

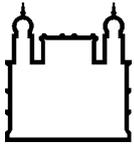
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Medicina Tropical

MONITORAMENTO E CONTROLE DE MOSQUITOS VETORES: UMA  
PROPOSTA PARA AVANÇAR NO CONHECIMENTO E NO  
CONTROLE DE *Aedes aegypti* E *Aedes albopictus*

PAULA FIGLIUOLO DA CRUZ BORGES

Rio de Janeiro  
Outubro de 2018



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*Paula Figliuolo da Cruz Borges*

Monitoramento e controle de mosquitos vetores: uma proposta para avançar no conhecimento e no controle de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

**Orientador (es):** Prof. Dr. José Bento Pereira Lima

**RIO DE JANEIRO**

Outubro de 2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Borges, Paula Figliuolo da Cruz.

Monitoramento e controle de mosquitos vetores: uma proposta para avançar no conhecimento e no controle de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* / Paula Figliuolo da Cruz Borges. - Rio de Janeiro, 2018.

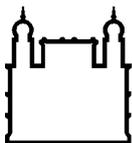
xxii, 177 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2018.

Orientador: José Bento Pereira Lima.

Bibliografia: f. 150-177

1. Vigilância de mosquitos. 2. Ovitampa. 3. Controle direcionado por ovitampa. 4. Resistência a inseticidas. 5. Marcador molecular microssatélite.  
I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***AUTOR: PAULA FIGLIUOLO DA CRUZ BORGES***

**Monitoramento e controle de mosquitos vetores: uma proposta para  
avançar no conhecimento e no controle de *Aedes aegypti* e *Aedes  
albopictus***

**ORIENTADOR: Prof. Dr. José Bento Pereira Lima**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Maria Goreti Rosa Freitas - *Presidente* – IOC/FIOCRUZ**

**Prof. Dr. Márcio Galvão Pavan – IOC/FIOCRUZ**

**Prof. Dr. Paulo Cesar Peiter – IOC/FIOCRUZ**

**Prof. Dr. Cícero Brasileiro de Mello Neto – UFF/RJ**

**Prof. Dr. Daniel Antunes Maciel Vilela – PROCC/FIOCRUZ**

Rio de Janeiro, 05 de outubro de 2018

Dedico esta Tese com todo meu amor e gratidão aos meus pais, Ricardo e Virgínia, ao meu esposo Gustavo e, ao nosso filhotinho, Flávio José.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu filhote, Flávio José ♥, que chegou em um momento perfeito! Mesmo tão pequenininho, me encheu de força e coragem para seguir em frente. Foi difícil conciliar o desenvolvimento desta tese com o início de uma nova fase: a de ser mãe... Mas foi possível e minha inspiração foi a história de muitas cientistas e mães que passaram pela mesma batalha, como muitos exemplos que temos nesta Instituição. Tudo foi por você, meu molequinho lindo, que me faz evoluir e tentar ser uma pessoa melhor!

À meu amor Gustavo, meu fofinho. ♥ Meu amigo, companheiro, porto seguro, que compartilha juntinho todos os momentos de minha vida. O meu grande amor e amigo, que sempre tem palavras de afeto e que são de uma riqueza enorme. Não há quem fique um minuto se quer sem rir ao seu lado pelo seu jeito descontraído de ser. Sou muito feliz em te ter ao meu lado e espero te fazer feliz por toda nossa vida. Obrigada por todo apoio, paciência e bela família que construímos.

Aos meus pais, Virgínia e Ricardo, exemplos de amor e dedicação, meu porto seguro. ♥ À eles todo meu amor e gratidão. Dedicaram seis meses fora da convivência com meus irmãos e sobrinhos para me apoiar na reta final desse trabalho. Eu sei que esse momento foi só uma prova de amor, dentre tantas por toda a vida. Minha meta de vida é ser uma mãe como a que tenho, uma mulher dedicada à família, amorosa e que faz de tudo pela nossa felicidade. Meu papai, além de um pai zeloso e carinhoso, é meu exemplo de pesquisador. Um homem dedicado, estudioso, que sempre incentivou os filhos a seguir seus sonhos. Pai e mãe, obrigada por tudo e por tanto, sempre...

Ao meu orientador, Dr. José Bento, pelo apoio e oportunidade de vir à esta Instituição para executar este trabalho. Sou muito grata pelo seu carinho e confiança pois, mesmo sem me conhecer de verdade, acreditou em mim. Obrigada, de coração, pela orientação, que não foi só para o estudo, mas para a vida também!

À Dra. Cynara Rodovalho, um exemplo de dedicação e apreço pelo trabalho, a quem criei uma linda amizade durante as “caronas e cafezinhos”, em que compartilhamos muitos momentos especiais. Obrigada Cy, você foi mais que uma parceira de trabalho, foi conselheira, co-orientadora e sempre será minha amiga e tia do Flavinho.

Aos meus co-orientadores, a quem tenho um carinho muito grande por cada um. Agradeço pela dedicação e ternura para comigo e meu trabalho: À Dra. Renata Schama, análises dos microssatélites; Ao Dr. Ademir Martins, análises resistência a

inseticidas e *kdr*; À Dra. Cláudia Codeço, confecção do *script* do R e nas análises estatísticas;

À Letícia Lima, minha parceira de bancada nos experimentos com microssatélites e a quem tenho carinho e amizade. Super obrigada por todo apoio, principalmente durante minha gestação;

Ao meus queridos amigos do Laficave, os quais tornaram-se minha família de coração: Ana Paula Corrêa, Diogo, Josiane, Raquel, Priscila, Quesia, Luciana, Taiza, Monique, Luiz, Luana, Rafi, Aline e Ana Paula Borges. Todos foram muito especiais durante esses anos (e serão eternamente!). Além do apoio em bancada e discussões científicas, tornaram-se amigos do coração; Agradeço o apoio também do Diego Montenegro, nas colaborações em estatística;

Às minhas queridas companheiras de insetário 2, Thaís Nunes, Bárbara Souza e Michelle Abdala, que se dedicaram com muito carinho e determinação durante os projetos e principalmente pelo apoio durante minha gestação. Com elas aprendi muito!!! Agradeço também ao apoio dado pela Renata Pinto e Elaine Rodrigues, no início do desenvolvimento do projeto;

À todos os agentes da CAP 1.0: Maciel, Falcão, Gatinho, Carlinhos, Silvio, Dorival, Jovenir e Rose que trabalharam lado-a-lado comigo durante os dois anos de atividades de campo. Foram muitas viagens de barca divertidas pela baía de Guanabara.

Ao Demétrio Borges, pela colaboração nas atividades de educação e monitoramento em Paquetá e na confecção dos mapas de kernel;

À todos colaboradores do SMS Arthur Villaboim da Ilha de Paquetá, em especial a Olgimar, Grazielle, Leandro e Diego, os quais foram parceiros e tiveram coração aberto para nossas ideias. Obrigada também aos ACSs de Paquetá, por todo apoio durante o estudo;

À Dra. Gorete Rosa-Freitas, pelas palavras de empoderamento, apoio carinhoso e revisão da tese;

*Foco, Força e Fé*

“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano. Sempre que alguém descobre esse poder, algo antes considerado impossível se torna realidade.”

*Albert Einstein*  
viii

## RESUMO

*Aedes aegypti* é o principal vetor de arbovírus ao homem, como o dengue, Zika e chikungunya. Como não existem tratamentos específicos e vacinas disponíveis, exceto para a dengue, o controle desses patógenos se dá mais comumente pelo combate ao vetor. Por este motivo, os inseticidas constituem-se a principal ferramenta de controle, cuja a aplicação indiscriminada tem levado à resistência dos vetores aos principais compostos utilizados no seu controle. Diante disso, novas estratégias de controle são sempre almejadas. O objetivo desta tese foi monitorar a densidade de *Aedes*, direcionar as ações de controle destes vetores e conhecer a distribuição espacial das populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* da Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, bem como capacitar os agentes de vigilância em saúde, conhecer o perfil de resistência/susceptibilidade a inseticidas, as frequências dos alelos de resistência *knockdown (kdr)* a piretroides e a estruturação genética entre populações de *Ae. aegypti* em áreas portuárias na baía de Guanabara, Rio de Janeiro, em duas estações do ano. O monitoramento foi realizado por meio de 90 ovitrampas de forma contínua e bimestral, durante dois anos, em dois extratos da Ilha. As ações de controle foram direcionadas em apenas um dos extratos, seguindo as orientações do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Foram realizadas palestras sobre a biologia dos vetores e a distribuição de mapas com a densidade de ovos de *Aedes* aos moradores da Ilha; foram realizados ensaios do tipo dose-resposta para conhecer o perfil de resistência aos inseticidas deltametrina, malathion e temephos; genotipagens por RT-PCR de SNPs foram realizadas para estimar a frequência das mutações *kdr* Val1016Ile e Phe1534Cys e genotipagem de 12 *loci* microssatélites para a genética das populações de *Ae. aegypti*. Durante 107 semanas epidemiológicas foram coletados mais de 760.000 ovos de *Aedes*, com média de 4.927 ovos por ovitrampa. Houve flutuação sazonal pelas estações do ano, com o índice de positividade de ovitrampas (IPO)  $\geq 50\%$ . No monitoramento bimestral, foram coletados mais de 213.000 ovos, média de 222 ovos por ovitrampa/semana e IPO  $\geq 50\%$ . *Ae. aegypti* (70%) predominou por toda Ilha, porém *Ae. albopictus* (30%) foi presente em todas ovitrampas e associado às armadilhas próximas de vegetação. A densidade de ovos teve associação positiva com precipitação e temperatura com duas semanas de defasagem. O direcionamento do controle de vetores não apresentou resultados significativos entre a associação das ações de controle e a densidade de ovos de *Aedes*. Todas as populações de *Ae. aegypti* avaliadas foram resistentes a deltametrina com  $RR_{50} > 10$  (razão de resistência) e temephos ( $RR_{50} \geq 5$ ) e susceptíveis ao malathion ( $RR_{50} < 5$ ). As frequências alélicas das mutações *kdr* foram elevadas, com frequências dos genótipos resistentes acima de 90%, no verão e inverno. Nas análises com microssatélites, o verão apresentou maior índice de variabilidade e estruturação genética. No conjunto, as ferramentas utilizadas neste estudo contribuíram para o entendimento da dinâmica sazonal de *Ae. aegypti* da Ilha de Paquetá, do *status* de susceptibilidade/resistência a inseticidas e que as barcas que transportam passageiros entre as estações da baía de Guanabara podem estar contribuindo com o fluxo gênico de *Ae. aegypti* entre as localidades avaliadas.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* is the main arbovirus vector to human, such as dengue, Zika and chikungunya. As there aren't specific treatments and vaccines available, except for dengue (vaccine in test), the control of these pathogens occurs only by combating the vector. For this reason, insecticides are the main tool for control, whose indiscriminate application has led to the resistance of the vectors to the main insecticides used in their control. Therefore, new control strategies are always desired. The objective of this thesis was to monitor the density of *Aedes*, to direct the control actions of these vectors and to know the spatial distribution of the populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* of the Paquetá Island, Rio de Janeiro, as well as to train the surveillance agents, to know the resistance / susceptibility profile to insecticides, the frequencies of *knockdown* (*kdr*) resistance alleles to pyrethroids and the genetic structure between populations of *Ae. aegypti* of port areas in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, in two seasons. The monitoring was performed by means of 90 ovitraps continuously and bimonthly for two years in two extracts of the Island. The control actions were directed in only one of the extracts, following the guidelines of the National Dengue Control Program (PNCD). Lectures were made on the biology of the vectors and the distribution of maps with the density of *Aedes* eggs to the inhabitants of the Island; dose-response assays were performed to determine the resistance profile of the insecticides deltamethrin, malathion and temephos; genotyping by RT-PCR of SNPs were performed to estimate the frequency of *kdr* Val1016Ile and Phe1534Cys mutations and genotyping of 12 microsatellite *loci* for the genetics of *Ae. aegypti*. During 107 epidemiological weeks more than 760,000 *Aedes* eggs were collected, with a mean of 4,927 eggs per ovitrap. There was a seasonal fluctuation into the seasons, with the ovitraps positivity index (IPO)  $\geq 50\%$ . In the bimonthly monitoring, more than 213,000 eggs were collected, mean of 222 eggs per ovitrap/ week and IPO  $\geq 50\%$ . *Ae. aegypti* (70%) predominated throughout the Island, but *Ae. albopictus* (30%) was present in all ovitraps and associated with traps near vegetation. The egg density was positively associated with precipitation and temperature with two weeks of lag. The control of vectors control didn't present significant results between the association of control actions and the density of *Aedes* eggs. All populations of *Ae. aegypti* were resistant to deltamethrin with resistance ratio 50 (RR50)  $> 10$  and temephos (RR50  $\geq 5$ ) and malathion susceptible (RR50  $< 5$ ). Allelic frequencies of *kdr* mutations were high, with frequencies of resistant genotypes above 90% in summer and winter. In the analyzes with microsatellites, the summer had a higher variability and genetic structured. On the whole, the tools used in this study contributed to the understanding of the seasonal dynamics of *Ae. aegypti* from the Paquetá Island, the susceptibility/ resistance status to insecticides and the boats that transport people between the stations of Guanabara Bay may be contributing to the *Ae. aegypti* gene flow among the evaluated sites.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Considerações sobre <i>Aedes</i> .....	1
1.1.1 <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	4
1.1.2 <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> (Skuse, 1894).....	8
<b>1.2 Principais arbovírus transmitidos por <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>.....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Dengue .....	11
1.2.2 Chikungunya .....	15
1.2.3 Zika .....	18
1.2.4 Febre Amarela .....	21
<b>1.3 Vigilância entomológica e controle vetorial.....</b>	<b>24</b>
1.3.1 Controle físico .....	27
1.3.2 Controle biológico .....	28
1.3.3 Controle químico.....	31
1.3.3.1 Organofosforados e piretroides e o uso no controle de <i>Ae. aegypti</i> no Brasil.....	34
<b>1.4 Resistência à inseticidas .....</b>	<b>36</b>
1.4.1 Canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_v$ ) e mutações <i>kdr</i> em <i>Ae. aegypti</i> .....	38
<b>1.5 Genética de populações em <i>Ae. aegypti</i> e a importância dos marcadores moleculares .....</b>	<b>40</b>
1.5.1 Marcadores microssatélites .....	43
1.5.2 Uso de marcadores microssatélites em genética de populações de <i>Ae. aegypti</i> .....	44
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>47</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>49</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>50</b>

<b>4.1</b>	<b>Monitoramento e direcionamento do controle de <i>Aedes</i> na Ilha de Paquetá .....</b>	<b>50</b>
4.1.1	Breve histórico sobre a Ilha de Paquetá .....	50
4.1.2	Aspectos socioeconômicos e geográficos sobre a Ilha de Paquetá.....	51
4.1.3	Instalação e Georreferenciamento das ovitrampas na Ilha de Paquetá .....	53
4.1.4	Monitoramento temporal contínuo e bimestral de ovitrampas na Ilha de Paquetá .....	55
4.1.5	Direcionamento das ações de controle em Paquetá I.....	56
4.1.6	Análise dos dados.....	58
<b>4.2</b>	<b>Obtenção de ovos e criação das amostras de <i>Aedes</i> das áreas portuárias do Rio de Janeiro.....</b>	<b>61</b>
<b>4.3</b>	<b>Avaliação da resistência a inseticidas em <i>Ae. aegypti</i> .....</b>	<b>66</b>
4.3.1	Bioensaios dose-resposta com inseticidas .....	66
4.3.2	Bioensaios com larvas .....	67
4.3.3	Bioensaios com adultos .....	69
4.3.4	Análise dos resultados dos bioensaios .....	70
4.3.5	Estimativa das frequências das mutações <i>kdr</i> em <i>Ae. aegypti</i> ....	71
4.3.5.1	Extração de DNA genômico de <i>Ae. aegypti</i> .....	71
4.3.5.2	Genotipagem e avaliação dos sítios mutantes Val1016Ile e Phe1534Cys em <i>Ae. aegypti</i> .....	72
<b>4.4</b>	<b>Análise da variabilidade genética de <i>Ae. aegypti</i> com marcadores microssatélites .....</b>	<b>77</b>
4.4.1	Obtenção de genótipos derivados de loci microssatélites .....	77
4.4.2	Análise dos parâmetros evolutivos .....	81
4.4.2.1	Análise da diversidade genética intrapopulacional de <i>Ae. aegypti</i> .....	81
4.4.2.2	Estrutura genética das populações de <i>Ae. aegypti</i> .....	82
<b>4.5</b>	<b>Atividades de treinamento e capacitação em controle de mosquitos vetores - Brasil Sem Miséria (BSM) .....</b>	<b>83</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>84</b>
<b>5.1</b>	<b>Monitoramento e direcionamento do controle na Ilha de Paquetá.....</b>	<b>84</b>

5.1.1	Distribuição espacial de <i>Aedes</i> na área de estudo (Paquetá I) ...	84
5.1.2	Monitoramento bimestral de <i>Aedes</i> na Ilha de Paquetá .....	90
5.1.3	Direcionamento das ações de controle em Paquetá I .....	99
<b>5.3</b>	<b>Bioensaios dose-resposta com inseticidas.....</b>	<b>104</b>
5.3.1	Bioensaios com larvas.....	105
5.3.2	Bioensaio com adultos.....	108
5.3.2.1	Ensaio com deltametrina .....	108
5.3.2.2	Ensaio com malathion.....	111
<b>5.4</b>	<b>Frequências das mutações <i>kdr</i>.....</b>	<b>113</b>
<b>5.5</b>	<b>Genética populacional de <i>Ae. aegypti</i> por meio de marcadores</b>	
	<b>microssatélites .....</b>	<b>116</b>
5.5.1	Diversidade genética dos loci microssatélites .....	116
5.5.2	Variação e estrutura genética das populações.....	123
<b>5.6</b>	<b>Atividades de treinamento e capacitação em controle de</b>	
	<b>mosquitos vetores - Brasil Sem Miséria (BSM) .....</b>	<b>128</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>131</b>
6.1	Direcionamento do controle de <i>Aedes</i> em Paquetá I.....	131
6.2	Distribuição espacial de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> na Ilha	
	de Paquetá .....	134
6.3	Resistência a inseticidas.....	136
6.4	Genética de populações de <i>Ae. aegypti</i> com marcadores	
	microssatélites .....	142
6.5	Atividades de educação em saúde com base no controle de	
	mosquitos vetores - Brasil Sem Miséria (BSM) .....	147
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>149</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.1:** Ciclo de vida e desenvolvimento holometábolo de mosquitos do gênero *Aedes*. Fonte imagens: Lucas Ouverney (2017);

www.educaaedes.federalcubatao.com.br; James Benet (2013) www.istock.com.3

**Figura 1.2:** Diferenças morfológicas de larvas e de mosquitos adultos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. (A) *Ae. aegypti* adulto; (B) lira presente no escudo de *Ae. aegypti* adulto; (C) cabeça da larva de *Ae. aegypti*; (D) *Ae. aegypti* larva (E) cauda da larva e espinho serrilhado (em evidência) de *Ae. aegypti*; (F) *Ae. albopictus* adulto; (G) linha longitudinal presente no escudo de *Ae. albopictus* adulto; (H) cabeça da larva de *Ae. albopictus*; (I) larva de *Ae. albopictus*; (J) cauda da larva e espinho liso (em evidência) de *Ae. albopictus*. Fonte A:

Teptong (2014) www.istock.com; C: Mrfiza (2016) www.istock.com; B,D,F,G,I,J:

Chave-entomológica de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994); E,H: Brasil (1989).

