

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

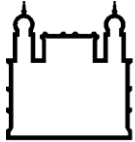
**Avaliação do efeito da seleção de populações de campo de *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) com o inseticida organofosforado malathion**

Priscila Viana Medeiros Loredo

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Denise Valle (IOC/Labmof)

Coorientador: Dr Rafael Dias Mesquita (IQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, julho de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

# **Avaliação do efeito da seleção de populações de campo de *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) com o inseticida organofosforado malathion**

*Priscila Viana Medeiros Loredo*

**Tese apresentada como requisito a obtenção do título de Doutora em Biologia Parasitária, com área de concentração em Genética e Bioquímica**

Orientadora: **Dr<sup>a</sup> Denise Valle** (IOC/Labmof)  
Coorientador: **Dr Rafael Dias Mesquita** (IQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, julho de 2017

Viana-Medeiros, Priscila Fernandes .

Avaliação do efeito da seleção de populações de campo de *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) com o inseticida organofosforado malathion / Priscila Fernandes Viana-Medeiros. - Rio de Janeiro, 2017.  
vii + 199 f.; il.

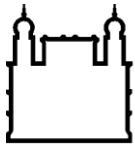
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientadora: Denise Valle.

Co-orientador: Rafael Dias Mesquita.

Bibliografia: f. 188-199

1. *Aedes aegypti*. 2. Resistência a inseticidas. 3. Seleção com o organofosforado malathion. 4. Mecanismos de resistência. 5. Transcriptoma.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

### **Avaliação do efeito da seleção de populações de campo de *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) com o inseticida organofosforado malathion**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biologia Parasitária, área de concentração: Genética e Bioquímica.

#### **Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Fernando Ariel Genta - Presidente** (IOC – FIOCRUZ / RJ)

**Prof. Dr. Daniel Antunes Maciel Villela** (PROCC – FIOCRUZ / RJ)

**Prof. Dr. Gustavo Lazzaro Rezende** (UENF / RJ)

**Prof. Dr. Felipe de Almeida Dias** (IBqM - UFRJ / RJ)

**Prof. Dra. Mariana Rocha David** (IOC – FIOCRUZ / RJ)

Rio de Janeiro, 31 de julho de 2017

Este trabalho foi realizado em três laboratórios distintos. Os ensaios biológicos, bioquímicos e moleculares foram feitos no *Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores*, Instituto Oswaldo Cruz, sediado no Instituto de Biologia do Exército. As análises de bioinformática foram realizadas no *Laboratório de Bioinformática* do Instituto de Química da UFRJ. Todo esforço de análise e interpretação dos resultados foi feito no *Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus*, Instituto Oswaldo Cruz. Foram utilizados recursos da Fundação Oswaldo Cruz, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*“Cada pessoa deve trabalhar  
para seu aperfeiçoamento  
e, ao mesmo tempo,  
participar da  
responsabilidade coletiva  
por toda a humanidade.”*  
(Marie Curie).

***Dedico esta tese às pessoas mais importantes da minha vida: minha família!***

***Ao meu Vovô Zizi (in memoriam), minha Vovó Cidinha (in memoriam), minha Mamãe Vanildinha, aos meus irmãos Patrícia e Rafael (e também à sua estimada esposa Luana), a minha madrinha Vaninha.***

***Dedico este manuscrito também ao meu amado marido, Sandi, e ao amor de nossas vidas, a Emanuelle.***

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus pelo que conquistei até agora, mas peço a Ele sabedoria e perseverança para conquistar muito mais. Ao longo deste estudo eu amadureci muito e senti crescer em mim a vontade de ajudar, de forma mais direta, a população brasileira a viver menos doente. *‘Na esperança de que eu irei conseguir (sobre)viver de pesquisa no Brasil, eu sigo!’*

***“Unir-se é um bom começo, manter a união é um progresso, e trabalhar em conjunto é a vitória” - Henry Ford.***

Agradeço a todos os amigos que eu fiz no Laficave: Márcia, Bento, Jutta, Ademir, Luana Farnesi, Thiago, Diogo, Gilberto, Raquel, Luana Carrara, Mariana, Gustavo, Helena, Ingrid, Renata, André, Luiz Paulo, Felipe, Adriana, Luciana, Gabriela, Diogo, Monique, Maria Ignez, Laís e Letícia. O meu mais profundo agradecimento aos meus estimados amigos!!

Agradeço também a toda equipe do Labmof, pelo apoio de sempre, principalmente a Dra Myrna, Adalgiza, Yasmin e Lidiane.

A Denise Valle, que não é apenas minha orientadora, é uma amiga. Eu não tenho palavras que possam expressar a magnitude de tudo o que eu aprendi com ela ao longo de 14 anos de convivência. Eu sei que ainda tenho muito a aprender, mas estou certa de que aprendi a ser muuuuito crítica e ainda mais ética do que eu era, por tentar me espelhar em você.

Agradeço a Renata Schama por todas as palavras de incentivo que acabaram fazendo eu me arriscar no campo da bioinformática.

Uma parte importante desta tese foi feita no Laboratório de Bioinformática do Instituto de Química da UFRJ. Eu também sou profundamente grata ao professor Rafael, a professora Glória, e também a todos os alunos deste laboratório onde fui tão bem acolhida. Todos me apoiaram muito e estavam sempre prontos a ajudar. Um agradecimento especial ao André, Bia, Eloy, Larissa e Carlos.

Ao grande amigo que eu herdei do Laficave – Diogo. É muito difícil escrever sobre essa pessoa tão importante na minha vida. Além da amizade sincera de todos os momentos, o Di me ajudou muito na tese. Eu sou profundamente grata a ele por absolutamente tudo!!!

Agradeço também às amigas e comadres Guaíra e Bianca, as amigas Lú e Camila, e aos primos Marcelinho e Lidiane, porque sempre me incentivaram muito e sempre acreditaram na minha vitória.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Instituto Oswaldo Cruz, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

***Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a construção deste trabalho!***

## Sumário

Lista de Siglas e Abreviaturas .....	6
RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
Introdução .....	10
1.1 Importância epidemiológica do <i>Aedes aegypti</i> .....	10
1.2 Controle e controle químico de <i>Aedes aegypti</i> no Brasil .....	11
1.3 Diferenças entre os organofosforados temephos e malathion .....	15
1.4 O estudo dos mecanismos de resistência .....	16
1.4.1 Resistência comportamental .....	17
1.4.2 Redução na penetração do inseticida .....	18
1.4.3 Resistência metabólica .....	18
1.4.4 Insensibilidade do alvo de inseticidas .....	19
1.4.5 Metodologias para avaliação dos mecanismos de resistência .....	23
1.4.6 Algumas notas sobre os mecanismos de resistência a inseticidas .....	26
1.5 Justificativa e apresentação da tese .....	28
Objetivo geral .....	30
Objetivos específicos .....	30
APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS .....	31
CAPÍTULO 1. Resistência a inseticidas, mecanismos associados e aspectos de <i>fitness</i> de duas populações brasileiras de <i>Aedes aegypti</i> .....	32
1.1 Resumo .....	33
1.2 Introdução .....	34
1.3 Materiais e Métodos .....	36
1.3.1 Linhagens de mosquitos .....	36
1.3.2 Dados sobre a distribuição de inseticidas .....	37
1.3.3 Criação de mosquitos .....	37
1.3.4 Inseticidas .....	38
1.3.5 Bioensaios .....	38
1.3.6 Ensaios de genotipagem .....	39
1.3.7 Ensaios bioquímicos .....	40
1.3.8 Avaliação de parâmetros do fitness .....	41
1.4 Resultados .....	43
1.4.1 Inseticidas aplicados em campo .....	43



1.4.2 Resistência a inseticidas, bioensaios .....	44
1.4.3 Mecanismos de resistência a inseticidas, ensaios moleculares .....	44
1.4.4 Mecanismos de resistência a inseticidas, ensaios bioquímicos .....	45
1.4.5 Avaliação de alguns parâmetros do fitness.....	46
1.5 Discussão .....	48
1.6 Conclusões.....	54
1.7 Figura.....	55
1.8 Tabelas .....	56
Tabela 1. Status de suscetibilidade de duas populações de campo de <i>Aedes aegypti</i> aos inseticidas utilizados no programa brasileiro de controle de dengue. ....	
	56
Tabela 2. Frequências alélicas e genotípicas de Kdr das populações de <i>Aedes aegypti</i> estudadas. ....	
	57
Tabela 3. Alterações de atividade enzimática em populações brasileiras de <i>Aedes aegypti</i> . ....	
	58
Tabela 4. Parâmetros de viabilidade das populações de <i>Aedes aegypti</i> de Aracaju e Crato, em comparação com a cepa Rockefeller. ....	
	59
1.9 Material suplementar.....	60
Tabela S1. Alguns detalhes dos bioensaios com inseticidas realizados em populações de <i>Aedes aegypti</i> . ....	
	60
Tabela S2. Frequências alélicas e genotípicas das substituições do gene <i>Nav</i> de <i>Aedes aegypti</i> . ....	
	61
Tabela S3. Quantificação das atividades enzimáticas relacionadas a AChE, o sítio-alvo dos organofosforados, e à resistência metabólica, nas populações brasileiras de <i>Aedes aegypti</i> . ....	
	62
Figura S1. Perfis de inibição da atividade da acetilcolinesterase.....	
	63
Figura S2. Tempo de desenvolvimento larvar.....	
	64
Figura S3. Eficiência de cópula. ....	
	65
Figura S4. Relação entre o montante de sangue ingerido e o peso corporal de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i> . ....	
	66
Figura S5. Números absolutos de postura. ....	
	67
CAPÍTULO 2. Seleção em laboratório de duas populações brasileiras de <i>Aedes aegypti</i> com o organofosforado malathion: quantificação da resistência e avaliação dos mecanismos envolvidos .....	
	68
2.1 Justificativa.....	69
2.2 Materiais e métodos .....	70
2.2.1 Coleta e obtenção de populações de campo .....	70
2.2.2 Bioensaios .....	71

2.2.3	Seleção com o OP malathion.....	72
2.2.4	Ensaio de genotipagem .....	74
2.2.5	Ensaio bioquímico .....	74
2.3	Resultados .....	75
2.3.1	Seleção .....	76
2.3.2	Status de resistência das populações selecionadas .....	76
2.3.3	Genotipagem das mutações kdr .....	84
2.3.4	Resistência metabólica e alvo de OP.....	85
2.4	Discussão.....	88
CAPÍTULO 3. Resposta à seleção de populações naturais de <i>Aedes aegypti</i> com o organofosforado malathion, usando sequenciamento de RNAm .....		
3.1	Justificativa .....	98
3.2	Materiais e métodos .....	99
3.2.1	Coleta e obtenção de populações de campo .....	99
3.2.2	Coleta e armazenamento das amostras para extração de RNA.....	100
3.2.3	Extrações de RNA .....	101
3.2.4	Construção das bibliotecas e sequenciamento das amostras .....	102
3.2.5	Avaliação da qualidade dos reads .....	104
3.2.6	Limpeza dos reads .....	105
3.2.7	Alinhamento dos reads nos genes preditos de <i>A. aegypti</i> .....	106
3.2.8	Remoção da duplicidade dos reads por biblioteca (R1 + R2 = R3).....	106
3.2.9	Alinhamento dos reads R3 nos genes de <i>A. aegypti</i> .....	106
3.2.10	Contagem dos reads e resolução de ambiguidade de mapeamento de reads. ....	107
3.2.11	Estatística: expressão gênica diferencial.....	107
3.2.12	Categorização da transcrição diferencial .....	107
3.2.13	Enriquecimento funcional da transcrição diferencial .....	108
3.3	Resultados.....	109
3.3.1	Extrações de RNA .....	109
3.3.2	Sequenciamento e mapeamento dos reads .....	111
3.3.3	Transcrição diferencial em Aracaju .....	112
3.3.4	Anotação funcional dos genes DE de Aracaju .....	119
3.3.5	Transcrição diferencial em Crato .....	122
3.3.6	Anotação funcional dos genes DE de Crato .....	126
3.4	Discussão (inicial) .....	129

Expressão de proteínas cuticulares e de biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares, em resposta à adaptação à criação em laboratório (grupos C e S).....	130
Expressão de proteínas de ligação a odorantes (OBP) em resposta à adaptação à criação em laboratório (grupos C e S) .....	133
Mudanças na expressão de profenoloxidasas em resposta à adaptação à criação em laboratório, ou à seleção com o malathion .....	135
Comparação com outros trabalhos.....	136
DISCUSSÃO GERAL.....	139
CONCLUSÕES GERAIS .....	144
ANEXO A: PROVA DE PRELO DO ARTIGO DESCRITO NO CAPÍTULO 1 DE RESULTADOS.....	146
ANEXO B: MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 2 DE RESULTADOS .....	148
Tabela B1. Alguns detalhes dos bioensaios com malathion realizados em larvas das populações de <i>Aedes aegypti</i> estudadas. ....	148
Tabela B2. Alguns detalhes dos bioensaios com malathion realizados com fêmeas adultas das populações de <i>Aedes aegypti</i> estudadas.....	148
Tabela B3. Alguns detalhes dos bioensaios com temephos realizados em larvas das populações de <i>Aedes aegypti</i> estudadas. ....	149
Tabela B4. Alguns detalhes dos bioensaios com diflubenzuron realizados em larvas das populações de <i>Aedes aegypti</i> estudadas. ....	149
Tabela B5. Alguns detalhes dos bioensaios com deltametrina realizados com fêmeas adultas das populações de <i>Aedes aegypti</i> estudadas.....	149
ANEXO C: MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 3 DE RESULTADOS – Versão de heatmaps em azul e amarelo .....	150
Figura C1. Transcrição diferencial em decorrência da seleção com o malathion, em Aracaju. ....	150
Figura C2. Transcrição diferencial em decorrência da manutenção em laboratório, em Aracaju. ....	151
Figura C3. Transcrição diferencial em decorrência da seleção com o malathion e da manutenção em laboratório, em Aracaju.....	152
Figura C4. Transcrição diferencial em decorrência da manutenção em laboratório, com reversão completa nas amostras selecionadas com malathion, em Aracaju. ....	153
Figura C5. Transcrição diferencial em decorrência da seleção com o malathion, em Crato. ....	154
Figura C6. Transcrição diferencial em decorrência da manutenção em laboratório, em Crato. ....	155
Figura C7. Transcrição diferencial em decorrência da seleção com o malathion e da manutenção em laboratório, em Crato. ....	156
Figura C8. Transcrição diferencial em decorrência da manutenção em laboratório, com reversão completa nas amostras selecionadas com malathion, em Crato. ....	157

ANEXO D: MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 3 DE RESULTADOS – ANOTAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM ARACAJU.....	158
Tabela D1. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a seleção com o OP malathion, em laboratório (aumentos de expressão) .....	158
Tabela D2. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a seleção com o OP malathion, em laboratório (declínios de expressão) .....	160
Tabela D3. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a adaptação à criação em laboratório (aumentos de expressão).....	161
Tabela D4. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a adaptação à criação em laboratório (declínios de expressão).....	169
Tabela D5. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a seleção com o OP malathion e a adaptação à criação em laboratório (Efeitos duplos: aumentos de expressão, sendo mais marcado nas amostras selecionadas) .....	171
Tabela D6. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a seleção com o OP malathion e a adaptação à criação em laboratório (Efeitos duplos: aumentos de expressão, sendo mais marcado nas amostras controle) .....	172
Tabela D7. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a seleção com o OP malathion e a adaptação à criação em laboratório (Efeitos duplos: declínios de expressão, sendo mais marcado nas amostras controle) .....	176
Tabela D8. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a adaptação à criação em laboratório, com reversão do padrão de expressão pela seleção com o malathion.....	178
ANEXO E: MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 3 DE RESULTADOS – ANOTAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CRATO.....	180
Tabela E1. Anotação funcional dos genes de Crato DE em resposta a seleção com o OP malathion, em laboratório (aumentos de expressão) .....	180
Tabela E2. Anotação funcional dos genes de Crato DE em resposta a seleção com o OP malathion, em laboratório (declínios de expressão) .....	182
Tabela E3. Anotação funcional dos genes de Crato DE em resposta a adaptação à criação em laboratório (aumentos de expressão).....	183
Tabela E4. Anotação funcional dos genes de Crato DE em resposta a seleção com o OP malathion e a adaptação à criação em laboratório (Efeitos duplos: declínios de expressão, sendo mais marcado nas amostras controle) .....	184
Tabela E5. Anotação funcional dos genes de Crato DE em resposta a adaptação à criação em laboratório, com reversão do padrão de expressão pela seleção com o malathion.....	186
REFERÊNCIAS.....	188

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- $\alpha$ -EST - Esterases quantificadas com o substrato acetato de  $\alpha$ -naftil
- $\beta$ -EST - Esterases quantificadas com o substrato acetato de  $\beta$ -naftil
- $\rho$ NPA-EST - Esterases quantificadas com o substrato acetato de  $\rho$ -nitrofenil
- $Na_v$  – Gene que codifica o canal de sódio regulado por voltagem
- Ace – Acetilcolinesterase
- ace-1* – Gene que codifica a Acetilcolinesterase 1 dos insetos
- ace-2* – Gene que codifica a Acetilcolinesterase 2 dos insetos
- AChE – Ensaio que mede atividade total da enzima Acetilcolinesterase
- AChI – Ensaio que mede a inibição da enzima Acetilcolinesterase pelo carbamato proproxur
- Bti – *Bacillus thuringiensis israelensis*
- CB – Inseticidas carbamatos
- CDC – Centers for Disease Control
- CL – Concentração letal
- Cluster – Agrupamento de genes que apresentam mesmo perfil de expressão
- Genes DE – Genes diferencialmente expressos
- GST – Glutathione S-Transferases
- Kdr* – Resistência tipo “*knock-down*”
- Laficave – Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores
- MFO – Oxidases de Função Múltipla (do inglês ‘*Mixed Function Oxidases*’)
- MS-SVS – Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- OP - Inseticidas organofosforados
- p99 – Percentil 99
- Parental RR - Razão de resistência calculada tendo como base a CL inicial da população
- PI – Inseticidas piretróides
- OBP* - proteínas de ligação a odorants, do inglês ‘*odorant binding proteins*’
- RNA-seq* – sequenciamento de bibliotecas de RNA
- Rock RR - Razão de resistência calculada tendo como base a CL da cepa Rockefeller, que é referência de suscetibilidade a inseticidas

RR – Razão de resistência

SNC – Sistema Nervoso Central

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

## RESUMO

No Brasil, organofosforados (OP) e piretróides (PI) foram usados para o controle de larvas e adultos de *A. aegypti*, respectivamente, desde 1967 e 2000. O uso frequente destes produtos selecionou populações resistentes do vetor. Optou-se então por usar o OP fosforoditioato malathion no controle dos adultos, composto molecularmente diferente do larvicida OP fosforotionato temephos, empregado há mais de 40 anos no país. Acredita-se que a resistência seja principalmente derivada de fatores metabólicos (enzimas que detoxificam o inseticida) ou de mutações nos sítios-alvo dos inseticidas, no Sistema Nervoso Central. Bioensaios com larvas confirmaram a resistência de várias populações ao OP temephos. Inicialmente, bioensaios com mosquitos adultos demonstraram não haver populações naturais brasileiras de *A. aegypti* classificadas como resistentes ao malathion (dados Laficave), corroborando a viabilidade de seu uso no controle de adultos. Uma vez que o malathion, ainda hoje, é o único composto não-PI aprovado pela OMS para uso em aplicações espaciais, a antecipação de um potencial evento de resistência nas populações naturais do vetor é relevante para subsidiar a continuidade de seu uso. No estudo foram usados bioensaios para avaliar a resistência das amostras do vetor, além de metodologias clássicas e modernas - como a análise dos índices de expressão gênica (*RNA-seq*) - para investigação dos mecanismos associados à resistência. Foram detectados níveis de resistência elevados contra PI e o OP temephos nas amostras originais das populações de Aracaju/SE e Crato/CE. O mesmo não ocorreu para diflubenzuron e malathion, mais recentemente usados no controle do vetor em campo. Quando ambas as populações iniciais são comparadas, os mosquitos de Aracaju tenderam a apresentar menores níveis de resistência a PI e OP e, simultaneamente, maior atividade de enzimas detoxificadoras e maiores custos evolutivos. Neste estudo também foi realizada seleção com malathion: houve aumento nos índices de RR (razão de resistência) para malathion em todas as réplicas biológicas das duas populações. Os dados sugerem ainda, a inexistência de resistência cruzada entre temephos e malathion. De fato, a seleção com malathion parece ter impactado negativamente sobre a RR frente ao temephos, e também a PI. Inusitadamente, foram observados, nos ensaios com PI, aumentos marcados no *status* de resistência dos grupos controle das duas populações, sem correlação com as frequências *kdr* - estas tenderam, inclusive, a diminuir. A avaliação bioquímica dos mecanismos de resistência revelou a possibilidade de GST ter tido papel importante na resposta frente aos PI nos grupos controle de Aracaju, mas não nos de Crato. Além disso, a análise *RNA-seq* identificou 374 transcritos (~2,6%) considerados diferencialmente expressos (DE) em Aracaju (classificados em oito *clusters*), e um total de 143 transcritos (~1%) considerados DE em Crato (divididos em cinco *clusters*). Foram detectadas, em pelo menos uma das populações avaliadas, alterações em genes potencialmente relacionados com a resistência por redução da penetração do inseticida através da cutícula – mecanismo que recebe pouca atenção nas avaliações sobre resistência. A possibilidade de enzimas *OBP* atuarem como ‘apresentadoras de moléculas inseticidas’, direcionando sua degradação para enzimas MFO, é discutida, assim como de profenoloxidasas agirem na formação da cutícula dos espécimes de Aracaju e Crato.

## ABSTRACT

In Brazil, organophosphates (OP) and pyrethroids (PY) were used for the control of larvae and adults of *A. aegypti*, respectively, since 1967 and 2000. Frequent use of these products selected resistant populations of the vector. It was then chosen to use the OP phosphorodithioate malathion in the control of adults, a molecularly different compound of the OP phosphorothiophate larvicide temephos, employed for more than 40 years in the country. Resistance is supposed to be primarily derived from metabolic factors (enzymes that detoxify the insecticide) or from mutations at the target sites of the insecticides in the Central Nervous System. Bioassays with larvae confirmed the resistance of various populations to the OP temephos. Initially, bioassays with adults showed that any Brazilian natural population of *A. aegypti* was resistant to malathion (Laficave data), corroborating the viability of its use in adult control. Since malathion is, up to now, the only non-PY compound approved by WHO for use in space spraying, the anticipation of a potential resistance event in the vector natural populations would be relevant to reinforce the continuity of its use. In the present study, we employed bioassays in order to evaluate the resistance of vector samples, in addition to classical and modern methodologies - such as the analysis of gene expression indexes (RNA-seq) - to investigate the resistance mechanisms associated. High resistance levels against PY and the temephos OP were detected in the original samples from Aracaju / SE and Crato / CE populations. The same did not occur for diflubenzuron and malathion, both insecticides most recently used in field for vector control. When both initial populations are compared, Aracaju mosquitoes tended to exhibit lower levels of resistance to PY and OP and, simultaneously, higher detoxifying enzyme activity and evolutionary costs. In this study, malathion selection was also performed: there was an increase in the malathion RR (resistance ratio) indexes in all biological replicates of the two populations. The data also point to the lack of cross-resistance between temephos and malathion. Indeed, selection with malathion appears to have negatively impacted temephos and also PY RR levels. Unexpectedly, significant increases in the resistance status of the control groups from both populations were observed in the PY assays, with no correlation with *kdr* frequencies - these even tended to decrease. Biochemical evaluation of resistance mechanisms revealed the possibility of a relevant GST role in the PY response in the Aracaju, but not in Crato, control groups. In addition, the RNA-seq analysis identified 374 transcripts (~ 2.6%) considered differentially expressed (DE) in Aracaju (classified in eight clusters), and a total of 143 transcripts (~ 1%) considered DE in Crato (divided in five clusters). In at least one of the evaluated populations, we detected changes in genes potentially related to resistance by reduction of insecticide penetration through the cuticle - a mechanism that receives little attention in resistance evaluations. The possibility of OBP enzymes carry the role of 'insecticidal molecules presenters', directing their degradation to MFO enzymes is discussed, as well as that of profenoloxidas participating in the cuticle formation of Aracaju and Crato specimens.



# INTRODUÇÃO

## 1.1 Importância epidemiológica do *Aedes aegypti*

*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é o principal vetor de dengue no mundo. Mais recentemente, Zika e chikungunya, outros dois vírus transmitidos por este mosquito, além de estarem disseminados em vários países, são atualmente sérios problemas de saúde pública no Brasil (Ferreira-de-Brito et al. 2016). Em 2016, foram registrados 1.500.535 casos prováveis de infecção por dengue, 271.824 por chikungunya e 215.319 por Zika no país (os números refletem o total de casos notificados, exceto os já descartados; MS-SVS 2017).

Não há medicamentos específicos disponíveis para nenhum destes vírus. Embora exista uma vacina contra dengue aprovada para uso em saúde pública no Brasil (Sanofi Pasteur 2016), além de outras vacinas em fase de testes clínicos contra os vírus dengue e Zika (Schwartz et al. 2015, Khetarpal e Khanna 2016, NIAID/NIH 2017), os esforços neste sentido em relação ao vírus chikungunya estão apenas começando (Erasmus et al. 2016). Além disso, deve ser considerado que *A. aegypti* tem potencial para transmitir vários outros patógenos emergentes e re-emergentes, devido aos seus hábitos sinantrópicos, sua grande adaptação ao ambiente urbano, e sua competência vetorial para vários vírus, inclusive o da febre amarela (FA; Lourenço-de-Oliveira et al. 2002; Lourenço-de-Oliveira 2004; Cardoso et al. 2010, Couto-Lima et al. 2017). Esta última é uma doença febril aguda que possui elevada letalidade em suas formas graves e para a qual são conhecidos dois ciclos de transmissão: o urbano, no qual o vírus é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* ao homem, que é o hospedeiro principal; e o silvestre, em que o vírus circula entre mosquitos silvestres (*Haemagogus* sp. e *Sabethes* sp.) e primatas não humanos (MS-SVS 2016). Segundo o Ministério da Saúde (MS), o Brasil vive hoje uma Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional, com registro de casos de FA em seis estados, dentre os quais destaca-se Minas Gerais, que até fevereiro de 2017 respondia por mais de 80% do total de casos notificados e por quase 90% do total de óbitos suspeitos (COES – Febre Amarela 2017).

O *A. aegypti* é uma espécie sinantrópica de hábito diurno (com pico de atividade nos crepúsculos matutino e vespertino); devido ao elevado grau de endofilia e antropofilia, é considerado um mosquito agressivo e oportunista. Vive intimamente associado ao homem (Lourenço-de-Oliveira 2004). Os adultos repousam, preferencialmente, dentro das habitações, e fazem a postura em recipientes com água encontrados no próprio domicílio ou peridomicílio, como tanques de armazenamento de água para consumo humano e vasilhames temporários (Braga e Valle 2007a).

## **1.2 Controle e controle químico de *Aedes aegypti* no Brasil**

No cenário atual as medidas profiláticas dependem, quase que exclusivamente, de iniciativas de controle voltadas para a diminuição da densidade do vetor (Townson et al. 2005; Ranson et al. 2010). Apesar da crescente atenção creditada ao controle mecânico e ao engajamento social, os inseticidas químicos ainda são ferramentas amplamente utilizadas. Atualmente no Brasil, as opções de inseticidas neurotóxicos disponíveis para uso em saúde pública pertencem às classes dos organofosforados (OP), piretróides (PI) e carbamatos (CB) (WHO 2008a, 2012, 2016). Recentemente foram introduzidos, como larvicidas, Reguladores do Desenvolvimento de Insetos (IGR, do inglês “Insect Growth Regulators”) tais como os inibidores de síntese de quitina (ISQ) e os análogos de hormônio juvenil (AHJ), além de bioinseticidas, como o *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*). Em todos os casos, são ferramentas potenciais no controle deste vetor cujas larvas se criam, preferencialmente, em água para consumo humano (WHO 2016).

No país, a rotina de controle químico de *A. aegypti* consiste de aplicação de larvicidas sobre os criadouros que não podem ser eliminados, em quatro a seis ciclos anuais. Por outro lado, preconiza-se que as aplicações espaciais e residuais sobre espécimes adultos do vetor sejam realizadas apenas em pontos estratégicos (áreas com potencial de produzir muitos mosquitos ou que apresentem muita convergência de pessoas), ou em situações de emergência, como nos períodos epidêmicos (Braga e Valle 2007a; MS-SVS 2009a-d, 2010; Viana-Medeiros 2011).

É importante frisar que a exposição por longo prazo das populações de vetores, ou pragas, a um determinado inseticida pode selecionar características/mecanismos que conferem resistência a este agente tóxico (Beaty e Marquardt 1996). Populações de vetores resistentes a inseticidas são uma ameaça ao sucesso dos programas de controle (Poupardin et al. 2008).

Além disso, muitas vezes um determinado organismo pode apresentar resistência para dois ou mais compostos químicos distintos por meio do(s) mesmo(s) mecanismo(s), fenômeno conhecido como resistência cruzada (Hemingway e Ranson 2000). Esta situação tem sido registrada com frequência (Rodríguez et al. 2005; Boyer et al. 2006; Kasai et al. 2007) e representa uma dificuldade adicional ao controle de vetores em geral, pois tende a limitar ainda mais os inseticidas disponíveis para uso em saúde pública.

Com isso, um dos pilares dos programas de controle de vetores é o monitoramento do *status* de suscetibilidade das populações naturais aos inseticidas, visando acompanhar o desenvolvimento progressivo da resistência aos principais compostos empregados e interromper o seu uso antes que tal condição alcance um limiar considerado de risco (Ranson et al. 2010).

Apesar da aparente grande variedade de inseticidas disponíveis, a maioria dos compostos aprovados para uso em saúde pública pertence às classes dos PI e OP, cada qual com um modo de ação específico e comum (PI atuam sobre os canais de sódio regulados por voltagem – Na<sub>v</sub>; e OP inibem a enzima acetilcolinesterase).

De 1967 a 1999, foram usados exclusivamente OP no controle de larvas e adultos de *A. aegypti* no Brasil (Braga e Valle 2007a). Após a detecção de resistência de larvas ao temephos, em 1999/2000, passou-se a usar o biolarvicida *Bti* nos municípios onde a resistência àquele composto havia sido detectada, e foi preconizado o uso de PI no controle de adultos em todo o país (Macoris et al. 1999; Lima et al. 2003; Braga e Valle 2007a; Viana-Medeiros 2011).

O uso de classes distintas de inseticidas nos diferentes estágios do ciclo de vida do mosquito tinha por objetivo diversificar a pressão de seleção, de modo a não favorecer um só, ou poucos, mecanismo(s) de resistência. Contudo, mesmo com esta conduta, depois de pouco tempo diversas

populações brasileiras de *A. aegypti* foram caracterizadas como resistentes aos PI (da-Cunha et al. 2005; Martins et al. 2009). Além disso, como as formulações disponíveis de *Bti* apresentavam baixa persistência em situação de campo, o MS passou a disponibilizar o IGR diflubenzuron (DFB) para o controle de larvas de *A. aegypti* nas localidades onde a resistência ao temephos havia sido apontada, a partir do ano de 2009 (MS-SVS 2009c, 2010). Concomitantemente, a detecção de resistência a PI, disseminada em todo o país, motivou o MS a promover a troca dos compostos usados para o controle de adultos do vetor. Com isso, desde 2009, são aplicados os OP malathion e fenitrothion, em aplicações espaciais e residuais, respectivamente, nas localidades onde o vetor é considerado resistente aos PI (MS-SVS 2009a,b,d, 2010; Viana-Medeiros 2011).

Ainda que o programa nacional que coordena o monitoramento de *A. aegypti* seja muito bem estruturado, sendo inclusive reconhecido internacionalmente (Ranson et al. 2010), efetivamente, o impacto na diminuição da densidade do vetor e no declínio do número de casos de arboviroses por ele transmitidas, infelizmente é bem menor do que o esperado (COES – Febre Amarela 2017; MS-SVS 2017). Uma hipótese é que esta situação resulte da excessiva relevância dada ao controle químico, em detrimento tanto das medidas preventivas quanto do estímulo ao engajamento comunitário.

Nesse sentido, a experiência mostra que quando a base de um programa de controle de um vetor é a aplicação de inseticidas químicos, em geral ocorrem: seleção de indivíduos resistentes; uso cada vez maior de compostos inseticidas; contaminação do meio ambiente.

De fato, no caso do controle das formas adultas do vetor, a eficiência da pulverização de inseticidas a ultra baixo volume (UBV), conhecida no Brasil como fumacê, depende de fatores como a adequada calibração dos equipamentos, as condições meteorológicas, o momento adequado para aplicação (período de maior atividade do vetor, o que, no caso do *A. aegypti*, é nos crepúsculos matutino e vespertino), dentre outros (MS-SVS 2010). Além disso, a aplicação de UBV gera também uma falsa sensação de segurança na população, que acaba negligenciando ações domésticas de prevenção (Gubler 2002; Esu et al. 2010; Ranson et al. 2010). Por outro lado, sabe-se que a maior parte dos criadouros do vetor encontra-se dentro das habitações ou no

peridomicílio (Lourenço-de-Oliveira 2004; Braga e Valle 2007a; CDC 2012), e que o UBV atinge apenas a forma adulta do mosquito, não tendo potencial para tratar, de forma efetiva, tais criadouros.

Conforme mencionado anteriormente, são usados, atualmente, compostos da classe dos OP para controlar espécimes adultos do vetor. Neste contexto, a aplicação espacial – aquela que usa o malathion; é a que detém maior relevância, sendo mais utilizada do que a residual (feita com fenitrothion). Mas uma questão ainda permanecia no início deste estudo: se já foi detectada a resistência a OP anteriormente, como usar um composto desta mesma classe para controlar os adultos de *A. aegypti* no Brasil? Efetivamente, a partir de 1999/2000, foi notificada ao Ministério da Saúde a resistência de diversas populações brasileiras do vetor ao larvicida OP temephos (Macoris et al. 1999; Lima et al. 2003). Apesar de também existirem relatos pontuais de alteração de suscetibilidade ao malathion em *A. aegypti* no país (Lima et al. 2003; Macoris et al. 2007; discutidos no Capítulo 2, Resultados), o Ministério da Saúde optou por reutilizar este composto, a partir de 2009, uma vez que, com exceção de malathion, não se dispunha de alternativas que não fossem da classe dos PI, para a qual a resistência já estava disseminada em todo o Brasil (da-Cunha et al. 2005; Martins et al. 2009; Fiocruz 2011). Cabe mencionar que tal cenário de resistência ao malathion foi sugerido por meio de dados qualitativos obtidos quando o país começava a aprender a se familiarizar com os protocolos de avaliação e a fazer o monitoramento da resistência do vetor.

Apesar do esforço do Ministério da Saúde de manejo racional dos inseticidas aplicados no campo, atualmente é pequena a gama de produtos disponíveis para o controle de adultos do vetor. Dos cinco compostos aprovados para uso em aplicações espaciais sobre mosquitos adultos, quatro são PI e apenas um, malathion, é OP (OMS 2012, 2016), o que mostra a necessidade de conhecer melhor os perfis e os mecanismos de resistência das populações do vetor, de modo a preservar os inseticidas existentes e a garantir eficácia das ações de controle.

### 1.3 Diferenças entre os organofosforados temephos e malathion

É importante ainda salientar que os compostos OP podem variar muito em estrutura e propriedades químicas (Figura 1). A maioria dos OP usados em saúde pública apresenta um enxofre ligado ao átomo de fósforo, sendo classificados como fosforotionatos (Ware e Whitacre 2004). No entanto, o malathion, atualmente empregado em âmbito nacional no controle de adultos do vetor da dengue, é exceção a este grupo, por ser um fosforoditoato, ou seja, apresenta dois enxofres ligados ao átomo de fósforo, ao invés de apenas um (Bloomquist 2009). Além disso, enquanto o temephos apresenta cadeia fechada, o malathion é um composto alifático (Ware e Whitacre 2004).

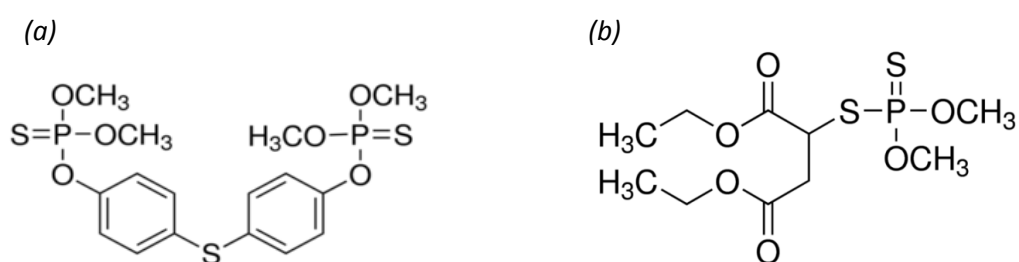


Figura 1. Exemplos de inseticidas OP. (a) Temephos. (b) Malathion.

Estas diferenças estruturais parecem ser importantes do ponto de vista do controle: há relatos em dípteros de mecanismos de resistência distintos para cada um desses compostos. Vários estudos apontam que as enzimas Esterases (EST) são relevantes na detoxificação dos OP. Neste caso, parece que a formação do complexo enzima-substrato frente à maioria dos OP (que são fosforotionatos) é rápida, em função da grande afinidade das EST (Ketterman et al. 1992; Wheelock et al. 2005). No entanto, tais compostos são considerados substratos pobres para as EST de insetos, pois a formação do intermediário enzima-substrato é estável. Ou seja, as EST de insetos em geral não processam os OP com eficiência, sendo, portanto, comum se falar em “sequestro” destes inseticidas (Hemingway e Karunaratne 1998; Hemingway 2000; Hemingway e Ranson 2000; Montella et al. 2012). Por isso, no caso de OP tipo fosforotionatos, como o temephos, por exemplo, a resistência via EST

decorreria de aumento no número de moléculas destas enzimas detoxificadoras e não de sua maior atividade.

Já a resistência a OP fosforoditioatos (como o malathion, por exemplo) estaria mais relacionada com a presença de EST estruturalmente diferentes, que teriam sofrido mutações em suas regiões codificantes, gerando espécies moleculares com maior capacidade de hidrólise – comumente chamadas de malaoxonases (Hemingway e Karunaratne 1998; Hemingway 2000; Hemingway e Ranson 2000; Hemingway et al. 2004). Neste sentido, foi detectada uma mutação, na região codificante de um gene de Esterase em cepas resistentes do díptero *Lucilia cuprina* (Wiedemann 1830), que resultou em maior atividade hidrolítica frente ao OP malathion e na redução da taxa de hidrólise de substratos OP fosforotionatos (Campbell et al. 1998 *apud* Li et al. 2007). Foi proposto que a referida mutação tenha aumentado o espaço para acomodar substratos que tenham radicais volumosos, como é o caso do malathion (Heidari et al. 2004). Há indícios de que mecanismos semelhantes ocorram com *Anopheles arabiensis* (Patton, 1905), *Anopheles culicifacies* (Giles, 1901) *Anopheles stephensi* (Liston, 1901) e *Culex tarsalis* (Coquillett, 1896) (Whyard et al. 1995, Hemingway e Karunaratne 1998; Hemingway e Ranson 2000; Hemingway et al. 2004; Li et al. 2007).

#### **1.4 O estudo dos mecanismos de resistência**

Conceitualmente, resistência a inseticidas é a habilidade de uma linhagem de um inseto em sobreviver a doses de compostos tóxicos, que seriam letais para a maioria da população normal suscetível da mesma espécie (Beaty e Marquardt 1996). Dentro deste trabalho, chamaremos 'resistência a inseticidas' como 'resistência'.

Nas avaliações de resistência, os ensaios mais relevantes são os bioensaios - qualitativos ou quantitativos, com larvas ou espécimes adultos. Os ensaios de larvas com inseticidas neurotóxicos são feitos por 24 horas de exposição, e o que se avalia são as concentrações letais (OMS 2005). No caso de IGR, investiga-se a inibição da emergência dos adultos e, por isso, a exposição é contínua (Martins *et al.*, 2008). Para exame da resistência de

mosquitos adultos, existem dois principais tipos de ensaios: um que emprega papéis impregnados com inseticidas – padronizado pela OMS (cujas leituras de mortalidade são feitas depois de 1 hora de exposição, seguida de 24 horas de recuperação) (OMS 2006, Maciel-de-Freitas et al. 2014); e o outro, que adota garrafas impregnadas, preconizado pelo CDC, faz a avaliação do tempo letal ou da taxa de mortalidade em intervalo específico para cada inseticida (Brogdon e McAllister 1998, da-Cunha et al. 2005).

Considera-se que existem quatro principais mecanismos de resistência a inseticidas nos insetos: comportamental; redução da penetração do inseticida; aumento na detoxificação destes compostos (esta também conhecida como resistência metabólica); e insensibilidade do sítio alvo do inseticida.

#### **1.4.1 Resistência comportamental**

Ocorre quando o inseto adquire a habilidade de evitar contato com doses letais de inseticida. Além disso, parece ter relação com as propriedades de excito-repelência e desalojamento promovidas pelos PI e pelo dicloro difenil tricloroetano (DDT, da classe dos organoclorados), que contribuiriam para reduzir a proporção de mosquitos que entra nas habitações, assim como para mudar seu período de maior atividade (Hemingway et al. 2004).

Em *Anopheles albimanus* (Wiedemann, 1820), por exemplo, que é considerado vetor de malária nas Américas, existem evidências de que o mosquito evita as casas onde foi aplicado inseticida DDT ou PI. O estudo demonstrou que os espécimes tendem a não entrar ou a permanecer menos tempo dentro das habitações que contêm os inseticidas (Chareonviriyaphap et al. 1997).

Comportamento parecido foi demonstrado para *Anopheles darlingi* (Root, 1926), incriminado como vetor de malária na Região Amazônica. Dois meses após aplicação de DDT nas paredes das habitações, foi demonstrada a seleção de fêmeas que entravam nas casas, faziam o repasto sanguíneo e então, saíam rapidamente sem repousar nas paredes, como era o habitual antes do uso de DDT pelos programas de controle (Roberts e Alecrim 1991).



#### **1.4.2 Redução na penetração do inseticida**

A penetração de um xenobiótico no organismo do inseto geralmente é rápida. No entanto, o espessamento ou a modificação de algumas características físico-químicas da cutícula podem gerar diminuição de sua permeabilidade, levando à redução da taxa de penetração do inseticida (Georghiou 1994).

Adicionalmente, a superfície cuticular dos insetos é recoberta por uma fina camada de variadas substâncias, sendo lipídeos e ceras as principais. Estas ceras estão relacionadas com a resistência à dessecação e alteram a absorção de compostos químicos e a penetração de micro-organismos e, portanto, têm um papel importante na sobrevivência dos insetos (Stanley-Samuelson et al. 1988; Ginzler e Blomquist 2016). Nesse sentido, alterações que modifiquem a camada lipídica também poderiam impactar na penetração dos inseticidas.

Acredita-se que a redução da penetração dos inseticidas ocasione baixos níveis de resistência, e que este mecanismo esteja frequentemente associado a outros (Braga e Valle 2007b). Uma explicação possível seria o atraso no acesso do inseticida ao organismo do inseto, resultando em sinergismo com o mecanismo de biotransformação de xenobióticos, como postulado por Plapp em 1976.

#### **1.4.3 Resistência metabólica**

Quando um organismo entra em contato com um xenobiótico, um processo de biotransformação é disparado, com o objetivo de tornar a molécula exógena mais hidrofílica, facilitando assim sua excreção (Montella 2008; Viana-Medeiros 2011).

A biotransformação de xenobióticos é catalisada por um sistema multienzimático, sendo as principais superfamílias envolvidas, as das oxidases de função múltipla (MFO) e esterases (EST) - responsáveis por modificar quimicamente as moléculas exógenas; e as glutathione S-transferases (GST) – capazes de conjugar o inseticida com o tripeptídeo endógeno glutathione (Feyereisen 1999; Wheelock et al. 2005; Frova 2006). Além disso, este

processo compreende também uma etapa de compartimentalização e/ou excreção dos metabólitos gerados, que se acredita ser mediada principalmente por transportadores ABC (ABC do inglês '*ATP-binding cassette*'; Locher 2009).

Quando o xenobiótico é um inseticida, o aumento da atividade de tais enzimas detoxificadoras, ou de transportadores ABC, pode resultar na resistência metabólica (Hemingway e Ranson 2000; Hemingway et al. 2004; Braga e Valle 2007b; Li et al. 2007). Tal aumento de atividade nos insetos resistentes poderia derivar de:

- i) amplificação gênica (aumento do número de cópias dos genes que codificam uma ou mais enzimas envolvidas na detoxificação);
- ii) expressão gênica alterada (decorre de mutação na região promotora dos genes, geralmente resultando em aumento de sua expressão);
- iii) modificação estrutural (mutação na região codificante resultando em espécie molecular com maior atividade e/ou afinidade pelo composto inseticida).

Notadamente, a abordagem metodológica mais usada para avaliar a participação das enzimas detoxificadoras na resistência a inseticidas são ensaios bioquímicos feitos na rotina dos programas de controle, em todo o globo (ver detalhamento adiante; Mourya et al. 1993; Montella et al. 2007; Marcombe et al. 2009; Polson et al. 2011; Viana-Medeiros 2011; Bellinato et al. 2016; Bisset et al. 2016). Adicionalmente, tais ensaios são utilizados para avaliar a inibição da atividade do alvo de OP – a enzima acetilcolinesterase (detalhado no próximo item).

#### **1.4.4 Insensibilidade do alvo de inseticidas**

Esta seção será restrita ao estudo da acetilcolinesterase (Ace) e do canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_v$ ), que são os sítios de ação dos inseticidas neurotóxicos OP e PI, respectivamente.

#### 1.4.4.1 Acetilcolinesterase – alvo de OP

A Ace é a enzima responsável pela degradação do neurotransmissor excitatório acetilcolina, contribuindo assim para cessar a transmissão dos impulsos nervosos (Soreq e Seidman 2001). É também o alvo dos inseticidas OP e CB. A inibição da enzima pelos inseticidas OP e CB gera excitação excessiva que, eventualmente, pode culminar na morte do inseto (Wu et al. 2010).

Comparação de sequências e análises filogenéticas apontam que a maioria dos insetos apresenta dois genes codificantes para a Ace, denominados *ace-1* e *ace-2* (Weill et al. 2002; Cassanelli et al. 2006; Huchard et al. 2006; Jiang et al. 2009). Até o momento, todos os casos de resistência em mosquitos se relacionam a mutações pontuais na região codificante do gene *ace-1* e, em geral, reduzem marcadamente a sensibilidade da enzima aos inseticidas (Weill et al. 2003, 2004; Mori et al. 2007; Alout et al. 2008). A mutação tida como “clássica” (por ter ocorrido variadas vezes, de forma independente e em diferentes espécies) é a G119S (posição de acordo com a primeira estrutura tridimensional de uma *ace-1* publicada, que foi a da arraia *Torpedo californica* [Ayres, 1855]) (Weill et al. 2003). Outras mutações no referido gene, que também se correlacionam à resistência a OP e CB, são F331W em *Culex tritaeniorhynchus* (Giles, 1901) e F290V em *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) (Hemingway et al. 2004; Nabeshima et al. 2004; Alout et al. 2008).

Rotineiramente, entretanto, para a avaliação de alterações na inibição da Ace, aplica-se a metodologia bioquímica clássica, e não a análise da sequência polipeptídica do gene *ace-1* (Raymond et al. 1985; Brogdon et al. 1988; French-Constant e Bonning 1989; Montella et al. 2007; Marcombe et al. 2009; Polson et al. 2011; Bellinato et al. 2016). O teste consiste de duas reações enzimáticas: uma que quantifica a atividade total da Ace usando acetilcolina como substrato, e a outra, a redução da atividade desta enzima na presença de propoxur, um CB usado como inibidor. O resultado do ensaio é dado pela diferença entre as duas reações, sendo geralmente expresso em percentual de atividade remanescente na presença do inibidor (Ellman et al. 1961; Hemingway 1998).

Especificamente para a avaliação das taxas de inibição de atividade da Ace, nos ensaios bioquímicos, existe um critério proposto pela OMS (Hemingway 1998). Este critério aponta como alterados os casos em que há mais de 30% de atividade remanescente depois da inibição com propoxur. Alternativamente, existe um critério que usa como ponto de corte o percentil 99 da cepa referência de suscetibilidade Rockefeller (Kuno 2010), e que classifica toda a população como tendo 'acetilcolinesterase alterada' se forem detectados mais que 15% de indivíduos com atividade superior ao percentil 99 de Rockefeller depois da inibição com propoxur (Valle et al. 2006; Montella et al. 2007). Tais critérios, logicamente, levam a conclusões distintas, e a relevância biológica de cada um destes não está bem entendida (Viana-Medeiros 2011; Polson et al. 2011; Resultados/Capítulo 2).

A exemplo do que ocorre com outros insetos, em culicídeos, o códon 119 do gene *ace-1* é traduzido em uma glicina, sendo esta codificada por 'GGA' ou 'GGC'. Nos gêneros *Culex* e *Anopheles*, o códon comumente encontrado é o 'GGC' e, nas populações que apresentam mutação nesta posição, esta origina o aminoácido serina ('GGC' para 'AGC'), o que gera índices de resistência a OP e CB extremamente altos (Weill et al. 2003, 2004; Huchard et al. 2006). No entanto, em *A. aegypti* o códon encontrado na posição 119 é 'GGA' (Weill et al. 2004), o que restringe mutações que geram alteração de aminoácido; este fenômeno foi verificado em 26 populações naturais de *A. aegypti* de todo o globo. Por outro lado, trabalho recente indica a ocorrência do códon 'GGC' na cepa Rockefeller e de um códon 'AGC' em uma população indiana do vetor, e será pontuado adiante (Muthusamy e Shivakumar 2015).

Com isso, até o momento, de nosso conhecimento, não há evidência na literatura de que, na espécie *A. aegypti*, resistência a OP esteja associada a alteração da Ace, em populações do campo. No entanto, existem dois estudos que sugerem, de forma indireta, que este mecanismo esteja ocorrendo nesta espécie (Polson et al. 2011; Muthusamy e Shivakumar 2015).

Em 2011, Polson et al. relataram alteração no perfil de inibição da Ace, determinada através da metodologia bioquímica clássica em populações naturais de *A. aegypti* oriundas de Trinidad. No entanto, tais alterações foram detectadas pela aplicação do critério de classificação proposto por Valle et al. (2006), que, conforme mencionado anteriormente, é sensível o suficiente para

exacerbar as pequenas diferenças existentes entre tais populações de campo e a cepa suscetível usada (Polson et al. 2011). Além disso, neste trabalho a cepa Rockefeller mostrou um perfil similar ao das populações de campo classificadas como alteradas pelo critério de classificação adotado, estando em todos os casos, abaixo dos 30% de atividade remanescente – ponto de corte da OMS; o que levanta questionamento acerca da significância biológica das diferenças sugeridas no referido trabalho.

Em 2015, Muthusamy e Shivakumar relataram detecção de mutações na posição 119 do gene *ace-1* de uma população indiana de *A. aegypti*, e da cepa Rockefeller. No entanto, os dois códons detectados foram diferentes de todos os resultados anteriores obtidos para esta espécie (Weill et al. 2004; Huchard et al. 2006). Intriga que tais substituições tenham resultado apenas em sutil alteração do perfil de inibição da Ace na população mutada. Este resultado é conflitante porque a ocorrência de troca de aminoácido na posição 119 de *ace-1* sempre ocasiona marcada alteração na inibição da Ace. Isto foi demonstrado por Weill et al. (2004) em experimento de mutação induzida no vetor, e por diversos autores que estudaram a referida mutação, que ocorre naturalmente em populações de *Culex sp.* e *Anopheles sp.* de diferentes origens geográficas (Raymond et al. 1985; Hemingway et al. 1986; Moores et al. 1988; French-Constant e Bonning 1989).

#### 1.4.4.2 Canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_V$ ) – alvo de PI

A resistência de *A. aegypti* a PI, por outro lado, já é caracterizada, desde 2009, em diversas populações naturais do país, mediada entre outros, por mutações no sítio-alvo destes compostos (Martins et al. 2009; Linss et al. 2014). No inseto suscetível, o PI se liga ao  $Na_V$  mantendo-o em sua conformação aberta, o que gera a transmissão de impulsos repetitivos, e eventual paralisia e morte. O inseto resistente a PI por alteração do  $Na_V$ , por outro lado, tomba devido ao rápido efeito ‘*knock-down*’ mas depois de algum tempo se recupera. Por isso, mutações no  $Na_V$  que resultam em resistência a PI são comumente chamadas de mutações *kdr* (do inglês ‘*knock-down resistance*’). Há registros de substituições em várias posições do  $Na_V$  de *A. aegypti* relacionadas à resistência a PI (Martins e Valle 2012).

No Brasil, são relatadas substituições nas posições 1534, 1016 e 1011. No entanto, a alteração no sítio 1016 não é encontrada de forma isolada, estando sempre associada à mutação *kdr* do sítio 1534 – essas últimas, significativamente relacionadas à resistência aos PI (Linss et al. 2014). Apesar de ter sido sugerida correlação entre a resistência a PI e uma mutação no sítio 1011 (Met) do gene *Nav*, em uma população de *A. aegypti* (Lima et al. 2011), Martins et al., em 2013, reportaram a ocorrência desta mutação em pelo menos 15 populações brasileiras, mas sem correlação significativa com a resistência a PI. Embora, no estudo de Lima et al. 2011 a presença da mutação 1534 não tenha sido investigada, sabe-se que já estava presente na região avaliada (Linss et al. 2014). Além disso, a comparação entre linhagens de *background* genético similar, diferindo apenas pela presença das mutações nas posições 1534, 1016/1534 e 1011, sugere que a linhagem com a mutação 1011 não seja resistente aos PI (Martins AJ, comunicação pessoal). De acordo, em populações brasileiras e estrangeiras do vetor, as mutações *kdr* mais amplamente estudadas são Val1534Ile e Phe1016Cys (Martins et al. 2009; Harris et al. 2010; Yanola et al. 2011; Linss et al. 2014).

#### **1.4.5 Metodologias para avaliação dos mecanismos de resistência**

Atualmente, a maior parte dos procedimentos rotineiros de avaliação dos mecanismos de resistência passíveis de uso em grande escala se baseiam em ensaios bioquímicos. Tais ensaios se aplicam principalmente à resistência metabólica; quantifica-se a atividade de três classes de enzimas: EST, MFO e GST. No entanto, técnicas modernas de avaliação de genomas inteiros e de suas manifestações em resposta a diferentes desafios têm permitido vislumbrar um cenário de grande complexidade. No caso de *A. aegypti*, o sequenciamento completo do genoma e o emprego de análises de expressão gênica global tais como os microchips de DNA (com o uso do “*Aedes detox chip*”, descrito originalmente por Strode et al. 2008) ou o sequenciamento em larga escala de transcritos (‘RNAseq’), apontam situações que os procedimentos bioquímicos rotineiros atuais não podem elucidar (metodologias detalhadas adiante). Alguns exemplos:

i) cada uma das classes de enzimas envolvidas com a 'resistência metabólica' é composta por dezenas de espécies moleculares, que podem ou não estar envolvidas com a resistência a diferentes inseticidas, e possuir diferentes especificidades;

ii) uma mesma enzima pode ter afinidades distintas por inseticidas de classes diferentes, ou mesmo inseticidas distintos da mesma classe, contribuindo diferencialmente para a resistência;

iii) as técnicas mais modernas de avaliação começam a ratificar que cada população tem uma 'identidade biológica' própria, que pode ter influência decisiva sobre os mecanismos de resistência que irá expressar frente a uma pressão de seleção específica.

