, pelo muito que me ensinou, pelo rigor do seu trabalho e grande disponibilidade.

À Professora Teresa Rebelo, minha orientadora interna, pela grande ajuda, interesse e disponibilidade

Ao Professor Filomeno Fortes, por ter financiado a minha viagem a Angola, por todo o apoio prestado durante o trabalho no terreno, pela grande atenção e orientação profissional.

Ao Doutor Derek Charlwood pelo estímulo e pelo muito que me ensinou durante as actividades no terreno, em Angola.

À Dra Carla Sousa pela grande ajuda e disponibilidade sempre que a ela recorri.

Ao Dr. José Luís Vicente pela enorme paciência, ajuda incansável e pelo facto de a palavra “não” não pertencer ao seu léxico. Um grande e sentido muito obrigada.

Ao Professor Doutor Virgílio do Rosário, Director da UEI Malária/CMDT e Doutor Luís Távora Távora, Coordenador do CMDT/IHMT, por me terem providenciado as condições laboratoriais e logísticas necessárias para o meu trabalho.

À Professora Deodália Dias, pela atenção, paciência e valiosos conselhos profissionais.

Aos investigadores e colegas do CMDT por terem tornado o meu tempo de trabalho no Instituto muito agradável. De todos guardo um grande apreço.

A todos os colegas e amigos da Faculdade de Ciências de Lisboa, Université Catholique de Louvain e Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

À minha muito querida mãe pelos sacrifícios que fez e continua a fazer por mim.

À minha sogra. Ao meu tio Venâncio e ao meu primo Márcio pelo grande carinho e apoio. Às minhas tias Iria, São, Luisinha e Mitó e aos meus primos em Luanda por me terem recebido com tanto carinho depois de tantos anos longe.

Ao casal Sarah e Richard Robison pelo carinho com que me tem tratado ao longo da minha vida.

Às famílias Reis, Andrade e Paul pelo grande estímulo e apoio. Aos meus amigos: Solival Martins, Márcia Pereira, aos irmãos Jônatas e Déborah Lee Fife, Paulo Jorge Lopes, Zi Cardoso, Gaelle e Anais Stubs. Obrigada pelo encorajamento.

Este trabalho foi co-financiado pelo Projecto HAMSET/Banco Mundial (Programa Nacional de Controlo da Malária, Ministério da Saúde de Angola) e pelo Centro de Malária e outras Doenças Tropicais, Laboratório Associado do Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior.

Resumo

Em Angola, a malária é responsável por 35% da mortalidade infantil abaixo dos cinco anos, 25% da mortalidade em mulheres grávidas e 60% das admissões hospitalares. Neste país, uma fracção importante da luta contra a doença tem por base o controlo vectorial com uso de insecticidas. Em *Anopheles gambiae* s.s., principal vector de malária na África sub-Sahariana, duas mutações pontuais no gene que codifica os canais de sódio das membranas nervosas, conferem resistência *knockdown* (*kdr*) aos insecticidas piretróides e ao DDT.

Os objectivos deste trabalho foram i) avaliar os níveis de resistência a insecticidas piretróides e ao DDT, em populações de vectores de malária de Angola, e ii) identificar mutações presentes no gene *voltage-gated sodium channel*, de *A. gambiae* s.s. associadas à resistência *kdr* àqueles insecticidas.

Foram realizadas colheitas entomológicas em 4 províncias de Angola no final da época seca de 2006. Os anofelíneos capturados foram sujeitos a ensaios de susceptibilidade a insecticidas, através de testes da OMS. A caracterização de espécie e forma molecular foi efectuada por PCR-RFLP. A presença de mutações *kdr* em *A. gambiae* s.s. foi detectada por PIRA-PCR.

Dos 1010 mosquitos capturados, 237 pertenciam ao Complexo *A. gambiae*. De entre estes encontraram-se 215 *A. gambiae* s.s. dos quais 195 foram identificados como pertencendo à forma molecular M, 20 à forma molecular S. e 16 foram identificados como *A. melas*. Os níveis de resistência encontrados foram baixos, exceptuando nos mosquitos do Grupo *Anopheles listeri* em Benguela, que apresentaram mortalidade inferior a 80% para o DDT, sugerindo resistência.

Os alelos de resistência foram encontrados nas províncias de Cabinda e Luanda embora, a nível individual, não se tenha observado relação directa entre a sua presença e a manifestação do fenótipo resistente. Para um diagnóstico mais preciso dos níveis de resistência *kdr* em Angola, será desejável a repetição da amostragem durante o período de transmissão da malária.

Palavras-chave: *Anopheles gambiae*, insecticidas, resistência *knockdown*, genes *kdr*

Abstract

Malaria is one of leading causes of morbidity and mortality in Angola, being responsible for 60% of hospital admissions and accounting for 35% of under five children mortality and 25% of mortality in pregnant women. Vector control using insecticides constitutes a major part of the fight against malaria in that country. *Anopheles gambiae* s.s., is the major vector in sub-Saharan Africa and is amongst the most important vector of malaria transmission in Angola. In this species two point mutations have been identified in the gene encoding the voltage gated sodium channel, conferring resistance to DDT/Pyrethroids.

The aims of this study were to identify the DDT/Pyrethroid insecticide knock down resistance status of vector populations in Angola and to identify mutations in the gene encoding the voltage gated sodium channel that may confer resistance to DDT/Pyrethroid insecticides.

Samples were collected from 4 different provinces in Angola at the end of the dry season in 2006, for entomological studies. The anopheline species collected were subject to insecticide susceptibility assays according to WHO standards. PCR-RFLP was used to characterize the species and the molecular form of the vector population. PIRA-PCR was used to detect *kdr* mutations in *A. gambiae* s.s.

Out of 1010 mosquito vectors analysed, 237 belonged to the *A. gambiae* complex. There were 215 *A. gambiae* s.s., 195 of which belonged to the molecular form M and 20 belonged to the molecular form S. 18 mosquitoes were identified as *A. melas*. The overall level of resistance to DDT/pyrethroid was very low except in the *Anopheles listeri* Group from the province of Benguela which showed a mortality rate under 80% with DDT, thus suggesting resistance.

The *kdr* insecticide resistance alleles were found in *Anopheles gambiae* s.s. from the provinces of Cabinda and Luanda. However, there was no direct relationship between genotype and phenotype. Further studies will have to be carried out during malaria transmission season in order to further assess the levels of resistance in Angola.

Key words: *Anopheles gambiae*, insecticides, knockdown resistance, *kdr* genes

Índice

Dedicatória	III
Agradecimentos	IV
Resumo	VI
Abstract	VII
Índice	VIII
Lista de abreviaturas	X
Índice de figuras	XI
Índice de tabelas	XIII
I. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS	1
1. A malária	2
2. Biologia da malária	3
2.1. O parasita	3
2.2. O vector	5
2.2.1. Ciclo de vida dos mosquitos <i>Anopheles</i> e factores determinantes	6
2.3. O complexo <i>Anopheles gambiae</i>	8
2.3.1. Variabilidade genética e especiação incipiente em <i>A. gambiae</i>	9
3. Controlo da malária	11
3.1. Controlo vectorial	12
3.1.1. Controlo vectorial químico	12
3.2. Resistência a insecticidas	13
3.2.1. Resistência <i>knockdown</i>	14
4. A malária em Angola	16
5. Objectivos	17
II. MATERIAL E MÉTODOS	18
1. Localização das zonas de colheita e obtenção das amostras	19
2. Colheita das amostras	20
3. Ensaio de susceptibilidade a insecticidas	21
3.1. Procedimento dos testes de susceptibilidade	21
3.2. Interpretação dos testes de susceptibilidade	22
4. Identificação morfológica	23
5. Extração de DNA	23
6. Identificação molecular das espécies e formas moleculares de <i>A. gambiae</i>	24
s.l.	
6.1. Reacção de PCR	24
6.2. Reacção de restrição enzimática	25
7. Genotipagem molecular dos genes <i>kdr</i> em <i>A. gambiae</i> s.s.	26
7.1. Detecção da mutação L1014S (TTA→TCA)	26
7.1.1. Reacção de PCR	26
7.1.2. Reacção de restrição enzimática	27
7.2. Detecção da mutação L1014F (TTA→TTT)	27
7.2.1. Reacção de PCR	27
7.2.2. Reacção de restrição enzimática	28
III. RESULTADOS	29
1. Identificação morfológica	30
1.1. Província de Cabinda	30
1.2. Província de Luanda	30
1.3. Província de Benguela	31
2. Identificação molecular do complexo <i>A. gambiae</i>	31
3. Testes de resistência	32

4. Mutações knockdown resistance em <i>A. gambiae</i> s.s.	33
4.1. Frequências alélicas	33
4.2. Frequências genotípicas por	34
4.3. Correlação genótipo <i>kdr</i> / fenótipo de resistencia	34
IV. DISCUSSAO	36
1. Identificação morfológica	37
2. Identificação molecular do complexo <i>A. gambiae</i>	38
3. Testes de resistência	39
4. Mutações <i>knockdown resistance</i> em <i>A. gambiae</i> s.s.	39
5. Considerações finais	40
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
Anexo I	51
Anexo II	52
Anexo III	54

Lista de abreviaturas

ACTs	Terapias Combinadas de Artemisina
BSA	Albumina de soro bovino
CMDT	Centro de Malária e outras Doenças Tropicais
ddH ₂ O	Água bidestilada, autoclavada
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP:	3'- deoxinucleósido -5'- trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>H-W</i>	Hardy-Weinberg
IGS	Espaçador intergénico
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
ITNs	Insecticide Treated Nets
ITS	Espaçador interno transcrito
<i>kdr</i>	Resistência <i>Knockdown</i>
<i>kdr-e</i>	Resistência <i>knockdown</i> de tipo “east”
<i>kdr-w</i>	Resistência <i>knockdown</i> de tipo “west”
<i>N</i>	Tamanho da amostra
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Número de pares de bases
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
PIRA PCR	Primer Introduced Restriction Analysis
rDNA	DNA Ribossomal
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
TBE	Tampão composto por Tris, ácido bórico e EDTA
TE	Tampão de eluição composto por Tris-EDTA
Tris	Tri (hidroximetil) aminoetano
Tris-HCL	Tris Hidroclorido
U	Unidade de enzima
UV	Ultra Violeta
VBD	Doença Transmitida por Vector (<i>vector born disease</i>)

Índice de figuras

I. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

Figura 1. Detalhe do quadro La malária (1850-1851) pintado por August Ernest Hébert (1817-1908)	1
Figura 2. Distribuição mundial do risco de transmissão da malária, 2005	3
Figura 3. O ciclo de vida do parasita da malária	4
Figura 4. O ciclo de vida dos mosquitos <i>Anopheles</i>	7
Figura 5. Anatomia geral do mosquito e principais diferenças morfológicas entre anofelíneos e culicídeos	8
Figura 6. Fórmulas químicas de dois insecticidas pertencentes às classes mais utilizadas em termos de saúde pública: Organoclorinos e piretróides	13
Figura 7. Representação esquemática dos quatro domínios do canal de sódio	15
Figura 8. Distribuição dos alelos <i>kdr</i> em África	16

II. MATERIAL E METODOS

Figura 9. Figura retirada em http://www.offthemark.com/	18
Figura 10. Distribuição da malária em Angola e localização das províncias prospectadas	20
Figura 11. Procedimento para a determinação da susceptibilidade/ resistência de mosquitos adultos a insecticidas, com base nos kits da O.M.S.	22
Figura 12. Representação esquemática das terminações 3' e 5' do fragmento 561-600 das regiões IGS sequenciadas nas espécies de <i>A. gambiae</i> (formas S e M)	24
Figura 13. Fotografia do gel de agarose (2%) para identificação simultânea das espécies e formas moleculares do Complexo <i>A. Gambiae</i>	26
Figura 14. Fotografia do gel de agarose (3%) para identificação dos alelos <i>kdr</i> em <i>A. gambiae</i> s.s. e esquema do padrão de restrição esperado para a caracterização do locus <i>kdr</i>	28

III. RESULTADOS

Figura 15. Mapa de Angola com indicação das províncias prospectadas bem como das cidades de referencia dos locais de colheita 32

Figura 16. Frequências dos alelos do locus *kdr* em *A. gambiae* s.s. nas províncias angolanas de Cabinda, Luanda e Benguela 34

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Figura 17. Figura retirada de [http://www. aenews.wsu.edu](http://www.aenews.wsu.edu) 42

Índice de tabelas

I. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

Tabela 1. Diferenças entre controlo e erradicação da malária	11
---	----

II. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 2. Sequência dos primers e enzimas de restrição	26
---	----

III. RESULTADOS

Tabela 3. Número de mosquitos anofelíneos capturados (e sua frequência) em Luanda, de acordo com a espécie e com a fase do ciclo de vida.	31
Tabela 4. Número de mosquitos anofelíneos capturados(e sua frequência) em Benguela, de acordo com a espécie e com a fase do ciclo de vida.	31
Tabela 5. Resultados dos ensaios de susceptibilidade, de acordo com a província, por insecticidas e por complexo/ grupo de espécie.	33
Tabela 6. Frequências genotípicas para cada província.	34
Tabela 7. Resultados dos testes de susceptibilidade aos insecticidas DDT e piretróides.	35

INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS



Figura 1. Detalhe do quadro La malaria (1850-1851) pintado por august Ernest Hébert (1817-1908). Adaptado de www.im.microbios.org;

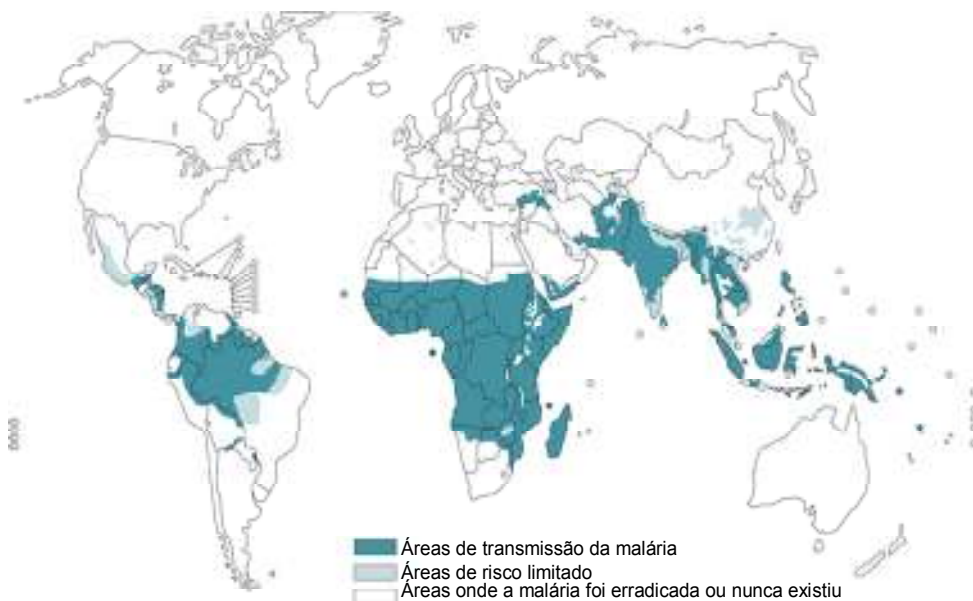
I. INTRODUÇÃO

1. A MALÁRIA

A Malária humana, também conhecida por paludismo, impaludismo ou febre palustre, é provavelmente uma das doenças com maior impacto na humanidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que, anualmente, 350 a 500 milhões de pessoas sejam infectadas saldando-se em cerca de um milhão de mortes. 90% dos casos de malária são registados no continente Africano a Sul do Sahara. As principais vítimas são crianças abaixo dos cinco anos de idade e mulheres grávidas (WHO, 2005). Trata-se de uma patologia infecciosa aguda ou crónica transmitida por um mosquito vector e que, nos humanos, é causada por quatro espécies de parasitas protozoários do género *Plasmodium* (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale*). Estes parasitas apresentam um ciclo de vida complexo, alternando entre hospedeiros humanos e mosquitos fêmeas do género *Anopheles*.

A malária é uma doença essencialmente tropical e subtropical (Fig.2). A sua distribuição geográfica é reflexo de vários factores tais como o clima, factores populacionais, sócio-económicos, distribuição vectorial e interacções entre parasita, homem e vector (WHO, 2005). A doença é endémica em extensas regiões de África, da Ásia, da América Central e do Sul e ainda no Médio Oriente e Oceânia, onde habitam 2,4 biliões de pessoas perfazendo cerca de 40% da população mundial (Diggins, 2002).

Mesmo em áreas tropicais e subtropicais, a transmissão não ocorre em condições de elevada altitude (acima de ca. 2000), em desertos (excluindo zonas de oásis) e em algumas ilhas do Pacífico onde não ocorrem espécies vectoras. Na Região Europeia da OMS a situação da malária é heterogénea do ponto de vista epidemiológico. Há países com malária endémica como a Turquia, e outros países onde se observou um reaparecimento da endemia. Na União Europeia a grande maioria dos casos são importados. Estes casos têm vindo a aumentar ao longo da última década, principalmente à custa da imigração, do aumento das viagens intercontinentais para zonas tropicais endémicas, do surgimento da resistência aos anti-palúdicos, e do aumento da endemia, particularmente em África (Legros & Danis, 1998; Sabatinelli *et al*, 2001). As alterações climáticas e ambientais globais têm levantado a preocupação sobre uma possível re-emergência da malária em certas regiões temperadas, onde esta doença se encontra actualmente erradicada (WHO, 2006 a).