..... 4

**Figura 1.3:** Mapa de modelagem da provável distribuição global de *Ae. aegypti*. O mapa representa a probabilidade de ocorrência de 0 (azul) para 1 (vermelho). Fonte: Kraemer et al (2015). .....

6

**Figura 1.4:** Diferenças na coloração entre a subespécie ancestral *Ae. aegypti formosus* (esquerda) e a subespécie doméstica *Ae. aegypti aegypti* (direita). Fonte: McBride et al (2014). .....

7

**Figura 1.5:** Mapa de modelagem da provável distribuição global de *Ae. albopictus*. O mapa representa a probabilidade de ocorrência de 0 (azul) para 1 (vermelho). Fonte: Kraemer et al (2015). .....

9

**Figura 1.6:** Classificação dos tipos de dengue e níveis de gravidade, segundo os sintomas clínicos. Fonte: WHO (2009) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009), com adaptações. ....

12

**Figura 1.7:** Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas no Brasil, nos anos de 2014, 2015 e 2016. Fonte: Brasil (2016) (BRASIL, 2016), com adaptações. ....

14

**Figura 1.8:** Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas no Brasil, nos anos de 2016, 2017 e 2018. Fonte: Brasil (2018) (BRASIL, 2018a), com adaptações. ....

15

<b>Figura 1.9:</b> Casos prováveis de chikungunya, por semana epidemiológica de início de sintomas no Brasil, nos anos de 2016, 2017 e 2018. Fonte: Brasil (2018) (BRASIL, 2018a), com adaptações.....	18
<b>Figura 1.10:</b> Exemplos de malformações decorrentes da Síndrome Congênita do Zika. (A, B) Neonatos com malformações craniofaciais e microcefalia; (C) Natimorto com microcefalia e contraturas de membros superiores e inferiores: artrogripose. Fonte das imagens: (MARTINES et al., 2016; MOORE et al., 2017). .....	19
<b>Figura 1.11:</b> Casos prováveis de Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas no Brasil, nos anos de 2016, 2017 e 2018. Fonte: (BRASIL, 2018a), com adaptações. ....	21
<b>Figura 1.12:</b> Ciclo urbano e silvestre da Febre Amarela Fonte: Portal Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017c). ....	22
<b>Figura 1.13:</b> Estrutura molecular do Canal de sódio regulado por voltagem ( <i>Nav</i> ), sítio-alvo dos inseticidas piretroides (PI) e DDT (OC) em <i>Ae. aegypti</i> . Fonte: (MARTINS; VALLE, 2012). ....	39
<b>Figura 4.1:</b> Ilha de Paquetá, situada na cidade do Rio de Janeiro (RJ), Brasil. Fonte: Google Earth (2018). ....	52
<b>Figura 4.2:</b> Baía de Guanabara e as cinco áreas portuárias da região metropolitana do Rio de Janeiro (RJ). (A) Ilha de Paquetá; (B) Praça XV; (C) Cocotá, Ilha do Governador; (D) Praça de Araribóia, Niterói; (E) Itaóca, São Gonçalo. Fonte: Google Earth (2018). ....	62
<b>Figura 4.3:</b> Procedimentos com as paletas de campo em laboratório. (A) secagem das paletas; (B) contagem dos ovos de <i>Aedes</i> em estereomicroscópio; (C, D) eclosão dos ovos de <i>Aedes</i> por ovitrampa. Imagens: Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores – LAFICAVE, IOC/FIOCRUZ, localizado no Instituto de Biologia do Exército – IBEX, Benifca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ....	66
<b>Figura 4.4:</b> Procedimento para a execução de bioensaio de larvas de <i>Ae. aegypti</i> com temephos (OP). (A, B) Separação das larvas de <i>Ae. aegypti</i> em copos com 20 mL de água desclorada; (C) Replicatas do gradiente de concentrações do larvicida. Imagens: Laboratório de Fisiologia e Controle de	

Artrópodes Vetores – LAFICAVE, IOC/FIOCRUZ, localizado no Instituto de Biologia do Exército – IBEX, Benifca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. .... 68

**Figura 4.5:** Procedimento para a execução de bioensaio de adultos de *Ae. aegypti* com deltametrina (PI) e malathion (OP). (A) impregnação do inseticida em papel; (B) gaiola com fêmeas de *Ae. aegypti* selecionadas para o ensaio; (C) kits de tubos de ensaio padrão OMS, sendo um lado para a exposição de *Ae. aegypti* ao papel impregnado com inseticida e o outro lado para descanso de *Ae. aegypti*; (D) tubos de descanso e solução açucarada à 10% com fêmeas do mosquito, durante o experimento. Imagens: Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores – LAFICAVE, IOC/FIOCRUZ, localizado no Instituto de Biologia do Exército – IBEX, Benifca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. .... 70

**Figura 4.6:** Gráfico com discriminação dos resultados dos alelos plotados durante a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real com *TaqMan* (BIOSYSTEMS, 2017)..... 74

**Figura 4.7:** Representação de uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o kit *TaqMan® Genotyping Master Mix – Applied Biosystems*. (A) dupla fita de DNA alvo; (B) fita de DNA desnaturada e reconhecimento da região alvo à ser amplificada; anelamento dos *primers forward* e *reverse* e hibridização da sonda (C) polimerização da fita de DNA a partir do *primer*, degradação da sonda com a liberação do fluoróforo, acendendo o sinal verde (fluorescência HEX). Fonte: *TaqMan® SNP Genotyping Assays User Guide* (BIOSYSTEMS, 2017)..... 76

**Figura 4.8:** Exemplos de uma combinação de *loci* utilizados nas PCRs e genotipagens *multiplex* de *Ae. aegypti*, com os possíveis tamanhos de alelos que cada *locus* pode apresentar em pares de bases. Bandas azuis (fluorescência FAM), bandas verdes (fluorescências HEX). Fonte: (LIMA, 2017), com modificações..... 78

**Figura 4.9:** Exemplos de eletroferogramas de alelos microssatélites de *Ae. aegypti*. (A) indivíduo heterozigoto (alelos 156 e 159) para o *locus* AC5 com fluorescência FAM; (B) indivíduo homozigoto (alelo 166) para o *locus* B3 com fluorescência HEX..... 81

**Figura 5.1:** Dinâmica temporal de *Aedes* em Paquetá I (bairro Ponte) da Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. Índice de

Densidade de Ovos - IDO (linha azul), Índice Médio de Ovos – IMO (linha vermelha) e número de ovos mensal - n ovos (barras cinzas). .....	85
<b>Figura 5.2:</b> Dinâmica temporal do índice de positividade de ovitrampas de <i>Aedes</i> em Paquetá I (bairro Ponte) da Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. Índice de Positividade de Ovitrampas - IPO (linha preta). .....	85
<b>Figura 5.3:</b> Correlação entre os índices de infestação para <i>Aedes</i> – Índice de Positividade de Ovitrampas (IPO) x Índice de Densidade de Ovos (IDO) e IPO x Índice Médio de Ovos (IMO), avaliados para Paquetá I (bairro Ponte), Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. ....	86
<b>Figura 5.4:</b> Mapas de kernel de meses do ano de 2014, com a distribuição espacial de ovos de <i>Aedes</i> em Paquetá I (bairro Ponte), Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. ....	87
<b>Figura 5.5:</b> Mapas de kernel de meses do ano de 2015, com a distribuição espacial de ovos de <i>Aedes</i> em Paquetá I (bairro Ponte), Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. ....	88
<b>Figura 5.6:</b> Mapas de kernel de meses do ano de 2016, com a distribuição espacial de ovos de <i>Aedes</i> em Paquetá I (bairro Ponte), Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. ....	89
<b>Figura 5.7:</b> Dinâmica temporal e espacial de <i>Aedes</i> avaliadas bimestralmente na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. Índice de Densidade de Ovos - IDO (linha azul), Índice Médio de Ovos – IMO (linha vermelha) e número de ovos mensal - n ovos (barras cinzas). .....	90
<b>Figura 5.8:</b> Dinâmica temporal do índice de positividade de ovitrampas de <i>Aedes</i> na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. Índice de Positividade de Ovitrampas - IPO (linha preta). .....	91
<b>Figura 5.9:</b> Mapas de kernel dos primeiros meses de coletas bimestrais, com a distribuição espacial de ovos de <i>Aedes</i> na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. ....	92
<b>Figura 5.10:</b> Mapas de kernel dos últimos meses de coletas bimestrais, com a distribuição espacial bimestral de ovos de <i>Aedes</i> na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. ....	93

<b>Figura 5.11:</b> Frequência de <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i> na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016.....	94
<b>Figura 5.12:</b> Mapa com a cobertura vegetal e ovitrampas na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil. Áreas em verde representam vegetação densa. Fonte: QGis (2018).....	95
<b>Figura 5.13:</b> Distribuição espacial-temporal de <i>Ae. aegypti</i> na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. De acordo com a barra de intensidade de kernel, os pontos com coloração mais clara (tons verde e amarelo) representam as armadilhas com menor quantidade de <i>Ae. aegypti</i> e os pontos mais escuros (laranja e vermelho) representam as armadilhas com maior quantidade de <i>Ae. aegypti</i> . Fonte: QGis (2018). ....	97
<b>Figura 5.14:</b> Distribuição espacial-temporal de <i>Ae. albopictus</i> na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. De acordo com a barra de intensidade de kernel, os pontos com coloração mais clara (tons verde e amarelo) representam as armadilhas com menor quantidade de <i>Ae. albopictus</i> e os pontos mais escuros (laranja e vermelho) representam as armadilhas com maior quantidade de <i>Ae. albopictus</i> . Fonte: QGis (2018).....	98
<b>Figura 5.15:</b> Associação entre variáveis ambientais e número total de ovos de <i>Aedes</i> na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. ....	99
<b>Figura 5.16:</b> <i>Boxplot</i> da associação entre o Índice de Positividade de Ovitrapas - IPO e a remoção de depósitos positivos para <i>Aedes</i> , na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil. ....	102
<b>Figura 5.17:</b> <i>Boxplot</i> dos Índices entomológicos de ovitrampas e número máximo de ovos de <i>Aedes</i> em Paquetá I e Paquetá II, Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. Paq I (Paquetá I); Paq II (Paquetá II) (A) Índice de Positividade de Ovitrapa - IPO; (B) Índice de Densidade de Ovos - IDO; (C) Índice Médio de Ovos – IMO. ....	103
<b>Figura 5.18:</b> Diagrama de dispersão do Índice de Positividade de Ovitrapa (IPO) em relação a temperatura mínima na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. ....	104
<b>Figura 5.19:</b> Curvas de regressão linear de análise log x <i>probit</i> em bioensaio dose-resposta de larva, de cinco populações de <i>Ae. aegypti</i> do Rio de Janeiro,	

Brasil, avaliadas com o organofosforado temephos, coletados em junho e dezembro de 2014.....	107
<b>Figura 5.20:</b> Curvas de regressão linear de análise log x <i>probit</i> em bioensaio dose-resposta de adulto, de cinco populações de <i>Ae. aegypti</i> do Rio de Janeiro, Brasil, avaliadas com o piretroide deltametrina, coletados em junho e dezembro de 2014. ....	110
<b>Figura 5.21:</b> Curvas de regressão linear de análise log x <i>probit</i> em bioensaio dose-resposta de adulto, de cinco populações de <i>Ae. aegypti</i> do Rio de Janeiro, Brasil, avaliadas com o organofosforado malathion, coletados em junho e dezembro de 2014.....	112
<b>Figura 5.22:</b> Frequências alélicas e genóticas referentes aos sítios 1016 e 1534 do canal de sódio regulado por voltagem ( $N_{av}$ ) em <i>Ae. aegypti</i> , obtidos em seis populações do Rio de Janeiro, Brasil, coletados em junho e dezembro de 2014. Lado esquerdo = amostras do inverno; lado direito = amostras do verão; (A) frequência dos alelos $N_{av}$ S, R1 e R2; (B) frequência genotípica R1R1, R1R2 e R2R2. Legenda das populações: PQT= Paquetá; PXV= Praça XV; CCT= Cocotá; NIT= Niterói; ITC= Itaóca. ....	114
<b>Figura 5.23:</b> Mapa da distribuição das frequências dos alelos S (selvagem), R1 (mutante sítio 1534) e R2 (mutante sítios 1016 e 1534) do canal de sódio regulado por voltagem ( $N_{av}$ ) em <i>Ae. aegypti</i> , estimados em seis populações de <i>Ae. aegypti</i> de regiões portuárias da região metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil, coletados em junho e dezembro de 2014. Inv: inverno; ver: verão. ....	115
<b>Figura 5.24:</b> Gráfico de Evanno para as populações de <i>Ae. aegypti</i> do Rio de Janeiro, Brasil, do verão (A) e inverno (B) (K= 2). Coleta do inverno (junho/2014) e do verão (dezembro/2014). ....	126
<b>Figura 5.25:</b> Gráfico de barras do Structure para as amostras de <i>Ae. aegypti</i> do verão (acima) e do inverno (abaixo) (K= 2). Coleta do inverno (junho/2014) e do verão (dezembro/2014). ....	126
<b>Figura 5.26:</b> Gráfico de Evano para as amostras de <i>Ae. aegypti</i> do verão e inverno juntas (K= 3). Coleta do inverno (junho/2014) e do verão (dezembro/2014). ....	127

<b>Figura 5.27:</b> Gráfico de barras do Structure para as amostras de <i>Ae. aegypti</i> de coletas do verão e inverno juntas (K= 3). Coleta do inverno (junho/2014) e do verão (dezembro/2014). .....	127
<b>Figura 5.28:</b> Eventos de capacitação aos agentes de vigilância em saúde (AVS) e caseiros vigilantes de domicílios da Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil.	129
<b>Figura 5.29:</b> Eventos educativos e de sensibilização sobre o ciclo de vida do <i>Aedes</i> e os arbovírus transmitidos que causam de doenças, aos moradores e estudantes da Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil. ....	129
<b>Figura 5.30:</b> Panfletos com mapa de calor (kernel) identificando as áreas mais infestadas por <i>Aedes</i> em Paquetá I, Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, distribuídos aos moradores da Ilha.....	130

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1:</b> Classificação dos tipos de depósitos e ações preconizadas pelo Programa Nacional de Controle da Dengue – PNCD. Fonte: Brasil (2009). .....	57
<b>Tabela 4.2:</b> Variáveis e códigos R utilizados nos modelos de regressão logística para os testes de associação entre os estratos de Paquetá I e Paquetá II, na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro. ....	60
<b>Tabela 4.3:</b> Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> e das sondas utilizadas nas genotipagens por meio de RT - PCR alelo específicas para os sítios 1016 e 1534 que codificam o canal de sódio regulado por voltagem $Na_V$ em <i>Ae. aegypti</i> .....	73
<b>Tabela 5.1:</b> Total de ovos de <i>Aedes</i> e resumo das atividades de campo obtidos durante o direcionamento das ações de controle de vetores. na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. ....	100
<b>Tabela 5.2:</b> Classificação dos depósitos inspecionados com foco de <i>Aedes</i> na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. A1 (depósitos de água elevados); A2 (depósitos de água ao nível do solo); B (depósitos móveis); C (depósitos fixos); D1 (depósitos de remoção: pneus); D2 (depósitos de remoção: lixo); E (depósitos naturais).....	100

<b>Tabela 5.3:</b> Comparação entre as ações de controle de <i>Aedes</i> (PNCD) realizadas durante as vistorias domiciliares em Paquetá I e Paquetá II, Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. ....	101
<b>Tabela 5.4:</b> Concentrações letais (CL) (mg/L) obtidas em bioensaio dose-resposta de larvas, calculadas por análise <i>probit</i> e razões de resistência (RR) para o organofosforado temephos, de cinco populações de <i>Ae. aegypti</i> do Rio de Janeiro, Brasil. Em negrito, na RR50, se mostram as populações resistentes, segundo a OMS (2016) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). ....	106
<b>Tabela 5.5:</b> Concentrações letais (CL) (mg/m <sup>2</sup> ) obtidas em bioensaio dose-resposta com adultos, calculadas por análise <i>probit</i> e razões de resistência (RR) para o piretroide deltametrina, de cinco populações de <i>Ae. aegypti</i> do Rio de Janeiro, Brasil. Em negrito, na RR50 se mostram as populações resistentes, segundo a OMS (2016) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). ....	109
<b>Tabela 5.6:</b> Concentrações letais (CL) (g/m <sup>2</sup> ) obtidas em bioensaio dose-resposta de adultos, calculadas por análise <i>probit</i> e razões de resistência (RR) para o organofosforado malathion, de cinco populações de <i>Ae. aegypti</i> do Rio de Janeiro, Brasil. Em negrito, na RR50, se mostram as populações resistentes, segundo OMS (2016) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). ....	111
<b>Tabela 5.7:</b> Frequências alélicas, genótípicas e dos genótipos resistentes (R1R1, R1R2, R2R2) referentes aos sítios 1016 e 1534 do canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_v$ ) em <i>Ae. aegypti</i> , obtidos em seis populações do Rio de Janeiro, Brasil, coletados em junho e dezembro de 2014. ....	113
<b>Tabela 5.8:</b> Frequências alélicas e estimativas de variabilidade genética de 12 <i>loci</i> microssatélites analisados em seis populações de <i>Ae. aegypti</i> do Rio de Janeiro (RJ), Brasil, coletados no inverno (junho/2014). Em negrito: nome do <i>locus</i> e nome do alelo; N: número de indivíduos genotipados; <i>Hprare</i> – Na: riqueza alélica; Ne: número efetivo de alelos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada. ....	117
<b>Tabela 5.9:</b> Frequências alélicas e estimativas de variabilidade genética de 12 <i>loci</i> microssatélites analisados em seis populações de <i>Ae. aegypti</i> do Rio de Janeiro (RJ), Brasil, coletados no verão (dezembro/2014). Em negrito: nome do <i>locus</i> e nome do alelo; N: número de indivíduos genotipados; <i>Hprare</i> – Na:	

riqueza alélica; Ne: número efetivo de alelos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigozidade esperada..... 119