Quando a quantificação da atividade das três principais classes de enzimas relacionadas à resistência metabólica foi incorporada à rotina do monitoramento, havia expectativa de que esta iniciativa pudesse contribuir decisivamente para a compreensão dos mecanismos de resistência e para a definição de estratégias precisas de manejo. De fato, no Brasil, por exemplo, foi possível constatar relação entre o histórico de uso dos inseticidas para controle de *A. aegypti* e a dinâmica de atividade destas classes enzimáticas ao longo dos anos (Montella et al. 2007). Contudo, uma correlação direta entre perfis e mecanismos de resistência não foi evidente quando cada população foi analisada separadamente (Montella et al. 2007; Viana-Medeiros 2011). Esta falta de correlação poderia ser o resultado de desconhecimento tanto dos painéis completos de resistência de populações específicas do vetor quanto da totalidade dos potenciais mecanismos envolvidos com a resistência, em cada caso. Adicione-se a este cenário o fato de que a atividade das enzimas relacionadas à resistência metabólica (e também da acetilcolinesterase) é modulada ao longo do desenvolvimento de *A. aegypti*: dependendo da família enzimática, são observados padrões de atividade característicos (Viana-Medeiros 2011).

Estes estudos possibilitaram identificar que a resistência nas populações brasileiras do vetor tem caráter multifatorial, com a contribuição de diferentes grupos de enzimas (Montella et al. 2007; Viana-Medeiros 2011). É possível, por exemplo, que em cada uma das três classes de enzimas avaliadas, conjuntos distintos de espécies moleculares sejam ativados em

função da história prévia das populações do vetor. Assim, aplicando-se o procedimento bioquímico padrão, o cenário preciso dos mecanismos de resistência em cada caso não poderia ser vislumbrado. Conjuntamente, tais dados apontavam para a necessidade de avançar no detalhamento das espécies moleculares potencialmente responsáveis pela resistência aos inseticidas, em populações brasileiras de *A. aegypti*, como requisito para a identificação de “mecanismos diagnósticos”. Para tanto, atualmente estão disponíveis metodologias que envolvem microchips de DNA e RNAseq, capazes de identificar diferenças na expressão de genes específicos (resultantes tanto de amplificação gênica quanto de expressão gênica alterada). Além disso, o RNAseq é também capaz de avaliar a ocorrência de mutações na região codificante dos genes de interesse.

Enquanto os microchips de DNA contêm sondas que permitem a detecção dos transcritos de interesse, o RNAseq utiliza o sequenciamento de bibliotecas inteiras de cDNA. Sendo assim, o ‘*Aedes detox chip*’ usado na técnica de microchips de DNA vem sofrendo frequentes atualizações, apresentando atualmente sondas específicas para 1089 genes (sendo originalmente 235), todos já previamente relacionados com a resistência a inseticidas neste vetor (Strode et al. 2008; Marcombe et al. 2009; Saavedra-Rodríguez et al. 2012, 2015; Dusfour et al. 2015). No entanto, uma questão, a limitação dos genes avaliados, ainda persiste: a resistência poderia ter relação com outros genes, ainda não apontados; neste caso, estes genes não seriam contemplados na avaliação.

As metodologias de sequenciamento em larga escala atualmente disponíveis, por sua vez, permitem que a análise de RNAseq identifique diferenças de expressão gênica com precisão considerada maior do que os microchips de DNA. Tal abordagem permite, por exemplo, uma melhor detecção de transcritos pouco abundantes (Zhao et al. 2014). Por outro lado, a imensa quantidade de dados gerados requer a aplicação de programas de bioinformática para tratamento adequado, e também o uso de potentes servidores para processamento. Entretanto, ainda não é possível aplicar estas metodologias modernas na rotina do monitoramento de populações de campo, em grande escala, em função não somente da complexidade da análise, mas também dos custos.



#### **1.4.6 Algumas notas sobre os mecanismos de resistência a inseticidas**

Até o início do século corrente, acreditava-se que o mecanismo de penetração reduzida era o menos importante, por conferir “apenas um grau baixo e adicional de resistência” (Plapp 1976; Georghiou 1994; Braga e Valle 2007b). É o mecanismo de resistência a inseticidas menos estudado. No entanto, recentemente, verificou-se que a resistência de populações argentinas de barbeiros tem relação com tal mecanismo (Juaréz e Fernández 2007; Pedrini et al. 2009; Juárez et al. 2010). Observou-se, por exemplo, que havia uma diferença importante na cutícula de insetos resistentes a PI e insetos suscetíveis. Os barbeiros resistentes possuem cutícula mais espessa e uma quantidade 54% maior de hidrocarbonetos de superfície do que os suscetíveis. Inclusive, parece que este é um mecanismo bastante importante para a resistência de triatomíneos a inseticidas (Pessoa et al. 2015).

Além disso, com a possibilidade de se avaliar transcriptomas de amostras resistentes e suscetíveis de diferentes espécies de insetos, é crescente o número de relatos que correlacionam resistência a inseticidas com a maior expressão de enzimas cuticulares (David et al. 2010; Riaz et al. 2013; David et al. 2014).

Por outro lado, o avanço nos estudos sobre a resistência metabólica revela alteração de algumas espécies moleculares de enzimas detoxificadoras, que em alguns casos, seriam relacionadas à resistência tanto a compostos OP, como também aos da classe dos PI, o que ratifica o caráter multifatorial da resistência em *A. aegypti* (Viana-Medeiros 2011; Saavedra-Rodriguez et al. 2012). As alterações mais relatadas são mudanças quantitativas e qualitativas de genes que codificam MFO, principalmente das famílias CYP6 e CYP9 (Marcombe et al. 2009; Dusfour et al. 2011; Riaz et al. 2013; David et al. 2014; Kasai et al. 2014; Saavedra-Rodríguez et al. 2015; Dusfour et al. 2015; Ishak et al. 2017). Alguns estudos relatam casos de amplificação gênica e ativação da transcrição do gene *CCEae3a* – que codifica uma EST (Strode et al. 2012; Poupardin et al. 2014; Grigoraki et al. 2016; Goindin et al. 2017; Melo Costa 2017). Outros trabalhos apontam aumento de expressão de cinco genes que codificam GSTs da classe Epsilon, principalmente os genes *GSTe2* e *GSTe3* (Strode et al. 2012; Faucon et al. 2017; Goindin et al. 2017), em populações

naturais de *A. aegypti* de todo o mundo. Tais alterações de EST seriam primariamente relacionadas com a resistência a OP e as de GST, com a resistência a compostos PI. No entanto, alguns desses relatos também fazem menção à participação dessas duas famílias de enzimas, EST e GST, na resposta do vetor a compostos das duas classes, OP e PI (Goindin et al. 2017; Melo Costa 2017).

Adicionalmente, a última fase da biotransformação dos xenobióticos compreende a sua exportação da célula. Nesse sentido, transportadores ABC (do inglês 'ATP-binding cassette') parecem ser os responsáveis pelo transporte ativo de pelo menos 27 diferentes compostos inseticidas (Buss e Callaghan 2008). Há relatos de resistência a inseticidas mediada, dentre outros, por alteração quantitativa ou qualitativa de genes que codificam transportadores ABC em insetos (Srinivas et al. 2004; Gahan et al. 2010; Silva et al. 2012). No entanto, poucos estudos correlacionam a resistência a inseticidas com alterações em transportadores ABC em culicídeos (Dermauw e Leeuwen 2013; Porretta et al. 2016). Usando inibidor de atividade dos transportadores ABC e RTqPCR, Epis et al. (2014) assinalaram o envolvimento desta classe com a resposta ao PI permetrina, em bioensaios com larvas de uma cepa suscetível de *A. stephensi*. Em 2012, foi relatada maior expressão de um gene que codifica um transportador ABC (*ABCB4*) em populações naturais de *A. aegypti* oriundas das Ilhas Cayman e de Cuba, resistentes a PI (Bariami et al. 2012). Foi inclusive verificado que tal alteração resulta, ao menos em parte, de amplificação gênica. Outro estudo recente sugeriu alteração na expressão de genes que codificam transportadores ABC em *A. aegypti*, em populações naturais resistentes ao OP temephos (Poupardin et al. 2014). Usando a combinação de enriquecimento de genes alvo com sequenciamento de alta vazão, Faucon et al., em 2015, relacionaram alterações qualitativas de genes que codificam transportadores ABC com a resistência ao PI deltametrina em populações de campo de *A. aegypti* oriundas de diferentes partes do mundo. Foi também sugerido que a seleção independente com três inseticidas - o neonicotinóide imidacloprid, o PI permetrina, e o CB propoxur - elicitou alterações na região codificante de genes de transportadores ABC (David et al. 2014).

Por outro lado, a insensibilidade do sítio alvo parece decorrer de uma ou poucas mutações, o que se justifica por serem moléculas vitais para a manutenção das funções regulares do organismo do inseto, como um todo (Huchard et al. 2006; Garcia et al. 2009). Aditivamente, a experiência mostra que, em geral, é possível correlacionar mutações *kdr* e índices marcadamente elevados de resistência aos PI. Segundo Donnelly et al. (2009), a relação entre as mutações *kdr* e a resistência a PI é clara; porém, tais mutações não ‘explicariam toda a resistência’, uma vez que se trata de um fenômeno complexo e multifatorial, assim como já pontuado anteriormente neste estudo.

## 1.5 Justificativa e apresentação da tese

A resistência a PI está disseminada em populações brasileiras de *A. aegypti* de todo o Brasil. Por isso, a partir de 2009, foi introduzido o OP malathion no controle das formas aladas do vetor – único composto recomendado pela OMS para aplicações espaciais que não é da classe dos PI. De fato, ensaios iniciais demonstraram suscetibilidade ao malathion em populações naturais brasileiras de *A. aegypti*, o que, de certa forma, validou seu uso como inseticida de escolha para o controle dos adultos.

Com isso, a antecipação de um potencial evento de resistência a malathion, assim como a elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos, eram de grande valor para a definição de estratégias racionais que prolongassem seu uso como alternativa viável para o controle de *A. aegypti* no Brasil. Nesse sentido, foram escolhidas duas populações naturais do vetor já sabidamente resistentes ao larvicida temephos – OP que tem estrutura química marcadamente diferente do malathion. Uma delas é proveniente de uma região do país que apresenta níveis de resistência para temephos excepcionalmente altos, o que poderia sugerir mecanismos de resistência distintos daqueles presentes no restante do país. O *status* de resistência das duas populações frente aos principais inseticidas utilizados no Brasil para controle de *Aedes aegypti* foi avaliado. Investigou-se também os mecanismos de resistência, usando as metodologias classicamente empregadas na rotina do monitoramento e aspectos do desenvolvimento e da viabilidade das duas

populações de campo. Este é o Capítulo 1 da seção Resultados, que está no prelo no Medical and Veterinary Entomology (Anexo A).

Selecionamos em laboratório, com malathion, por cinco gerações, as duas populações naturais brasileiras do vetor de dengue previamente caracterizadas. Havia também controles de cada população, mantidos em paralelo, sem contato com inseticidas. Foram avaliados aspectos como o *status* de resistência frente aos inseticidas usados no controle do vetor no país e os mecanismos de resistência. Para tanto foram usadas metodologias empregadas na rotina do monitoramento da resistência de vetores a inseticidas: 'bioensaios', 'ensaios bioquímicos' e 'ensaios moleculares'. Os resultados estão apresentados no Capítulo 2 dos Resultados.

Iniciamos ainda a investigação de mudanças globais no conjunto de genes expressos em cada situação, por meio de análise de transcriptomas. Embora preliminares, os dados indicam alteração de categorias de proteínas não avaliadas pelos métodos rotineiros de monitoramento dos mecanismos de resistência (Resultados, Capítulo 3).

## OBJETIVO GERAL

Avaliar, em duas populações naturais de *A. aegypti* brasileiras, em condições de laboratório, a influência da pressão de seleção com o OP malathion sobre a resistência e os potenciais mecanismos relacionados.

### Objetivos específicos

- 1) Realizar a caracterização inicial das duas populações de campo de *A. aegypti* utilizadas
  - 1.1) Quantificar a resistência frente aos principais inseticidas utilizados no país para seu controle;
  - 1.2) Investigar os principais mecanismos de resistência envolvidos, por meio de técnicas moleculares e bioquímicas usadas na rotina de monitoramento da resistência;
  - 1.3) Avaliar aspectos do desenvolvimento e da reprodução.
  
- 2) Selecionar larvas das duas populações de *A. aegypti* escolhidas com o OP malathion.
  - 2.1) Conduzir a seleção com concentração fixa de malathion, equivalente à dose que provoca pelo menos 80% de mortalidade na primeira geração exposta, e prosseguir até que a mortalidade seja inferior a 20%;
  - 2.2) Quantificar a resistência das amostras pós-seleção frente aos principais inseticidas usados no controle de *A. aegypti* no Brasil;
  - 2.3) Investigar os principais mecanismos de resistência das amostras pós-seleção, com as metodologias usadas na rotina do monitoramento da resistência de vetores a inseticidas (ensaios bioquímicos e moleculares).
  
- 3) Sequenciar em larga escala, por tecnologia 'Illumina', os transcritos das duas populações de campo selecionadas com o OP malathion, e comparar os índices de transcrição com a geração inicial de cada população, e com os grupos controle mantidos sem qualquer inseticida.

## APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados estão organizados em três capítulos que contêm, na sequência:

i) a caracterização inicial das populações naturais usadas no estudo. Foram avaliados: a resistência aos principais inseticidas usados no controle em campo, os mecanismos de resistência, e eventuais impactos no desenvolvimento e viabilidade

ii) a seleção com o organofosforado malathion, em laboratório, de duas populações naturais de *A. aegypti*. Este capítulo inclui tanto a quantificação da resistência quanto a avaliação dos mecanismos envolvidos no material mantido em laboratório.

iii) avaliações preliminares das variações nos índices de expressão gênica associadas com a adaptação ao malathion e com a adaptação à criação em laboratório.

O primeiro estudo está no prelo, na revista *Medical and Veterinary Entomology*. A versão em português está no capítulo um, assim como a carta de aceitação da revista, e a prova de prelo do artigo, no Anexo A.

O segundo capítulo detalha as alterações no perfil de suscetibilidade aos inseticidas, em resposta à seleção e à manutenção em ambiente livre de inseticidas, através de duas abordagens analíticas. Além disso, neste capítulo foram aplicadas metodologias de rotina na avaliação dos mecanismos de resistência potencialmente envolvidos.

O capítulo três descreve de maneira sucinta as diferenças de expressão que ocorreram em resposta à seleção com o malathion e/ou, em decorrência da adaptação à manutenção em laboratório. Este contém também a descrição das metodologias de bioinformática adotadas. No entanto, resta ainda a análise de eventuais mudanças na região codificante dos genes nas amostras estudadas.

# **CAPÍTULO 1. RESISTÊNCIA A INSETICIDAS, MECANISMOS ASSOCIADOS E ASPECTOS DE FITNESS DE DUAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *AEDES AEGYPTI***

(A prova de prelo do artigo está no Anexo A deste documento)

**Título:** "Caracterização da resistência aos inseticidas de duas populações brasileiras de *Aedes aegypti*"

Priscila Fernandes Viana Medeiros<sup>1</sup>, Diogo Fernandes Bellinato<sup>1</sup>, Ademir Jesus Martins<sup>2,3</sup>, Denise Valle<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro (RJ), Brasil

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM), Rio de Janeiro (RJ), Brasil

## **Endereços de e-mail de todos os autores:**

Viana-Medeiros PF: vianap@ioc.fiocruz.br; viana.medeirospf@gmail.com

Bellinato DF: bllinato@ioc.fiocruz.br

Martins AJ: ademirjr@ioc.fiocruz.br

## **\* Autor correspondente**

Valle, Denise - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brazil. CEP: 21040-900. Tel: (55)(021) 3865 8161 - Fax: (55) (021) 3865 8200 - e-mail: dvalle@ioc.fiocruz.br.

## 1.1 Resumo

No Brasil, a resistência de populações de *Aedes aegypti* aos inseticidas piretróides (PI) e ao organofosforado (OP) temephos está disseminada. Atualmente, os reguladores do desenvolvimento de insetos (IGR) e o OP malathion são empregados, respectivamente contra larvas e adultos. Bioensaios com mosquitos de dois municípios do Nordeste, Crato e Aracaju, revelaram, para ambas as populações, suscetibilidade a IGRs e malathion ( $RR_{95} \leq 2,0$ ), confirmando a efetividade desses compostos. Em contraste, os níveis de resistência a temephos e deltametrina (PI) foram altos ( $RR_{95} > 10$ ), consistente com um controle químico intenso. Inclusive, as  $RR_{95}$  de Crato eram maiores que 50 para ambos os compostos. Os mutantes *kdr*, no canal de sódio regulado por voltagem, o sítio alvo de PI, corresponderam a 43% e 32% dos mosquitos de Aracaju e Crato, respectivamente. Os ensaios bioquímicos revelaram maior atividade da resistência metabólica (esterases, oxidases de função mista e glutathione S-transferases) em Aracaju. Quanto aos aspectos de *fitness*, embora a eficiência de cópula tenha sido prejudicada de forma equivalente nas duas populações, os mosquitos de Aracaju foram mais afetados, com maior tempo de desenvolvimento larvar; menor aceitação do repasto sanguíneo; ingurgitamento reduzido e produção de menor número de ovos por fêmea. Em comparação com Crato, os mosquitos de Aracaju exibem  $RR_{95}$  menores para OP e PI, maior participação de enzimas detoxificadoras e mais aspectos de *fitness* afetados. A relação potencial entre os mecanismos de resistência operantes e a viabilidade dos mosquitos é discutida.

### **Palavras-chave**

*Aedes aegypti*; diflubenzuron; *fitness*; resistência a inseticidas; organofosforados; piretróides; mecanismos de resistência.



## 1.2 Introdução

O *Aedes aegypti* é o principal vetor de dengue. Mais recentemente, Zika e chikungunya, dois outros vírus transmitidos por este mosquito, estão ameaçando diversos países ao redor do mundo. Em nenhum caso medicamentos específicos estão disponíveis. Embora existam algumas vacinas candidatas contra dengue (Schwartz et al., 2015), os esforços neste sentido em relação aos outros vírus estão apenas começando. Além disso, deve-se considerar que *A. aegypti* tem potencial de transmitir vários outros agentes patogênicos emergentes, devido aos seus hábitos sinantrópicos e à sua grande competência vetorial para tais vírus. Em um cenário como este, a prevenção dessas doenças depende de medidas de controle direcionadas para diminuir a densidade de seu vetor principal, *A. aegypti*. Apesar da crescente atenção dada ao controle mecânico e ao engajamento social, os inseticidas químicos ainda são ferramentas amplamente utilizadas. As principais classes de inseticidas neurotóxicos empregadas hoje em dia para o controle de vetores de doenças são organofosforados (OP) e piretróides (PI) (Ranson et al., 2010; Valle et al., 2015).

Durante mais de trinta anos, apenas compostos OP foram utilizados para o controle de *A. aegypti* no Brasil. A detecção de resistência ao larvicida temephos, no final da década de 1990, resultou no uso de inseticidas de diferentes classes contra larvas e adultos: a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) foi empregada contra larvas e os compostos PI foram utilizados no controle de adultos (Braga & Valle, 2007a). Contudo, poucos anos depois, o Ministério da Saúde interrompeu o uso de Bti em escala nacional. Desde 2009, os reguladores do desenvolvimento dos insetos (do inglês *Insect Growth Regulators* - IGR) são empregados no controle de larvas, em um esquema programado; os inibidores da síntese de quitina (do inglês *chitin synthesis inhibitors* - CSI) foram aplicados até 2013. Diflubenzuron foi o CSI inicialmente escolhido. Embora não empregado durante o período coberto pelo presente trabalho e, portanto, não usado aqui, desde 2014, o análogo de hormônio juvenil pyriproxyfen é utilizado para o controle de larvas (MS-SVS, 2014).

Quanto aos mosquitos adultos, o uso doméstico de inseticidas PI provavelmente contribuiu para a seleção de populações resistentes (da-Cunha et al., 2005; Montella et al., 2007; Linss et al., 2014). Esse uso descontrolado de PI, disponível no mercado varejista, aumenta em períodos epidêmicos e, embora difícil de quantificar, supõe-se induzir resistência mesmo quando não há aplicações de PI por parte dos profissionais de saúde pública (Maciel-de-Freitas et al., 2014). Esta disseminação da resistência a PI impediu a utilização da maioria dos adulticidas recomendados pelo Esquema de Avaliação de Pesticidas da Organização Mundial da Saúde para o controle de mosquitos *A. aegypti* (WHO, 2012). Em 2009, o OP malathion, o único composto não-PI recomendado para pulverização espacial contra *A. aegypti*, foi gradualmente introduzido como adulticida no país (MS-SVS, 2009b). No início, isso foi feito especificamente nos municípios onde a resistência PI havia sido detectada. Atualmente, a substituição está em andamento em todo o território nacional.

Os principais mecanismos de resistência a inseticidas são: a) mudanças estruturais em seus sítios-alvo que impedem a interação com inseticidas; b) um aumento na capacidade de detoxificação dos inseticidas, conhecida como resistência metabólica; (Valle et al., 2015).

A enzima acetilcolinesterase (AChE), presente na fenda sináptica, é alvo de inseticidas OP; AChE inativa o neurotransmissor acetilcolina. Os compostos PI atuam nos canais de sódio regulados por voltagem ( $Na_v$ ), localizados nos axônios. Os OP inibem a atividade de AChE e PI mantêm os canais de sódio em sua conformação aberta. O resultado em ambos os casos é a transmissão de impulsos repetitivos que podem culminar com a morte do inseto.

A AChE de mosquitos é codificada por dois genes, *ace1* e *ace2*; apenas o primeiro está relacionado à resistência aos OP (Huchard et al., 2006). Em *A. aegypti*, de nosso conhecimento, não foi descrita mutação em *ace1*, um fenômeno atribuído ao distinto uso de códons desta espécie (Weill et al., 2004). Em relação ao gene  $Na_v$  - o alvo PI, as populações brasileiras de *A. aegypti* registram pelo menos duas substituições correlacionadas com a resistência, Val1016Ile e Phe1534Cys. Espécimes homozigotos para uma ou ambas as substituições são referidas como 'resistentes *knockdown*' ou *kdr* (Martins et al., 2012; Linss et al., 2014).

Outro mecanismo importante de resistência a inseticidas, conhecido como resistência metabólica, é caracterizado por mudanças no número ou na eficiência de enzimas que sequestram ou transformam o inseticida em uma molécula progressivamente mais solúvel, facilitando sua excreção (Valle et al., 2015). As principais superfamílias de enzimas envolvidas neste processo são as oxidases de função mista (MFO) e as esterases de fase 1 (EST), e as glutathiona S-transferases de fase 2 (GST).

Sabe-se que ambos os mecanismos de resistência, metabólica e alteração do sítio alvo, têm o potencial de afetar os processos fisiológicos e reprodutivos de um determinado organismo (Rivero et al., 2010). Nestes casos, embora os insetos resistentes tenham mais chances de sobreviver quando expostos ao inseticida, na ausência destes, tais espécimes tendem a ser menos competitivos (Brito et al., 2013). De fato, existem vários registros de custos adaptativos associados à resistência a inseticidas em mosquitos vetores de doenças (Berticat et al., 2002; Rivero et al., 2010; Belinato et al., 2012; Jaramillo-O et al., 2014; Belinato & Valle, 2015; Diniz et al., 2015).

Neste estudo, utilizamos uma série de metodologias aplicadas na rotina dos programas de monitoramento da resistência de vetores a inseticidas para caracterizar duas populações de campo brasileiras de *A. aegypti*, Aracaju, no Estado de Sergipe (SE) e Crato, no Estado do Ceará (CE). Além dos perfis de resistência relacionados aos inseticidas empregados no âmbito do programa brasileiro de controle da dengue, também foi investigada a participação de mecanismos de resistência distintos. Além disso, foram analisados diferentes parâmetros de desenvolvimento e reprodução de ambas as populações, a fim de avaliar qualquer correlação potencial entre esses aspectos e a resistência a inseticidas.

## **1.3 Materiais e Métodos**

### **1.3.1 Linhagens de mosquitos**

As populações de campo de *A. aegypti* de duas localidades do Nordeste brasileiro foram escolhidas (Figura 1): Aracaju no Estado de Sergipe (SE) e Crato, no Ceará (CE). Historicamente, o Ministério da Saúde brasileiro monitora amostras representativas de todos os municípios (Lima et al., 2003; Montella et al., 2007; Linss et al., 2014). A coleta de ovos em campo, realizada com o auxílio de armadilhas ovitrampas, foi realizada por agentes de saúde locais, seguindo os procedimentos recomendados pelo PNCD (Programa Nacional de Controle da Dengue / Ministério da Saúde) (Lima et al., 2003). No laboratório, a criação foi iniciada com 349 ovitrampas positivas obtidas de Aracaju em 2012 e 272 de Crato, em 2013. Foram utilizados espécimes F1 ou F2, conforme indicado.

A cepa Rockefeller ('Rock'), uma referência de vigor e suscetibilidade a inseticidas (Kuno, 2010), foi utilizada tanto para calibrar todos os ensaios quanto como controle interno dos testes com populações de campo.

### **1.3.2 Dados sobre a distribuição de inseticidas**

O Ministério da Saúde do Brasil coordena a distribuição de inseticidas utilizados em Saúde Pública em todo o país, para todos os programas de controle vetorial de doenças. Nós fomos autorizados a acessar esses dados, ordenados por ano, desde 2003. Os inseticidas utilizados pelo Programa Nacional de Controle da Dengue entre 2003 e 2013 são retratados na Figura 1, juntamente com os locais de coleta de amostras de mosquitos.

### **1.3.3 Criação de mosquitos**

Os mosquitos foram criados de acordo com condições padrão descritas anteriormente (Belinato et al., 2012; Martins et al., 2012). Resumidamente, os ovos foram postos a eclodir durante 1 hora em água desclorada, grupos de aproximadamente 1.000 larvas sincronizadas foram transferidos cuidadosamente para bacias de 33 x 24 x 8 cm, alimentados com 1 g de ração para gatos (Friskies, Purina / Camaquã / RS) a cada três dias, e mantidos a  $26 \pm 1$  °C até a pupação. Os adultos foram mantidos em gaiolas cilíndricas de 17 x

18 cm e alimentados *ad libitum* com uma solução de 10% de açúcar, substituída três vezes por semana.

Para obtenção de ovos, fêmeas privadas da alimentação açucarada durante 18-24 horas foram alimentadas com sangue de cobaias anestesiadas com ketamina e xilazina (Hawk & Leary, 1999). A alimentação de sangue das fêmeas de *A. aegypti* foi realizada de acordo com as diretrizes brasileiras (Filipecki et al., 2011). O protocolo foi aprovado pelo comitê institucional da Fiocruz "Comissão de Ética sem Estudo de Animais" (CEUA / Fiocruz 2008), número de licença: L-011/09 e LW-20/14.

#### **1.3.4 Inseticidas**

A suscetibilidade aos principais inseticidas empregados pelo PNCD contra as populações de campo de *A. aegypti* foi avaliada: os OP temephos (Pestanal, Sigma-Aldrich) e malathion (Cheminova Brasil Ltda, gentilmente fornecido pelo Ministério da Saúde), o PI deltametrina (Pestanal, Sigma - Aldrich) e o CSI diflubenzuron (DFB) (Pestanal, Sigma-Aldrich).

#### **1.3.5 Bioensaios**

Os bioensaios quantitativos com larvas foram realizados com espécimes L3. Os bioensaios com temephos seguiram procedimentos da OMS (WHO, 2005) e aqueles com DFB foram realizados de acordo com a metodologia descrita em outro estudo (Martins et al., 2008). Para cada inseticida, foram realizados pelo menos três ensaios, em dias distintos, cada qual com oito concentrações diferentes. Os ensaios com larvas empregaram quatro réplicas por concentração, com 20 espécimes por réplica para temephos (total de 1920 larvas) e com 10 espécimes por réplica para DFB (total de 960 larvas). Para os ensaios com temephos, os resultados foram registrados após 24 horas de exposição; os registros para DFB foram realizados a cada dois dias, até a emergência dos adultos ou a morte do último espécime do controle.

Bioensaios quantitativos com adultos empregaram fêmeas de 1 a 5 dias de idade. Os ensaios biológicos com deltametrina e malathion foram

realizados com papéis impregnados, utilizando uma metodologia adaptada da OMS (Maciel-de-Freitas et al., 2014). Para cada inseticida, pelo menos três ensaios foram realizados, em dias diferentes, cada ensaio com oito concentrações distintas. Os ensaios com adultos utilizaram três réplicas por concentração, com 15-20 indivíduos cada (um total de 1080-1440 espécimes). Exposição dos adultos aos papéis impregnados com inseticida foi realizada durante 1 hora, seguida de 24 horas de recuperação, quando a mortalidade foi registrada.

Os bioensaios quantitativos também foram realizados com a cepa Rockefeller. Além disso, dois controles internos paralelos a todos os ensaios foram realizados: a) larvas e adultos de Rockefeller foram expostos a duas concentrações diferentes de inseticidas,  $CL_{99}$  (concentração letal) ou  $IE_{99}$  (inibição de emergência) e outra correspondente à metade desta; b) os espécimes de campo foram mantidos com o solvente, na mesma quantidade utilizada para as amostras experimentais.

Análises Probit (Polo-PC, LeOra Software, Berkeley, CA) foram utilizadas para calcular as doses efetivas, CL para inseticidas neurotóxicos e IE para DFB. Razões de resistência (RR) foram obtidas através da comparação das doses efetivas das populações-teste com as doses equivalentes de Rockefeller. O critério previamente validado para classificar o *status* de resistência ao temephos em populações de campo brasileiras do vetor (Montella et al., 2007) foi adotado para os outros inseticidas aqui mostrados. De acordo com este critério, as populações com  $RR_{95}$  superiores a 3,0 são resistentes e o inseticida empregado nestas localidades nas atividades de controle químico precisa ser substituído.

### **1.3.6 Ensaios de genotipagem**

A pesquisa de mutações *kdr* no gene  $Na_v$  nas amostras de Crato foi feita usando o método TaqMan, conforme descrito para os mosquitos de Aracaju (Linss et al., 2014). Em ambos os casos, foram utilizados 30 machos adultos individuais, das gerações Aracaju F0 e Crato F2. Para cada uma das substituições, Val1016Ile e Phe1534Cys, foram realizadas duas reações independentes. Para cada posição, utilizou-se 1 ul contendo 0,5% do DNA total

extraído de cada espécime, em um volume final de reação de 10  $\mu$ l. Os genótipos individuais, bem como as frequências alélicas e genótípicas de cada população, foram calculados com base na variação de ambas as posições, 1016 e 1534, assumindo que estão sob desequilíbrio de ligação (Linss et al., 2014). As frequências alélicas e genótípicas relativas a cada posição individual, 1016 e 1534, também são mostradas.

### **1.3.7 Ensaio bioquímico**

Os adultos foram avaliados de acordo com metodologia descrita por Valle et al. (2006), com base em recomendações do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e da OMS (CDC, 1998; Hemingway, 1998). As atividades de MFO, EST e GST foram quantificadas. Enquanto a MFO foi indiretamente medida, foram utilizados três substratos para EST:  $\alpha$ - e  $\beta$ -naftil e acetatos de  $p$ -nitrofenil, respondendo, respectivamente, pelas atividades denominadas  $\alpha$ -EST,  $\beta$ -EST e  $p$ NPA-EST. Para AChE, tanto a atividade total como a atividade inibida pelo carbamato propoxur foram testadas. De acordo com o critério da OMS específico para esta última análise (Hemingway, 1998), atividade remanescente de AChE igual ou superior a 30% indica resistência aos inseticidas OP e carbamatos.

Para todas as enzimas, pelo menos três ensaios, cada um com 40 espécimes individuais de campo e cinco da cepa Rockefeller, foram realizados em dias diferentes. Para calcular as atividades enzimáticas específicas, o conteúdo de proteína total de cada amostra foi quantificado usando o reagente concentrado para quantificação de proteínas da marca Bio-Rad (número de catálogo: 500-0006). O mesmo protocolo, com alguns ajustes, foi aplicado às larvas (Viana-Medeiros, 2011).

As atividades enzimáticas foram classificadas essencialmente de acordo com o critério estabelecido anteriormente (Valle et al. 2006; Montella et al. 2007): após calcular o percentil 99 de Rockefeller, a taxa de espécimes acima desse ponto de corte foi estimada para cada enzima e população. As atividades foram classificadas como inalteradas, alteradas ou fortemente alteradas quando esta taxa foi, respectivamente, abaixo de 15%, entre 15% e 50%, ou acima de 50%.

### **1.3.8 Avaliação de parâmetros do fitness**

Todos os seguintes ensaios foram realizados pelo menos três vezes. Mosquitos Rockefeller foram sempre testados em paralelo, como um controle interno. Em todos os casos, os ovos foram imersos em água desclorada durante 30 minutos para induzir a eclosão das larvas. Grupos de 300 larvas L1 foram contadas e transferidas delicadamente para bacias plásticas contendo 1 litro de água desclorada e 1 g de alimento para gato, adicionados a cada três dias. As larvas foram mantidas em estufa do tipo BOD (“*Biological Oxygen Demand*”) a  $26 \pm 1$  ° C e sob LD 12:12. Os adultos foram alimentados *ad libitum* com solução de açúcar a 10%.

#### **1.3.8.1 Cinética do desenvolvimento larvar**

A cinética de formação de pupas, nas condições supramencionadas, foi registrada diariamente como indicativa do tempo de desenvolvimento das larvas. Cada ensaio foi feito com três repetições de 300 espécimes. O número absoluto de pupas formadas até o 6º dia após a eclosão das larvas foi utilizado nas análises estatísticas.

#### **1.3.8.2 Frequência de fêmeas inseminadas**

Para cada população, 15 grupos, cada qual constituído por três fêmeas e um macho, todos virgens e com dois a três dias de idade, foram mantidos confinados em tubos Falcon transparentes de 50 mL, como indicado em outro trabalho (Belinato et al., 2012). Após três dias, as espermatecas das fêmeas foram dissecadas e a presença de espermatozóides foi avaliada com auxílio de um microscópio óptico (Nikon Biophot, 200X). O número de machos capazes de inseminar zero, uma, duas ou três fêmeas foi marcado e cada uma dessas taxas foi calculada e multiplicada pelo número correspondente de fêmeas. A soma destes valores resultou em pontuações que variaram teoricamente entre zero (100% dos machos incapazes de inseminar qualquer fêmea) e 300 (se



100% dos machos inseminam as três fêmeas disponíveis) e foram utilizados para ranquear o desempenho reprodutivo, visando comparar as diferentes linhagens (Belinato & Valle, 2015).

#### 1.3.8.3 Aceitação do repasto sanguíneo e quantidade de sangue ingerido

Foram oferecidas, a fêmeas adultas de três a cinco dias de idade, durante 30 minutos, cobaias anestesiadas, e o número de espécimes que efetivamente se alimentou foi registrado. Para avaliar a quantidade de sangue ingerido, três grupos, cada um com dez espécimes, foram pesados antes da alimentação sanguínea e três grupos foram pesados após o procedimento. A pesagem foi feita em uma balança analítica (APX -200, Denver Instrument). A razão entre o peso após a refeição sanguínea em relação ao peso anterior foi calculada, conforme realizado em outros estudos (Martins et al., 2012; Brito et al., 2013).

#### 1.3.8.4 Postura de ovos

Três dias após a refeição sanguínea, a oviposição foi estimulada colocando-se as fêmeas em placas de Petri invertidas, com as tampas internamente revestidas com papel de filtro umedecido em água desclorada (Farnesi et al., 2009), e mantidas em estufa do tipo BOD a  $26 \pm 1$  °C. Para cada população, um total de 90 fêmeas individuais foram empregadas, distribuídas em três experimentos com 30 espécimes cada, realizados em dias diferentes. Após 24 horas, as fêmeas foram removidas e quatro parâmetros foram registrados: o número de fêmeas que ovipuseram, a quantidade de fêmeas inseminadas que não ovipôs, o número e a viabilidade dos ovos.

#### 1.3.8.5 Análise estatística dos parâmetros de fitness

Os dados obtidos para cada parâmetro foram testados quanto à normalidade usando o teste de Kolmogorov-Smirnov (com valor de P de acordo com Dallal-Wilkinson-Lilliefors). Os resultados de todas as cepas foram então

comparados usando testes qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey, conforme indicado nos resultados. As exceções foram o número de ovos, avaliado com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e a frequência de fêmeas inseminadas, que foi avaliada através do cálculo da taxa de desempenho reprodutivo supramencionado. O programa Graph-Pad Prism versão 5.0 para Windows foi adotado para todas as análises (Graph-Pad Software, San Diego, Califórnia, EUA) (graphpad.com).

## 1.4 Resultados

### **1.4.1 Inseticidas aplicados em campo**

A Figura 1 mostra o histórico de abastecimento anual dos inseticidas empregados contra o vetor da dengue nos Estados de Sergipe e Ceará e que foram aqui avaliados. Todos esses dados foram obtidos diretamente do Ministério da Saúde. Embora a informação disponível não seja detalhada ao nível dos municípios e não discrimine as quantidades de inseticidas distribuídos, sua apresentação ajuda a avaliar os perfis de resistência aqui descritos no contexto do uso de inseticidas em campo. Em relação aos adulticidas, foram incluídos todos os produtos pertencentes à classe dos PI, mesmo aqueles empregados em programas de controle de outras doenças transmitidas por vetores. Isso foi realizado devido ao potencial impacto das aplicações espaciais em campo sobre as populações naturais do *A. aegypti*.

Nos dois Estados, o controle das larvas foi realizado exclusivamente com o OP temephos até 2008 (Figura 1). Desde 2009, o CSI diflubenzuron foi introduzido progressivamente, em adição ao temephos. Em Sergipe, até 2013, tanto temephos quanto o CSI ainda eram empregados contra larvas. No entanto, no Estado do Ceará, as aplicações de temephos foram interrompidas em 2012 e o CSI permaneceu como o único larvicida empregado pelos agentes

públicos. Vale lembrar que o Ceará também utilizou a bactéria entomopatogênica Bti contra larvas do vetor entre 2003 e 2009.

O controle de adultos no Estado de Sergipe foi feito exclusivamente com PI, durante o período 2003-2013. No Ceará, desde 2008, o OP malathion foi adicionado à lista dos adulticidas disponíveis.

Esta descrição trata meramente das aplicações de inseticidas realizadas por gerentes públicos. O uso doméstico, principalmente de adulticidas, embora não trivial, especialmente nas épocas epidêmicas (Maciel-de-Freitas et al., 2014), é difícil de avaliar e não pôde ser resgatado.

#### **1.4.2 Resistência a inseticidas, bioensaios**

As Razões de Resistência (RR) obtidas por meio de bioensaios quantitativos com os principais inseticidas empregados no controle de *A. aegypti* estão apresentados na Tabela 1. A Tabela S1 mostra detalhes dos bioensaios, como dados de Rockefeller, doses efetivas (intervalos de confiança de 95%) e 'slopes' obtidos em cada caso.

Foram obtidos valores de RR compatíveis com *status* de suscetibilidade para o DFB, o primeiro CSI introduzido contra larvas em todo o país, e para o OP malathion, empregado em adição a PI no Estado do Ceará desde 2008. Em contraste, tanto para Aracaju como para Crato, foram obtidos altos valores de RR para o larvicida temephos (também um composto OP) e para o adulticida PI deltametrina, inseticidas usados por longos períodos pelo PNCD. Em geral, para estes dois compostos, Crato exibiu *status* de resistência cerca de duas a três vezes maior, quando comparado com Aracaju. No caso da  $RR_{95}$  para temephos, a diferença entre Crato e Aracaju aumentou para cinco vezes (Tabela 1).

#### **1.4.3 Mecanismos de resistência a inseticidas, ensaios moleculares**

Os genótipos *kdr* nas posições 1016 e 1534 do gene  $Na_V$  - sítio alvo dos piretróides, são mostrados na Tabela 2. O alelo 'selvagem', suscetível, '1016 Val<sup>+</sup> / 1534 Phe<sup>+</sup>', é referido como 'S'. O alelo mutado apenas na

posição 1534 (1016 Val<sup>+</sup> / 1534 Cys<sup>kdr</sup>) é chamado 'R1' e aquele com mutações em ambas as posições (1016 Ile<sup>kdr</sup> / 1534 Cys<sup>kdr</sup>) é denominado 'R2'. A mutação exclusivamente na posição 1016 não foi encontrada (Linss et al., 2014).

Todos os três alelos foram encontrados em Aracaju e Crato. Em Crato, S foi o alelo mais frequente, e em Aracaju, o mutante duplo, R2, foi o mais presente. Uma vez que as mutações *kdr* nas posições 1016 e 1534 são recessivas, a resistência a PI por alteração do gene Na<sub>v</sub> é expressa apenas em indivíduos homozigotos: R1R1, R1R2 e R2R2 (Linss et al., 2014). Uma proporção similar desses genótipos mutantes foi encontrada em ambas as amostras: Aracaju com 43%; enquanto o Crato exibiu 32% (Tabela 2). Os dados sobre as frequências alélicas e genotípicas relativas a cada posição, separadamente, são mostrados na Tabela S2.

#### **1.4.4 Mecanismos de resistência a inseticidas, ensaios bioquímicos**

A Tabela 3 mostra o perfil de larvas e adultos das populações de Aracaju e Crato em relação às principais classes de enzimas detoxificadoras. A atividade total do site alvo de OP – a enzima AChE, também é apresentada. A Tabela S3 exhibe informações adicionais dos ensaios bioquímicos, como o número amostral, a mediana das distribuições, bem como o percentil 99 de Rockefeller para cada atividade avaliada.

Aumento da atividade total de AChE foi observado apenas em mosquitos adultos de Crato, a população com resistência muito alta ao temephos (Tabela 3). Deve-se notar que, de acordo com o critério da OMS (Hemingway, 1998), larvas e adultos de ambas as populações exibiram uma AChE sensível à inibição pelo inseticida inibidor usado (Figura S1).

Em relação aos mecanismos de resistência metabólica, em geral, Aracaju apresentou mais alterações do que os espécimes de Crato, tanto em termos de número de enzimas afetadas quanto de intensidade de aumento de atividade (Tabela 3). Isso aconteceu apesar dos valores mais altos de RR para temephos e deltametrina exibidos pelos mosquitos de Crato (Tabela 1).

A comparação entre larvas e adultos de cada município mostrou que as alterações no estágio adulto foram ligeiramente maiores. Neste sentido,

aumento de atividade das MFO de Fase 1 foi observado apenas em espécimes adultos de Aracaju. A outra classe de enzimas da Fase 1, EST, também foi mais alterada nas amostras de Aracaju. Dos três substratos, apenas  $\rho$ NPA-EST poderia ser classificado como alterado em ambas as populações e estágios. Aracaju exibiu mais alterações de  $\alpha$ -EST e  $\beta$ -EST do que Crato. Da mesma forma, as enzimas GST estavam alteradas em ambos os estágios em espécimes de Aracaju, mas apenas em adultos de Crato.

#### **1.4.5 Avaliação de alguns parâmetros do fitness**

Foi avaliada uma série de aspectos do desenvolvimento e da reprodução das populações de *A. aegypti* de Aracaju e Crato, a fim de investigar eventuais efeitos negativos, possivelmente associados à resistência a inseticidas. Os dados foram comparados com a cepa Rockefeller, referência de suscetibilidade e vigor. Considerando que a cepa Rockefeller foi mantida em condições de laboratório por um longo período de tempo, para minimizar as limitações potenciais, os dados das populações de campo foram também comparados entre si. Cada seção a seguir descreve um parâmetro individual e a Tabela 4 resume os resultados.

##### **1.4.5.1 Cinética do desenvolvimento larvar**

A Figura S2a exibe dados diários de pupação para cada população de campo e para a cepa suscetível. Tanto para Rockefeller quanto para Crato, a maior proporção de pupas é formada no 6<sup>o</sup>-7<sup>o</sup> dia após a eclosão das larvas. O desenvolvimento da população de Aracaju foi mais lento, atingindo o pico nos dias 7-8. Apesar disso, em todos os casos, a muda larva-pupa foi completada até o 10<sup>o</sup> dia do desenvolvimento pós-embrionário. Não houve mortalidade nesta fase. Os dados cumulativos, mostrados na Figura S2b, corroboram essas observações. Conforme ilustrado na Tabela 4, a comparação dos resultados obtidos no primeiro dia de pupação para todos os grupos, correspondente ao 6<sup>o</sup> dia após a eclosão das larvas, confirmou diferenças significativas entre Aracaju

e Rockefeller (ANOVA,  $p < 0,0001$ ), Aracaju e Crato (ANOVA,  $P < 0,01$ ), mas não entre Crato e Rockefeller (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

#### 1.4.5.2 Frequência de fêmeas inseminadas

Todos os machos de ambas as populações foram capazes de inseminar pelo menos uma das três fêmeas disponíveis, indicando que todos os machos utilizados eram sexualmente competentes (Figura S3). Após três dias, 98% dos machos da cepa Rockefeller havia inseminado as três fêmeas disponíveis, e os 2% restantes haviam inseminado duas fêmeas. Em contraste, apenas 56 e 47% dos machos Aracaju e Crato foram capazes de inseminar as três fêmeas disponíveis, no mesmo período. No entanto, quando o índice de "desempenho reprodutivo" foi calculado (ver Métodos para detalhes), de um total máximo possível de 300, ambos os mosquitos de Aracaju e Crato atingiram o mesmo valor, 240, inferior aos 298 obtidos para Rockefeller (Tabela 4).

#### 1.4.5.3 Alimentação sanguínea

Quase 95% (172/182) das fêmeas Rockefeller aceitaram o repasto sanguíneo, aproximadamente equivalente aos 89% (144/161) dos mosquitos de Crato ( $\chi^2_{0,05,1} = 3,021$ ;  $p = 0,0822$ ). No entanto, a taxa alcançada pelos espécimes de Aracaju foi de 79% (143/182), significativamente menor do que os mosquitos da cepa Rockefeller ( $\chi^2_{0,05,1} = 19,83$ ;  $p < 0,0001$ ) e de Crato ( $\chi^2_{0,05,1} = 7,388$ ;  $p = 0,0066$ ).

As fêmeas de Aracaju também ingeriram uma menor quantidade de sangue do que os outros grupos (ANOVA,  $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$ , em comparação com Rockefeller e Crato, respectivamente). Esses espécimes consumiram cerca de metade da quantidade ingerida por Rockefeller, enquanto a diferença entre Crato e o grupo controle foi de cerca de apenas 15% (Figura S4 e Tabela 4).

#### 1.4.5.4 Fecundidade

Quatro parâmetros relacionados à fecundidade foram avaliados: i) a porcentagem de fêmeas alimentadas com sangue que foram capazes de colocar ovos foi equivalente entre os grupos (Rockefeller: 195/215 = 91%. Aracaju: 188/218 = 86%;  $\chi^2_{0,05,1} = 2,519$ ,  $p = 0,1125$ . Crato: 191/213 = 90%;  $\chi^2_{0,05,1} = 0,03830$ ,  $p = 0,8448$ ); ii) a pequena proporção de fêmeas que não ovipuseram, presentes em cada grupo, estava efetivamente inseminada, conforme confirmado pela dissecação das espermatecas; iii) apesar da alta variabilidade dentro de cada população, a mediana do número de ovos postos pelas fêmeas de Aracaju, mas não de Crato, tendeu a ser menor, em comparação com a cepa Rockefeller (Figura S5; Kruskal-Wallis;  $p < 0,0001$ ). Além disso, o número de ovos de Aracaju também foi significativamente inferior ao de Crato (Kruskal-Wallis;  $p < 0,0001$ ); iv) em todos os casos, a viabilidade dos ovos postos foi alta, acima de 95% (Tabela 4).

É interessante notar que Aracaju ingeriu cerca de 50% menos sangue do que a cepa suscetível, refletindo em um número de ovos aproximadamente 30% inferior.

## **1.5 Discussão**

Aqui apresentamos a caracterização de duas populações brasileiras de campo de *A. aegypti* em relação aos seus *status* de suscetibilidade a inseticidas e a alguns parâmetros de do seu ciclo de vida geralmente alterados como efeito colateral da resistência.

Ambas as populações apresentam resistência aos compostos empregados há muito tempo no país, o larvicida temephos, um OP, e o adulticida deltametrina, um PI. Em particular, os mosquitos de Crato, CE, apresentaram níveis de resistência extremamente elevados em relação a estes dois inseticidas. Em contraste, nenhuma alteração de suscetibilidade foi observada em relação a DFB ou malathion, os compostos recentemente introduzidos no país para controlar, respectivamente, larvas e adultos. Em relação ao malathion, deve-se notar que os mecanismos de resistência

geralmente detectados contra esse OP de cadeia aberta tendem a ser diferentes daqueles induzidos por outros compostos desta classe, como o temephos (Hemingway & Ranson, 2000).

O estado do Ceará aparentemente atribui grande importância ao controle químico de vetores de dengue, em particular com o uso de inseticidas neurotóxicos. Em consonância com isto, Lima et al. (2011) usando amostras de Crato coletadas em 2009, detectaram  $RR_{95}$  de aproximadamente 200 para temephos. Este foi um dos maiores índices de resistência ao OP registrados em populações brasileiras do vetor de dengue e impulsionou a interrupção deste inseticida no CE, iniciativa esta que está em prática desde 2012 (Figura 1). Os dados apresentados aqui, derivados de amostras coletadas quase dois anos após essa interrupção, embora ainda apontando para níveis muito altos de resistência a temephos, revelam um declínio de aproximadamente três vezes na  $RR_{95}$  desta população (64,8). Esta queda é provavelmente consequência da substituição de temephos por DFB, produto com modo de ação distinto. Enquanto isso, em Aracaju, SE, o uso do temephos não foi interrompido, e os níveis de resistência quase dobraram desde 2001-2003, quando os valores de  $RR_{95}$  da população eram em torno de 6,0 (Braga et al., 2004; Montella et al., 2007). No entanto, a alta  $RR_{95}$  para temephos detectada em Aracaju neste estudo (12,9), ainda é cinco vezes menor que a de Crato e compatível com os valores observados na maioria dos municípios brasileiros.

Considerando PI, avaliações anteriores estão disponíveis apenas para Aracaju. Logo após a introdução de PI no controle de *A. aegypti* no Brasil, análise qualitativa detectou alteração incipiente de suscetibilidade nesta localidade (da-Cunha et al., 2005). Confirmamos, no presente trabalho, que a resistência de Aracaju à deltametrina já está instalada ( $RR_{95} = 17,8$ ). Mais uma vez, neste caso, os mosquitos do Crato exibiram valores muito mais altos de  $RR_{95}$  (51,6), corroborando a opção do estado do CE pela ênfase no controle químico do vetor da dengue.

Os primeiros relatos de resistência a temephos em amostras brasileiras de *A. aegypti* de campo demoraram cerca de 30 anos depois que este OP começou a ser usado (Montella et al., 2007). Em contraste, a resistência aos inseticidas PI se desenvolveu de forma extremamente rápida. Isso pode ser devido, em parte, ao uso doméstico de PI, diretamente disponível para a



população, como já pontuado por alguns autores (Maciel-de-Freitas et al., 2014). Além disso, esta rápida disseminação da resistência aos PI, já detectada em algumas amostras de campo desde 2001 (da-Cunha et al., 2005) também poderia ser consequência de algum mecanismo de resistência cruzada.

Avaliamos a participação de resistência a PI e OP por alteração de seus sítios-alvo. No entanto, Aracaju e Crato exibiram frequências aproximadamente equivalentes de homozigotos *kdr*, apesar de níveis de resistência a deltametrina muito diferentes, apontando para o envolvimento de outros mecanismos. Do mesmo modo, Marcombe et al. (2012), trabalhando com populações *A. aegypti* da Martinica, sugeriram que, além do *kdr*, a resistência metabólica desempenha um papel significativo na resistência a PI. Portanto, outras possibilidades ainda não avaliadas são a ocorrência de substituições em posições distintas de Na<sub>v</sub> (Li et al., 2015) ou a participação de transportadores ABC e algumas enzimas cuticulares, na resistência a inseticidas destas amostras (David et al., 2014; Poupardin et al., 2014; Zhu et al., 2014).

O aumento da atividade total de AChE, o sítio-alvo de OP, foi detectado apenas em mosquitos de Crato, a população com maior nível de resistência ao temephos. Os ensaios bioquímicos de rotina aqui empregados não permitem discriminar entre a expressão aumentada de AChE, amplificação de genes ou modificação estrutural levando a uma maior eficiência da enzima. Resta ainda confirmar este fenômeno com outras abordagens metodológicas mais diretas.

Embora o Crato tenha apresentado maiores índices de resistência a OP e PI, foram detectadas mais alterações na resistência metabólica em Aracaju (Tabela 3). É teoricamente esperado que, em comparação com a resistência por alteração do sítio-alvo, os mecanismos metabólicos resultem em menores níveis de resistência devido ao comprometimento desta via com a viabilidade (*fitness*) desses espécimes, embora existam exceções (Valle et al., 2015). Isso foi demonstrado por Brito et al., em 2013, para uma linhagem de *A. aegypti* resistente a PI, que apresentava o genótipo *kdr* e alterações nas enzimas detoxificadoras: retrocruzamentos com a cepa Rockefeller por oito gerações sucessivas resultaram na mutação *kdr* em um *background* genético suscetível. A linhagem resultante apresentou redução da alteração de atividade

das enzimas detoxificadoras, mas ainda era altamente resistente a PI. No entanto, a resistência a inseticidas é um fenômeno multifatorial complexo, em que cada população usa "soluções locais" para enfrentar o desafio do inseticida (Viana-Medeiros, 2011; Bellinato et al., 2016). Tais soluções têm uma estreita relação com as mudanças nas enzimas da resistência metabólica que provavelmente foram pré-selecionadas em desafios anteriores nos criadouros larvares do campo (como pontuado por Mallet, 1989 e Bellinato & Martins, 2016).

Os mosquitos de Aracaju haviam exibido, anteriormente, atividades alteradas de  $\alpha$ -EST, *pnpa*-EST e, principalmente, de GST, conforme mostrado para amostras coletadas entre 2001 e 2003 (Montella et al., 2007). Aumento das duas últimas atividades foi atribuído à introdução de PI no país, em 2000.