Fonte: O.M.S. , 2005

Figura 2. Distribuição mundial do risco de transmissão da malária de acordo com a OMS em 2005. Figura adaptada de www.rbm.who.int

Para além da elevada mortalidade, atribuída essencialmente à infecção por *P. falciparum*, a malária provoca também uma grande morbilidade devido à febre, fraqueza, subnutrição, anemia, inflamação do baço e baixa de imunidade conferindo vulnerabilidade a outras doenças. A severidade dos sintomas é variável dependendo da conjugação de vários factores tais como a idade, o nível de exposição à infecção, a espécie e o genótipo do parasita. Em áreas endémicas, as crianças são mais susceptíveis de desenvolver malária grave. Nos adultos, o desenvolvimento de uma imunidade parcial ou premunição, permite-lhes tolerar melhor a infecção pelo que podem ser portadores assintomáticos. A malária é uma patologia curável, podendo no entanto evoluir rapidamente tornando-se fatal ou deixando graves sequelas, caso o diagnóstico e o tratamento não sejam atempados ou adequados (Bremen, 2001).

2. BIOLOGIA DA MALÁRIA

2.1. O parasita

O género *Plasmodium* (Fig. 3) inclui cerca de 120 espécies que infectam hospedeiros vertebrados mamíferos, aves e répteis. Contudo, as espécies *P. vivax*, *P. malariae*, *P. falciparum* e *P. ovale* são os únicos agentes etiológicos da malária humana.

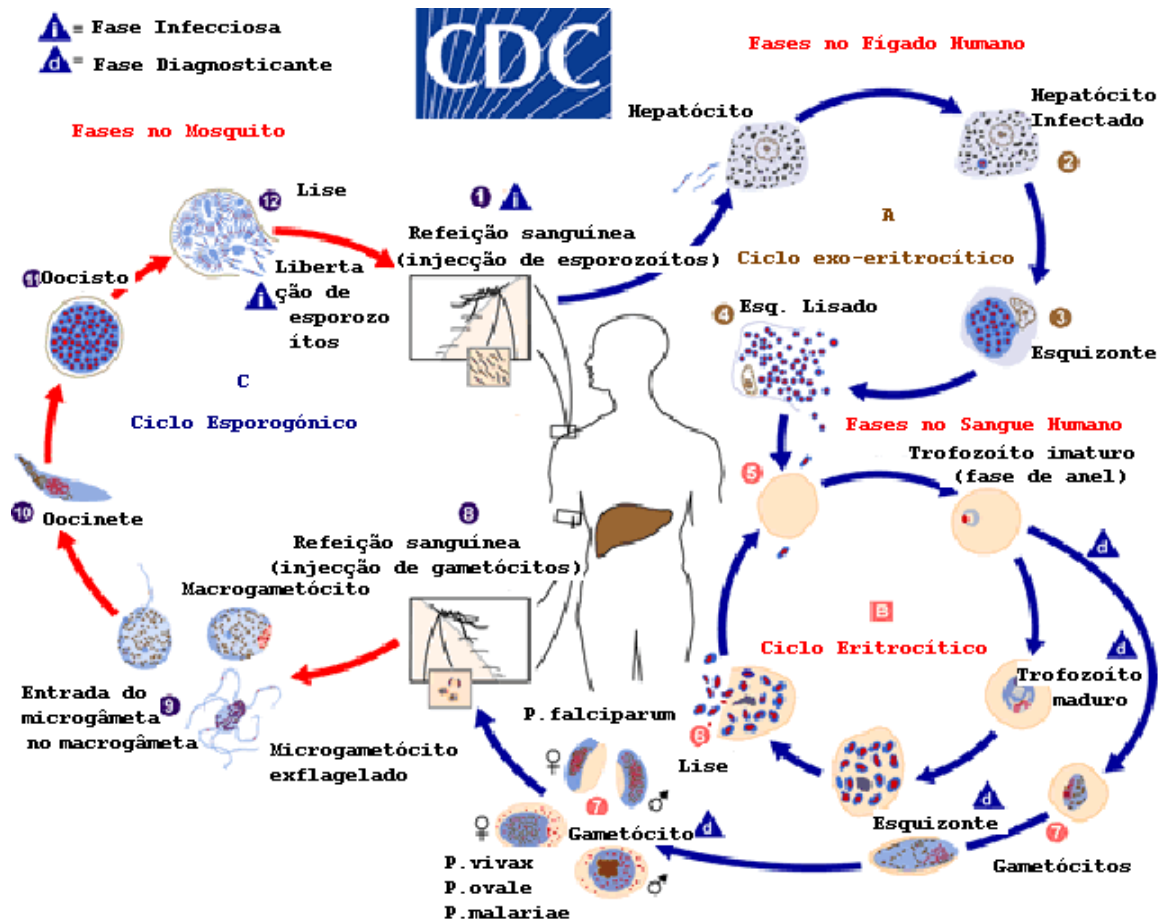


Figura 3. O ciclo de vida do parasita da malária. Durante uma refeição sanguínea, um mosquito fêmea infectado inocula esporozoítos no hospedeiro humano. Os esporozoítos infectam os hepatócitos e sofrem maturação que envolve multiplicação por mitoses sucessivas, passando a esquizontes, os quais se rompem libertando merozoítos. Após esta multiplicação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica) o parasita sofre reprodução assexuada nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica). Os merozoítos infectam os glóbulos vermelhos que se desenvolvem em esquizontes, os quais se rompem libertando merozoítos. Alguns merozoítos diferenciam-se em gametócitos. Os gametócitos macho (microgametócitos) e fêmea (macrogametócitos), são ingeridos por um mosquito fêmea durante a refeição sanguínea. O ciclo esporogônico compreende a multiplicação dos parasitas no mosquito. Ainda no estômago do mosquito, os microgâmetas fertilizam os macrogâmetas originando zigotos. Os zigotos sofrem meiose e tornam-se móveis e alongados (ocinetes) os quais invadem as paredes do estômago do mosquito onde se desenvolvem formando oocistos. Ocorre então uma fase de multiplicação por mitoses sucessivas e os oocistos rompem-se libertando esporozoítos. Estes deslocam-se para as glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos num novo hospedeiro humano reinicia o ciclo de vida. Figura adaptada de CDC (www.cdc.org).

Classificação Sistemática: Género *Plasmodium* (Ayala et al., 1998):

- Reino Protista
- Filo Apicomplexa
- Classe Hematozoa
- Ordem Haemosporidae
- Família Plasmodiidae
- Género *Plasmodium*

Durante o seu ciclo de vida, o *Plasmodium* alterna entre dois hospedeiros: um vertebrado (e.g. o Homem) e um invertebrado (o mosquito). O seu ciclo de vida pode ser dividido em 4 fases:

1. Fertilização, fase sexuada que ocorre no estômago do mosquito vector após uma refeição com sangue infectado.
2. Esporogonia, primeira fase assexuada que ocorre na parede do estômago do mosquito.
3. Esquizogonia hepática, segunda fase assexuada que tem lugar no fígado do hospedeiro vertebrado após inoculação do parasita pela refeição sanguínea do mosquito.
4. Esquizogonia eritrocitária, terceira fase assexuada que ocorre nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, responsável pelos sintomas de malária.

2.2. O vector

Os mosquitos pertencem à Família Culicidae, uma das mais importantes da Ordem Diptera, e caracterizam-se por ter um aparelho bucal do tipo picador-sugador alongado, constituído por vários estiletos protegidos por uma bainha comum. Esta morfologia permitiu a aquisição de hábitos hematófagos podendo alimentar-se de sangue de vários vertebrados entre os quais o Homem, conferindo-lhes uma grande importância médica (Richards & Davies, 1977). A subfamília Anophelinae inclui três géneros (*Anopheles*, *Bironella* e *Chagasia*) sendo o género *Anopheles* o de maior importância médica, uma vez que são os únicos mosquitos que transmitem as espécies de *Plasmodium* que infectam humanos, além de serem vectores de filarioses e várias arboviroses (Service, 1980). O género *Anopheles* conta com cerca de 430 espécies conhecidas das quais 70 são vectores da malária e destes apenas 40 possuem relevância médica (Service & Townson, 2002).

Classificação Sistemática de acordo com a classificação de Richards & Davies (1977):

- Reino Animalia
- Filo Arthropoda
- Classe Insecta
- Subclasse Pterigota
- Ordem Diptera
- Subordem Nematocera
- Família Culicidae
- Subfamília Anophelinae
- Género *Anopheles*

2.2.1. Ciclo de vida dos mosquitos *Anopheles* e factores determinantes

O ciclo de vida de um mosquito compreende uma fase aquática e uma fase terrestre (Fig. 4). Os ovos demoram cerca de 1 a 2 dias a eclodir, originando larvas que irão passar por quatro estadios sucessivos. Após o quarto estadio, a larva sofre uma metamorfose para a pupa. Apesar da pupa não se alimentar, ela mantém-se activa durante 1 a 2 dias após os quais o adulto emerge apresentando uma cabeça, tórax e abdómen distintos. Normalmente, os mosquitos macho emergem cerca de 24 horas antes dos mosquitos fêmea. Para que as fêmeas completem o primeiro ciclo gonotrófico, necessitam de duas refeições sanguíneas. A maturação dos ovos leva geralmente 2 a 4 dias.

A duração do ciclo de vida do mosquito depende da espécie e das condições ambientais, em particular da temperatura. Na fêmea, é regulado por três factores comportamentais essenciais: (1) Procura do hospedeiro e refeição sanguínea (geralmente durante a noite). Somente as fêmeas se alimentam de sangue, um elemento essencial para o desenvolvimento dos ovos. A localização do hospedeiro é feita a vários níveis, intervindo vários estímulos, de ordem olfactiva e visual (Service & Townson, 2002). Por definição, a tendência para de um mosquito se alimentar de sangue humano é designada por antropofilia. Quando o mosquito procura o sangue de outros animais, esta tendência é designada por zoofilia (Snow & Gilles, 2002) (2) A digestão do sangue e desenvolvimento gonotrófico resultam na maturação dos ovos. As fêmeas paras (que fizeram uma ou mais posturas) necessitam de uma única refeição sanguínea para fazer uma postura, enquanto que as fêmeas nulíparas (que nunca realizaram uma postura) podem precisar de duas refeições sanguíneas para poderem completar o desenvolvimento dos seus ovários. Neste caso diz-se ser uma fêmea pré-grávida. (3) Procura do local adequado para a postura. Tal como na procura do hospedeiro, são tidos em conta estímulos olfactivos e visuais (Service & Townson, 2002).

A anatomia básica de todos os mosquitos (Fig.5) é similar, mas os géneros diferem em detalhes importantes na morfologia dos ovos e disposição, posição larvar relativamente à superfície da água e na posição do adulto em repouso (Service & Townson, 2002).

A sobrevivência do vector é um factor determinante na avaliação da capacidade vectorial, pois quanto maior a longevidade das fêmeas, maior a probabilidade de estas se infectarem por agentes patogénicos (Fernandez & Forattini, 2003) e esta característica depende directamente de factores ambientais como a temperatura e humidade relativa mas varia também de acordo com a espécie (Service & Townson, 2002). Factores comportamentais tais como a antropofilia também condicionam a capacidade vectorial (Constantini *et al.*, 1999).



Figura 4. O ciclo de vida de mosquitos *Anopheles*. Adaptado de www.medscape.com

A capacidade de um mosquito vector transmitir um patógeno resulta de uma interacção complexa de diversos factores. A capacidade vectorial de uma população de mosquitos é uma característica quantitativa que reflecte a receptividade à malária de uma determinada área, através de uma estimativa do número potencial de picadas infectantes secundárias que podem ser geradas a partir de uma pessoa infectada. Para o cálculo desta medida, entram os principais factores que determinam o nível de transmissão da malária incluindo a densidade populacional do vector, a frequência de picada, a sobrevivência e a duração do ciclo esporogónico do parasita (Black & Moore, 1996).

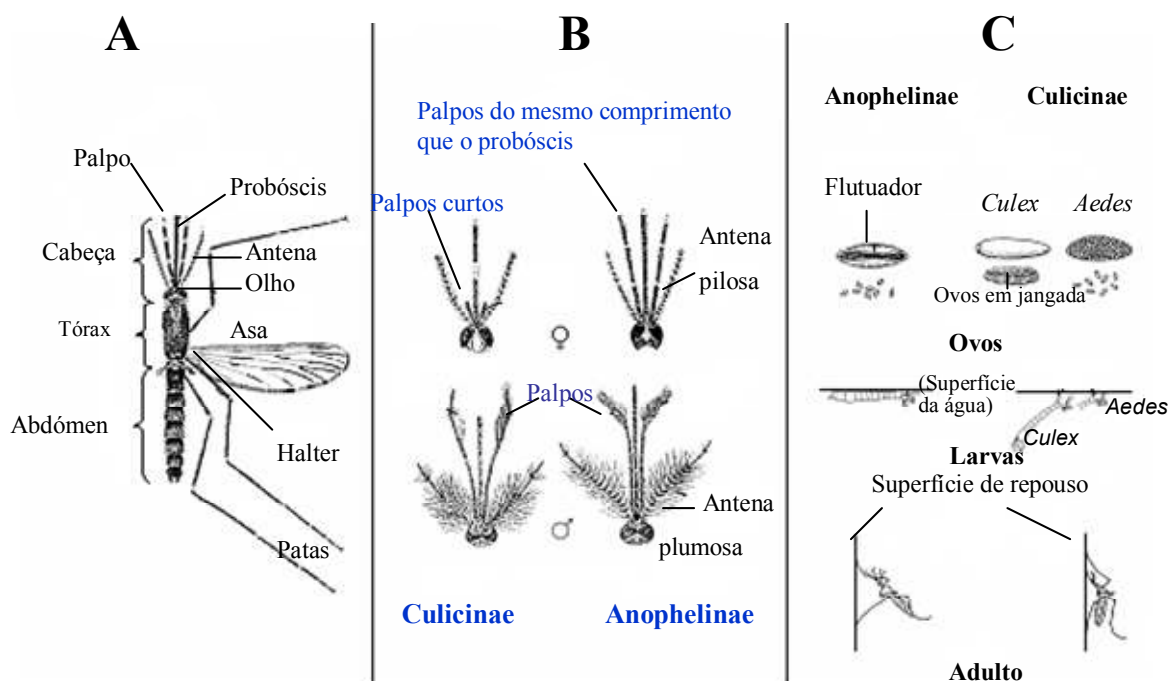


Figura 5. Anatomia geral do mosquito (A) e principais diferenças morfológicas entre anofelineos e culicíneos (B). Diferenças a nível dos ovos, larvas e na postura em repouso (C). Figura adaptada de Pinto *et al.* (2003).

2.3. O Complexo *Anopheles gambiae*

Frequentemente, critérios morfológicos permitiram o agrupamento de populações de mosquitos numa determinada espécie. Contudo subsequentes análises genéticas, moleculares e de cruzamentos em laboratório, revelaram que estas populações pertencem a entidades reprodutivamente isoladas, constituindo espécies biológicas diferentes. Estas espécies, crípticas ou gémeas, apesar de morfologicamente indistintas, podem apresentar grandes diferenças bio-ecológicas e comportamentais, que influenciam o modo como transmitem a malária (Coluzzi, 1984). Um grupo constituído por várias espécies, com ascendência evolutiva comum, tem a designação de complexo específico (Service & Townson, 2002). O Complexo *Anopheles gambiae* é composto por 7 espécies gémeas: *Anopheles gambiae sensu stricto* (s.s.) Giles, 1902; *Anopheles arabiensis* Patton, 1905; *Anopheles quadriannulatus* Theobald, 1911; *Anopheles melas* Theobald, 1903; *Anopheles merus* Dönitz, 1902; *Anopheles bwambae* White, 1985; e *Anopheles quadriannulatus* espécie B (Hunt *et al.*, 1998). Este Complexo inclui os mais eficientes vectores Afrotropicais de malária, nomeadamente *A. gambiae* s.s. e *A. arabiensis* (White 1974; Coetzee *et al.*, 2000). Estas são igualmente as espécies do complexo com maior distribuição geográfica no continente Africano. *A. gambiae* s.s. predomina em regiões húmidas, é antropofílico e repousa no interior das habitações (endofilia). *A. arabiensis*, apesar de ser também encontrado em regiões húmidas, é mais tolerante a regiões de savana, mais áridas e é

relativamente menos antropofílico que *A. gambiae* s.s, alimentando-se também em animais domésticos. Estas duas espécies ocorrem em simpatria em extensas áreas da sua distribuição e as abundâncias relativas variam sazonalmente (White & Rosen 1973, Charlwood *et al.*, 1995). *A. quadriannulatus* encontra-se restrito a zonas do Nordeste e Sul de África, sendo exofílico e zoofílico, bem como o único membro do complexo que não é considerado vector da malária. As espécies *A. merus* e *A. melas*, ocorrem nas regiões litorais do Este e Oeste africanos, respectivamente. Ambas estão adaptadas a ambientes de água salobra e apresentam também alguma tendência zoofílica e exofílica, sendo considerados vectores de menor importância (Lindsay *et al.*, 1998; Coetzee *et al.*, 2000).