**Tabela 5.10:** Coeficientes de endogamia (FIS) estimados para 12 *loci* microssatélites utilizados em análises populacionais em seis populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil, coletados no inverno (junho/2014) e verão (dezembro/2014). Em negrito estão os valores significativos para desequilíbrio de Hardy-Weinberg. .... 122

**Tabela 5.11:** Frequência dos alelos nulos encontrados nas populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil, coletados no inverno (junho/2014) e verão (dezembro/2014). .... 123

**Tabela 5.12:** Matriz de índice de fixação (FST) entre seis populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil, coletados no inverno (junho/2014) e verão (dezembro/2014). .... 124

**Tabela 5.13:** Análise de variância molecular (AMOVA) entre seis populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil, coletados no inverno (junho/2014) e verão (dezembro/2014). .... 125

## Lista de Siglas e Abreviaturas

AaNav	Canal de sódio regulado por voltagem em <i>Aedes aegypti</i>
ACS	Agente Comunitário em Saúde
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AVS	Agente de Vigilância em Saúde
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> variedade <i>israelensis</i>
CB	Carbamato
Cys	Cisteína
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
ex	Exemplo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
Gly	Glicina
GPS	<i>Global Positioning System</i>
GST	Glutationa-S-transferase
IC	Incompatibilidade citoplasmática
IGR	<i>Insect Growth Regulator</i> - Regulador de Crescimento em Insetos
Ile	Isoleucina
<i>kdr</i>	<i>knockdown resistance</i>
MFO	Monoxigenase de função mista/múltipla
MoReNAa	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de <i>Aedes aegypti</i> a Inseticidas
MS	Ministério da Saúde
NaV	Canal de sódio regulado por voltagem
Na <sub>V</sub> <sup>R1</sup>	Alelo mutante no sítio 1534
Na <sub>V</sub> <sup>R2</sup>	Alelo mutante nos sítios 1016 e 1534
OC	Organoclorado
OMS	Organização Mundial de Saúde
OP	Organofosforado
Phe	Fenilalanina
PI	Piretroide
PNCD	Programa Nacional de Controle de Dengue
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
Val	Valina
UTM - SAD	<i>Universal Transversa de Mercator – South American Datum</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações sobre *Aedes*

Os mosquitos são insetos pertencentes à Ordem Diptera e Família Culicidae, sendo a última um grupo grande e abundante, composto por mais de 3.600 espécies (THOMAS V. GAFFIGAN ET AL., 2015). As espécies de culicídeos são classificadas filogeneticamente dentro das subfamílias Anophelinae e Culicinae, distribuídas em cerca de 40 gêneros (HARBACH, 2007; THOMAS V. GAFFIGAN ET AL., 2015). Os culicídeos são encontrados em todas as regiões temperadas e tropicais do mundo e até pelo Círculo Ártico (SERVICE, 2008). Alguns gêneros apresentam importância epidemiológica e médica, como por exemplo: *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Haemagogus*, *Mansonia* e *Sabethes*. Grande parte das espécies destes gêneros está envolvida na transmissão de agentes etiológicos para humanos provocando, conseqüentemente, doenças com altas taxas de morbidade e mortalidade (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

Do ponto de vista da saúde pública, a transmissão de patógenos é um grande problema, pois são transmitidos através da picada de mosquitos vetores infectados durante a atividade hematofágica realizada pelas fêmeas. São também conhecidos como carapanãs, pernilongos ou muriçocas e, quando em altas densidades, são considerados pragas apenas devido a alta taxa de picadas (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; RUEDA, 2008).

Mosquitos do gênero *Aedes* possuem uma extensa distribuição pelo mundo, incluindo espécies endêmicas em todo o planeta, nos mais variados climas e ambientes. Ao todo, são 932 espécies descritas distribuídas em 44 subgêneros (WILKERSON; ET AL, 2015). Um dos subgêneros mais importantes epidemiologicamente é o *Stegomyia*, do qual fazem parte os principais vetores de arbovírus ao homem: *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são espécies exóticas, simpátricas e sinantrópicas (BRAKS et al., 2003; GOMES, 1998). Em muitas áreas do mundo,

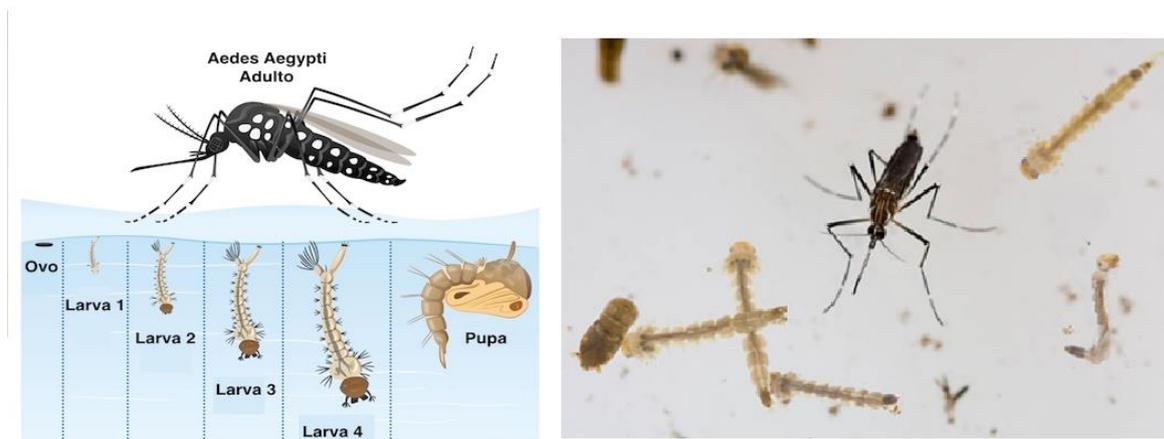
*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* coexistem, compartilhando os mesmos habitats em áreas urbanas e suburbanas (BRAKS et al., 2003; CAMARA et al., 2016; LEISNHAM et al., 2009; REY; LOUNIBOS, 2015). A distribuição das populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* está relacionada com fatores ecológicos, climáticos e antropogênicos (KRAEMER et al., 2015) e encontram-se distribuídas por quase todo o mundo, com exceção de locais congelados (FORATTINI, 2002). A dispersão de ambas espécies, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, pelos continentes tem sido associada ao comércio, como o de pneus usados, e viagens de migrações humanas (BROWN et al., 2014; POWELL; TABACHNICK, 2013).

*Ae. aegypti* é encontrado frequentemente no ambiente intradomiciliar e desenvolveu um comportamento antropofílico, com hábito predominantemente urbano. No entanto, *Ae. albopictus* frequenta o ambiente extradomiciliar e tem uma valência ecológica bem mais ampla que *Ae. aegypti*, com habilidade de se dispersar em diversos habitats, tanto na zona silvestre quanto urbana (GOMES et al., 2005; TAUIL, 2002).

Os culicídeos têm desenvolvimento holometábolo (Figura 1.1), ou seja, apresentam metamorfose completa com o ciclo de vida iniciando no ovo, passando pelas fases de larva, pupa e adulto. Variáveis climáticas, como pluviosidade e temperatura, são elementos determinantes que influenciam diretamente o desenvolvimento dos mosquitos. Os ovos são depositados pela fêmea em superfícies úmidas dos reservatórios e criadouros e os *Aedes* têm preferência por substratos escuros, rugosos e com águas não poluídas (FORATTINI, 2002). Os ovos de *Aedes* são resistentes à dessecação e ficam aderidos ao substrato até a eclosão (CHRISTOPHERS, 1960). Quando secos, os ovos podem permanecer viáveis por muitos meses, em estado de quiescência embrionária (CHRISTOPHERS, 1960; CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002) eclodindo após serem inundados novamente. Essas condições biológicas favorecem a disseminação das espécies de mosquitos *Aedes* através da dispersão passiva.

Após a fase de ovo, os mosquitos passam por quatro estádios larvais (L1 a L4) e um estágio de pupa. Nos estádios larvais alimentam-se de matéria orgânica disponível no ambiente aquático. A disponibilidade de alimento e a

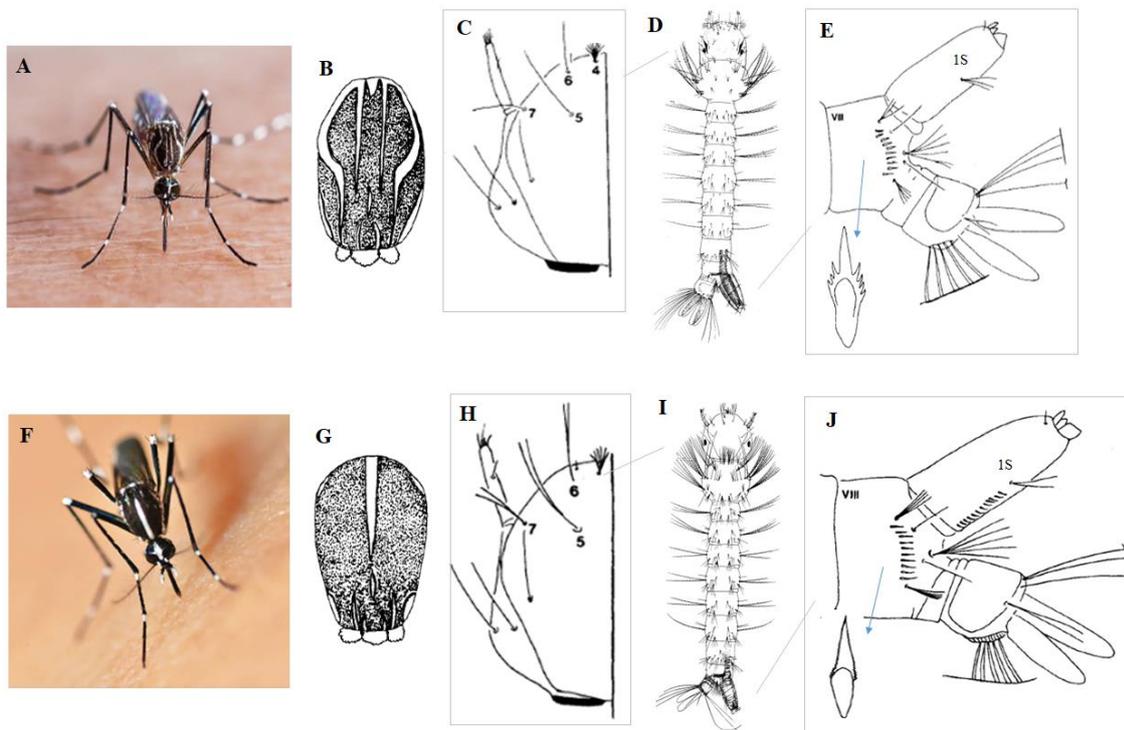
densidade de larvas no criadouro são fatores cruciais no tempo de duração da fase larvária (PUGGIOLI et al., 2017) em média de quatro a oito dias. A última fase imatura é a pupa, com duração de, aproximadamente, dois dias. Nesta etapa, o inseto não se alimenta e usa a reserva energética para a emergência como mosquito adulto (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002).



**Figura 1.1:** Ciclo de vida e desenvolvimento holometábolo de mosquitos do gênero Aedes. Fonte imagens: Lucas Ouverney (2017); [www.educaedes.federalcubatao.com.br](http://www.educaedes.federalcubatao.com.br); James Benet (2013) [www.istock.com](http://www.istock.com).

Tanto *Ae. aegypti* (Figura 1.2A) quanto *Ae. albopictus* (Figura 1.2C) são mosquitos de coloração escura, com escamas brancas nas pernas e tórax. Diante da similaridade morfológica de ambos os mosquitos, a principal identificação é através do escudo, na parte dorsal do tórax (Figura 1.2B, 1.2G). Em *Ae. aegypti*, o escudo é constituído de linhas longitudinais compostos por escamas branco-prateadas formando um desenho na forma de lira (Figura 1.2B); *Ae. albopictus* apresenta uma única linha longitudinal branco-prateada, no centro do escudo (Figura 1.2G). A identificação também pode ser realizada em larvas: *Ae. aegypti* (Figura 1.2D) dispõe na cabeça cerdas 5, 6 e 7 simples (Figura 1.2C); na cauda tem escamas do pente do segmento VIII com um espinho longo e dentes bilaterais (Figura 1.2E); *Ae. albopictus* (Figura 1.2I) tem na cabeça cerdas 5, 6 e 7 duplas, triplas ou múltiplas (Figura 1.2H); apresenta cerdas 1S com 2 a 4 ramos e escamas do pente do segmento VIII com um espinho longo sem dentes bilaterais, apenas com franja nas bases laterais (Figura 1.2J)

(BRASIL, 1989; CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Tem coloração mais escura que *Ae. aegypti* sendo, portanto, ligeiramente mais negro.



**Figura 1.2:** Diferenças morfológicas de larvas e de mosquitos adultos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. (A) *Ae. aegypti* adulto; (B) lira presente no escudo de *Ae. aegypti* adulto; (C) cabeça da larva de *Ae. aegypti*; (D) *Ae. aegypti* larva (E) cauda da larva e espinho serrilhado (em evidência) de *Ae. aegypti*; (F) *Ae. albopictus* adulto; (G) linha longitudinal presente no escudo de *Ae. albopictus* adulto; (H) cabeça da larva de *Ae. albopictus*; (I) larva de *Ae. albopictus*; (J) cauda da larva e espinho liso (em evidência) de *Ae. albopictus*. Fonte A: Teptong (2014) [www.istock.com](http://www.istock.com); C: Mrfiza (2016) [www.istock.com](http://www.istock.com); B,D,F,G,I,J: Chave-entomológica de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994); E,H: Brasil (1989).

### 1.1.1 *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

*Ae. aegypti* (Figura 1.2A) é considerado um importante inseto invasor, cuja expansão pelos continentes tropicais e subtropicais do planeta influenciado pelas atividades humanas (BROWN et al., 2014; POWELL; TABACHNICK, 2013). *Ae. aegypti* é uma das espécies que melhor se adapta e mais dependente ao ambiente urbano (NATAL, 2002), principalmente por ser altamente antropofílica (NELSON, 1986).

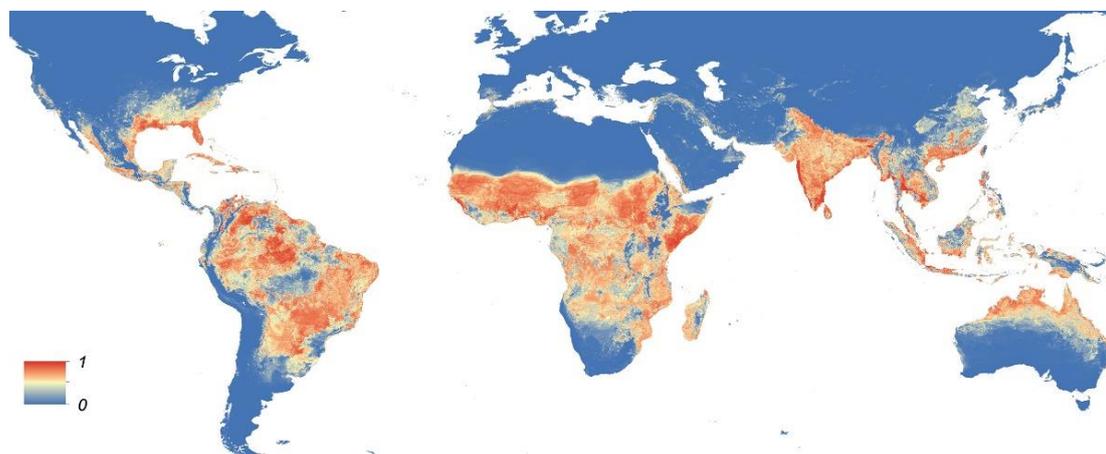
Uma das principais causas da adaptação e permanência de mosquitos *Ae. aegypti* nas cidades se dá pelo processo de urbanização sem planejamento, principalmente em áreas onde o serviço de saneamento básico é deficitário (TAUIL, 2002). O lixo aglomerado no peridomicílio e o armazenamento de água em recipientes artificiais servem de criadouros para o vetor *Ae. aegypti*, onde encontra condições satisfatórias para o desenvolvimento de seu ciclo biológico. O progresso da indústria automotiva também tem sido um fator determinante para o aumento populacional dos mosquitos aedíneos, posto que aumenta o descarte de pneumáticos. Os pneus são um dos recipientes preferidos para a oviposição do mosquito *Aedes* (TAUIL, 2001, 2002).

Um comportamento que favorece reprodutivamente *Ae. aegypti* é a oviposição em saltos, pois dessa forma a fêmea dispersa seus ovos em vários recipientes diferentes, aumentando a probabilidade de sobrevivência de sua prole (REITER, 2007). Além disso, as fêmeas de *Ae. aegypti* têm uma peculiaridade chamada discordância gonotrófica, ou seja, tem a capacidade de realizar múltiplos repastos sanguíneos, em pessoas diferentes, a cada ciclo gonotrófico (CHRISTOPHERS, 1960). Este comportamento aumenta as chances da fêmea se infectar e transmitir agentes infecciosos para mais de um hospedeiro no mesmo ciclo gonotrófico (FORATTINI, 2002).

A busca das fêmeas de *Ae. aegypti* por hospedeiros para a hematofagia é um dos mecanismos para a dispersão ativa da espécie e a maneira pelo qual as fêmeas adquirem e transmitem os patógenos, sendo um importante meio de propagação de doenças (BHATT et al., 2013; HONÓRIO et al., 2003). A capacidade de vôo da espécie, em áreas urbanas, pode variar entre 100 e 800 metros (HONÓRIO et al., 2003; REITER et al., 1995; SERVICE, 2008), de acordo com situações particulares em que os espécimes se encontram. Em áreas florestadas urbanas, *Ae. aegypti* não adentra mais que 100 metros da margem da floresta (MACIEL-DE-FREITAS et al., 2006).