Alguns relatos baseados em ferramentas moleculares correlacionam a resistência a PI com alterações em algumas espécies moleculares das classes MFO e GST; da mesma forma resistência a OP é relacionada a aumentos quantitativos de EST (Marcombe et al., 2009; Marcombe et al., 2012; Poupardin et al., 2014). Essas mesmas correlações gerais também foram sugeridas pelos ensaios bioquímicos de rotina para diferentes populações naturais de *A. aegypti* (Marcombe et al., 2009; Polson et al., 2011; Marcombe et al., 2012). Na maioria dos casos, o caráter multifatorial da resistência aos inseticidas é observado (Ranson et al., 2010; Viana-Medeiros, 2011; Marcombe et al., 2012). De acordo, um estudo genômico recente e amplo revelou que as alterações relacionadas à resistência nas populações naturais de *A. aegypti* não são universais (Faucon et al., 2015). Neste estudo, foram encontradas tanto mutações em regiões codificantes quanto variações no número de cópias de genes que participam do metabolismo de desintoxicação.

Na presença de um inseticida, as populações de vetores resistentes apresentam uma vantagem significativa. No entanto, esta condição de resistência pode afetar vários aspectos de seu *fitness*. Do ponto de vista epidemiológico, os parâmetros que influenciam a capacidade vetorial são particularmente relevantes. No entanto, semelhante à grande variabilidade vista na resistência metabólica, não existe uma alteração "diagnóstica" de *fitness* que pudesse estar diretamente relacionada à resistência a um determinado produto (Valle et al., 2015).

Na ausência de populações de campo brasileiras suscetíveis a inseticidas, e considerando a necessidade de se dispor de um controle para comparar as avaliações de *fitness*, Rockefeller, uma cepa que é referência de suscetibilidade a inseticidas e de vigor, foi empregada, como relatado anteriormente (Belinato et al., 2012; Martins et al., 2012; Brito et al., 2013; Jaramillo-O et al., 2014; Belinato & Valle, 2015). Embora Rockefeller seja indubitavelmente mais adaptada às condições de laboratório, no caso de *A. aegypti*, é necessário empregar uma cepa de laboratório para comparar o desempenho do *fitness* de populações resistentes ou suscetíveis a inseticidas. No entanto, além de comparar com Rockefeller, também é possível analisar dados de ambas as populações de campo de forma comparativa (Tabela 4, comparar colunas de Crato e Aracaju).

A velocidade de desenvolvimento larvar está diretamente relacionada à densidade populacional dos adultos, uma vez que aquele estágio está sujeito à predação e à eliminação dos criadouros. Este parâmetro foi afetado apenas na população de Aracaju. Em *A. aegypti*, o comprometimento desta característica foi previamente relacionado a níveis elevados de resistência ao temephos em populações de campo, bem como à seleção com deltametrina e temephos em condições de laboratório (Martins et al., 2012; Brito et al., 2013; Diniz et al., 2015).

O desempenho da inseminação e, conseqüentemente, a eficiência de cópula dos machos de Aracaju e Crato foi afetado, de forma equivalente e significativa, quando comparado aos mosquitos de Rockefeller. Prejuízo neste parâmetro, como resultado de resistência a inseticidas, já foi descrito em *A. aegypti* e em populações de *Culex pipiens* (Antonio et al., 2009; Belinato et al., 2012; Diniz et al., 2015). Reversão parcial deste déficit foi alcançada para o vetor da dengue após a criação em laboratório na ausência de inseticidas (Belinato & Valle, 2015).

Comparado com a cepa controle, uma taxa menor de fêmeas de Aracaju aceitou a alimentação sanguínea. Esse comportamento já foi identificado em outras populações brasileiras de *A. aegypti* resistentes a temephos, além de ter sido mantido após seleção em laboratório com DFB por várias gerações. Além disso, essa característica, semelhante ao que ocorreu com a eficiência da cópula, foi parcialmente revertida quando mosquitos foram

criados em laboratório, na ausência de qualquer inseticida (Belinato et al., 2012; Belinato & Valle, 2015).

Da mesma forma, a quantidade de sangue ingerido é fundamental para a capacidade vetorial do mosquito, uma vez que influencia diretamente a quantidade de parasitas ingeridos e o número de ovos depositados (Belinato et al., 2009, 2012; Belinato & Valle, 2015). Apesar de sua relevância, este parâmetro é geralmente negligenciado em avaliações de *fitness* (Jaramillo-O et al., 2014; Diniz et al., 2015). Nossos dados indicam capacidade reduzida de fêmeas de Aracaju em ingerir sangue, quando comparadas à cepa controle Rockefeller. O mesmo não foi observado nas fêmeas de Crato. Este resultado também impactou o número de ovos colocados, que foi menor para as fêmeas de Aracaju.

Considerando-se diferentes populações do vetor, observa-se uma marcada variação nos parâmetros de *fitness* afetados. No entanto, nas amostras brasileiras de *A. aegypti* resistentes a inseticidas já avaliadas, a quantidade de sangue ingerido e o número de ovos postos são os parâmetros mais frequentemente alterados. Além disso, observa-se correlação geral e direta entre os níveis de resistência aos inseticidas e o número e a intensidade dos aspectos de viabilidade afetados (Belinato et al., 2009, 2012; Martins et al., 2012; Brito et al., 2013; Belinato & Valle, 2015; Valle et al., 2015).

Os dados sobre as populações de campo de Aracaju e Crato aqui apresentados corroboram o caráter multifatorial da resistência. Em comparação com Crato, foi observada uma maior participação da resistência metabólica nos mosquitos de Aracaju, bem como um maior número de parâmetros de *fitness* acometidos. Estes resultados corroboram o potencial já aludido das enzimas detoxificadoras em induzir um desvio relevante dos recursos metabólicos. Este processo, em geral, tem um impacto significativo na viabilidade dos insetos (Berticat et al., 2002; Rivero et al., 2010; Diniz et al., 2015). Alternativamente, Crato pode ter sofrido mutações compensatórias que melhoraram seu *fitness*, assim como já visto para outros vetores e para microorganismos resistentes a medicamentos (Brooke & Koekemoer, 2010).

Contudo, em se tratando de OP, a detecção de altos níveis de resistência a temephos, mas não a malathion, confirma a viabilidade de usar este último composto nas populações de campo avaliadas. Da mesma forma, a

suscetibilidade a DFB mostrada neste estudo argumenta em favor do uso de CSI no controle de larvas de *A. aegypti* no país. Além disso, os efeitos da resistência aos inseticidas e dos mecanismos associados sobre a biologia de amostras naturais de *A. aegypti* demonstrados aqui revelam a importância de estudar esses aspectos em mais populações de campo, a fim de fornecer suporte para orientar o controle racional do vetor da dengue.

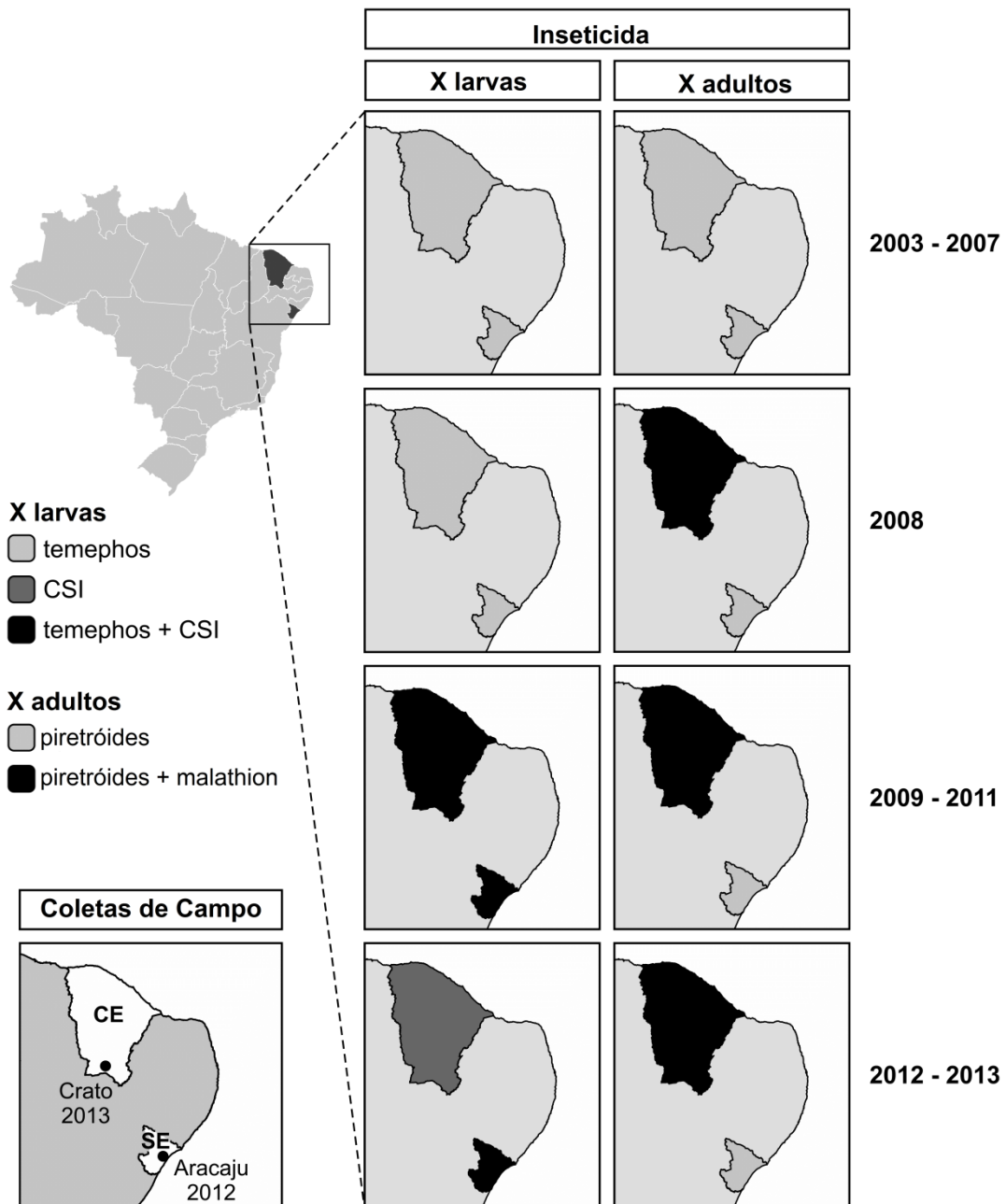
## 1.6 Conclusões

Elevados índices de resistência a piretróides e ao organofosfato temephos foram detectados em duas populações de *A. aegypti* do Nordeste brasileiro, derivados de intenso uso de controle químico. O mesmo não foi demonstrado para diflubenzuron e malathion, mais recentemente empregados no controle do vetor. Quando as duas populações são comparadas, os mosquitos de Aracaju tenderam a exibir níveis mais baixos de resistência a OP e PI e, ao mesmo tempo, maior atividade de enzimas detoxificadoras e maior comprometimento de *fitness*. O caráter multifatorial do fenômeno da resistência também foi demonstrado. Estes resultados sugerem um maior impacto da resistência metabólica, quando comparada aos mecanismos de alteração do sítio-alvo, na viabilidade dos mosquitos, nas populações avaliadas.

### ***Agradecimentos***

Agradecemos a Lindemberg Caranha de Sousa e sua equipe, da Secretaria de Saúde do Ceará, pelas coletas de ovos de Crato; Raquel Santos de Oliveira, pela assistência técnica; Dr. Thiago Affonso Belinato, pelo auxílio com as análises estatísticas; e Heloisa Diniz, pela arte da Figura 1. Agradecemos também aos dois revisores anônimos por suas pertinentes colocações.

## 1.7 Figura



**Figura 1. Histórico da aplicação de inseticidas nos estados de Sergipe (SE) e Ceará (CE).** A figura trata da dinâmica do uso de inseticidas em campo, de 2003 ao último ano de coleta das amostras de campo (2013). Em cada Estado, Ceará (CE) e Sergipe (SE), apenas os municípios submetidos à coleta de campo das amostras de *Aedes aegypti* são mostrados. Apenas foram considerados os inseticidas distribuídos pelo Ministério da Saúde e avaliados aqui. Em relação aos adulticidas, além da deltametrina, foram incluídos outros compostos piretróides, conforme explicado no texto. CSI: inibidor da síntese de quitina.

## 1.8 Tabelas

**Tabela 1. Status de suscetibilidade de duas populações de campo de *Aedes aegypti* aos inseticidas utilizados no programa brasileiro de controle de dengue.**

população	estágio	geração	inseticida	RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>
Aracaju/SE	larvar	F1	temephos	<b>11,2</b>	<b>12,9</b>
		F2	diflubenzuron	1,6	1,7
	adulto	F1	deltamethrin	<b>14,3</b>	<b>17,8</b>
		F2	malathion	1,6	1,8
Crato/CE	larvar	F2	temephos	<b>23,2</b>	<b>64,8</b>
		F2	diflubenzuron	1,6	1,8
	adulto	F3	deltamethrin	<b>37,0</b>	<b>51,6</b>
		F3	malathion	1,6	2,0

O critério atualmente adotado no Brasil para classificar o *status* de suscetibilidade de *A. aegypti* ao temephos considera que as populações com RR<sub>95</sub> superiores a 3,0 são resistentes (Montella et al., 2007). Este critério foi empregado para avaliar as populações de Aracaju e Crato em relação aos outros inseticidas testados também. Os valores em negrito são indicativos de resistência. Em todos os casos, a cepa referência, Rockefeller, foi utilizada como controle de suscetibilidade. RR: razão de resistência. Para doses efetivas e intervalos de confiança, veja a Tabela S1.

**Tabela 2. Frequências alélicas e genotípicas de Kdr das populações de *Aedes aegypti* estudadas.**

população (geração)	frequências genotípicas						frequências alélicas		
	SS	SR1	SR2	R1R1	R1R2	R2R2	S	R1	R2
Aracaju (F0)	0,200	0,033	0,333	0,033	0,100	0,300	0,383	0,100	0,517
Crato (F2)	0,214	0,321	0,143	0,179	0,107	0,036	0,446	0,393	0,161

Os alelos S, R1 e R2 referem-se às posições 1016 e 1534 do gene  $Na_v$ : 1016 Val<sup>+</sup> / 1534 Phe<sup>+</sup> (S), 1016 Val<sup>+</sup> / 1534 Cys<sup>kdr</sup> (R1) e 1016 Ile<sup>kdr</sup> / 1534 Cys<sup>kdr</sup> (R2). A avaliação de cada população empregou 30 machos adultos individuais. Os dados de Aracaju foram apresentados anteriormente (Linss et al., 2014).



**Tabela 3. Alterações de atividade enzimática em populações brasileiras de *Aedes aegypti*.**

população	estágio	MFO	$\alpha$ -Est	$\beta$ -Est	$\rho$ npa-Est	GST	AChE *
Aracaju (F1)	larvar	9	<u>30</u>	<u>39</u>	<b>55</b>	<u>20</u>	4
	adulto	<b>87</b>	<b>75</b>	8	<u>32</u>	<u>36</u>	1
Crato (F2)	larvar	2	4	1	<u>22</u>	13	0
	adulto	0	<u>17</u>	0	<u>23</u>	<u>26</u>	<u>34</u>

As atividades enzimáticas populacionais foram classificadas como inalteradas (fonte regular), alteradas (fonte itálica e sublinhada) e altamente alteradas (em itálico e negrito), se, respectivamente, menos de 15, 15-50 ou mais de 50% dos indivíduos apresentaram atividades acima do ponto de corte correspondente ao percentil 99 de Rockefeller (Consulte Materiais e Métodos e Tabela S3 para mais detalhes). (\*) Atividade total da acetilcolinesterase.

**Tabela 4. Parâmetros de viabilidade das populações de *Aedes aegypti* de Aracaju e Crato, em comparação com a cepa Rockefeller.**

parâmetro	Rock X populações de campo		
	Rock	Aracaju	Crato
desenvolvimento larvar <sup>1</sup>	40,7 ± 11,2 <sup>a</sup>	17,7 ± 7,5 <sup>b</sup>	31,8 ± 8,7 <sup>a</sup>
eficácia de acasalamento <sup>2</sup>	297,8	240	240
aceitação do repasto sanguíneo <sup>3</sup>	95 <sup>a</sup>	79 <sup>b</sup>	89 <sup>a</sup>
quantidade de sangue ingerida <sup>4</sup>	1,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>a</sup>
taxa de fêmeas que ovipõem <sup>5</sup>	90,9 ± 2,7	86,7 ± 6,0	90,2 ± 5,7
ovos/fêmea <sup>6</sup>	107,6 ± 23,1 <sup>a</sup>	82,2 ± 31,6 <sup>b</sup>	103,4 ± 32,6 <sup>a</sup>
viabilidade dos ovos <sup>7</sup>	96,9 ± 2,0	95,8 ± 3,1	97,1 ± 2,2

A média ± desvio padrão dos ensaios são mostrados em todos os casos, com exceção da "eficiência da cópula" e da "taxa de aceitação do repasto sanguíneo". Para cada parâmetro, sempre que apropriado, as diferenças estatísticas são indicadas por letras sobrescritas ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup> desenvolvimento larvar é indicado pela taxa de pupas formadas até o 6º dia após a eclosão das larvas.

<sup>2</sup> eficácia de acasalamento é uma taxa que varia de zero a 300, que é diretamente proporcional à eficiência da cópula (de acordo com Belinato & Valle 2015). Consulte Métodos para maiores detalhes.

<sup>3</sup> aceitação do repasto sanguíneo reflete o percentual de fêmeas ingurgitadas, após 30 minutos de contato com as cobaias anestesiadas.

<sup>4</sup> quantidade de sangue ingerida refere-se ao peso relativo das fêmeas após / antes da alimentação sanguínea.

<sup>5</sup> percentual de fêmeas ingurgitadas que ovipõem.

<sup>6</sup> número médio de ovos colocados por fêmeas alimentadas com sangue, que colocam pelo menos um ovo.

<sup>7</sup> percentual de eclosão dos ovos.

## 1.9 Material suplementar

***Tabela S1. Alguns detalhes dos bioensaios com inseticidas realizados em populações de Aedes aegypti.***

população	estágio	geração	inseticida	unidade	CL/IE <sub>50</sub>	CL/IE <sub>95</sub>	intervalos de confiança		slope
							CL/IE <sub>50</sub>	CL/IE <sub>95</sub>	
Rockefeller 2012	larvar	-	temephos	mg/L	0,004	0,008	0,00331 < LC < 0,00382	0,00675 < LC < 0,00846	5,0
			diflubenzuron	µg/L	0,970	2,410	0,91806 < LC < 1,02526	2,25609 < LC < 2,57395	4,2
	adulto	-	deltamethrin	mg/m <sup>2</sup>	0,922	2,121	0,84267 < LC < 1,00946	1,86583 < LC < 2,41151	4,5
Aracaju/SE (2012)	larvar	F1	temephos	mg/L	0,040	0,098	0,03858 < LC < 0,04107	0,09273 < LC < 0,10286	4,2
		F1	diflubenzuron	µg/L	1,574	4,031	1,49646 < LC < 1,65528	3,64624 < LC < 4,45778	4,0
	adulto	F1	deltamethrin	mg/m <sup>2</sup>	13,145	37,784	12,4253 < LC < 13,9069	33,5690 < LC < 42,5283	3,6
		F2	malathion*	g/m <sup>2</sup>	0,294	0,522	0,27786 < LC < 0,31058	0,48529 < LC < 0,56057	6,6
Rockefeller 2013	larvar	-	temephos	mg/L	0,002	0,005	0,00200 < LC < 0,00216	0,00490 < LC < 0,00535	4,2
			diflubenzuron	µg/L	1,226	2,144	1,17311 < LC < 1,28204	2,01410 < LC < 2,28185	6,8
	adulto	-	deltamethrin	mg/m <sup>2</sup>	0,755	2,717	0,70248 < LC < 0,81079	2,36109 < LC < 3,12665	3,0
			malathion	g/m <sup>2</sup>	0,184	0,297	0,17744 < LC < 0,19100	0,28277 < LC < 0,31275	7,9
Crato/CE (2013)	larvar	F2	temephos	mg/L	0,048	0,332	0,04317 < LC < 0,05412	0,29850 < LC < 0,36883	2,0
		F2	diflubenzuron	µg/L	2,002	3,982	1,91585 < LC < 2,09109	3,70419 < LC < 4,27966	5,5
	adulto	F3	deltamethrin	mg/m <sup>2</sup>	27,912	140,201	25,5326 < LC < 30,5141	120,162 < LC < 163,581	2,3
		F3	malathion	g/m <sup>2</sup>	0,299	0,606	0,27089 < LC < 0,30218	0,56495 < LC < 0,64953	5,0

Resultados gerados por análises probit. Cada série de resultados com a cepa Rockefeller, realizada em 2012 ou 2013, foi comparada com uma população, avaliada em cada ano correspondente. Variações nas concentrações letais entre anos diferentes são comumente observadas, mesmo para a cepa suscetível de laboratório. Essas diferenças são provavelmente devidas a condições de criação ou a características intrínsecas de lotes de inseticidas específicos. Para superar essas diferenças, as comparações são realizadas entre amostras de campo e controle testadas no mesmo período (Braga et al 2004).

(\*) Os bioensaios de adultos com o malathion foram realizados exclusivamente em 2013 e foram comparados com os resultados de "Rockefeller 2013". LC: concentração letal. EI: inibição de emergência dos adultos. O intervalo de confiança 95% é mostrado.

**Tabela S2. Frequências alélicas e genotípicas das substituições do gene *Na<sub>v</sub>* de *Aedes aegypti*.**

Na <sub>v</sub> Kdr sítios	frequência	população	
		Aracaju	Crato
1534	alélica	0,6170	0,552
	genotípica	0,4330	0,310
1016	alélica	0,5170	0,172
	genotípica	0,3000	0,034

A tabela mostra as mutações nas posições 1016 e 1534, separadamente.

**Tabela S3. Quantificação das atividades enzimáticas relacionadas a AChE, o sítio-alvo dos organofosforados, e à resistência metabólica, nas populações brasileiras de *Aedes aegypti*.**

estágio	população / cepa	MFO (nmoles de citocromo/mg ptn)				α-Est (nmol/mg ptn/min)				β-Est (nmol/mg ptn/min)				p npa-Est (D Abs/mg ptn/min)				GST (mmol/mg ptn/min)				AChE (Abs/mg ptn/hora)			
		n <sup>1</sup>	med <sup>2</sup>	p99 Rock <sup>3</sup>	% > p99 Rock <sup>4</sup>	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock	n	med	p99 Rock	% > p99 Rock
larvar	Rock	172	35,57	67,48		178	13,67	22,24		163	19,56	31,19		173	2,47	4,19		153	0,47	0,94		179	0,05	0,08	
	Aracaju	137	43,23		9	137	19,22		30	137	28,5		39	132	4,4		55	137	0,71		20	137	0,07		8
adulto	Rock	137	28,05	44,97		154	5,49	7,58		153	6,33	10,77		83	3,2	6,39		100	0,66	1,07		155	0,12	0,22	
	Aracaju	39	56,68		87	118	8,73		75	118	7,67		8	111	5,73		32	111	0,93		36	117	0,15		1
larvar	Rock	283	32,25	67,41		289	13,55	23,35		274	21,31	46,15		265	2,59	4,49		264	0,57	1,24		260	0,02	0,11	
	Crato	91	31,52		2	92	14,36		4	92	28,14		1	91	3,78		22	92	0,75		13	92	0,06		0
adulto	Rock	135	101,04	181,8		312	5,6	8,38		313	6,91	11,00		300	3,06	5,10		311	0,91	1,32		309	0,12	0,17	
	Crato	55	63,79		0	174	7,01		17	173	6,45		0	161	4,3		23	163	1,15		26	174	0,15		34

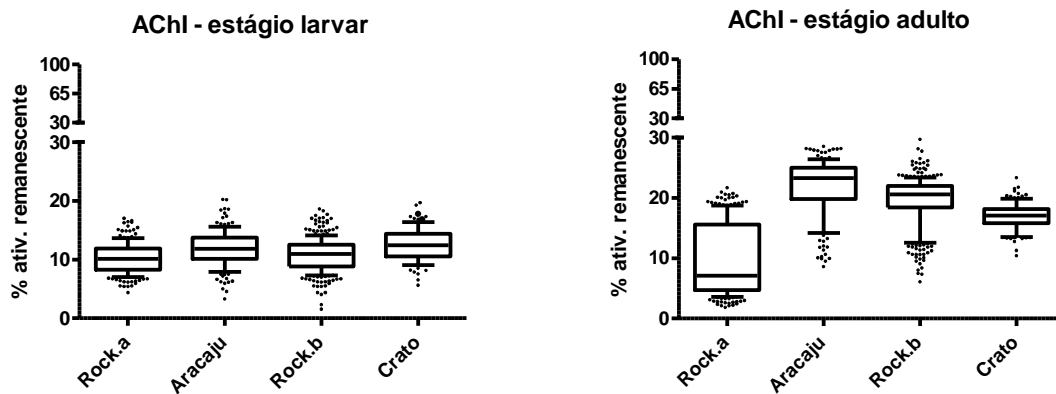
As atividades enzimáticas foram classificadas como inalteradas (em verde), alteradas (em amarelo) e altamente alteradas (em rosa), se, respectivamente, menos de 15, entre 15 e 50 ou mais de 50% dos indivíduos apresentassem atividades acima do valor correspondente ao percentil 99 de Rockefeller (de acordo com o critério de classificação de Montella et al., 2007). Uma vez que estes ensaios foram realizados em diferentes períodos, são apresentados dois conjuntos de dados da cepa Rockefeller, cada um utilizado para calibrar uma população. Os ensaios bioquímicos empregaram espécimes F1 de Aracaju e F2 de Crato.

<sup>1</sup> Número de espécimes avaliados.

<sup>2</sup> Mediana das atividades enzimáticas.

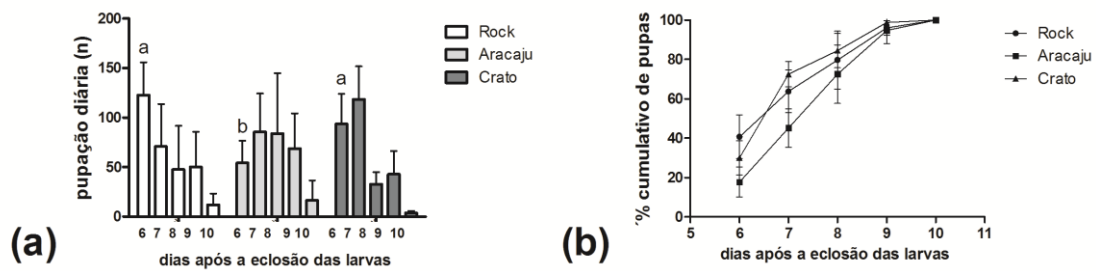
<sup>3</sup> valor do percentil 99 da cepa Rockefeller.

<sup>4</sup> Taxa da população com atividade superior ao percentil 99 de Rockefeller.



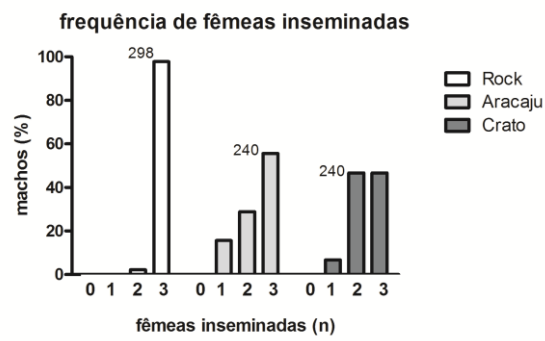
**Figura S1. Perfis de inibição da atividade da acetilcolinesterase.**

Os gráficos do tipo 'box plot' mostram a atividade remanescente da AChE derivada dos ensaios com o carbamato inibidor, propoxur, realizado de acordo com a OMS com larvas ou adultos individuais. Cada caixa indica os quartis dos perfis de distribuição, a linha horizontal dentro da caixa representa a mediana e as linhas verticais externas apontam para os percentis 10 e 90. Os pontos correspondem a espécimes individuais fora desse intervalo. Rock.a e Rock.b são os controles de, respectivamente, amostras de Aracaju e Crato. De acordo com o critério de classificação da OMS, após a adição do propoxur, atividade remanescente inferior a 30% indica AChE suscetível à inibição por inseticidas (Hemingway, 1998).



**Figura S2. Tempo de desenvolvimento larvar.**

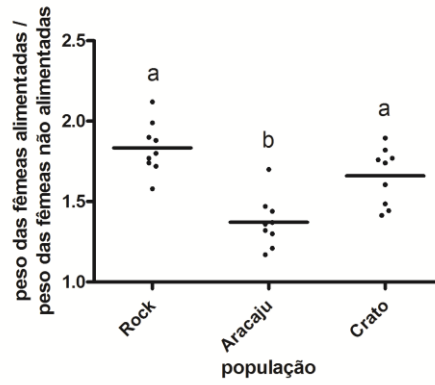
**(a) Taxa diária de desenvolvimento larvar de *Aedes aegypti*.** Em todos os casos, as médias e os desvios padrão de 3 ensaios, cada um com 3 réplicas de 300 larvas do vetor, são mostrados. As diferenças estatísticas são indicadas pelas letras sobscritas ( $p < 0,05$ ). **(b) Desenvolvimento cumulativo da larvas de *Aedes aegypti*.** A média e o desvio padrão da formação da pupas são indicados.



**Figura S3. Eficiência de cópula.**

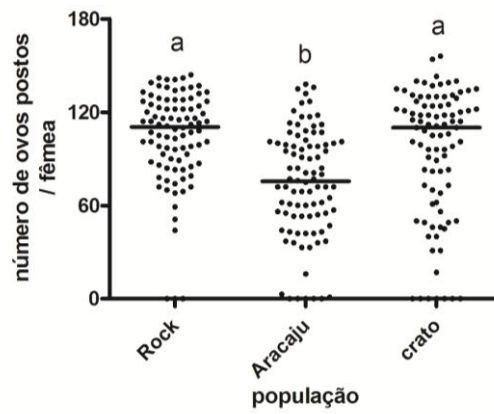
Freqüência de inseminação de fêmeas de *Aedes aegypti* em condições de confinamento. Em todos os casos, trinta amostras, cada qual contendo um macho e três fêmeas, todos virgens, foram mantidas juntas durante três dias em tubos transparentes. As espermatecas de todas as fêmeas foram então examinadas quanto à presença de esperma. O índice de "desempenho reprodutivo" é mostrado acima das distribuições.





**Figura S4. Relação entre o montante de sangue ingerido e o peso corporal de fêmeas de *Aedes aegypti*.**

Cada ponto representa a diferença entre um *pool* (constituído por 10 espécimes) pesado depois do repasto sanguíneo e outro *pool* (com 10 fêmeas diferentes) pesado antes da alimentação sanguínea. Linhas horizontais indicam a média de cada distribuição. As diferenças estatísticas são indicadas por letras sobrescritas ( $p < 0,05$ ).



**Figura S5. Números absolutos de postura.**

Cada ponto indica o número de ovos colocados por uma fêmea de *Aedes aegypti* individual. Linhas horizontais representam as medianas das distribuições. As diferenças estatísticas são indicadas por letras sobrescritas ( $p < 0,05$ ).

## **CAPÍTULO 2. SELEÇÃO EM LABORATÓRIO DE DUAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Aedes aegypti* COM O ORGANOFOSFORADO MALATHION: QUANTIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA E AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS**

Neste estudo foram usadas as populações caracterizadas no capítulo anterior. Este bloco de resultados descreve um processo de seleção, em laboratório, com o malathion. Este OP foi progressivamente introduzido como adulticida no país desde 2009 (MS-SVS 2009d). A seleção foi feita com larvas, por questões operacionais, assim como já realizado em vários outros procedimentos de seleção em laboratório com adulticidas (ver Discussão; González et al. 1996, Bisset et al. 1998, Hidayati et al. 2005, Rodríguez et al. 2005, Selvi et al. 2010, Hidayati et al. 2011, David et al. 2014).

Foi utilizada uma dose única de malathion, capaz de provocar a mortalidade de 80% dos espécimes na primeira geração. O procedimento foi repetido até que a mortalidade tivesse sido reduzida para menos de 20%, o que aconteceu depois de cinco gerações. Para cada população foram acompanhadas três réplicas experimentais e duas réplicas controle (sem pressão de seleção), todas mantidas de forma isolada umas das outras.

Ao final do processo a resistência de larvas e adultos ao malathion foi quantificada. Foi também avaliado o *status* de resistência de todas as réplicas aos principais inseticidas empregados no controle de *A. aegypti* no país: os larvicidas temephos e diflubenzuron e o adulticida deltametrina. A análise de todos os bioensaios foi feita utilizando-se dois critérios: a comparação com as concentrações letais equivalentes de uma população suscetível, de referência (Rockefeller), como é feito rotineiramente, e comparação com os valores das populações originais, antes do processo de seleção (dados apresentados na seção Resultados, Capítulo 1).

Além disso, os principais mecanismos potencialmente envolvidos com a resistência foram avaliados: a resistência metabólica e alterações na

acetilcolinesterase e no canal de sódio regulado por voltagem, alvos, respectivamente, de OP e PI.

Em todos os casos foram usados bioensaios, ensaios bioquímicos e moleculares normalmente empregados na rotina do monitoramento da resistência a inseticidas de populações de *A. aegypti*.

## 2.1 Justificativa

Ainda que várias populações brasileiras de *A. aegypti* tenham sido classificadas como resistentes aos OP, o inseticida empregado nestas avaliações não foi malathion, e sim o fosforotionato temephos, que vinha sendo usado no Brasil como larvicida desde 1967. Em 2000 o temephos foi substituído por *Bti* nos municípios onde a resistência ao composto havia sido detectada, até que seu uso começou a ser descontinuado em todo o território nacional, a partir de 2009 (Valle et al. 2015, MS-SVS 2009c). Adicionalmente, a detecção de resistência ao OP temephos motivou também a troca da classe inseticida usada no controle de mosquitos adultos, até então também OP. Nesse contexto, a partir do ano 2000 foram usados PI para o controle de adultos de *A. aegypti* (Braga & Valle 2007). Entretanto, muito pouco tempo depois, várias populações naturais do vetor apresentaram alterações de suscetibilidade aos PI (da-Cunha et al. 2005, Martins et al. 2009). Identificou-se, à época, a necessidade de trocar a classe de inseticida usada no controle dos adultos do vetor.

Uma vez que a OMS recomenda apenas cinco compostos para uso em ultra baixo volume, dos quais quatro são PI, a única alternativa que restou ao governo brasileiro (que usa apenas os compostos atestados pela OMS, como sendo seguros a saúde humana) foi o uso do OP malathion (OMS 2012). Este, apesar de também pertencer à classe dos OP, tem estrutura marcadamente diferente do temephos, pois além de ser alifático, é um fosforoditioato, apresentando dois enxofres ligados ao átomo de fósforo central, ao invés de apenas um (Introdução, Figura 1; Bloomquist 2009). Estas diferenças estruturais têm sido importantes do ponto de vista do controle, pois parecem elicitar mecanismos de resistência distintos, assim como ocorre no gênero

*Anopheles*, por exemplo (Hemingway & Ranson 2000, Karunaratne & Hemingway 2001).

De fato, ensaios iniciais demonstraram suscetibilidade de populações naturais brasileiras de *A. aegypti* ao malathion (Laficave, dados não publicados), o que, de certa forma, validou seu uso como inseticida de escolha para o controle dos adultos. Sendo assim, a antecipação de um suposto evento de resistência a malathion, assim como a elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos, seria de grande valor para a definição de estratégias racionais que prolonguem seu uso como alternativa viável para o controle dos espécimes adultos de *A. aegypti* no Brasil. Nesse sentido, foram escolhidas duas populações naturais do vetor já sabidamente resistentes a OP, sendo uma delas proveniente de uma região do país que apresenta níveis de resistência para temephos excepcionalmente altos, o que pode sugerir mecanismos de resistência distintos daqueles presentes no restante do país.

## **2.2 Materiais e métodos**

### **2.2.1 Coleta e obtenção de populações de campo**

A coleta de ovos de *A. aegypti* das populações de campo foi feita por meio de ovitrampas, de modo a representar todo o município a ser avaliado (Braga et al. 2000, Lima et al. 2003). No laboratório, as colônias foram iniciadas com 349 ovitrampas positivas obtidas de Aracaju/SE em 2012, e 272 paletas positivas de Crato/CE, em 2013 (Viana-Medeiros et al. 2017; Resultados, Capítulo 1). Os ovos foram postos a eclodir e as larvas, criadas por meio de procedimento rotineiramente utilizado (Viana-Medeiros 2011). Os adultos de *A. aegypti* resultantes foram então identificados, selecionados e utilizados para a obtenção de ovos da geração F1. O objetivo inicial era fazer o procedimento da seleção com espécimes da geração F1 de ambas as populações. No entanto a quantidade de ovos, no caso das duas populações, não foi suficiente para suprir tal demanda, e por isto foram usados espécimes da geração F2.

### **2.2.2 Bioensaios**

Ensaio funcionais do tipo dose-resposta foram realizados para quantificar a resistência das populações de campo, neste caso, frente aos principais inseticidas usados no controle de *A. aegypti* no Brasil pelo Ministério da Saúde, até o ano de 2013, quando a última coleta foi feita. Os bioensaios de larvas com temephos seguiram os parâmetros e procedimentos descritos pela OMS (OMS 1981), e os bioensaios com DFB foram feitos de acordo com Martins et al. 2008. Os testes de adultos com PI e com malathion foram realizados de acordo com adaptação de metodologia que usa papéis impregnados com inseticidas (OMS 2006, Maciel-de-Freitas et al. 2014). Em todos os casos, para cada população foram feitos de três a quatro testes, em dias diferentes, sendo também feitos ensaios simultâneos com a cepa referência de suscetibilidade a inseticidas Rockefeller (Kuno 2010), o que serviu como um controle interno dos ensaios. Cada bioensaio consistiu na exposição dos espécimes a um espectro de pelo menos oito concentrações de inseticida. Larvas foram expostas a temephos por 24 horas e ao DFB até a morte ou emergência do último espécime adulto do grupo controle. Adultos foram expostos a deltametrina ou a malathion por 1 hora e então transferidos para uma câmara de recuperação, sem inseticida, onde permaneceram por mais 24 horas.

Para os inseticidas neurotóxicos, após a leitura de mortalidade, as concentrações letais (CL) foram calculadas com o auxílio do software Polo-PC (LeOra Software, Berkeley, CA) por análise probit (Raymond 1985). Os resultados dos ensaios quantitativos foram expressos de duas formas (ver esquema abaixo): (a) como a razão de resistência (RR) entre a CL do grupo experimental sob teste e a CL equivalente de Rockefeller ('Rock RR'); e também (b) tendo como base a CL equivalente da população de campo, na geração com a qual foi iniciado o experimento ('Parental RR'). Os bioensaios com DFB foram avaliados de forma semelhante, mas com o cálculo de inibição da emergência de adultos (Rock IE e Parental IE), e não de mortalidade de larvas (ver esquema abaixo).

$$\text{Rock RR} = \frac{\text{CL/IE grupo experimental}}{\text{CL/IE Rock}}$$

$$\text{Parental RR} = \frac{\text{CL/IE grupo experimental}}{\text{CL/IE inicial população}}$$

O critério previamente validado para classificar o *status* de resistência ao temephos em populações brasileiras de *A. aegypti* (Montella et al. 2007) foi também aplicado aos outros inseticidas avaliados neste estudo. De acordo com este critério, as populações com RR<sub>95</sub> superior a 3,0 são classificadas como resistentes, e há recomendação de substituição das atividades de controle químico em campo.

Foi também avaliado o '*slope*' que é um parâmetro reconhecido como uma medida de heterogeneidade das amostras: quanto maior o *slope*, mais homogênea é a população.

### **2.2.3 Seleção com o OP malathion**

Embora malathion seja um adulticida, optou-se por fazer a seleção com larvas das populações de campo escolhidas, por questões operacionais, que foram: a vantagem de expor, de forma similar, todos os espécimes; e a possibilidade de poder trabalhar com exposição contínua (ver detalhamento adiante). Pensou-se em utilizar uma dose capaz de matar, na primeira geração trabalhada, cerca de 80% de espécimes. Esta mesma dose seria mantida por várias gerações, até que a mortalidade fosse de apenas 20%. Foram feitas três réplicas biológicas da seleção (S1, S2 e S3), por população, sem troca de espécimes entre as réplicas. Para cada população havia ainda dois grupos controle (C1 e C2), mantidos simultaneamente nas mesmas condições, mas sem qualquer contato com inseticida.

No entanto, para definir as doses a serem empregadas na seleção, não foi possível usar diretamente as CL: nos bioensaios de produtos neurotóxicos com larvas, as CL são avaliadas depois de exposição por apenas 24 horas. Na tentativa de encontrar relação entre CL (24 horas) e mortalidade decorrente de exposição contínua, foram feitos ensaios prévios com a cepa Rockefeller. Nestes ensaios de exposição contínua ao malathion foram utilizadas bacias

contendo 1 L de água desclorada, 1 g de ração para gatos (Friskies, Purina/Camaquã/RS), e 500 larvas L3/L4, mantidas continuamente a 26°C (em B.O.D.), até a emergência dos adultos. Nestas condições, verificou-se 80% de mortalidade após exposição contínua à CL<sub>20</sub> obtida no ensaio regular, com exposição ao inseticida por 24 horas.

Apesar deste resultado com Rockefeller, exposição da população de Aracaju a sua CL<sub>20</sub> obtida no ensaio regular, nas mesmas condições descritas acima (até a emergência dos adultos), resultou em mortalidade de apenas 5,4%. Para Crato não houve qualquer mortalidade, apenas atraso de três dias no desenvolvimento das larvas.

Optou-se então por diminuir a quantidade de larvas expostas, o tamanho e o volume final das bacias. As CL 20, 40 e 60 foram testadas em grupos de 100 larvas L3/L4 em bacias cilíndricas (10 x 12 cm) contendo 250 mL. Estas condições foram reproduzidas na seleção propriamente dita.

Para as populações de Aracaju e Crato foram usados respectivamente 5.400 e 12.300 espécimes da primeira geração submetida à seleção, que foi a F2. Para Aracaju, a CL<sub>20</sub> (0,06229 mg/L, IC 0,05935 a 0,06538), mantida até a emergência dos adultos nas novas condições experimentais, gerou mortalidade de 80%. A população de Crato foi exposta à CL<sub>60</sub> (0,09876 mg/L, IC 0,09581 a 0,10181), que resultou na mortalidade de 88% dos espécimes.

Os adultos sobreviventes foram alimentados e usados para produção de ovos. A partir daí a seleção procedeu, com as mesmas concentrações de malathion, usando 3.000 larvas por réplica.

Os mosquitos adultos foram mantidos em gaiolas cilíndricas de papelão (medindo 17 x 18 cm), e alimentados *ad libitum* (exceto antes do repasto sanguíneo) com solução açucarada a 10%, repostada três vezes por semana. Para obtenção de ovos, as fêmeas foram privadas da solução açucarada por 18-24 horas, sendo então ofertada alimentação sanguínea em cobaios anestesiados (Hawk & Leary 1999). Tal alimentação sanguínea foi feita de acordo com as diretrizes brasileiras (Filipecki et al. 2011), por meio de protocolo aprovado pela “Comissão de Ética no Estudo de Animais” (CEUA/Fiocruz 2008), licenças L-011/09 e LW-20/14. Foram feitas quatro alimentações sanguíneas visando a obtenção de ovos. O número de espécimes expostos à seleção foi calculado não somente para garantir representatividade das



amostras, mas também para permitir que houvesse material suficiente para todos os ensaios necessários (cerca de 1.000 espécimes por bioensaio, além de cerca de 2.000 espécimes para todos os ensaios bioquímicos e moleculares).

Ao final de cinco gerações de seleção em laboratório, as amostras selecionadas alcançaram mortalidade inferior a 20% na presença do inseticida, e o experimento foi finalizado.

#### **2.2.4 Ensaios de genotipagem**

A pesquisa por mutações *kdr* no gene  $Na_V$  das amostras pós-seleção foi feita usando o método de TaqMan, assim como descrito para os mosquitos parentais de Aracaju (Linss et al. 2014). Em cada grupo experimental, foram usados 30 machos individuais da geração F7 de Aracaju S1-S3, e C1 e C2 e, para Crato, da geração F7 para S1-S3, e F6 para C1 e C2. Foram feitas reações independentes para a avaliação das substituições Val1016Ile e Phe1534Cys. Para cada posição, foi usado 1  $\mu$ l, equivalendo a 0,5% do conteúdo de DNA extraído de cada espécime, em uma reação que tinha 10  $\mu$ l de volume final. Os genótipos individuais, bem como as frequências alélicas e genotípicas de cada população, foram calculados com base nas variações nas posições 1016 e 1534, ambas dentro do mesmo gene (Linss et al. 2014).

#### **2.2.5 Ensaios bioquímicos**

Fêmeas adultas de um dia de idade foram avaliadas de acordo com metodologia descrita por Valle et al. (2006), com base nas recomendações do Centro de Controle e Prevenção de Doenças americano (CDC) e da OMS (CDC 1998, Hemingway 1998). O mesmo protocolo, com algumas adaptações, foi aplicado às larvas (Viana-Medeiros 2011). As atividades de MFO, EST e GST foram quantificadas. Foram empregados três substratos para EST: acetatos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -naftil, e de  $p$ -nitrofenil, relativos às atividades denominadas, respectivamente, de  $\alpha$ -EST,  $\beta$ -EST e  $p$ NPA-EST.

Para Acetilcolinesterase (Ace), sítio-alvo de OP, foram feitos ensaios tanto de atividade total (AChE) como de atividade inibida (AChI) por propoxur, um CB.

Para o cálculo das atividades enzimáticas específicas, o conteúdo de proteína total de cada amostra foi quantificado utilizando o reagente para proteínas da marca Bio-Rad (número de catálogo: 500-0006), que se baseia no método de Bradford (Bradford 1976). Para todas as enzimas foram realizados pelo menos três ensaios, em dias diferentes, cada um com 40 espécimes individuais da população sob teste e cinco espécimes da cepa Rockefeller (sendo estes também considerados controles das reações enzimáticas).

As atividades enzimáticas foram classificadas essencialmente de acordo com critério estabelecido anteriormente por nosso grupo: após o cálculo do percentil 99 de Rockefeller, a taxa de espécimes acima deste valor foi estimada para cada enzima e população. As atividades foram classificadas como normais, alteradas ou muito alteradas nos casos em que esta taxa foi, respectivamente, inferior a 15, entre 15 e 50, ou acima de 50% (Montella et al. 2007). Além disso, foi avaliado o índice de 'Alteração Bioquímica Global' (ABG) que é o cálculo, para cada população, da média das alterações de atividade em todas as classes de enzimas (excetuando-se AChI).

Vale ressaltar que, especificamente para o ensaio de inibição da Ace com propoxur (AChI), existe um critério da OMS que estabelece que atividade remanescente superior a 30% é indicativa de resistência a inseticidas OP (Hemingway 1998). Para esta avaliação, é usual a comparação gráfica entre os perfis de inibição da atividade das populações de interesse e de Rockefeller. Nesse sentido, na Figura 2.2, os termos Rock.a e Rock.b representam, respectivamente, os perfis de Rockefeller usados no cálculo das alterações bioquímicas (em anos diferentes; ver Resultados, Capítulo 1 - Tabela S1) acrescidos dos controles dos ensaios de Aracaju e Crato (cinco espécimes de Rockefeller avaliados simultaneamente a cada ensaio enzimático).

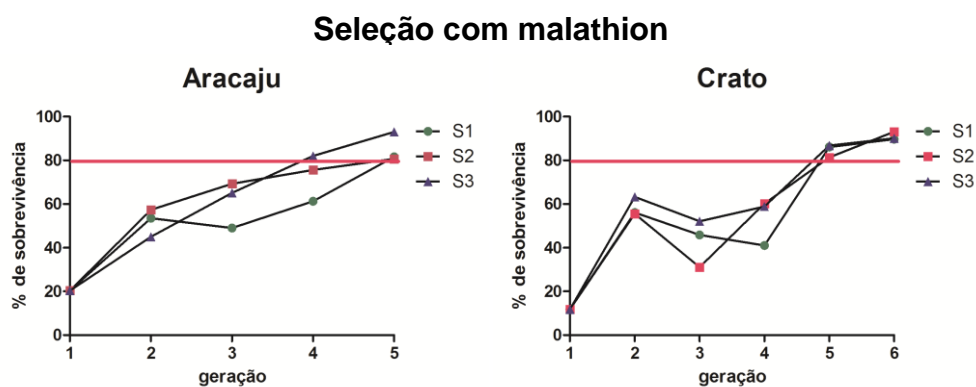
## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 Seleção**

A seleção foi feita com uma dose fixa de malathion, adicionada às larvas de terceiro estágio e mantida continuamente até a pupação. O procedimento resultou em sobrevivência de 20,4 e 11,8% dos indivíduos da geração inicial das populações de Aracaju e Crato, respectivamente. A seleção prosseguiu até que a mortalidade fosse inferior a 20%.

A cada geração, observou-se aumento mais regular da sobrevivência de Aracaju em comparação com Crato ( $R^2 = 0,8623$ ;  $0,8264$  e  $0,9803$ ; para S1, S2 e S3 de Aracaju; e  $R^2 = 0,6191$ /S1;  $0,7099$ /S2 e  $0,714$ /S3 de Crato). No entanto, as duas populações alcançaram o limiar de 80% de sobrevivência, definido como o momento de interrupção da seleção, na quinta geração. Este limiar está indicado por uma linha rosa nos gráficos da Figura 2.1, que mostra os percentuais de sobrevivência ao longo do experimento de pressão seletiva.

As avaliações do potencial impacto da seleção em laboratório foram feitas na quinta geração. No entanto, a título de confirmação, para a população de Crato, a exposição ao malathion foi repetida com a geração posterior, quando se detectou 90,9% de sobrevivência.



**Figura 2.1.** Taxa de sobrevivência de duas populações de *Aedes aegypti* submetidas à seleção com uma dose fixa de malathion, de forma contínua, entre as fases L3 e de pupa. Para as duas populações as avaliações pós-seleção foram feitas na quinta geração.

### **2.3.2 Status de resistência das populações selecionadas**

Como mencionado acima, os impactos da seleção com malathion e da adaptação à criação em laboratório foram avaliados de duas maneiras:

calculando-se a RR tendo como base a cepa referência de suscetibilidade, Rockefeller ('Rock RR'), ou a geração inicial das populações naturais do estudo ('Parental RR'). Em alguns casos, como prevíamos, foram observados resultados discrepantes entre as duas avaliações, feitas a partir de valores de referência diferentes. Para permitir comparação direta, os resultados das avaliações iniciais, pré-seleção (Resultados, Capítulo 1; Viana-Medeiros et al. 2017) também estão mostrados.

Na Tabela 2.1, os resultados ressaltados em rosa nas colunas 'Rock RR' indicam resistência ao malathion quando se emprega o critério de classificação estipulado pelo MS, previamente definido para o OP temephos (ver Materiais e Métodos, item 'bioensaios').

As duas abordagens analíticas (Rock RR e Parental RR) apontaram a efetividade da seleção em laboratório promovida no estudo: (a) as RR ('Rock' e 'Parental') aumentaram nas larvas de praticamente todos os grupos selecionados (sendo inclusive classificadas como resistentes ao malathion em todos estes, no caso da comparação com Rockefeller - critério Rock RR<sub>95</sub>); (b) em Crato, a pressão seletiva repercutiu no estágio adulto a ponto de este também ser classificado como resistente depois da seleção, quando se empregou o critério Rock RR<sub>95</sub>. Além disso, de maneira geral, os grupos mantidos separadamente se comportaram de forma equivalente nas duas populações.

**Tabela 2.1. Razões de resistência de larvas e adultos de *A. aegypti* de Aracaju/SE e Crato/CE ao malathion.**

população	geração	malathion (larvas)					malathion (adultos)				
		Rock	Rock	Parental	Parental	slope	Rock	Rock	Parental	Parental	slope
		RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>	RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>		RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>	RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>	
Aracaju	F1	2,6	2,9	1,0	1,0	4,7	1,6	1,8	1,0	1,0	6,6
Aracaju C1	F7	2,4	2,6	1,3	1,1	5,8	1,7	2,4	1,1	1,2	5,6
Aracaju C2		2,3	2,5	1,2	1,0	5,5	1,6	2,6	1,0	1,3	4,9
Aracaju S1		2,4	3,1	1,3	1,3	4,6	1,8	2,4	1,2	1,2	6,5
Aracaju S2		3,5	4,0	1,8	1,7	5,2	2,0	2,7	1,3	1,3	6,3
Aracaju S3		2,9	3,8	1,5	1,6	4,3	1,9	2,4	1,2	1,2	7,1
Crato	F2	2,4	2,8	1,0	1,0	4,3	1,6	2,0	1,0	1,0	5,0
Crato C1	F6	2,3	2,6	1,3	1,1	5,1	1,8	2,7	1,1	1,1	5,4
Crato C2		2,2	2,5	1,2	1,1	5,2	1,9	2,5	1,2	1,1	6,1
Crato S1		5,3	5,9	3,0	2,5	5,6	2,5	3,2	1,5	1,4	6,5
Crato S2	F7	4,7	5,1	2,7	2,2	5,6	2,5	3,7	1,6	1,6	5,2
Crato S3		4,8	5,3	2,7	2,3	5,5	2,3	3,4	1,4	1,4	5,2

Estão indicados os resultados das populações originais e das amostras após seleção de larvas com malathion (S1-S3) ou simplesmente depois de manutenção em laboratório, na ausência de inseticida (C1, C2). Adotando-se o critério validado para Rock RR de temephos no Brasil (Montella et al. 2007, Valle et al. 2015), populações com RR<sub>95</sub> menor que 3,0 são classificadas como inalteradas (em verde), e aquelas com valores superiores, são indicativas de alteração de suscetibilidade (em rosa). Rock RR: razão de resistência tendo como base as CL da cepa Rockefeller. Parental RR: razão de resistência tendo como base as CL iniciais das populações sob teste. C: grupo controle. S: grupo selecionado. *Slope*: inclinação da reta formada quando se constrói gráfico 'concentração inseticida X mortalidade'; este valor é usado como indicador de heterogeneidade das amostras.

Por outro lado, os grupos mantidos sem inseticida, no laboratório, apresentaram resultados diferentes dependendo do critério de comparação: (a) no estágio larvar, houve discreta redução das 'Rock RR' para malathion (que já eram baixas); (b) contudo, houve aumento nas 'Rock RR' dos adultos; (c) também foi identificado ligeiro aumento das 'Parental RR' em ambos os estágios avaliados, larvas e adultos. Resta definir, contudo, qual a significância, estatística e biológica, dos valores encontrados.

As diferenças entre as 'Parental RR' parecem mais sutis do que as alterações observadas nas 'Rock RR'. No entanto, racionalizamos que as taxas 'Parental RR' permitem visualizar de forma mais direta a amplitude das alterações, em relação a cada população original.