Dadas as diferenças bio-ecológicas existentes entre as espécies do Complexo *gambiae*, a identificação específica é claramente uma fase crítica para qualquer programa de controlo vectorial que se queira efectivo (Collins *et al.*, 2000). Uma vez que as espécies crípticas que compõem os complexos geralmente diferem na sua capacidade vectorial, uma identificação correcta das espécies é essencial para a investigação das patologias transmitidas. No caso do Complexo *gambiae*, é possível discriminar inequivocamente todas as espécies, essencialmente com recurso a duas técnicas. A análise citogenética permite a identificação das espécies com base em inversões cromossómicas paracêntricas fixas, específicas de espécie, em regra localizadas no cromossoma X (Coluzzi, 1968; Hunt, 1973). Mais recentemente, foram desenvolvidos métodos moleculares para identificação das espécies deste Complexo. Estes métodos baseiam-se essencialmente em técnicas de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR), que amplificam sequências da região *intergenic spacer* (IGS) do DNA ribossomal os quais apresentam polimorfismos de tamanho específicos para cada espécie (Scott *et al.*, 1993).

2.3.1. Variabilidade genética e especiação incipiente em *A. gambiae* s.s.

As actividades humanas são reconhecidas como importantes motores de mudança e heterogeneidade ambiental. Assim, podem agir como força evolutiva favorecedora da emergência e isolamento de variações genéticas e levando, eventualmente, ao isolamento reprodutivo, em espécies biológicas sinantrópicas (Coluzzi, 1979). Este tipo de especiação é particularmente importante em mosquitos com importância médica, resultando em entidades taxonómicas crípticas, isto é, com isolamento reprodutivo, mas sem diversificação fenotípica (Coluzzi, 1994).

O genoma de *A. gambiae*, apresenta dez inversões cromossômicas fixas, das quais cinco se encontram no cromossoma X, e trinta e uma inversões polimórficas, estando dezoito delas no braço direito do cromossoma 2 (Coluzzi *et al.*, 2002). O estudo destas inversões paracêntricas, por Coluzzi *et al.* (1985), levou à descrição de cinco formas cromossômicas, ou citoformas, designadas por FOREST, SAVANNA, MOPTI, BAMAKO e BISSAU. Estas citoformas diferem entre si por possuírem determinados arranjos cromossômicos característicos, sendo a ocorrência de híbridos bastante baixa (Coluzzi *et al.*, 1979, 1985).

A distribuição das diferentes citoformas, isto é, de populações de mosquitos portadores de determinados arranjos cromossômicos, não é feita ao acaso reflectindo a tendência de cada cariótipo para se fixar nas condições ambientais onde se adapta melhor. Uma consequência evolutiva da escolha do habitat óptimo por portadores de inversões alternativas pode ser a possibilidade de poderem procurar e adaptar-se a novos nichos ecológicos (Coluzzi *et al.*, 1979).

As formas cromossômicas MOPTI e SAVANNA/BAMAKO coincidem respectivamente com duas formas moleculares, designadas por M e S que diferem na sequência das regiões dos espaçadores transcritos internos 1 e 2 (ITS-1 e ITS-2) e do espaçador intergénico (IGS) (della Torre *et al.*, 2001; Gentile *et al.*, 2001). Existem evidências de que estas formas moleculares representam unidades de um processo de especiação incipiente em *A. gambiae* s.s. (della Torre *et al.*, 2001, 2002). A evidência mais óbvia é a baixa frequência de híbridos (em regra inferior a 1%) encontrados nas extensas regiões onde estas formas ocorrem em simpatria, natureza (della Torre *et al.*, 2005). Também a frequência de genes *knockdown resistance*, (*kdr*), que conferem resistência a insecticidas, difere bastante entre formas, sendo muito mais elevada na forma S do que na forma M, mesmo em condições de simpatria (della Torre *et al.*, 2001; Fanello *et al.*, 2003). No entanto, é na divisão 6 e parte da divisão 5 do cromossoma X que se encontra a maior diferenciação genética entre as formas M e S. Pelo facto de esta região ser adjacente ao centrómero, estando menos sujeita a recombinação genética, os elevados níveis de diferenciação entre as formas M e S nesta região, levaram a sugerir a presença de genes de isolamento reprodutivo que possam estar sob o efeito da selecção natural (Slotman *et al.*, 2006). Sabe-se que em populações parcialmente isoladas, as regiões de baixa recombinação diferenciam-se mais rapidamente que outras regiões (Begun & Aquadro, 1993).

3. CONTROLO DA MALÁRIA

Em 1955, a OMS iniciou uma grande campanha de erradicação da malária obtendo um grande sucesso, essencialmente em países de regiões temperadas (Beales & Gilles, 2002). No início de 1962, a malária foi erradicada nestes locais salvando cerca de 317 milhões de pessoas. No entanto, as condições para a erradicação não foram encontradas em todas as áreas afectadas, especialmente em África, onde nunca se desenvolveram verdadeiros esforços continuados. Os recursos logísticos, humanos e financeiros necessários apenas foram reunidos num reduzido número de países, o que terá levado ao abandono do conceito de erradicação (WHO, 2006a). As principais diferenças entre controlo e erradicação da malária estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Diferenças entre controlo e erradicação da malária. Adaptada de Beales & Gilles (2002).

	Controlo	Erradicação
Objectivos	Redução da mortalidade e incidência da doença até que deixe de ser um problema maior de saúde pública	Fim da transmissão do parasita e eliminação do reservatório humano de infecção.
Duração	Indefinida	Limitada no tempo
Área de operação	Apenas em áreas de elevada incidência	Em todas as áreas de transmissão
Cobertura total	Não necessária	Indispensável
Padrões operacionais	Bons	Perfeitos
Acessibilidade de resultados	Amostragem populacional para determinação de mortalidade, incidência e prevalência, parasitemia e taxas esplénicas.	Detecção de casos em fases avançadas; procedimentos de vigilância.
Casos importados	Não relevantes	Preocupantes em fases avançadas do programa.
Custo	Recorrentes	Investimento de capital. Após conclusão os custos são apenas com a vigilância.

Actualmente o controlo da malária tem-se baseado em medidas direccionadas para o vector e no recurso a medicamentos anti-maláricos tanto para a cura como para a profilaxia (Cravo & Rosário, 2002). No caso do vector, pulverizações domiciliárias com insecticidas residuais e redes mosquiteiras impregnadas com insecticidas constituem os dois métodos principais de intervenção da O.M.S. para o controlo da malária (WHO, 2006a). No que toca ao parasita, o uso de Terapias Combinadas de Artemisina (ACTs) é, actualmente, o mais recomendado para o tratamento dos casos de malária em regiões endémicas sobretudo as mais afectadas pela resistência às monoterapias (www.who.int/tdr).

3.1. Controlo Vectorial

O grande objectivo do controlo vectorial é a redução dos níveis de mortalidade e morbilidade através de uma gradual diminuição da transmissão da doença (Collins *et al.*, 2000). Este controlo pode ser biológico ou químico. O primeiro envolve a redução do vector por introdução de um predador, competidor ou patogénio. Estas metodologias têm a grande vantagem da especificidade, minimizando assim o desequilíbrio ambiental (e.g. *Bacillus thuringiensis*) (Hemingway, 2005). O controlo químico envolve o uso de insecticidas de síntese química. O sucesso de ambos os tipos de controlo requer um bom conhecimento da biologia do vector bem como das condições locais e ecológicas.

3.1.1. Controlo Vectorial químico

Todos os insecticidas foram inicialmente desenvolvidos com fins agrícolas, tendo sido, mais tarde, adaptados ao uso em saúde pública (Hemingway & Ranson, 2005). Os programas de controlo vectorial químico baseiam-se principalmente em quatro classes de insecticidas: organoclorinos, organofosforados, carbamatos e piretróides sendo preferencialmente utilizados os primeiros e os últimos.

Os organoclorinos (Fig. 6A) incluem insecticidas como o dicloro-difeniltricloroetano (DDT) e a dieldrina. Estes compostos e seus análogos, pelo seu alto carácter lipofílico penetram a estrutura cuticular do insecto tendo como alvo os canais de sódio das membranas axonais do sistema nervoso periférico, provocando a morte por hiper-excitação nervosa (Narashi, 1976). O uso alargado deste insecticida deve-se ao facto de ser barato e relativamente seguro, sendo reconhecido pela OMS como o insecticida mais eficaz para uso doméstico (WHO, 2006b).

Os insecticidas piretróides são os únicos compostos licenciados pela OMS para a impregnação de redes mosquiteiras (ITNs) uma vez que são de acção rápida, efectiva e com uma forte acção excito-repelente (Chandre *et al.*, 2000). São compostos químicos análogos estruturais das piretrinas (Fig. 6B), compostos activos naturais extraídos das flores de algumas espécies de crisântemo (Macan, 2006).

A lambdacialotrina e a deltametrina são dois dos piretróides mais conhecidos. Tal como o DDT, estes insecticidas actuam no sistema nervoso, modificando a cinética dos canais de sódio, o que leva à inibição tanto da activação como da

inactivação destes canais, despolarizando a membrana neuronal e provocando a morte do mosquito por paralisia (Hemingway *et al.*, 2004). Este tipo de insecticida não apresenta risco significativo para os mamíferos uma vez que o rápido metabolismo evita a sua acumulação (Macan *et al.*, 2006).

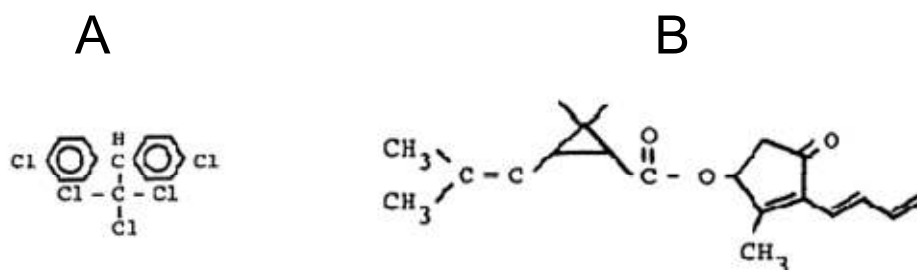


Figura 6. Fórmulas químicas de dois insecticidas pertencentes às classes mais utilizadas em termos de saúde pública: Organoclorinos e piretróides. A – Estrutura química do DDT; B – Estrutura da piretrina. Adaptado de Coats (1990).

3.2. Resistência a insecticidas

A resistência aos insecticidas é uma característica hereditária envolvendo mudanças num ou mais genes de um insecto (Hemingway *et al.*, 2004). O uso extensivo de pesticidas e insecticidas na agricultura, em programas de controlo de vectores e a nível doméstico são considerados as principais causas do aparecimento de resistências em diversas espécies. De acordo com a WHO (1968), a resistência é definida como a “aptidão de uma população de insectos tolerar doses de um determinado insecticida, as quais exerceriam uma acção letal sobre a maioria dos indivíduos de uma população normal da mesma espécie.” Os vectores de malária na região africana têm vindo apresentar estas mudanças relativamente aos insecticidas mais usados em programas de saúde pública. Testes de susceptibilidade ao DDT foram feitos em *A. gambiae* em 21 países sendo que em 10 destes foi observada resistência, a qual é acentuada nas regiões do Oeste, Centro e Sul do continente. Para a permetrina (insecticida piretróide) os níveis de resistência foram testados em 17 países, sendo observada em 8, sobretudo nas regiões a Oeste e Centro (Bagayoko *et al.*, 2005). Devido ao uso em larga escala na agricultura e também a nível doméstico, as pressões selectivas dos insecticidas contra populações anofelineas são quase impossíveis de controlar.

Os mecanismos de resistência a insecticidas podem ser divididos em dois grupos principais: (1) a resistência metabólica – alterações dos níveis ou da actividade das proteínas enzimáticas de destoxificação – e (2) mecanismos “target site” que impedem a ligação do insecticida ao seu alvo. Estes

mecanismos podem actuar separadamente ou em conjunto, conferindo resistência a todas as classes de insecticidas. Adicionalmente, muitos insecticidas, como o DDT e a permetrina, influenciam também o comportamento do insecto, e.g. reduzindo as taxas de entrada dos insectos nas habitações e alterando o número de picadas (Mathenge *et al.*, 2001). Outras alterações consistem no desenvolvimento de cutículas mais espessas ou de estrutura alterada de modo a dificultar a penetração do insecticida (Apperson & Georgiou, 1975).

3.2.1. Resistência *Knockdown*

A resistência a piretróides representa potencialmente a maior ameaça à implementação dos programas de prevenção de malária baseados no uso de redes mosquiteiras impregnadas com estes insecticidas (Fanello *et al.*, 2003) uma vez que os insecticidas piretróides são ainda os únicos compostos licenciados pela OMS para a impregnação destes materiais.

O termo *knockdown resistance (kdr)* é utilizado para o tipo de resistência ao insecticida organoclorino DDT e a insecticidas piretróides. Estes insecticidas têm um modo de acção semelhante, alterando a funcionalidade dos canais de sódio presentes nas membranas nervosas. Vários estudos indicam que mutações nos genes destes canais em insectos são a causa primária da resistência *kdr*. (Soderlund & Knipple, 2003). As mutações *kdr* (Fig. 7) são polimorfismos de nucleótido único (SNPs). Em *A. gambiae* s.s., foram descritas duas mutações, caracterizadas pela substituição de uma leucina (TTA) por uma serina (TCA) ou por fenilalanina (TTT) (Martinez-Torres *et al.*, 1998), na posição aminoacídica 1014 do gene que codifica a subunidade transmembranar S6 do domínio II do canal de sódio (Martinez-Torres *et al.*, 1998; Ranson *et al.*, 2000). Por este motivo, neste trabalho, o alelo selvagem *kds* (codão TTA), será designado 1014L, os alelos resistentes *kdr-e* e *kdr-w* (codões TCA e TTT) serão respectivamente designados 1014S e 1014F.

A observação do mesmo *locus* envolvido na resistência *kdr* em diversos insectos revela que o resíduo de leucina nesta posição é altamente conservado durante a evolução, e que as substituições aminoacídicas não inactivam funcionalmente o canal de sódio (Soderlund & Knipple, 2003; Hemingway *et al.*, 2004).

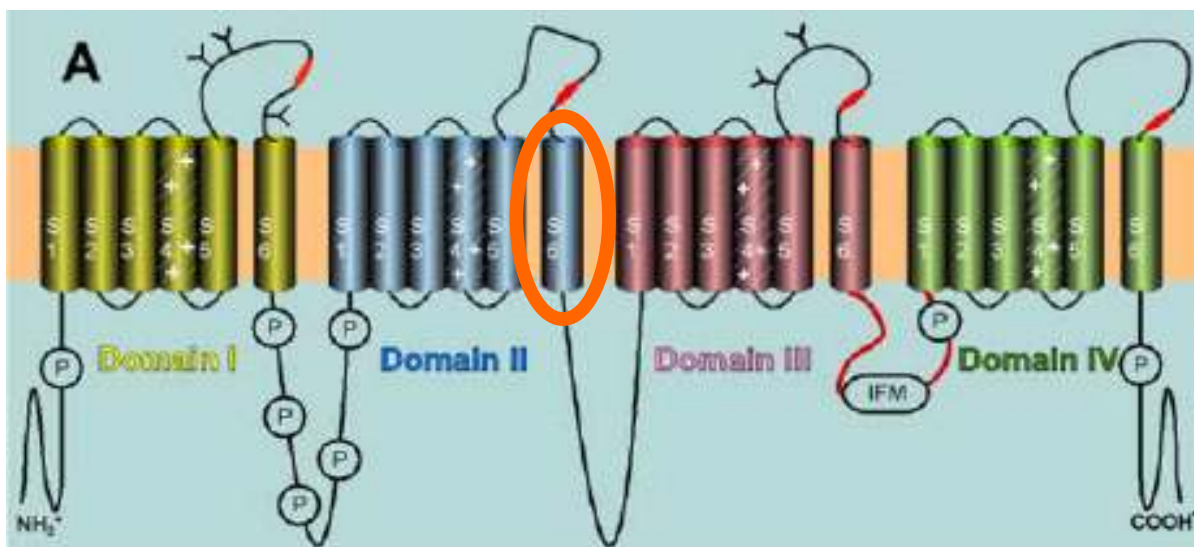


Figura 7. Representação esquemática dos quatro domínios do canal de sódio. A resistência kdr, em várias espécies de insectos, deve-se a uma mutação aminoacídica pontual na posição 1014 do sexto segmento transmembrantar do domínio II do canal de sódio (IIS6). Adaptado de Denac. *et al.* (2000)

Inicialmente as mutações kdr foram unicamente encontradas na forma S (Fanello *et al.*, 2003) exceptuando algumas populações da forma M do Benim (Chandre *et al.*, 1999). Existem evidências que apontam para que as mutações kdr tenham sido adquiridas pela forma M por hibridação introgressiva (Weil *et al.*, 2000) e que estão agora a espalhar-se naquela forma (Yawson *et al.*, 2004). A mutação Leucina-Fenilalanina (L1014F) foi inicialmente encontrada dispersa apenas na África Ocidental, enquanto que a substituição Leucina-Serina (L1014S) apresentava uma distribuição mais limitada, na África Oriental (Chandre *et al.*, 1999; Ranson *et al.*, 2000; Gentile *et al.*, 2002). No entanto, estudos recentes revelaram a co-ocorrência destas mutações, em particular na África Central-Ocidental e no Uganda (Etang *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006). Na maioria das localidades, registou-se uma associação entre a presença destas mutações e a resistência ao DDT e piretróides. Os alelos kdr têm sido encontrados a frequências que em algumas áreas rondam os 80% (Bagayoko *et al.*, 2005).