*Ae. aegypti* apresenta uma ampla distribuição geográfica pelo mundo, podendo ser encontrado em regiões tropicais e subtropicais (CHRISTOPHERS, 1960), entre as latitudes 35° Norte e 35° Sul (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). A espécie *Ae. aegypti* só não é encontrada em países onde o clima é predominantemente frio e/ou com altitude muito elevada (>1.200

m), como por exemplo Canadá, parte da Rússia e Antártica (Figura 1.3). Atualmente, *Ae. aegypti* é encontrado em ampla faixa do continente americano, desde o Uruguai até parte do Centro e Sul dos Estados Unidos e, no Brasil, está espalhado por todo país.



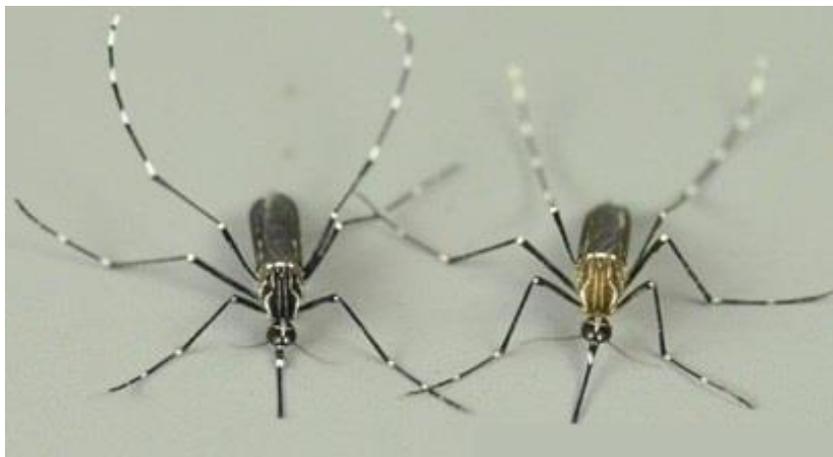
**Figura 1.3:** Mapa de modelagem da provável distribuição global de *Ae. aegypti*. O mapa representa a probabilidade de ocorrência de 0 (azul) para 1 (vermelho). Fonte: Kraemer et al (2015).

Já foram descritas três subespécies de *Ae. aegypti*: *Ae. aegypti aegypti*, *Ae. aegypti formosus* e *Ae. aegypti queenslandensis*. Em relação à última, ainda há controvérsias se é uma subespécie ou variedade de *Ae. aegypti aegypti* e se ainda pode ser encontrada (GLORIA-SORIA et al., 2016a). Altas distâncias genéticas entre populações de *Ae. aegypti* africanas e não-africanas identificaram a existência de dois grupos diferentes, correspondendo as subespécies *Ae. ae. aegypti* e *Ae. ae. formosus*. A última, *Ae. formosus*, é a espécie ancestral (BROWN et al., 2011).

As larvas de *Ae. ae. formosus* se desenvolvem em buracos de árvores e piscinas naturais e os adultos são preferencialmente zoofílicos. *A. aegypti formosus* é naturalmente mais escuro e com menos escamação branca pelo corpo, enquanto *Ae. ae. aegypti* é mais acastanhado (MCBRIDE et al., 2014) (Figura 1.4).

Diferente da espécie doméstica *Ae. ae. aegypti*, *Ae. ae. formosus* está limitada a África Subsaariana com aspectos comportamentais silvestres e habitats não antropizados (BROWN et al., 2011; POWELL; TABACHNICK, 2013). No Quênia, as duas subespécies foram encontradas coexistindo

(MCBRIDE et al., 2014) e populações africanas de *Ae. ae. aegypti* habitando ambientes urbanos, mesmo assim classificadas no grupo de *Ae. ae. formosus* (GLORIA-SORIA et al., 2016a).



**Figura 1.4:** Diferenças na coloração entre a subespécie ancestral *Ae. aegypti formosus* (esquerda) e a subespécie doméstica *Ae. aegypti aegypti* (direita). Fonte: McBride et al (2014).

*Ae. aegypti* é um mosquito originário da África e foi primeiramente descrito no Egito. A dispersão de *Ae. aegypti* para as Américas ocorreu por meio de navios, onde as condições de habitação humana foram determinantes para a sua domesticação (POWELL; TABACHNICK, 2013). No Brasil, a introdução de *Ae. aegypti* ocorreu provavelmente durante o período colonial através do tráfico negreiro (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Acredita-se que no ano de 1685, *Ae. aegypti* já estava estabelecido no país devido a uma grande epidemia de febre amarela no Recife, Pernambuco, dentre muitas outras que aconteceram em todo território nacional neste período (BRASIL, 1989).

Apesar de erradicado duas vezes no Brasil, *Ae. aegypti* teve sua re-emergência por falhas na vigilância entomológica e crescimento urbano acelerado (BRAGA; VALLE, 2007a), principalmente em decorrência da reinfestação a partir de regiões geográficas de fronteiras onde o vetor nunca foi erradicado (KOTSAKIOZI et al., 2017).

### 1.1.2 *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894)

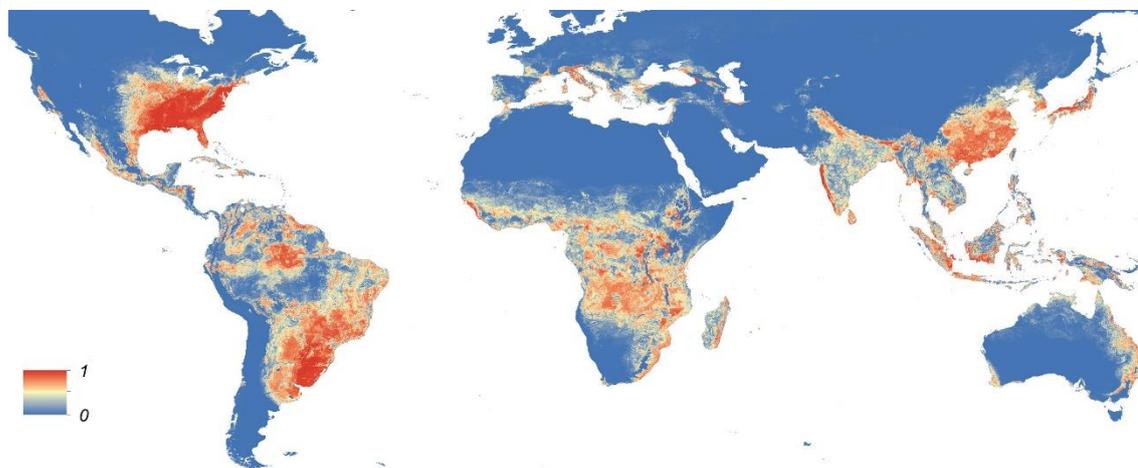
*Ae. albopictus* (Figura 1.2C) é um mosquito nativo da Ásia, também conhecido como mosquito tigre. Desde a década de 1980, ultrapassa limites globais de dispersão (GOMES et al., 1999), espalhando-se para, pelo menos, 28 países incluindo o Brasil (BENEDICT et al., 2007).

*Ae. albopictus* é uma espécie que possui aspectos biológicos que contribuem com sua rápida disseminação global: a forte plasticidade ecológica e fisiológica. A plasticidade ecológica permite que *Ae. albopictus* se adapte facilmente a novos ambientes, diferente dos quais naturalmente habitava, tanto nas fases imaturas quanto adulta. Consequentemente, *Ae. albopictus* é encontrado em ambientes urbanos e suburbanos, com grande concentração humana, capaz de realizar hematofagia em humanos e oviposição em recipientes artificiais (PAUPY et al., 2009). A plasticidade fisiológica de *Ae. albopictus* é detectada, por exemplo, pela sua capacidade de suportar condições climáticas adversas. Os ovos de *Ae. albopictus* são capazes de entrar em dormência embrionária (diapausa) para aguentar temperaturas baixas ( $\approx -5^\circ \text{C}$ ) e climas secos (PAUPY et al., 2009). Biologicamente, isso se deve a lipogênese larval, a capacidade de sintetizar uma grande quantidade de lipídeos durante o frio (BRIEGEL; TIMMERMANN, 2001). Além do mais, os ovos de *Ae. albopictus* são resistentes a dessecação, assim como *Ae. aegypti*. A dispersão de *Ae. albopictus* pode ter sido favorecida pelo comércio internacional de pneus usados (REITER; SPRENGER, 1987).

O mosquito *Ae. albopictus* vem se dispersando a partir do oeste do Pacífico e Sudeste Asiático para a Europa, África, Oriente Médio, norte e América do Sul e Caribe (GRATZ, 2004; PAUPY et al., 2009), com maior densidade ao sul da Europa, norte da China, sul do Brasil, norte dos Estados Unidos e Japão (Figura 1.5) (KRAEMER et al., 2015).

Foi pela primeira vez encontrado no Brasil nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, em 1986 (FORATTINI, 1986), possivelmente trazidos através do comércio marítimo de minério de ferro oriundos do Japão (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). No mesmo ano, *Ae. albopictus* foi identificado no Estado de São Paulo, disseminando-se pela região sudeste.

Desde sua primeira detecção, *Ae. albopictus* vem sendo encontrado em vários estados brasileiros. Todavia, nunca fora reportado nos Estados do Amapá, Acre e Sergipe (PANCETTI et al., 2015).



**Figura 1.5:** Mapa de modelagem da provável distribuição global de *Ae. albopictus*. O mapa representa a probabilidade de ocorrência de 0 (azul) para 1 (vermelho). Fonte: Kraemer et al (2015).

*Ae. albopictus* é um mosquito adaptado ao convívio humano e periurbano, com preferência pelas áreas mais florestadas, rurais e semi-rurais (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Esse processo de adaptação de *Ae. albopictus* foi devido a disponibilidade de depósitos propiciados pelo homem, da mesma forma que aconteceu com *Ae. aegypti* (BRAGA; VALLE, 2007a). *Ae. albopictus* coloniza criadouros naturais e artificiais, com preferência pelos criadouros naturais, por exemplo ocos de árvores, cascas de frutas, bromélias e entrenós de bambu (HAWLEY, 1988). *Ae. albopictus* coexiste nos mesmos recipientes artificiais que *Ae. aegypti*, vivendo em constante estresse competitivo (CAMARA et al., 2016; LEISNHAM et al., 2009).

O mosquito *Ae. albopictus* tem hábito diurno, zoofílico e exofágico, apontado como uma espécie oportunista por alimentar-se em humanos e outros mamíferos (cães, gatos e equinos), aves e répteis (HAWLEY, 1988; PAUPY et al., 2009; SAVAGE et al., 1993), dependendo da disponibilidade de hospedeiros.

Esse ecleticismo alimentar faz com que o *Ae. albopictus* seja considerado um potencial elo na cadeia de transmissão viral entre animais e humanos e entre animais selvagens e domésticos (PAUPY et al., 2009).

## 1.2 Principais arbovírus transmitidos por *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*

Arbovírus, do inglês *arbovirus* (*Arthropod Borne Virus*) são vírus transmitidos por diversas classes de animais do Filo Arthropoda, entre os quais, os mosquitos. Geralmente, os artrópodes adquirem esses patógenos após a ingestão de sangue virêmico durante a hematofagia, dando início a fase de incubação extrínseca, com a infecção, replicação e disseminação do vírus até alcançar a saliva. A fase de incubação intrínseca acontece no corpo do hospedeiro vertebrado, iniciada com a infecção, replicação e viremia (FORRESTER; GOFFEY; WEAVER, 2014; KRAEMER; EBEL, 2003; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). O período de incubação extrínseca varia de acordo com o arbovírus. Como exemplo, em *Ae. aegypti*, o vírus da febre amarela atinge a glândula salivar com 10 dias pós-infecção (dpi) (MCELROY et al., 2008), o dengue leva de 7-9 dpi (ROHANI et al., 2009), o Zika de 7-14 dpi (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016) e, o mais breve, chikungunya com apenas 2 dpi (DUBRULLE et al., 2009).

Longos períodos de incubação viral extrínseco podem ser uma vantagem para o controle vetorial, com a implementação de medidas de controle que limitem a disseminação dos patógenos. Essa vantagem se dá devido ao extenso tempo de disseminação do vírus pelo organismo do mosquito, antes que se torne infectivo e capaz de transmitir o agente infeccioso (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016).

*Ae. aegypti* é o principal vetor dos quatro sorotipos do dengue (DENV-1 - DENV-4), do chikungunya (CHIKV), do Zika (ZIKV) e da febre amarela urbana (FAU), no continente americano (WEAVER, 2014; YAKOB; WALKER, 2016). Os arbovírus são também transmitidos por *Ae. albopictus*, no entanto, até o momento, *Ae. albopictus* não foi incriminado como vetor primário no Brasil e demais países do continente americano (GRATZ, 2004; REITER, 2007; SHROYER, 1990).

*Ae. albopictus* é vetor secundário de DENV e CHIKV em áreas de coexistência com *Ae. aegypti*, em países asiáticos e é *Ae. albopictus* quem mantém os casos de dengue em áreas rurais em países da Ásia (GRATZ, 2004;

PAUPY et al., 2009). Em regiões onde é encontrado isoladamente, *Ae. albopictus* é considerado vetor primário de DENV. Provavelmente, foi o responsável por epidemias de dengue clássica em diversos países, por exemplo Japão, Taiwan, Ilha La Reunion, China, Havaí e países da Europa (AMRAOUI; FAILLOUX, 2016; LAMBRECHTS; SCOTT; GUBLER, 2010; PAUPY et al., 2009). Nas epidemias de chikungunya ocorridas no ano de 2007 na Itália, em Camarões e Gabão em 2007 e no Congo em 2004, *Ae. Albopictus* foi comprovadamente confirmado como vetor primário (ANGELINI et al., 2008; LEROY et al., 2009; PASTORINO et al., 2004; PEYREFITTE et al., 2007). Todas as grandes epidemias de dengue hemorrágica ocorreram apenas em áreas onde *Ae. aegypti* é encontrado. Embora *Ae. albopictus* seja susceptível ao dengue, a susceptibilidade pode variar entre os sorotipos virais (LAMBRECHTS; SCOTT; GUBLER, 2010). Quanto a competência vetorial em laboratório, *Ae. albopictus* é considerado vetor para, pelo menos, 26 arbovírus (PAUPY et al., 2009).

### 1.2.1 Dengue

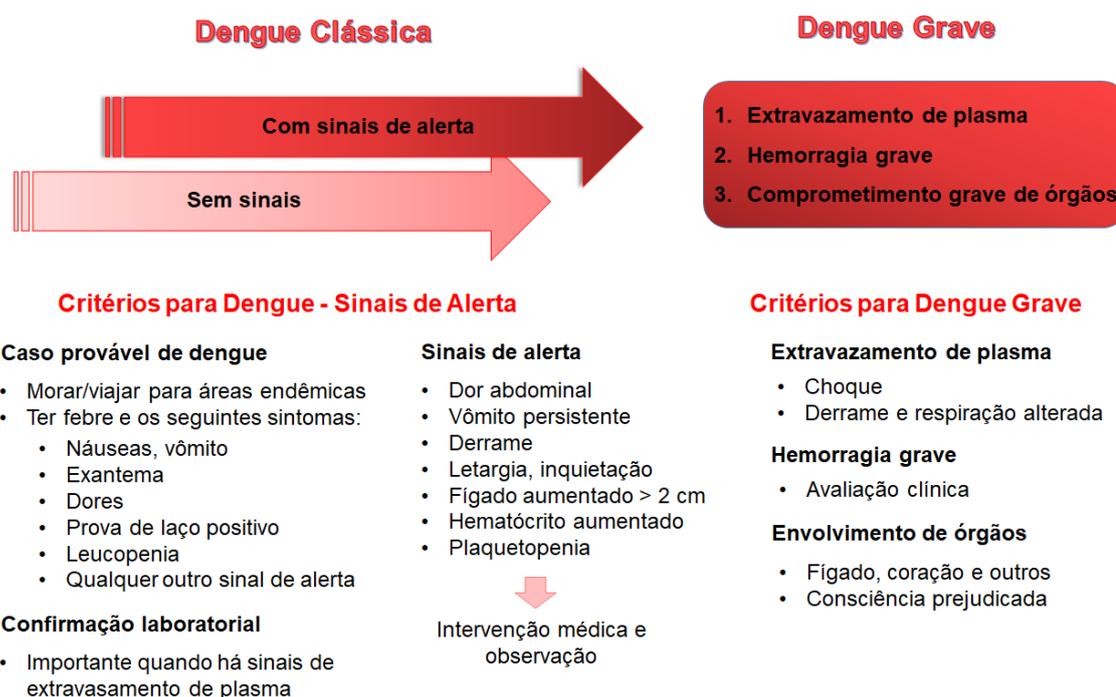
Entre as endemias tropicais, a dengue continua em destaque por ser a arbovirose com maior prevalência e impacto epidemiológico no mundo. Mesmo com um grande número de casos subnotificados, a estimativa é de que 390 milhões de pessoas sejam infectadas pelo dengue, por ano (BHATT et al., 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

O vírus dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae, de RNA de cadeia simples com quatro sorotipos intimamente relacionados: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, classificados de acordo com critérios biológicos, imunológicos e filogenéticos (GUBLER, 1998).

Em 2013, um novo sorotipo (DENV-5) foi identificado a partir exames sorológicos coletados de um paciente hospitalizado no Estado de Sarawak, Malásia. Primeiramente, foi considerado um caso de dengue silvestre de DENV-4. No entanto, com análises de filogenia, confirmou-se a distinção das outras formas virais e que o novo vírus é de fato um novo sorotipo e não uma variante do DENV-4 (MUSTAFA et al., 2015).

A dengue é caracterizada como uma doença febril aguda exantemática, infecciosa e sistêmica (GUBLER, 1998; RENAULT; SOLET; SISSOKO, 2007). A dengue é responsável por altos índices de morbidade e letalidade, com grande contribuição para a perda de anos saudáveis de vida no Brasil, afetando principalmente as faixas etárias extremas (crianças  $\leq 1$  ano e idosos  $\geq 65$  anos) (ARAÚJO et al., 2017).