A análise dos *slopes* evidenciou que em praticamente todos os casos os grupos mantidos no laboratório, com ou sem pressão de seleção, diminuíram sua heterogeneidade (maiores valores de *slope*), quando comparados com as populações originais, de campo (Tabela 2.1; ANEXO B - Tabelas B1 e B2).

A seleção com malathion não parece ter induzido resistência cruzada com temephos, outro OP. Esta situação era, de certa forma, esperada, considerando as estruturas moleculares dos dois inseticidas (Introdução, Figura 1) e outros relatos da literatura (Hemingway e Karunaratne 1998, Hemingway e Ranson 2000, Li et al. 2007). Este fenômeno é percebido quando se compara as 'Rock RR' (Tabela 2.2 e ANEXO B - Tabela B3). A redução dos índices de resistência foi mais marcada em Crato, a população inicialmente mais resistente ao temephos.

Ainda em relação à avaliação de temephos com a Rock RR, a simples manutenção em laboratório (grupos C) parece ter reduzido levemente a resistência inicial das populações - o que também era esperado, uma vez que em geral este é o resultado quando se elimina a pressão de seleção. A redução da resistência a temephos parece ter sido mais acentuada nos grupos selecionados com malathion do que nos grupos controle, o que foi inesperado. Entretanto, é necessário confirmar a significância funcional destes dados.

Por outro lado, as avaliações usando 'Parental RR' apontam um cenário diferente: nos grupos selecionados com malathion não parece ter havido qualquer modificação do *status* original de resistência a temephos, em relação à população original. No entanto, a simples manutenção em cativeiro (grupos controle) parece ter aumentado discretamente os valores de RR para temephos. Isto então não seria consequência da seleção com malathion, mas simplesmente reflexo da manutenção em cativeiro.

A análise dos *slopes* dos bioensaios com temephos demonstra que, ao final do experimento, de maneira geral, as amostras de ambas as populações tenderam a ficar levemente mais homogêneas. Além disso, chama a atenção que todos os valores de Crato são marcadamente menores que os de Aracaju, sugerindo maior heterogeneidade daquela população. No entanto, a variabilidade entre os *slopes* das réplicas foi muito grande, o que dificulta a análise de tendências.

**Tabela 2.2. Razões de resistência ao temephos, em larvas de *A. aegypti* de Aracaju e Crato, após seleção com malathion e manutenção em laboratório.**

população	geração	temephos				slope
		Rock RR <sub>50</sub>	Rock RR <sub>95</sub>	Parental RR <sub>50</sub>	Parental RR <sub>95</sub>	
Aracaju	F1	<b>11,2</b>	<b>12,9</b>	1,0	1,0	4,2
Aracaju C1		<b>8,7</b>	<b>11,5</b>	1,2	1,0	5,2
Aracaju C2		<b>8,3</b>	<b>12,9</b>	1,1	1,1	4,2
Aracaju S1	F7	<b>5,8</b>	<b>9,6</b>	0,8	0,8	4,0
Aracaju S2		<b>7,5</b>	<b>10,3</b>	1,0	0,9	4,9
Aracaju S3		<b>8,5</b>	<b>11,8</b>	1,1	1,0	4,8
Crato	F2	<b>23,2</b>	<b>64,8</b>	1,0	1,0	2,0
Crato C1	F6	<b>19,2</b>	<b>43,9</b>	2,1	1,1	2,9
Crato C2		<b>13,5</b>	<b>40,4</b>	1,5	1,0	2,4
Crato S1	F7	<b>8,1</b>	<b>26,6</b>	0,9	0,7	2,3
Crato S2		<b>9,1</b>	<b>45,7</b>	1,0	1,2	1,8
Crato S3		<b>12,4</b>	<b>44,3</b>	1,4	1,1	2,2

Legendas e siglas como na Tabela 2.1

Na época em que se iniciou o estudo, o diflubenzuron havia sido introduzido há pouco para o controle de larvas no país. Trata-se de um regulador do desenvolvimento dos insetos, tendo, com isso, mecanismo de ação distinto dos neurotóxicos classicamente utilizados. Por isso o cálculo das RR, neste caso, emprega os índices de inibição da emergência de adultos (IE), e não as concentrações letais usadas nos ensaios com inseticidas neurotóxicos. Em relação ao DFB, todos os índices 'Rock RR' obtidos foram considerados baixos e compatíveis com o *status* de suscetibilidade (Tabela 2.3, que resume os resultados dos bioensaios com DFB, e ANEXO B - Tabela B4, que os detalha).

Ainda que todas as amostras tenham sido classificadas como suscetíveis ao DFB, os dois critérios de avaliação apontam conclusões distintas. Enquanto a análise 'Rock RR' mostra tendência de discreta redução dos valores de RR nos grupos controle e manutenção dos valores originais nos grupos selecionados, a análise 'Parental RR' parece indicar valores levemente maiores em todos os grupos selecionados.

A análise dos *slopes* sugeriu, de maneira geral, que as amostras das duas populações tenderam a ficar mais homogêneas em resposta à manutenção em cativeiro, independente da seleção (Tabela 2.3).

**Tabela 2.3. Razões de resistência ao diflubenzuron, em larvas de *A. aegypti* de Aracaju e Crato, após seleção com malathion e manutenção em laboratório.**

população	geração	diflubenzuron				slope
		Rock RR <sub>50</sub>	Rock RR <sub>95</sub>	Parental RR <sub>50</sub>	Parental RR <sub>95</sub>	
Aracaju	F1	1,6	1,7	1,0	1,0	4,0
Aracaju C1	F7	1,4	1,3	1,5	1,0	7,8
Aracaju C2		1,2	1,6	1,4	1,2	4,8
Aracaju S1		1,4	1,8	1,5	1,4	4,4
Aracaju S2		1,4	1,6	1,5	1,2	5,7
Aracaju S3		1,6	1,9	1,7	1,4	4,9
Crato	F2	1,6	1,8	1,0	1,0	5,5
Crato C1	F6	1,3	1,3	1,1	1,0	6,3
Crato C2		1,2	1,2	1,0	0,9	6,3
Crato S1	F7	1,5	1,8	1,3	1,4	4,8
Crato S2		1,8	1,7	1,5	1,2	8,0
Crato S3		1,6	1,7	1,4	1,2	6,3

Legendas e siglas como na Tabela 2.1.

Em relação à deltametrina, todas as amostras foram consideradas muito resistentes (a Tabela 2.4 resume os resultados e ANEXO B - Tabela B5, os detalha).

De maneira inesperada, a manutenção em laboratório exacerbou os níveis de resistência a PI dos grupos controle, nas duas populações do estudo. Isto foi observado com os dois critérios de análise, 'Rock RR' e 'Parental RR'. Este efeito, no entanto, não foi observado nos grupos selecionados com malathion. Nestes, ao contrário, e principalmente em Crato, a resistência a deltametrina, de modo geral, parece ter diminuído.

Ao contrário dos ensaios anteriores, houve tendência de aumento de heterogeneidade (menores *slopes*). Não houve muita variação deste parâmetro entre as réplicas, o que, no caso de Crato, poderia validar a aparente maior homogeneidade dos grupos S, comparados com os grupos C. Em Aracaju, todos os *slopes* foram inferiores à amostra original, ou seja, não pareceu haver correlação entre alteração na heterogeneidade e o processo de seleção.



**Tabela 2.4. Razões de resistência a deltametrina, em adultos de *A. aegypti* de Aracaju e Crato, após seleção com malathion e manutenção em laboratório.**

população	geração	deltametrina				slope
		Rock RR <sub>50</sub>	Rock RR <sub>95</sub>	Parental RR <sub>50</sub>	Parental RR <sub>95</sub>	
Aracaju	F1	14,3	17,8	1,0	1,0	3,6
Aracaju C1	F7	40,7	60,2	2,3	4,3	2,3
Aracaju C2		41,8	90,5	2,4	6,5	1,8
Aracaju S1		11,6	23,0	0,7	1,7	1,9
Aracaju S2	F7	9,7	17,2	0,6	1,2	2,0
Aracaju S3		10,9	16,4	0,6	1,2	2,2
Crato	F2	37,0	51,6	1,0	1,0	2,3
Crato C1	F6	39,6	91,2	1,1	1,8	1,8
Crato C2		40,8	75,3	1,1	1,5	2,0
Crato S1	F7	28,3	35,0	0,8	0,7	2,5
Crato S2		26,4	41,1	0,7	0,8	2,2
Crato S3		32,2	37,7	0,9	0,7	2,6

Legendas e siglas como na Tabela 2.1.

### 2.3.2.1 Comparação das alterações visualizadas

A Tabela 2.5 mostra as discrepâncias observadas entre os dois critérios de análise, 'Rock RR' e 'Parental RR'. De forma empírica, as diferenças de 'Rock RR' e de 'Parental RR' menores que 1,0 e 0,5, entre as amostras, respectivamente, foram consideradas pequenas. As conclusões discrepantes entre os dois critérios foram realçadas em rosa, assim como feito para as réplicas que apresentaram comportamento diferenciado. Em verde são assinalados resultados concordantes quando se usam ambos os critérios.

As réplicas dos grupos controle das duas populações se comportaram de forma similar, sem muita variação entre elas. No entanto, em alguns casos, apenas nos grupos selecionados, houve dispersão entre as réplicas (em rosa na Tabela 2.5). Nestes casos, tendências foram apontadas apenas se observadas em pelo menos quatro dos seis resultados obtidos (três resultados de RR<sub>50</sub> e três de RR<sub>95</sub>).

Nos grupos controle das duas amostras, Aracaju e Crato, chama a atenção que todas as análises feitas com mosquitos adultos (malathion e deltametrina) tenham apresentado resultados concordantes entre as duas

abordagens: aumento da RR em relação à população original. Ao mesmo tempo, todas as avaliações feitas com larvas (malathion, temephos e DFB) foram discrepantes entre os dois critérios, com tendência de redução em relação à população original quando ‘Rock RR’ foi empregado e tendência de aumento quando se usou ‘Parental RR’.

**Tabela 2.5. Resumo das alterações identificadas usando os critérios de análise ‘Rock RR’ e ‘Parental RR’ nas amostras de Aracaju (a) e Crato (b).**

comparação	pop	Rock RR	Parental RR	Rock RR	Parental RR	Rock RR	Parental RR	Rock RR	Parental RR	Rock RR	Parental RR	
		malathion (larvas)	malathion (larvas)	malathion (adultos)	malathion (adultos)	temephos	temephos	diflubenzuron	diflubenzuron	deltametrina	deltametrina	
<b>(a)</b>	CONTROLE	discreta redução	discreto aumento	discreto aumento	discreto aumento	redução	discreto aumento	discreta redução	discreto aumento	marcado aumento	marcado aumento	
	réplicas											
	homogeneidade	aumento		diminuição		aumento		aumento		diminuição		
	SELEÇÃO	discreto aumento	aumento	discreto aumento	discreto aumento	redução	discreta redução	manutenção dos valores iniciais	discreto aumento	redução	manutenção dos valores iniciais	
réplicas												
homogeneidade	manutenção		manutenção		aumento		aumento		diminuição			
<b>(b)</b>	CONTROLE	discreta redução	discreto aumento	discreto aumento	discreto aumento	redução	aumento	discreta redução	manutenção valores iniciais	marcado aumento	aumento	
	réplicas											
	homogeneidade	aumento		aumento		aumento		aumento		diminuição		
	SELEÇÃO	aumento	aumento	aumento	aumento	redução	manutenção valores iniciais	manutenção valores iniciais	discreto aumento	marcada redução	discreta redução	
réplicas												
homogeneidade	aumento		aumento		aumento		aumento		aumento			

Estão marcadas em rosa as discrepâncias e em verde, as concordâncias, entre os resultados das duas abordagens (ver texto para detalhes).

Por outro lado, nos grupos selecionados, houve concordância entre os dois critérios para malathion, o inseticida usado na seleção: verificou-se aumento de RR em larvas e adultos em todos os casos.

Em geral, espera-se que a manutenção em laboratório, sem pressão seletiva como é o caso dos grupos controle, resulte em aumento da homogeneidade das amostras populacionais (mensurada pelo aumento de *slope*). De maneira geral, isso foi detectado para todos os inseticidas avaliados, exceto na avaliação de deltametrina, tanto em Aracaju como em Crato. No entanto, foi justamente para deltametrina que houve um inusitado aumento de resistência em todas as réplicas dos grupos controle.

Por outro lado, a seleção parece ter impactado de forma diferente as duas populações: enquanto Crato tendeu a ficar mais homogênea, Aracaju demonstrou diferentes tendências em relação ao *slope*, para os inseticidas avaliados no estudo.

### **2.3.3 Genotipagem das mutações *kdr***

Os genótipos *kdr* nas posições 1016 e 1534 do gene  $Na_V$ , sítio alvo de PI, são mostrados nas Tabelas 2.6 e 2.7. O alelo 'tipo selvagem' e suscetível, '1016 Val<sup>+</sup> / 1534 Phe<sup>+</sup>', foi chamado de 'S'. O alelo mutado somente na posição 1534 (1016 Val<sup>+</sup> / 1534 Cys<sup>*kdr*</sup>) foi denominado 'R1' e o outro, com mutações em ambas as posições (1016 Ile<sup>*kdr*</sup> / 1534 Cys<sup>*kdr*</sup>), 'R2'. Mutação apenas no sítio 1016 não foi encontrada. Os três alelos foram detectados em Aracaju e Crato. Uma vez que as mutações *kdr* nas posições 1016 e 1534 têm caráter recessivo, a resistência a PI mediada por tais alterações somente é expressa nos indivíduos homocigotos: R1R1, R1R2 e R2R2 (Linss et al. 2014; realçados em rosa nas Tabelas 2.6 e 2.7).

Originalmente R2 foi o alelo mais frequente em Aracaju, seguido pelo alelo selvagem (Tabela 2.6 e Resultados, Capítulo 1). Ao final do experimento de seleção com o OP malathion ou da manutenção desses espécimes em ausência de pressão, observou-se um aumento na frequência do alelo S, em praticamente todos os grupos avaliados.

Em Crato, por outro lado, o alelo selvagem foi o mais frequente, seguido por R1, padrão que se manteve em todos os grupos amostrais (Tabela 2.7 e Resultados, Capítulo 1). Em relação à população original, foi detectado, ao final do experimento, aumento na frequência do alelo S em todos os grupos, controle e selecionados.

Inicialmente, foi observada proporção similar destes genótipos *kdr*, que foram 43 e 32%, para Aracaju e Crato, respectivamente. De maneira geral, pode-se dizer que as frequências dos genótipos *kdr* foram menores em todos os grupos, selecionados e controle, do que inicialmente (colunas fgKdr nas Tabelas). Estes resultados estão em contradição com o aumento das RR para deltametrina observado, notadamente nos grupos controle (Tabela 2.4). O

conjunto dos dados aponta para a ocorrência de outros mecanismos associados à resistência a PI em Aracaju e Crato.

**Tabela 2.6. Alterações em Aracaju, pré- e pós-seleção, no canal de sódio regulado por voltagem (AaNa<sub>v</sub>), sítio alvo de piretróides.**

Aracaju	<i>n total</i>	Frequências alélicas			Frequências genotípicas						
		S	R1	R2	SS	SR1	R1R1	SR2	R1R2	R2R2	fgKdr
F0	30	0,383	0,100	0,517	0,200	0,033	0,033	0,333	0,100	0,300	0,433
F7 C1	30	0,350	0,233	0,417	0,100	0,133	0,033	0,367	0,267	0,100	0,400
F7 C2	30	0,517	0,100	0,384	0,233	0,100	0,000	0,467	0,100	0,100	0,200
F7 S1	29	0,517	0,121	0,362	0,172	0,172	0,000	0,517	0,069	0,069	0,138
F7 S2	30	0,500	0,167	0,334	0,267	0,067	0,067	0,400	0,133	0,067	0,267
F7 S3	30	0,400	0,250	0,351	0,100	0,233	0,033	0,367	0,200	0,067	0,300

Os alelos S, R1 e R2 referem-se às posições 1016 e 1534 do gene Na<sub>v</sub>: 1016 Val<sup>+</sup> / 1534 Phe<sup>+</sup> (S), 1016 Val<sup>+</sup> / 1534 Cys<sup>kdr</sup> (R1) e 1016 Ile<sup>kdr</sup> / 1534 Cys<sup>kdr</sup> (R2). Estão realçados em rosa os alelos e os genótipos *kdr*. fgkdr: frequência dos genótipos *kdr* (R1R1 + R1R2 + R2R2). Foram avaliados, para cada grupo, 30 machos adultos ('n total'). Diferentemente das demais avaliações, a análise das mutações *kdr* de Aracaju utilizou espécimes da geração parental (F0; dados publicados previamente: Linss et al. 2014).

**Tabela 2.7. Alterações em Crato, pré- e pós-seleção, no canal de sódio regulado por voltagem (AaNa<sub>v</sub>), sítio alvo de piretróides.**

Crato	<i>n total</i>	Frequências alélicas			Frequências genotípicas						
		S	R1	R2	SS	SR1	R1R1	SR2	R1R2	R2R2	fgKdr
F2	28	0,446	0,393	0,161	0,214	0,321	0,179	0,143	0,107	0,036	0,321
F6 C1	28	0,464	0,339	0,196	0,143	0,321	0,143	0,321	0,071	0,000	0,214
F6 C2	30	0,667	0,284	0,050	0,500	0,300	0,100	0,033	0,067	0,000	0,167
F7 S1	29	0,535	0,276	0,190	0,207	0,310	0,103	0,345	0,034	0,000	0,138
F7 S2	30	0,500	0,317	0,183	0,133	0,533	0,000	0,200	0,100	0,033	0,133
F7 S3	29	0,517	0,311	0,173	0,379	0,207	0,138	0,069	0,138	0,069	0,345

Legenda como na Tabela 2.6.

### **2.3.4 Resistência metabólica e alvo de OP**

A Tabela 2.8 mostra os perfis de atividade de larvas e adultos das populações Aracaju e Crato com respeito às principais classes de enzimas detoxificadoras. Atividade total do sítio alvo de OP, a enzima Ace, assim como seu perfil de inibição (AChE e AChI, respectivamente), também são apresentados. Além disso, foi incluída a 'Alteração Bioquímica Global' (ABG) – um indicador elaborado para facilitar a comparação inter e intrapopulações.

As duas populações avaliadas mostraram mais alterações no estágio adulto do que no larvar. Em Aracaju houve, de maneira geral, declínio nas alterações enzimáticas ao final do experimento, o que foi mais marcado no estágio larvar. Em Crato, por outro lado, foi observado um aumento generalizado das alterações enzimáticas no estágio adulto. A ABG corrobora todas estas conclusões.

**Tabela 2.8. Mecanismos de resistência de Aracaju (a) e Crato (b), pré- e pós-seleção, de acordo com ensaios bioquímicos.**

		% acima do percentil 99 de Rockefeller								
população	grupo	AChI	AChE	MFO	$\alpha$ -Est	$\beta$ -Est	$\rho$ npa-Est	GST	ABG*	
(a)	(F1)	6	4	9	30	39	55	20	26	
	Aracaju (larvas)	C1	2	0	9	19	0	4	2	6
		C2	3	0	7	31	1	4	4	8
		S1	1	3	3	5	0	26	10	8
		S2	0	1	5	15	0	18	0	7
		S3	3	0	9	6	3	11	0	5
	(F1)	63	1	87	75	8	32	36	40	
	Aracaju (adultos)	C1	0	9	0	7	0	46	80	24
		C2	0	0	0	27	1	78	65	29
		S1	0	29	0	15	0	63	40	25
		S2	0	0	0	28	1	63	26	20
		S3	0	33	0	33	3	51	43	27
	(b)	% acima do percentil 99 de Rockefeller								
		população	grupo	AChI	AChE	MFO	$\alpha$ -Est	$\beta$ -Est	$\rho$ npa-Est	GST
(F2)			4	0	2	4	1	22	13	7
Crato (larvas)		C1	10	0	5	29	1	8	6	8
		C2	8	0	0	19	0	4	0	4
		S1	0	4	4	25	5	4	6	8
		S2	3	3	3	38	0	10	8	10
		S3	1	1	5	34	13	10	10	12
(F2)			0	34	0	17	0	23	26	17
Crato (adultos)		C1	1	0	0	70	22	99	67	43
		C2	0	1	0	61	17	87	33	33
		S1	0	8	0	59	8	90	58	37
		S2	0	0	0	81	33	100	49	44
		S3	0	9	0	54	16	90	57	38

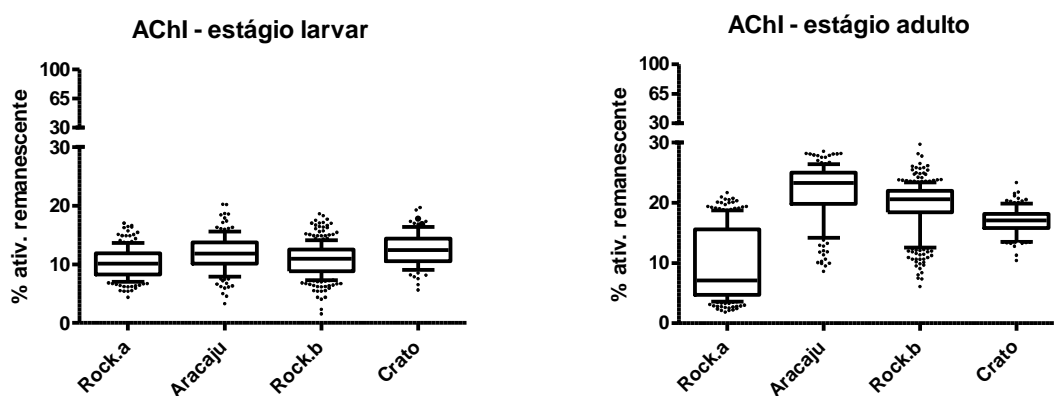
As atividades enzimáticas foram classificadas de acordo com o percentual de indivíduos com atividade acima do percentil 99 da cepa Rockefeller: se <15%, entre 15 e 50%, e >50%, sendo consideradas normais (em verde), alteradas (em amarelo), e muito alteradas (em rosa), respectivamente. \*ABG: 'alteração bioquímica global': para cada amostra, média dos percentuais de indivíduos acima do *cut off* mencionado, considerando-se todas as atividades relacionadas à resistência metabólica e AChE. A geração inicialmente avaliada foi F1 para Aracaju e F2 para Crato. O restante das análises foi feito com espécimes da geração F7, exceto para os grupos controle de Crato, com a geração F6.

De maneira geral, não foram notadas diferenças entre os grupos controle e expostos à seleção com malathion. A única exceção aparente foi a alteração de GST mais marcada nas fêmeas controle de Aracaju.

Fêmeas adultas de Aracaju apresentaram, de forma generalizada, maior atividade de  $\rho$ NPA-EST e redução de  $\alpha$ -EST, em relação à amostra original. Em Crato, foram também observadas alterações mais marcadas de  $\alpha$ -EST e  $\rho$ NPA-EST em fêmeas das amostras finais, em relação às parentais.

No estágio larvar, por outro lado, houve tendência de queda em todas as alterações metabólicas detectadas na amostra inicial de Aracaju. Ao passo que, em Crato, a alteração inicial de  $\rho$ NPA-EST parece ter sido substituída pela de  $\alpha$ -EST.

Adicionalmente, as alterações de MFO e AChI em fêmeas adultas da geração inicial de Aracaju parecem ter sido revertidas durante a manutenção em cativeiro, independente da seleção (Tabela 2.8a). O mesmo parece ter ocorrido para a alteração inicial de AChE em Crato (Tabela 2.8b). Em função dessas alterações iniciais de Ace nas duas populações, investigamos o perfil de inibição da enzima usando o critério da OMS: inibição de 70% ou mais da atividade de Ace com propoxur (AChI) é indicativo de que a enzima é sensível a OP e CB (Figura 2.2). De acordo com este critério, AChI é compatível com suscetibilidade nos mosquitos das amostras originais de Aracaju e Crato.



**Figura 2.2. Perfis de atividade da acetilcolinesterase, alvo de OP, após inibição com propoxur, nas amostras originais de Aracaju e Crato.** Gráficos do tipo *box plot* mostram a atividade remanescente de Ace depois de inibição com o CB propoxur, em larvas ou adultos individuais. Cada *box* indica os quartis das distribuições. A linha horizontal dentro dos *boxes* representa a mediana e as linhas verticais externas apontam para os percentis 10 e 90. Os pontos correspondem a espécimes individuais fora deste intervalo. Rock.a e Rock.b: ver item 'Ensaio bioquímico' da metodologia. De acordo com a OMS, a Ace é classificada como suscetível aos inseticidas nos casos em que propoxur inibe sua atividade em 70% ou mais (ou seja, quando a atividade remanescente é inferior a 30%; Hemingway 1998).

## 2.4 Discussão

O estudo almejou apresentar a seleção em laboratório de duas populações brasileiras de *A. aegypti* com o organofosforado malathion, em relação à quantificação da resistência e à avaliação dos mecanismos envolvidos através de metodologias aplicadas rotineiramente nos programas de controle de vetores.

Na época da idealização do estudo, em 2012, poucos trabalhos investigavam a suscetibilidade de populações naturais deste vetor ao malathion, e a maioria indicava sensibilidade ao inseticida (Coto et al. 2000, Fonseca-González et al. 2011, Komalamisra et al. 2011, Rong et al. 2012). Uma revisão com dados de suscetibilidade a inseticidas em populações colombianas do vetor apontou a existência de uma amostra resistente, duas com resistência incipiente, e 37 suscetíveis, todas avaliadas através da metodologia de papéis impregnados, preconizada pela OMS: após uma hora de exposição e 24 horas de recuperação em ambiente livre de malathion (Serrano 2012). Esse mesmo estudo indicava a ocorrência de quatro populações do vetor resistentes ao malathion, dentre 42 amostras submetidas ao protocolo padronizado pelo CDC, que avalia tempo letal em garrafas impregnadas (Brogdon e McAllister 1998). Dentre as 26 populações avaliadas por Serrano através das duas metodologias, OMS e CDC, cinco apresentaram resistência ou resistência incipiente, mas apenas em um dos ensaios (ou seja, em nenhuma das situações detectadas de alteração de suscetibilidade houve concordância das duas abordagens metodológicas).

Outro trabalho sugeriu resistência de cinco populações brasileiras de *A. aegypti* ao malathion (Macoris et al. 2007). No entanto, neste caso, os bioensaios foram avaliados depois de uma hora de exposição, e não após 24 horas de recuperação, conforme recomendado pela OMS (OMS 2006). Neste mesmo trabalho, a mortalidade da cepa Rockefeller, referência de suscetibilidade, foi inferior a 100% quando se usou a dose diagnóstica proposta pela OMS. Esta dose, no entanto, é (ou deveria ser) equivalente ao dobro da concentração mínima que mata 100% dos indivíduos de uma cepa suscetível.

Além disso, foi também sugerida alteração incipiente na suscetibilidade ao malathion de cinco outras populações brasileiras do vetor (Lima et al. 2003).

Este estudo, realizado em garrafas impregnadas (metodologia CDC), avaliou a resposta a uma dose do inseticida capaz de induzir a mortalidade de 100% dos espécimes expostos da cepa Rockefeller. Neste procedimento com garrafas, que não inclui etapa de recuperação, foram feitas leituras de mortalidade em dois momentos, depois de 45 e 120 minutos de exposição. De fato, em nossos ensaios de adultos, com papéis impregnados com malathion, percebeu-se que uma fração significativa de mosquitos vivos depois de uma hora de exposição não sobrevivia ao período de recuperação. Com isso, é possível que os resultados avaliados imediatamente após a exposição ao malathion nos dois estudos mencionados (Lima et al. 2003, Macoris et al. 2007) fossem diferentes caso as leituras de mortalidade tivessem sido feitas após 24 horas de recuperação.

Ainda que o malathion seja usado como adulticida em campo, optou-se por fazer a seleção com larvas por questões operacionais: (a) a possibilidade de trabalhar com exposição contínua e (b) a vantagem de expor todos os espécimes à mesma dose. Machos de culicídeos em geral têm desenvolvimento mais rápido que as fêmeas; em adição, machos adultos são menores. Com isto, a expectativa é que existam diferenças de gênero na resposta ao inseticida, e que estas diferenças sejam mais evidentes no estágio adulto. Neste caso, para a seleção com adultos seria necessário fazer experimentos diferentes, com concentrações distintas de malathion para machos e fêmeas, o que poderia complicar muito a rotina dos ensaios. Além disso, nos testes com adultos, o contato com os inseticidas só ocorre durante o pouso, dificultando o controle do nível de exposição. Apesar de alguns trabalhos relatarem o uso de larvas em experimentos de seleção com adulticidas, em geral, esta aparente inconsistência não chega sequer a ser mencionada nos textos (exemplos em: González et al. 1996, Bisset et al. 1998, Hidayati et al. 2005, Rodríguez et al. 2005, Selvi et al. 2010). Além disso, há pelo menos um relato de desenvolvimento de resistência ao adulticida deltametrina que foi mais efetivo na seleção de larvas do que na de adultos (Kulmar et al. 2002). Neste estudo, feito com uma cepa indiana de *A. aegypti*, depois de 40 gerações de seleção, as  $RR_{50}$  aumentaram 703 vezes nas larvas, mas apenas 1,3 vezes nos adultos. Em outro estudo, a seleção de fêmeas adultas com o mesmo PI, também resultou em alteração apenas discreta do



*status* de resistência de uma população brasileira de *A. aegypti* (Martins, Ribeiro et al. 2012).

Em geral, experimentos de seleção em condições de laboratório tendem a privilegiar múltiplos mecanismos de baixo efeito, assim como seria esperado em campo, de acordo com as premissas da seleção natural (Mallet 1989). Entretanto, a aplicação de inseticidas no campo parece ser apenas um desafio a mais para os mosquitos. *Aedes aegypti* é um inseto generalista e, como tal, poderia lidar também com a presença de poluentes ou de metabólitos secundários de plantas em seus criadouros larvares, o que provavelmente lhe conferiria uma vantagem pré-adaptativa frente ao desafio com inseticidas e poderia justificar a detecção precoce de casos de resistência a compostos recém-introduzidos pelos programas de controle (da-Cunha et al. 2005, Martins et al. 2009). De fato, alguns desses metabólitos, assim como poluentes, foram capazes de induzir aumento significativo na expressão de enzimas MFO no vetor, o que poderia servir como um indício que corrobora tal pré-adaptabilidade para a resistência a inseticidas no modelo (Poupardin et al. 2008).

Independentemente do inseticida ou do modelo de estudo, são usados dois tipos de materiais iniciais em ensaios de seleção em laboratório com inseticidas: i) cepas suscetíveis; ii) populações de campo. Em geral, procedimentos de seleção que usam cepas suscetíveis só alcançam níveis baixos de resistência. Nestes casos a resposta, em relação aos mecanismos associados, parece ser, na maioria das vezes, o acometimento da resistência metabólica mas não de resistência por alteração do sítio alvo (Riaz et al. 2013, David et al. 2014). Quando se emprega uma população de campo suscetível, ou com baixos níveis de resistência ao inseticida usado na seleção, em geral, a resposta à seleção também é limitada (Saavedra-Rodriguez et al. 2012, Belinato e Valle 2015). No entanto, deve-se também levar em consideração o número de gerações de seleção – que no caso de alguns trabalhos mencionados acima, foi reduzido. Outra possibilidade seria o uso de populações de campo já resistentes ao composto que se deseja usar na seleção; isto em geral é feito para selecionar cepas com altos índices de resistência, com foco também no estudo dos mecanismos envolvidos (González et al. 1996, Bisset et al. 1998, Wirth e Georghiou 1999, Rodríguez et

al. 2005, Melo-Santos et al. 2010, Martins et al. 2012, Saavedra-Rodriguez et al. 2015).

Nesse estudo, o objetivo principal foi antecipar um eventual caso de resistência ao malathion em populações brasileiras do vetor. Quando este trabalho foi iniciado, a resistência a temephos, outro OP, já estava difundida nas populações de *A. aegypti* do país. As duas populações escolhidas apresentavam distintos índices de resistência a temephos. Em especial, as razões de resistência de *A. aegypti* de Crato eram marcadamente maiores que as populações do vetor do restante do país.

Foram aplicados dois diferentes critérios para avaliar os impactos da seleção com o malathion e da adaptação à criação em laboratório: 'Rock RR' e 'Parental RR', que tinham como base a comparação com a cepa Rockefeller ou com a geração inicial das populações naturais estudadas, respectivamente. Conforme esperado, houve casos em que o resultado de ambas as abordagens diferiu. Um exemplo foram as avaliações feitas com as larvas controle das duas populações, cujas RR diminuíram em relação à população inicial, quando o critério 'Rock RR' foi usado; no entanto, houve elevação de suas RR, relativas às populações originais, quando se usou o critério 'Parental RR'. Por outro lado, foi notória a concordância entre os dois critérios, 'Rock RR' e 'Parental RR', nos grupos selecionados com malathion, em relação aos ensaios com este inseticida: ocorreu aumento consistente de RR para este OP em larvas e adultos dos grupos selecionados, em Aracaju e em Crato.

O resultado da seleção com o OP malathion parece robusto uma vez que as RR das três réplicas biológicas de Aracaju e Crato aumentaram. Apesar de limitados, tais incrementos podem ser considerados compatíveis com o que é regularmente encontrado na literatura para populações naturais de mosquitos inicialmente suscetíveis ao composto usado, e expostas à seleção por um número moderado de gerações (Saavedra-Rodriguez et al. 2012, Belinato e Valle 2015).

Embora a seleção tenha, de fato, aumentado os níveis de resistência para malathion, nossos dados sugerem que, de maneira geral, as RR para temephos, também um OP, tenderam a diminuir nas duas populações. O declínio nas RR para temephos parece, inclusive, ter sido mais proeminente nas amostras selecionadas com malathion do que nos grupos controle.

Coletivamente, tais dados reforçam a ideia de que esses dois compostos, apesar de pertencerem à mesma classe inseticida, parecem elicitar mecanismos de resistência diferentes (Hemingway e Ranson 2000; Hemingway et al. 2004). Isto ocorre, por exemplo, com espécies dos gêneros *Anopheles* e *Culex*: verificou-se que resistência ao temephos deriva da amplificação do número de cópias de genes que codificam esterases (o que aumenta a transcrição e culmina em maior número de enzimas disponíveis; Scott 1995, Hemingway et al. 2004); por outro lado, a resistência ao malathion foi relacionada a outra esterase, chamada de 'malaoxonase', com alterações na região codificante que a tornaram mais eficiente diante deste último composto (Whyard et al. 1995, Karunaratne e Hemingway 2001).

De fato, os dois OP diferem em estrutura química. Temephos, além de ter anéis aromáticos, possui apenas um átomo de enxofre ligado ao seu fósforo central, enquanto o malathion possui cadeia aberta e dois enxofres ligados ao seu átomo de fósforo central. Tais diferenças parecem resultar em hidrólise de temephos, via esterases, extremamente lenta (podendo durar dias). Nesse caso, diz-se inclusive que há sequestro das moléculas inseticidas (Hemingway e Karunaratne 1998). Em consequência, a resistência mediada por esterases se daria por aumento na quantidade de enzimas, assim como ocorre no gênero *Culex* (Hawkes e Hemingway 2002, Hemingway et al. 2004). Em nosso estudo, foram observadas alterações pontuais em alguns dos mecanismos de resistência analisados. No entanto, estas não foram capazes de elucidar toda complexidade observada nas respostas dos diferentes grupos amostrais de Aracaju e Crato, frente aos diferentes inseticidas avaliados.

Nas amostras aqui avaliadas, houve alteração da atividade de enzimas relacionadas à resistência metabólica, notadamente em espécimes adultos do vetor, e principalmente de esterases e de GST. Contudo, não foi observada diferença que fosse exclusiva das réplicas submetidas à seleção em ambas as populações. Isto poderia, talvez, indicar a ocorrência de mecanismos diferenciados, ou ainda, de espécies moleculares de enzimas detoxificadoras que não fossem prontamente identificadas nas amostras estudadas, pela metodologia bioquímica clássica adotada.

A avaliação dos perfis de atividade e de inibição da Ace, alvo de OP, demonstrou poucas alterações, sendo todas restritas às amostras originais das

populações naturais do vetor estudadas. Em geral, os resultados de AChI foram concordantes entre as duas abordagens analíticas adotadas (critérios de classificação propostos pela OMS [Hemingway 1998] e por Valle et al. [2006]), com exceção da população original de Aracaju. No entanto, a análise destes espécimes, sob a ótica do critério de classificação da OMS, não revelou alteração relevante. Além disso, avaliação da atividade total da enzima (AChE), assim como pontuado por Viana-Medeiros, em 2011, e Bellinato et al., em 2016, detectou alteração na população original de Crato. No entanto, esta não refletiu em menor inibição da enzima, além de parecer ter sido suprimida após a manutenção em laboratório. Com isso, o estudo do alvo de OP não pareceu revelar alterações que pudessem ser correlacionadas com o incremento na suscetibilidade ao malathion, nas amostras selecionadas.

Em relação ao PI deltametrina, por outro lado, a seleção com malathion parece ter impactado na diminuição de praticamente todas as RR observadas, o que confirma o uso de mecanismos de resistência distintos frente ao OP e ao PI nas populações de *A. aegypti* estudadas. De fato, tal resultado, diminuição de RR, foi também obtido para o OP temephos, em todas as amostras de Crato e Aracaju selecionadas com malathion. Nos dois casos - temephos e deltametrina; a diminuição das RR foi maior nos grupos selecionados com malathion do que nos grupos controle. Uma hipótese para isso seria a seleção de determinados mecanismos em resposta ao malathion, em detrimento de outros, previamente selecionados em campo para a resistência a temephos e deltametrina, possivelmente presentes nas amostras originais. Em outras palavras, isto poderia ser o resultado do desvio de recursos metabólicos que geralmente ocorre, por exemplo, na resistência mediada por enzimas detoxificantes (Carrière et al. 1994, Rivero et al. 2010). No caso da redução dos níveis de resistência a deltametrina nos grupos selecionados com malathion, vale ressaltar que, coincidentemente, houve também redução nas frequências de homozigotos resistentes *kdr* nestes mesmos grupos.

Inusitadamente, foi observado, nos ensaios com deltametrina, aumento marcado da resistência nos grupos controle – aqueles mantidos sem qualquer inseticida - em relação às amostras originais. Por outro lado, a frequência das mutações *kdr* diminuiu de forma discreta nesses mesmos grupos. A diminuição da frequência das mutações *kdr* poderia ser, de alguma forma, esperada, uma

vez que existem indícios de que, em ausência de pressão com PI, tais mutações não oferecem vantagem adaptativa, além de imporem custo evolutivo significativo, aos indivíduos que as carregam (Brito et al. 2013). Em contrapartida, esta diminuição de frequência *kdr* não parece compatível com o aumento de resistência a deltametrina demonstrado, principalmente, quando se considera que este mecanismo é relevante para a resistência a PI.

Por outro lado, a avaliação dos mecanismos de resistência metabólica em fêmeas adultas de Aracaju revelou a possibilidade das enzimas GST terem tido um papel importante na resposta frente aos PI, uma vez que sua atividade foi considerada marcadamente alterada especificamente nas amostras mantidas sem pressão de seleção – justamente aquelas que apresentaram marcado aumento de RR aos PI. Existem alguns estudos que sugerem a participação de GST na resistência a PI em populações de *A. aegypti* de diferentes origens geográficas (Montella et al. 2007, Strode et al. 2012, Faucon et al. 2017), além de trabalhos que caracterizaram a relação entre GST e resistência a PI (Vontas et al. 2001, Li et al. 2007). Ainda assim, a hipótese de que GST tenha sido o principal mecanismo associado aos altos índices de resistência aos PI nos grupos controle talvez não se sustente, pois a alteração de tais enzimas não se mostrou tão proeminente nas amostras de Crato – que também apresentaram incrementos bem marcados em sua RR. No entanto, sabe-se que o fenômeno da resistência a inseticidas tem caráter multifatorial. Neste caso, o aumento bem delineado da resistência a PI nos grupos controle poderia ter relação com a alteração de GST, dentre outros mecanismos que podem também estar atuando, em Aracaju, mas supostamente, não em Crato.

Parece que a adaptação à criação em laboratório, ao mesmo tempo em que tendeu a diminuir as frequências dos homozigotos resistentes *kdr*, poderia ter favorecido ou selecionado algum(ns) mecanismo(s) que fosse(m) particularmente interessante(s) para a resposta de mosquitos adultos aos PI, e que fosse vantajoso em ausência de pressão seletiva e sob condições ótimas de criação. E nesse caso, a seleção com o malathion parece ter dificultado, de alguma forma, a ‘ativação’ de tal(is) mecanismo(s), uma vez que foram detectados níveis mais baixos de resistência a PI nos espécimes selecionados.

Adicionalmente, nossos dados apontam que a avaliação das mutações *kdr* não pode ser usada como único indicador de resistência aos PI: a

frequência de homozigotos *kdr* não foi capaz de elucidar o grande incremento dos níveis de resistência nas amostras controle de Aracaju ou de Crato.

Em geral, acredita-se que a manutenção em laboratório, sem pressão seletiva - como foi o caso dos grupos controle; poderia aumentar a homogeneidade das amostras populacionais (Ferrari 1996). Nesse caso, utiliza-se o *slope* como uma medida de variabilidade da população – quanto maior o *slope*, mais uniforme seria a resposta dos indivíduos avaliados. No entanto, nossos dados apontam que essa relação entre ausência de pressão seletiva e declínio de heterogeneidade, embora frequente, pode não ser generalizada. O *slope* é, em geral, um parâmetro negligenciado na área do monitoramento da resistência a inseticidas em vetores de doenças. São poucos os trabalhos que mencionam a heterogeneidade das amostras avaliadas, e, quando o fazem, é sempre sem detalhamento (exemplos de estudos que relatam resultados de *slope*: Lima et al. 2003, Braga et al. 2004, Braga et al. 2005, Macoris et al. 2007, Marcombe et al. 2009, Alvarez et al. 2013, Araújo et al. 2013, Bisset et al. 2013, Bisset et al. 2014, Bellinato et al. 2016, Horowitz e Ishaaya 2016). No presente estudo foi detectado aumento de homogeneidade na maioria dos grupos experimentais. A principal exceção ocorreu com a avaliação de deltametrina: os grupos controle das duas populações apresentaram maior heterogeneidade para o PI. E foi justamente para deltametrina que se detectou um inusitado e marcado aumento de resistência nessas amostras. Por outro lado, a seleção parece ter impactado de forma diferente as duas populações: enquanto Crato apresentou respostas mais homogêneas frente a todos os inseticidas avaliados; Aracaju não se mostrou mais homogênea frente ao malathion e ao PI.

Este estudo demonstrou a seleção bem sucedida de duas populações naturais brasileiras de *A. aegypti* com o organofosforado malathion. Além disso, foram detectadas algumas mudanças no perfil de resistência dessas amostras aos outros compostos usados no controle de *A. aegypti* no país. Não foi encontrada resistência cruzada entre malathion e o também OP temephos, nem com o PI deltametrina. Adicionalmente, a seleção com malathion parece ter tido efeito negativo sobre a resistência ao temephos e à deltametrina. Por outro lado, a manutenção de Aracaju e Crato em ambiente livre de inseticidas

mostrou um inusitado aumento da resistência aos PI em todas as réplicas biológicas. No entanto, o uso de abordagens metodológicas rotineiramente adotadas pelos programas de controle não foi capaz de revelar os potenciais mecanismos de resistência associados, em cada caso. Isto tudo aponta a importância de avaliações globais dos mecanismos associados aos casos de resistência.

Nossos dados sugerem, ainda, a viabilidade do uso de malathion e diflubenzuron no controle de *A. aegypti* no Brasil. A possibilidade de se aplicar um esquema de rotação de larvicidas (assim como já é preconizado pelo MS) poderia, decerto, contribuir para a manutenção do uso de DFB em campo, como estratégia viável. Em relação ao malathion, infelizmente, conduta similar não seria possível, pois todos os compostos adulticidas alternativos são da classe dos PI (OMS 2012), para os quais a resistência de *A. aegypti* encontra-se disseminada em todo o país (da-Cunha et al. 2005, Martins et al. 2009, Linss et al. 2014).

Finalmente, nossos resultados reforçam a relevância de se investigar o *status* de suscetibilidade em mais populações naturais de *A. aegypti* aos inseticidas aplicados nas ações de controle, e os mecanismos de resistência associados, de modo a subsidiar a escolha racional dos compostos a serem usados, mas também na tentativa de manter a viabilidade do uso dos poucos compostos disponíveis.

### CAPÍTULO 3. RESPOSTA À SELEÇÃO DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Aedes aegypti* COM O ORGANOFOSFORADO MALATHION, USANDO SEQUENCIAMENTO DE RNAM

Neste estudo foram usadas as duas populações caracterizadas no Capítulo 1, e cujo processo de seleção artificial com o OP malathion foi descrito no capítulo anterior. O objetivo do estudo foi usar sequenciamento de RNA (RNA-seq) para analisar variações nos índices de transcrição associadas com a adaptação ao malathion e com a adaptação à criação em laboratório. Para isso, foi extraído RNA de *pools* de larvas L3/L4, sendo construídas oito bibliotecas de cDNA por população: três com amostras prévias ao procedimento de seleção (geração F2); três com os grupos submetidos à seleção com malathion, de forma independente (geração F7); e duas com amostras dos grupos controle, criados sem pressão de seleção, também independentemente um do outro (geração F6/7). O RNA foi extraído com o método do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (TRIzol®; Invitrogen) e quantificado por Nanodrop (Thermo scientific), Qubit (Invitrogen) e Bioanalyzer (Agilent technologies). As bibliotecas foram construídas com o kit '*TruSeq Stranded mRNA Sample Prep LS Protocol*' (Illumina) e quantificadas por Bioanalyzer (Agilent technologies) e por PCR quantitativa (equipamento *LightCycler*®; Roche), utilizando o kit '*KAPA Library Quantification*'. O sequenciamento foi feito em um equipamento HiSeq 2500 com todas as bibliotecas juntas em uma única canaleta (*lane*) de uma lâmina (*flow cell*). Após o sequenciamento de 100 bases nos dois sentidos das sequências ('*paired end sequencing*'; sendo os *reads* sequenciados no sentido '*forward*' chamados de R2 e os do sentido '*reverse*' chamados de R1), procedeu-se às análises de bioinformática aplicáveis, que foram: limpeza exaustiva dos *reads* obtidos; alinhamento/mapeamento dos *reads* nos genes preditos de *A. aegypti*; produção de um único universo de *reads* por réplica (todos os *reads* R1, acrescidos dos *reads* únicos de R2 [que não tinham pares '*reverse*' ou cujos pares não mapearam/alinharam nos genes preditos do



vetor]); cálculo dos índices de transcrição (abundância relativa) de cada gene; avaliação das diferenças de expressão entre as amostras; *clusterização* dos genes diferencialmente expressos (DE); análises de enriquecimento funcional de cada *cluster* observado, nas duas populações.

### 3.1 Justificativa

Os procedimentos mais amplamente utilizados para a avaliação dos mecanismos de resistência são os ensaios bioquímicos que foram usados nos Capítulos 1 e 2 da seção Resultados. Trata-se da quantificação da atividade de algumas superfamílias de enzimas – que são tradicionalmente correlacionadas com a resistência a vários compostos inseticidas; além de contar com a avaliação do perfil de inibição da Ace – alvo de OP. O protocolo avalia algumas classes de enzimas que participam da resistência metabólica, como esterases, oxidases de função múltipla (MFO) e glutathione S-transferases. No entanto, cada uma dessas classes de enzimas é composta por dezenas a centenas de espécies moleculares que divergem em especificidade de substrato e na resposta frente a diferentes compostos, ou seja, uma mesma enzima detoxificadora pode contribuir de forma diferente para o fenômeno da resistência. Existem ainda autores que sugerem que os substratos usados nos ensaios bioquímicos não são os mais adequados para revelar alterações de atividade relacionadas com a resistência a inseticidas. Além disso, vários estudos apontam que a resistência a inseticidas, além de multifatorial, é marcadamente focal - cada população possui um conjunto de mecanismos próprios, que provavelmente foram selecionados em decorrência dos desafios prévios que enfrentou.

Em um cenário de tamanha complexidade, são frequentes os dados que indicam haver limitações dos ensaios bioquímicos. Inclusive, os dados bioquímicos apresentados nos Capítulos 1 e 2 (Resultados) dessa tese não foram capazes de elucidar a alta resistência aos PI e ao OP temephos, nas amostras das populações do vetor. Mesmo tendo revelado tendências genéricas interessantes, em alguns estudos, a difícil interpretação dos dados bioquímicos e a frequente falta de correlação com o *status* de suscetibilidade,

em diferentes amostras, motivou a busca por uma metodologia capaz de fazer uma avaliação mais abrangente dos mecanismos associados à resistência em populações brasileiras do vetor. Nesse sentido, o sequenciamento em larga escala de transcritos (*RNA-seq*) poderia fornecer perfis de transcriptomas inteiros de qualquer organismo. Em adição, o alto rendimento da técnica permitiria o estudo de perfis de expressão gênica com resolução muito maior que métodos tradicionais. Além disso, os dados de sequenciamento oriundos do *RNA-seq* poderiam ser usados para acessar eventuais mutações em genes de interesse.

Nessa tese, foi feita a seleção com malathion, em condições de laboratório, de populações naturais de *A. aegypti* provenientes de Aracaju e de Crato. Ambas apresentavam níveis de resistência marcadamente diferentes ao temephos (ver Capítulos 1 e 2 de Resultados). Com o intuito de aprofundar a investigação dos mecanismos de resistência associados, esse capítulo descreve a análise preliminar de alterações de expressão gênica, evidenciadas através de *RNA-seq*, destas amostras. Foram investigadas não somente a resposta à seleção com o malathion, como também as alterações relativas às amostras originais, e aquelas decorrentes da adaptação à criação em laboratório.

## **3.2 Materiais e métodos**

### **3.2.1 Coleta e obtenção de populações de campo**

A coleta de ovos de *A. aegypti* das populações de campo foi feita por meio de ovitrampas, de modo a representar todo o município a ser avaliado (Braga et al. 2000; Lima et al. 2003). No laboratório, as colônias foram iniciadas com 349 ovitrampas positivas obtidas de Aracaju/SE em 2012, e 272 paletas positivas de Crato/CE, em 2013 (Capítulo 1 de Resultados). Os ovos foram postos a eclodir e as larvas criadas por meio de procedimento rotineiramente utilizado (Viana-Medeiros 2011). Os adultos de *A. aegypti* resultantes foram então identificados, selecionados e utilizados para a obtenção de ovos da geração F1. Uma vez que a quantidade de ovos da geração F1 foi insuficiente

para suprir a demanda de todos os ensaios de rotina acrescidos da seleção, optou-se por iniciar o procedimento com a geração F2 das populações de Aracaju e Crato (Capítulo 2 de Resultados), sendo os espécimes desta mesma geração coletados para o posterior sequenciamento de RNA.

### **3.2.2 Coleta e armazenamento das amostras para extração de RNA**

Previamente, todo o material utilizado nessa etapa foi lavado com detergente neutro e deixado em luz UV por 15 minutos, após o que foi tratado com lenços de papel embebidos em *RNaseZAP* (Sigma-Aldrich), aplicados sobre toda a superfície de cada item a ser usado. Foram coletados 10 *pools* por réplica, cada um contendo 80 larvas (aproximadamente 100 mg). As exceções foram as amostras parentais (nestas foram usados espécimes de três posturas diferentes, sendo coletados cerca de três *pools* de cada). Os *pools* usados nas extrações de RNA estão discriminados na Tabela 3.1. O procedimento de coleta dos espécimes incluiu a colocação das larvas em placas de Petri contendo solução salina em água “*RNase free*”. Depois, com o auxílio de um pincel, as larvas foram delicadamente coletadas, contabilizadas e colocadas em tubos “*RNase free*” contendo 1 ml de RNAlater (*RNA Stabilization Reagent*, marca Qiagen). As amostras então eram acondicionadas em geladeira por 24 horas, para que o RNAlater penetrasse nos tecidos, sendo posteriormente congeladas a -80°C.

A Tabela 3.1 discrimina as amostras usadas para a construção das 16 bibliotecas de cDNA.

**Tabela 3.1. Ordenação dos *pools* de amostras usados na extração de RNA.**

n°	população	amostra	n° tubo	coleta
1		inicial_1	2	02/12/2013
2		inicial_2	4	02/12/2013
3		inicial_3	9	02/12/2013
4	<b>Aracaju</b>	controle_1	2	26/05/2014
5		controle_2	1	27/05/2014
6		selecionado_1	2	17/04/2014
7		selecionado_2	1	17/04/2014
8		selecionado_3	1	17/04/2014
9		inicial_1	2	03/12/2013
10		inicial_2	4	03/12/2013
11		inicial_3	8	03/12/2013
12	<b>Crato</b>	controle_1	1	28/05/2014
13		controle_2	1	29/05/2014
14		selecionado_1	1	20/05/2014
15		selecionado_2	1	20/05/2014
16		selecionado_3	1	20/05/2014

A tabela discrimina cada *pool* de larvas usado na construção das 16 bibliotecas de cDNA posteriormente sequenciadas. Foram coletados 10 tubos da geração aqui chamada de inicial (geração F2) de ambas as populações, e estão discriminados na tabela quais os tubos usados nas extrações das réplicas (oriundas de três diferentes posturas, sendo consideradas como réplicas biológicas). Em todos os outros casos (dois grupos controle e três selecionados) os diferentes grupos foram mantidos de forma independente durante todo o experimento, sendo também considerados como réplicas biológicas.