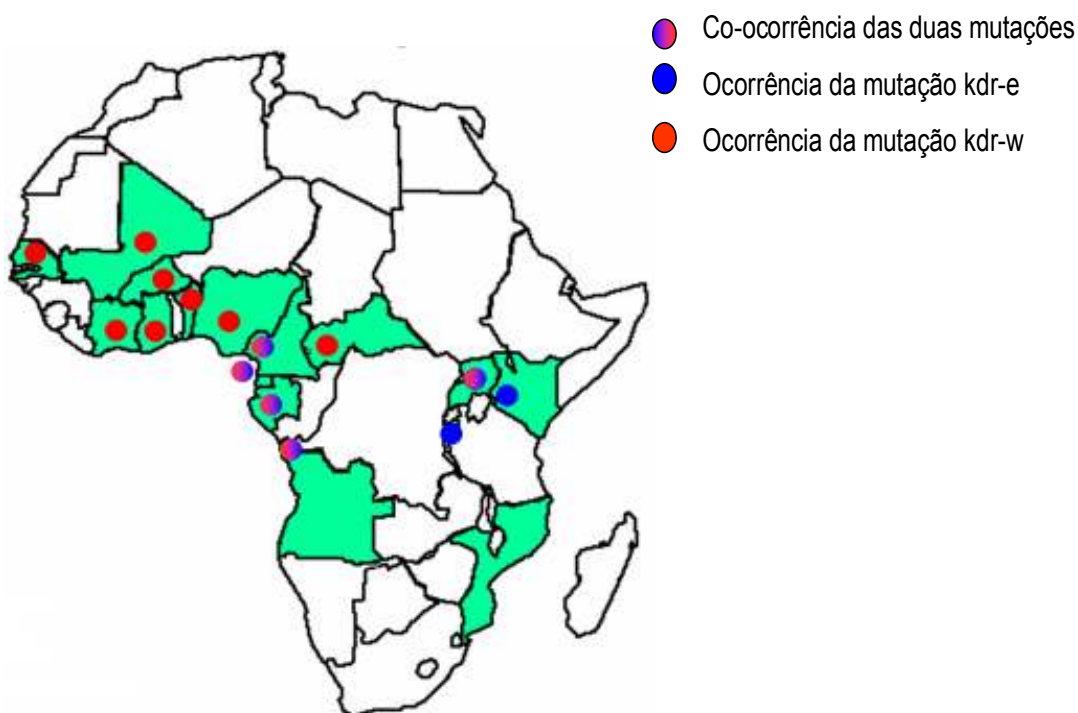


Figura 8. Distribuição dos alelos *kdr* em África.
kdr-w: alelo 1014F, *kdr-e*: alelo 1014S.
Adaptado de Pinto *et al.*, não publicado.

4. A MALÁRIA EM ANGOLA

A malária é uma patologia endémica na maior parte do território angolano constituindo a maior causa de mortalidade e morbilidade, em particular nas crianças até aos 5 anos de idade (WHO, 2005). As espécies de parasitas encontradas no território são *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* (Brunhes *et al.*, 1998), embora estudos recentes apontem também para a presença de *P. ovale* (Miranda 2007, comunicação pessoal). Contudo, *P. falciparum* é a espécie mais prevalente, ocorrendo em 90% dos casos de malária.

Até à data foram descritas 47 espécies de *Anopheles* no país, das quais os vectores de malária são: *A. gambiae*, *Anopheles funestus* Giles 1900, *Anopheles nili* Theobald 1904, *Anopheles coustani* Laveran 1900, *Anopheles flavicosta* Edwards 1911, *Anopheles paludis* Theobald 1900, e *Anopheles pharoensis* Theobald 1901. O complexo *Anopheles gambiae* encontra-se representado pelas espécies *A. gambiae* s.s., *A. arabiensis* e *A. melas* (Hervy *et al.*, 1998).

A época de transmissão da malária na maioria das províncias dura 5 a 9 meses em geral a partir de Outubro, no entanto, o pico de transmissão regista-se entre Março e Maio (PMI, 2007).

Alguns factores fazem de Angola um país com características próprias no controlo da malária: (1) Ser um país de grande extensão geográfica que inclui vários ecossistemas; (2) O facto de ter atravessado três décadas de guerra civil com um grave impacto no seu desenvolvimento, particularmente no sector da saúde (PMI, 2007). O conflito armado a qual provocou migrações de populações inteiras, levando a uma redistribuição populacional que se reflectiu na desertificação de algumas zonas e sobrepovoamento de outras; (3) Outra consequência do conflito armado foi a concentração de refugiados não imunes em zonas de transmissão.

As dificuldades de acesso às populações deslocadas constituem um dos principais obstáculos para a aplicabilidade das medidas de controlo actualmente em curso no País (Cuamba *et al*, 2006). Relativamente ao vector, o Programa Nacional de Controlo da malária tem medidas de controlo em curso. O Governo angolano banuiu o uso do DDT com excepção da zona fronteira Angola/Namíbia uma vez que neste país é corrente o uso deste insecticida no controlo da malária. No entanto, evidências apresentadas na África do Sul indicam que a eficácia dos piretróides (correntemente empregues nas pulverizações intra-domiciliárias e na impregnação de redes mosquiteiras) é significativamente inferior à do DDT levando as autoridades a equacionar novamente o uso deste insecticida (PMI, 2007).

5. OBJECTIVOS

Este trabalho teve como objectivos: (i) avaliar os níveis de resistência a insecticidas piretróides e ao DDT, em populações de vectores de malária de Angola, onde o uso destes insecticidas está em curso, como parte integrante das actividades de controlo da malária (ii) identificar mutações presentes no gene *voltage-gated sodium channel* de *A. gambiae* s.s. associadas à resistência do tipo *kdr* a DDT/piretróides, nestes vectores de malária.

MATERIAL E MÉTODOS

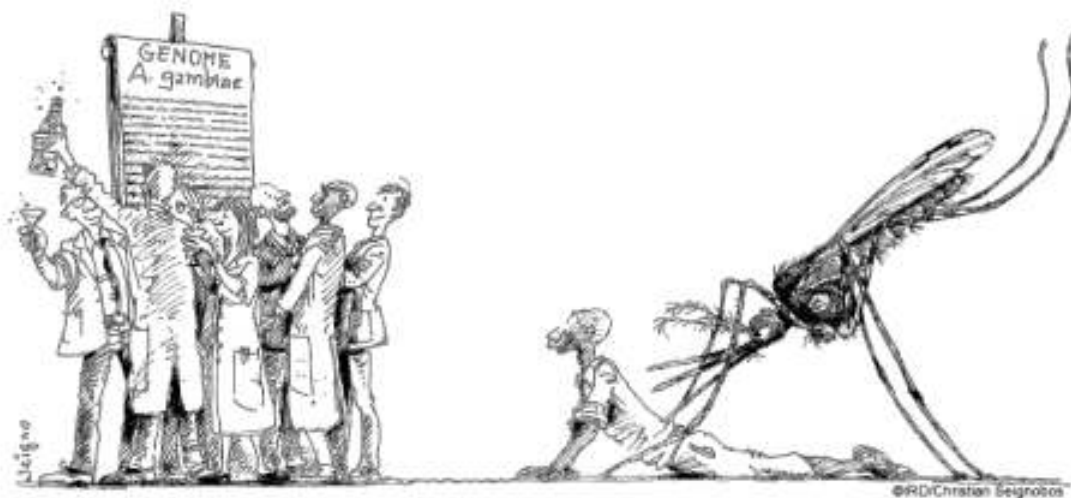


Figura 9. Imagem retirada de www.offthemark.com

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. LOCALIZAÇÃO DAS ZONAS DE COLHEITA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Angola (12°30'S 18°30'E) é um país localizado na costa do Atlântico Sul da África Austral, entre a Namíbia e a República Democrática do Congo, partilhando também fronteiras com a Zâmbia. Inclui também o enclave de Cabinda. Com uma superfície de 1 246 700 Km², é habitada por uma população de 12.263.596 habitantes. A densidade populacional é de 13 habitantes por km². O país conta com um total de 2,65% de solo arável. As principais fontes de riqueza são o petróleo, diamantes, ferro, fosfatos, cobre, feldspatos, ouro, bauxite e urânio (www.cia.gov).

O território angolano é caracterizado por uma grande variedade bioclimática: As terras altas do interior têm um clima suave com estações chuvosas de Novembro a Abril, seguida por uma estação seca, mais fria, de Maio a Outubro. As regiões do Norte e Cabinda têm chuvas ao longo de quase todo o ano. Na zona Nordeste, incluindo o enclave de Cabinda, a humidade relativa é de cerca de 80% e as temperaturas médias estão entre os 21 e os 26°C, com precipitações anuais de 1000 A 1600 mm, as paisagens são de savana e floresta. A Noroeste, onde se encontra a províncias de Luanda (8°48'S 13° 14'E) e Benguela, a humidade relativa é de cerca de 80% estando igualmente as temperaturas entre os 21 e os 26°C. Os valores de pluviosidade variam entre 200 e 1000 mm favorecendo paisagens de savana. Na região Sul, onde se situa a província da Huíla, as temperaturas médias registadas estão entre 21 e 23°C com valores anuais de precipitação entre os 100 e 600 mm e humidade de 50% sendo que nas paisagens predominam savana e estepe.

Na figura 10 estão representadas as localizações das Províncias prospectadas: Cabinda (2 localidades), Luanda (3 localidades), Benguela (2 localidades) e Huíla (4 localidades) somando um total de onze localidades. Luanda é a maior cidade e capital de Angola, sendo também a capital da província com o mesmo nome, que é a mais populosa (4,5 milhões de habitantes, segundo estimativa da ONU em 2004). A cidade de Luanda possui o principal porto internacional e constitui o centro administrativo do país. Benguela é o segundo centro citadino do país. Situada a Oeste, é a capital da província com o mesmo nome contando com cerca de 156 mil habitantes. Huíla e Cabinda são sobretudo províncias rurais, excluindo as zonas das capitais de província.

No que diz respeito à transmissão de malária, Cabinda apresenta um perfil hiperendêmico, Luanda e Huila apresentam um perfil mesoendêmico e em Benguela a transmissão é sazonal curta (PMI, 2007).

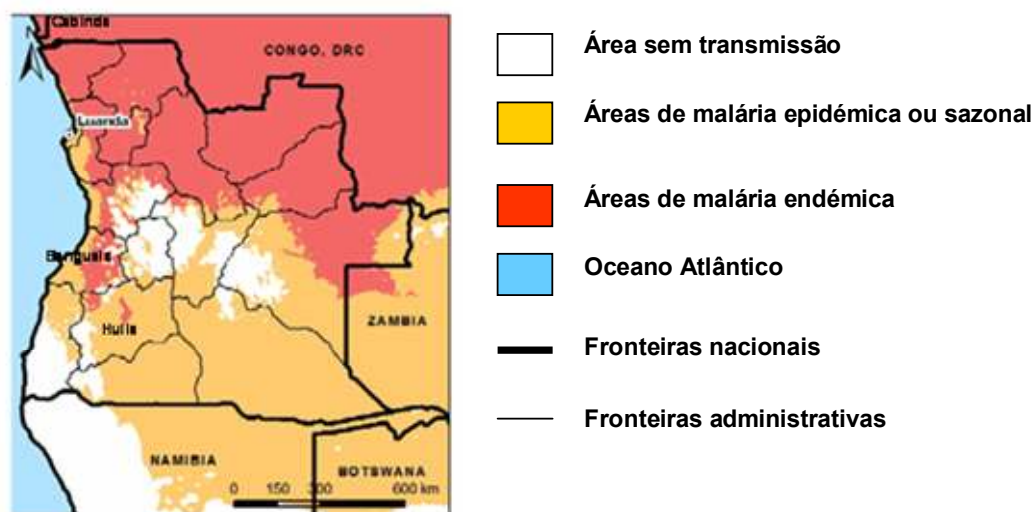


Figura 10. Distribuição da malária em Angola e localização das províncias prospectadas. Imagem adaptada de www.afro.who.int/malaria/

2. COLHEITA DAS AMOSTRAS

As colheitas entomológicas decorreram entre 20 de Outubro e 12 de Novembro, altura coincidente com o final da estação seca. Os insectos foram capturados por colheitas sobre isca humana (adultos) ou prospecção de criadouros larvares. O protocolo de colheitas desenvolvido foi autorizado pelo Instituto Nacional de Saúde Pública de Angola e pelos habitantes dos locais prospectados.

Os insectos adultos foram capturados por colheitas sobre isca humana, uma metodologia utilizada para a colheita de mosquitos que procuram uma refeição sanguínea (Service, 1993). Antes do início do estudo, todos os colectores iniciaram um tratamento profiláctico de modo a diminuir o risco de infecção. Os insectos capturados por isca humana foram inseridos em copos de captura sendo cada um destes usado para apenas uma hora de captura, após a qual era mudado e registado o número de mosquitos capturados. Foram ainda usadas armadilhas de tenda bem como de luz do tipo CDC nas colheitas entomológicas de adultos. Insectos imaturos foram colhidos nas localidades estudadas através da prospecção de criadouros larvares, com recurso a caços e pipetas. Os insectos capturados em fase imatura foram mantidos até à emergência dos adultos em gaiolas cúbicas (30cm de lado) numa sala de ambiente controlado (25-28°C, 75-85% HR).

Os mosquitos capturados foram identificados morfologicamente na fase adulta com vista à separação dos anofelíneos dos restantes mosquitos.

3. ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE A INSECTICIDAS

Os anofelíneos adultos (capturados ou obtidos a partir de imaturos) foram sujeitos a ensaios de susceptibilidade com testes OMS (WHO, 1970). Estes decorreram em locais livres de insecticidas contaminantes, temperaturas extremas, humidade, iluminação e correntes de ar. A temperatura foi sempre controlada ao longo dos testes.

3.1. Procedimento dos testes de susceptibilidade

Para os ensaios de susceptibilidade foi utilizado material padronizado e fornecido pela OMS (Anexo I). Foi testada a resistência / susceptibilidade a 3 insecticidas às concentrações recomendadas pela OMS: DDT 4%, lambdacialotrina 0.05% e deltametrina 0.05% (Anexo II). A figura 11 ilustra o procedimento dos testes de susceptibilidade: Em cada um dos tubos de suporte foi ajustado um pedaço de papel branco enrolado em cilindro posicionado com um clipe de aço. Ajustaram-se as lâminas aos tubos e os mosquitos foram colhidos em lotes de poucos indivíduos (10 no máximo) e cuidadosamente transferidos para os tubos de repouso através dos orifícios existentes em cada um dos lados ficando entre 15 e 25 em cada tubo. Seguiu-se um tempo de espera para assegurar que os indivíduos danificados não seriam incluídos no teste. Os tubos de suporte foram colocados na vertical durante uma hora, finda a qual, foram removidos os insectos danificados e registada a mortalidade pré-teste (A-D). No interior de cada um dos tubos de exposição e de controlo foi introduzida uma folha de papel impregnado (com insecticida nos tubos de exposição e com o excipiente do insecticida nos tubos de controlo) ajustado às paredes e fixo por cliques. A exposição decorreu com os tubos na posição vertical e a ponta da grelha voltada para cima (E) durante uma hora sob condições de iluminação difusa, temperatura e humidade relativa adequadas ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 70-80%). O número de mosquitos mortos foi registado aos 60 minutos. No fim do tempo de exposição, os mosquitos foram transferidos para os tubos de repouso pelo procedimento inverso tendo sido removidos os tubos de exposição. Os tubos de repouso foram colocados em posição vertical apoiados na lâmina e sobre a grelha, situada na parte superior do tubo. Pedacos de algodão embebido numa solução açucarada posicionados sobre a grelha garantiram o alimento dos mosquitos sobreviventes (F). Foram mantidos 24 horas em local abrigado tendo sido registadas as temperaturas

máxima e mínima do local. Foram também protegidos de insectos predadores e mantidos em câmara húmida.

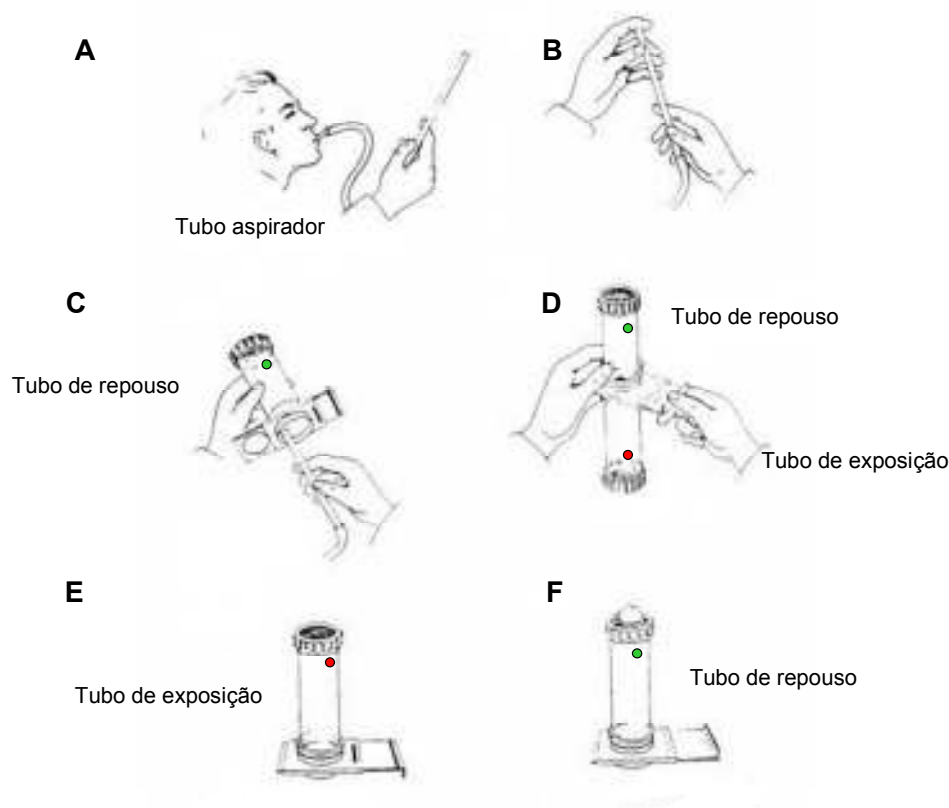


Figura 11. Procedimento para a determinação da susceptibilidade/ resistência de mosquitos adultos a insecticidas, com base nos kits da OMS. Adaptado de WHO (1970).