A dengue tem um amplo espectro de apresentações clínicas, muitas vezes com evolução rápida e resultados clínicos imprevisíveis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). As manifestações clínicas da dengue (Figura 1.6) podem variar entre: Dengue Clássica, a forma mais branda; Dengue Hemorrágica, forma grave e pode ser fatal e; Síndrome do Choque do Dengue, a forma mais severa e de curta duração. Para esta última, o paciente pode ter falência circulatória sanguínea e falecer em 12-24 horas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).



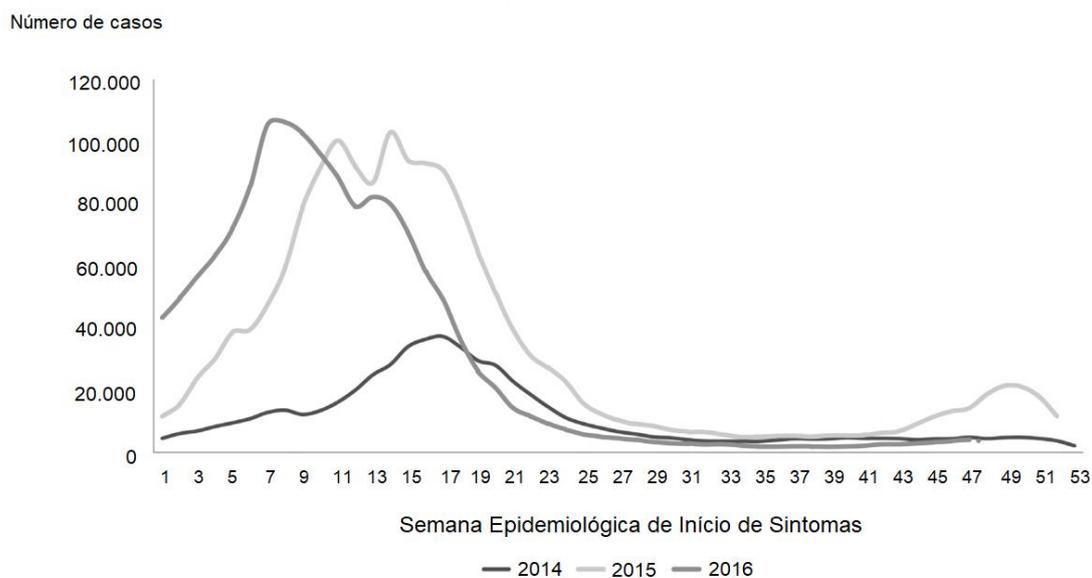
**Figura 1.6:** Classificação dos tipos de dengue e níveis de gravidade, segundo os sintomas clínicos. Fonte: WHO (2009) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009), com adaptações.

Já existe uma vacina contra a dengue, a Dengvaxia - Sanofi-Aventis®, licenciada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), aprovada no

Brasil em dezembro de 2015. A vacina é tetravalente recombinante, de vírus atenuado, e protege contra os quatro sorotipos de DENV. Após a avaliação de ensaios clínicos, no Brasil e nas Filipinas (Ásia), a Organização Mundial da Saúde - OMS alertou sobre o aumento do risco de dengue grave com a aplicação da vacina e recomendou a vacinação para as pessoas que tiveram contato com o vírus anteriormente (BRASIL, 2017a; PANG et al., 2018).

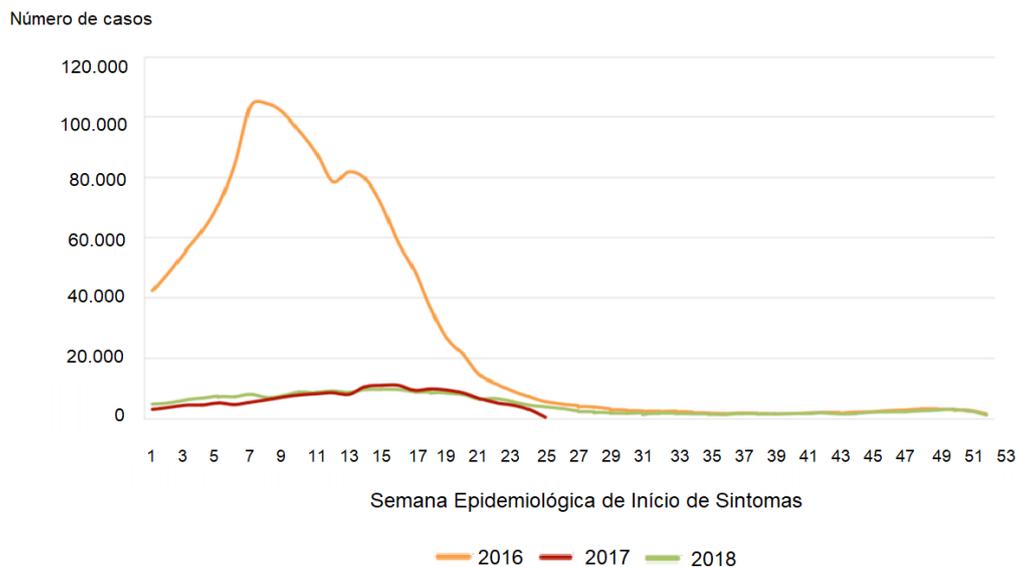
No Brasil, as epidemias acontecem com a circulação simultânea dos quatro sorotipos virais do dengue (NOGUEIRA et al., 2008, 1993), sendo o Rio de Janeiro um dos Estados que tem notificado o maior número de casos de dengue (XAVIER et al., 2017). Foi no Rio de Janeiro que houve a entrada e disseminação dos sorotipos DENV-1 (1986), DENV-2 (1990) e DENV-3 (2000) (33, 34,35). A introdução do DENV-4 ocorreu em Boa Vista (RR), Norte do País, em 1982 (TEMPORÃO et al., 2011).

Em 2015, foram registrados 1.649.008 casos de dengue no país com 863 óbitos. Vale ressaltar que nesse mesmo ano houve o aparecimento de pacientes infectados pelo vírus Zika, com possíveis casos de diagnóstico errado pelo fato da doença apresentar sintomas similares a dengue (HADDOW et al., 2012). A região Sudeste foi a que notificou o maior número de casos (1.026.226) de dengue em relação ao total do país. No Estado do Rio de Janeiro foram notificados 62.669 casos de dengue, 47 do tipo grave e 24 óbitos (BRASIL, 2016). Houve um aumento de 240% em 2015, considerando que em 2014 foram registrados 572.308 casos da doença (BRASIL, 2014a). O ano de 2016 continuou com muitos casos notificados (1.487.924 casos), com a região Sudeste com o maior número de casos prováveis de dengue registrados (855.425 casos) (Figura 1.7).



**Figura 1.7:** Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas no Brasil, nos anos de 2014, 2015 e 2016. Fonte: Brasil (2016) (BRASIL, 2016), com adaptações.

Em 2017 foram registrados 251.711 casos de dengue, sendo a região Nordeste com o maior número de casos notificados (86.110 casos) em relação ao total do país. Em 2018, até a semana epidemiológica (SE) 17 (abril do corrente ano), foram registrados 42.329 casos confirmados de dengue, destes 87 foram casos grave e 41 mortes pela doença. O Centro-Oeste é a região que vem apresentando o maior número de casos prováveis de dengue (40.806 casos), seguida do Sudeste (36.801 casos), Nordeste (21.267 casos), Norte (8.915 casos) e Sul (2.502 casos) (BRASIL, 2018a) (Figura 1.8).



**Figura 1.8:** Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas no Brasil, nos anos de 2016, 2017 e 2018. Fonte: Brasil (2018) (BRASIL, 2018a), com adaptações.

### 1.2.2 Chikungunya

A chikungunya é uma doença febril aguda com sintomas similares aos da dengue, porém associada à manifestações reumatológicas. Geralmente, na chikungunya as febres são acompanhadas por erupções cutâneas, cefaléia, edema articular e conjuntivite. Todavia, o que caracteriza a chikungunya é a poliartralgia, dores intensas e debilitantes nas articulações (CASTRO; LIMA; NASCIMENTO, 2016; SCHILTE, 2013). Este nome, chikungunya, foi atribuído à postura curvada dos pacientes por causa dos sintomas álgicos, decorrente das crises articulares e reumáticas (ROBINSON, 1955).

Um agravante da chikungunya é a prevalência de sintomas persistentes no primeiro ano após a manifestação clínica da doença, com artralgia intermitente, com recuperação e recidiva (CASTRO; LIMA; NASCIMENTO, 2016).

O vírus (CHIKV) é do gênero *Alphavirus*, Família *Togaviridae*, cujo genoma é constituído por uma molécula de RNA de fita simples com aproximadamente 11,8 kb (kilo bases). A partir de análises filogenéticas de sequências virais, foram identificados três genótipos diferentes: o da África

Ocidental, o do Leste/ Centro/ Sul Africano (ESCA) e o Asiático (POWERS et al., 2000).

No Brasil, as linhagens asiática e ESCA circulam no país (RENAULT; SOLET; SISSOKO, 2007; TEIXEIRA et al., 2015), sendo a asiática de maior distribuição (LEPARC-GOFFART et al., 2014). Na epidemia de 2014-2015 no Rio de Janeiro, foi confirmado que o genótipo circulante de CHIKV era o asiático, a partir de análises filogenéticas em amostras de casos importados do Caribe (RENAULT; SOLET; SISSOKO, 2007). Com amostras obtidas durante a epidemia de 2016 (TMA et al., 2018) foi confirmado a circulação do genótipo ECSA.

O vírus CHIKV foi isolado pela primeira vez na Tanzânia, África, em 1952-1953. Em seguida, o arbovírus se espalhou pelos países da África e da Ásia, causando epidemias durante a década de 1960 (PIALOUX et al., 2017). A partir de 2004, países da Europa Mediterrânea, África Central e Ásia foram acometidas por uma pandemia de chikungunya (AMRAOUI; FAILLOUX, 2016; POWERS; LOGUE, 2007). Em 2006, um terço da população da Ilha La Réunion, França, foi infectada pelo vírus CHIKV, causando 237 mortes (RENAULT; SOLET; SISSOKO, 2007).

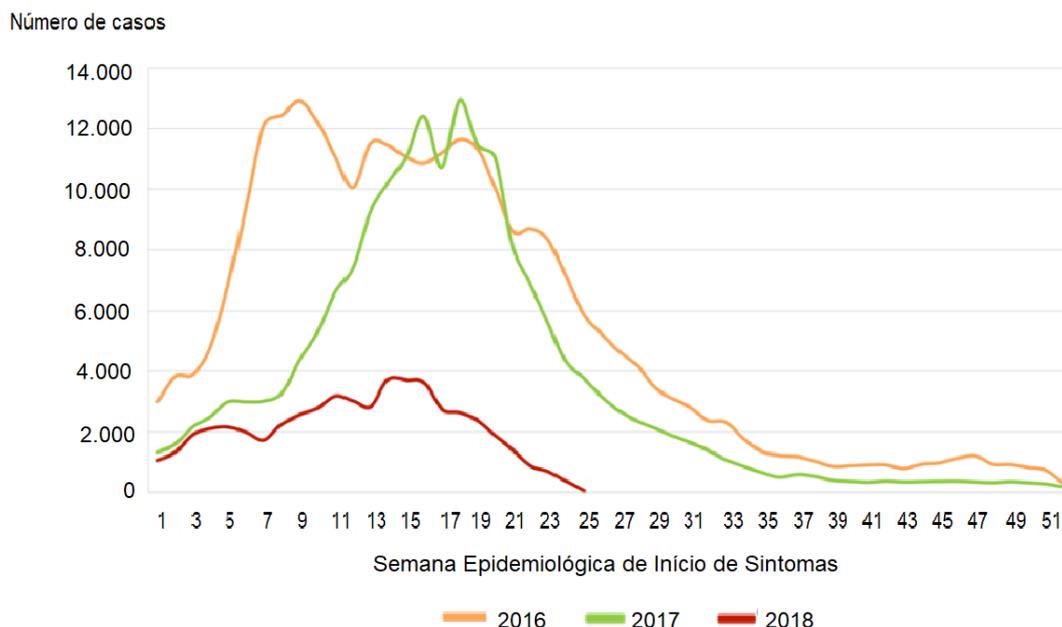
Em 2013, houve o primeiro caso autóctone de CHIKV nas Américas, registrado no Caribe. A partir daí, com a presença de vetores competentes e o intenso fluxo de pessoas em viremia, o vírus se disseminou pelo continente Americano, pelos países da América do Sul como Argentina, Colômbia, Bolívia, Venezuela e Brasil, cujos primeiros casos importados foram registrados a partir de junho de 2014 (CARBAJO; VEZZANI, 2015).

O CHIKV transmitido entre humanos pelos vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Apesar de *Ae. aegypti* ter se destacado como o principal vetor para o ciclo urbano do CHIKV, *Ae. albopictus* também demonstrou alta competência vetorial para a transmissão do CHIKV por apresentar uma substituição de aminoácido alanina por uma valina - A226V - na glicoproteína do envelope E1, presente no genótipo ECSA (*E1-Ala226Val*) (SCHUFFENECKER et al., 2006). A mutação, aumenta a infectividade no intestino médio do mosquito, além de estar associada a uma disseminação viral mais eficiente do intestino médio para órgãos secundários, até as glândulas salivares (TSETSARKIN et al., 2007). Essa

adaptação do CHIKV para *Ae. albopictus* provavelmente contribuiu para sua rápida disseminação pelos continentes (MORRISON, 2014).

Em muitas epidemias ocorridas pelo mundo, *Ae. aegypti* foi considerado o vetor primário na transmissão de CHIKV, sobretudo quando a linhagem asiática circulante era predominante, com a ausência da substituição *E1-A226V* (POWERS; LOGUE, 2007). Ademais, as cepas asiáticas do CHIKV são limitadas em sua capacidade de se adaptar a *Ae. albopictus*, por não apresentarem a mutação (TSETSARKIN et al., 2011). Essa mutação foi detectada durante o surto ocorrido em *La Réunion*, levando a considerar o *Ae. albopictus* como o principal vetor, desempenhando um papel importante nestes e em outras epidemias na região do Oceano Índico e Europa (TSETSARKIN et al., 2007).

Dos casos recentes registrados de febre chikungunya no país em 2016, foram notificados 277.882 casos prováveis. No ano seguinte, em 2017, o total de casos prováveis foi de 185.854, sendo a região Nordeste com o maior número de casos prováveis (142.006 casos) em relação ao total do país. Até a SE 25 (mês de junho) deste ano, 2018, foram registrados 53.089 casos prováveis da doença, com 11 óbitos confirmados em laboratório. A região Sudeste é a que tem mais apresentado número de casos prováveis de chikungunya (28.722 casos) em relação ao total do país. Logo após vem as regiões Centro-Oeste (13.169 casos), Nordeste (6.876 casos), Norte (4.087 casos) e Sul (235 casos) (BRASIL, 2018a) (Figura 1.9).



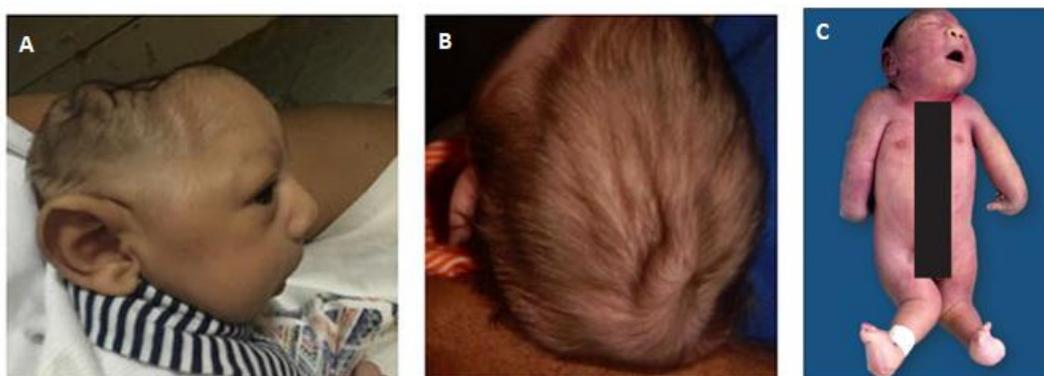
**Figura 1.9:** Casos prováveis de chikungunya, por semana epidemiológica de início de sintomas no Brasil, nos anos de 2016, 2017 e 2018. Fonte: Brasil (2018) (BRASIL, 2018a), com adaptações.

### 1.2.3 Zika

Desde 2015, a Zika tem sido considerado de relevância na saúde pública brasileira, pois um aumento no número de casos de microcefalia em fetos e recém-nascidos foi detectado no país, durante uma epidemia da doença (SCHULER-FACCINI et al., 2016). Os primeiros casos de Zika aconteceram no Nordeste brasileiro, com transmissão autóctone iniciada na Bahia (abril/ 2015), seguida de Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro e São Paulo (BRASIL, 2015). Rapidamente, o vírus se espalhou para o resto do país e para os países vizinhos. Foi nessa mesma região, Nordeste, que houve mais casos notificados de infecção pelo arbovírus e de microcefalia em bebês, confirmados no território nacional (BRASIL, 2017b; FARIA et al., 2017).

A Zika é caracterizada como uma doença febril exantemática aguda, benigna, diferenciada da dengue por apresentar exantema maculopapular pruriginoso e hiperemia conjuntival (SHUAIB et al., 2016; WANG; WANG; AN, 2016).

Além da microcefalia, uma série de malformações congênitas (morfológicas e fisiológicas) que podem afetar o desenvolvimento do recém-nascido já foram relatadas, por ex.: anomalias cerebrais, desproporção craniofacial, artrogripose (malformação das articulações causado por contraturas musculares), convulsões, irritabilidade e anormalidades auditivas e oculares, o que levou ao conjunto de sintomas observados em bebês que foram expostos ao vírus Zika ainda no útero materno, sendo chamado de Síndrome Congênita do Zika (SCZ) (MOORE et al., 2017; RIBEIRO et al., 2017; SHUAIB et al., 2016) (Figura 1.10).



**Figura 1.10:** Exemplos de malformações decorrentes da Síndrome Congênita do Zika. (A, B) Neonatos com malformações craniofaciais e microcefalia; (C) Natimorto com microcefalia e contraturas de membros superiores e inferiores: artrogripose. Fonte das imagens: (MARTINES et al., 2016; MOORE et al., 2017).