### **3.2.3 Extrações de RNA**

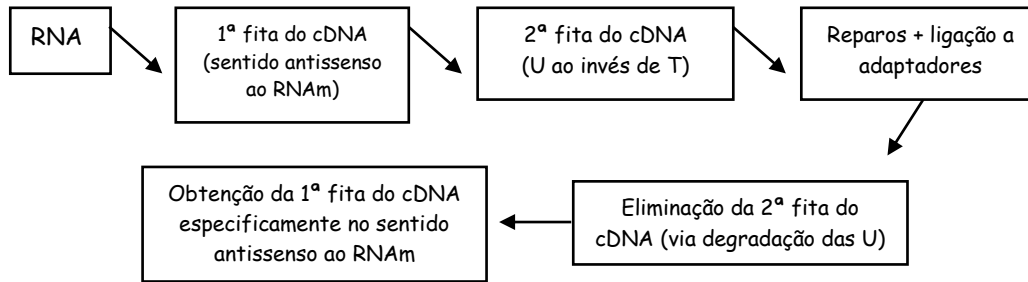
O RNA total foi extraído usando o método do TRIzol® (Invitrogen, UK). Inicialmente, retirou-se ao máximo o RNAlater e os tecidos de cada *pool* de amostra (descritos na Tabela 3.1) foram macerados em um homogeneizador T10 Ultra Turrax – IKA (modelo S25N-25G) usando 1,2 ml de Trizol® em tubos Falcon® (com capacidade para 5 ml). Enquanto uma amostra era macerada, as outras eram mantidas no gelo. Após a maceração do tecido, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos, quando então transferiu-se 1 mL do tecido macerado em TRIzol para microtubos com capacidade para 1,5 mL. Acrescentou-se 200 µL de clorofórmio e agitou-se vigorosamente (por 30 vezes) cada amostra, seguido de uma etapa de incubação em temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C, para a separação do material em três fases:

fase aquosa superior (transparente: RNA); interface (branca: clorofórmio + DNA + proteínas) e fase inferior orgânica (avermelhada: fenol + algumas proteínas). 400 µL do sobrenadante translúcido foram transferidos para um tubo de 1,5 mL limpo (com cuidado para não pegar a interface) ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol. O material foi homogeneizado em Vortex para precipitação do RNA total. As amostras foram então incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (isopropanol) foi cuidadosamente descartado em local apropriado dentro da capela e o *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado preparado com água DEPC (o material foi rapidamente agitado no Vortex para 'soltar' o *pellet* da parede do tubo), seguido de centrifugação a 11.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O etanol foi removido por inversão e o *pellet* secou à temperatura ambiente até ficar transparente. As amostras de RNA foram então dissolvidas em 80 µl de água “*RNAse free*”, acrescentou-se 1 ml de TRIzol, e todo o procedimento foi repetido, a partir da etapa do clorofórmio. Ao final, as amostras de RNA foram ressuspensas em 20 µl de água “*RNAse free*”, sendo, a partir de então, sempre estocadas em freezer -80°C e mantidas em gelo, quando utilizadas.

#### **3.2.4 Construção das bibliotecas e sequenciamento das amostras**

A construção das bibliotecas foi realizada no laboratório multiusuário (Centro de Genômica Funcional) localizado na ESALQ-USP, seguindo o protocolo *TruSeq Stranded mRNA Sample Prep LS* (Illumina).

As amostras de RNA total foram purificadas por meio da captura do RNA mensageiro (RNAm) pela cauda poli-A, utilizando microesferas magnéticas que continham oligonucleotídeos poli-T complementares. O RNAm purificado foi quebrado em fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases com o mix *Fragment, Prime, Finish* presente no kit Illumina. Para garantir que a biblioteca seria ‘*strand specific*’ (ver fluxo de trabalho na Figura 3.1), a síntese da primeira fita de cDNA a partir do RNAm foi realizada com a enzima *Superscript II ® Reverse Transcriptase*, da Invitrogen™, e o mix usado foi o *First Strand Synthesis Act D* (Illumina).

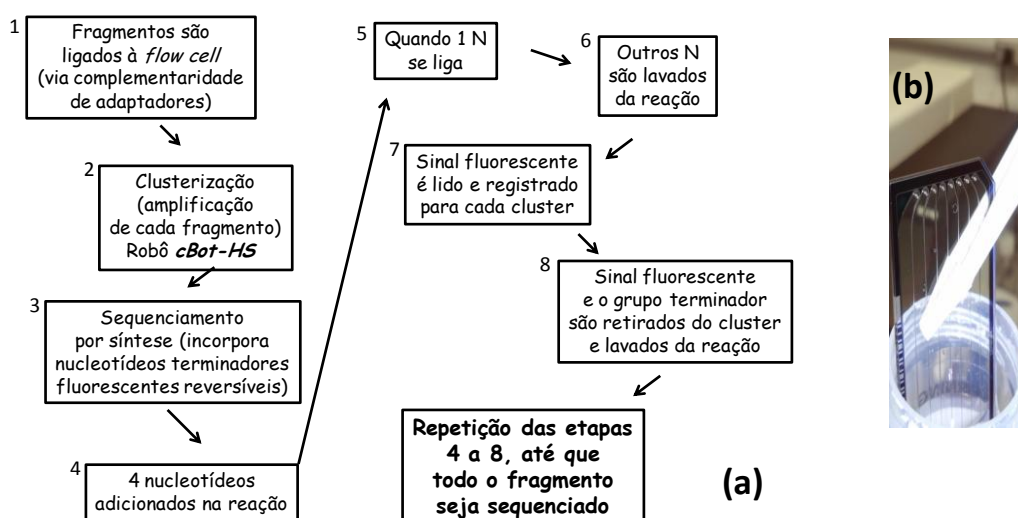


**Figura 3.1. Esquema de preparação de biblioteca 'strand-specific'.** Fluxo da construção de bibliotecas 'strand-specific'. Adaptado da metodologia descrita por Borodina et al. 2011. U: nucleotídeo uracila. T: nucleotídeo timina.

Para a síntese da segunda fita de cDNA foi utilizado o mix *Second Strand Master* também presente no kit da Illumina. Depois da obtenção do cDNA dupla fita purificado, foi feito o reparo das extremidades das fitas. O reparo das extremidades das moléculas foi feito usando exonucleases e polimerases, com o intuito de remover os nucleotídeos que estavam em excesso na extremidade 3' e preencher a sequência na extremidade 5', respectivamente. Então, houve uma etapa de adenilação na qual foi adicionado um nucleotídeo adenina em cada extremidade 3' dos fragmentos para auxiliar a ligação dos adaptadores (que possuem um nucleotídeo timina em sua extremidade). A ligação dos adaptadores aos fragmentos foi feita pela ligação da timina contida na extremidade do adaptador e a adenina adicionada na extremidade 3' do ds cDNA (*double strand cDNA*). Os adaptadores possuem uma sequência complementar às sequências dos oligos contidos na lâmina de sequenciamento (*flow cell*).

A etapa seguinte, de validação da biblioteca, consistiu em verificar a qualidade e o comprimento dos fragmentos de cDNA usando o chip DNA 1000 em *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies). Em seguida, foi feita PCR quantitativa (qPCR) no equipamento *LightCycler®* da Roche para quantificação relativa de cada biblioteca utilizando o kit *KAPA Library Quantification*. Para que as bibliotecas fossem sequenciadas, foi feita a mistura das amostras, e amplificação inicial no equipamento cBot-HS (Illumina – San Diego, EUA) utilizando o Kit *TruSeq PE Cluster v4* (Illumina – San Diego, EUA). A alta densidade dos *clusters* possibilita que o sinal de fluorescência gerado no sequenciamento tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção

exata. Para facilitar o entendimento do procedimento de sequenciamento por síntese, um esquema é mostrado abaixo, na Figura 3.2.



**Figura 3.2. Esquematização do sequenciamento em plataforma Illumina.** (a) esquema do sequenciamento. (b) foto de uma lâmina (*flow cell*). Para cada biblioteca, foram gerados dois resultados (*paired end reads*): R1, com seqüências antissenso à predição gênica de *A. aegypti* publicada; e R2 com as seqüências senso.

### **3.2.5 Avaliação da qualidade dos reads**

A análise dos dados de transcriptoma de nossas amostras foi realizada em um servidor supermicro 256 GB de memória e 6 TB de HD, usando o Linux Debian 8. Algumas exceções foram devidamente sinalizadas ao longo do texto.

Para a verificação da qualidade dos *reads*, foi usado o programa FastQC

(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/download.html#fastqc>), com parâmetros *default*. Uma etapa de verificação da existência de contaminantes nos *reads* também foi feita com o auxílio do FastQC. Para isso, foi inserida uma listagem com as seqüências dos adaptadores *Illumina*, para que o programa rastreasse sua presença.

### **3.2.6 Limpeza dos reads**

A limpeza dos *reads* é uma etapa importante, uma vez que previne montagens errôneas, provocadas pela existência de trechos de adaptadores usados na reação do sequenciamento. Esta etapa foi realizada com o auxílio do programa Cutadapt (<https://pypi.python.org/pypi/cutadapt>).

Primeiramente, foi avaliado se os *kmers* (*kmer* se refere a todas as possíveis subsequências contidas nos *reads* oriundos de um sequenciamento) mais representativos (relatados pelo FastQC) correspondiam a contaminantes. Essa pesquisa revelou a ocorrência do *kmer* 'AGATCGG' no início de alguns *reads* R1 e ao final dos R2, estando também presente na sequência de alguns adaptadores Illumina usados para o sequenciamento.

Com isso, informou-se ao Cutadapt dois trechos de 22 nucleotídeos presentes em sequências de adaptadores, que continham o *kmer* supracitado. Foi também inserida a sequência reversamente complementar ao adaptador contaminante detectado nas bibliotecas R1, na limpeza das bibliotecas R2, e vice-versa. Com isso, foram incluídas as sequências 1 e 2 abaixo descritas, para a limpeza dos *reads* de R1, e as sequências 3 e 4 para a limpeza dos *reads* de R2:

- 1: GATCGGAAGAGCACACGTCTGA
- 2: CTACACGACGCTCTTCCGATCT
- 3: AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAG
- 4: TCAGACGTGTGCTCTTCCGATC

Uma vez que tal limpeza poderia render *reads* menores que 90 bases de extensão, mas que, ainda assim, seriam informativos e confiáveis, optou-se por considerar *reads* que tivessem comprimento mínimo de 50 nucleotídeos. Além disso, foram indicados: *cutoff* de qualidade mínima das bases (*Phred score*) igual a 32, e a possibilidade do Cutadapt poder cortar as duas sequências dos adaptadores citados (duas para R1 e duas distintas para R2) caso fossem encontradas em um mesmo *read* (no modo *default*, ocorre, no máximo, a remoção de um adaptador).



### **3.2.7 Alinhamento dos reads nos genes preditos de *A. aegypti***

Para avaliar quais genes eram expressos em cada amostra, e também o quão expressos estavam sendo, utilizou-se a predição gênica de referência (versão 3.3) do site *Vector Base*. O alinhamento dos *reads* R1 e R2, de cada biblioteca, aos genes preditos do vetor usou como *input* os arquivos na extensão '*fastq*' gerados pelo Cutadapt. Nessas análises foi usado o programa Bowtie2 versão 2.2.9 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>), com a opção de alinhamento estratificado e erro máximo de 5%. Esta opção divide o alinhamento em etapas, onde um *read* só é analisado na etapa de alinhamento com mais erro se a etapa mais precisa não tiver dado resultados para aquele *read* (Langmead & Salzberg, 2012).

### **3.2.8 Remoção da duplicidade dos reads por biblioteca (R1 + R2 = R3)**

Foi montado um script para remover a duplicidade de informação dos '*paired end reads*' das bibliotecas que haviam sido alinhadas na etapa anterior, transformando a informação *paired* em *single*. O script ('*Unique script*' - em linguagem *Perl*) considerou todos os *reads* alinhados de R1, acrescidos dos *reads* de R2 somente quando o R1 correspondente não havia alinhado. Os *reads* R2 usados foram transformados em sua sequência reversa-complementar, para que todos os *reads* tivessem a mesma orientação de R1. Esta etapa foi importante, pois os programas subsequentes não conseguem contar corretamente os índices de expressão de genes usando dados de R1 e R2. A contagem de uma "unidade de expressão" para cada transcrito alinhado, não pode usar R1 e R2, portanto, tivemos que contar R1 ou R2.

### **3.2.9 Alinhamento dos reads R3 nos genes de *A. aegypti***

Os *reads* (R3) foram realinhados com os genes preditos de *A. aegypti* como descrito no item 'Alinhamento dos reads nos genes preditos de *A. aegypti*'.

### **3.2.10 Contagem dos reads e resolução de ambiguidade de mapeamento de reads**

A contagem dos *reads* mapeados em cada gene foi feita pelo programa eXpress versão 1.5.1 (<http://bio.math.berkeley.edu/eXpress/>). Este aplica um alinhamento probabilístico altamente eficiente para mapeamentos ambíguos de fragmentos sequenciados (aqueles que têm *reads* alinhados em mais de um gene) (Roberts e Pachter 2013). Assim, o eXpress proporciona a distribuição da contagem dos *reads* ambíguos, de acordo com a abundância dos genes onde alinharam, se for possível estimá-la pelos *reads* alinhados de maneira única, gerando uma contagem corrigida de *reads* mapeados.

### **3.2.11 Estatística: expressão gênica diferencial**

A contagem corrigida de cada gene em todas as bibliotecas foi adicionada em uma tabela em formato texto pelo script *eXpress2edgeR* (em linguagem *Perl*). Uma segunda tabela foi feita manualmente, e continha informações de nome e tamanho das bibliotecas a serem comparadas. A estatística da expressão gênica diferencial foi feita com o auxílio do programa edgeR (pacote estatístico R) versão 3.16.5 (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>), sempre em comparações binárias (controle x experimental). A expressão mínima de 0,2 CPM (*counts per million*) foi utilizada como corte, sendo excluídos os genes que apresentaram expressão menor que esta em todas as bibliotecas. Somente as expressões diferenciais com FDR (*false discovery rate*) inferior a 5% foram consideradas.

### **3.2.12 Categorização da transcrição diferencial**

Para clusterização dos genes diferencialmente expressos ('genes DE') foi utilizado o programa Expander versão 7.11 (<http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/>), para *Windows*. Uma tabela foi gerada pela aplicação do script *eXpress2Expander* (em linguagem *Perl*) contendo a média do FPKM (do inglês '*Fragments Per Kilobase of exon per Million reads*

*mapped*) das réplicas de cada condição, mas apenas para os genes considerados como DE na análise anterior. Foram feitas duas análises no Expander, a clusterização hierárquica e a clusterização pelo algoritmo *click*, ambas no sentido de descobrir que genes tinham o mesmo perfil de alteração de expressão gênica, classificando-os em um mesmo grupo.

Uma vez que se admite que estes dois algoritmos possam gerar erros pontuais, posteriormente foi feita uma comparação manual entre os dois resultados, de modo a validar os clusters gerados pelo algoritmo *click*, e também para propor outros clusters que se mostrassem pertinentes.

### **3.2.13 Enriquecimento funcional da transcrição diferencial**

O enriquecimento funcional dos genes DE usou buscas por similaridade (BLAST) de sequências proteicas, o que exigiu a extração das sequências polipeptídicas de interesse do arquivo contendo todas as proteínas preditas no genoma (promovida pelo script *extractSEQtoMULTIFASTA\_blastlist*). Com isso, para cada cluster que se dispunha, foi gerado um arquivo contendo todas as sequências polipeptídicas oriundas de seus 'genes DE'.

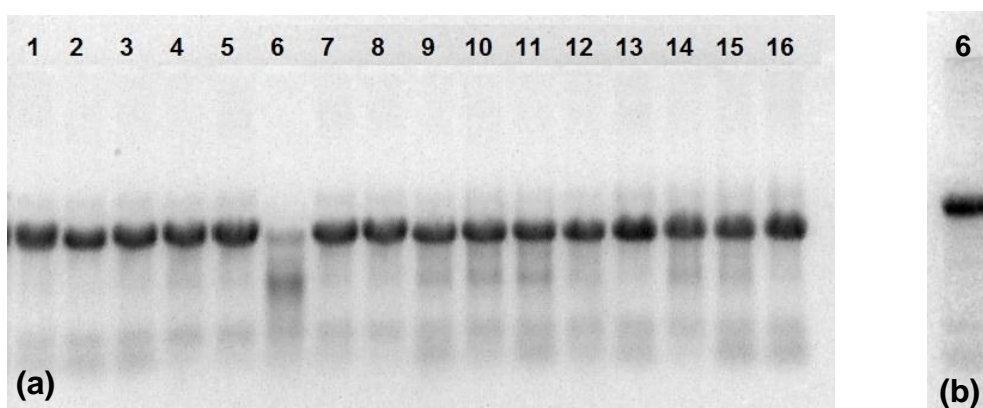
As análises posteriores contaram com o auxílio da professora Glória Regina Cardoso Braz do Instituto de Química da UFRJ. Nesta etapa foram feitas buscas contra diferentes bancos de dados: ARTHROPODA; REFSEQ-INVERTEBRATE protein [NCBI Reference Sequence Database]; REFSEQ-VERTEBRATES protein [também uma NCBI Reference Sequence Database]; GO [Gene Ontology]; SWISS-PROT [banco que contém informações funcionais de proteínas]; CDD [Conserved Domain Database]; PFAM [protein families]; KOG [EuKaryotic Orthologous Groups]; SMART [Simple Modular Architecture Research Tool]).

Foi então aplicado o programa *Classifier*, elaborado pelo pesquisador do NIAID/NIH José Marcos C. Ribeiro, que classifica cada transcrito de acordo com as funções das sequências mais similares reportadas com base no *score* e no *e-value* observados. Posteriormente, as funções de cada transcrito foram inseridas no programa *Table Maker* (versão oct2011), que gerou uma tabela que norteou a construção dos gráficos de enriquecimento funcional elaborados no estudo.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Extrações de RNA

A extração de RNA total das amostras (discriminadas na Tabela 3.1) foi seguida de verificação de sua pureza e integridade. Primeiramente, foi realizada eletroforese do material extraído (Figura 3.3a).



**Figura 3.3. Corrida eletroforética das amostras das populações de *A. aegypti* estudadas.** Gel de agarose 1% que usou azul de bromofenol para verificar a migração dos nucleotídeos e *gel red* como agente intercalante de nucleotídeos. (a) todo material extraído inicialmente. (b) repetição da extração de RNA da amostra seis (6).

Não foi detectada a banda do RNA ribossomal 28S, o que está de acordo com o que é relatado na literatura para *A. aegypti*, que assim como na maioria dos insetos, está sujeito ao fenômeno *'hidden break'*: a fração 28S tende a se quebrar e a migrar próximo da 18S (Macharia et al. 2015; ver Figura 3.4). Além disso, observamos que a amostra de número seis (6) apresentou apenas um rastro sugestivo de degradação de RNAs, e por isso todo o procedimento foi repetido com outro pool desta amostra (pool sinalizado na Tabela 3.1). A partir de então, todos os demais procedimentos foram feitos com este segundo pool da amostra seis, cujo RNA total extraído se mostrava íntegro.

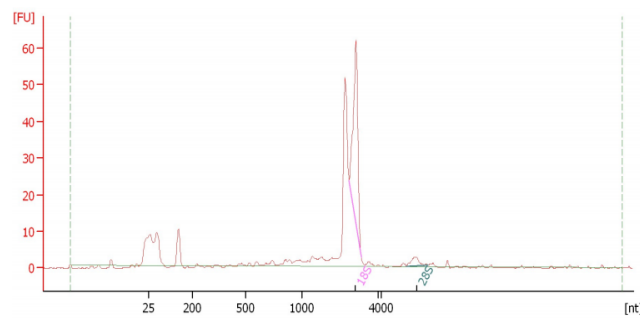
**Tabela 3.2. Quantificações das amostras extraídas, em Nanodrop.**

<u>Sample ID</u>	<u>Conc. ng/uL</u>	<u>A260</u>	<u>A280</u>	<u>260/280</u>	<u>260/230</u>
1	9707,0	242,676	116,218	2,09	1,84
2	5207,5	130,187	64,756	2,01	2,03
3	8940,9	223,522	106,879	2,09	1,91
4	10984,6	274,616	131,715	2,08	1,92
5	11494,1	287,353	138,321	2,08	2,20
6	9653,2	241,331	115,829	2,08	2,18
7	12071,5	301,786	145,975	2,07	2,08
8	11578,7	289,469	139,359	2,08	2,10
9	10776,7	269,416	129,057	2,09	2,23
10	11384,4	284,611	137,323	2,07	2,13
11	9920,2	248,004	118,803	2,09	2,19
12	9474,7	236,866	112,884	2,10	2,16
13	8718,9	217,971	104,241	2,09	2,12
14	10909,9	272,747	131,636	2,07	1,73
15	8096,0	202,401	96,724	2,09	2,14
16	8271,8	206,795	98,306	2,10	2,22

A260: absorvância em 260 nm (nanômetros; quantifica nucleotídeos). A280: absorvância em 280 nm. As razões entre as absorvâncias 260/280 e 260/230 são utilizadas, respectivamente, para estimar a proporção de proteínas e de fenol e outros contaminantes nas amostras.

As quantificações obtidas no Nanodrop (Tabela 3.2) indicaram baixa contaminação fenólica e/ou por proteínas. Com isso, passou-se então a confirmar as quantificações e a integridade do RNA total extraído em Bioanalyzer - equipamento que usa fluorescência e eletroforese capilar, sendo considerado mais sensível e acurado para tais análises. A Figura 3.4 mostra o eletroesferograma da amostra 2, que é representativo de todas as outras amostras, uma vez que estas renderam perfis de separação eletroforética similares. De fato, tais eletroesferogramas obtidos em Bioanalyzer expressam uma resolução maior do que a observada no gel de agarose da Figura 3.3.

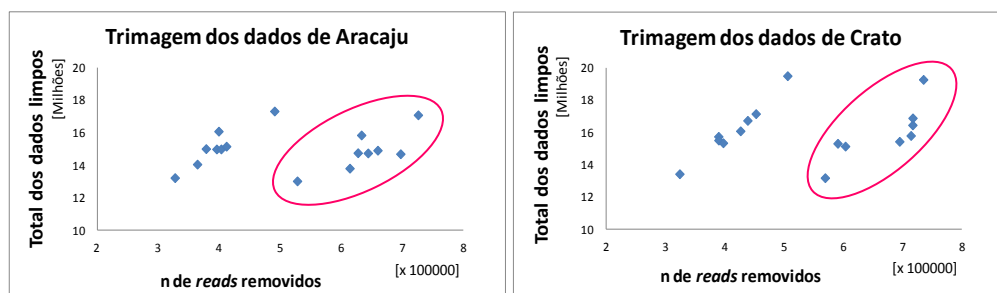
Uma vez que os resultados de Nanodrop e Bioanalyzer apontaram que as extrações foram bem sucedidas, sem evidências de degradação de RNA ou qualquer contaminação, as 16 amostras seguiram para a etapa de construção das bibliotecas e posterior sequenciamento, ambos executados pelo Centro de Genômica Funcional ESALQ-USP.



**Figura 3.4. Eletroferograma observado em Bioanalyzer para a amostra dois (2).** [FU]: unidade de fluorescência relativa.

### **3.3.2 Sequenciamento e mapeamento dos reads**

Mais de 510 milhões de *reads* de cDNA com 100 pb (pares de bases) foram sequenciados ao total. Cada amostra foi sequenciada duas vezes, em sentidos opostos, o que rendeu uma média de 32,1 milhões de *reads* por biblioteca. A limpeza dos *reads* de baixa qualidade e contaminados determinou a retirada de uma média de 529,882 (SD 138,075) *reads* por biblioteca. Assim como mostrado na Figura 3.5, as bibliotecas R2 foram as que tiveram o maior número de *reads* removidos (em rosa).

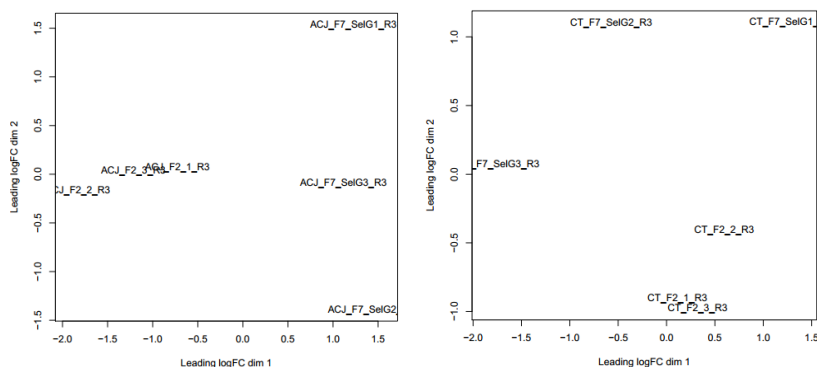


**Figura 3.5. Volume de dados limpos por biblioteca.** Relação entre o tamanho de cada biblioteca e a quantidade de *reads* subtraídos após limpeza. São visualizados dois diferentes grupos de bibliotecas, nas duas populações de campo. As bibliotecas R2 estão marcadas em rosa.

Foram mapeados todos os *reads* limpos das bibliotecas R1 e R2 contra as regiões codificantes (CDS) dos genes preditos de *A. aegypti* (versão 3.3; Vector Base). Todos os *reads* oriundos de R1 que mapearam com sucesso foram usados, acrescidos dos *reads* mapeados de R2 somente se seu par em

R1 não tivesse sido mapeado. Essa estratégia rendeu um mapeamento básico de 90% dos *reads* R1, suplementado com cerca de 1,5% dos *reads* R2.

Conforme esperado, as réplicas biológicas mantidas no laboratório de forma isolada dispersaram mais do que as réplicas das amostras iniciais das duas populações, o que pode ser visualizado nos gráficos da Figura 3.6. Uma vez que a grande dispersão observada para algumas réplicas de determinadas condições (condição de seleção, por exemplo) poderia dificultar a detecção de diferenças de expressão, optou-se pela retirada de algumas bibliotecas das análises de expressão diferencial, como Aracaju F2\_2 e F7\_SelG1, e Crato F2\_2 e F7\_SelG3.



**Figura 3.6. Dispersão das bibliotecas de Aracaju e Crato.** Os gráficos se baseiam nas diferenças globais de log FC (do inglês '*log Fold Change*'; unidade que mede as alterações de expressão em escala logarítmica). ACJ: Aracaju. CT: Crato.

Além disso, foram detectados sinais de transcrição para uma média de 79,7% (SD=0,7) dos genes preditos para o modelo de estudo adotado.

### **3.3.3 Transcrição diferencial em Aracaju**

Como as bibliotecas tinham tamanho em torno de 13-17 milhões de *reads*, as análises de transcrição diferencial foram feitas com os genes cuja soma das contagens ('*counts*'), nas duas réplicas biológicas consideradas, foi maior que dois (2) *reads* (equivalente a 0,2 CPM). Com isso, em Aracaju, foram

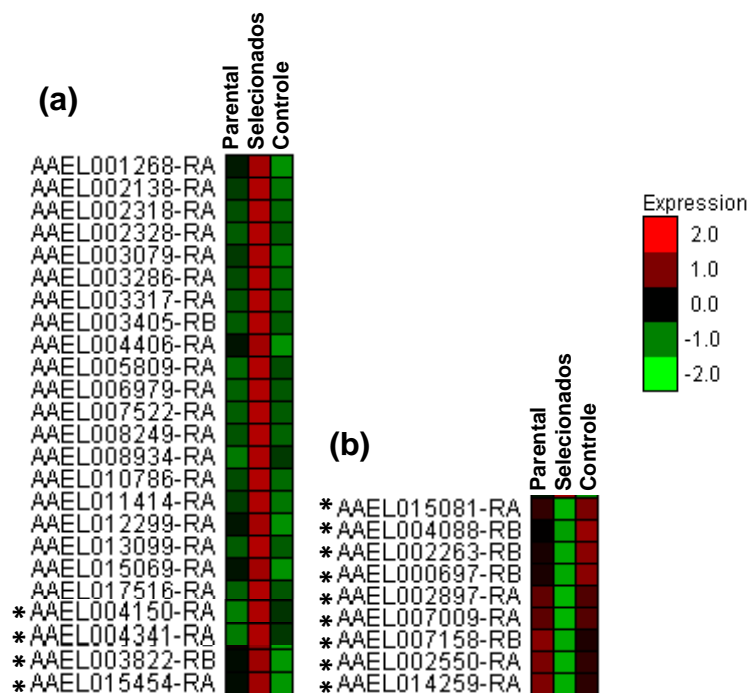
considerados de 14.134 a 14.186 transcritos nestas análises, dependendo da biblioteca. Em tentativa de determinar diferenças de expressão que tivessem, de fato, significância biológica, além da diferença estatisticamente suportada, foram utilizados filtros considerando apenas as diferenças com menos de 5% FDR e  $\log_{2}FC \geq 2$ , o que rendeu um total de 374 transcritos DE (~2,6%) nesta população.

Análises de clusterização hierárquica e também de agrupamento pelo algoritmo *Click*, baseadas nos índices de transcrição dos genes DE de Aracaju foram feitas. Estas análises evidenciaram um total de sete (7) diferentes clusters. No entanto, a comparação manual dos resultados das duas abordagens analíticas permitiu incluir 16 dos 26 'singletons' (que seriam os genes que ficaram fora dos clusters propostos pela aplicação do algoritmo *Click*) de Aracaju e determinar a presença de mais um (1) cluster na população. Estes estão sinalizados ao longo das Figuras 3.7 a 3.10 (*heatmaps* em verde e vermelho) e no Anexo C (*heatmaps* em azul e amarelo – mais adequados à visualização de dautônicos).

#### Aracaju: efeitos da seleção com o organofosforado malathion

A seleção com o malathion foi capaz de, significativamente, aumentar a expressão de 24 genes (Figura 3.7a) e de reduzir a expressão de outros nove (9) genes (Figura 3.7b). Este último cluster foi construído manualmente por genes não agrupados pelas metodologias automáticas.





**Figura 3.7. Transcrição diferencial em decorrência da seleção com o malathion, em Aracaju.** (a) *heatmap* de genes com expressão aumentada. (b) *heatmap* de genes com expressão diminuída. A escala de cores do *heatmap* significa log<sub>2</sub> do FPKM. \*Genes que foram incluídos manualmente aos *clusters*.

### Aracaju: efeitos da manutenção em laboratório

Os dados apontam que a manutenção em laboratório, em ambiente livre de inseticidas, foi capaz de elevar significativamente a transcrição de 157 genes de Aracaju (Figura 3.8a) – este foi o maior dos clusters desta população. Além disso, houve diminuição da expressão de 30 genes (Figura 3.8b).

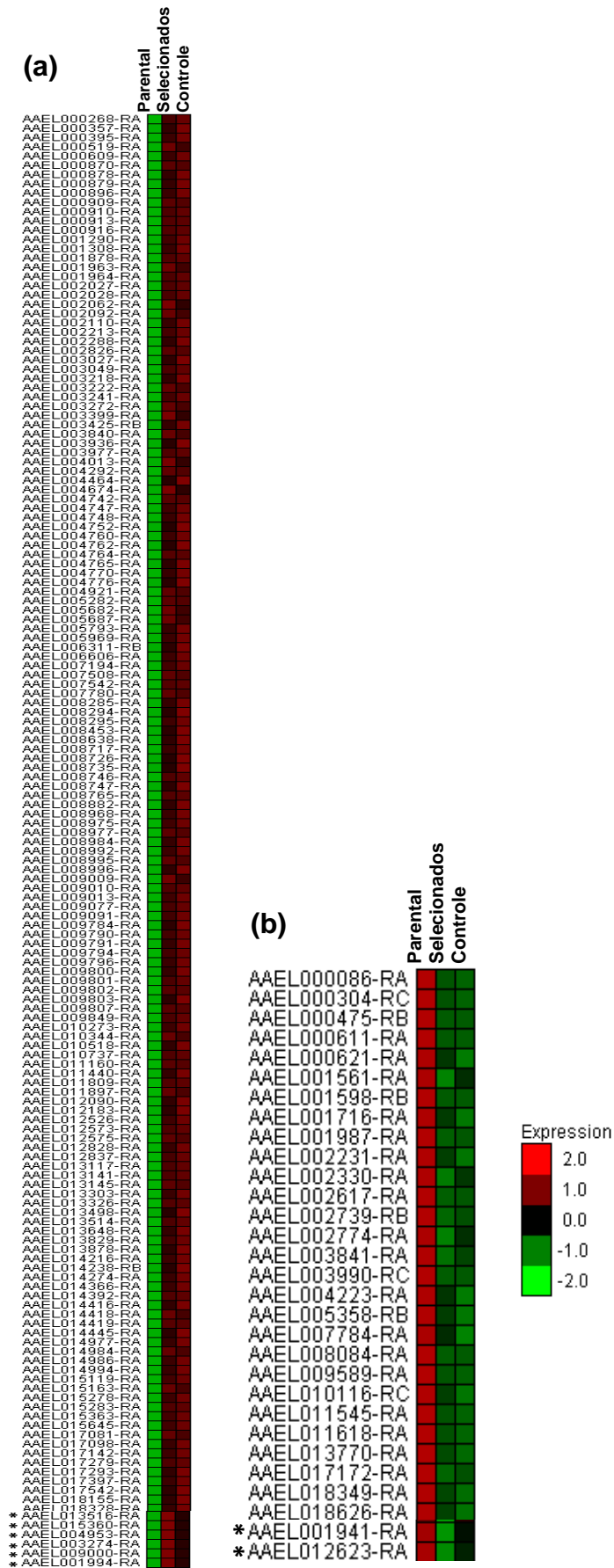


Figura 3.8. Transcrição diferencial em decorrência da manutenção em laboratório, em Aracaju: (a) *heatmap* de genes com expressão aumentada. (b) *heatmap* de genes com expressão diminuída. A escala de cores do *heatmap* significa log<sub>2</sub> do FPKM. \*Genes que foram incluídos manualmente aos *clusters*.

Considera-se que estes clusters poderiam refletir a adaptação à criação em laboratório, uma vez que foram identificadas diferenças marcadas entre Aracaju F2 (Parental) e as amostras mantidas em condições de laboratório até a geração F7 (Selecionadas e Controle), independentemente do contato com o inseticida.

Aracaju: efeitos duplos (manutenção em laboratório + seleção com malathion)

Foram também observadas alterações de expressão gênica que ocorreram tanto nas amostras controle quanto nas selecionadas. Muitos dos genes tidos como DE em Aracaju apresentaram alterações desse tipo, que foram aqui referidas como '*Efeitos duplos*'. Notaram-se ainda, dois tipos de alterações de expressão: 1) *cluster* em que o efeito da manutenção em laboratório e seleção por inseticida foi aditiva, levando a um aumento de expressão gênica progressiva entre os grupos (Figura 3.9a), e 2) *clusters* onde os efeitos foram opostos, ou seja, a presença do inseticida foi capaz de contrapor o efeito da manutenção em laboratório (Figura 3.9b-c).

Foram observados 11 genes com expressão aumentada de forma aditiva (Figura 3.9a), e 72 genes cujo aumento na expressão no grupo controle (em relação ao parental) foi parcialmente revertido pela seleção com malathion (Figura 3.9b). Além disso, notaram-se 30 genes que diminuíram sua expressão no grupo controle, mais que no grupo selecionado (Figura 3.9c).

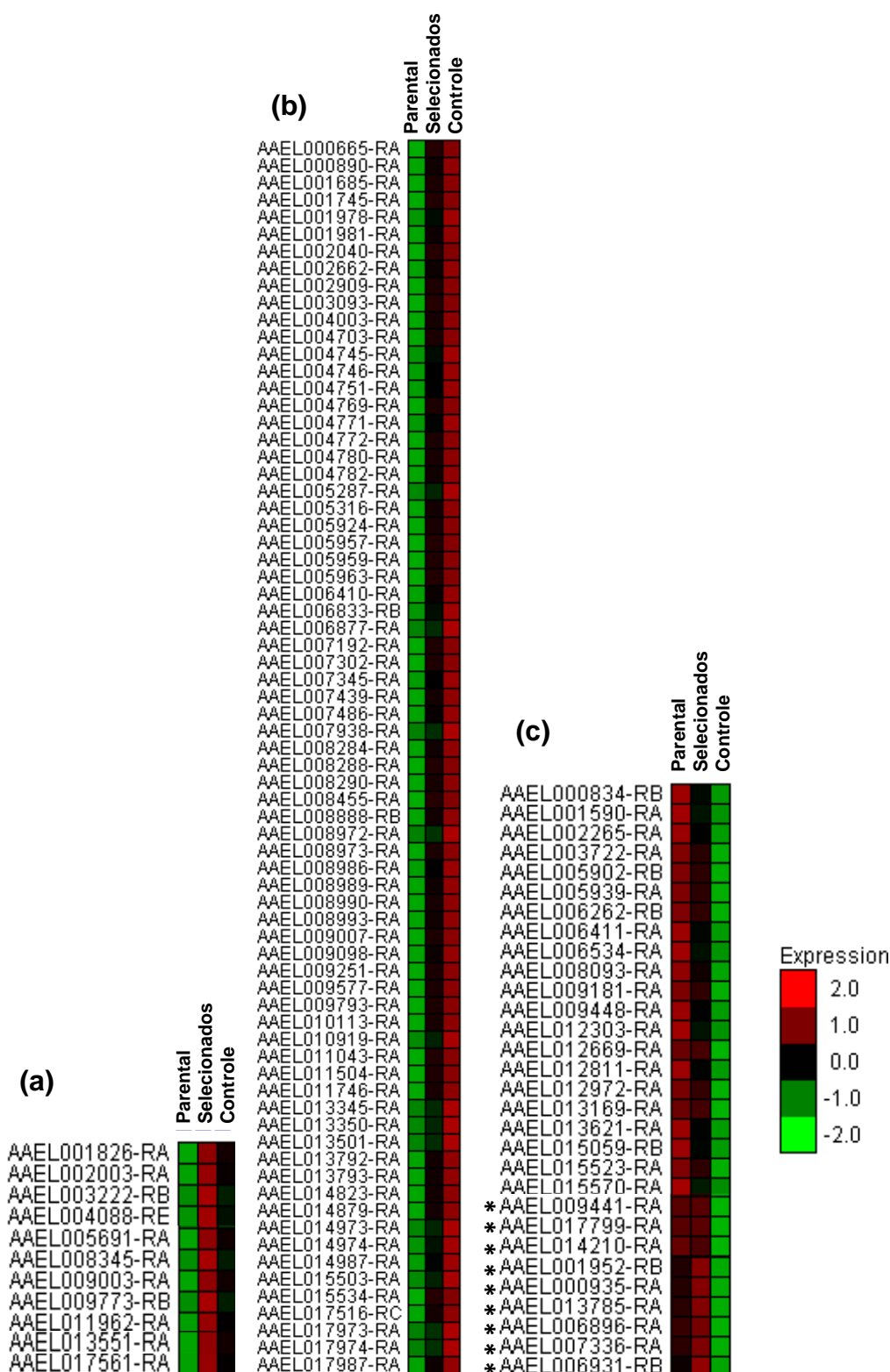
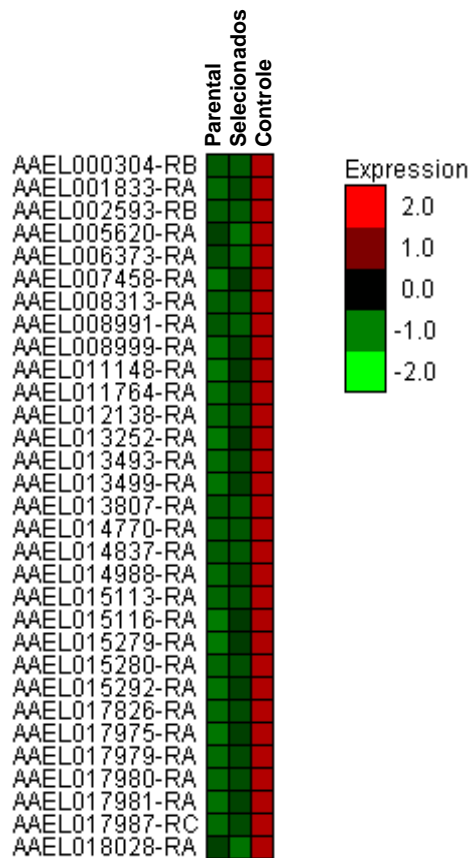


Figura 3.9. Transcrição diferencial em decorrência da seleção com o malathion e da manutenção em laboratório, em Aracaju. (a) *heatmap* de genes com expressão aumentada com efeitos aditivos em relação ao parental. (b) *heatmap* de genes com expressão aumentada em relação ao parental, mas com efeitos antagônicos. (c) *heatmap* de genes com expressão diminuída em relação ao parental, mas com efeitos antagônicos. A escala de cores do *heatmap* significa log<sub>2</sub> do FPKM. \*Genes que foram incluídos manualmente aos *clusters*.

Aracaju: efeitos da manutenção em laboratório completamente revertidos pela seleção com malathion

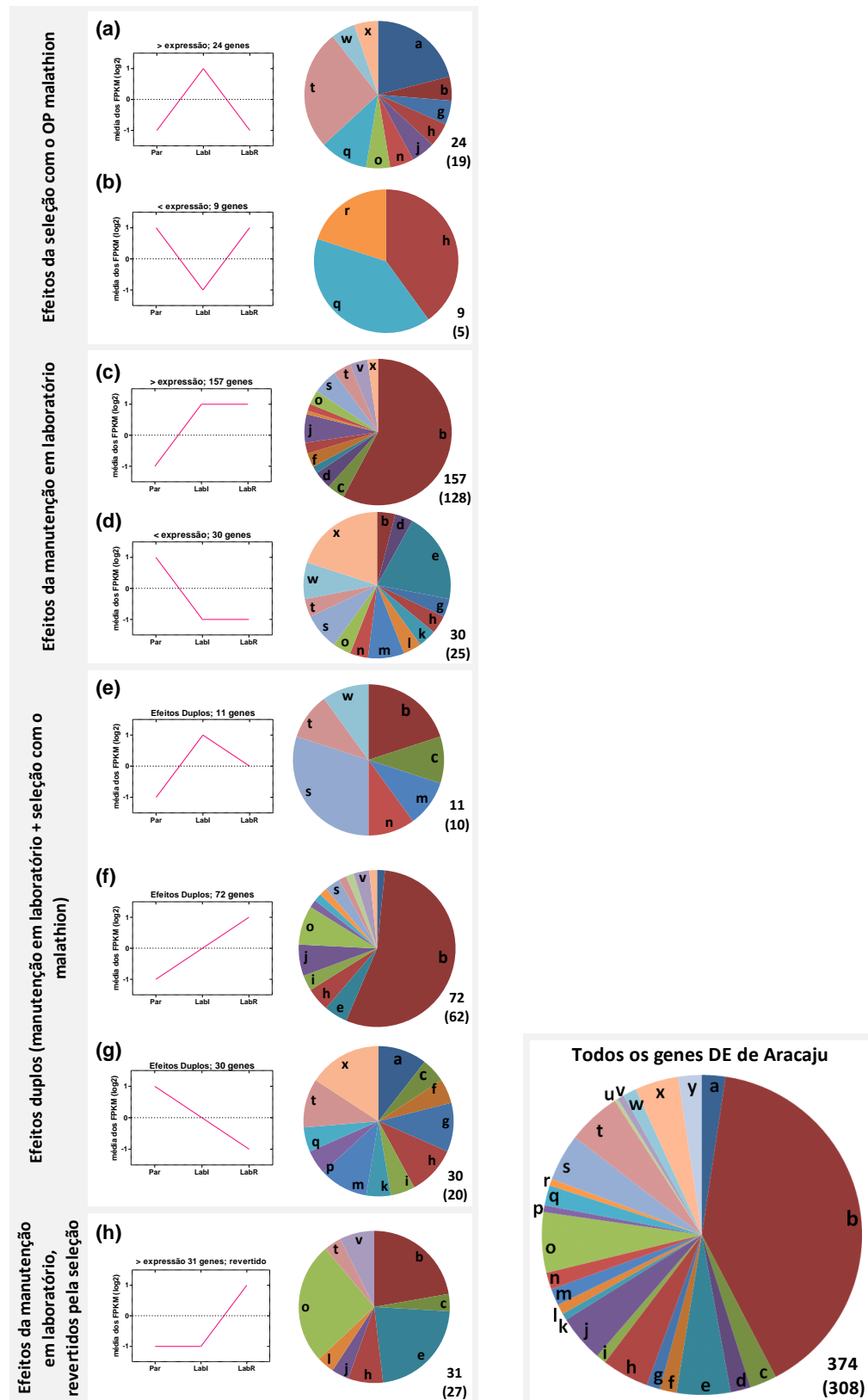
Os dados apontam que a manutenção em laboratório, em ambiente livre de inseticidas, foi capaz de elevar significativamente a transcrição dos 31 genes de Aracaju mostrados no 'heat map' abaixo (Figura 3.10). No entanto, existe a possibilidade de este efeito ter sido completamente revertido pela seleção com o malathion promovida em laboratório, uma vez que a expressão nestes espécimes foi similar à parental (geração F2).



**Figura 3.10.** Transcrição diferencial em decorrência da manutenção em laboratório, com reversão completa nas amostras selecionadas com malathion, em Aracaju. *Heatmap* de genes com expressão aumentada. A escala de cores do *heatmap* significa log2 do FPKM.

### **3.3.4 Anotação funcional dos genes DE de Aracaju**

A classificação dos genes DE de Aracaju em categorias biológicas revelou o marcado enriquecimento de proteínas relacionadas à cutícula nas amostras. A maioria dos genes cuticulares mostrou aumento de expressão independente de pressão seletiva com inseticida (74 genes, 20%; Figura 3.11c, painel da direita), enquanto outros mostraram aumento que foi parcialmente (34 genes, 9%; Figura 3.11f, painel da direita) ou completamente revertido (6 genes, 2%; Figura 3.11h, painel da direita) pela seleção com malathion. Um número bem pequeno de genes cuticulares teve sua expressão aumentada tanto pela manutenção em laboratório como pela seleção com inseticida (2 genes, 0,5%; Figura 3.11e, painel da direita). Além disso, é relevante mencionar que, de todos os genes DE de Aracaju, 64 eram transcritos desconhecidos conservados, e dois desconhecidos (ver Tabelas de anotação funcional no Anexo D para detalhes).



**Figura 3.11. Anotação funcional dos genes DE de Aracaju.** Os gráficos de pizza descrevem a anotação funcional de cada cluster, baseado no número de transcritos relacionados a cada função. O número total de genes constituindo os clusters é indicado à direita, fora da pizza, assim como o número de transcritos com funções preditas (entre parênteses). As letras presentes em cada fatia da pizza auxiliam a leitura da escala de cores. Par: grupo parental (F2). LabI: grupo selecionado com malathion; LabR: grupo controle.

Entre os genes mais expressos nas amostras de Aracaju selecionadas com malathion, há cinco proteínas de transdução de sinais (dentre elas, uma acetilcolinesterase/butirilcolinesterase) e quatro de citoesqueleto. Por outro lado, dos nove genes que foram menos expressos nos grupos selecionados, há duas proteínas da maquinaria de síntese proteica e duas de metabolismo energético.

Em ambiente de laboratório, com ou sem inseticida, tiveram sua expressão aumentada oito proteínas de metabolismo de lipídeos, sete proteínas ligadoras de odor (*'odorant binding proteins'*) e cinco detoxificadoras (Figura 3.11c, painel da direita). Dentre as que tiveram expressão mais baixa, foram encontradas cinco proteínas de imunidade e da maquinaria de transcrição, além da existência de duas proteínas ligadoras de odor e uma proteína cuticular (Figura 3.11d, painel da direita).

Assim como previamente pontuado, dentro da categoria de 'efeitos duplos' observaram-se dois subgrupos, o de efeitos aditivos entre a manutenção em laboratório e a seleção com malathion (Figura 3.11e) que apresenta 11 genes mais expressos. Dentre estes genes DE há três proteínas ligadoras de odor, duas proteínas cuticulares (já mencionadas) e uma oxidase de função múltipla (*'Mixed Function Oxidases'*; MFO). O subgrupo de efeitos antagônicos contém dois clusters que apresentaram alterações de expressão opostas em relação aos efeitos da manutenção em laboratório e da seleção com o malathion. Nele há o segundo maior cluster de Aracaju (Figura 3.11f) que apresentou aumento de expressão em relação à população parental. Nele também se revelou a presença de duas proteínas ligadoras de odor, duas *'heat shock proteins'* e uma acetilcolinesterase/butirilcolinesterase, além do enriquecimento bem marcado de proteínas cuticulares já mencionado anteriormente. O outro cluster apresentou redução da expressão em relação à geração parental (Figura 3.11g). A análise de enriquecimento funcional deste *cluster* revelou a existência de três proteínas participantes da maquinaria de transcrição, e de uma proteína detoxificadora monooxigenase que contém flavina (que atua de forma semelhante às MFO, mas que usa FAD para oxidar e não um grupamento prostético heme), dentre outras proteínas.

Dentre os genes que foram superexpressos nas amostras controle e cujo padrão de maior expressão foi potencialmente revertido pela seleção com



o malathion (Figura 3.11h), há sete que codificam proteínas da maquinaria de modificação proteica (dentre estas estão quatro ‘*heat shock proteins*’), seis proteínas cuticulares (já comentadas anteriormente) e de imunidade, além da existência de uma MFO e uma proteína induzível por hormônio juvenil.

As tabelas de anotação funcional dos transcritos DE de Aracaju constam no Anexo D.

### **3.3.5 Transcrição diferencial em Crato**

Como as nossas bibliotecas tinham tamanho em torno de 13-19 milhões de *reads*, as análises de transcrição diferencial foram feitas com os genes cuja soma das contagens (*counts*), nas duas réplicas biológicas consideradas, foi maior que dois (2) *reads* (equivalente a 0,2 CPM). Com isso, em Crato, foram considerados de 14.001 a 14.105 transcritos em tais análises, dependendo da biblioteca. Em tentativa de determinar diferenças de expressão que tivessem, de fato, significância biológica, além da diferença estatisticamente suportada, foram utilizados filtros considerando apenas as diferenças com menos de 5% FDR e  $\log_{2}FC \geq 2$ , o que rendeu um total de 143 transcritos (~1%) considerados diferencialmente expressos (DE) em Crato.

Análises de clusterização hierárquica e também de agrupamento pelo algoritmo *Click*, baseadas nos índices de transcrição dos genes DE de Crato, foram feitas. Estas análises evidenciaram um total de quatro (4) diferentes clusters em Crato. No entanto, a comparação manual dos resultados das duas abordagens analíticas permitiu incluir 25 dos 28 ‘*singletons*’ de Crato e distinguir mais um (1) cluster nesta população. Estes estão sinalizados ao longo das Figuras 3.12 a 3.15 (*heatmaps* em verde e vermelho) e no Anexo C (*heatmaps* em azul e amarelo – mais adequados à visualização de dautônicos).

### Crato: efeitos da seleção com o organofosforado malathion

A seleção com malathion aumentou de forma significativa a expressão de 31 genes (Figura 3.12a); e reduziu significativamente a expressão de outros 11 genes (Figura 3.12b). Este último cluster foi construído manualmente utilizando genes não clusterizados de forma automática.

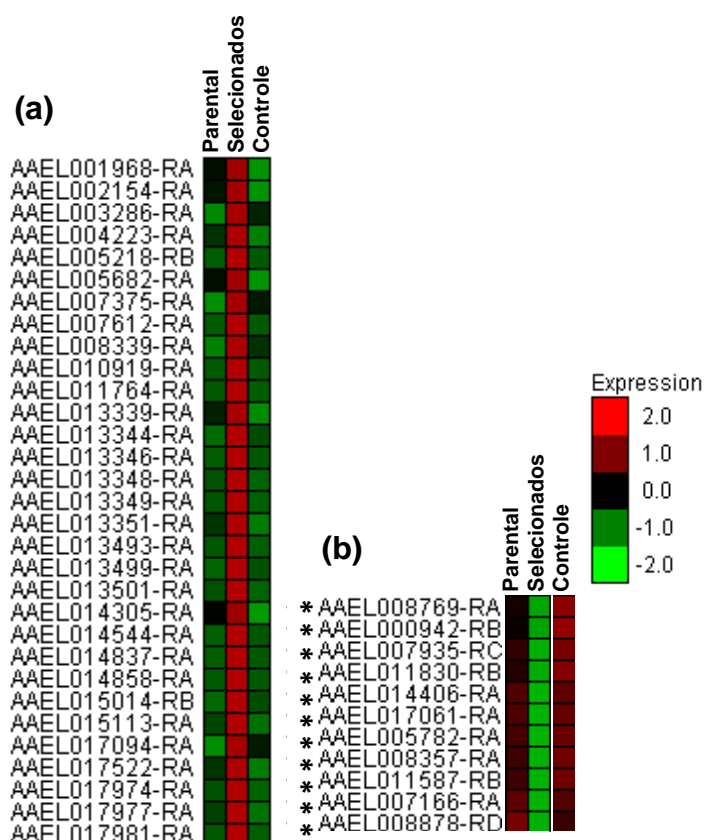
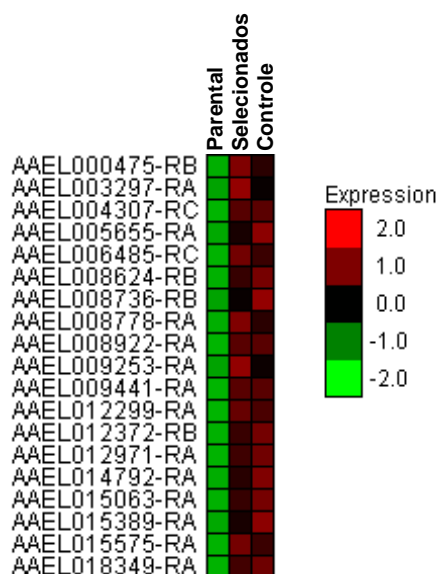


Figura 3.12. Transcrição diferencial em decorrência da seleção com o malathion, em Crato. (a) *heatmap* de genes com expressão aumentada. (b) *heatmap* de genes com expressão diminuída. A escala de cores do *heatmap* significa log<sub>2</sub> do FPKM. \*Genes que foram incluídos manualmente aos *clusters*.

### Crato: efeitos da manutenção em laboratório

Foram observados 19 genes cuja expressão foi aumentada nas amostras mantidas em laboratório, com pouca influência da seleção por malathion (Figura 3.13).



**Figura 3.13. Transcrição diferencial em decorrência da manutenção em laboratório, em Crato.** *Heatmap* de genes com expressão aumentada. A escala de cores do *heatmap* significa log<sub>2</sub> do FPKM.

Considera-se que este cluster poderia refletir a adaptação à criação em laboratório, uma vez que foram identificadas diferenças marcadas entre o grupo parental (F2) e as amostras que foram mantidas em condições de laboratório até a geração F6/F7, independente do contato com malathion.

*Crato: efeitos duplos (manutenção em laboratório + seleção com malathion)*

Em Crato também foram observadas alterações de expressão gênica que ocorreram tanto nas amostras controle quanto nas selecionadas. Foram identificados, ao todo, 36 genes que tiveram sua expressão diminuída nas amostras mantidas em laboratório, sendo este declínio parcialmente revertido no grupo selecionado (Figura 3.14). 14 ‘*singletons*’ foram incluídos a este subgrupo após a conferência manual das análises de agrupamento realizadas, sendo representados no ‘*heat map*’ abaixo.