Para a leitura removeram-se os mosquitos mortos e os vivos foram contados por atordoamento, agitando ligeiramente o tubo. Após leitura as amostras foram mantidas secas em tubos individuais de 0,5 ml parcialmente cheios com sílica gel e algodão. Em laboratório, as amostras ficaram preservadas a 20°C até à extracção de DNA.

3.2. Interpretação dos testes de susceptibilidade

A contagem da mortalidade para cada insecticida foi feita 24 horas após a realização do teste. Foram contados os indivíduos mortos nos tubos de exposição e calculada a percentagem de mortalidade. Uma elevada mortalidade no controlo poderá dever-se a uma má manipulação dos insectos ou ao facto de, acidentalmente, terem entrado em contacto com o insecticida, ou ainda a uma exposição a condições desfavoráveis (WHO, 1968). Assim, nos casos em que tal sucedeu, procedeu-se da seguinte forma:

- Uma mortalidade nos tubos controlo inferior a 5% pode ser desprezada, no entanto, uma mortalidade superior a 20% invalida o teste devendo este ser repetido.
- Em casos onde os valores de mortalidade do controlo se mostraram entre 5 e 20%, a mortalidade registada nos tubos expostos ao insecticida foi corrigida pela fórmula de Abbot (WHO, 1963).

De acordo com a OMS, as taxas de mortalidade observadas nas exposições aos insecticidas dão uma indicação do estado de susceptibilidade da população em estudo, com base nos seguintes intervalos:

- 98 – 100% de mortalidade indicam susceptibilidade
- 80 – 97% de mortalidade sugerem a possibilidade de resistência
- Valores de mortalidade inferiores a 80% correspondem a resistência.

4. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Uma vez chegados ao laboratório, os mosquitos capturados e ensaiados para susceptibilidade a insecticidas foram morfologicamente identificados até ao nível de espécie ou complexo de espécie por observação ao estereomicroscópio e fazendo uso de chaves de identificação (Gillies & De Meillon, 1968; Gillies & Coetzee, 1987). Aos mosquitos identificados como *A. gambiae* procedeu-se com a extracção de DNA.

5. EXTRACÇÃO DE DNA

Foi utilizado um protocolo ligeiramente modificado de Collins *et al.* (1988) para a extracção de DNA ribossómico (rDNA) de mosquitos individuais (Pinto *et al.*, 2006).

Para a homogeneização cada mosquito foi esmagado com o auxílio de homogenizadores de plástico, em 100µl de tampão de lise e o homogenato incubado 30 minutos a 65°C. Para a precipitação proteica foram adicionados 14µl de acetato de potássio (8M) e a mistura foi vortexada ficando a incubar em gelo mais 30 minutos após os quais foi centrifugada a 12000xg durante 10 minutos, tendo o sobrenadante sido transferido para um novo tubo. Foram adicionados 200µl de etanol absoluto, a mistura foi vortexada e seguidamente deixada a incubar a -20°C durante uma hora (ou a -70°C durante 10 minutos), finda a qual foi centrifugada 15 minutos a 12000xg. Os *pellets* foram lavados adicionando 200µl de etanol a 70% e vortexando a mistura, que posteriormente foi centrifugada 10 minutos a 12000xg. Procedeu-se à remoção do sobrenadante e o depósito dos tubos foi seco em estufa a 37°C durante a noite.

O DNA foi eluído em 100µl de água (bi-destilada e autoclavada) e em 100µl de tampão TE e conservado a -20°C. A partir de cada amostra de DNA foram preparadas alíquotas de trabalho de 30µl e diluições de 1:10 (2µl DNA + 18µl ddH₂O) em tubos de 0,5ml, que foram conservadas a 4°C durante a execução das análises moleculares.

6. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES E FORMAS MOLECULARES DE *A. GAMBIAE* S.L.

Para a identificação dos membros do complexo *Anopheles gambiae* e formas moleculares M e S, procederam-se a ensaios de PCR-RFLP de acordo com os protocolos descritos por Scott *et al.* (1993) e Fanello *et al.* (2002). Esta técnica baseia-se em polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição específicos das espécies, localizados nos espaçadores intergénicos (IGS) do DNA ribossomal. O método é baseado na digestão directa de um fragmento de rDNA de tamanho variável consoante a espécie, amplificado por PCR, com a enzima *HhaI* (Scott *et al.* 1993), (Fig. 12) e permite uma identificação simultânea de todas as espécies do complexo *A. gambiae* bem como das formas M e S e de *A.gambiae* s.s.

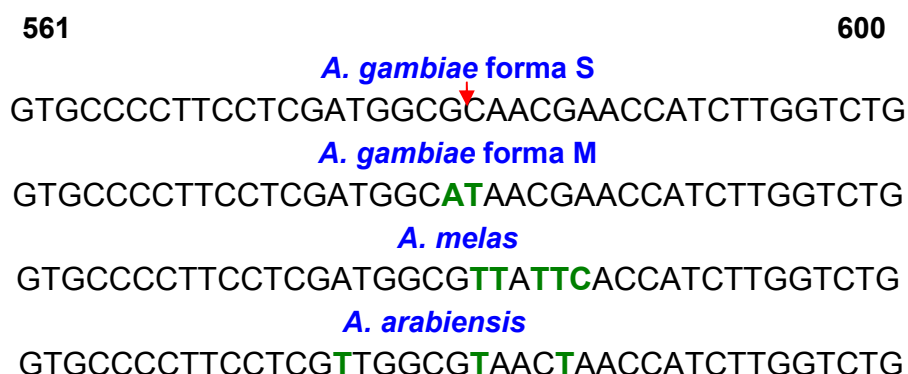


Figura 12. Representação esquemática das terminações 3' e 5' do fragmento 561-600bp da região IGS do rDNA sequenciadas por Scott *et al.* (1993) nas espécies *A.gambiae* (formas S e M), *A.arabiensis* e *A.melas*. A seta indica o local de restrição da enzima *HhaI* (palíndroma GCG[^]C) na forma molecular S de *A.gambiae*. Figura adaptada de Fanello *et al.* (2002).

6.1. Reacção de PCR

A reacção de PCR decorreu em tubos de 0.2ml utilizando um *primer forward* universal (UN: 5'-GTG TGC CCC TTC CTC GAT GT-3'), comum a todas as espécies, e *primers reverse*, cada um específico para para *A. gambiae* s.s. (GA: 5'-CTG GTT TGG TCG GCA CGT TT-3'), *A. arabiensis* (AR: 5'-AAG TGT CCT TCT CCA TCC TA-3') e *A. melas/merus* (ME: 5'-TGA CCA ACC CAC TCC

CTT GA-3'). A mistura de reacção de amplificação foi preparada com 1X de tampão de *PCR* (Promega™, Madison, USA), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de *dNTP*, 0,5 ng/μl de *primer* UN e ME, 0,25 ng/μl de *primer* GA e 0,75 ng/μl de *primer* AR, e 0,25 U de *Taq DNA* polimerase (Promega™, Madison, USA), perfazendo um volume total de 10 μl. Das diluições preparadas a partir do stock de rDNA, foi utilizado 1 μl de *DNA* molde para cada reacção de amplificação. Cada grupo de reacções de amplificação incluiu controlos positivos para cada espécie e para as formas moleculares (composto por *DNA* anteriormente identificado) e um controlo negativo (sem *DNA* molde).

O programa de *PCR* utilizado decorreu em termocicladores iCYCLER™ da Bio-Rad (California, USA) nas seguintes condições: 30 ciclos de (1) desnaturação a 94°C durante 30 segundos; (2) emparelhamento a 50°C durante 30 segundos; e (3) extensão a 72°C durante 30 segundos. Realizou-se ainda uma etapa final de alongamento a 72°C durante 10 minutos. Para conservação no termociclador, o programa foi concluído a uma temperatura de 4°C.

6.2. Reacção de restrição enzimática

Para a digestão enzimática com *HhaI* (Promega™, Madison, USA) juntou-se 10 μl de produto amplificado a 2 U de enzima *HhaI*, 1X de tampão de enzima de restrição (Promega™, Madison USA) e 0,1mg/ml de albumina de soro bovino (BSA) (Promega™, Madison USA), num volume total de 20 μl. A incubação decorreu à temperatura de 37°C durante 3 horas num termociclador. As amostras foram conservadas a -20°C até à separação dos fragmentos por electroforese em gel de agarose.

Os produtos amplificados foram separados por electroforese em gel de agarose (Promega™, Madison USA) a 2% com brometo de etídio (Sigma™, St Louis USA) incorporado (10mg/ml) em tampão TBE 1X. 20 μl de cada amostra foram aplicados no gel correndo a 110-130V durante 60 a 90 minutos e sendo posteriormente visualizado e fotografado num transiluminador de luz UV (UVitec, Alfagene, UK). Foi usado marcador molecular 100bp *DNA ladder* (Fermentas, Burlington, Canada). A figura 13 mostra o padrão electroforético observado para cada espécie e forma molecular.

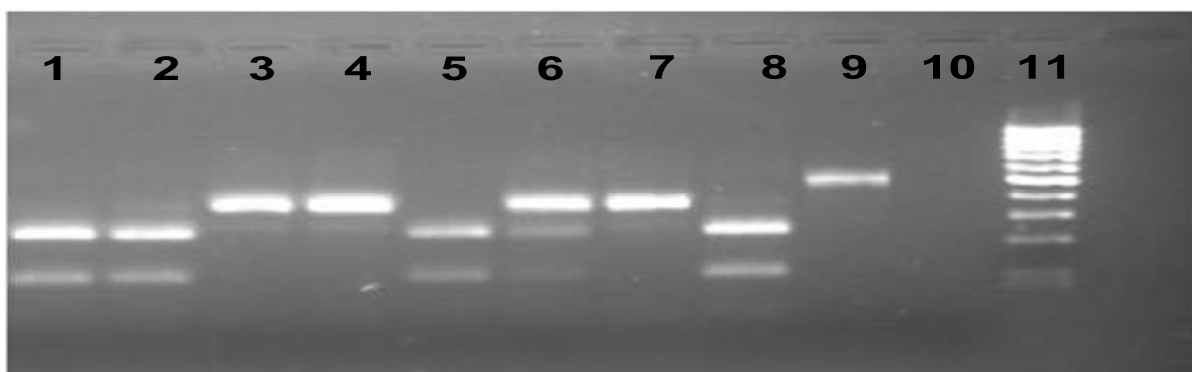


Figura 13. Fotografia de um gel de agarose (2%) contendo os produtos de PCR-RFLP para identificação simultânea das espécies e formas moleculares do Complexo *A. gambiae*. Linhas 1,2,5 e 8: *A. gambiae* s.s. forma S; Linhas 3,4 e 7: *A. gambiae* forma M; Linha 6: híbrido M/S; Linha 9: *A. melas*; Linha 10: Controlo negativo; Linha 11: Marcador molecular 100 bp. Figura adaptada de Oliveira (2007).

7. GENOTIPAGEM MOLECULAR DOS GENES *KDR* EM *A. GAMBIAE* S.S.

Apenas as amostras identificadas como *A.gambiae* s.s. foram pesquisadas quanto à ocorrência de *kdr*. Para o efeito foi utilizada uma técnica de PIRA-PCR (*Primer Introduced Restriction Analysis-PCR*). Este método é muito utilizado na pesquisa e genotipagem de mutações pontuais e baseia-se na criação de um RFLP artificial por introdução de um *mismatch* de um único nucleótido, geralmente situado na extremidade 3' do *primer*, próximo da mutação de interesse (Haliassos *et al.*, 1989; Ke *et al.*, 2001). As mutações L1014F (TTA→ TTT) e L1014S (TTA→TCA) foram genotipadas separadamente por intermédio de uma reacção de ensaios específicos para cada polimorfismo de nucleótido, com recurso aos primers e enzimas de restrição descritos na tabela 2 (Janeira *et al.*, não publicado).

Tabela 2. Sequência dos *primers* (F: forward; R: reverse) e enzimas de restrição.

Alelo alvo	Primers	Sequência	Enzima	Palindroma
TCA	Kdr-TCA-F	5'CTT GGC CAC TGT AGT GAT AGG AAA <u>g</u> 3'	BseMII	5'...CTCAG(N)10...3' 3'...GAGTC(N) 8...3'
	Kdr-TCA-R2	5' <u>ACA</u> TGG TGC TAG TGG ATT GTA C 3'		
TTT	Kdr-TTT-F	5' <u>TTG</u> GCC ACT GTA GTG ATA GGA AAT <u>a</u> T3'	Sspl	5' ...AAT ATT... 3' 3' ...TTA TAA ...3'
	Kdr-TTT-R2	5' <u>ACA</u> TGG TGC TAG TGG ATT GTA C 3'		

7.1. Detecção da mutação L1014S (TTA→TCA)

7.1.1. Reacção de PCR

Para cada reacção de PCR foi usado 1µl de *DNA* molde. A mistura de reacção foi constituída por tampão de PCR 1.05X (Fermentas, Burlington, Canada)

MgCl₂ 2,63mM, dNTPs 0.21mM, *primer kdr-TCA- forward* 0.26mM, *primer kdr-TCA-reverse* 0.26mM, Taq DNA polimerase 0.05U (Fermentas, Burlington, Canada) e ddH₂O perfazendo um volume total de 19µl. As condições de PCR foram: um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 3 minutos seguido de 35 ciclos, cada um com 30s a 94°C, 30s a 56°C e 30s a 72°C. O alongamento foi feito a 94°C durante 10 minutos e o produto amplificado foi conservado a 4°C até visualização em gel de agarose a 2% com brometo de etídio incorporado (10mg/ml) em tampão TBE 1X. Para confirmação da amplificação por PCR, de cada uma das amostras foram aplicados 10µl em gel de agarose (2%) com brometo de etídio (10mg/ml) correndo a electroforese a 110-130 V durante 60 a 90 minutos e sendo posteriormente visualizados num transiluminador de luz UV . Foi usado marcador molecular 100bp DNA ladder .

7.1.2. Reacção de restrição enzimática

A reacção de restrição enzimática foi feita a 55°C sendo a mistura de reacção composta por: 5µl de produto amplificado, tampão de restrição 1X Tango (Promega TM, Madison USA), factor SAM 0.025 mM (Promega TM, Madison USA), 0.025 U de Bse MII (Promega TM, Madison USA), e ddH₂O perfazendo um volume de 18.5µl. 10µl do produto de restrição foram aplicados em gel de agarose (3%) com brometo de etídio (10mg/ml) em tampão TBE 1X. A corrida electroforética foi feita a 120V durante 90 a 120 minutos e o padrão de restrição observado e fotografado no transiluminador de luz UV.

7.2. Detecção da mutação L1014F (TTA→TTT)

7.2.1. Reacção de PCR

Para cada reacção de PCR foi usado 1µl de DNA molde. A mistura de reacção foi constituída por tampão PCR 1X (Fermentas, Burlington, Canada) MgCl₂ 2mM, dNTPs 0.2mM, *primer kdr-TTT- forward* 0.33µM , *primer kdr-TCA-reverse* 0.33µM , 0.0667U de Taq DNA polimerase (Fermentas, Burlington, Canada) e ddH₂O perfazendo um volume total de 15µl. As condições de PCR foram: um passo inicial de desnaturação a 94°C durante 3 minutos seguido de 40 ciclos, cada um com: 30s a 94°C, 30s a 55°C e 30s a 72°C. O alongamento foi feito a 72°C durante 10 minutos e o produto amplificado foi conservado a 4°C até visualização em gel de agarose a 2% com brometo de etídio incorporado (10mg/ml) em tampão TBE 1X. De cada uma das amostras 10µl foram aplicados em gel de agarose (2%) correndo a 110-130 V durante 60 a 90

minutos e sendo posteriormente visualizados no transiluminador de luz UV. Foi usado marcador molecular 100bp *DNA ladder*.

7.2.2. Reacção de restrição enzimática

A reacção de restrição enzimática foi feita a 37°C sendo a mistura de reacção composta por: 6µl de produto amplificado, tampão 0.67 X (Promega TM, Madison USA), 0.025 U de *Bse* MII (Promega TM, Madison USA) e ddH₂O perfazendo um volume total de 18µl. 10µl do produto de restrição foram aplicados em gel de agarose (3%) com brometo de etídio (10mg/ml) em tampão TBE 1X. A corrida electroforética foi feita a 120V durante 90 a 120 minutos e o padrão de restrição observado no transiluminador de luz UV. A figura 14 mostra o padrão electroforético de cada tipo de genótipo possível.