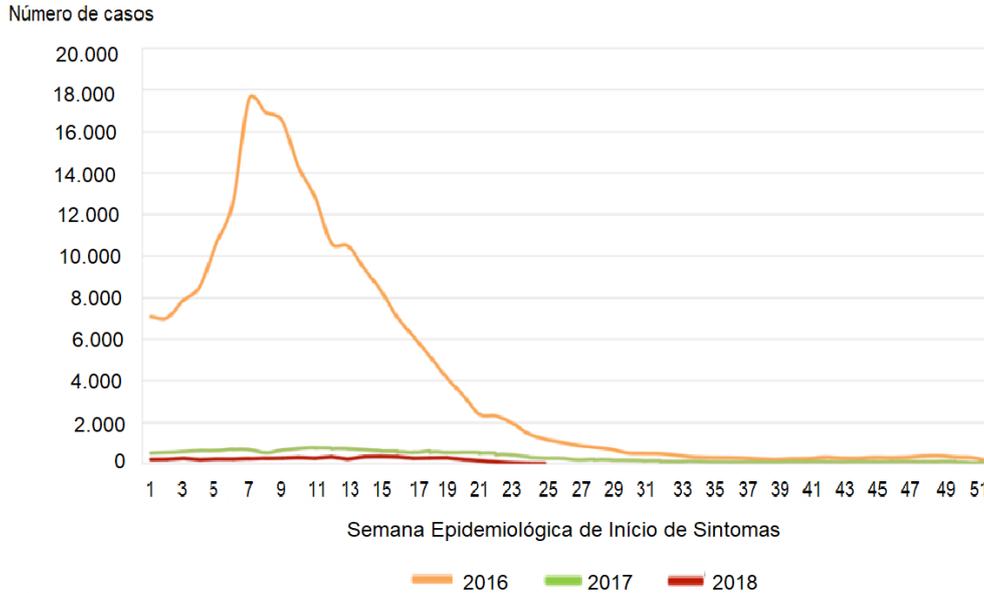
Além desse agravamento, houve um aumento nos casos de pacientes com distúrbios neurológicos característicos de Síndrome de Guillain-Barré (SGB), notificados após o desenvolvimento do quadro clínico da infecção por ZIKV, desde o final de 2013, na Polinésia Francesa (CAO-LORMEAU et al., 2016). Em julho de 2015, os primeiros casos de SGB foram sinalizados no Brasil (DE ARAÚJO et al., 2016).

O vírus do Zika (ZIKAV) é classificado no gênero *Flavivirus*, Família *Flaviviridae*, composto por RNA de cadeia única, com um genoma de 10,7 kb com três linhagens principais: leste-africana, oeste-africana ou asiática (FAYE et al., 2014; MUSO; GUBLER, 2014). A partir de análises filogenéticas da região codificadora do ZIKV, coletadas durante a epidemia de 2015, Faria et al (2017) identificaram que a linhagem de ZIKV circulante no Brasil é do genótipo asiático,

que compartilham um ancestral comum com a cepa que circulou na Polinésia Francesa, em novembro de 2013.

Foi identificado pela primeira vez na floresta Zika em Uganda, África, em 1947, isolado de macacos *Rhesus* utilizados como sentinelas durante a vigilância de febre amarela silvestre. Em humanos, foi relatado previamente em 1954 na Nigéria e isolado em *Ae. aegypti* na Malásia em 1969 pela primeira vez (MUSO; GUBLER, 2014). No Brasil, a entrada do ZIKV foi primeiramente relacionada à Copa do Mundo de 2014 (ZANLUCA et al., 2015). Em seguida, a versão foi que a entrada do ZIKV tenha sido através do Campeonato Mundial de Canoagem de Primavera em 2014, realizada no Rio de Janeiro (MUSSO, 2015), onde muitos atletas polinésios participaram. No entanto, Massad et al. (2017) concluíram que o ZIKV foi provavelmente introduzido e estabelecido no Brasil antes dos dois eventos esportivos descritos acima, através de pessoas que chegaram infectadas da Polinésia Francesa, entre outubro de 2013 e março de 2014.

No Rio de Janeiro, os casos iniciaram-se entre janeiro de 2015, com pico de transmissão em maio do mesmo ano (BRASIL, 2016). Em 2016, foram registrados 216.207 casos de Zika em todo País com oito falecimentos, sendo quatro no Rio de Janeiro (BRASIL, 2017b). Em 2017 foram notificados 17.594 casos da doença, com uma morte no estado de Rondônia. Até a SE 25 de 2018 foram registrados 5.401 casos prováveis e dois óbitos nos Estados de Alagoas e Paraíba. O Sudeste tem apresentado o maior número de casos prováveis (2.049 casos), seguido do Nordeste (1.287 casos), Centro-Oeste (1.266 casos), Norte (768 casos) e Sul (31 casos) (BRASIL, 2018a) (Figura 1.11).



**Figura 1.11:** Casos prováveis de Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas no Brasil, nos anos de 2016, 2017 e 2018. Fonte: (BRASIL, 2018a), com adaptações.

No Brasil, o ZIKV tem como principal vetor *Ae. aegypti*. No entanto, foram detectados RNA do ZIKV em mosquitos adultos de *Ae. albopictus* na Bahia (CHELSEA et al., 2017).

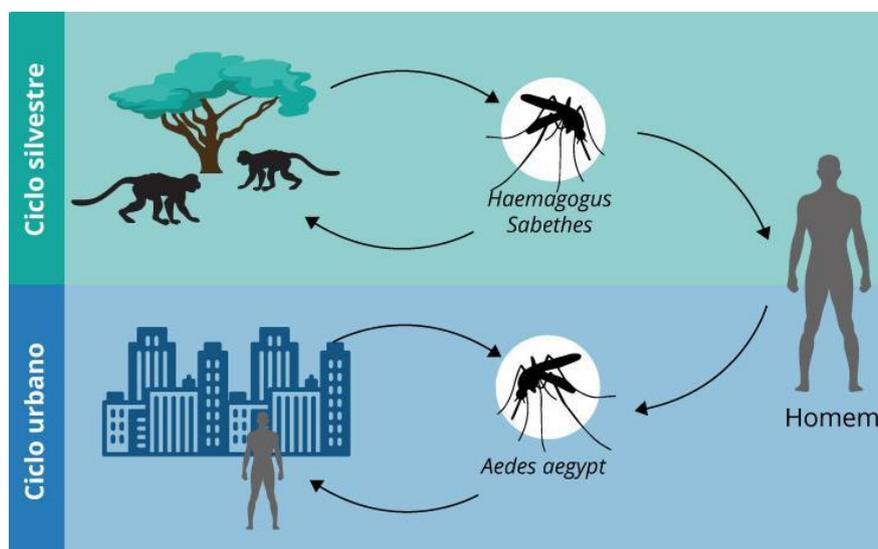
Apesar de suscetíveis à infecção pelo ZIKV, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* apresentam competência vetorial diferentes para ZIKV, sendo o *Ae. aegypti* mais competente que *Ae. albopictus*, em diferentes populações dos mosquitos avaliadas (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016; LIU et al., 2017; RYCKEBUSCH et al., 2017). A elevada transmissão de ZIKV no Brasil pode ser devido ao grande número de pessoas suscetíveis ao vírus (CHOUIN-CARNEIRO et al., 2016).

#### 1.2.4 Febre Amarela

A febre amarela (FA) é uma doença infecciosa aguda e febril (HERVÉ et al., 1986), associada a icterícia. Pode se manifestar de forma leve e grave. Cerca de 50% dos casos evoluem para as formas graves, com síndromes de falência hepática e renal (BONALDO et al., 2017; BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007).

O vírus da febre amarela (YFV) é do gênero *Flavivirus*, Família Flaviviridae, derivado de *Flavus* que significa amarelo, em latim. O YFV composto por RNA de aproximadamente 11 kb. Estudos filogenéticos têm evidenciado sete genótipos do YFV, sendo cinco na África e dois nas Américas, classificados em América do Sul I e II (BONALDO et al., 2017). Acredita-se que os genótipos americanos do YFV são derivados de um ancestral de linhagem da África Ocidental, que divergiram na época do tráfico de escravos (BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007).

A FA tem dois ciclos epidemiológicos: o urbano e silvestre, como ilustrado na Figura 1.12, com os mesmos aspectos etiológico, clínico, imunológico e fisiopatológico, em ambos os ciclos (CAVALCANTE et al., 2017), mas diferente quanto à natureza dos mosquitos transmissores e dos hospedeiros vertebrados. No ciclo urbano, a FA é classificada como antroponose, pois o hospedeiro amplificador do vírus é o próprio homem. O principal vetor da FA nas Américas e África é o *Ae. aegypti*. Já no ciclo silvestre, a FA é classificada como zoonose, sendo o macaco o hospedeiro amplificador do vírus. Os vetores da FA silvestre são mosquitos de floresta dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* nas Américas e, *Aedes* na África (HERVÉ et al., 1986).



**Figura 1.12:** Ciclo urbano e silvestre da Febre Amarela Fonte: Portal Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017c).

Casos de FA urbana não são reportados no país desde 1942, sendo os últimos casos reportados no Acre e no Rio de Janeiro, em 1928-1929. Isso foi devido à vacinação extensiva contra o vírus em áreas de risco, produzida pelo Instituto Oswaldo Cruz – IOC/Fiocruz no Rio de Janeiro desde 1937. A estratégia nacional de controle da febre amarela tem sido a vacinação em massa de pessoas que vivem em áreas onde o vírus circula (MASSAD et al., 2005). A partir de 1994, a vacina foi integrada ao calendário básico de vacinação pública, pelo Ministério da Saúde e a partir de 2018 é dada em todo país (BRASIL, 2018b).

No entanto, o Brasil não está totalmente livre do vírus YFV. Ocorrências do ciclo silvestre de febre amarela acontecem, mesmo com poucos casos notificados, nas regiões antes classificadas como endêmicas (Norte, Centro-Oeste e Maranhão, no Nordeste) e, nos Estados classificadas como áreas de epizootias (parte do Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Paraná). Nos demais Estados brasileiros e na outra parte dos Estados citados como áreas de epizootias, eram considerados regiões indenes de febre amarela (COUTO-LIMA et al., 2017; VASCONCELOS, 2002). Os surtos de epizootias de febre amarela aconteciam com intervalo de cinco a sete anos, tempo provável para o surgimento de novas gerações de símios susceptíveis (VASCONCELOS, 2010).

Desde o final dos anos 1990, o vírus YFV se espalhou, atingindo as regiões Sudeste e Sul do país. Esse fato foi preocupante, tendo em vista a baixa cobertura de pessoas vacinadas contra o vírus YFV nas áreas indenes de febre amarela (BRASIL, 2015) o que poderia favorecer o risco da reurbanização da FA no Brasil. Além do mais, as cidades brasileiras estão altamente infestadas pelo vetor urbano, o *Ae. aegypti*, e também por *Ae. albopictus*, susceptível ao vírus YFV. Portanto, *Ae. albopictus* é considerado um possível elo entre o ciclo silvestre e o meio urbano (VASCONCELOS, 2002).

Entre os anos 2000 e 2010, a FA teve sua re-emergência em regiões brasileiras antes consideradas livres do vírus por décadas, fora da área de transição endêmica do vírus, como na região Amazônica, por exemplo. Com isso, localidades onde a vacinação não era preconizada foram incluídas no mapa de risco da FA, revisado a partir de 2010 (ROMANO et al., 2011).

Recentemente, desde o final de 2016, o Brasil vive um dos maiores surtos de FA silvestre da sua história, com ocorrência de casos fatais de macacos e humanos. Os Estados mais afetados foram da região Sudeste, como Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (CAVALCANTE et al., 2017), zonas anteriormente consideradas livres do vírus YFV por mais de 70 anos (COUTO-LIMA et al., 2017).

Segundo o monitoramento epidemiológico da FA no Brasil, até junho de 2018 foram notificados 3.073 casos de epizootias em primatas não-humanos, sendo o Estado de São Paulo com o maior número de casos registrados, seguido de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Mato Grosso (BRASIL, 2018c).

Segundo o Ministério da Saúde (Fev/2018), de julho de 2016 até fevereiro de 2017, foram notificados 509 casos confirmados de FA e 159 óbitos no Brasil (BRASIL, 2017c). No Estado do Rio de Janeiro, de março a dezembro de 2017, 27 casos de FA confirmados, sendo nove óbitos (BRASIL, 2018d). E, de julho de 2017 a fevereiro deste ano, 2018, foram confirmados 353 casos e 98 óbitos (BRASIL, 2018a), sendo o município de Angra dos Reis com o maior número de casos notificados (57) e mortes (12), seguido de Valença (40 casos e seis óbitos) e Teresópolis (23 casos e oito óbitos), segundo a Subsecretaria de Vigilância em Saúde da Secretaria de Estado de Saúde (GOVERNO DO RIO DE JANEIRO, 2018a).

Diante disso, para reduzir o risco de reurbanização da FA, desde abril de 2017 a vacina tem sido recomendada em todos os 92 municípios do Estado (GOVERNO DO RIO DE JANEIRO, 2018b).

### **1.3 Vigilância entomológica e controle vetorial**

A vigilância entomológica constitui um fator indispensável para o controle das doenças causadas pelos patógenos transmitidos por vetores. Para tanto, é importante, entre outros, o conhecimento das densidades populacionais do vetor (espacial e temporal) para mensurar seu grau de infestação e quantificar os componentes da cadeia de transmissão da doença (GOMES, 2002).

As ações de controle ao *Ae. aegypti* no Brasil remontam ao início do século XX, devido às grandes epidemias de febre amarela urbana que aconteciam naquele momento. Entre as décadas de 1930 e 1940, várias campanhas de erradicação de *Ae. aegypti* nas Américas foram realizadas. Em 1955, o *Ae. aegypti* foi considerado erradicado no Brasil. Contudo, com a descontinuidade das ações de vigilância e controle entomológico, em 1967 foi confirmada a reintrodução do *Ae. aegypti* no país. Novamente, em 1973, o *Ae. aegypti* foi considerado erradicado, porém a mesma falha na vigilância epidemiológica resultou em sua reinfestação apenas três anos depois, em 1976 (BRAGA; VALLE, 2007a).

Desde então, grandes campanhas de saúde pública buscam minimizar as enfermidades relacionadas a esse vetor, as quais atualmente envolvem vários arbovírus, como DENV, ZIKV, CHIKV e YFV.

Já em 1996, o Ministério da Saúde implementou o Plano de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa) devido a ocorrência de casos graves de dengue hemorrágica. Foi um programa estratificado em diversos segmentos, relacionados a vigilância epidemiológica, saneamento, suporte laboratorial e treinamento de pessoas. Pelo insucesso no controle da infestação e no controle de casos de dengue, em 2001 foi implantado o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD), institucionalizado pelo Ministério da Saúde, em parceria com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Ao mesmo tempo, a meta de erradicação do vetor *Ae. aegypti* já estava sendo abandonada, direcionando o foco para o controle do mosquito. O plano teve três pressupostos principais: universalidade regional, sincronicidade e continuidade das ações, as quais já haviam sido desenvolvidas anteriormente. O objetivo foi focalizar nos municípios prioritários, com maior transmissão do vírus, com população  $\geq 50$  mil habitantes e aqueles considerados receptivos a introdução de novos sorotipos de dengue.

Em 2002, uma nova versão do programa, em um âmbito federal, foi instituída como Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), ainda vigente. O objetivo principal do PNCD foi centralizado em três componentes fundamentais: 1) redução da infestação de *Ae. aegypti*; 2) redução da incidência da dengue e 3) redução da letalidade por dengue hemorrágica (BRASIL, 2002).

O PNCD continuou com o foco nos municípios prioritários, visando a melhoria de alguns aspectos na estrutura do controle vetorial brasileiro, como: a) elaboração de programas permanentes e executados de forma continuada; b) produção de campanhas de informação e mobilização da população; c) fortalecimento da vigilância epidemiológica e entomológica para melhorar a detecção precoce de surtos da doença; d) melhoria da qualidade do trabalho de campo de combate ao vetor; e) integração das ações de controle da dengue na atenção básica; f) utilização de instrumentos legais que facilitem o trabalho do poder público na eliminação de criadouros em imóveis abandonados e, g) desenvolvimento de instrumentos mais eficazes de acompanhamento e supervisão das ações desenvolvidas pelo Ministério da Saúde, estados e municípios (BRASIL, 2002).

Para monitorar a densidade de *Ae. aegypti*, o PNCD recomenda a visita domiciliar “casa a casa” para a pesquisa larvária, que consiste na inspeção de depósitos, os quais são potenciais criadouros de reprodução do vetor. Os depósitos positivos para formas imaturas de *Ae. aegypti* recebem o tratamento indicado conforme sua classificação, podendo ser por controle físico, biológico ou químico com larvicida, como explicado mais a seguir.

As atividades de vistoria dos domicílios são realizadas por Agentes de Vigilância em Saúde (AVS) que, em cada imóvel vistoriado, identificam os depósitos positivos para larvas de *Aedes* e coletam as amostras para posteriormente identificá-las. Índices entomológicos, como índices de infestação predial (IIP), índices de Breteau (IB) e índice de tipos de recipientes (ITR) são calculados a partir dos dados coletados em campo para estimar o grau de infestação das formas imaturas e os tipos de recipiente prevalentes. O IIP corresponde ao percentual de imóveis positivos para larvas de *Ae. aegypti* entre os domicílios examinados. O IB estabelece a relação entre recipientes positivos e imóveis vistoriados, sendo quantificado pela quantidade total de recipientes contendo larvas de *Ae. aegypti* em cada 100 imóveis e o ITR indica a proporção de recipientes positivos por tipo de criadouro (BRASIL, 2009).

Esses índices são utilizados como indicadores entomológicos no Levantamento de Índice Rápido para *Aedes aegypti* (LIRAA). As áreas vistoriadas são escolhidas aleatoriamente por sorteio de quarteirão e o ciclo

dessas ações acontece bimestralmente. A avaliação é baseada no IIP, cuja classificação é IIP <1% - baixo ou satisfatório,  $1 \leq \text{IIP} \leq 3.9\%$  – estágio de alerta e IIP >3.9% - considerado situação de risco para epidemia de arboviroses (BRASIL, 2009). O levantamento na maioria dos municípios brasileiros e no Rio de Janeiro é realizado a cada três meses, totalizando quatro LIRAA anuais. No município, o monitoramento do vetor é também realizado com o auxílio de armadilhas para ovos (ovitrampas), as quais tem sido caracterizada como a alternativa mais sensível e econômica no monitoramento de *Aedes*, em relação à pesquisa larvária e à pesquisa com armadilhas para adultos (BRAGA et al., 2000; CODEÇO et al., 2015; HONÓRIO et al., 2009a).