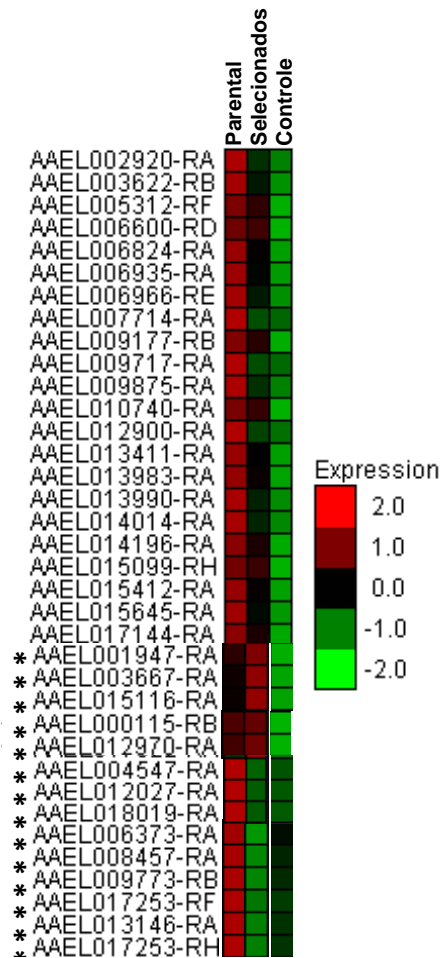
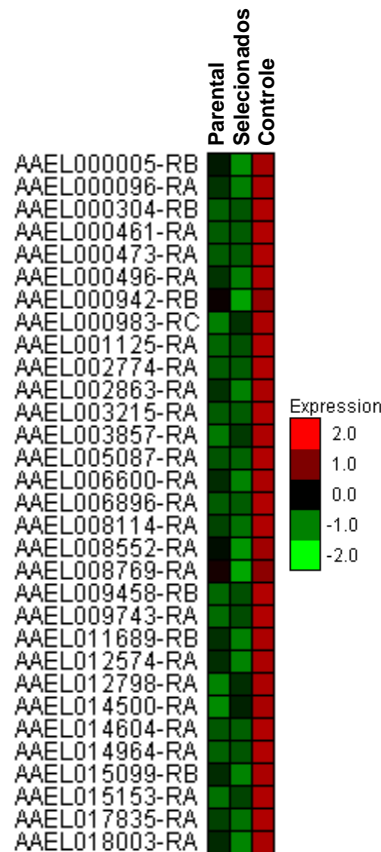


Figura 3.14. Transcrição diferencial em decorrência da seleção com o malathion e da manutenção em laboratório, em Crato: *Heatmap* de genes com expressão diminuída em relação ao parental, mas com efeitos antagônicos. A escala de cores do *heatmap* significa log<sub>2</sub> do FPKM. \*Genes que foram incluídos manualmente aos *clusters*.

Crato: efeitos da manutenção em laboratório completamente revertidos pela seleção com o malathion

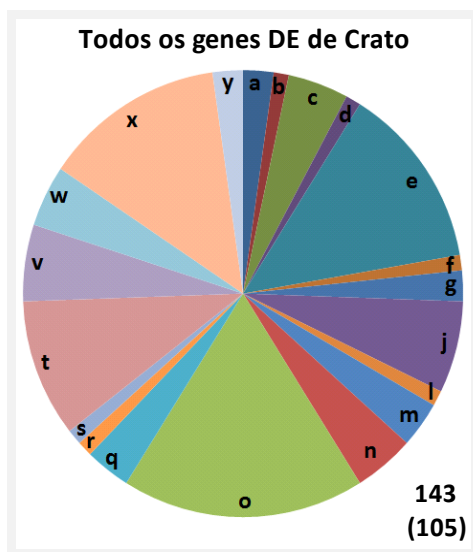
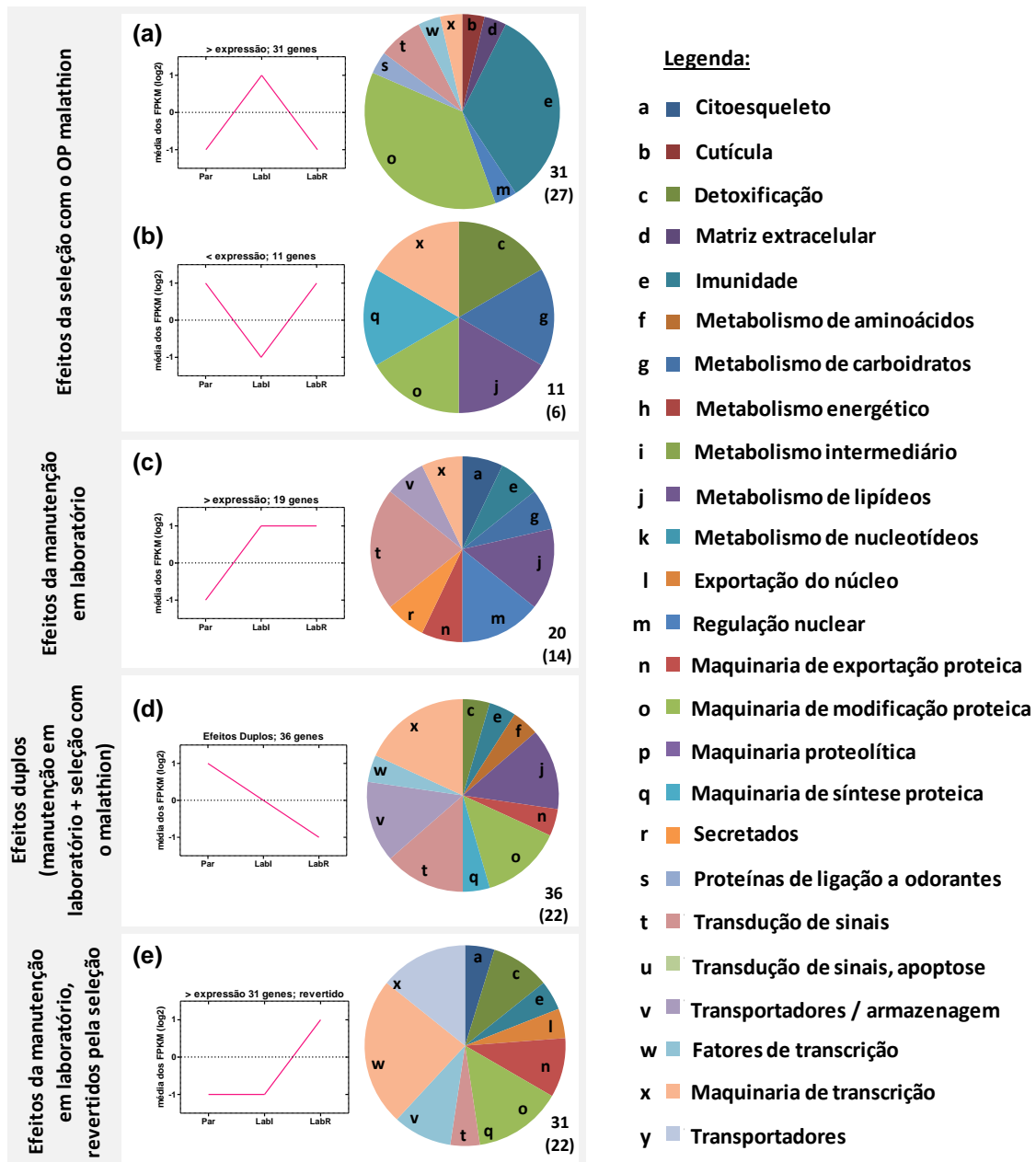
Os dados apontam que a manutenção em laboratório, em ambiente livre de inseticidas, foi capaz de elevar significativamente a transcrição dos 31 genes de Crato mostrados (Figura 3.15). No entanto, este efeito foi revertido pela seleção com o malathion, uma vez que a expressão nessas amostras foi semelhante à parental (da geração F2).



**Figura 3.15. Transcrição diferencial em decorrência da manutenção em laboratório, com reversão completa nas amostras selecionadas com malathion, em Crato.** *Heatmap* de genes com expressão aumentada. A escala de cores do *heatmap* significa log2 do FPKM. \*Genes que foram incluídos manualmente aos *clusters*.

### **3.3.6 Anotação funcional dos genes DE de Crato**

A classificação dos genes DE de Crato em categorias biológicas revelou o enriquecimento de proteínas da maquinaria de modificação proteica, maquinaria de transcrição, imunidade e transdução de sinais (cada uma destas funções contou com aproximadamente 10% dos 143 genes DE em Crato; Figura 3.16). Além disso, é relevante mencionar que de todos os genes DE em Crato, 36 eram transcritos desconhecidos conservados, e dois foram desconhecidos (ver Tabelas de anotação funcional no Anexo E para detalhes).



**Figura 3.16. Anotação funcional dos genes DE de Crato.** Os gráficos de pizza descrevem a anotação funcional de cada cluster, baseado no número de transcritos relacionados a cada função. O número total de genes constituindo os clusters é indicado à direita, fora da pizza, assim como o número de transcritos com funções previstas (entre parênteses). As letras presentes em cada fatia da pizza auxiliam a leitura da escala de cores. Par: grupo parental (F2). Labl: grupo selecionado com malathion; LabR: grupo controle.

A seleção com o malathion, por outro lado, aumentou a expressão de 31 genes e diminuiu a de outros 11 genes. O primeiro *cluster* (Figura 3.16a) contém 10 proteínas da maquinaria de modificação proteica (tendo seis proteínas *Alpha-crystallins* e três '*heat shock proteins*'), nove de imunidade (sendo oito profenoloxidasas), além da existência de uma *proteína ligadora de odor*, uma proteína cuticular, dentre outras proteínas. Já o segundo *cluster* (Figura 3.16b) contém cinco proteínas desconhecidas conservadas, além de uma proteína detoxificadora MFO, dentre outras.

A manutenção em laboratório, com ou sem pressão com o inseticida, aumentou significativamente a expressão de 20 genes (Figura 3.16c). Dentre esses há seis proteínas desconhecidas conservadas, três que participam da transdução de sinais, além da existência de duas proteínas de metabolismo de lipídeos, duas de regulação nuclear, dentre outras proteínas.

O único *cluster* que representa os efeitos duplos em Crato apresenta 36 genes que foram menos expressos nas amostras laboratoriais, sendo a queda parcialmente revertida na seleção com malathion (Figura 3.16d). Este *cluster*, por sua vez, apresentou 13 proteínas desconhecidas conservadas, quatro da maquinaria de transcrição, além de três proteínas que participam do metabolismo de lipídeos, uma MFO (homóloga a CYP4g15 de *D. melanogaster*), dentre outras proteínas.

Dentre os 32 genes que estavam superexpressos na amostra controle e cujo padrão de maior expressão foi completamente revertido nas amostras selecionadas (Figura 3.16e), há cinco proteínas da maquinaria de transcrição, além de três proteínas transportadoras, duas detoxificadoras (uma MFO e uma proteína de resposta a estresse oxidativo), uma proteína de ligação ao fator *heat shock*, dentre outras.

As tabelas de anotação funcional dos transcritos DE de Crato estão no Anexo E.

### 3.4 Discussão (inicial)

A caracterização dos mecanismos de resistência é essencial para melhorar o manejo dos inseticidas. Os programas de monitoramento da resistência de *A. aegypti* contam hoje com metodologias moleculares bastante diretas para a determinação de alterações pontuais no sítio-alvo dos PI (Garcia et al. 2009, Martins et al. 2009, Harris et al. 2010, Yanola et al. 2011, Linss et al. 2014). Por outro lado, é ampla a gama de possibilidades no que tange os demais mecanismos que podem resultar em fenótipo resistente - e não somente a PI, mas também aos diversos inseticidas que são aplicados em saúde pública. Em relação a estes, apenas uma metodologia bioquímica, colorimétrica, preconizada por OMS e CDC, é usualmente empregada (Montella et al. 2007, Polson et al. 2011, Viana-Medeiros 2011). Tal metodologia é, em alguns casos, criticada pela incapacidade de distinguir qual, entre as dezenas de espécies moleculares de enzimas detoxificadoras existentes, está envolvida no processo de resistência.

Alguns grupos de pesquisa fazem uso da técnica de microarranjo, aplicando o '*Aedes detox chip*', que atualmente contém sondas para 1.089 genes, previamente relacionados com a resistência a diversos inseticidas. Neste *chip* estão incluídos todos os genes que codificam as enzimas detoxificadoras MFO, GST e EST (Strode et al. 2008, Marcombe et al. 2009, Riaz et al. 2009, Saavedra-Rodriguez et al. 2015, Dusfour et al. 2015). Entretanto, esta ainda é uma metodologia cara, e nem sempre é possível confirmar os índices de transcrição por RTqPCR. Além disso, esta técnica somente possibilita avaliar os genes já incorporados ao *chip*, não permitindo a detecção de 'novos' mecanismos de resistência. Neste sentido, trabalhos anteriores do nosso grupo com metodologias clássicas (Montella et al. 2007, Viana-Medeiros 2011, Bellinato et al. 2016), além de todos os trabalhos mencionados acima que aplicaram o '*Aedes detox chip*', indicam que cada população tem uma identidade biológica própria. Parece que os desafios prévios – que são diferentes em cada população; têm influência decisiva sobre os mecanismos de resistência expressos frente a uma pressão de seleção específica. Em outras palavras, a resistência a inseticidas é multifatorial e focal.



Foi isso o que motivou a aplicação do RNA-seq nas avaliações deste estudo, a tentativa de entender melhor o fenômeno da resistência como um todo.

A análise comparativa de RNA-seq das populações naturais de *A. aegypti* de Aracaju e de Crato contou com amostras iniciais/'parentais', que foram submetidas à seleção artificial por cinco gerações com o OP malathion, e com amostras que foram mantidas em laboratório sem qualquer pressão com inseticida. O estudo identificou 374 transcritos (~2,6%) considerados diferencialmente expressos (DE) em Aracaju (sendo suas diferenças de expressão classificadas em oito diferentes clusters), e um total de 143 transcritos (~1%) considerados DE em Crato (que por sua vez, foram divididos em cinco clusters).

Esta seção trata da potencial participação do mecanismo de redução da penetração do inseticida. Foram identificados genes relacionados a esta via metabólica nas duas populações analisadas. Em ambos os casos encontrou-se genes diferencialmente expressos, embora sua participação tenha sido distinta em cada população. Também será abordada a possibilidade de proteínas de ligação a odorantes (do inglês '*Odorant Binding Proteins*'; OBP) atuarem como 'apresentadoras de moléculas inseticidas', direcionando a degradação para enzimas MFO. Finalmente, trataremos de profenoloxidasas, que teriam o potencial de agir na formação da cutícula dos espécimes de Aracaju e Crato. A seção, no entanto, não pretende de forma alguma esgotar as discussões sobre os dados - apenas tratamos de algumas considerações que inicialmente nos pareceram relevantes.

### **Expressão de proteínas cuticulares e de biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares, em resposta à adaptação à criação em laboratório (grupos C e S)**

Considera-se que alteração na expressão de genes cuticulares foi importante nas duas populações, contudo, por motivos diferentes: Aracaju apresentou mais de 100 genes DE enquanto Crato teve apenas um, mas que estava 64 vezes mais expresso nas amostras selecionadas com malathion.

Interessantemente, dentre os genes que codificam proteínas cuticulares em Aracaju, um teve diminuição de expressão, enquanto 117 apresentaram aumentos, principalmente no grupo controle em relação ao parental. A maioria dessas alterações foi pequena, com aumentos de quatro a oito vezes nos índices de expressão. Entretanto, alguns genes apresentaram incrementos de 16, 32, 64 e 128 vezes. Isto sugere fortemente a ativação do mecanismo de redução da penetração do inseticida, o que pode ser decorrente de uma maior deposição de quitina, ou de outro aspecto relacionado ao exoesqueleto desses espécimes. De fato, a primeira barreira contra a penetração de inseticida é a cutícula (ou tegumento) do inseto, formada por camadas denominadas epicutícula, procutícula (esta, composta por proteínas e quitina), e uma monocamada epidérmica mais internalizada, envolvida na síntese e secreção dos principais componentes da cutícula (Lockey 1988, Farnesi et al. 2012). A epicutícula do inseto é a camada mais externa e fina (largura de 0,1 a 3  $\mu\text{m}$ ); sua superfície é coberta por finos depósitos de lipídios ou ceras (Juárez et al. 2010).

As ceras dos insetos são formadas pelo alongamento de ácidos graxos até produtos de cadeias muito longas que são, então, modificados para gerar hidrocarbonetos (Stanley-Samuelson et al. 1988). Tais hidrocarbonetos cuticulares são essenciais para prevenir a dessecação e morte dos insetos, além de auxiliarem na comunicação química em várias espécies, e de protegerem contra o ataque de microrganismos e a penetração de xenobióticos (Stanley-Samuelson et al. 1988, Pedrini et al. 2009, Ginzl & Blomquist 2016). Inclusive, alguns estudos apontam relação direta entre maior quantidade de hidrocarbonetos cuticulares e resistência a inseticidas em *A. gambiae*, *D. melanogaster* e *Triatoma infestans* (Pedrini et al. 2009, Juárez et al. 2010, Strycharz et al. 2013, Balabanidou et al. 2016, Bass & Stone 2016). Neste sentido, nosso estudo detectou, em mosquitos de Aracaju em resposta à adaptação à criação em laboratório, aumento na expressão de quatro elongases - AAEL004953, AAEL003977, AAEL003093 e uma 'James Bond' elongase, AAEL002662 (Finck et al. 2016) - e de duas redutases de ácidos graxos (AAEL000910, AAEL013648). Todas essas enzimas participam da biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares. A identificação de aumento na expressão de tais enzimas sugere participação do mecanismo de redução da

penetração do inseticida, potencialmente imposto pelo enriquecimento de proteínas cuticulares superexpressas em todas as amostras de Aracaju mantidas no laboratório, assim como postulado para outros modelos por Pedrini et al. em 2009, por Juárez et al. em 2010, e por Strycharz et al. em 2013.

Além disso, a superexpressão de algumas MFO da família CYP4 (AAEL008638, AAEL008345, AAEL003399, AAEL010273 e AAEL000357), nas amostras de Aracaju, se mostrou particularmente interessante. Isto porque, além de tais enzimas apresentarem a capacidade de detoxificar xenobióticos, alguns autores sugerem que elas também participam da cascata de produção de hidrocarbonetos cuticulares (Qiu et al. 2012, Falcón et al. 2014, Bass & Stone 2016). Recentemente Balabanidou et al. (2016), usando microscopia de imunofluorescência, sugeriram que duas MFO, cuja expressão estava aumentada em anofelinos resistentes a PI, eram muito abundantes nos oenócitos, células onde ocorre a síntese de tais hidrocarbonetos. Inclusive, os autores conseguiram localizar uma dessas MFO (CYP4G16) na membrana plasmática de tais células - e não nos microsomas como regularmente visto - e especularam sobre sua função potencial no transporte dos hidrocarbonetos pela membrana dos oenócitos. Neste trabalho foi ainda comprovada, por expressão heteróloga, a atividade decarbonilásica oxidativa da CYP4G16, demonstrando de forma mais direta a sua atuação na biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares em *A. gambiae*.

Em Crato, apesar de ter sido vislumbrada diferença na expressão de apenas um gene que codifica uma proteína cuticular (AAEL005218), a ativação foi da ordem de 64 vezes nas amostras selecionadas com malathion, comparadas com as demais. Além disso, foram identificadas diferenças na expressão de uma elongase (AAEL015063) e de uma desaturase (AAEL003622) que também participam da biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares. Enquanto a elongase estava 64 vezes mais expressa nas amostras de Crato mantidas em cativeiro, a desaturase estava quatro vezes menos expressa nessas mesmas amostras. As desaturases são enzimas importantes na biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares: convertem os ácidos graxos saturados (introduzindo uma ligação dupla) em produtos insaturados (Falcón et

al. 2014). As elongases são igualmente relevantes, pois catalizam o 'alongamento' dos ácidos graxos, necessário para a síntese dos hidrocarbonetos cuticulares (Finck et al. 2016, Ginzel & Blomquist 2016).

Neste cenário, vale considerar a possibilidade de Crato também apresentar redução da penetração de inseticida, o que poderia ocorrer via espessamento da camada quitinosa (procutícula) e com participação das ceras que compõem a epicutícula. Entretanto, análise global dos dados gerados neste estudo sugere que tal mecanismo esteja mais ativo em Aracaju. É digno de nota que Aracaju parece ter acionado este mecanismo, de redução da penetração, a partir de outro desafio, independente do inseticida.

### **Expressão de proteínas de ligação a odorantes (OBP) em resposta à adaptação à criação em laboratório (grupos C e S)**

As OBP parecem ter sido outra classe de enzimas relevante na resposta à manutenção em laboratório em Aracaju, e na resposta à seleção de Crato com malathion. No entanto, isto ocorreu de forma distinta nas duas populações do vetor. Enquanto em Aracaju houve aumento na expressão de 12 OBP e diminuição de 2, em Crato foi observado um gene que codifica OBP que estava 16 vezes mais expresso nas amostras selecionadas, em relação às outras.

Enquanto as moléculas odorantes são primariamente hidrofóbicas, os receptores do olfato ficam ancorados à membrana das células receptoras e estão envoltos por um meio líquido chamado linfa sensilar (Steinbrecht 1998, Zhou et al. 2010). Em teoria, as OBP são proteínas solúveis da família das lipocalinas (que incluem muitas proteínas carreadoras encontradas em ampla gama de tecidos), de baixo peso molecular, que estão presentes na linfa sensilar e que atuam como agentes solubilizadores e carreadores de moléculas odorantes, além de entregarem tais moléculas para as proteínas receptoras transmembranares (Ryan 2002, Vogt 2005).

Murphy et al. (2013) sugeriram que a interação das OBPs 1 e 4 de *A. gambiae* com a molécula odorante e com outros componentes do sistema olfatório, é que seria, de fato, importante para a percepção do odor.

Posteriormente, a molécula odorante seria rapidamente degradada, geralmente por algumas enzimas detoxificadoras - principalmente MFO (Steinbrecht 1998, Vogt 2005, Younus et al. 2014). Apesar de estudos das últimas décadas terem contribuído para um maior entendimento sobre a via de atuação das OBPs, e de sua atuação 'conjunta' com enzimas detoxificadoras, admite-se que tal processo ainda não foi totalmente esclarecido (Zhou et al. 2010, Pitts et al. 2011).

Notadamente, a manutenção dos mosquitos de Aracaju em laboratório induziu, nos grupos controle e selecionados, aumento na expressão de 12 genes que codificam OBPs (AAEL001826, AAEL001963, AAEL001964, AAEL001981, AAEL001994, AAEL002003, AAEL002027, AAEL002028, AAEL002040, AAEL005682, AAEL005687, AAEL005691). Destes, um gene (AAEL005691) estava 256 vezes mais expresso; dois, 128 vezes (AAEL002003 e AAEL005682); e dois, 64 vezes mais expressos (AAEL002027 e AAEL005687). Por outro lado, a seleção de Crato com malathion resultou na detecção de ativação de uma OBP (AAEL005682): estava 16 vezes mais expressa em relação a todas outras amostras, parentais e grupos controle.

Conforme mencionado anteriormente, a expressão de cinco genes que codificam MFO parece ter sido induzida pela manutenção em laboratório, em Aracaju. Por outro lado, em Crato a expressão de uma MFO (AAEL006824) foi reduzida em 16 vezes em relação à amostra parental. No entanto, houve aumento de expressão de outra MFO (AAEL014604) e de uma peroxidase/oxidase (AAEL000496), respectivamente, de quatro e 128 vezes nos grupos controle em relação aos grupos parentais e selecionados com malathion (ou seja, tiveram o efeito da manutenção em laboratório completamente revertido pela seleção com o malathion).

Sendo assim, a possibilidade de OBPs atuarem como 'apresentadoras' de moléculas inseticidas, direcionando sua degradação para enzimas MFO, assim como sugerido pelos dados de Aracaju, merece ser objeto de investigações futuras. De fato, alguns autores já levantaram a hipótese de OBPs atuarem também na depuração de compostos tóxicos eventualmente presentes na linfa sensilar (Steinbrecht 1998, Zhou et al. 2010). Keeling et al., em 2013, caracterizaram a função de uma MFO da peste de agricultura *Dendroctonus ponderosae*, como uma enzima que degrada odorantes. Além

disso, a presença de grande número de OBPs nos palpos maxilares de fêmeas de *A. gambiae*, a despeito da limitada capacidade de codificação olfativa deste órgão, sugere que, ao menos em alguns momentos, OBPs possam agir como filtros para moléculas 'odorantes' do meio (Pitts et al. 2011).

De forma complementar, Swarup et al. (2011) demonstraram a clara relação entre diferenças na expressão de OBPs e diferenças comportamentais em *D. melanogaster*, o que levanta a possibilidade de associação equivalente em *A. aegypti*. Em Aracaju, a maior expressão de tais proteínas estaria mediando uma eventual resistência comportamental? Entretanto, esta é uma questão que requer metodologias capazes de testá-la diretamente.

Adicionalmente, um recente estudo sugeriu a participação de UDP-glucuronosiltransferases na degradação de odorantes em antenas de *D. melanogaster*, porém com funções adicionais em outros tecidos (Younus et al. 2014). Detectamos uma UDP-glucuronosiltransferase (AAEL003079) oito vezes mais expressa nos espécimes de Aracaju selecionados com o malathion. Tal situação poderia sugerir participação dessa enzima na degradação de odorantes e/ou moléculas inseticidas, assim como sugerido para as MFOs superexpressas nas amostras desta população, que foram mantidas em laboratório.

### **Mudanças na expressão de profenoloxidasas em resposta à adaptação à criação em laboratório, ou à seleção com o malathion**

As profenoloxidasas possuem um papel bem delineado na imunidade dos artrópodes, atuando na encapsulação e morte de microrganismos invasores (Söderhäll & Cerenius 1998, Zhou et al. 2010). Serino proteases são tidas como o fator de ativação da cascata de melanização promovida pelas profenoloxidasas nestes insetos (Choo et al. 2010, An et al. 2013).

Foram detectadas alterações na expressão de profenoloxidasas e serino proteases nos grupos controle e selecionado de Aracaju e no grupo selecionado de Crato. Apesar do aumento nos índices de expressão ter sido pequeno, em geral de quatro vezes, foram 10 os genes de profenoloxidasas afetados em Aracaju: AAEL006877, AAEL010919, AAEL013498, AAEL013501,

AAEL011764, AAEL013493, AAEL013499, AAEL014837, AAEL015113 e AAEL015116. Destes, nos seis últimos, o efeito da manutenção em cativeiro, de aumento da expressão, foi revertido pela seleção com malathion. Em Crato, foram oito os genes de profenoloxidasas com expressão aumentada: AAEL010919, AAEL011764, AAEL013493, AAEL013499, AAEL013501, AAEL014544, AAEL014837 e AAEL015113.

A manutenção em laboratório, independente de contato com malathion, aumentou em quatro vezes a expressão de dois genes de serino proteases em Aracaju (AAEL012573 e AAEL012575), ao mesmo tempo em que uma serino protease teve sua expressão aumentada nos grupos controle, sendo este efeito completamente revertido pela seleção (AAEL006373). Este último gene estava 16 vezes mais expresso nas amostras parentais de Crato: houve declínio de expressão que foi mediano nos grupos selecionados e mais marcado nos grupos controle. Além disso, a seleção diminuiu em 16 vezes a expressão de outro gene que codifica uma serino protease nesta população (AAEL008769).

Uma possibilidade é as profenoloxidasas atuarem na formação da cutícula dos espécimes de Aracaju e Crato. De fato, o processo de esclerotização da cutícula dos insetos envolve uma etapa de catálise da produção de quinonas (para então formar melanina) mediada por uma profenoloxidase (Zhou et al. 2015, Arakane et al. 2016). Em adição, alguns trabalhos relacionam a resistência a inseticidas com alterações de profenoloxidasas, mas de forma controversa. Enquanto Zhou et al., em 2012, correlacionaram a superexpressão de uma subunidade de profenoloxidase com o aumento de suscetibilidade de *C. pipiens* ao PI deltametrina, Cornet et al., em 2013, demonstraram que a atividade de uma fenoloxidase e uma profenoloxidase eram significativamente maiores em fêmeas resistentes a OP do que em fêmeas suscetíveis de *C. pipiens*.

### **Comparação com outros trabalhos**

Em 2014, David et al. publicaram a seleção artificial da cepa referência de suscetibilidade Bora-Bora, utilizando doses do PI permetrina, do neonicotinóide imidacloprid, e do CB propoxur. Em todos os casos a seleção foi

feita por 10 gerações, e em cada geração foram usadas doses calibradas para gerar mortalidade de cerca de 70% das larvas expostas. Os autores revelaram  $RR_{50}$  de 1,8, de 3,8 e 5,6 para o CB, o PI e o neonicotinóide, respectivamente. Dentre os 413 transcritos conhecidos diferencialmente expressos nas cepas selecionadas, em comparação com a cepa suscetível original, as diferenças na transcrição gênica mais marcadas ocorreram depois da seleção com imidacloprid. Este trabalho também identificou enriquecimento de proteínas de cutícula e de imunidade, assim como visto nos dados de transcriptoma de nosso estudo. Além disso, os autores demonstraram que a seleção com permetrina gerou um maior número de mutações (SNPs, do inglês '*single nucleotide polymorphisms*'), e que o experimento com propoxur atingiu patamares intermediários nas duas avaliações, de índices de expressão e de SNPs. Com isso, uma perspectiva relevante do estudo aqui apresentado é a avaliação dos SNPs nas amostras iniciais, selecionadas e controle, de Aracaju e Crato.

Em 2014, Hojland et al. avaliaram a adaptação à criação em laboratório, ao longo de 29 gerações, de uma população natural de *Musca domestica*. Foi observado um aumento progressivo na transcrição de hexamerinas, enzimas que atuam no armazenamento de carboidratos, concomitante à diminuição do uso desses açúcares de reserva (amilases). Por outro lado, no estudo aqui apresentado, após adaptação à criação em laboratório por quatro/cinco gerações, foi detectada em Crato uma leve diminuição da transcrição de duas hexamerinas.

Além disso, Hojland et al. (2014) também detectaram a diminuição da expressão de quatro genes que codificam MFO. Entretanto, em nosso estudo foram observados resultados discrepantes. Em Aracaju, a transcrição de apenas um dos sete genes CYP diferencialmente expressos foi menor nas amostras mantidas em laboratório. Em Crato, por outro lado, dois genes CYP estavam superexpressos nas amostras mantidas em cativeiro, um teve sua transcrição diminuída nessas amostras, e outro gene CYP demonstrou tendência de queda de expressão, mas apenas nas amostras selecionadas com o malathion.



No conjunto, os dados apresentados neste capítulo ratificam que o fenômeno da resistência a inseticidas em *A. aegypti* é um caráter multifatorial e de alta complexidade. De nosso conhecimento, foram mostrados pela primeira vez, em populações brasileiras do vetor, indícios da participação do mecanismo de redução da penetração de inseticidas. Apesar de se admitir que tal mecanismo possa operar nas duas populações aqui analisadas, globalmente, nossos dados sugerem que a penetração reduzida atua de forma mais significativa em Aracaju.

As alterações de expressão apontadas com *RNAseq* nas amostras de Aracaju e Crato poderão servir como base para o estudo de novos mecanismos de resistência em *A. aegypti*, principalmente no que tange a função dos genes denominados 'desconhecidos conservados'. Pretende-se ainda avaliar as diferenças de expressão gênica entre as amostras originais de Aracaju e Crato; e os SNPs derivados da manutenção em laboratório e, principalmente, aqueles decorrentes da seleção com o OP malathion.

## DISCUSSÃO GERAL

Atualmente, *A. aegypti* é incriminado não somente na transmissão dos vírus dengue, como também de Zika e chikungunya – sérios problemas de saúde pública no Brasil (Ferreira-de-Brito et al. 2016, MS-SVS 2017). Além disso, deve-se considerar que este vetor tem potencial para transmitir o vírus da febre amarela, que, devido à atual situação de ‘Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional’ (MS-SVS 2016, COES – Febre Amarela 2017), impõe marcado risco de reemergência da transmissão urbana deste patógeno.

Excetuando-se a vacina contra febre amarela, a prevenção de tais arboviroses depende, quase que exclusivamente, de medidas de controle voltadas para a diminuição da densidade de seu vetor (Ranson et al. 2010, Vythilingam et al. 2016). No âmbito do controle vetorial, os inseticidas químicos ainda são ferramentas amplamente utilizadas – conduta esta que culmina na seleção de indivíduos resistentes. Com isso, um dos pilares dos programas de controle é o monitoramento do *status* de suscetibilidade de populações naturais do vetor, de forma a subsidiar o manejo da resistência aos inseticidas (Ranson et al. 2010). Considerando que uma população de vetores pode apresentar resistência cruzada a dois ou mais compostos, a análise global dos mecanismos potencialmente associados com a resistência tem marcada relevância.

Dentre as poucas opções de adulticidas disponíveis, apenas o OP malathion não pertence à classe dos PI – para os quais a resistência está disseminada em populações de *A. aegypti* de todo o Brasil (Martins et al. 2009, OMS 2012, Linss et al. 2014). Desde 2009 este OP é o composto de escolha para aplicação espacial de inseticidas que é (ou deveria ser) feita apenas em períodos epidêmicos (MS-SVS 2009d, 2010). Uma vez que não se tinha, à época, registros de resistência de populações brasileiras do vetor ao malathion, o objetivo deste estudo foi antecipar, em laboratório, eventuais situações de disseminação de resistência. Para os ensaios de seleção foram escolhidas duas populações de campo com índices de resistência marcadamente diferentes ao OP temephos, durante décadas o único larvicida disponível para

controle de *A. aegypti* no Brasil. A primeira foi oriunda de Aracaju, com índices históricos de  $RR_{95}$  sempre em torno de 6,0. A outra população, de Crato, havia apresentado  $RR_{95}$  de aproximadamente 200, muito maior do que os índices detectados no restante do país, o que poderia sugerir a ocorrência de mecanismos de resistência diferentes (Braga et al. 2004, Montella et al. 2007, Lima et al. 2011).

A caracterização inicial das populações de campo revelou, assim como era previsto, maior resistência ao OP temephos e ao PI deltametrina em Crato. Por outro lado, Aracaju demonstrou maior participação da resistência metabólica, bem como um maior número de parâmetros de *fitness* acometidos, em comparação com Crato.

A seleção de Aracaju e Crato com o malathion provocou aumento nos índices de RR em todas as réplicas biológicas do estudo. Foi demonstrada a aparente ausência de resistência cruzada entre os OP malathion e temephos, nas populações brasileiras de *A. aegypti* analisadas. Além disso, a seleção parece ter impactado negativamente sobre a resistência frente ao temephos e a PI. Foram adotados dois parâmetros de comparação para analisar a suscetibilidade aos inseticidas: a cepa Rockefeller e a amostra parental de cada população. Dependendo do parâmetro utilizado, foram observados resultados discrepantes: todos os bioensaios feitos com larvas dos grupos controle (malathion, temephos e DFB) demonstraram tendência de redução das RR em relação à cepa suscetível ('Rock RR') e tendência de aumento em relação à população original ('Parental RR'); nos grupos selecionados foram observadas diferenças entre os dois parâmetros, geralmente pequenas, na avaliação do DFB (nas duas populações), do temephos (em Crato) e da deltametrina (em Aracaju). Isto evidencia a cautela necessária na análise das diferenças de suscetibilidade (por bioensaios) em experimentos de seleção.

A análise dos mecanismos potenciais de resistência é feita na tentativa de 'elucidar' os índices de resistência observados nos bioensaios. A frequência das mutações *kdr* no gene  $Na_v$ , sítio alvo de inseticidas PI, das amostras originais de Aracaju e Crato, foi de 43% e 32%, respectivamente. Estas taxas, semelhantes, já indicavam a participação de outros mecanismos na resistência a PI, uma vez que a  $RR_{95}$  de Crato a deltametrina era quase três vezes maior que de Aracaju. De forma inesperada, verificamos que as frequências das

mutações *kdr* nas amostras controle, mantidas em laboratório sem contato com inseticidas, tenderam a diminuir levemente, ao mesmo tempo em que as RR aumentaram marcadamente. Estes resultados reiteram que as mutações *kdr* não servem como indicadores exclusivos de resistência a PI. Similarmente, Donnelly et al. (2009) postularam que a relação entre os genótipos *kdr* e o fenótipo da resistência a PI é clara, porém, outros mecanismos poderiam estar também associados à resistência. Isto ratifica a relevância dos bioensaios, além da avaliação dos mecanismos associados, para um melhor entendimento do caráter da resistência.

O estudo dos índices de expressão gênica por *RNA-seq* demonstrou uma quantidade de genes diferencialmente expressos (DE) em Aracaju quase três vezes maior do que em Crato. Esta última era a população com maiores níveis iniciais de resistência - e talvez por isso mesmo tenha apresentado menor alteração de expressão gênica em decorrência da seleção com o malathion. Houve, pela primeira vez em amostras brasileiras de *A. aegypti*, indicação de ativação de genes com potencial de participarem da resistência por alteração de sua penetração via cutícula. Levantou-se também a possibilidade de enzimas *OBP* atuarem como 'apresentadoras de moléculas inseticidas', direcionando a degradação para enzimas MFO. Foi ainda sugerido que as profenoloxidasas cuja expressão estava alterada estariam agindo na formação da cutícula dos espécimes de Aracaju e Crato, talvez potencializando o mecanismo de redução da penetração do inseticida nos espécimes das duas populações.

A comparação entre os resultados dos ensaios bioquímicos com a avaliação de *RNA-seq* revelou (apenas) um evento de concordância: uma monooxigenase que estava quatro vezes mais expressa nas amostras originais de Aracaju (AAEL000834), que também apresentaram forte alteração na quantificação da atividade de MFO. É provável que estes eventos não estejam associados. No entanto, existe a possibilidade de que se trate de uma mesma espécie molecular, apesar dos ensaios rotineiros quantificarem a atividade de MFO de forma indireta – é quantificado seu grupamento prostético *heme*.

É interessante notar que a população de Aracaju apresentou menores índices de resistência, maior acometimento de mecanismos da resistência metabólica e que, assim como pontuado por Carrière et al. (1994) e Rivero et

al. (2010), demonstrou impacto maior nos aspectos do desenvolvimento e viabilidade avaliados inicialmente. A manutenção em laboratório parece ter sido um estímulo importante para um potencial acionamento do mecanismo de redução da penetração do inseticida. Foi observado aumento na expressão de 74 genes que codificam proteínas cuticulares - independente de pressão seletiva com inseticida. Destes, a seleção com malathion reverteu parcialmente o aumento de expressão de 34 genes; em seis genes, a reversão foi total. Além disso, a seleção aumentou em 64 e 32 vezes a expressão, respectivamente, de uma MFO e de uma butirilcolinesterase. Resta saber se há correlação entre o aumento de expressão desta butirilcolinesterase e a detecção de maior atividade de Ace demonstrada para duas das três réplicas selecionadas de Aracaju, no ensaio bioquímico clássico – que emprega acetilcolina como substrato (Ellman et al. 1961).

Em Crato, por outro lado, foi notória a marcada resistência ao OP temephos e ao PI deltametrina nas amostras iniciais do estudo. Ainda que tais índices tenham declinado após a seleção com o malathion, a população continuou sendo considerada altamente resistente a estes compostos, ao final do experimento. Foi observado relevante aumento na expressão de uma proteína cuticular e em algumas poucas enzimas que participam da biossíntese de hidrocarbonetos cuticulares (camada de ceras que recobre o exoesqueleto dos insetos). Estes resultados poderiam indicar a participação do mecanismo de redução da penetração do inseticida nas amostras selecionadas de Crato. Por outro lado, nossos dados de RNAseq sugerem que os altos índices de resistência observados inicialmente poderiam estar relacionados a algum(ns) mecanismo(s) inusitado(s), não identificado(s) prontamente. Isso poderia ser a consequência de expressão diferencial de genes conhecidos, que estariam impactando na resistência, porém, de uma forma diferente do que é usualmente reportado. Alternativamente, os altos níveis de resistência observados poderiam estar relacionados às diferenças de expressão de um ou mais genes com funções desconhecidas assinalados pelo RNA-seq. Uma possibilidade seria a ocorrência de mutações na região codificante de genes importantes para a resposta ao desafio com inseticidas em Crato, como, por exemplo, genes que codificam enzimas detoxificadoras e transportadores ABC (Poupardin et al. 2014, Faucon et al. 2015). Nesse sentido, em 2014, David et

al. demonstraram a relevância da avaliação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês ‘Single Nucleotide Polymorphisms’) em dados oriundos do sequenciamento de alta vazão em amostras de *A. aegypti* selecionadas com o neonicotinóide imidacloprid. A avaliação futura de SNPs em todas as amostras de nosso estudo, principalmente nas de Crato, é relevante.

Adicionalmente, não se poderia descartar a possibilidade de haver enzimas detoxificadoras com modificações em sua região codificante que gerassem maior eficiência catalítica. Tais enzimas, ao menos em teoria, teriam o potencial de serem detectadas pelos ensaios bioquímicos, mas não pela análise de *RNA-seq*. Este seria mais um fator que mostra a relevância da avaliação dos SNPs nas amostras estudadas.

O estudo ratifica o caráter multifatorial e focal da resistência a inseticidas. No Capítulo 1 foram avaliados os efeitos da resistência aos inseticidas e dos mecanismos associados sobre a biologia de amostras naturais de *A. aegypti*. Nos Capítulos 2 e 3 investigou-se os índices de suscetibilidade pós-seleção e foi feita a avaliação global dos mecanismos de resistência. Os dados revelam a importância de aprofundar o estudo da resistência a inseticidas em mais populações de campo, como suporte para orientar o controle racional desse relevante vetor.

## CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Foram identificados elevados índices de resistência ao PI deltametrina e ao OP temephos nas populações de *A. aegypti* Aracaju e Crato, provavelmente derivados de intenso uso de controle químico.
- ✓ O mesmo não foi demonstrado para diflubenzuron e malathion, mais recentemente empregados no controle do vetor no país.
- ✓ A comparação das amostras originais, do campo, através de metodologias de rotina revelou que os mosquitos de Aracaju tenderam a exibir níveis mais baixos de resistência a OP e PI e, ao mesmo tempo, maior atividade de enzimas detoxificadoras e maior comprometimento de *fitness*, do que os espécimes de Crato.
- ✓ Estes resultados sugerem um maior impacto da resistência metabólica, quando comparada aos mecanismos de alteração do sítio-alvo, na viabilidade dos mosquitos, nas populações avaliadas.
- ✓ A seleção de Aracaju e Crato com malathion resultou em aumento dos índices de RR em todas as réplicas biológicas do estudo.
- ✓ Não foi detectada resistência cruzada entre os OP malathion e temephos, nas duas populações de *A. aegypti* analisadas.
- ✓ A seleção com malathion teve impacto negativo sobre a resistência ao temephos e a PI.
- ✓ A manutenção em laboratório sem contato com inseticidas aumentou a resistência a PI (porém diminuiu a frequência dos homozigotos *Kdr*) em todas as réplicas de Aracaju e Crato.
- ✓ As avaliações rotineiramente adotadas para avaliação dos mecanismos associados (que avaliam alterações nas enzimas da resistência metabólica, alvo de OP, e alvo de PI) não foram capazes de ‘elucidar’ os altos índices de resistência observados nos bioensaios, para as duas populações de *A. aegypti* analisadas.
- ✓ O estudo dos índices de expressão gênica por *RNA-seq* revelou, em Aracaju, duas vezes mais genes diferencialmente expressos que em Crato.
- ✓ O caráter multifatorial do fenômeno da resistência foi demonstrado.

- ✓ Foi detectada a participação de vários genes potencialmente relacionados com o mecanismo de resistência por redução da penetração do inseticida na cutícula de *A. aegypti*.



# ANEXO A: PROVA DE PRELO DO ARTIGO DESCRITO NO CAPÍTULO 1 DE RESULTADOS

Carta de aceite da revista *Medical and Veterinary Entomology*

2017-6-12 ScholarOne Manuscripts

Medical and Veterinary Entomology

**Decision Letter (MVE-16-1397.R2)**

**From:** mary.cameron@lshtm.ac.uk

**To:** viana.medeirospf@gmail.com, bllinato@loc.fiocruz.br, ademirjr@loc.fiocruz.br, dvalle@loc.fiocruz.br

**CC:**

**Subject:** Medical and Veterinary Entomology - Decision on Manuscript ID MVE-16-1397.R2 [email ref: DL-RW-1-a]

**Body:** 24-Mar-2017

Dear Mrs. Viana-Medeiros:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects of two *Aedes aegypti* Brazilian populations" in its current form for publication in *Medical and Veterinary Entomology*.

Please note although the manuscript is accepted the files will now be checked to ensure that everything is ready for publication, and you may be contacted if final versions of files for publication are required.

Your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. The corresponding author will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion.

As the author of a paper being published in a Royal Entomological Society Journal, you might like to consider applying for Fellowship of the Society, see here <http://www.royensoc.co.uk/membership/fellowship.htm> for details.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of *Medical and Veterinary Entomology*, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
Prof. Mary Cameron  
Editor in Chief, *Medical and Veterinary Entomology*  
mary.cameron@lshtm.ac.uk

**Date Sent:** 24-Mar-2017

	MVE Journal Name	mve_12241 Manuscript No.		Dispatch: July 5, 2017 Author Received:	Journal: MVE No of pages: 11	CE: TS: suresh
---	---------------------	-----------------------------	---	--	---------------------------------	-------------------

Medical and Veterinary Entomology (2017), doi: 10.1111/mve.12241

## Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects in two Brazilian *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) populations

P. F. VIANA-MEDEIROS<sup>1</sup>✉, D. F. BELLINATO<sup>1</sup>, A. J. MARTINS<sup>2,3</sup> and D. VALLE<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Molecular de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil, <sup>2</sup>Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil and <sup>3</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM), Rio de Janeiro, Brazil

**Abstract.** In Brazil, insecticide resistance in *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) (Diptera: Culicidae) populations to pyrethroids and to the organophosphate (OP) temephos is disseminated. Currently, insect growth regulators (IGRs) and the OP malathion are employed against larvae and adults, respectively. Bioassays with mosquitoes from two northeast municipalities, Crato and Aracaju, revealed, in both populations, susceptibility to IGRs and malathion ( $RR_{95} \leq 2.0$ ), confirming the effectiveness of these compounds. By contrast, temephos and deltamethrin (pyrethroid) resistance levels were high ( $RR_{95} > 10$ ), which is consistent with the use of intense chemical control. In Crato,  $RR_{95}$  values were  $> 50$  for both compounds. Knock-down-resistant (*kdr*) mutants in the voltage-gated sodium channel, the pyrethroid target site, were found in 43 and 32%, respectively, of Aracaju and Crato mosquitoes. Biochemical assays revealed higher metabolic resistance activity (esterases, mixed function oxidases and glutathione-S-transferases) at Aracaju. With respect to fitness aspects, mating effectiveness was equivalently impaired in both populations, but Aracaju mosquitoes showed more damaging effects in terms of longer larval development, decreased bloodmeal acceptance, reduced engorgement and lower numbers of eggs laid per female. Compared with mosquitoes in Crato, Aracaju mosquitoes exhibited lower OP and pyrethroid  $RR_{95}$ , increased activity of detoxifying enzymes and greater effect on fitness. The potential relationship between insecticide resistance mechanisms and mosquito viability is discussed.

**Key words.** *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*), diflubenzuron, fitness, insecticide resistance, organophosphate, pyrethroid, resistance mechanisms.

### Introduction

*Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) is the main vector of dengue virus. More recently, the Zika and Chikungunya viruses, also transmitted by this mosquito, have been reported in several countries around the world. In neither case are specific drugs available. Although some candidate vaccines exist against

dengue (Schwartz *et al.*, 2015), equivalent efforts against the other viruses are just beginning. In addition, *S. aegypti* has the potential to transmit several other emerging pathogens, given its synanthropic habits and high vector competence for several viruses. In such a scenario, the prevention of these diseases relies on control measures directed towards decreasing the densities of their main vector, *S. aegypti*. Despite the growing attention

Correspondence: Denise Valle, Laboratório de Biologia Molecular de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Manginhos, Rio de Janeiro, RJ CEP 21040-900, Brazil. Tel.: + 55 21 3865 8161; Fax: + 55 21 3865 8200; E-mail: dvalle@ioc.fiocruz.br

© 2017 The Authors. *Medical and Veterinary Entomology* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Royal Entomological Society. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## ANEXO B: MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 2 DE RESULTADOS

**Tabela B1. Alguns detalhes dos bioensaios com malathion realizados em larvas das populações de *Aedes aegypti* estudadas.**

Malathion (larvas)									
ano	população	geração	CL50 (mg/L)	CL95(mg/L)	Intervalos de confiança		RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>	slope
					CL50 (mg/L)	CL95 (mg/L)			
2014	Rockefeller		0,049	0,088	0,04799 < CL < 0,05058	0,08438 < CL < 0,09259	1,0	1,0	6,5
	Aracaju P	F2	0,094	0,213	0,09142 < CL < 0,09741	0,21254 < CL < 0,22242	2,6	2,9	4,7
	Aracaju C1	F7	0,120	0,231	0,11608 < CL < 0,12366	0,22036 < CL < 0,24261	2,4	2,6	5,8
	Aracaju C2		0,111	0,221	0,10786 < CL < 0,11502	0,21086 < CL < 0,23243	2,3	2,5	5,5
	Aracaju G1	F7	0,121	0,273	0,11592 < CL < 0,12540	0,25585 < CL < 0,29130	2,4	3,1	4,6
	Aracaju G2		0,172	0,357	0,16647 < CL < 0,17769	0,33785 < CL < 0,37651	3,5	4,0	5,2
	Aracaju G3		0,141	0,339	0,13487 < CL < 0,14754	0,32034 < CL < 0,35847	2,9	3,8	4,3
	Crato P	F2	0,086	0,207	0,08350 < CL < 0,08928	0,19702 < CL < 0,21668	2,4	2,8	4,3
	Crato C1	F6	0,112	0,234	0,10824 < CL < 0,11576	0,22182 < CL < 0,24612	2,3	2,6	5,1
	Crato C2		0,106	0,220	0,10238 < CL < 0,10962	0,20900 < CL < 0,23147	2,2	2,5	5,2
	Crato G1	F7	0,262	0,519	0,25458 < CL < 0,27055	0,49096 < CL < 0,54918	5,3	5,9	5,6
	Crato G2		0,232	0,454	0,22495 < CL < 0,23923	0,43227 < CL < 0,47663	4,7	5,1	5,6
	Crato G3		0,235	0,470	0,22601 < CL < 0,24499	0,44554 < CL < 0,49628	4,8	5,3	5,5

Resultados gerados por análises probit. LC: concentração letal. O intervalo de confiança 95% é mostrado.

**Tabela B2. Alguns detalhes dos bioensaios com malathion realizados com fêmeas adultas das populações de *Aedes aegypti* estudadas.**

Malathion (adultos)									
ano	população	geração	CL50 (g/L)	CL95(g/L)	Intervalos de confiança		RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>	slope
					CL50 (g/L)	CL95 (g/L)			
2014	Rockefeller		0,186	0,257	0,18223 < CL < 0,19058	0,24829 < CL < 0,26660	1,0	1,0	11,7
	Aracaju P	F1	0,294	0,522	0,27786 < CL < 0,31058	0,48529 < CL < 0,56057	1,6	1,8	6,6
	Aracaju C1	F7	0,320	0,630	0,29833 < CL < 0,34304	0,56280 < CL < 0,70528	1,7	2,4	5,6
	Aracaju C2		0,303	0,661	0,28087 < CL < 0,32600	0,58213 < CL < 0,74958	1,6	2,6	4,9
	Aracaju G1	F7	0,342	0,612	0,32491 < CL < 0,35981	0,55591 < CL < 0,67349	1,8	2,4	6,5
	Aracaju G2		0,380	0,695	0,36195 < CL < 0,39871	0,62586 < CL < 0,77146	2,0	2,7	6,3
	Aracaju G3		0,357	0,610	0,34149 < CL < 0,37415	0,55820 < CL < 0,66653	1,9	2,4	7,1
	Crato P	F3	0,299	0,606	0,27089 < CL < 0,30218	0,56495 < CL < 0,64953	1,6	2,0	5,0
	Crato C1	F6	0,339	0,685	0,31655 < CL < 0,36227	0,61311 < CL < 0,76575	1,8	2,7	5,4
	Crato C2		0,347	0,648	0,32671 < CL < 0,36804	0,57556 < CL < 0,73051	1,9	2,5	6,1
	Crato G1	F7	0,458	0,823	0,43701 < CL < 0,47985	0,74136 < CL < 0,91359	2,5	3,2	6,5
	Crato G2		0,466	0,960	0,44267 < CL < 0,49157	0,86888 < CL < 1,06041	2,5	3,7	5,2
	Crato G3		0,419	0,871	0,39320 < CL < 0,44749	0,78748 < CL < 0,96324	2,3	3,4	5,2

Legenda como na Tabela B1.

**Tabela B3. Alguns detalhes dos bioensaios com temephos realizados em larvas das populações de Aedes aegypti estudadas.**

ano	população	geração	Temephos						
			CL50 (mg/L)	CL95(mg/L)	Intervalos de confiança		RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>	slope
					CL50 (mg/L)	CL95 (mg/L)			
	Rockefeller		0,005	0,008	0,00524 < CL < 0,00537	0,00820 < CL < 0,00857	1,0	1,0	8,3
2014	Aracaju P	F1	0,040	0,098	0,03858 < CL < 0,04107	0,09273 < CL < 0,10286	11,2	12,9	4,2
	Aracaju C1	F7	0,046	0,096	0,04465 < CL < 0,04760	0,09138 < CL < 0,10113	8,7	11,5	5,2
	Aracaju C2		0,044	0,108	0,04254 < CL < 0,04591	0,10150 < CL < 0,11532	8,3	12,9	4,2
	Aracaju G1	F7	0,031	0,080	0,02928 < CL < 0,03259	0,07510 < CL < 0,08623	5,8	9,6	4,0
	Aracaju G2		0,040	0,087	0,03815 < CL < 0,04164	0,08139 < CL < 0,09202	7,5	10,3	4,9
	Aracaju G3		0,045	0,099	0,04326 < CL < 0,04715	0,09301 < CL < 0,10476	8,5	11,8	4,8
	Crato P	F2	0,048	0,332	0,04317 < CL < 0,05412	0,29850 < CL < 0,36883	23,2	64,8	2,0
	Crato C1	F6	0,102	0,368	0,09597 < CL < 0,10759	0,33782 < CL < 0,40069	19,2	43,9	2,9
	Crato C2		0,071	0,339	0,06589 < CL < 0,07747	0,30658 < CL < 0,37542	13,5	40,4	2,4
	Crato G1	F7	0,043	0,223	0,03782 < CL < 0,04903	0,19976 < CL < 0,24943	8,1	26,6	2,3
Crato G2	0,048		0,383	0,04181 < CL < 0,05514	0,33816 < CL < 0,43440	9,1	45,7	1,8	
Crato G3	0,066		0,372	0,05880 < CL < 0,07355	0,33274 < CL < 0,41584	12,4	44,3	2,2	

Legenda como na Tabela B1.