No presente estudo, as frequências genotípicas observadas foram testadas para as expectativas do equilíbrio de Hardy-Weimberg por intermédio de um *software* GENEPOP versão 3.4 (Raymond & Rousset, 1995) sendo que a hipótese nula H₀= As frequências observadas estão de acordo com as frequências esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weimberg. O nível de significância para a rejeição de H₀ foi $\alpha = 0,05$.

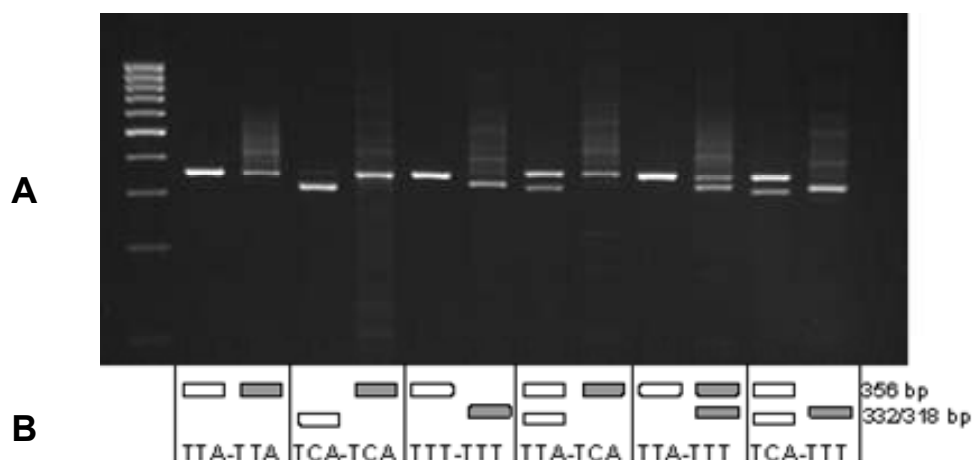


Figura 14. A – Fotografia do gel de agarose (3%) para identificação dos alelos *kdr* em *A. gambiae* s.s. B – Esquema do padrão de restrição esperado para a caracterização do locus *kdr* em amostras de *A. gambiae* s.s. pelo método PIRA-PCR. A restrição ocorre apenas quando está presente um alelo mutante originando dois fragmentos de 318 pb e 39pb para o alelo L1014S. O alelo L1014F origina, por restrição, um fragmento de 332pb e um outro de 24. Figura adaptada de (Janeira *et al.*, não publicado)

RESULTADOS

La seule vraie science est la connaissance des faits.

Buffon, Histoire naturelle.

III. RESULTADOS

1. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Durante as colheitas entomológicas efectuadas em Angola no período de 20 de Outubro a 12 de Novembro de 2006, foram capturadas várias espécies de mosquitos. Tendo em conta os objectivos deste trabalho, os resultados apresentados referem-se apenas às espécies pertencentes ao género *Anopheles* (N= 1010).

Na província da Huíla, as colheitas entomológicas resultaram na captura de um único mosquito, identificado como *A. gambiae* s.s. forma M. Assim, dado o baixo sucesso das capturas, não foi possível efectuar as análises subsequentes tal como realizado para Cabinda, Luanda e Benguela.

1.1. Província de Cabinda

Nesta província não houve sucesso na busca activa de mosquitos adultos. Assim, foram capturados por prospecção larvar, ovos e larvas nos seus quatro estadios de desenvolvimento, tendo 27 indivíduos atingido a fase de adulto. Todos pertenciam ao Complexo *gambiae*. A colheita foi feita em dois de quatro criadouros prospectados, um permanente e outro temporário de pequena dimensão, ambos de água doce, límpida e sem vegetação.

1.2. Província de Luanda

Para um total de 326 indivíduos (tabela 3) capturados, 57 % (186) indivíduos foram identificados como *A. gambiae* s.l., dos quais aproximadamente 50% foram provenientes de imaturos. Esta espécie foi a única representada nas colheitas de imaturos. As larvas foram colhidas em 5 criadouros, consistindo em pequenas lagoas com alguma vegetação e possivelmente de água salobra, dada a sua proximidade ao mar. Nas colheitas de adultos, foram identificadas 5 espécies/ complexos ou grupos de espécies diferentes, sendo *A. gambiae* s.l. a espécie mais frequente. Não foi possível a identificação de 41 indivíduos (13%).

Tabela 3. Número de mosquitos anofelineos capturados (N) e sua frequência (%) de acordo com a espécie e com a fase do ciclo de vida, na província de Luanda.

	Imaturos		Adultos	
	N	%	N	%
<i>Anopheles gambiae s.l.</i>	92	86,8	94	42,7
<i>Anopheles funestus</i>	0	0,0	12	5,5
<i>Anopheles nili</i>	0	0,0	31	14,1
Grupo <i>listeri</i>	0	0,0	29	13,2
<i>Anopheles ziemanni</i>	0	0,0	27	12,3
Por identificar	14	13,2	27	12,3
Total	106		220	

1.3.Província de Benguela

Nesta província foram capturados 657 indivíduos (tabela 4) em fases imaturas, 92% dos quais pertencentes ao Grupo *A. listeri*. Foram ainda capturados dois imaturos *A. gambiae s.l.* (0,3%). Foram prospectados 6 criadouros e os mosquitos anofelíneos foram encontrados tanto em charcos temporários, superficiais e de água poluída, como em zonas de água mais límpida junto ao leito de um rio. Nas colheitas de adultos obtiveram-se 22 *A. gambiae s.l.* Não foi possível a identificação de 28 mosquitos (4%).

Tabela 4. Número de mosquitos anofelíneos capturados (N) e sua frequência (%) de acordo com a espécie e com a fase do ciclo de vida, na província de Benguela.

	Imaturos		Adultos	
	N	%	N	%
<i>Anopheles gambiae s.l.</i>	2	0,5	22	91,6
Grupo <i>listeri</i>	605	95,5	0	0,0
Por identificar	26	4,0	2	8,4
Total	633		24	

2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO COMPLEXO *A. GAMBIAE*

A análise por PCR-RFLP revelou a presença de duas espécies do complexo, *A. gambiae s.s.* e *A. melas*, bem como das duas formas moleculares, M e S, descritas para *A. gambiae s.s.* A sua distribuição nas províncias prospectadas encontra-se na figura 15.

Foram analisados, por PCR-RFLP, 237 mosquitos (Cabinda: 27 indivíduos, Luanda: 186 e Benguela: 24), tendo sido identificadas duas espécies pertencentes ao Complexo *A. gambiae*. Não foi possível a identificação de 6 (3%) indivíduos por falha da técnica de PCR. *Anopheles gambiae s.s.* foi a espécie predominante nas amostras analisadas (195 indivíduos, 82%),

ocorrendo nas três províncias. *Anopheles melas* (16 indivíduos, 7%) foi identificado nas amostras de Cabinda e Luanda, estando ausente na amostra de Benguela. A forma M de *A. gambiae* s.s. foi a única identificada nas amostras das províncias de Benguela e Luanda. Em Cabinda, todos os 20 *A. gambiae* s.s. identificados pertenciam à forma S. Não foram encontrados híbridos M/S.

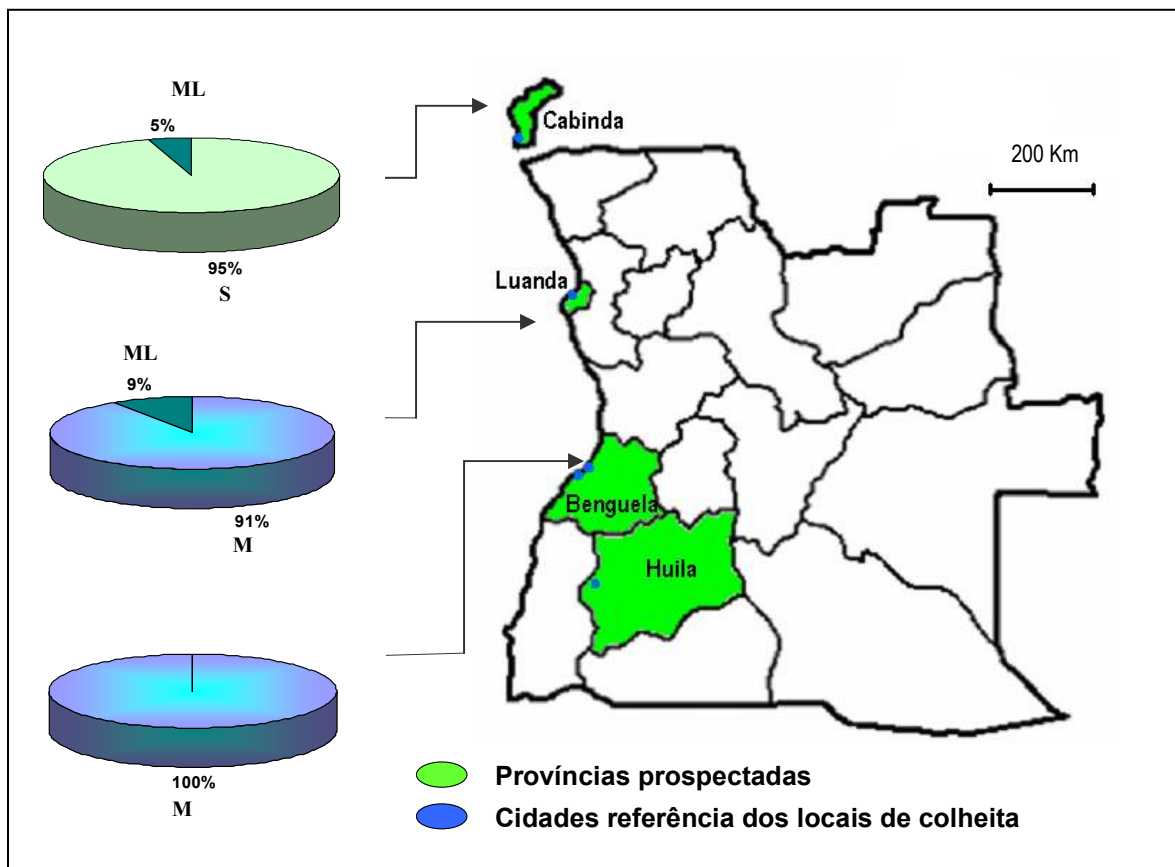


Figura 15. Mapa de Angola com indicação das cidades referência dos locais de colheita e distribuição dos membros do Complexo *gambiae*. Os gráficos indicam, de cima para baixo, a percentagem de formas moleculares de *A. gambiae* encontradas nas províncias de Cabinda, Luanda e Benguela.

3. TESTES DE RESISTÊNCIA

Realizaram-se ensaios de susceptibilidade a insecticidas em 205 *A. gambiae* s.l. e em 634 mosquitos pertencentes ao Grupo A: *listeri*. Os resultados estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Resultados dos ensaios de susceptibilidade de acordo com a província, por insecticida e por complexo/grupo de espécie.

		Cabinda		Luanda		Benguela	
		L-cialotrina	DDT	L-cialotrina	DDT	L-cialotrina	Deltametrina
<i>A.gambiae</i> s.l.	%	95,5	98,6	98,8	100,0	100,0	-
	N	22	72	80	2	22	-
Grupo <i>A.listeri</i>	%	-	96,6	-	79,3	93,7	100,0
	N	-	29	-	174	254	177

N: nº de mosquitos testados, em exposições de 1 hora em testes OMS. %: percentagem de mortalidade.

A negrito: percentagens de mortalidade inferiores a 80%, indicador de resistência (WHO, 1998).

-: não efectuado

Em geral, os níveis de resistência aos insecticidas testados foram baixos, com taxas de mortalidade que variaram entre os 94% e os 100%. A única excepção foi para o Grupo *A. listeri* em Benguela, que apresentou uma taxa de mortalidade inferior a 80% nos ensaios com DDT, o que sugere resistência a este insecticida. De notar que nesta província, foram ensaiados apenas 2 *A. gambiae* para o DDT pelo que não se poderão tirar quaisquer ilações. Em *A. gambiae* s.l. foram identificados apenas 3 indivíduos resistentes, dois para lambda cialotrina (Cabinda e Luanda) e 1 para DDT (Luanda).

4. MUTAÇÕES *KNOCKDOWN RESISTANCE* EM *A. GAMBIAE* S.S.

Um total de 215 (20 de Cabinda, 171 de Luanda e 24 de Benguela) *A. gambiae* s.s. foram genotipados para o locus *kdr* por PIRA-PCR não sendo possível obter os genótipos de 6 (3%) indivíduos de Benguela, devido a falhas de detecção em pelo menos um dos ensaios.

4.1.Frequências alélicas

Na província de Cabinda registou-se a presença dos dois alelos associados à resistência a insecticidas piretróides e DDT, 1014F e 1014S, juntamente com o alelo selvagem (1014L) “susceptível” que apresentou a menor frequência. Em Luanda e Benguela prevalece o alelo selvagem, tendo sido observado o alelo 1014F apenas em Luanda e em baixa frequência (≈ 5%). A figura 16 mostra as frequências alélicas do locus *kdr* nas três províncias.

Cabinda 2N= 40

Luanda 2N= 342

Benguela 2N= 36

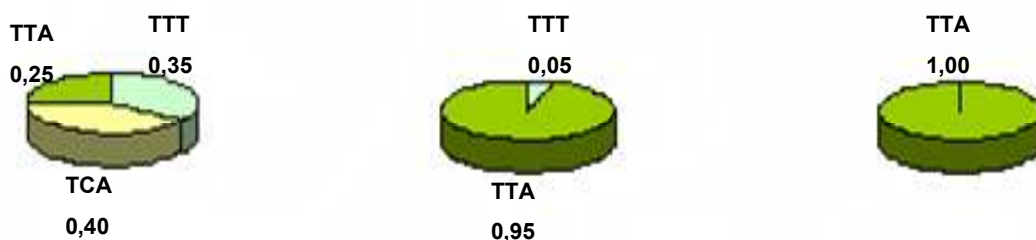


Figura 16. Frequências alélicas para o locus *kdr* em *A. gambiae* nas províncias de Cabinda, Luanda e Benguela. 2N = nº de cromossomas analisados (2x nº de indivíduos diplóides testados, N). TTA = codão correspondente ao alelo 1014L; TTT = codão correspondente ao alelo 1014F (resistente); TCA = codão correspondente ao alelo 1014S (resistente).

4.2. Frequências genotípicas

As frequências genotípicas do locus *kdr* estão representadas na tabela 6 para as províncias de Cabinda e Luanda. Na província de Benguela apenas foi encontrado o genótipo selvagem.

Tabela 6. Frequências genotípicas para cada província.

		TTA/TTA (Leu/Leu)	TCA/TC A (Ser/Ser)	TTT/TTT (Phe/Phe)	TTA/TCA (Leu/Ser)	TTA/TTT (Leu/Phe)	TCA/TTT (Ser/Phe)
Cabinda	O	1	2	0	3	5	9
N = 20	E	1,154	3,077	2,333	4,103	3,590	5,744
Luanda	O	153		O: 0		18	
N= 171	E	153,449		E: 0,449		17,103	

TTA = codão correspondente ao alelo 1014L; TTT = codão correspondente ao alelo 1014F (resistente); TCA = codão correspondente ao alelo 1014S (resistente).

Em ambas as Províncias, a distribuição dos genótipos para o locus *kdr* não diferiu significativamente do esperado para o equilíbrio de H-W (Testes exactos de H-W: $P = 0,053$ e $P = 0,951$, para Cabinda e Luanda, respectivamente). Deve-se notar, contudo, que a reduzida dimensão da amostra de Cabinda (N= 20) não permite uma grande confiança nos resultados obtidos.

4.3. Correlação genótipo *kdr* / fenótipo de resistência

Dada a reduzida dimensão da amostra em algumas províncias, a associação entre genótipos *kdr* e o fenótipo para cada insecticida foi analisada a partir do total de *A. gambiae* s.s.. obtido para todas as localidades. Da mesma forma, juntaram-se os indivíduos ensaiados para os dois piretróides num grupo único. Assim, foi possível a correlação entre o genótipo *kdr* e o fenótipo de resistência para um total de 174 indivíduos. Os resultados apresentam-se na tabela 7.

Tabela 7. Resultados dos testes de susceptibilidade (OMS, 1998) aos insecticidas DDT e piretróides, de acordo com o genótipo *kdr*. % Mort.: percentagem de mortalidade

	DDT			Piretróides		
	Susceptível	Resistente	%Mort.	Susceptível	Resistente	%Mort.
<i>kds/kds</i>	61	0	100,0	80	0	100,0
<i>kdr-w/kdr-w</i>	0	0	0,0	3	0	100,0
<i>kdr-e/kdr-e</i>	0	0	0,0	2	0	100,0
<i>kds/kdr-w</i>	5	1	83,3	12	1	92,3
<i>kds/kdr-e</i>	0	0	0,0	2	0	100,0
<i>Kdr-w/kdr-e</i>	0	0	0,0	6	1	85,7
Total	66	1	98,5	105	2	98,1

kds: alelo 1014L, *kdr-w*: alelo 1014F, *kdr-e*: alelo 1014S

Os testes de susceptibilidade a insecticidas revelaram três indivíduos com fenótipo resistente os quais apresentam mutações *kdr*, em heterozigotia com o alelo “susceptível” ou entre ambos os alelos associados à resistência. Dos 171 indivíduos com fenótipo susceptível, para DDT ou piretróides, 30 (18%) apresentaram mutações *kdr*, dos quais 5 eram homozigóticos para alelos *kdr* e 6 heterozigóticos para ambos os alelos associados à resistência.