O PNCD preconiza o controle integrado, uma estratégia combinada de metodologias, com o intuito de melhorar a eficácia, o custo-benefício e a integridade ecológica no processo de controle dos vetores. A abordagem deve ser utilizada de forma racional e prática, para ser também adotada pelas comunidades (BRASIL, 2009; DONALÍSIO; GLASSER, 2002). Este tipo de controle visa principalmente a utilização de medidas de educação sanitária e manejo ambiental, incluindo a mobilização dos moradores.

As medidas de controle vetorial podem ser direcionadas contra as formas imaturas e/ou adultas, cujos métodos podem ser classificados em:

### **1.3.1 Controle físico**

É também chamado de controle mecânico, é o mais indicado e eficiente dentre os demais tipos de controle, pois se trata de identificar e eliminar os possíveis criadouros dos mosquitos, evitando assim a continuidade do ciclo de vida.

O controle mecânico é baseado em intervenções diretas de acordo com a classificação dos depósitos positivos ou que podem ainda tornar-se positivos para larvas de *Aedes*. Essas intervenções são baseadas nas Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue (BRASIL, 2009), com o objetivo de priorizar a eliminação do reservatório, usando o larvicida só em situações que a eliminação não é possível. Os métodos de controle mecânico utilizados são: eliminação e/ ou destinação adequada dos

depósitos (ex. lixos e pneus), colocação de areia (ex. vasos de plantas), colocação de telas (ex. caixas d'água, ralos, portas e janelas), drenagem de água acumulada (ex. calhas). Quando se trata de criadouros naturais, a ação preconizada é a remoção desses criadouros, se possível (BRASIL, 2009; ZARA et al., 2016).

O controle mecânico é considerado a melhor opção em longo prazo e requer a participação da população, pois sendo realizada continuamente, reduz ou torna desnecessário o uso de outros métodos de controle (BRAGA; VALLE, 2007b).

### 1.3.2 Controle biológico

O controle biológico é o conjunto de medidas que utiliza outros organismos para controlar e/ ou reduzir as populações de vetores. O controle biológico e o controle físico são os mais indicados pois evitam o uso indiscriminado de inseticidas.

O controle biológico baseia-se na utilização de predadores naturais ou patógenos diretamente nas formas imaturas do mosquito. Os predadores podem ser invertebrados aquáticos e peixes, como alguns exemplos a seguir:

a) *Toxorhynchites* (Culicidae): um gênero de mosquito não hematófago, que coexiste e compartilha o mesmo habitat no ecossistema aquático de *Aedes*. As larvas de *Aedes* são rapidamente predadas na superfície ou no fundo do recipiente (COLLINS; BLACKWELL, 2014);

b) Copépodos, ordem Cyclopoida: o gênero que se destaca é *Mesocyclops*. São crustáceos que se alimentam das larvas recém-eclodidas de mosquitos. Os copépodos têm potencial operacional fácil e barato, de produção em massa e no mesmo reservatório que as larvas de *Aedes* (MARTEN; REID, 2007);

c) Peixes larvófagos: *Gambusia affinis* e *Poecilia reticulata* (popularmente conhecido por “barrigudinhos”) são as espécies mais utilizadas no controle de mosquitos (BRAGA; VALLE, 2007b). Ambas espécies, *Gambusia affinis* e *Poecilia reticulata*, são da Família Poeciliidae e são fáceis de criar, visto que vivem em tanques de água com pouca oxigenação. São peixes vorazes,

pois engolem rapidamente as larvas de mosquito em qualquer estágio. *G. affinis* é o mais voraz, pois consome de 100 a 300 larvas/dia, enquanto *P. reticulata* consome de 80 a 100 larvas/dia (SARWAR, 2015). Um peixe bastante popular, o “Beta” (*Betta splendens*) tem se mostrado adequado para o controle biológico de larvas de *Ae. aegypti*, até mesmo em grandes recipientes de água (LIMA; GO, 2010).

Como medidas de controle biológico, também é utilizado moléculas e micro-organismos para a eliminação e controle de larvas de *Ae. aegypti*, como abaixo:

d) *Bti*: Bactérias entomopatogênicas como *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*Bti*) ainda são usado no controle de *Ae. aegypti* e foram introduzidas pelo Ministério da Saúde em algumas localidades que apresentavam resistência ao temephos, como no Estado do Rio de Janeiro, desde 2001 (LIMA; MELO; VALLE, 2005). A bactéria produz cristais paraesporais compostas por protoxinas (proteínas da família Cry e Cyt, também chamadas de  $\delta$ -endotoxinas) durante a fase de esporulação (SCHNEPF et al., 1998). Após ingestão e solubilização dos cristais em meio alcalino no intestino das larvas, ocorre ativação proteolítica das protoxinas em toxinas, as quais são hidrolisadas por proteases intestinais, levando à degradação do intestino e à morte do mosquito (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; LACEY, 2007). Apesar de eficiente no combate as larvas de *Ae. aegypti*, o efeito residual das formulações de *Bti* é muito baixo, variando entre 2 a 4 semanas, necessitando ser reaplicado, o que limita seu uso em campo (BOYCE et al., 2013; LIMA; MELO; VALLE, 2005);

e) Espinosinas: O biolarvicida spinosad é atualmente uma alternativa preconizada pelo Ministério da Saúde para o controle de larvas de *Ae. aegypti*. É produzido durante a fermentação aeróbica de um actinomiceto de solo, *Sacharopolyspora spinosa* (MERTZ; YAO, 2018). No total, são produzidas nove spinosinas (A-H e J), porém as que possuem maior atividade inseticida são as A e D. Este inseticida atua primariamente nos receptores nicotínicos de acetilcolina e, secundariamente, nos receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (PÉREZ et al., 2007);

f) Fungos entomopatogênicos: *Lagenidium giganteum* e *Metarhizium anisopliae* são as principais espécies de fungos utilizadas no controle de larvas de *Ae. aegypti*. *L. giganteum* é o único fungo que é produzido comercialmente como agente de controle de mosquitos, pois uma única aplicação é necessária por estação, ou seja, seu efeito residual é prolongado. Há indícios de que os oósporos (esporos sexuados) podem hibernar, iniciando as epizootias na estação seguinte. O uso de *L. giganteum* chega a ser 100% eficaz quando as larvas são muito jovens (SCHOLTE et al., 2004). *M. anisopliae* tem algumas cepas muito virulentas contra larvas de mosquito. As toxinas causam degeneração dos tecidos, desidratação das células por perda de fluidos e morte das larvas. Se as condições forem apropriadas, os conidióforos (corpo vegetativo do fungo) crescem através da cutícula e cobrem todo o corpo da larva. Também são capazes de penetrar no sifão respiratório, bloqueando a respiração e, conseqüentemente, levando à morte da larva (SCHOLTE et al., 2004).

g) *Wolbachia*: Bactérias do gênero *Wolbachia*, da Ordem Rickettsiales, são organismos gram-negativos, endossimbiontes intracelulares (WERREN; BALDO; CLARK, 2008), naturalmente encontrados em cerca de 60% dos insetos terrestres e 52% dos insetos aquáticos (HILGENBOECKER et al., 2008; SAZAMA et al., 2017). *Wolbachia pipientis* foi pela primeira vez observada naturalmente nos tecidos reprodutivos do mosquito *Culex pipiens*. A partir de cruzamentos entre mosquitos infectados com *Wolbachia* e os não infectados, descobriu-se o fator de incompatibilidade, herdado através das fêmeas dos mosquitos, chamada de incompatibilidade citoplasmática (IC). As fêmeas com *Wolbachia*, independente de cruzar com machos infectados com *Wolbachia* ou não infectados, sempre geram descendentes com a bactéria. E, quando as fêmeas sem *Wolbachia* se acasalam com machos com a *Wolbachia*, os óvulos fertilizados morrem, não gerando descendentes (SINKINS, 2004). Em *Ae. aegypti*, a *Wolbachia* não é encontrada naturalmente infectando o vetor. No entanto, cepas da bactéria como por exemplo as cepas *wMelPop* e *wMel* (originárias e isoladas da mosca *Drosophila melanogaster*), são introduzidas em *Ae. aegypti* por transinfecção, com o intuito de ser utilizada no controle dos arbovírus, interferindo no desenvolvimento e na disseminação dos arbovírus

DENV, CHIKV, YFV e ZIKV no hospedeiro vetor (DUTRA et al., 2016a; HURK et al., 2012; MOREIRA et al., 2009). Em contrapartida, algumas cepas de *Wolbachia* comprometem o *fitness* do mosquito (DUTRA et al., 2016b; YEAP et al., 2014). No Brasil e em vários outros países, o uso de *Wolbachia* como controle de arbovírus é realizada de modo autossustentável, projeto integrado no programa “Eliminar a Dengue” – *Eliminate dengue: our challenge* (WORLD MOSQUITO PROGRAM, 2018). Essa estratégia é realizada pela substituição da população natural de *Ae. aegypti* pela população do vetor infectado com *Wolbachia*. A substituição ocorre através da liberação de mosquitos adultos fêmeas e machos em campo, mediante a transmissão da bactéria pela fêmea de *Ae. aegypti* para a prole, de acordo com a vantagem reprodutiva de incompatibilidade citoplasmática. Por esse motivo, o método torna-se autossustentável, uma vez que naturalmente a *Wolbachia* vai se perpetuar nas gerações futuras dos mosquitos (GARCIA et al., 2016; HOFFMANN et al., 2011).

### 1.3.3 Controle químico

A base do controle químico de vetores é por meio de inseticidas, de origem orgânica e inorgânica, os quais podem ser utilizados tanto nas formas imaturas quanto nos mosquitos adultos. O Brasil tem destaque como um dos maiores consumidores de inseticidas, principalmente na agricultura (PIGNATI et al., 2017; RIGOTTO; ROCHA; ROCHA, 2014). Há várias décadas, o controle químico tem sido a estratégia mais empregada para suprimir populações de vetores durante campanhas de saúde pública contra doenças como dengue, malária, leishmaniose e doença de Chagas (VAN DEN BERG et al., 2012).

Os inseticidas são classificados de acordo com o grupo químico ao qual pertencem, como organoclorados (OC), carbamatos (CA), organofosforados (OP) e piretroides (PI) e de acordo com o modo de ação no organismo do inseto. São ainda classificados como: de primeira geração, compostos que atuam no aparelho digestivo, como por exemplo o arsênico; de segunda geração, inseticidas de contato, como por exemplo os neurotóxicos e, de terceira geração, compostos de ação fisiológica, como por exemplo reguladores de crescimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

O uso de inseticidas no controle químico de pragas é secular. Existe datações de até 1000 a.C., da utilização de produtos químicos naturais na luta contra insetos. No decorrer da história da humanidade, outros compostos naturais foram surgindo, como arsênio, arseniato de chumbo, verde-paris, entre outros (OBEREMOK et al., 2015).

Em 1874, o químico austríaco Othmar Tseidle sintetizou pela primeira vez o inseticida químico mais reconhecido no controle de pragas e extremamente eficiente, o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano). Porém, suas propriedades e eficiência só foram reconhecidas em 1939, pelo químico suíço Paul Müller. Em 1948, Paul Müller ganhou o Prêmio Nobel de Medicina “pela descoberta da alta eficiência do DDT como veneno de contato” (DAVIES et al., 2007; OBEREMOK et al., 2015).

O DDT foi amplamente utilizado durante a Segunda Guerra Mundial, para combater a tifo transmitida por piolhos e a malária transmitida pelo *Anopheles*. Foi um período conhecido como “era química”, marcante e inovadora, dando início ao emprego de inseticidas sintéticos orgânicos (WARE; WHITACRE, 2004; ZUBRIN, 2012). O DDT é um inseticida neurotóxico, da classe dos organoclorados que contém cloro em sua composição, caracterizado pela sua alta persistência e estabilidade no ambiente, o que favoreceu seu uso por muitos anos (ROZENDAAL, 1997). No Brasil, o DDT foi usado intensivamente durante os anos de 1960 no controle de vetores como o *Aedes*, *Anopheles* e *Lutzomyia* (flebotomíneos transmissores de *Leishmania* causadores de leishmaniose) (OLIVEIRA FILHO, 1999), contribuindo significativamente para a erradicação de *Ae. aegypti* no Brasil pela primeira vez (1965). Após os anos de 1970 começou a ser evitado por causa do aparecimento de problemas ambientais, afetando ecossistemas aquáticos e aves e, ao acúmulo em tecidos do organismo de animais e de humanos (BRAGA; VALLE, 2007a; D’AMATO; TORRES; MALM, 2002). No Brasil, o uso na agricultura foi proibido em 1985 e, em 1998, seu emprego foi proibido em campanhas de saúde pública (GUIMARÃES; ASMUS; MEYER, 2007; ROBERTS; TREN, 2010). Proteínas do canal de sódio dependente de voltagem (Nav) são as moléculas alvo do DDT. Quando em contato com o inseticida, essas moléculas mudam de conformação e mantêm-se abertas, mesmo mecanismo de ação dos piretroides. Os organoclorados, dos

subgrupos ciclodienos e dos policloroterpenos, tem como mecanismos de ação os receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) (WARE; WHITACRE, 2004).

Como sucessores dos organoclorados, outras classes de moléculas foram surgindo que agem diretamente no sistema nervoso central dos mosquitos, com diferenças em relação ao sítio de ligação e a forma de atuação no organismo do inseto (BRAGA; VALLE, 2007b) como os organofosforados, carbamatos e piretroides.

Os OPs (derivados do ácido fosfórico) foram introduzidos na rotina do controle de *Ae. aegypti* em 1967, com o uso prolongado e interrompido do temephos como larvicida por mais de 30 anos. Essa classe de inseticidas continua sendo utilizada pelos programas de controle de vetores adultos no Brasil (BRASIL, 2014b).

O grupo dos carbamatos (derivados do ácido carbâmico) tem curto tempo residual e ação letal rápida sobre os insetos (BRAGA; VALLE, 2007b). São inseticidas com baixa toxicidade em mamíferos e atingem uma ampla variedade. Os CA agem no mesmo sítio alvo que os OPs, inibindo a acetilcolinesterase nas sinapses neuronais. No entanto, a inibição da acetilcolinesterase pode ser reversível (WARE; WHITACRE, 2004). Os inseticidas propoxur e bendiocard são atualmente recomendados pela OMS para aplicação residual para controle dos vetores da malária, de doença de Chagas e das leishmanioses. Para o controle do *Ae. aegypti*, o bendiocard é recomendado para tratamento perifocal em pontos estratégicos (BRASIL, 2014c).

A classe dos PI como deltametrina, cipermetrina e permetrina também foi amplamente empregada através de aplicação espacial para controlar vetores adultos (BRAGA; VALLE, 2007b). Com a disseminação da resistência ao PI no Brasil em 2009, o PNCD recomendou a troca de PI pelo malathion (OP) em campanhas de bloqueio ao mosquito adulto, que permanece até hoje nas diretrizes de controle dos mosquitos (BRASIL, 2012).

Tendo em vista a resistência aos principais grupos de inseticidas utilizados pelos programas de controle de vetores no Brasil, como OP e PI, novas alternativas têm sido empregadas como ferramentas de controle químico. Assim, outros larvicidas recomendados pela OMS para uso em água potável começaram a ser utilizados para combater as formas imaturas do vetor, como os

Reguladores de Crescimento em Insetos, do termo em inglês *Insect Growth Regulator* – IGRs.

Os IGRs atuam diretamente no sistema endócrino do inseto, retardando ou inibindo a metamorfose. Os IGRs não têm efeito letal imediato como os demais inseticidas químicos, o que resulta na maior demanda de tempo para reduzir populações (ROZENDAAL, 1997). Os IGRs são hormônios sintéticos, análogos aos hormônios naturais dos insetos, os quais atuam nas células de várias maneiras, dependendo da sua constituição química, classificados em:

a) Análogos de hormônios juvenis: também chamado de inseticida juvenóide, atuam sobre o inseto de forma idêntica ao hormônio juvenil interferindo no desenvolvimento das características adultas, como por exemplo, na pupação, na formação das asas, na maturação dos órgãos reprodutivos e até no comportamento (CHAMBERLAIN, 1975). Esses compostos inibem a liberação do hormônio protoracicotrópico (PTTH) no cérebro, resultando na desativação da glândula protorácica e na inibição da secreção da ecdisona, hormônio indutor da muda (CHAPMAN, 2013). São exemplos de análogos de hormônios juvenis os inseticidas pyriproxyfen, fenoxicarb e methoprene.

b) Inibidores da síntese de quitina: atuam diretamente na inibição ou interferência dos processos relacionados ao metabolismo da quitina (CHAMBERLAIN, 1975). A quitina é um polissacarídeo e um dos componentes mais importantes do exoesqueleto dos artrópodes relacionado com a proteção, a sustentação e o revestimento de estruturas biológicas (CHAPMAN, 2013). São exemplos de inibidores da síntese de quitina os inseticidas diflubenzuron e novaluron.

### **1.3.3.1 Organofosforados e piretroides e o uso no controle de *Ae. aegypti* no Brasil**

Os OPs são inseticidas neurotóxicos que apresentam vantagens como baixa estabilidade química, biodegradabilidade e não se acumulam nos tecidos de mamíferos (HEMINGWAY; RANSON, 2000). No entanto, os OPs têm uma maior toxicidade para vertebrados quando comparados aos OCs (WARE; WHITACRE, 2004).

Os OPs são classificados em três grupos: alifáticos (como o malathion), derivados de fenil - aromáticos (como o temephos e fenitrothion) e heterocíclicos (como o clorpirifos).

O sítio-alvo dos OPs é a enzima acetilcolinesterase (AChE), que age pela inibição de sua atividade de degradação do neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina. Com a inibição da AChE, há o acúmulo de acetilcolina nas sinapses neuronais e neuro-musculares. Com isso, a propagação do impulso elétrico ocorre de forma interrompida, levando à paralisia e morte do inseto, provocada por rápidas contrações nos músculos voluntários (WARE; WHITACRE, 2004).

Os PI são moléculas sintéticas análogas ao ácido crisantêmico (piretroide tipo I) e ao ácido pirétrico (piretroide tipo II), isolados das flores de piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) e de espécies relacionadas (DAVIES et al., 2007). Os PIs são também moléculas neurotóxicas de ação rápida, cujo alvo é a proteína do canal de sódio dependente de voltagem (Nav), presente nas membranas dos axônios. Quando o inseto entra em contato com o inseticida PI, a conformação da proteína Nav fica alterada e mantém-se aberta ao fluxo constante de descargas elétricas. Com isso, o inseto sofre paralisia e morte, efeito conhecido como knockdown (SHONO, 1985).