**Tabela B4. Alguns detalhes dos bioensaios com diflubenzuron realizados em larvas das populações de Aedes aegypti estudadas.**

ano	população	geração	Diflubenzuron						
			IE50 (µg/L)	IE95(µg/L)	Intervalos de confiança		IE50	IE95	slope
					IE50 (µg/L)	IE95 (µg/L)			
	Rockefeller		1,717	2,978	1,64664 < CL < 1,78964	2,75355 < CL < 3,22043	1,0	1,0	6,9
2014	Aracaju P	F1	1,574	4,031	1,49646 < CL < 1,65528	3,64624 < CL < 4,45778	1,6	1,7	4,0
	Aracaju C1	F7	2,364	3,837	2,26826 < CL < 2,46480	3,57900 < CL < 4,11358	1,4	1,3	7,8
	Aracaju C2		2,131	4,663	2,01306 < CL < 2,25560	4,23165 < CL < 5,13764	1,2	1,6	4,8
	Aracaju G1	F7	2,322	5,475	2,19893 < CL < 2,45230	4,94692 < CL < 6,05879	1,4	1,8	4,4
	Aracaju G2		2,419	4,721	2,32590 < CL < 2,51625	4,38859 < CL < 5,07868	1,4	1,6	5,7
	Aracaju G3		2,675	5,805	2,54809 < CL < 2,80739	5,25405 < CL < 6,41321	1,6	1,9	4,9
	Crato P	F2	2,002	3,982	1,91585 < CL < 2,09109	3,70419 < CL < 4,27966	1,6	1,9	5,5
	Crato C1	F6	2,164	3,957	2,06379 < CL < 2,26832	3,64920 < CL < 4,29096	1,3	1,3	6,3
	Crato C2		2,006	3,670	1,91027 < CL < 2,10735	3,39976 < CL < 3,96193	1,2	1,2	6,3
	Crato G1	F7	2,511	5,497	2,39073 < CL < 2,63696	5,00953 < CL < 6,03289	1,5	1,8	4,8
Crato G2	3,083		4,964	2,97765 < CL < 3,19215	4,67612 < CL < 5,26874	1,8	1,7	8,0	
Crato G3	2,724		4,954	2,60888 < CL < 2,84385	4,60621 < CL < 5,32709	1,6	1,7	6,3	

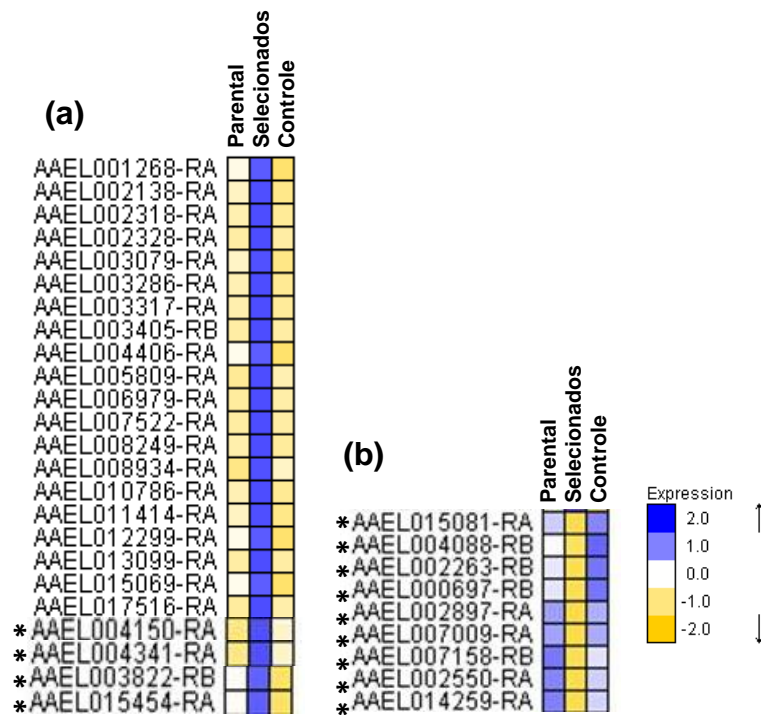
Legenda como na Tabela B1. IE: inibição de emergência dos adultos.

**Tabela B5. Alguns detalhes dos bioensaios com deltametrina realizados com fêmeas adultas das populações de Aedes aegypti estudadas.**

ano	população	geração	Deltametrina						
			CL50 (mg/L)	CL95(mg/L)	Intervalos de confiança		RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>	slope
					CL50 (mg/L)	CL95 (mg/L)			
	Rockefeller		0,755	2,717	0,7025 < CL < 0,8108	2,3611 < CL < 3,1267	1,0	1,0	3,0
2014	Aracaju P	F1	13,145	37,784	12,4253 < CL < 13,9069	33,5690 < CL < 42,5283	14,3	17,8	3,6
	Aracaju C1	F7	30,728	163,599	27,4459 < CL < 34,4036	126,2634 < CL < 211,9755	40,7	60,2	2,3
	Aracaju C2		31,558	245,824	27,4785 < CL < 36,2427	172,3738 < CL < 350,5714	41,8	90,5	1,8
	Aracaju G1	F7	8,739	62,534	7,4030 < CL < 10,3164	48,2728 < CL < 81,0077	11,6	23,0	1,9
	Aracaju G2		7,329	46,761	6,1171 < CL < 8,7821	37,6125 < CL < 58,1343	9,7	17,2	2,0
	Aracaju G3		8,263	44,664	7,1005 < CL < 9,6169	36,4743 < CL < 54,6928	10,9	16,4	2,2
	Crato P	F3	27,912	140,201	25,5326 < CL < 30,5141	120,1620 < CL < 163,5812	37,0	51,6	2,3
	Crato C1	F6	29,889	247,729	25,3161 < CL < 35,2868	175,1436 < CL < 350,3965	39,6	91,2	1,8
	Crato C2		30,796	204,656	26,1259 < CL < 36,3016	151,9393 < CL < 275,6638	40,8	75,3	2,0
	Crato G1	F7	21,393	95,144	19,1135 < CL < 23,9440	76,6795 < CL < 118,0558	28,3	35,0	2,5
Crato G2	19,923		111,709	17,6912 < CL < 22,4360	88,2136 < CL < 141,4627	26,4	41,1	2,2	
Crato G3	24,276		102,520	22,0314 < CL < 26,7495	84,0210 < CL < 125,0931	32,2	37,7	2,6	

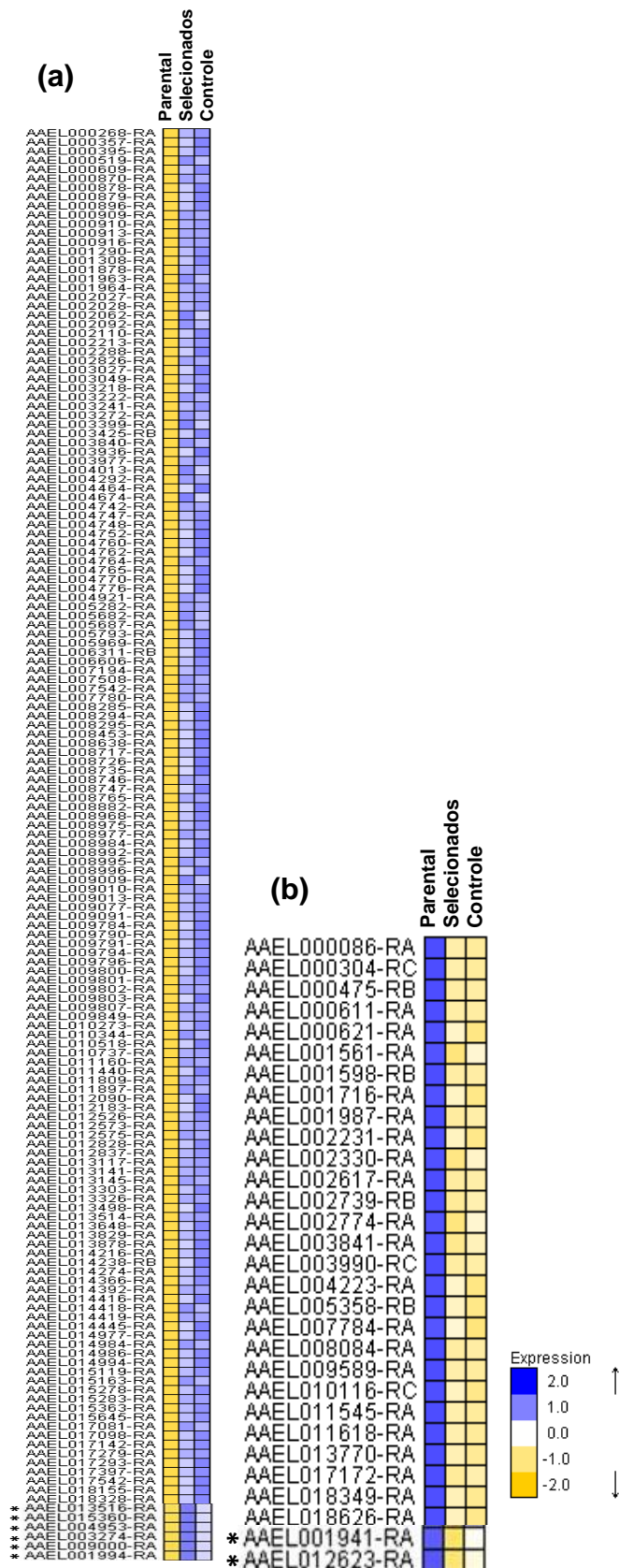
Legenda como na Tabela B1.

## ANEXO C: MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 3 DE RESULTADOS – VERSÃO DE *HEATMAPS* EM AZUL E AMARELO



**Figura C1. Transcrição diferencial em decorrência da seleção com o malathion, em Aracaju.**

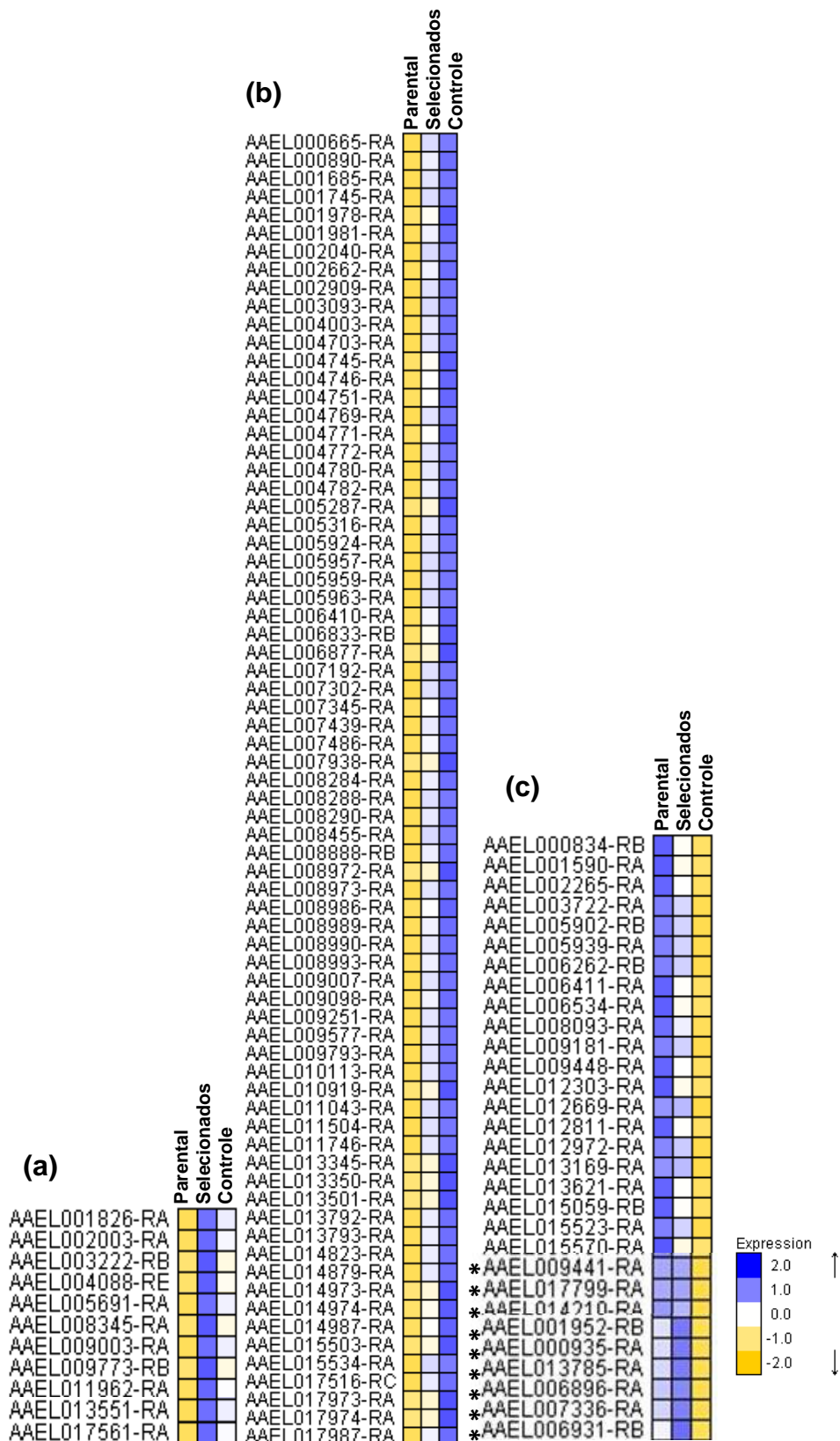
(a) *heatmap* de genes com expressão aumentada. (b) *heatmap* de genes com expressão diminuída. A escala de cores do *heatmap* significa log<sub>2</sub> do FPKM. \*Genes que foram incluídos manualmente aos *clusters*.



**Figura C2. Transcrição diferencial em decorrência da manutenção em laboratório, em Aracaju.**

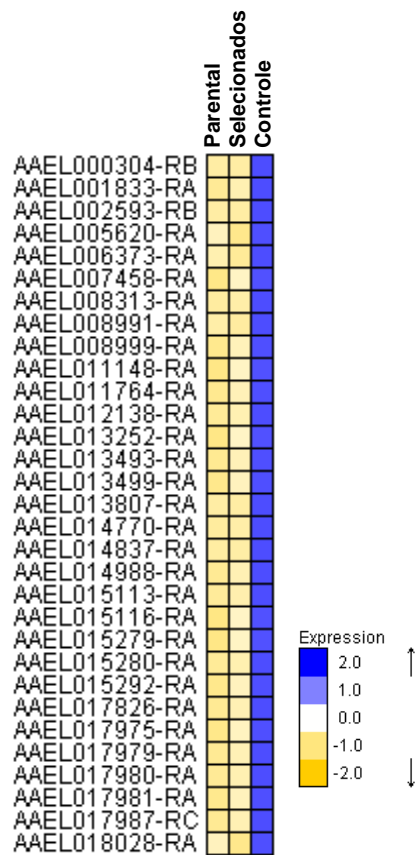
Legenda como na Figura C1.





**Figura C3. Transcrição diferencial em decorrência da seleção com o malathion e da manutenção em laboratório, em Aracaju.**

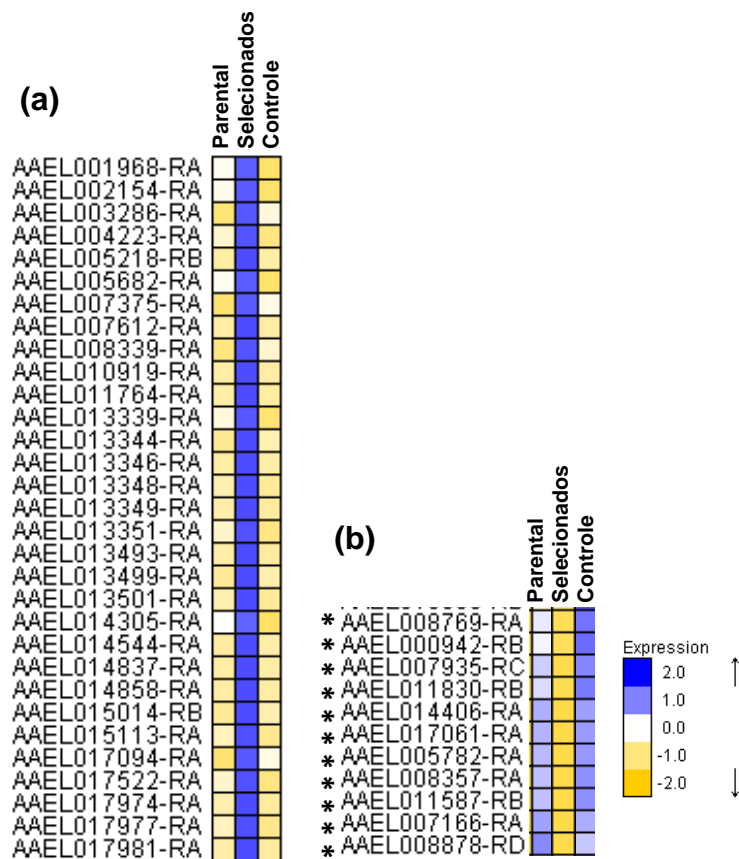
Legenda como na Figura C1.



**Figura C4. Transcrição diferencial em decorrência da manutenção em laboratório, com reversão completa nas amostras selecionadas com malathion, em Aracaju.**

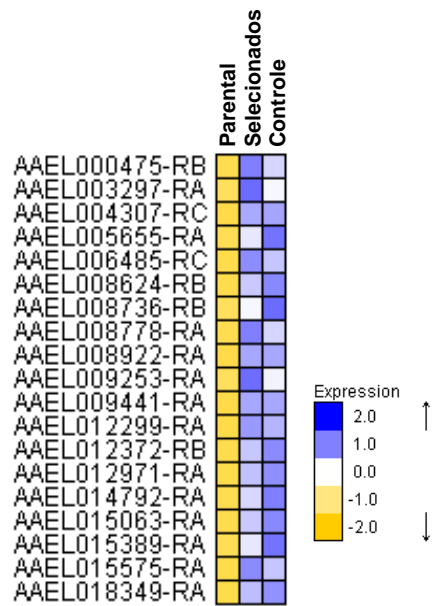
Legenda como na Figura C1.





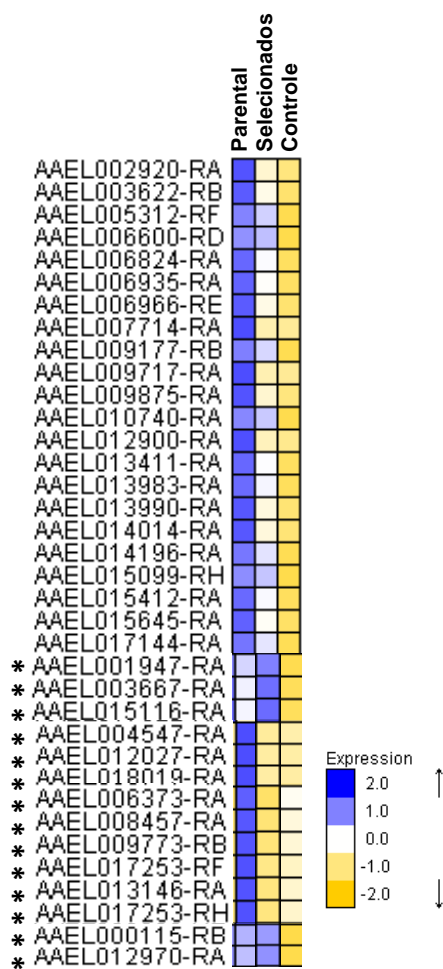
**Figura C5. Transcrição diferencial em decorrência da seleção com o malathion, em Crato.**

Legenda como na Figura C1.



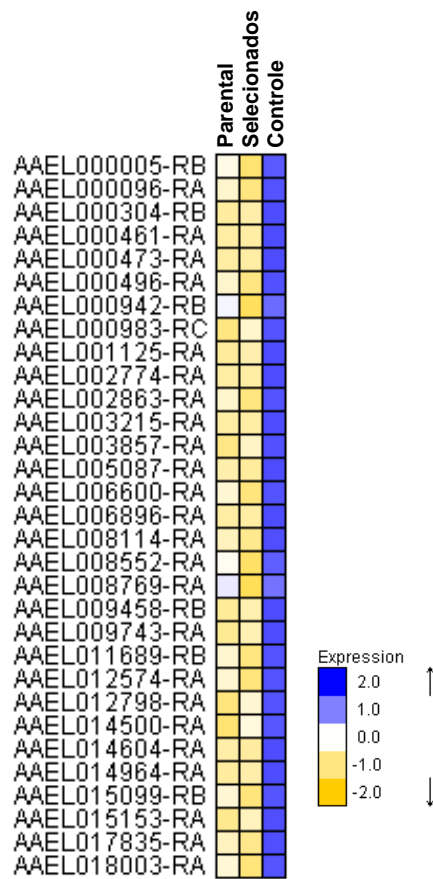
**Figura C6. Transcrição diferencial em decorrência da manutenção em laboratório, em Crato.**

Legenda como na Figura C1.



**Figura C7. Transcrição diferencial em decorrência da seleção com o malathion e da manutenção em laboratório, em Crato.**

Legenda como na Figura C1.



**Figura C8. Transcrição diferencial em decorrência da manutenção em laboratório, com reversão completa nas amostras selecionadas com malathion, em Crato.**

Legenda como na Figura C1.

# ANEXO D: MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 3 DE RESULTADOS – ANOTAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM ARACAJU

**Tabela D1. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a seleção com o OP malathion, em laboratório (aumentos de expressão)**

Seq name	pep name	class	database	<i>e-value</i>
AAEL015069-PA	AGAP000073-PA - membrane organization - heart contraction - muscle cell development - cardiac muscle tissue development - sarcolemma - sarcoglycan	cs	GO	2,00E-85
AAEL003405-PB	Regulator of microtubule dynamics protein 1 - probable fragment	cs	SWISSP	2,00E-18
AAEL004406-PA	extracellular region - muscle cell fate determination - molecular_function	cs	GO	3,00E-52
AAEL005809-PA	cep290 - ciliary tip - olfactory behavior	cs	GO	0
AAEL004150-PA	fibrinogen C domain containing 1 - Mus musculus - chitin binding - membrane - integral component of membrane - metal ion binding	Cuticle	GO	1,00E-48
AAEL003079-PA	UDP-glucuronosyltransferase 2B1	met/carb	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL002328-PA	positive regulation of release of cytochrome c from mitochondria - cellular response to hypoxia - extracellular exosome -	met/energy	GO	0,000001
AAEL002138-PA	lipid catabolic process - lipase - carboxylic ester hydrolase - cellular_component	met/lipid	GO	2,00E-34
AAEL007522-PA	ceramide transfer protein - ER to Golgi ceramide transport - phosphatidylinositol-4-phosphate binding - ceramide transporter - ceramide binding - - probable fragment	pe	GO	8,00E-95
AAEL008934-PA	Trypsin	pm/protease	KOG	8,00E-42
AAEL017516-PA	AGAP006037-PA - cytosolic large ribosomal subunit - translation - structural constituent of ribosome - ribosomal large subunit assembly	ps	GO	3,00E-92

AAEL011414-PA	High mobility group protein D - dendrite morphogenesis - muscle organ development - DNA binding	st	GO	1,00E-41
AAEL004341-PA	Acetylcholinesterase/Butyrylcholinesterase	st	KOG	3,00E-56
AAEL003317-PA	membrane-bound alkaline phosphatase - probable fragment	st	REFSEQ- INVERTEBRATE	2,00E-60
AAEL003286-PA	membrane-bound alkaline phosphatase - probable fragment	st	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL012299-PA	nucleus - phosphoprotein phosphatase - dephosphorylation - cytoplasm - cation binding - protein dephosphorylation - probable fragment	st	GO	2,00E-79
AAEL013099-PA	AGAP004580-PA - transcription factor sequence-specific DNA binding - probable fragment	tf	GO	3,00E-29
AAEL010786-PA	FtsJ-like RNA methyltransferase - probable fragment	tm	KOG	0
AAEL002318-PA	AAEL002318-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL001268-PA	AAEL001268-PA partial	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL008249-PA	AAEL008249-PD	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	3,00E-48
AAEL006979-PA	AAEL006979-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	5,00E-28

Tentativa de anotação funcional dos transcritos, baseada nos maiores escores de similaridade e nos menores valores de *E-value* obtidos através de buscas em nove diferentes bancos de dados de sequências proteicas. Seq name: nome do gene codificante. Pep name: nome do peptídeo mais similar. Class: categoria biológica a qual o peptídeo pertence. Database: banco de dados onde o peptídeo mais similar foi depositado. cs: citoesqueleto. Cuticle: cutícula. detox: detoxificação. extmat: matriz extracelular. imm: imunidade. met/aa: metabolismo de aminoácidos. met/carb: metabolismo de carboidratos. met/energy: metabolismo energético. met/int: metabolismo intermediário. met/lipid: metabolismo de lipídeos. met/nuc: metabolismo de nucleotídeos. ne: exportação do núcleo. nr: regulação nuclear. pe: maquinaria de exportação proteica. pm e pm/protease: maquinaria de modificação proteica. prot: maquinaria proteolítica (proteassoma). ps: maquinaria de síntese proteica. s/: secretados. s/OBP: proteínas de ligação a odorantes. st: transdução de sinais. st/apoptosis: transdução de sinais, apoptose. storage/: transportadores / armazenagem. tf: fatores de transcrição. tm: maquinaria de transcrição. tr: transportadores. uc: desconhecidos conservados. uk: desconhecidos.

**Tabela D2. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a seleção com o OP malathion, em laboratório (declínios de expressão)**

<b>Seq name</b>	<b>pep name</b>	<b>class</b>	<b>database</b>	<b>e-value</b>
AAEL002897-PA	ATP synthase subunit f mitochondrial	met/energy	SWISSP	6,00E-37
AAEL015081-PA	Mitochondrial tRNA-specific 2-thiouridylase 1	met/energy	SWISSP	0
AAEL007009-PA	eukaryotic elongation factor 2 lysine methyltransferase - peptidyl-lysine trimethylation - protein-lysine N- methyltransferase	ps	GO	2,00E-31
AAEL007158-PB	AGAP002684-PA - preribosome large subunit precursor - rRNA processing - nucleus	ps	GO	0
AAEL002263-PB	Probable salivary secreted peptide	s/	SWISSP	0,000004
AAEL004088-PB	Aldo/keto reductase family	uc	KOG	0
AAEL014259-PA	AAEL014259-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL000697-PB	AAEL000697-PB	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL002550-PA	Unknown product	uk		

Legenda como na Tabela D1.

**Tabela D3. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a adaptação à criação em laboratório (aumentos de expressão)**

<b>Seq name</b>	<b>pep name</b>	<b>class</b>	<b>database</b>	<b>e-value</b>
AAEL003027-PA	AGAP000345-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	0
AAEL012090-PA	AGAP000745-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	0
AAEL008294-PA	AGAP005453-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	2,00E-54
AAEL008285-PA	AGAP005456-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	5,00E-65
AAEL013514-PA	AGAP005998-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	1,00E-43
AAEL003274-PA	AGAP009869-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	1,00E-40
AAEL003241-PA	AGAP009872-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	2,00E-47
AAEL003222-PA	AGAP009872-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	6,00E-44
AAEL003218-PA	AGAP009872-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	2,00E-45
AAEL003272-PA	AGAP009876-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	7,00E-59
AAEL014418-PA	AGAP009877-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space - probable fragment	Cuticle	GO	2,00E-75
AAEL014416-PA	AGAP009878-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	2,00E-79
AAEL014419-PA	AGAP009879-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	1,00E-60
AAEL004760-PA	Ccp84Aa - chitin-based cuticle development - structural constituent of chitin-based larval cuticle - extracellular matrix - structural constituent of	Cuticle	GO	1,00E-32
AAEL004764-PA	Ccp84Aa - chitin-based cuticle development - structural constituent of chitin-based larval cuticle - extracellular matrix - structural constituent of	Cuticle	GO	9,00E-32
AAEL004742-PA	Ccp84Aa - chitin-based cuticle development - structural constituent of chitin-based larval cuticle - extracellular matrix - structural constituent of	Cuticle	GO	1,00E-32
AAEL013829-PA	Ccp84Ag - extracellular matrix - chitin-based cuticle development - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural constituent of	Cuticle	GO	4,00E-37



AAEL009803-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	5,00E-65
AAEL009802-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	1,00E-66
AAEL002092-PA	cuticle protein	Cuticle	REFSEQ- INVERTEBRATE	3,00E-72
AAEL008765-PA	cuticle protein	Cuticle	REFSEQ- INVERTEBRATE	3,00E-68
AAEL009807-PA	cuticle protein	Cuticle	REFSEQ- INVERTEBRATE	3,00E-64
AAEL015119-PA	cuticle protein	Cuticle	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL009791-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	2,00E-58
AAEL000879-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	3,00E-16
AAEL009790-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	2,00E-59
AAEL009796-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	1,00E-47
AAEL009784-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	7,00E-60
AAEL009801-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	8,00E-63
AAEL015163-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	4,00E-59
AAEL009794-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	3,00E-55
AAEL015363-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	4,00E-65
AAEL009800-PA	Cuticle protein - probable fragment	Cuticle	SWISSP	8,00E-52
AAEL004292-PA	Cuticle protein 1 - probable fragment	Cuticle	SWISSP	1E-12
AAEL000916-PA	Cuticle protein 16.5 isoform B	Cuticle	SWISSP	0,000001
AAEL004748-PA	cuticle protein 18.6	Cuticle	REFSEQ- INVERTEBRATE	3,00E-57
AAEL013878-PA	cuticle protein 8	Cuticle	REFSEQ- INVERTEBRATE	3,00E-54
AAEL013516-PA	cuticle protein CP14.6	Cuticle	REFSEQ- INVERTEBRATE	4,00E-43
AAEL007194-PA	cuticle protein CP14.6	Cuticle	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-50
AAEL000909-PA	Cuticle protein LPCP-23	Cuticle	SWISSP	2E-15
AAEL000878-PA	Cuticle protein LPCP-23	Cuticle	SWISSP	7,00E-17
AAEL004765-PA	Cuticular protein 30F - neurogenesis - sensory perception of pain - structural constituent of chitin-based larval cuticle - extracellular matrix -	Cuticle	GO	7,00E-30
AAEL018328-PA	Cuticular protein 30F - neurogenesis - sensory perception of pain - structural constituent of chitin-based larval cuticle - extracellular matrix -	Cuticle	GO	4,00E-34
AAEL004776-PA	Cuticular protein 30F - neurogenesis - sensory perception of pain - structural constituent of chitin-based larval cuticle - extracellular matrix -	Cuticle	GO	4,00E-35
AAEL004752-PA	Cuticular protein 35B - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - chitin-based cuticle development - structural - probable fragment	Cuticle	GO	4,00E-19
AAEL004747-PA	Cuticular protein 35B - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - chitin-based cuticle development - structural - probable fragment	Cuticle	GO	5,00E-19

AAEL008726-PA	Cuticular protein 56F - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - chitin-based cuticle development - structural - probable fragment	Cuticle	GO	1E-11
AAEL009009-PA	Cuticular protein 62Bc - chitin-based cuticle development - structural constituent of chitin-based larval cuticle - extracellular matrix - structural - probable fragment	Cuticle	GO	1,00E-15
AAEL014977-PA	Cuticular protein 76Ba - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	7,00E-24
AAEL014986-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	3,00E-25
AAEL008992-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	2,00E-24
AAEL008968-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	2,00E-21
AAEL009010-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	5,00E-25
AAEL008984-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	1,00E-23
AAEL015278-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	3,00E-21
AAEL008975-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	4,00E-24
AAEL009000-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	3,00E-24

AAEL008995-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	7,00E-22
AAEL009013-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	1,00E-34
AAEL008996-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	6,00E-21
AAEL014984-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	5,00E-34
AAEL008977-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	1,00E-24
AAEL001290-PA	Cuticular protein 92F - structural constituent of chitin-based larval cuticle - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural - probable fragment	Cuticle	GO	4,00E-35
AAEL004921-PA	endocuticle structural glycoprotein SgAbd-1	Cuticle	REFSEQ-INVERTEBRATE	4,00E-44
AAEL008295-PA	endocuticle structural glycoprotein SgAbd-2	Cuticle	REFSEQ-INVERTEBRATE	8,00E-64
AAEL004762-PA	larval cuticle protein A3A	Cuticle	REFSEQ-INVERTEBRATE	7,00E-76
AAEL002110-PA	larval cuticle protein A3A	Cuticle	REFSEQ-INVERTEBRATE	2,00E-52
AAEL000896-PA	Larval/pupal cuticle protein H1C	Cuticle	SWISSP	2,00E-40
AAEL017293-PA	Larval/pupal cuticle protein H1C	Cuticle	SWISSP	2E-09
AAEL011897-PA	obstructor-A - chitin-based embryonic cuticle biosynthetic process - regulation of multicellular organism growth - regulation of tube size	Cuticle	GO	3,00E-28
AAEL004770-PA	pupal cuticle protein	Cuticle	REFSEQ-INVERTEBRATE	2,00E-46
AAEL004674-PA	pupal cuticle protein	Cuticle	REFSEQ-INVERTEBRATE	5,00E-44
AAEL003049-PA	pupal cuticle protein 78E	Cuticle	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL014994-PA	Tweedlebeta - body morphogenesis - structural constituent of chitin-based cuticle - chitin-based cuticle development - proteinaceous extracellular	Cuticle	GO	3,00E-53
AAEL008638-PA	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies	detox	KOG	7,00E-55

AAEL005793-PA	Non-ribosomal peptide synthetase/alpha-aminoacidate reductase [Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism]	detox	KOG	0,00E+00
AAEL003399-PA	Cytochrome P450-4d2 - iron ion binding - heme binding - oxidoreductase	detox/ox	GO	3,00E-96
AAEL010273-PA	Cytochrome P450 4V2 - heme binding - oxidoreductase	detox/ox	GO	6,00E-59
AAEL000357-PA	cytochrome P450-4v8, family 4, subfamily V	detox/ox	GO	1,00E-56
AAEL014392-PA	zye - actin filament organization - cell-matrix adhesion - apical constriction - apical plasma membrane - regulation of embryonic cell shape - - probable fragment	extmat	GO	1,00E-40
AAEL014445-PA	Collagen alpha-1(I) chain (Fragments) - probable fragment	extmat	SWISSP	5,00E-17
AAEL003936-PA	Glycine-rich cell wall structural protein 2	extmat	SWISSP	4E-10
AAEL009849-PA	GPI-anchored cell surface glycoprotein (flocculin) - membrane - cell wall - single organismal cell-cell adhesion - single-species biofilm formation - probable fragment GPI-anchored cell surface glycoprotein; (Flocculina de <i>Sacharomices</i> )	extmat	GO	5,00E-28
AAEL002213-PA	vegetative cell wall protein gp1-like - probable fragment	extmat	REFSEQ-INVERTEBRATE	8E-11
AAEL013498-PA	prophenoloxidase	imm	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL003840-PA	keratinocyte lectin	imm	REFSEQ-INVERTEBRATE	2,00E-42
AAEL010737-PA	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase - pyridoxal phosphate binding - carboxy-lyase - cellular amino acid metabolic process	met/aa	GO	0,00E+00
AAEL007542-PA	Glutamate decarboxylase	met/aa	KOG	0
AAEL017098-PA	Aromatic amino acid hydroxylase	met/aa	KOG	0
AAEL014238-PB	Aromatic-L-amino-acid/L-histidine decarboxylase	met/aa	KOG	0
AAEL004013-PA	glucose dehydrogenase	met/energy	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL017081-PA	copper ion transport - mitochondrial intermembrane space - respiratory chain complex IV assembly - copper chaperone	met/energy	GO	1,00E-20
AAEL011809-PA	Glucose dehydrogenase FAD quinone	met/energy	SWISSP	0
AAEL005969-PA	Phospholipase	met/lipd	KOG	8,00E-87
AAEL000910-PA	AGAP010788-PA - fatty-acyl-CoA reductase (alcohol-forming) - long-chain fatty-acyl-CoA metabolic process - wax biosynthetic process - peroxisome	met/lipd	GO	0,00E+00
AAEL004953-PA	Fatty acyl-CoA elongase/Polyunsaturated fatty acid specific elongation enzyme	met/lipd	KOG	4,00E-49
AAEL000268-PA	lipase	met/lipd	REFSEQ-INVERTEBRATE	0

AAEL003977-PA	ELOVL fatty acid elongase 4b - fatty acid biosynthetic process - 3-oxo-arachidoyl-CoA synthase - endoplasmic reticulum - unsaturated fatty acid	met/lipd	GO	1,00E-84
AAEL013648-PA	Acyl-CoA reductase	met/lipd	KOG	0
AAEL001878-PA	phospholipase A1 member A	met/lipd	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL010344-PA	Phosphatidylinositol transfer protein SEC14	met/lipd	KOG	3,00E-30
AAEL006311-PB	Nuclear pore complex component (sc Seh1)	ne	KOG	0
AAEL015283-PA	synaptic vesicle glycoprotein 2B	pe	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL008717-PA	calcium binding and coiled-coil domain 2 - cytoplasmic vesicle - PML body - membrane - autophagy - cytoskeleton - cytoplasm	pe	GO	4,00E-07
AAEL002288-PA	extracellular region - proteolysis - serine-type endopeptidase	pm/protease	GO	1,00E-64
AAEL007508-PA	serine-type endopeptidase - proteolysis - probable fragment	pm/protease	GO	7,00E-64
AAEL012573-PA	serine protease	pm/protease	REFSEQ- INVERTEBRATE	3,00E-75
AAEL012575-PA	serine protease	pm/protease	REFSEQ- INVERTEBRATE	3,00E-66
AAEL001994-PA	odorant-binding protein A10 - probable fragment OBP	s/OBP	SWISSP	2,00E-26
AAEL005682-PA	odorant-binding protein A10 - probable fragment OBP	s/OBP	SWISSP	6,00E-26
AAEL002027-PA	odorant-binding protein A10 - probable fragment OBP	s/OBP	SWISSP	3,00E-26
AAEL002028-PA	odorant-binding protein A10 - probable fragment OBP	s/OBP	SWISSP	4,00E-26
AAEL005687-PA	odorant-binding protein A10 - probable fragment OBP	s/OBP	SWISSP	2,00E-26
AAEL001964-PA	odorant-binding protein A10 - probable fragment OBP	s/OBP	SWISSP	2,00E-24
AAEL001963-PA	odorant-binding protein A10 - probable fragment OBP	s/OBP	SWISSP	3,00E-27
AAEL008882-PA	Basic proline-rich protein - extracellular region - hormone	st	GO	2,00E-73
AAEL009077-PA	alkaline phosphatase	st	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL010518-PA	cyclin-dependent serine/threonine-protein kinase DDB_G0272797/DDB_G0274007 - probable fragment	st	SWISSP	3,00E-24
AAEL000395-PA	retinoid X receptor	st	GO	0,00E+00
AAEL011160-PA	MEK1 interacting protein 1 - zinc ion binding - establishment of cell polarity - mitogen-activated protein kinase kinase binding - maintenance of	st	GO	3E-08
AAEL015645-PA	multiple RNA-binding domain-containing protein 1	tm	REFSEQ- INVERTEBRATE	2,00E-97
AAEL002062-PA	Nuclear hormone receptor betaFTZ-F1	tm	KOG	0

AAEL014216-PA	C2H2-type Zn-finger protein - probable fragment	tm	KOG	2,00E-20
AAEL018155-PA	membrane - transporter - oligopeptide transport	tr	GO	0,00E+00
AAEL001308-PA	sleep - intracellular - transporter - transport - cellular_component - molecular_function	tr	GO	1,00E-86
AAEL013141-PA	mfs transporter	tr	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-84
AAEL012183-PA	AGAP006609-PA - organic cation transmembrane transporter - integral component of plasma membrane - probable fragment	tr	GO	0,00E+00
AAEL004464-PA	AGAP003038-PA - organic cation transport - carnitine transmembrane transporter - integral component of plasma membrane - amine transmembrane	tr	GO	0,00E+00
AAEL012526-PA	AAEL012526-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL008747-PA	AAEL008747-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL007780-PA	AAEL007780-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL017279-PA	AAEL017279-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	2,00E-27
AAEL008735-PA	AAEL008735-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL013145-PA	AAEL013145-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	5,00E-95
AAEL013326-PA	AAEL013326-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL017142-PA	AAEL017142-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	2,00E-29
AAEL012828-PA	AAEL012828-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	2,00E-94
AAEL008453-PA	AAEL008453-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL000519-PA	AAEL000519-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-53
AAEL017397-PA	AAEL017397-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-49
AAEL006606-PA	AAEL006606-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	2,00E-55
AAEL013303-PA	AAEL013303-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL008746-PA	AAEL008746-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL013117-PA	AAEL013117-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL011440-PA	AAEL011440-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL000870-PA	AAEL000870-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	4,00E-92
AAEL002826-PA	AAEL002826-PA partial	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL017542-PA	AAEL017542-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	2,00E-48
AAEL015360-PA	AAEL015360-PA partial	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	2,00E-78
AAEL003425-PB	AAEL003425-PB partial	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0

AAEL009091-PA	AAEL009091-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL012837-PA	AAEL012837-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-27
AAEL000609-PA	AAEL000609-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	2,00E-97
AAEL014366-PA	AAEL014366-PB	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL005282-PA	AAEL005282-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0,00E+00
AAEL014274-PA	AAEL014274-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0,00E+00
AAEL000913-PA	AAEL000913-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0

Legenda como na Tabela D1.

**Tabela D4. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a adaptação à criação em laboratório (declínios de expressão)**

Seq name	pep name	class	database	e-value
AAEL007784-PA	AGAP011117-PA - axonogenesis - extracellular space - proteinaceous extracellular matrix	extmat	GO	9E-13
AAEL002231-PA	cuticle protein	Cuticle	REFSEQ-INVERTEBRATE	8,00E-38
AAEL004223-PA	Cecropin-B1	imm	SWISSP	2,00E-23
AAEL000621-PA	Cecropin-B	imm	SWISSP	3,00E-19
AAEL003841-PA	Defensin-A	imm	SWISSP	8,00E-53
AAEL000611-PA	Cecropin-B type 2	imm	SWISSP	7,00E-25
AAEL018349-PA	Cecropin-A2	imm	SWISSP	5,00E-23
AAEL017172-PA	Ribokinase - probable fragment	met/carb	KOG	6,00E-34
AAEL010116-PC	Calcium uptake protein 1 homolog mitochondrial - probable fragment	met/energy	SWISSP	0
AAEL009589-PA	Mitochondrial endonuclease	met/nuc	KOG	0
AAEL000304-PC	Predicted protein - nuclear pore cytoplasmic filaments - telomere tethering at nuclear periphery - structural constituent of nuclear pore - nuclear	ne	GO	0,0000008
AAEL008084-PA	Phosphatidylserine-specific receptor PtdSerR contains JmjC domain	nr	KOG	0
AAEL000475-PB	nuclear protein NAP - probable fragment	nr	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL002774-PA	Golgi microtubule-associated protein - Golgi membrane - Rab GTPase binding - Golgi cis cisterna - vesicle-mediated transport - Golgi organization - - probable fragment	pe	GO	1,00E-99
AAEL000086-PA	anionic trypsin-2	pm/protease	REFSEQ-INVERTEBRATE	2,00E-87
AAEL001987-PA	odorant-binding protein A10 - probable fragment OBP	s/OBP	SWISSP	1,00E-23
AAEL002617-PA	odorant-binding protein OBP	s/OBP	REFSEQ-INVERTEBRATE	9,00E-55
AAEL011545-PA	retrograde transport	st	GO	6,00E-51
AAEL002330-PA	Transcription factor grauzone - probable fragment	tf	SWISSP	5,00E-67
AAEL013770-PA	AGAP006592-PA - transcription factor sequence-specific DNA binding	tf	GO	0
AAEL005358-PB	quaking related 58E-1 - nucleus - neurogenesis - sensory perception of pain - catalytic step 2 spliceosome - mRNA	tm	GO	3,00E-63



splicing

AAEL001716-PA	KEKE-like motif-containing transcription regulator (Rlr1)/suppressor of sin4	tm	KOG	0
AAEL001941-PA	metal ion binding - regulation of transcription	tm	GO	1,00E-49
AAEL003990-PC	Myelodysplasia/myeloid leukemia factor - protein stabilization - regulation of transcription - probable fragment	tm	GO	6,00E-44
AAEL002739-PB	C2H2-type Zn-finger protein - probable fragment	tm	KOG	3E-12
AAEL012623-PA	AAEL012623-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-90
AAEL001561-PA	AAEL001561-PD	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	4,00E-99
AAEL001598-PB	AAEL001598-PB	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL011618-PA	AAEL011618-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0

Legenda como na Tabela D1.

**Tabela D5. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a seleção com o OP malathion e a adaptação à criação em laboratório (Efeitos duplos: aumentos de expressão, sendo mais marcado nas amostras selecionadas)**

<b>Seq name</b>	<b>pep name</b>	<b>class</b>	<b>database</b>	<b>e-value</b>
AAEL008345-PA	Cytochrome P450-4g1 - lipid metabolic process - oxidoreductase	detox/ox	GO	0
AAEL009003-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	4,00E-23
AAEL003222-PB	Pupal cuticle protein 36 - probable fragment	Cuticle	SWISSP	5,00E-16
AAEL017561-PA	ATP-dependent DNA ligase IV	nr	KOG	0
AAEL011962-PA	Transport and Golgi organization protein 2	pe	SWISSP	4,00E-59
AAEL001826-PA	Odorant-binding protein 56a OBP	s/OBP	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-44
AAEL005691-PA	odorant-binding protein A10 - probable fragment OBP	s/OBP	SWISSP	8,00E-26
AAEL002003-PA	odorant-binding protein A10 - probable fragment OBP	s/OBP	SWISSP	2,00E-26
AAEL009773-PB	geminin - negative regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway - regulation of syncytial blastoderm mitotic cell cycle -	st	GO	4,00E-26
AAEL013551-PA	Transcription factor grauzone	tf	SWISSP	3,00E-57
AAEL004088-PE	Aldo/keto reductase family	uc	KOG	0

Legenda como na Tabela D1.

**Tabela D6. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a seleção com o OP malathion e a adaptação à criação em laboratório (Efeitos duplos: aumentos de expressão, sendo mais marcado nas amostras controle)**

<b>Seq name</b>	<b>pep name</b>	<b>class</b>	<b>database</b>	<b>e-value</b>
AAEL007439-PA	Myosin light chain cytoplasmic - myosin VI complex - myosin V complex - myosin II complex - myosin VII complex - myosin binding - protein binding	cs	GO	4,00E-65
AAEL008986-PA	adult cuticle protein	Cuticle	REFSEQ-INVERTEBRATE	1,00E-43
AAEL015534-PA	AGAP000745-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	0
AAEL008284-PA	AGAP005453-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	1,00E-55
AAEL008288-PA	AGAP005453-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	1,00E-54
AAEL008290-PA	AGAP007042-PA - structural constituent of cuticle - extracellular space	Cuticle	GO	4,00E-33
AAEL004745-PA	Ccp84Ab - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - chitin-based cuticle development - structural constituent of	Cuticle	GO	3,00E-27
AAEL004746-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	5,00E-28
AAEL009793-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	2,00E-61
AAEL004769-PA	cuticle protein	Cuticle	REFSEQ-INVERTEBRATE	8,00E-71
AAEL004751-PA	Cuticle protein	Cuticle	SWISSP	1,00E-27
AAEL001685-PA	Cuticle protein 16.5 isoform B	Cuticle	SWISSP	0,0000002
AAEL015503-PA	cuticle protein 8	Cuticle	REFSEQ-INVERTEBRATE	3,00E-55
AAEL000665-PA	cuticular protein	Cuticle	REFSEQ-INVERTEBRATE	1,00E-61
AAEL004771-PA	Cuticular protein 35B - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - chitin-based cuticle development - structural - probable fragment	Cuticle	GO	1,00E-17
AAEL004772-PA	Cuticular protein 35B - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - chitin-based cuticle development - structural - probable fragment	Cuticle	GO	2,00E-19
AAEL004782-PA	Cuticular protein 35B - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - chitin-based cuticle development - structural - probable fragment	Cuticle	GO	2,00E-18

AAEL011043-PA	Cuticular protein 66Cb - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - chitin-based cuticle development - structural - probable fragment	Cuticle	GO	3,00E-26
AAEL014987-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	4,00E-32
AAEL008993-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	5,00E-23
AAEL009007-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	6,00E-24
AAEL014973-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	2,00E-21
AAEL008973-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	4,00E-21
AAEL008990-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	3,00E-25
AAEL008972-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	2,00E-21
AAEL014974-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	4,00E-23
AAEL008989-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	6,00E-21
AAEL007192-PA	flexible cuticle protein 12	Cuticle	REFSEQ- INVERTEBRATE	4,00E-48
AAEL000890-PA	Larval/pupal cuticle protein H1C	Cuticle	SWISSP	1,00E-40
AAEL009577-PA	obstructor-A - chitin-based embryonic cuticle biosynthetic process - regulation of multicellular organism growth - regulation of tube size	Cuticle	GO	3,00E-82

AAEL011504-PA	pupal cuticle protein	Cuticle	REFSEQ- INVERTEBRATE	3,00E-66
AAEL004780-PA	pupal cuticle protein	Cuticle	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-88
AAEL014879-PA	pupal cuticle protein	Cuticle	REFSEQ- INVERTEBRATE	7,00E-63
AAEL013793-PA	TweedleE - proteinaceous extracellular matrix - chitin-based cuticle development - structural constituent of chitin-based cuticle	Cuticle	GO	1,00E-46
AAEL013792-PA	TweedleE - proteinaceous extracellular matrix - chitin-based cuticle development - structural constituent of chitin-based cuticle	Cuticle	GO	1,00E-34
AAEL006877-PA	Prophenoloxidase 2 - melanotic encapsulation of foreign target - defense response to Gram-positive bacterium - defense response to fungus -	imm	GO	0
AAEL013501-PA	Prophenoloxidase 2 - melanotic encapsulation of foreign target - defense response to Gram-positive bacterium - defense response to fungus -	imm	GO	0
AAEL010919-PA	Prophenoloxidase 1 - sleep - defense response to Gram-positive bacterium - dopamine metabolic process - dopamine monooxygenase - L-DOPA - probable fragment	imm	GO	0
AAEL004003-PA	glucose dehydrogenase	met/energy	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL006833-PB	Succinyl-CoA synthetase alpha subunit	met/energy	KOG	0
AAEL011746-PA	GTP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit - probable fragment	met/energy	KOG	0
AAEL001745-PA	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase/Polyprenyl synthetase	met/int	KOG	5,00E-58
AAEL001978-PA	uroporphyrinogen iii synthase	met/int	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL002909-PA	Triglyceride lipase-cholesterol esterase	met/lipd	KOG	7,00E-79
AAEL003093-PA	fatty acid elongase - fatty acid elongation - integral component of membrane - cellular_component	met/lipd	GO	0,00E+00
AAEL005959-PA	Phospholipase	met/lipd	KOG	1,00E-79
AAEL005957-PA	Phospholipase	met/lipd	KOG	8,00E-89
AAEL017974-PA	heat shock protein 70 B2	pm	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL017973-PA	heat shock protein 70 B2	pm	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL013350-PA	Alpha crystallins - probable fragment	pm	KOG	6,00E-26
AAEL013345-PA	Alpha crystallins - probable fragment	pm	KOG	2,00E-32
AAEL007938-PA	AGAP011920-PA - cytoplasm - serine-type endopeptidase	pm/protease	GO	6,00E-56
AAEL008455-PA	AGAP002322-PA - ubiquitin protein ligase - proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process - protein ubiquitination involved in	prot	GO	0

AAEL017516-PC	ribosomal protein L23a	ps	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL002662-PA	james bond - pheromone biosynthetic process - meiotic spindle organization - male meiosis cytokinesis - very long-chain fatty acid biosynthetic	s/	GO	5,00E-79
AAEL001981-PA	odorant-binding protein A10 - probable fragment OBP	s/OBP	SWISSP	1,00E-21
AAEL002040-PA	odorant-binding protein A10 - probable fragment OBP	s/OBP	SWISSP	3,00E-23
AAEL007486-PA	Acetylcholinesterase/Butyrylcholinesterase	st	KOG	2,00E-85
AAEL005963-PA	Ser/Thr-rich caspase - nurse cell apoptotic process - positive regulation of compound eye retinal cell programmed cell death - salivary gland	st/apoptosis	GO	8,00E-41
AAEL007302-PA	transferase transferring acyl groups other than amino-acyl groups	storage/	GO	0
AAEL008888-PB	CCR4-NOT complex subunit 3 - nuclear-transcribed mRNA catabolic process - probable fragment	tm	GO	3E-15
AAEL007345-PA	cyclic-nucleotide-gated cation channel	tr	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL005287-PA	AAEL005287-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-67
AAEL005316-PA	AAEL005316-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL005924-PA	AAEL005924-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL006410-PA	AAEL006410-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL009251-PA	AAEL009251-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL014823-PA	AAEL014823-PA partial	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL010113-PA	AAEL010113-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	5,00E-96
AAEL009098-PA	AAEL009098-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL004703-PA	AAEL004703-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL017987-PA	AGAP000892-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	2,00E-59

Legenda como na Tabela D1.

**Tabela D7. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a seleção com o OP malathion e a adaptação à criação em laboratório (Efeitos duplos: declínios de expressão, sendo mais marcado nas amostras controle)**

<b>Seq name</b>	<b>pep name</b>	<b>class</b>	<b>database</b>	<b>e-value</b>
AAEL013169-PA	uncharacterized protein encoded by CACTIN-AS1 - probable fragment	cs	SWISSP	2,00E-21
AAEL012303-PA	AGAP000246-PA - intraciliary transport particle B - cilium - centrosome	cs	GO	0
AAEL000834-PB	Flavin-containing monooxygenase	detox	KOG	8,00E-97
AAEL008093-PA	Trypsin	met/aa	KOG	3,00E-55
AAEL012972-PA	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 partial	met/carb	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL001590-PA	Xyloside xylosyltransferase 1	met/carb	SWISSP	4,00E-66
AAEL005939-PA	MpV17 mitochondrial inner membrane protein - molecular_function - mitochondrion - integral component of membrane - membrane - mitochondrial inner	met/energy	GO	4,00E-40
AAEL012811-PA	AGAP012082-PA - mitochondrial translational termination - ribosome binding - translation release factor	met/energy	GO	0
AAEL013785-PA	pyridoxal phosphate binding - molybdenum ion binding - catalytic - probable fragment	met/int	GO	1,00E-30
AAEL003722-PA	ribonuclease UK114 - probable fragment	met/nuc	REFSEQ-INVERTEBRATE	6,00E-32
AAEL006411-PA	DNA topoisomerase I-interacting protein - probable fragment	nr	KOG	1,00E-71
AAEL012669-PA	DNA polymerase delta regulatory subunit 55	nr	KOG	0
AAEL007336-PA	Ubiquitin-conjugating enzyme E2Q-like protein CG4502 - probable fragment	prot	SWISSP	8,00E-78
AAEL003822-PB	translation - methyltransferase - copper ion binding - probable fragment	ps	GO	1,00E-67
AAEL006262-PB	AGAP005239-PA - translation - structural constituent of ribosome	ps	GO	0
AAEL015523-PA	serine/threonine-protein kinase 6 - probable fragment	st	REFSEQ-INVERTEBRATE	2,00E-35
AAEL006534-PA	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor - probable fragment	st	KOG	0
AAEL006931-PB	POU domain class 3 transcription factor 2 - probable fragment	tm	SWISSP	1E-12
AAEL014210-PA	regulation of transcription - probable fragment	tm	GO	2,00E-34

AAEL009448-PA	SAGA-associated factor 29kDa - Ada2/Gcn5/Ada3 transcription activator complex - chromatin remodeling - histone acetylation - methylated histone	tm	GO	0
AAEL009181-PA	AAEL009181-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-38
AAEL015570-PA	AAEL015570-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL015454-PA	AAEL015454-PA partial	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	6,00E-78
AAEL002265-PA	AAEL002265-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL009441-PA	AAEL009441-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL001952-PB	Phosphoprotein/predicted coiled-coil protein	uc	KOG	3,00E-17
AAEL005902-PB	Uncharacterized conserved protein	uc	KOG	0
AAEL013621-PA	AAEL013621-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL015059-PB	AAEL015059-PB	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL006896-PA	AAEL006896-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-95
AAEL000935-PA	Unknown product	uk		

Legenda como na Tabela D1.