DISCUSSÃO

Tal ciência é para mim maravilhosíssima; tão alta que não a posso atingir.

Salmos 139:6

IV.DISSCUSSÃO

Pelo facto de o período de estudo coincidir com o final da estação seca, a amostragem foi pequena sobretudo nas províncias de Cabinda e Huíla. Um dos factores que diminuiu o número de indivíduos provenientes de Cabinda foi o transporte das larvas, de avião, para Luanda. Foi registada uma grande mortalidade nos estádios mais avançados. Cerca de 48 horas após o transporte, começaram a emergir os indivíduos sobreviventes que não excederam os 27. Outro grande óbice da sobrevivência larvar foi o deficiente controlo das condições laboratoriais uma vez que durante a noite ocorriam falhas de electricidade perturbando as condições de temperatura controlada.

1. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

A grande contribuição para o total de espécies apanhadas em Angola foi de mosquitos pertencentes ao Grupo *A. listeri*. Em Angola, este grupo deverá estar representado principalmente pela espécie *Anopheles azevedoi* Ribeiro, 1969, que está descrita apenas neste País e na África do Sul, em ambientes costeiros devido à sua halofilia (Ribeiro & Ramos, 1975; Brunhes *et al.*, 1998). Longos períodos sem chuva, como é comum na época seca, alteram a concentração de sais minerais presentes nas águas dos criadouros (esta espécie prefere geralmente criadouros temporários) favorecendo o seu desenvolvimento larvar e este facto é corroborado com o grande número de larvas apanhado, relativamente ao número de indivíduos adultos (Brunhes *et al.* 1998). O pouco número de adultos capturados poderá dever-se ao facto de as fêmeas de *A. azevedoi* serem menos antropofílicas repousando preferencialmente no exterior das habitações (Gillies & Coetzee, 1987). Os indivíduos adultos de *A. azevedoi* são facilmente confundíveis com os de *A. listeri* De Meillon, 1931, uma espécie igualmente costeira embora menos tolerante à salinidade e sem hábitos antropofílicos (Ribeiro & Ramos, 1975). Existem ainda poucos dados acerca do possível papel de *A. azevedoi* na transmissão de malária mas este não deve ser negligenciado (Ribeiro, 1974). Um factor a ter em conta é que, apesar da exofilia, devido ao calor, nestas regiões muitas famílias pernoitam no exterior das habitações, comportamento que leva ao aumento do contacto na altura em que o mosquito está mais activo. De acordo com Coluzzi *et al.* (1979) a agressividade dentro ou fora das habitações podem variar de acordo com a estação. Assim, serão necessários mais estudos de modo a avaliar o potencial papel de *A. azevedoi* como vector de malária em Angola, que deverão incluir a comparação entre as estações seca e húmida.

As espécies do Complexo *Anopheles nili* apresentam uma grande distribuição no continente africano com um comportamento variável entre zoofilia (espécies descritas na Namíbia) e antropofilia (espécies encontradas na região da República Democrática do Congo), podendo também variar no grau de endofilia (Gillies & Coetzee, 1987). A sua ocorrência em Angola foi descrita por Ribeiro e Ramos (1975) e o seu papel como vector de malária, embora ainda subjectivo, é reconhecido em alguns países do Oeste Africano. De acordo com os locais de captura na província de Luanda, Cacuaco e Funda, é possível aferir que pertença à forma *nili* Congo. Embora estas sejam zonas de grande proximidade ao mar, esta forma é característica de bacias fluviais onde se dá o seu desenvolvimento larvar (Gillies & De Meillon, 1968).

Anopheles funestus é um importante vector de malária na região Afro-tropical com uma densidade variável, aumentando com a chegada da estação húmida de acordo com as épocas chuvosas (Gillies & Coetzee, 1987; Hervy *et al.*, 1998). Tal poderá explicar o facto de ter sido a espécie menos abundante nas colheitas efectuadas neste estudo (apenas 5,5% do total de indivíduos adultos capturados na Província de Luanda) realizado durante a estação seca.

Anopheles ziemanni Grünberg, 1902 é uma espécie que ocorre geralmente nas proximidades de terrenos alagados, muitas vezes também associado a águas com algum teor salino. É um vector secundário uma vez que os seus hábitos alimentares são preferencialmente zoofílicos (Gillies & De Meillon, 1968). Esta espécie foi encontrada em Luanda onde as colheitas foram feitas em locais próximos do mar.

Anopheles gambiae Giles, 1902 é uma espécie ubíqua no território Angolano, incluindo toda a faixa costeira, sendo o mais importante vector do país (Ribeiro & Ramos, 1975). A distribuição e abundância de *A.gambiae* parecem ser fortemente influenciadas por factores climáticos, principalmente a precipitação total anual (Lindsay *et al.*, 1998). As espécies do Complexo *A. gambiae* foram maioritariamente encontradas em Cabinda e Luanda, locais que mesmo durante a estação seca apresentam maior temperatura e humidade relativa.

2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO COMPLEXO *A. GAMBIAE*

Em Cabinda, a forma S de *A. gambiae* foi a única identificada. Embora a reduzida dimensão da amostra não permita tirar conclusões robustas, este achado está de acordo com estudos anteriores que sugerem que a forma S é mais comum em zonas florestais húmidas, rurais ou com pouca pressão humana (della Torre *et al.*, 2005).

Em Luanda e Benguela prevaleceu a forma M, o que uma vez mais está de acordo com a literatura (della Torre *et al.*, 2005). Esta forma é considerada como mais adaptada a ambientes urbanos, com forte pressão humana, tal como foi o caso das localidades prospectadas nas províncias de Luanda e Benguela. Recentemente, Cuamba *et al.* (2006) publicaram resultados de 400 mosquitos colhidos na província de Luanda em 2001, dos quais 94% foram identificados como sendo da forma M e 6% da forma S.

Anopheles melas foi encontrado em pequena proporção, em simpatria com ambas as formas de *A. gambiae* s.s. Esta é uma espécie descrita como típica de água salobra, de distribuição costeira tendo sido observada na Ilha do Mussulo em Luanda e em Cabinda, em locais sempre muito próximos ao mar. Esta espécie é considerada um vector secundário de malária, podendo contudo ter um papel relevante na transmissão local em circunstâncias particulares, tais como períodos de grande densidade (Gillies & Coetzee, 1987).

3. TESTES DE RESISTÊNCIA

Para muitos dos testes de susceptibilidade efectuados, não foi possível atingir o número mínimo de mosquitos ensaiados recomendado pela OMS (100 mosquitos/ insecticida/dose em 4-5 réplicas de 20 mosquitos (WHO, 1998) Assim, apenas são válidos os testes de *A. gambiae* s.l para a Lambdaialotrina em Luanda, bem como os testes do Grupo *A. listeri* para os três insecticidas, efectuados em Benguela.

Níveis de mortalidade indicadores de resistência foram apenas observados em Benguela, no Grupo *A. listeri* para DDT. A taxa de mortalidade inferior a 80% é comparável com a obtida por Ribeiro & Mexia (1970), com populações larvares deste Grupo colhidas na mesma província: Neste estudo, os autores registaram 20% de indivíduos resistentes ao mesmo insecticida. Tal sugere que a selecção da resistência a este insecticida neste Grupo terá ocorrido ainda durante o período colonial, possivelmente associado a programas de erradicação da malária ou ao uso do DDT na agricultura (Cambournac *et al.*, 1956).

4. MUTAÇÕES *KNOCKDOWN RESISTANCE* EM *A. GAMBIAE* S.S.

Neste trabalho, foram encontrados alelos de resistência *kdr* nas Províncias Angolanas de Cabinda e Luanda. Em Cabinda, apesar da baixa amostragem, as duas mutações *kdr* foram encontradas com elevada frequência que, no

conjunto, constituíram 75% dos 40 alelos amostrados nesta Província. A ocorrência de ambas as mutações *kdr* em *A.gambiae* s.s. tinha sido já observada no Gabão (Pinto *et al.*, 2006) e nos Camarões (Etang *et al.*, 2006) sugerindo que se trata de um fenómeno comum em populações desta espécie na região Centro-Occidental de África. As implicações epidemiológicas deste fenómeno permanecem ainda por investigar.

Em Luanda, o alelo de resistência 1014F foi encontrado em 18 indivíduos da forma M de *A.gambiae* s.s. Embora a ocorrência de mutações *kdr* na formam M seja rara, este não é um achado único, tendo sido anteriormente observado no Burkina Faso e Benim (Weill *et al.*, 2000; Diabaté *et al.*, 2002). Weill *et al.*, (2000) sugeriram, após análise do intrão 1 do gene dos canais de sódio, que a presença do alelo 1014F na forma M terá ocorrido por introgressão com a forma S.

Tal como neste estudo, Cuamba *et al.* (2006) não encopntraram alelos *kdr* em 164 *A.gambiae* s.s. provenientes de Benguela, e também da Província do Huambo (N= 54). Os autores não genotiparam amostras de Luanda nem de Cabinda, pelo que não é possível uma comparação de resultados com estudos anteriores, para estas Províncias.

Na análise de correlação genótipo/fenótipo, apenas 3 indivíduos apresentaram o fenótipo resistente, sendo dois heterozigóticos entre o alelo selvagem e o alelo 1014F associado à resistência e um heterozigótico para os dois alelos associados à resistência (1014F/1014S). Não houve uma correspondência entre genótipos homozigóticos para qualquer dos alelos de resistência e o fenótipo resistente, tal como seria de esperar para uma característica incompletamente recessiva como a resistência *kdr* em *A. gambiae* (Chandre *et al.*, 2000; Ranson *et al.*, 2000). De igual modo, a presença dos dois alelos de resistência em heterozigotia também não correspondeu na totalidade, à resistência fenotípica. Estes resultados levantam dúvidas sobre o impacto dos alelos 1014F e 1014S no fenótipo resistente, em particular acerca do grau de recessividade dos mesmos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, a reduzida dimensão das amostras de *A. gambiae* não permitiu tirar conclusões robustas acerca do actual estado de susceptibilidade aos insecticidas, neste vector de malária em Angola. Embora para o reduzido número de mosquitos ensaiados, as taxas de mortalidade tenham sido bastante elevadas, sugerindo susceptibilidade, será necessário repetir estes

ensaios de modo a confirmar os valores preliminares obtidos. Só assim se poderá ter uma noção mais precisa sobre o real impacto das medidas de controlo em curso, na selecção de resistência aos insecticidas.

A ocorrência dos dois alelos *kdr*, associados à resistência aos insecticidas DDT e piretróides, poderia ser um indicador de resistência nestas populações. No entanto não foi observada uma relação directa, a nível individual, entre a presença dos alelos (em homozigotia ou heterozigotia) e o fenótipo de resistência. Este foi um resultado inesperado, tendo em conta que a resistência *kdr* é considerada um carácter recessivo (Martinez-Torrez *et al.*, 1998; Ranson *et al.*, 2000).

No Grupo *A. listeri*, foi observada resistência ao DDT em Benguela, num conjunto de ensaios válido de acordo com os critérios da OMS. A elevada abundância observada nesta província sugere que este vector possa ter um papel relevante na transmissão da malária, durante a estação seca. Seria pertinente a realização de um estudo mais aprofundado sobre o Grupo *A. listeri* (i.e. *A. azevedoi*) de modo a conhecer-se o seu papel na transmissão da malária bem como as possíveis interacções com a espécie *Anopheles gambiae* quando em simpatria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

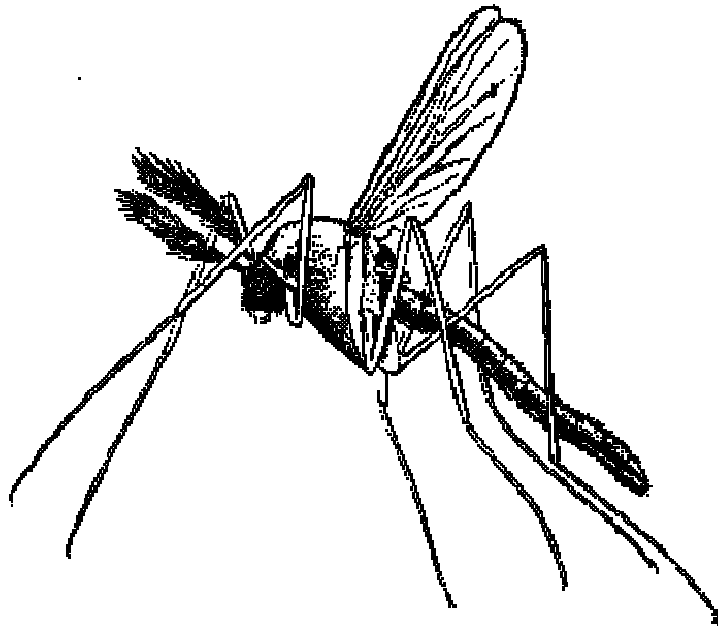


Figura 17. Imagem retirada de www.aenews.wsu.edu

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apperson CS & Georghiou GP (1975). Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides. In *Culex tarsalis*. *Journal of Economic. Biochemistry* 68: 63-78

Ayala FJ, Escalante AA, Lal AA, Rich SM (1998). Evolutionary relationships of human malaria parasites. In: *Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection*, Sherman IV (Ed.), American Society for Microbiology Press, Washington D.C.: 285-300

Bagayoko M, Ameneshewa B, Faye O, Lymo E, Govere J, Gebremarian M & Manga L(2005). The status of malária vector resistance to insecticides used for public health in the African Region. *WHO Bulletin*

Beales P& Gilles HM (2002). Rationale and technique of malaria control. In Warrel DA & Gilles.HM. *Essential Malaryology*. (4th Ed). Arnold. London: 107-190

Begun DJ & Aquadro CF (1993). African and North American populations of *Drosophila melanogaster* are very different at the DNA level. *Nature* 365: 548-50

Black WC & Moore CG (1996). Population biology as a tool for studying vector-borne diseases. In: Beaty BJ. *The biology of disease vectors*. Niwot (CO): University of Colorado; 393-416. Marquardt MC, editors

Bremen J (2001). The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 64:1–11

Brunhes J, Cuisance D, Cuny G, Manguin S, de La Roque S, Geoffreu B (1998). Medical entomology: the technological explosion *Medicine Tropicale* 58 : 15-20

Cambournac FJ, Gandara AF, Casaca VM (1956). Malaria prevention by the application of insecticides of residual action on the rural area south of Angola. *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical* 13:361-70

Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dosou-Yoyo J, Darriet F, Diabate A, Carnevale , Guillet P(1999). Current distribution of pyrethroid resistance gene

(*kdr*) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of Mopti form. *Parassitologia* 41:319-322

Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, Carnevale P, Guillet P (2000). Modifications of pyrethroid effects associated with *kdr* mutation in *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology* 14:81-8

Charlwood JD, Kihonda J, Sama S, Billingsley PF, Heiz B & Takken W (1995). The rise and fall of *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in a Tanzanian village. *Bulletin of Entomological Research* 85: 37-44

Coats JR (1990). Mechanisms of toxic action and structure activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*. 87:255-62

Coetzee M, Craig M, le Sueur D (2000). Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitology Today* 16: 74-77

Collins FH, Finnerty V & Petrarca V (1988). Ribosomal DNA-probes differentiate five cryptic species in the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia* 30: 321-240

Collins FH, Kamau L, Ranson HA & Vulule JM (2000). Molecular entomology and prospects for malaria control. *Bulletin of the World Health Organization* 78: 1412-1423

Coluzzi M (1968). Cromosomi politenici delle cellule nutrici ovariche nel complesso *gambiae* del genere *Anopheles*. *Parassitologia* 10: 179-183

Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V & Di Deco MA (1979). Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73:5

Coluzzi M (1984). Heterogeneities of the malaria vectorial system in tropical Africa and their significance in malaria epidemiology and control. *WHO Bulletin* 63: 107-113

Coluzzi M, Petrarca V & Di Deco MA (1985). Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bulletin of Zoology*. 52: 45-63

Coluzzi M (1994). Malaria and the Afrotropical ecosystems: impact of man-made environmental changes. *Parassitologia* 36:223-7

Coluzzi M, Sabatini A, della Torre A, Di deco MA, Petrarca V (2002). A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science* 298: 1415-1418

Constantini C, Sagon NF, della Torre A, Coluzzi M (1999). Mosquito behavioural aspects of vector human interactions in the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia* 41: 209-217

Cravo P & Rosário VE (2002). Aspectos da genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos. *Boletim de Biotecnologia* 73: 2-8

Cuamba N, Kwang SC, Townson H (2006). Malaria vectors in Angola: distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex, their pyrethroid insecticide knockdown resistance (*kdr*) status and *Plasmodium falciparum* sporozoite rates. *Malaria Journal* 5:2

della Torre A, Fanello C, Akogbeto M, Dossou-yovo J, Favia G, Petrarca V & Coluzzi M (2001). Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Molecular Biology* 10: 9-16

della Torre A, Costantini C, Besansky NJ, Caccone A, Petrarca V, Powell JR, Coluzzi M (2002). Speciation within *Anopheles gambiae* – the Glass Is Half Full. *Science* 298: 115 - 117

della Torre A, Tu Z, Petrarca V (2005). On the distribution and genetic differentiation of *Anopheles gambiae* s.s. molecular forms. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 755 – 769

Denac H, Mevissen M, Scholtisyc G (2000). Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* ; 362: 453-79

Diabaté A, Baldet T, Chandre F, Guiguemdé RT, Brengues C, Guillet P, Hemingway J, Hougard JM (2002). First report of the *kdr* mutation in *Anopheles gambiae* M form from Burkina Faso, West Africa. *Parasitologia* 44: 157-8

Diggins K (2002). Malaria: Still a Global Health Problem. *Topics in Advanced Practice Nursing e-Journal*. 2. www.medscape.com

Etang J, Fondjo E, Chandre F, Morlais I, Brengues C, Nwane P, Chouaibou M, Ndjemai H, Simard F (2006). First report of knockdown resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74:795-7

Fanello C, Santolamazza F & Della Torre A (2002). Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Medical and veterinary Entomology* 16: 461-464

Fanello C, Petrarca V, della Torre A, Santolamazza F, Dolo G, Coulibaly M, Allouche A, Curtis CF, Touré YT, Coluzzi M (2003). The pyrethroid knockdown resistance gene in the *Anopheles gambiae* complex in Mali and further indication of incipient speciation within *An. Gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*; 12: 241-24

Fernandez J & Forattini OP (2003). Survival of *Aedes albopictus*: physiological age and reproductive history. *Revista de Saude Publica* 37:285-91

Gentile G, Slotman M, Ketmaier V, Powell JR & Caccone A (2001). Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* 10: 25-32

Gentile G, della Torre A, Maegga B, Powell JR, Caccone A (2002). Genetic differentiation in the African malaria vector, *Anopheles gambiae* s.s., and the problem of Taxonomic status. *Genetics* 161:1561-78

Gillies MT & De Meillon B (1968). The Anophelinae of Africa South of the Sahara. *The South African Institute for Medical Research* 54: 343

Gillies MT & Coetzee M (1987). A supplement to the Anophelinae of Africa south of the Sahara. *The South African Institute for Medical Research* 55:143

Ke X, Collins A, Ye S (2002). PCR designer for restriction analysis of various types of sequence mutation. *Bioinformatics Applications Note*, 12: 1688-1989

Halliassos A, Chomel JC, Tesson L, Bambis M, Kruh J, Kaplan JC, Kitz A (1989). Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutation. *Nucleic Acid* 17:3606

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H (2004). The molecular basis of resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology* 18: 153-60

Hemingway J (2005). In: Beaty BJ, Marquardt MC. *The biology of disease vectors*. Niwot (CO): University of Colorado; 393-416. Marquardt MC, editors

Hervy JP, Le Goff G, Geofroy B, Herve JP, Manga L, Brunhes J (1998). Os anopheles da região afrotropical: um programa de identificação e de ensino. Paris; ORSTOM, 1CD (Didactiques)

Hunt RH (1973). A cytological technique for the study of *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia* 15: 137-139

Hunt RH, Coetzee M, Fettene M (1998). The *Anophelesgambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92: 231-235

Legros F & Danis M (1998). Surveillance of malaria in European Union countries. *Eurosurveillance*. 3

Lindsay SW, Parson L, Thomas CJ (1998). Mapping the ranges and relative abundance of the two principal African malaria vectors, *Anopheles gambiae sensu stricto* and *An. arabiensis*, using climate data. *Proceedings of the Royal Society of London. B* 265: 847-854

Macan J, Varnay VM, Turk R (2006). Health effects of pyrethrins and pyrethroids . *Arhiv za higijenu rada I toksokologiju* 57: 237-43

Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge 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 Molecular Biology* 7: 179-184

Mathenge EM, Gimnig JE, Kolczak M, Ombok M, Irungu LW, Haeley WA, (2001). Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behaviour, blood feeding success, and time of feeding of malária mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. *Journal of Medical Entomology* 38: 531-536

Narashi T (1976). Nerve membrane as a target for pyrethroids. *Pesticide Science* 7: 267-272

Oliveira E (2007). Caracterização genética do mosquito vector da malária *Anopheles gambiae* em Bissau, Guiné-Bissau. Tese de Licenciatura. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. 62 pp

Pinto JP (2003). Population Structure of *Anopheles gambiae* Giles, 1902 and the epidemiology and control of malaria in São Tomé and Príncipe. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 189 pp

Pinto J, Lynd A, Elissa N, Donnelly MJ, Costa C, Gentile G, Caccone A, do Rosário VE (2006). Co-occurrence of East and West African *kdr* mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon. *Medical and Veterinary Entomology* 20: 27-32

PMI: President Malaria's Initiative. www.fightingmalaria.gov

Ranson H, Jensen B, Wang X, Prapanthadara L, Hemingway J, Collins FH (2000). Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 9:499-507

Raymond M, Rousset F (1995). GENEPOP (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249

Ribeiro H & Mexia JT (1970). Detection of DDT resistance in adult *Anopheles melas* and larval *Anopheles listeri* populations from Lobito, Angola (Portuguese West Africa). *Mosquito News* 30: 611-613

Ribeiro H (1974) Research on the mosquitoes of Angola. Garcia de Orta, *Serie Zoologia* 3:31-37

Ribeiro H, Ramos HC (1975). Research on the Mosquitoes of Angola. *Garcia de Orta, Série Zoologia* 4: 1- 40

Richards OW & Davies RG (1977). Imm's general book of entomology II: General classification and biology (10th Ed.), New York

Sabatinelli G, Ejov M, Joergensen P (2001). Malaria in the WHO European Region (1971-1999). *Eurosurveillance* 6

Scott JA, Brogdon WG, Collins FH (1993). Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49: 520-529

Service MW (1980). *A Guide to Medical Entomology*. The McMillan Inst. College (1st Ed). London

Service MW (1993). Mosquito ecology. Field Sampling Methods, (2nd Ed). Chapman & Hall, London

Service MW & Townson H (2002). The *Anopheles* vector In Warrel DA & Gilles HM. *Essential Malariology*. (4th Ed), London: 59-84

Slotman MA, Reimer LJ, Thiemann T, Dolo G, Fondjo E , Lanzaro G (2006). Reduced recombination rate and genetic differentiation between the M and S form of *Anopheles gambiae* s.s. *Genetics* 10:1054

Snow RW, Gilles HM (2002). The epidemiology of malaria. In: Warrel DA & Gilles HM. *Essential Malariology* (4th Ed), Arnold. London: 85-105

Soderlund DM & Knipple DC (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 563-77

Weill M, Chandre F, Brengues C, Manguin S, Akogbeto M, Pasteur N, Guillet P & Raymond M (2000). The *kdr* mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Molecular Biology* 9: 451-455

White GB & Rosen P (1973). Comparative studies on sibling species of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera, Culicidae). Ecology of species A and B in savanna around Kaduna, Nigeria, during transition from wet to dry season. *Bulletin of entomological research* 62:613-625

White GB (1974). *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 68: 278-301

WHO (1963). Résistance aux insecticides et lutte contre les vecteurs. Treizième rapport du comité OMS d'experts des insecticides, Genève : OMS, *Séries de Rapports Techniques* 265

WHO (1968). *Méthodes statistiques utilisées dans les campagnes d'éradication du paludisme*. OMS, Genève

WHO (1970). Insecticide Resistance and vector control. *Seventeenth Report of the WHO Expert Committee on Insecticides. Technical Report Series* 443. WHO, Geneva

WHO (1998) Tests Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-Efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surfaces. *Report of the WHO Informal Consultation*. Geneva:

WHO (2005). World Malaria Report. . rbm.who.int/wmr2005/

WHO (2006a). Malaria Vector control and Personal Protection” *Technical Report Series* 936. WHO, Geneva

WHO (2006b). WHO gives indoor use of DDT a clean bill of health for controlling malaria.

www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr50/en/print.html

Yawson AE, McCall PJ, Wilson MD, Donnelly MJ (2004). Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. *Medical and Veterinary entomology* 18: 372-7

Sites consultados:

www.aenews.wsu.edu; Atualizado diariamente. Acedido em Julho de 2007

www.cdc.org; Atualizado a 30 de Maio de 2007. Acedido em Junho de 2007

www.cia.gov/redirects/factbookredirect.htm; Atualizado a 29 de Junho de 2007. Acedido em Julho de 2007

www.fightingmalaria.gov; Atualizado a 27 de Abril 2007; Acedido em Junho 2007

www.medscape.com; Atualizado a 18 de Abril de 2007; Acedido em Julho de 2007

www.im.microbios.org; Atualizado diariamente. Acedido em Abril de 2007.

www.offthemark.com; Atualizado em Fevereiro de 2007. Acedido em Abril 2007

www.rbm.who.int; Atualizado diariamente. Acedido em Abril 2007.

ANEXO I

Composição do kit de teste:

a) 12 Tubos de plástico (125mm de comprimento e 44mm de diâmetro), nos quais uma das pontas é preenchida por uma grelha com uma malha de tipo 16. Os 12 tubos incluem:

- 5 Tubos marcados a vermelho: são usados como tubos de exposição, onde se sujeitam os mosquitos ao insecticida.

- 2 Tubos marcados a verde: são usados como tubos de controlo, ou seja, sem insecticida.

- 5 Tubos marcados a verde: são usados como tubos de repouso para o repouso pré-teste e para observação pós-exposição.

b) 6 Lâminas, cada uma com um encaixe de rosca em cada lado e com um orifício de 20mm de diâmetro.

c) 40 Folhas de papel de limpo (12x15) para revestir os tubos de repouso.

d) 14 Clipes com cabo em forma de mola para prender os papéis contra as paredes dos tubos:

- 7 Clipes de aço: para serem usados nos tubos de repouso e nos tubos de controlo

- 5 Clipes de cobre: usados nos tubos de exposição aos insecticidas.

e) 2 Aspiradores de vidro (podem também ser de plástico) do tipo OMS para captura de mosquitos) 1 Rolo de fita adesiva plástica.

f) 1 Rolo de fita adesiva plástica.

g) Manual de instruções, 20 formulário, 3 folhas de papel logarítmico para traçar rectas de regressão e os documentos: WHO/VBC/81.6 “ Critérios e significado dos testes de determinação da susceptibilidade de insectos a insecticidas”; WHO/VBC/ 81.805 “Instruções para determinar a susceptibilidade ou resistência de mosquitos adultos a insecticidas organoclorinos, organofosfatos e carbamatos, estabelecimentos da linha de base”.

ANEXO II

Insecticidas:

- a) Conjuntos de caixas, cada uma contendo 8 papéis de 12x15 cm, impregnados com o insecticida às concentrações recomendadas os em concentrações requisitadas no caso de se pretender efectuar testes a várias concentrações.
- b) Caixas contendo papéis de controlo, impregnados com o excipiente apropriado de cada insecticida. Deste modo, haverá papéis de controlo para organoclorinos, carbamatos-organofosfatos e piretróides.

WORLD HEALTH ORGANIZATION ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTÉ ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD	
INSECTICIDE-IMPREGNATED PAPERS PAPIERS IMPREGNÉS D'INSECTICIDE PAPELES IMPREGNADOS DE INSECTICIDAS	
CONCENTRATION:	OC- CONTROL
CONCENTRACIÓN:	
IMPREGNATION DATE:	
DATE D'IMPRÉGNATION:	JULY 2006
FECHA DE IMPREGNACIÓN:	
EXPIRY DATE:	
DATE-LIMITE D'UTILIZATION:	JULY 2011
FECHA DE CADUCIDAD:	
BATCH No:	
LOT No:	OC 016
LOTE No:	
CONTROL No:	
CONTRÔL No:	O16
COMPROBATION No:	
CAUTION: Roll the paper and insert in tubes with labelling (insecticide/concentration) outside and visible through tube wall.	
AVIS: Rouler les papiers de façon à ce que le mom de l'insecticide soit à l'extérieur et visible à travers la paroi du tube.	
NOTA: Enrolle el papel y colóquelo en el tubo de modo que el rótulo (insecticida/ concentración) esté al exterior y pueda lees a través de las pared.	

WORLD HEALTH ORGANIZATION ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTÉ ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD	
INSECTICIDE-IMPREGNATED PAPERS PAPIERS IMPREGNÉS D'INSECTICIDE PAPELES IMPREGNADOS DE INSECTICIDAS	
CONCENTRATION:	DDT 4%
CONCENTRACIÓN:	
IMPREGNATION DATE:	
DATE D'IMPRÉGNATION:	JULY 2006
FECHA DE IMPREGNACIÓN:	
EXPIRY DATE:	
DATE-LIMITE D'UTILIZATION:	JULY 2011
FECHA DE CADUCIDAD:	
BATCH No:	
LOT No:	DD042
LOTE No:	
CONTROL No:	
CONTRÔL No:	042
COMPROBATION No:	
CAUTION: Roll the paper and insert in tubes with labelling (insecticide/concentration) outside and visible through tube wall.	
AVIS: Rouler les papiers de façon à ce que le mom de l'insecticide soit à l'extérieur et visible à travers la paroi du tube.	
NOTA: Enrolle el papel y colóquelo en el tubo de modo que el rótulo (insecticida/ concentración) esté al exterior y pueda lees a través de las pared.	

WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTÉ
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

INSECTICIDE-IMPREGNATED PAPERS
 PAPIERS IMPREGNÉS D'INSECTICIDE
 PAPELES IMPREGNADOS DE INSECTICIDAS

CONCENTRATION: **PY CONTROL**
 CONCENTRACIÓN:

IMPREGNATION DATE:
 DATE D'IMPRÉGNATION: **AUGUST 2006**
 FECHA DE IMPREGNACIÓN:

EXPIRY DATE:
 DATE-LIMITE D'UTILIZATION: **AUGUST 2007**
 FECHA DE CADUCIDAD:

BATCH No:
 LOT No: **PY037**
 LOTE No:

CONTROL No:
 CONTRÔL No: **037**
 COMPROBATION No:

CAUTION: Roll the paper and insert in tubes with labelling
 (insecticide/concentration) outside and visible through tube wall.

AVIS: Rouler les papiers de façon à ce que le mom de
 l'insecticide soit à l'extérieur et visible à travers la paroi du tube.

NOTA: Enrolle el papel y colóquelo en el tubo de modo que el
 rótulo (insecticida/ concentración) esté al exterior y pueda lees a
 través de las pared.

WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTÉ
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

INSECTICIDE-IMPREGNATED PAPERS
 PAPIERS IMPREGNÉS D'INSECTICIDE
 PAPELES IMPREGNADOS DE INSECTICIDAS

CONCENTRATION: **DELTAMETHRIN 0,05%**
 CONCENTRACIÓN:

IMPREGNATION DATE:
 DATE D'IMPRÉGNATION: **AUGUST 2006**

FECHA DE IMPREGNACIÓN
 EXPIRY DATE:
 DATE-LIMITE D'UTILIZATION: **AUGUST 2007**
 FECHA DE CADUCIDAD:

BATCH No:
 LOT No: **DE076**
 LOTE No:

CONTROL No:
 CONTRÔL No: **076**
 COMPROBATION No:

CAUTION: Roll the paper and insert in tubes with labelling
 (insecticide/concentration) outside and visible through tube wall.

AVIS: Rouler les papiers de façon à ce que le mom de
 l'insecticide soit à l'extérieur et visible à travers la paroi du tube.

NOTA: Enrolle el papel y colóquelo en el tubo de modo que el
 rótulo (insecticida/ concentración) esté al exterior y pueda lees a
 través de las pared.

WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTÉ
ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

INSECTICIDE-IMPREGNATED PAPERS
 PAPIERS IMPREGNÉS D'INSECTICIDE
 PAPELES IMPREGNADOS DE INSECTICIDAS

CONCENTRATION: **LAMBDA CYALOTHRIN 0.05%**
 CONCENTRACIÓN:

IMPREGNATION DATE:
 DATE D'IMPRÉGNATION: **JULY 2006**
 FECHA DE IMPREGNACIÓN:

EXPIRY DATE:
 DATE-LIMITE D'UTILIZATION: **JULY 2006**
 FECHA DE CADUCIDAD:

BATCH No:
 LOT No: **LA027**
 LOTE No:

CONTROL No:
 CONTRÔL No: **027**
 COMPROBATION No:

CAUTION: Roll the paper and insert in tubes with labelling
 (insecticide/concentration) outside and visible through tube wall.

AVIS: Rouler les papiers de façon à ce que le mom de
 l'insecticide soit à l'extérieur et visible à travers la paroi du tube.

NOTA: Enrolle el papel y colóquelo en el tubo de modo que el
 rótulo (insecticida/ concentración) esté al exterior y pueda lees a
 través de las pared.

ANEXO III

Lista de reagentes:

- Tampão de lise:

Composição		Para 100ml	Stock
Tris-HCl, pH 8.0	0,1M	20ml	0,5M
NaCl	0,08M	16ml	0,5M
EDTA, pH 8.0	0,06M	12ml	0,5M
SDS	0,5%	5ml	10%
Sacarose	0,16M	5,475g	

- Tampão de enzima de restrição (T.E.), pH 8.0:

Composição		Para 50ml	Stock
Tris-HCl, pH 8.0	10mM	1ml	0,5M
EDTA, pH 8.0	1mM	0,1ml	0,5M
ddH ₂ O (estéril)		48,9ml	