**Tabela D8. Anotação funcional dos genes de Aracaju DE em resposta a adaptação à criação em laboratório, com reversão do padrão de expressão pela seleção com o malathion**

Seq name	pep name	class	database	e-value
AAEL015280-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	4,00E-25
AAEL008991-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	7,00E-25
AAEL014988-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	1,00E-28
AAEL008999-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	2,00E-29
AAEL015279-PA	Cuticular protein 76Bb - chitin-based cuticle development - extracellular matrix - structural constituent of chitin-based larval cuticle - structural - probable fragment	Cuticle	GO	2,00E-24
AAEL014770-PA	Cuticular protein 62Bc - chitin-based cuticle development - structural constituent of chitin-based larval cuticle - extracellular matrix - structural - probable fragment	Cuticle	GO	5E-13
AAEL018028-PA	cytochrome P450, family 4, subfamily V, polypeptide 7 - Danio rerio - oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen - heme binding - oxidation-reduction process - iron ion binding - metal ion binding - cellular_component - oxidoreductase activity - monooxygenase activity	detox/ox	GO	3,00E-65
AAEL015113-PA	Prophenoloxidase 1 - sleep - defense response to Gram-positive bacterium - dopamine metabolic process - dopamine monooxygenase - L-DOPA	imm	GO	0
AAEL013493-PA	Prophenoloxidase 1 - sleep - defense response to Gram-positive bacterium - dopamine metabolic process - dopamine monooxygenase - L-DOPA	imm	GO	0
AAEL015116-PA	Prophenoloxidase 1 - sleep - defense response to Gram-positive bacterium - dopamine metabolic process - dopamine monooxygenase - L-DOPA	imm	GO	0
AAEL013499-PA	prophenoloxidase	imm	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL011764-PA	Prophenoloxidase 1 - sleep - defense response to Gram-positive bacterium - dopamine metabolic process - dopamine monooxygenase - L-DOPA	imm	GO	0

AAEL014837-PA	Prophenoloxidase 1 - sleep - defense response to Gram-positive bacterium - dopamine metabolic process - dopamine monoxygenase - L-DOPA	imm	GO	0
AAEL015292-PA	Complex III assembly factor LYRM7 - mitochondrial matrix - probable fragment	met/energy	GO	1E-11
AAEL005620-PA	ATP synthase subunit f mitochondrial	met/energy	SWISSP	1,00E-30
AAEL012138-PA	24-dehydrocholesterol reductase	met/lipd	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL000304-PB	Predicted protein - nuclear pore cytoplasmic filaments - telomere tethering at nuclear periphery - structural constituent of nuclear pore - nuclear	ne	GO	0,0000008
AAEL017981-PA	heat shock protein 70 B2	pm	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL017979-PA	heat shock protein 70 B2	pm	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL017975-PA	heat shock protein 70 B2	pm	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL017980-PA	heat shock protein 70 B2	pm	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL013252-PA	AGAP008419-PA - phagolysosome assembly involved in apoptotic cell clearance - phagocytic vesicle - Golgi to endosome transport - Golgi apparatus - - probable fragment	pm/protease	GO	3,00E-85
AAEL006373-PA	serine protease htra2	pm/protease	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL002593-PB	extracellular region - proteolysis - serine-type endopeptidase	pm/protease	GO	0
AAEL001833-PA	Juvenile hormone-inducible protein	st	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL013807-PA	transferase transferring acyl groups other than amino-acyl groups	storage/	GO	2,00E-50
AAEL007458-PA	Amino acid transporters	tr	KOG	0
AAEL011148-PA	AAEL011148-PA	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	2,00E-43
AAEL008313-PA	AAEL008313-PA	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL017987-PC	AGAP000892-PA	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	1,00E-57

Legenda como na Tabela D1.

## ANEXO E: MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 3 DE RESULTADOS – ANOTAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CRATO

**Tabela E1. Anotação funcional dos genes de Crato DE em resposta a seleção com o OP malathion, em laboratório (aumentos de expressão)**

Seq name	pep name	class	database	e-value
AAEL005218-PB	sinuous - adult chitin-containing cuticle pigmentation - cell adhesion involved in heart morphogenesis - heart process - plasma membrane - dorsal	Cuticle	GO	1,00E-94
AAEL014305-PA	GPI transamidase complex - probable fragment	extmat	KOG	4,00E-37
AAEL004223-PA	Cecropin-B1	imm	SWISSP	2,00E-23
AAEL013493-PA	Prophenoloxidase 1 - sleep - defense response to Gram-positive bacterium - dopamine metabolic process - dopamine monooxygenase - L-DOPA	imm	GO	0
AAEL014544-PA	prophenoloxidase	imm	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL014837-PA	Prophenoloxidase 1 - sleep - defense response to Gram-positive bacterium - dopamine metabolic process - dopamine monooxygenase - L-DOPA	imm	GO	0
AAEL015113-PA	Prophenoloxidase 1 - sleep - defense response to Gram-positive bacterium - dopamine metabolic process - dopamine monooxygenase - L-DOPA	imm	GO	0
AAEL013501-PA	Prophenoloxidase 2 - melanotic encapsulation of foreign target - defense response to Gram-positive bacterium - defense response to fungus -	imm	GO	0
AAEL013499-PA	prophenoloxidase	imm	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL011764-PA	Prophenoloxidase 1 - sleep - defense response to Gram-positive bacterium - dopamine metabolic process - dopamine monooxygenase - L-DOPA	imm	GO	0
AAEL010919-PA	Prophenoloxidase 1 - sleep - defense response to Gram-positive bacterium - dopamine metabolic process - dopamine monooxygenase - L-DOPA - probable fragment	imm	GO	0
AAEL014858-PA	Hismacro and SEC14 domain-containing	nr	KOG	4,00E-27
AAEL017974-PA	heat shock protein 70 B2	pm	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL013349-PA	Alpha crystallins - probable fragment	pm	KOG	1,00E-38

AAEL001968-PA	Catecholamines up - perinuclear endoplasmic reticulum - intracellular - neuronal cell body - synaptic vesicle - axon - synapse	pm	GO	0
AAEL013339-PA	Alpha crystallins	pm	KOG	1,00E-28
AAEL017977-PA	heat shock protein 70 B2	pm	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL017981-PA	heat shock protein 70 B2	pm	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL013351-PA	Alpha crystallins	pm	KOG	1,00E-36
AAEL013344-PA	Alpha crystallins	pm	KOG	3,00E-40
AAEL013346-PA	Alpha crystallins	pm	KOG	2,00E-40
AAEL013348-PA	Alpha crystallins	pm	KOG	2,00E-37
AAEL005682-PA	odorant-binding protein A10 - probable fragment OBP	s/OBP	SWISSP	6,00E-26
AAEL003286-PA	membrane-bound alkaline phosphatase - probable fragment	st	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL007375-PA	Dehydrogenase kinase	st	KOG	0
AAEL008339-PA	TBX1 - probable fragment	tf	KOG	2,00E-81
AAEL002154-PA	transcription initiation factor IIA gamma chain	tm	REFSEQ-INVERTEBRATE	4,00E-51
AAEL015014-PB	AAEL015014-PB	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL017522-PA	AAEL017522-PA	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	1,00E-38
AAEL007612-PA	AAEL007612-PA	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	3,00E-62
AAEL017094-PA	AAEL017094-PA partial	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	5,00E-37

Tentativa de anotação funcional dos transcritos, baseada nos maiores escores de similaridade e nos menores valores de *E-value* obtidos através de buscas em nove diferentes bancos de dados de sequências proteicas. Seq name: nome do gene codificante. Pep name: nome do peptídeo mais similar. Class: categoria biológica a qual o peptídeo pertence. Database: banco de dados onde o peptídeo mais similar foi depositado.

**Tabela E2. Anotação funcional dos genes de Crato DE em resposta a seleção com o OP malathion, em laboratório (declínios de expressão)**

<b>Seq name</b>	<b>pep name</b>	<b>class</b>	<b>database</b>	<b>e-value</b>
AAEL017061-PA	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies	detox	KOG	5,00E-59
AAEL011830-PB	Class II aldolase/adducin N-terminal domain protein - probable fragment	met/carb	KOG	1,00E-57
AAEL008878-PD	diacylglycerol acyltransferase (DGAT)	met/lipd	KOG	3,00E-95
AAEL008769-PA	serine protease SP24D	pm/ protease	REFSEQ- INVERTEBRATE	4,00E-80
AAEL011587-PB	60S ribosomal protein L27 - cytosolic large ribosomal subunit - structural constituent of ribosome - probable fragment	ps	GO	4,00E-31
AAEL014406-PA	AGAP003566-PA - regulation of transcription from RNA polymerase II promoter - nucleus - transcription cofactor	tm	GO	3,00E-56
AAEL007166-PA	AAEL007166-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-89
AAEL005782-PA	AAEL005782-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL007935-PC	AAEL007935-PC partial	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL000942-PB	AAEL000942-PB	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-95
AAEL008357-PA	LAR-interacting protein	uc	KOG	0

Legenda como na Tabela E1.

**Tabela E3. Anotação funcional dos genes de Crato DE em resposta a adaptação à criação em laboratório (aumentos de expressão)**

Seq name	pep name	class	database	e-value
AAEL014792-PA	phosphatase and actin regulator 4-B isoform X3 - probable fragment	cs	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL018349-PA	Cecropin-A2	imm	SWISSP	5,00E-23
AAEL006485-PC	AGAP001183-PA - purine nucleosidase - purine nucleoside catabolic process - cytosol	met/carb	GO	1,00E-97
AAEL015063-PA	Fatty acyl-CoA elongase/Polyunsaturated fatty acid specific elongation enzyme	met/lipd	KOG	3,00E-56
AAEL008624-PB	AGAP009471-PA - sterol-transporting ATPase - cholesterol transporter - integral component of membrane - plasma membrane	met/lipd	GO	0
AAEL015389-PA	Nucleosomal histone kinase 1	nr	SWISSP	0
AAEL000475-PB	nuclear protein NAP - probable fragment	nr	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL005655-PA	AGAP009255-PA - phosphatidylinositol binding - early endosome to Golgi transport - extrinsic component of membrane - vesicle organization - endosome	pe	GO	0
AAEL012971-PA	Integumentary mucin A.1	s/	SWISSP	2,00E-23
AAEL004307-PC	AGAP008821-PA - signal transduction - cytoplasm	st	GO	0
AAEL012299-PA	nucleus - phosphoprotein phosphatase - dephosphorylation - cytoplasm - cation binding - protein dephosphorylation - probable fragment	st	GO	1,00E-79
AAEL003297-PA	membrane-bound alkaline phosphatase	st	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL008736-PB	RNA polymerase II transcriptional coactivator	tm	SWISSP	3,00E-21
AAEL015575-PA	AGAP004657-PA - protein channel - integral component of mitochondrial inner membrane - protein import into mitochondrial matrix - mitochondrial	tr	GO	2,00E-80
AAEL009441-PA	AAEL009441-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL012372-PB	AAEL012372-PB	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL009253-PA	AAEL009253-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL008778-PA	AAEL008778-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL008922-PA	AAEL008922-PB	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0

Legenda como na Tabela E1.

**Tabela E4. Anotação funcional dos genes de Crato DE em resposta a seleção com o OP malathion e a adaptação à criação em laboratório (Efeitos duplos: declínios de expressão, sendo mais marcado nas amostras controle)**

Seq name	pep name	class	database	e-value
AAEL006824-PA	Cytochrome P450-4g1 - lipid metabolic process - oxidoreductase	detox/ox	GO	0
AAEL015116-PA	Prophenoloxidase 1 - sleep - defense response to Gram-positive bacterium - dopamine metabolic process - dopamine monooxygenase - L-DOPA	imm	GO	0
AAEL009875-PA	Alanine aminotransferase	met/aa	KOG	0
AAEL012027-PA	Lipid storage droplets surface-binding protein 2 - probable fragment	met/lipd	SWISSP	1,00E-37
AAEL003622-PB	Fatty acid desaturase	met/lipd	KOG	5,00E-63
AAEL006966-PE	lipase - lipid catabolic process - carboxylic ester hydrolase - cellular_component	met/lipd	GO	2,00E-40
AAEL010740-PA	Protein Wnt - cell fate commitment - neuron differentiation - Wnt signaling pathway - extracellular space - frizzled binding	pe	GO	0
AAEL006373-PA	serine protease htra2	pm/protease	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL001947-PA	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 2 - probable fragment	pm/protease	SWISSP	2,00E-23
AAEL015412-PA	zinc metalloproteinase nas-4 - probable fragment	pm/protease	REFSEQ-INVERTEBRATE	4,00E-49
AAEL000115-PB	AGAP001656-PA - UTP-C complex - CURI complex - rRNA processing - ribosomal small subunit assembly	ps	GO	8,00E-65
AAEL004547-PA	insulin-like growth factor 2b - extracellular region - hormone - somitogenesis - forebrain development - growth factor - extracellular space	st	GO	0,00000003
AAEL009773-PB	geminin - negative regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway - regulation of syncytial blastoderm mitotic cell cycle -	st	GO	4,00E-26
AAEL005312-PF	Misexpression suppressor of KSR 4 - cellular_component - molecular_function - positive regulation of Ras protein signal transduction - probable fragment	st	GO	8,00E-32
AAEL013983-PA	Hexamerin-1.1	storage/	SWISSP	0
AAEL013990-PA	Hexamerin-1.1	storage/	SWISSP	0
AAEL015099-PH	Zn-finger transcription factor	tf	KOG	5,00E-89

AAEL014014-PA	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter - transcription corepressor - cytoplasm	tm	GO	3,00E-38
AAEL018019-PA	RNA export factor NXT1	tm	KOG	8,00E-23
AAEL012900-PA	Transcription factor B5 - nucleus - nucleotide-excision repair - transcriptional open complex formation at RNA polymerase II promoter - transcription	tm	GO	2,00E-20
AAEL015645-PA	multiple RNA-binding domain-containing protein 1	tm	REFSEQ-INVERTEBRATE	2,00E-97
AAEL013146-PA	AGAP006609-PA - organic cation transmembrane transporter - integral component of plasma membrane - probable fragment	tr	GO	0
AAEL013411-PA	AAEL013411-PA	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL017144-PA	AAEL017144-PA	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	2,00E-61
AAEL012970-PA	AAEL012970-PA	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	2,00E-83
AAEL003667-PA	AAEL003667-PB	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL002920-PA	AAEL002920-PA	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	2,00E-47
AAEL009177-PB	AAEL009177-PB	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL017253-PF	AAEL017253-PG	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL006600-PD	AAEL006600-PD	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL007714-PA	AAEL007714-PA	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL008457-PA	AAEL008457-PA	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL009717-PA	AAEL009717-PA	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	0
AAEL014196-PA	AAEL014196-PA	uc	REFSEQ-INVERTEBRATE	7,00E-61
AAEL017253-PH	Uncharacterized conserved protein	uc	KOG	0,000000002
AAEL006935-PA	Unknown product	uk		

Legenda como na Tabela E1.



**Tabela E5. Anotação funcional dos genes de Crato DE em resposta a adaptação à criação em laboratório, com reversão do padrão de expressão pela seleção com o malathion**

Seq name	pep name	class	database	e-value
AAEL000461-PA	integral component of membrane - cytoplasmic microtubule	cs	GO	4,00E-24
AAEL014604-PA	Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies	detox	KOG	3,00E-69
AAEL000496-PA	Peroxidase/oxygenase	detox/ox	KOG	3,00E-32
AAEL003857-PA	Defensin-A	imm	SWISSP	1,00E-50
AAEL000304-PB	Predicted protein - nuclear pore cytoplasmic filaments - telomere tethering at nuclear periphery - structural constituent of nuclear pore - nuclear	ne	GO	0,0000008
AAEL002774-PA	Golgi microtubule-associated protein - Golgi membrane - Rab GTPase binding - Golgi cis cisterna - vesicle-mediated transport - Golgi organization - - probable fragment	pe	GO	1,00E-99
AAEL009458-PB	AGAP001030-PA - vesicle docking - SNARE complex - integral component of membrane - endomembrane system - vesicle fusion - intracellular protein	pe	GO	0
AAEL003215-PA	Heat shock factor binding protein	pm	KOG	5,00E-22
AAEL012798-PA	Trypsin - probable fragment	pm/ protease	KOG	1,00E-32
AAEL013583-PA	AGAP010252-PA - large ribosomal subunit rRNA binding - cytosolic large ribosomal subunit - structural constituent of ribosome	ps	GO	1,00E-75
AAEL006600-PA	Juvenile hormone-inducible protein	st	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL009743-PA	Transcription factor zerknüllt - probable fragment	tf	KOG	3,00E-19
AAEL015099-PB	Zn-finger transcription factor	tf	KOG	3,00E-90
AAEL000005-PB	C2H2-type Zn-finger protein - probable fragment	tm	KOG	3,00E-26
AAEL001125-PA	RNA export factor NXT1 - probable fragment	tm	KOG	8,00E-18
AAEL002863-PA	metal ion binding - regulation of transcription - probable fragment	tm	GO	1,00E-56
AAEL008114-PA	RNA export factor NXT1	tm	KOG	2,00E-28
AAEL014964-PA	Predicted RNA-binding protein - probable fragment	tm	KOG	5,00E-51
AAEL000983-PC	Adaptor Protein complex 1	tr	GO	8,00E-75
AAEL011689-PB	Acyl carrier protein/NADH-ubiquinone oxidoreductase NDUFAB1/SDAP subunit	tr	KOG	1,00E-33
AAEL014500-PA	Amino acid transporters - probable fragment	tr	KOG	0
AAEL000473-PA	AAEL000473-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL005087-PA	AAEL005087-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	0
AAEL006896-PA	AAEL006896-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-95
AAEL008552-PA	AAEL008554-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	7,00E-47

AAEL012574-PA	AAEL012574-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	7,00E-52
AAEL013437-PA	AAEL013437-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	6,00E-62
AAEL015153-PA	AAEL013443-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	1,00E-65
AAEL018003-PA	AAEL008130-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	3,00E-25
AAEL000096-PA	AAEL000096-PA	uc	REFSEQ- INVERTEBRATE	2,00E-74
AAEL015547-PA	Unknown product	uk		

Legenda como na Tabela E1.

## REFERÊNCIAS

- Alvarez LC, Ponce G, Oviedo M, Lopez B, Flores AE (2013). Resistance to malathion and deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from western Venezuela. *J Med Entomol*, 50(5):1031-9.
- An C, Zhang M, Chu Y, Zhao Z (2013). Serine Protease MP2 Activates Prophenoloxidase in the Melanization Immune Response of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 8(11): e79533.
- Antonio GE, Sanches D, Willians T, Marina CF (2009). Paradoxical effects of sublethal exposure to the naturally derived insecticide spinosad in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Pest Management Science*, 65: 323-6.
- Arakane Y, Noh MY, Asano T, Kramer KJ (2016). Tyrosine Metabolism for Insect Cuticle Pigmentation and Sclerotization. In: Cohen E., Moussian B. (eds) *Extracellular Composite Matrices in Arthropods*. Springer, Cham.
- Araújo AP, Araujo Diniz DF, Helvecio E, de Barros RA, de Oliveira CM, Ayres CF, et al. (2013). The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. *Parasites & Vectors*, 6: 297.
- Balabanidou V, Kampouraki A, MacLean M, Blomquist GJ, Tittiger C, Juárez MP, et al. (2016). Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *PNAS*, 113 (33): 9268-73.
- Bariami V, Jones CM, Poupardin R, Vontas J, Ranson H (2012). Gene Amplification, ABC Transporters and Cytochrome P450s: Unraveling the Molecular Basis of Pyrethroid Resistance in the Dengue Vector, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(6): e1692.
- Bass C & Jones CM (2016). Mosquitoes boost body armour to resist insecticide attack. *PNAS*, 113(33): 9145-7.
- Beatty BJ & Maquardt WC (1996). *The biology of disease vectors*. Colorado: University Press of Colorado. xv + 632p.
- Belinato TA & Martins AJ (2016). Insecticide Resistance and Fitness Cost, *Insecticides Resistance*, Prof. Stanislav Trdan (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61826. Available from: <https://www.intechopen.com/books/insecticides-resistance/insecticide-resistance-and-fitness-cost>
- Belinato TA & Valle D (2015). The impact of selection with diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor, on the fitness of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations. *PLoS ONE*, 10: e0130719.
- Belinato TA, Martins AJ, Lima JBP, Lima-Camara TN, Peixoto AA, Valle D (2009). Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 43-7.
- Belinato TA, Martins AJ, Valle D (2012). Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107: 916-22.
- Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Araújo SC, Martins AJ, Lima JBP, Valle D 2016. Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations. *BioMed Research International*, Article ID 8603263, 12 pages.
- Berticat C, Boquien G, Raymond M, Chevillon C (2002). Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetics Research*, 79: 41-7.
- Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, Soca A (1998). Resistance in a Strain of *Culex quinquefasciatus* Coming From Medellín, Colombia. *Rev Cubana Med Trop*, 50 (2):133-7.
- Bisset JA, Marín R, Rodríguez MM, Severson DW, Ricardo Y, French L, et al. (2013). Insecticide resistance in two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains from Costa Rica. *J Med Entomol*, 50: 352-61.
- Bisset JA, Rodríguez MM, French L, Severson DW, Gutiérrez G, Hurtado D, et al. (2014). Insecticide Resistance and Metabolic Mechanisms Involved in Larval and Adult Stages of

- Aedes aegypti* Insecticide-Resistant Reference Strains from Cuba. *J Am Mosq Control Assoc*, 30(4): 298-304.
- Bisset JA, Rodríguez MM, Nuñez DH, Alvarez HH, Miró VV, López IF (2016). Insecticide resistance and its biochemical mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the municipality of Boyeros in the years 2010 and 2012. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 68(1): 82-94.
- Bloomquist JR (2009). Insecticides: Chemistries and Characteristics. Em "University of Minnesota's electronic textbook of Integrated Pest Management". Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>
- Borodina T, Adjaye J, Sultan M (2011). A strand-specific library preparation protocol for RNA sequencing. *Methods Enzymol*, 500: 79-98.
- Boyer S, David JP, Rey D, Lemperiere G, Ravanel P (2007). Response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae to three xenobiotic exposures: larval tolerance and detoxifying enzyme activities. *Environ Toxicol Chem*, 25(2): 470-6.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 7(72): 248-54.
- Braga IA & Valle D (2007a). *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde*, 16(2): 113-8.
- Braga IA & Valle D (2007b). *Aedes aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. *Epidemiol Serv Saúde*, 16(4): 295-302.
- Braga IA, Gomes AC, Nelson M, Mello RCG, Bergamaschi DP, Souza JMP (2000). Comparative study between larval surveys and ovitraps to monitor populations of *Aedes aegypti*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 33: 347-53.
- Braga IA, Lima JB, Soares S da S, Valle D (2004). *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99 (2): 199-203.
- Braga IA, Mello CB, Reis I, Lima JBP, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, et al. (2005). Effectiveness of methoprene, an insect growth regulator, against temephos-resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. *J Med Entomol*, 42(5): 830-7.
- Brito LP, Linss JGB, Lima-Camara TN, Belinato TA, Peixoto AA, Lima JBP, et al. (2013). Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLoS ONE*, 8: e60878.
- Brogdon WG, Beach RF, Stewart JM, Castanaza L (1988). Microplate assay analysis of the distribution of organophosphate and carbamate resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Bull World Health Organ*, 66(3): 339-46.
- Brogdon WG & McAllister JC (1998). Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J Am Mosq Control Assoc*, 14: 159-164.
- Brooke BD & Koekemoer LL (2010). Major effect genes or loose confederations? The development of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Parasites and Vectors*, 3: 74.
- Buss DS & Callaghan A (2008). Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: a survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90: 141-53.
- Campbell PM, Newcomb RD, Russell RJ, Oakeshott JG (1998). Two different amino acid substitutions in the acetylcholinesterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol*, 28: 139-50. *apud* Li et al. 2007.
- Cardoso JdaC, de Almeida MA, dos Santos E, da Fonseca DF, Sallum MA, Noll CA, et al. (2010). Yellow fever virus in *Haemagogus leucocelaenus* and *Aedes serratus* mosquitoes, southern Brazil, 2008. *Emerg Infect Dis*, 16(12): 1918-24.

- Carriere Y, Deland J-P, Roff DA, Vincent C (1994). Life-History Costs Associated with the Evolution of Insecticide Resistance. *Proc R Soc Lond*, 258: 35-40.
- Cassanelli S, Reyes M, Rault M, Carlo Manicardi G, Sauphanor B (2006). Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochem Mol Biol*, 36(8): 642-53.
- CDC (1998). Insecticide Resistance Workshop: microplate assays. Centers for Disease Control, Atlanta, GAS.
- Chareonviriyaphap T, Roberts DR, Andre RG, Harlan HJ, Manguin S, Bangs MJ (1997). Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*, a malaria vector in the Americas. *J Am Mosq Control Assoc*, 13(2): 171-83.
- Choo YM, Lee KS, Yoon HJ, Kim BY, Sohn MR, et al. (2010). Dual Function of a Bee Venom Serine Protease: Prophenoloxidase-Activating Factor in Arthropods and Fibrin(ogen)olytic Enzyme in Mammals. *PLoS ONE*, 5(5): e10393.
- COES – Febre Amarela (2017). Monitoramento dos casos e óbitos de febre amarela no Brasil. Informe - nº 16/2017. Centro de operações de emergências em saúde pública sobre febre amarela. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/16/COES-FEBRE-AMARELA---INFORME-32---Atualiza----o-em-16mar2017---s-13horas.pdf>. Acessado em 20 de fevereiro de 2017.
- Cornet S1, Gandon S, Rivero A (2013). Patterns of phenoloxidase activity in insecticide resistant and susceptible mosquitoes differ between laboratory-selected and wild-caught individuals. *Parasit Vectors*, 6(1): 315.
- Costa MM (2017). Avaliação da resistência a inseticidas e mecanismos selecionados em populações de *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae) da fronteira entre Brasil e Guiana Francesa. Dissertação de mestrado. Pós-graduação em Biologia Parasitária. Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, 80 pp.
- Coto MM, Lazcano JA, de Fernández DM, Soca A (2000). Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after its use in *Aedes aegypti* control programs. *J Am Mosq Control Assoc*, 16(4): 324-30.
- Couto-Lima D1, Madec Y, Bersot MI, Campos SS, Motta MA, Santos FBD, et al. (2017). Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci Rep*, 7(1): 4848.
- da-Cunha MP, Lima JB, Brogdon WG, Moya GE, Valle D (2005). Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100: 441-4.
- David JP, Faucon F, Chandor-Proust A, Poupardin R, Riaz MA, Bonin A, et al. (2014). Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. *BMC Genomics*, 15: 174.
- Dermauw W & Van Leeuwen T (2014). The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem Mol Biol*, 45: 89-110.
- Diniz DF, Melo-Santos MA, Santos EM, Beserra EB, Helvecio E, de Carvalho-Leandro D, et al. (2015). Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasites and Vectors*, 8: 662.
- Donnelly MJ, Corbel V, Weetman D, Wilding CS, Williamson MS, Black WC 4<sup>th</sup> (2009). Does kdr genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes? *Trends Parasitol*, 25(5): 213-9.
- Dusfour I, Thalmensy V, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Girod R (2011). Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(3): 346-52.

- Dusfour I, Zorrilla P, Guidez A, Issaly J, Girod R, Guillaumot L, et al. (2015). Deltamethrin Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* Populations from Three French Overseas Territories Worldwide. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(11): e0004226.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7: 88-95.
- Epis S, Porretta D, Mastrantonio V, Comandatore F, Sassera D, Rossi P, et al. (2014). ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Parasit Vectors*, 29(7): 349.
- Erasmus JH, Auguste AJ, Kaelber JT, Luo H, Rossi SL, Fenton K, et al. (2016). A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. *Nat Med*, 23(2): 192-9.
- Esu E, Lenhart A, Smith L, Horstick O (2010). Effectiveness of peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission; systematic review. *Trop Med Int Health*, 15(5): 619-31.
- Falcón T, Ferreira-Caliman MJ, Franco Nunes FM, Tanaka ED, do Nascimento FS, Gentile Bitondi MM (2014). Exoskeleton formation in *Apis mellifera*: cuticular hydrocarbons profiles and expression of desaturase and elongase genes during pupal and adult development. *Insect Biochem Mol Biol*, 50: 68-81.
- Farnesi LC, Martins AJ, Valle D, Rezende GL (2009). Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 124-6.
- Farnesi LC, Brito JM, Linss JG, Pelajo-Machado M, Valle D, et al. (2012). Physiological and Morphological Aspects of *Aedes aegypti* Developing Larvae: Effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron. *PLoS ONE*, 7(1): e30363.
- Faucon F, Dusfour I, Gaude T, Navratil V, Boyer F, Chandre F, et al. (2015). Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. *Genome Research*, 25: 1347-59.
- Faucon F, Gaude T, Dusfour I, Navratil V, Corbel V, Juntarajumnong W, et al. (2017). In the hunt for genomic markers of metabolic resistance to pyrethroids in the mosquito *Aedes aegypti*: an integrated next-generation sequencing approach. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(4): e0005526.
- Ferrari JA (1996). Insecticide resistance, pp. 512-529. In B. J. Beaty and W.C. Marquardt [eds.], *The biology of disease vectors*. University Press of Colorado, Niwot, CO.
- Ferreira-de-Brito A, Ribeiro IP, Miranda RM, Fernandes RS, Campos SS, Silva KA, et al. (2016). First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 111(10): 655-8.
- Feyereisen R (1999). Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol*, 44: 507-33. Review.
- French-Constant RH & Bonning BC (1989). Rapid microtitre plate test distinguishes insecticide resistant acetylcholinesterase genotypes in the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *An. nigerrimus* and *Culex pipiens*. *Med Vet Entomol*, 3(1): 9-16.
- Filipecki AT, Machado CJ, Valle S, Teixeira MO (2011). The Brazilian legal framework on the scientific use of animals. *ILAR Journal*, 52: E8-15.
- Finck J, Berdan EL, Mayer F, Ronacher B, Geiselhardt S (2016). Divergence of cuticular hydrocarbons in two sympatric grasshopper species and the evolution of fatty acid synthases and elongases across insects. *Sci Rep*, 28(6): 33695.
- Fiocruz (2011). Recomendação técnica sobre a interrupção do uso de inseticidas piretroides no controle do *Aedes aegypti* no Brasil. Nota Técnica 2/2011/IOC-Fiocruz/Diretoria, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/NotaTecnica%20%20IOC%20v1%20dengue%206%20set%202011.pdf>.
- Fonseca-González I, Quiñones ML, Lenhart A, Brogdon WG (2011). Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Manag Sci*, 67(4): 430-7.

- Frova C (2006). Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol Eng*, 23(4): 149-69.
- Gahan LJ, Pauchet Y, Vogel H, Heckel DG (2010). An ABC Transporter Mutation Is Correlated with Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin. *PLoS Genet*, 6(12): e1001248.
- Garcia GP, Flores AE, Fernandez-Salas I, Saavedra-Rodriguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, et al. (2009). Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*, 3: 531.
- Georghiou GP (1994). Principles of insecticide resistance management. *Phytoprotection*, 75(4): 51-9.
- Ginzel MD & Blomquist GJ (2016). Insect Hydrocarbons: Biochemistry and Chemical Ecology, pp. 221-52. In E Cohen, B Moussian (Eds.), *Extracellular Composite Matrices in Arthropods*. Springer International Publishing Switzerland.
- Goindin D, Delannay C, Gelasse A, Ramdini C, Gaude T, Faucon F, et al. (2017). Levels of insecticide resistance to deltamethrin, malathion, and temephos, and associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). *Infectious Diseases of Poverty*, 6: 38.
- González T, Bisset JA, Díaz C, Rodríguez MM, Diéguez L (1996). The Evolution of Resistance in a *Culex quinquefasciatus* Strain Starting From Selection With the Pyrethroid Insecticide Lambdacyhalothrin. *Rev Cubana Med Trop*, 48(3): 218-23.
- Grigoraki L, Balabanidou V, Meristoudis C, Miridakis A, Ranson H, Swevers L, et al. (2016). Functional and immunohistochemical characterization of CCEae3a, a carboxylesterase associated with temephos resistance in the major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Insect Biochem Mol Biol*, 74: 61-7.
- Gubler DJ (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol*, 10(2): 100-3.
- Harris AF, Rajatileka S e Ranson H (2010). Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg*, 83(2): 277-84
- Hartberg WK & Craig GB Jr (1970). Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitoes. II. Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. *Evol*, 24: 692-703.
- Hawk CT & Leary SL (1999). *Formulary for laboratory animals*. University Press, Iowa.
- Hawkes NJ & Hemingway J (2002). Analysis of the promoters for the beta-esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem Biophys Acta*, 1574(1): 51-62.
- Heidari R, Devonshire AL, Campbell BE, Bell KL, Dorrian SJ, Oakeshott JG, et al. (2004). Hydrolysis of organophosphorus insecticides by in vitro modified carboxylesterase E3 from *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol*, 34(4): 353-63.
- Hemingway J (1998). Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). World Health Organization, Geneva (WHO/CDC/CPC/MAL/98.6).
- Hemingway J (2000). The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol*, 30(11): 1009-15. Review.
- Hemingway J & Karunaratne SH (1998). Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol*, 12(1): 1-12. Review.
- Hemingway J & Ranson H (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45: 371-91. Review.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*, 34: 653-65.
- Hemingway J, Smith C, Jayawardena KGI, Herath PRJ (1986). Field and laboratory detection of the altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res*, 76: 559-65.

- Hidayati H, Nazni WA, Lee HL, Sofian-Azirun M (2011). Insecticide resistance development in *Aedes aegypti* upon selection pressure with malathion. *Trop Biomed*, 28(2): 425-37.
- Hidayati H, Sofian MA, Nazni WA, Lee HL (2005). Insecticide resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Say), *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) larvae against malathion, permethrin and temephos. *Tropical Biomedicine*, 22(1): 45-52.
- Højland DH, Jensen K-MV, Kristensen M (2014). Adaptation of *Musca domestica* L. Field Population to Laboratory Breeding Causes Transcriptional Alteration's. *PLoS ONE*, 9(1): e85965.
- Horowitz AR & Ishaaya I (2016). In Horowitz AR e Ishaaya I (eds.), pp. 1-8. *Advances in Insect Control and Resistance Management*. Springer International Publishing Switzerland.
- Huchard E, Martinez M, Alout H, Douzery EJ, Lutfalla G, Berthomieu A, et al. (2006). Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273: 2595-604.
- Ishak IH, Kamgang B, Ibrahim SS, Riveron JM, Irving H, Wondji CS (2017). Pyrethroid Resistance in Malaysian Populations of Dengue Vector *Aedes aegypti* Is Mediated by CYP9 Family of Cytochrome P450 Genes. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(1): e0005302.
- Jaramillo-O N., Fonseca-González I., Chaverra-Rodríguez, D. (2014). Geometric morphometrics of nine field isolates of *Aedes aegypti* with different resistance levels to lambda-cyhalothrin and relative fitness of one artificially selected for resistance. *PLoS ONE*, 9: e96379.
- Jiang H, Liu S, Zhao P, Pope C (2009). Recombinant expression and biochemical characterization of the catalytic domain of acetylcholinesterase-1 from the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol*, 39(9): 646-53.
- Juàrez MP & Calderón Fernández GM (2007). Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comp Biochem Physiol A*, 147: 711-30.
- Juàrez MP, Pedrini N, Girotti JR, e Mijailovsky SJ (2010). Pyrethroid Resistance in Chagas Disease Vectors: The case of *Triatoma infestans* cuticle. *Resistance Pest Manag News*, 19: 59-61. Review.
- Karunaratne SH & Hemingway J (2001). Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bull World Health Organ*, 79(11): 1060-4.
- Kasai S, Komagata O, Itokawa K, Shono T, Ng LC, et al. (2014). Mechanisms of Pyrethroid Resistance in the Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*: Target Site Insensitivity, Penetration, and Metabolism. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(6): e2948.
- Kasai S, Shono T, Komagata O, Tsuda Y, Kobayashi M, Motoki M (2007). Insecticide resistance in potential vector mosquitoes for West Nile virus in Japan. *J Med Entomol*, 44: 822-29.
- Keeling CI, Henderson H, Li M, Dullat HK, Ohnishi T, Bohlmann J (2013). CYP345E2, an antenna-specific cytochrome P450 from the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, catalyses the oxidation of pine host monoterpene volatiles. *Insect Biochem Mol Biol*, 43(12): 1142-51.
- Ketterman AJ, Jayawardena KG, Hemingway J (1992). Purification and characterization of a carboxylesterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem J*, 287(2): 355-60.
- Khetarpal N & Khanna I (2016). Dengue Fever. Causes, Complications, and Vaccine Strategies. *Journal of Immunology Research*, Article ID 6803098, 14 pages.
- Komalamisra N, Srisawat R, Phanbhuvong T, Oatwaree S (2011). Insecticide susceptibility of the dengue vector, *Aedes aegypti* (L.) in Metropolitan Bangkok. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 42(4): 814-23.
- Kumar S, Thomas A, Sahgal A, Verma A, Samuel T, et al. (2002). Effect of the synergist, piperonyl butoxide, on the development of deltamethrin resistance in yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera : Culicidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 50: 1-8.



- Kuno G (2010). Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *Journal of Medical Entomology*, 47: 957-71.
- Langmead B & Salzberg SL (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*, 9(4): 357-9.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol*, 52: 231-53. Review.
- Li CX, Kaufman PE, Xue RD, Zhao MH., Wang G, Yan T, *et al.* (2015). Relationship between insecticide resistance and *kdr* mutations in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southern China. *Parasites and Vectors*, 8: 325.
- Lima EP, Paiva MH, de Araújo AP, da Silva EV, da Silva UM, de Oliveira LN *et al.* (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites and Vectors*, 4: 5.
- Lima JB, da-Cunha MP, Da Silva RC, Galardo AK, Soares SS, Braga IA *et al.* (2003). Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68: 329-33.
- Linss JGB, Brito LP, Garcia GA, Araki AS, Bruno RV, Lima JB *et al.* (2014). Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys *kdr* mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasites and Vectors*, 7: 25.
- Locher KP (2009). Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Phil Trans R. Soc B*, 364: 239-45.
- Lockey KH (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol*, 89B(4): 595-645. Review.
- Londres F (2012). *Agrotóxicos do Brasil: um guia para ação em defesa da vida*. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria em Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa. 2ª edição; 200 p.
- Lourenço-de-Oliveira R (2004). Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. Em Coura JR. *Dinâmica das Doenças Parasitárias*. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Vol. 2, 2025 p.
- Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Bispo de Filippis AM, Failloux AB (2002). Oral susceptibility to yellow fever virus of *Aedes aegypti* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(3): 437-9.
- Macharia RW, Ombura FL, Aroko EO (2015). Insects' RNA Profiling Reveals Absence of "Hidden Break" in 28S Ribosomal RNA Molecule of Onion Thrips, *Thrips tabaci*. *Journal of Nucleic Acids*, Article ID 965294, 8 pages.
- Maciel-de-Freitas R, Avendanho FC, Santos R, Sylvestre G, Araújo SC, Lima JBP, *et al.* (2014). Undesirable consequences of insecticide resistance following *Aedes aegypti* control activities due to a dengue outbreak. *PLoS ONE*, 9: e92424.
- Macoris ML, Andrighetti MT, Otrera VC, Carvalho LR, Caldas Junior AL, Brogdon WG (2007). Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(8): 895-900.
- Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VCB (1999). Alteration in susceptibility response of *Aedes aegypti* to organophosphates in cities in the state of S. Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pùb*, 33: 521-2.
- Mallet J (1989). The evolution of insecticide resistance: Have the insects won? *Trends Ecol Evol*, 4(11): 336-40.
- Marcombe S, Mathieu RB, Pocquet N, Riaz M-A, Poupardin R, Sélisior S, *et al.* (2012). Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS ONE*, 7(2): e30989.
- Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, *et al.* (2009). Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics*, 10: 494.

- Martins AJ & Valle D (2012). The pyrethroid knockdown resistance. In M Larramendy, S Soloneski (eds.), Book 2, *Insecticides*, Intech, La Plata, p. 17-38.
- Martins AJ, Belinato AT, Lima JBP, Valle D (2008). Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Pest Management Science*, 64: 676-80.
- Martins AJ, Lima JB, Peixoto AA, Valle D (2009). Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Trop Med Int Health*, 14: 1351-5.
- Martins AJ, Ribeiro CD, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D, Lima JB (2012). Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS One*, 7: e31889.
- Melo-Santos MAV, Varjal-Melo JJ, Araújo AP, Gomes TCS, Paiva MH, Regis LN, et al. (2010). Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Trop*, 113: 180-9.
- Montella IR (2008). Estudos dos mecanismos bioquímicos da resistência a inseticidas em diferentes populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) do Brasil. PhD Thesis, Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, 92 pp.
- Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA, Valle D (2007). Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg*, 77(3): 467-77.
- Montella IR, Schama R, Valle D (2012). The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(4): 437-49.
- Moore GD, Devonshire AL, Denholm I (1988). A microtitre plate assay for characterizing insensitive acetylcholinesterase genotypes of insecticide-resistant insects. *Bull ent Res*, 78: 537-44.
- Mori A, Lobo NF, Bruyn B, Severson DW (2007). Molecular cloning and characterization of the complete acetylcholinesterase gene (Ace 1) from the mosquito *Aedes aegypti* with implications for comparative genome analyses. *Insect Biochem Mol Biol*, 39: 667-74.
- Mourya DT, Hemingway J, Leake CJ (1993). Changes in enzyme titres with age in four geographical strains of *Aedes aegypti* and their association with insecticide resistance. *Med Vet Entomol*, 7(1): 11-6.
- MS-SVS (2009a). Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Série A. Normas e Manuais Técnicos, 1ª edição, Brasília / DF.
- MS-SVS (2009b). Manejo da resistência de *Aedes aegypti* a inseticidas. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica nº 013/2009 CGPNCD/DIGES/SVS/MS.
- MS-SVS (2009c). Uso do larvicida Diflubenzuron (PM25%) para controle de *Aedes aegypti*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica nº 015/2009 CGPNCD/DIGES/SVS/MS.
- MS-SVS (2009d). Informa mudança de uso de inseticidas larvicidas e adulticidas na rotina do Programa Nacional de Controle da Dengue. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota técnica nº 146/2009 CGPNCD/DIGES/SVS/MS.
- MS-SVS (2010). Nota técnica N.º 109/ 2010 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS. O uso racional de inseticidas no controle do *Aedes aegypti* e sua utilização oportuna em áreas com transmissão de dengue. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.
- MS-SVS (2016). Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Plano de Contingência para Resposta às Emergências em Saúde Pública: Febre Amarela [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

- MS-SVS (2017). Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 4, 2017. Boletim Epidemiológico Volume 48, Nº 5 – 2017.
- Murphy EJ, Booth JC, Davrazou F, Port AM, Jones DN (2013). Interactions of *Anopheles gambiae* odorant-binding proteins with a human-derived repellent: implications for the mode of action of n,n-diethyl-3-methylbenzamide (DEET). *J Biol Chem*, 288(6): 4475-85.
- Muthusamy R e Shivakumar MS (2015). Susceptibility status of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos from three districts of Tamil Nadu, India. *J Vector Borne Dis*, 52(2): 159-65.
- Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, Harada S, et al. (2004). An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 313(3): 794-801.
- NIAID/NIH (2017). Zika Virus Vaccines. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/zika-vaccines>. Acessado em 19 de julho de 2017.
- OMS (1981). World Health Organization: *Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. Geneva, Switzerland (WHO/VBC/81.807).
- OMS (2005). World Health Organization: *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. Geneva, Switzerland (WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13). [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO\\_CDS\\_WHOPES\\_GCDPP\\_2005.13.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf). Accessed 17 May 2016.
- OMS (2006). World Health Organization: *Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets*. Geneva, Switzerland (WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/3).
- OMS (2012). World Health Organization: *WHOPES recommended insecticides for space spraying*. Geneva, Switzerland. [http://www.who.int/whopes/Insecticides\\_for\\_space\\_spraying\\_Jul\\_2012.pdf](http://www.who.int/whopes/Insecticides_for_space_spraying_Jul_2012.pdf). Accessed 7 Oct 2015.
- OMS (2016). World Health Organization: *Monitoring and managing insecticide resistance in Aedes mosquito populations: Interim guidance for entomologists*. Geneva, Switzerland (WHO/ZIKV/VC/16.1).
- Pedrini N, Mijailovsky SJ, Girotti JR, Stariolo R, Cardozo RM, et al. (2009). Control of Pyrethroid-Resistant Chagas Disease Vectors with Entomopathogenic Fungi. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(5): e434.
- Pessoa GC, Vinãs PA, Rosa AC, Diotaiuti L (2015). History of insecticide resistance of Triatominae vectors. *Rev Soc Bras Med Trop*, 48(4): 380-9.
- Pitts RJ, Rinker DC, Jones PL, Rokas A, Zwiebel LJ (2011). Transcriptome profiling of chemosensory appendages in the malaria vector *Anopheles gambiae* reveals tissue- and sex-specific signatures of odor coding. *BMC Genomics*, 12: 271.
- Plapp FW (1976). Biochemical genetics of insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol*, 21: 179-97.
- Polson KA, Brogdon WG, Rawlins SC, Chadee DD (2011). Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Trop*, 117(1): 31-8.
- Porretta D, Epis S, Mastrantonio V, Ferrari M, Bellini R, Favia G, et al. (2016). How heterogeneous is the involvement of ABC transporters against insecticides? *Acta Trop*, 157: 131-5.
- Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP (2008). Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem Mol Biol*, 38: 540-51.
- Poupardin R, Reynaud S, Strode C, Ranson H, Vontas J, David JP (2008). Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes*

- aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem Mol Biol*, 38(5): 540-51.
- Poupardin R, Srisukontarat W, Yunta C, Ranson H (2014). Identification of carboxylesterase genes implicated in temephos resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8: e2743.
- Qiu Y, Tittiger C, Wicker-Thomas C, Le Goff G, Young S, Wajnberg E, et al. (2012). An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 14858-63.
- Ranson H, Burhani J, Lumjuan N, Black WC (2010). Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net Journal*, 1(1).
- Raymond M (1985). Presentation d'une programme d'analyse logprobit pour microordinateur. *Cahiers Orstrom Sér Ent Med Parasitol*, 22: 117-21.
- Riaz MA, Chandor-Proust A, Dauphin-Villemant C, Poupardin R, Jones CM, Strode C, et al. (2013). Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Aquat Toxicol*, 126: 326-37.
- Rivero A, Vézilier J, Weill M, Read AF, Gandon S (2010). Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathogens*, 6: e1001000.
- Roberts A & Pachter L (2013). Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. *Nature methods*, 10: 71-3.
- Roberts DR & Alecrim WD (1991). Response of *Anopheles darlingi* to spraying with DDT in Amazonas, Brazil. *Bol Oficina Sanit Panam*, 110(6): 480-8.
- Rodríguez MM, Bisset JA, De Armas Y, Ramos F (2005). Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *J Am Mosq Control Assoc*, 21(4): 437-45.
- Rong LS, Ann AT, Ahmad NW, Lim LH, Azirun MS (2012). Insecticide susceptibility status of field-collected *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) at a dengue endemic site in Shah Alam, Selangor, Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health*, 43: 34-47.
- Saavedra-Rodriguez K, Beaty M, Lozano-Fuentes S, Denham S, Garcia-Rejon J, Reyes-Solis G, et al. (2015). Local Evolution of Pyrethroid Resistance Offsets Gene Flow Among *Aedes aegypti* Collections in Yucatan State, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 92(1): 201-9.
- Saavedra-Rodriguez K, Suarez AF, Salas IF, Strode C, Ranson H, et al. (2012). Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 21(1): 61-77.
- Sanofi Pasteur (2016). Comunicado de imprensa: a vacina contra dengue da Sanofi Pasteur é aprovada no Brasil. Disponível em: <http://www.sanofi.com.br/br/medias/524EE272-23C5-4319-B849-70B1D9ECBFD0.pdf>. Acessado em 25 de janeiro de 2016.
- Schwartz LM, Halloran ME, Durbin AP, Longini IM Jr (2015). The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. *Vaccine*, 33: 3293-8.
- Scott JA (1995). The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. *Fla Entomol*, 78(3): 399-414.
- Selvi S, Edah MA, Nazni WA, Lee H-L, Tyagi BK, Sofian-Azirun M, et al. (2010). Insecticide susceptibility and resistance development in malathion selected *Aedes albopictus* (Skuse). *Trop Biomed*, 27: 534-50.
- Serrano RM (2012). Susceptibility status of *Aedes aegypti* to insecticides in Colombia. In *Insecticides - Pest Engineering*, F. Perveen, Ed. InTech, pp. 241-70.
- Silva AX, Bacigalupe LD, Luna-Rudloff M, Figueroa CC (2012). Insecticide Resistance Mechanisms in the Green Peach Aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) II: Costs and Benefits. *PLoS ONE*, 7(6): e36810.
- Soreq H & Seidman S (2001). Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*, 2(4): 294-302. Review.

- Srinivas R, Udikeri SS, Jayalakshmi SK, Sreeramulu K (2004). Identification of factors responsible for insecticide resistance in *Helicoverpa armigera*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 137: 261-9.
- Stanley-Samuelson DW, Jurenka RA, Cripps C, Blomquist GJ, e de-Renobales M (1988). Fatty acids in insects: Composition, metabolism, and biological significance. *Arch Insect Biochem Physiol*, 9: 1-33.
- Steinbrecht RA (1998). Odorant-Binding Proteins: Expression and Function. *Ann NY Acad Sci*, 855: 323-32.
- Strode C, de Melo-Santos M, Magalhães T, Araújo A, Ayres C (2012). Expression Profile of Genes during Resistance Reversal in a Temephos Selected Strain of the Dengue Vector, *Aedes aegypti*. *PLoS ONE*, 7(8): e39439.
- Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, et al. (2008). Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*, 38(1): 113-23.
- Strycharz JP, Lao A, Li H, Qiu X, Lee SH, Sun W, et al. (2013). Resistance in the highly DDT-resistant 91-R strain of *Drosophila melanogaster* involves decreased penetration, increased metabolism, and direct excretion. *Pestic Biochem Physiol*, 107(2): 207-17.
- Townson H, Nathan MB, Zaim M, Guillet P, Manga L,; Bos R, et al. (2005). Exploiting the potential of vector control for disease prevention. *Bulletin of the World Health Organization: the International Journal of Public Health*, 83(12): 942-7.
- Valle D, Belinato TA, Martins AJ (2015). Controle químico de *Aedes aegypti*, resistência a inseticidas e alternativas. *Dengue: teorias e práticas* (ed. By D. Valle, D. N. Pimenta, R. V. Cunha), pp. 93-126. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Valle D, Montella IR, Ribeiro RA, Viana-Medeiros PF, Martins AJ, Lima JBP (2006). Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti* / Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Publicação em parceria entre Fundação Oswaldo Cruz e Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro e Distrito Federal, Brasil, 128p.
- Viana-Medeiros PF (2011). *Investigações sobre os mecanismos de resistência em larvas e adultos de Aedes aegypti, Linnaeus, 1762*. MSc Thesis, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brazil.
- Viana-Medeiros PF, Bellinato DF, Martins AJ, Valle D (2017). Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects in two Brazilian *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) populations. *Medical and Veterinary Entomology*, doi: 10.1111/mve.12241.
- Vogt RG (2005). Molecular basis of pheromone detection in insects. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology*. Volume 3. Endocrinology. (LI Gilbert, K Iatrou, S Gill eds). pp. 753-804. Elsevier, London.
- Vontas JG, Small GJ, Hemingway J (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J*, 357: 65-72.
- Vythilingam I, Sam JI-C, Chan YF, Khaw LT, Sulaiman WYW (2016). New Paradigms for Virus Detection, Surveillance and Control of Zika Virus Vectors in the Settings of Southeast Asia. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1452.
- Ware GW & Whitacre DM (2004). An introduction to insecticides [online]; Minnesota. disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>
- Weill M, Berthomieu A, Berticat C, Lutfalla G, Nègre V, Pasteur N, et al. (2004). Insecticide resistance: a silent base prediction. *Curr Biol*, 14(14): R552-3.
- Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M (2002). A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc Biol Sci*, 269(1504): 2007-16.

- Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, et al. (2003). Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*, 423(6936): 136-7.
- Wheelock CE, Shan G, Ottea J (2005). Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *J Pest Sci*, 30: 75-83.
- Whyard S, Downe AER, Walker VK (1995). Characterization of a novel esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 29: 329-42
- Wirth MC & Georghiou GP (1999). Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *J Am Mosq Control Assoc*, 15: 315-20.
- Wu S, Li M, Tang PA, Felton GW, Wang JJ (2010). Cloning and characterization of acetylcholinesterase 1 genes from insecticide-resistant field populations of *Liposcelis paeta* Pearman (Psocoptera: Liposcelididae). *Insect Biochem Mol Biol*, 40(5):415-24.
- Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Prapanthadara L (2011). A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96: 127-31.
- Younus F, Cheretemps T, Pearce SL, Pandey G, Bozzolan F, Coppin CW, et al. (2014). Identification of candidate odorant degrading gene/enzyme systems in the antennal transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol*, 53: 30-43.
- Zhao S, Fung-Leung W-P, Bittner A, Ngo K, Liu X (2014). Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells. *PLoS ONE*, 9(1): e78644.
- Zhou D, Sun Y, Hao S, Chena L, Xiong C, Ma L, et al. (2012). Cloning and characterization of prophenoloxidase A3 (proPOA3) from *Culex pipiens pallens*. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology*, 162(4): 57-65.
- Zhou JJ (2010). Odorant-binding proteins in insects. *Vitam Horm*, 83: 241-72.
- Zhu G, Zhong D, Cao J, Zhou H, Li J, Liu Y, et al. (2014). Transcriptome profiling of pyrethroid resistant and susceptible mosquitoes in the malaria vector, *Anopheles sinensis*. *BMC Genomics*, 15: 448.
- Zou FM, Lee KS, Kim BY, Kim HJ, Gui ZZ, Zhang GZ, et al. (2015). Differential and spatial regulation of the prophenoloxidase (proPO) and proPO- activating enzyme in cuticular melanization and innate immunity in *Bombyx mori* pupae. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18: 757-64.