A classificação dos PIs são: tipo I, PI que tem a presença do grupamento alfa-ciano em sua estrutura química (como a permetrina) ou tipo II, representados pela ausência do grupamento alfa-ciano (como a deltametrina e cipermetrina). Os PIs são biodegradáveis, não-cumulativos e considerados de baixa toxicidade para aves e mamíferos, porém apresenta alta toxicidade para insetos em comparação com outros inseticidas, o que minimiza a quantidade utilizada em campo (SHONO, 1985).

No Brasil, até o ano de 2001, os inseticidas mais utilizados foram os OPs, conforme o PNCD. Os OPs começaram a ser aplicados no controle de *Ae. aegypti*, em 1967, sendo intensamente utilizados na eliminação de larvas e adultos, principalmente após as epidemias de dengue que ocorreram no país em 1986. O temephos foi utilizado por mais de 30 anos no controle de larvas do mosquito, por ser um dos poucos larvicidas apropriados para uso em água de consumo humano (BRAGA; VALLE, 2007b). Diante do uso intenso e ininterrupto

do temephos, a partir da década de 1990 algumas populações do mosquito foram reconhecidas como resistentes ao larvicida (BELLINATO et al., 2016; BRAGA et al., 2004; CARVALHO et al., 2004; HORTA et al., 2011; LIMA et al., 2003; MACORIS et al., 1995; MONTELLA et al., 2007).

Nas localidades onde foram detectadas alterações no perfil de susceptibilidade aos organofosforados em 2001, o malathion foi substituído pelos piretroides no controle de adultos e o temephos foi substituído pelo *Bti* no controle das formas imaturas (MONTELLA et al., 2007). No entanto, rapidamente foi identificada a resistência aos PIs em populações de *Ae. aegypti* do Estado de São Paulo em 2001 (MACORIS et al., 2003) e, entre os anos de 2001 e 2003, confirmada no Rio de Janeiro (DA-CUNHA et al., 2005). Desde então, a resistência aos PIs foi disseminada e continua prevalente no Brasil (BELLINATO et al., 2016; DA-CUNHA et al., 2005; GARCIA et al., 2018; LINSS et al., 2014; MACIEL-DE-FREITAS; VALLE, 2014; MARTINS et al., 2009a; MONTELLA et al., 2007). Em 2009, os IGR's foram preconizados para o controle de larvas do vetor e o malathion retornou para o controle químico dos adultos, substituindo os PI.

#### **1.4 Resistência à inseticidas**

A resistência é definida como a capacidade de uma população de determinada espécie tolerar doses de um produto tóxico que é letal para a maioria da população susceptível da mesma espécie (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981). É um processo genético, pois a intensa pressão exercida pelos xenobióticos (compostos químicos estranhos a um organismo) seleciona os fenótipos resistentes, com o consequente aumento da frequência genotípica dos indivíduos (FFRENCH-CONSTANT; DABORN; GOFF, 2004). A resistência pode ser também manifestada através da resistência cruzada, quando um único mecanismo confere resistência a dois ou mais inseticidas e, resistência múltipla, quando pelo menos dois diferentes mecanismos coexistentes conferem resistência a dois ou mais compostos químicos (MONTELLA et al., 2007).

A seleção de resistência a uma classe de inseticida ocorre, principalmente, ao uso intenso e indiscriminado em populações do vetor (DONG,

2007; FFRENCH-CONSTANT; DABORN; GOFF, 2004). Em consequência, as opções de compostos químicos disponíveis tornam-se limitadas, ocasionando problemas para a saúde pública, pois os inseticidas continuam sendo uma importante ferramenta para os programas de controle de vetores (BRAGA; VALLE, 2007b). Diante disso, uma estratégia de rotação de inseticidas tem sido aplicada, a cada 3-4 anos, com o objetivo de evitar a seleção de indivíduos resistentes a um determinado composto e preservar a variedade de inseticidas disponíveis para o controle vetorial no campo (BELLINATO et al., 2016; MONTELLA et al., 2007).

A avaliação prévia do perfil de suscetibilidade de uma determinada população de insetos vetores é aconselhável para ser realizada antes de iniciar o uso de um determinado inseticida (MACORIS, 2002). Já a indicação para a troca de inseticida é baseada nos resultados de bioensaios, que podem ser do tipo dose-diagnóstica, que permitem a detecção e caracterização de resistência em percentual de mortalidade. A dose diagnóstica é obtida através de bioensaios com larvas ou mosquitos, dependendo do tipo de inseticida, onde se obtém a dose que mata 99% dos insetos suscetíveis da linhagem de referência. Para *Ae. aegypti*, a linhagem de referência mais utilizada no Brasil é a linhagem Rockefeller. Segundo a OMS (2016) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016), a resistência é confirmada quando a mortalidade é inferior a 90%. Bioensaios do tipo dose-resposta também são realizados para quantificar a resistência a um determinado inseticida, com o intuito de determinar as concentrações letais (CL) e, por conseguinte, as razões de resistência (RR).

A resistência à inseticidas é pré-adaptativa, surge como o resultado de uma mutação casual que altera uma característica fisiológica, morfológica ou comportamental (BRAGA; VALLE, 2007b). Essas alterações são conhecidas como mecanismos de resistência e são classificadas em quatro categorias:

a) Resistência comportamental: é uma forma de autoproteção quando o inseticida é detectado pelo inseto e o mesmo consegue evitar o contato direto de seu corpo com o composto químico, através de adaptações comportamentais (SPARKS et al., 1989);

b) Resistência à penetração reduzida: é um mecanismo físico de resistência onde o exoesqueleto do inseto é selecionado por alterações que evitam a penetração do inseticida;

c) Resistência metabólica: é um processo intrínseco, no qual enzimas que são capazes de metabolizar o inseticida, são selecionadas positivamente detoxificando o organismo do inseto pela degradação das moléculas do inseticida. Essas alterações podem acontecer pelo aumento da síntese das enzimas ou via alteração da atividade das enzimas detoxificantes, envolvidas na degradação. São exemplos de enzimas relacionadas à resistência metabólica associada à OP e/ ou PI em *Ae. aegypti*: esterases, oxidases de função múltipla (MFO) e glutathione-S-transferase (GOINDIN et al., 2017; MONTELLA et al., 2007; MONTELLA; SCHAMA; VALLE, 2012; STRODE et al., 2012);

d) Resistência por inibição do sítio-alvo: ocorre quando há a seleção para a diminuição da sensibilidade das moléculas que são sítio de ação de um inseticida. São exemplos desse tipo de resistência as moléculas: acetilcolinesterase (sítios-alvo dos OPs e CA), receptores de ácido gama-aminobutírico (sítios-alvo dos OP ciclodienos) e o canal de sódio (sítios-alvo dos PI e DDT).

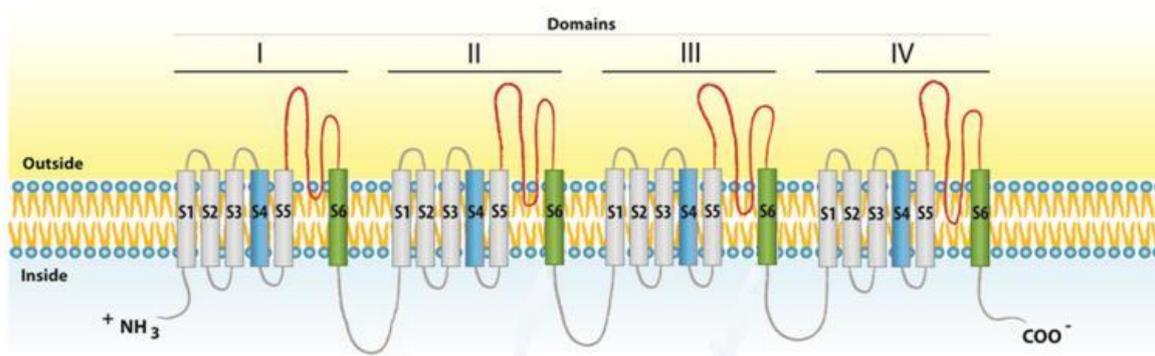
#### **1.4.1 Canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_V$ ) e mutações *kdr* em *Ae. aegypti***

Os canais de sódio regulados por voltagem ( $Na_V$ ) são os sítio-alvo dos inseticidas da classe dos PIs e também do DDT. Os  $Na_V$  são proteínas transmembranares localizadas nos axônios dos neurônios dos mosquitos, responsáveis por gerar o potencial de ação, caracterizada como uma descarga elétrica que percorre a membrana da célula. O potencial de ação é causado pela despolarização de íons sódio ( $Na^+$ ) para o interior das células, propagando-se por todo o neurônio, possibilitando assim a transmissão do impulso nervoso. O processo de despolarização acontece a partir de um estímulo, nesse caso causado pelo contato com o inseticida PI, promovendo a ativação da proteína  $Na_V$ , ou seja, mantendo-a na conformação aberta. Quando isso acontece, os íons  $Na^+$  entram ininterruptamente e, conseqüentemente, há a propagação

contínua do impulso nervoso, o que provoca paralisia rápida e morte do mosquito (*knockdown*) (DAVIES et al., 2007; SHONO, 1985; WARE; WHITACRE, 2004).

A resistência ao efeito *knockdown* é resultado de mutações no gene do canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_V$ ), conhecidas como mutações *kdr* (SODERLUND; KNIPPLE, 2003). Mutações não-sinônimas diminuem potencialmente a afinidade dos PI e DDT ao sítio-alvo  $Na_V$ . Quando o mosquito é resistente e entra em contato com esses compostos, sofre paralisia momentânea seguida de recuperação completa, cujo efeito ficou conhecido como *knockdown resistance (kdr)* (BUSVINE, 1952).

A Figura 1.13 apresenta a estrutura molecular do  $Na_V$ , formado por quatro domínios homólogos (I a IV), sendo cada domínio constituído por seis segmentos hidrofóbicos (S1 a S6) e um *loop* complementar entre os segmentos S5 e S6, o *P-loop*.



**Figura 1.13:** Estrutura molecular do Canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_V$ ), sítio-alvo dos inseticidas piretroides (PI) e DDT (OC) em *Ae. aegypti*. Fonte: (MARTINS; VALLE, 2012).

Em *Ae. aegypti* são descritas 10 mutações pontuais distribuídas pelo  $AaNa_V$  (canal de sódio regulado por voltagem em *Ae. aegypti*), as quais variam nas frequências alélicas e genotípicas, localização geográfica das populações do mosquito e efeitos sobre a resistência (MOYES et al., 2017). Dessa variedade de sítios mutantes dispersos pelo  $Na_V$ , muitos não foram associados com resistência (Thr1502Ile, D1763Y, Leu982Trp, Ile1011Val, Gly923Val). No entanto, alguns sítios são associados com resistência quando combinada com outras mutações, como os sítios Ser989Pro e Val1016Ile e, sítios em que a mutação isolada é fortemente associada com resistência, como no caso dos

sítios Ile1011Met, Val1016Gly, Phe1534Cys e as mais recentes Ala1007Gly e Phe1558Cys (BRENGUES et al., 2003; HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010; LIEN et al., 2018; MARTINS et al., 2009a, 2009b; RAJATILEKA et al., 2008; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007; SRISAWAT et al., 2010).

Em populações de *Ae. aegypti* das Américas, embora outras mutações tenham sido identificadas em *AaNav* (ex. Ile1011Val), apenas os sítios Val1016Ile e Phe1534Cys (HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010; MARTINS et al., 2009a; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007) são comprovadamente relacionados à perda da susceptibilidade aos piretroides (LINSS et al., 2014). Ambas as substituições Val1016Ile e Phe1534Cys são recessivas. Os sítios em que essas mutações estão localizadas são em domínios diferentes do *AaNav*, IIS6 e IIS6, respectivamente.

No Brasil, são encontrados dois alelos *kdr* ( $Nav^{R1}$  e  $Nav^{R2}$ ) (LINSS et al., 2014), que juntos, interagem diretamente com a molécula de piretroide (DAVIES et al., 2007; LINSS et al., 2014). O  $Nav^{R1}$  é mutante no sítio 1534 de *AaNav* e  $Nav^{R2}$  mutante nos dois sítios 1534 e 1016. A mutação 1016Ile<sup>*kdr*</sup> não foi, até o momento, encontrada sozinha em homozigose ( $Nav^{R3} = 1016Ile^{kdr} + 1016Ile^{kdr}$ ) nas populações brasileiras de *Ae. aegypti*, somente junto com 1534Cys<sup>*kdr*</sup> ( $Nav^{R2} = 1016Ile^{kdr} + 1534Cys^{kdr}$ ).

Em *Ae. albopictus*, as mutações por substituição detectadas no *Nav*, até o momento, foram: Ile1532Thr, Phe1534Cys e Phe1534Leu. Recentemente, Phe1534Cys foi pela primeira vez encontrada em populações brasileiras (AGUIRRE-OBANDO; MARTINS; NAVARRO-SILVA, 2017).

## **1.5 Genética de populações em *Ae. aegypti* e a importância dos marcadores moleculares**

Para o controle da densidade de indivíduos de uma espécie vetora, é necessário o conhecimento de seus aspectos biológicos, comportamentais e genético-evolutivos, com o intuito de compreender a dinâmica natural desses organismos. Todas essas condições naturais são a base da manutenção da variabilidade genética em populações, caracterizada como uma condição fundamental para que haja evolução adaptativa, uma vez que a seleção natural

atua nos fenótipos (e genótipos associados) que ocorrem dentro das populações (HARTL, 1981).

Para o estudo da genética de populações, marcadores que acessem a variabilidade genética dessas populações são de extrema importância. Desta maneira é possível identificar o papel das forças evolutivas (mutação, migração, deriva genética e seleção natural) que atuam ou atuaram nas populações (HARTL; CLARK, 2010). Populações de mosquitos têm sido amplamente investigadas à nível molecular e comportamental, com o objetivo de desenvolver estratégias para o controle populacional (PADUAN; ARAÚJO-JÚNIOR; RIBOLLA, 2006).

Por *Ae. aegypti* ser o principal vetor de diversos arbovírus de importância na saúde pública, diversos estudos genéticos já foram realizados nesta espécie. Os estudos de genética de populações visam estimar a variação genética das populações dessa espécie pelo mundo, considerando sua ampla distribuição geográfica. Estudos evolutivos têm sido úteis para o conhecimento do padrão migratório de *Ae. aegypti*, avaliando a estruturação genética das populações do mosquito em diversas localidades (HUBER et al., 2002).

Em geral, populações de *Ae. aegypti* são estruturadas, com características genéticas distintas em diversas localidades e regiões. Estas diferenças genéticas em muitos casos podem gerar diferenciação na capacidade vetorial e outros fatores de importância epidemiológica entre as populações do vetor (COSTA-RIBEIRO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2007). Ademais, padrões de estrutura genética podem estar relacionadas à resistência aos inseticidas, tão quanto podem afetar as estratégias de controle na determinação dos limites necessários para interromper a transmissão de patógenos (PADUAN; ARAÚJO-JÚNIOR; RIBOLLA, 2006; URDANETA-MARQUEZ; FAILLOUX, 2011).

Três principais classes de marcadores moleculares podem ser usados para acessar a variabilidade genética das populações: as alozimas ou isoenzimas (variantes de enzimas), os de polimorfismo de sequências de DNA (mitocondrial, RAPD, RFLP, AFLP, SNPs) e os DNAs repetitivos (minissatélites e microssatélites). Marcadores genéticos como alozimas e RAPD, por exemplo, são marcadores mais ultrapassados e têm limitações significativas em relação

aos marcadores codominantes (microssatélites e SNPs) e haploides (mitocondrial), pois são passíveis de causar viés nas estimativas de parâmetros genéticos, além de apresentar problemas de reprodutibilidade (FERRÃO et al., 2012). Logo, os marcadores que vêm sendo mais aplicados em estudos de genética das populações são os marcadores microssatélites e SNPs.

Os SNPs – Polimorfismo de Nucleotídeo Único, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*, já foram utilizados, por exemplo, para estudos populacionais (Rasic et al., 2014; Rasic et al., 2015; Steffler et al., 2016), estudos de diferenciação entre subespécies de *Ae. aegypti* (Rasic et al., 2016) e testes de hipóteses sobre invasão global e domesticação de *Ae. aegypti* (Brown et al., 2014).

A partir de 1.504 SNPs gerados com o sequenciamento RAD – *RADseq* (sequenciamento de DNA de próxima geração), Brown et al. (2014) estudaram a história evolutiva e domesticação direcionada por humanos de *Ae. aegypti* e foi possível separar populações africanas e neotropicais avaliadas. As populações de *Ae. aegypti* do Novo Mundo são derivadas de populações africanas e, provavelmente, se dispersaram para a Ásia e Austrália originando novas populações do vetor.

Rasic et al. (2014) utilizaram o *RADseq* e identificaram 18.000 SNPs para *Ae. aegypti* coletados no Brasil (Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro), Indonésia, Austrália e Vietnã. Os autores verificaram uma forte separação entre as populações devido a estrutura genética em larga escala. Para entender a diferenciação entre as variedades de *Ae. aegypti* de Singapura e Queensland, Rasic et al (2016) avaliaram sequências mitocondriais e 16.569 SNPs identificados por *RADseq* e constataram que *Ae. ae. queenslandensis* é genomicamente idêntico ao *Ae. ae. aegypti* e cruzam livremente, ou seja, *Ae. ae. queenslandensis* não deve ser considerado uma subespécie e sim, uma variedade ou tipo.

Das várias classes de marcadores moleculares existentes, os microssatélites, os quais são marcadores codominantes, surgiram como uma opção vantajosa para estudo e avaliação de parâmetros evolutivos de mosquitos, devido às qualidades informativas que são capazes de fornecer. Entre os gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*, já foram desenvolvidos marcadores

microssatélites e utilizados em estudos populacionais em várias espécies vetoras primárias de patógenos (BROWN et al., 2011; CHAMBERS et al., 2007; CONN et al., 2006; CUNHA-MACHADO; SCARPASSA, 2014; GUIMARÃES-MARQUES et al., 2012; HICKNER et al., 2010; HUBER et al., 2001; PORRETA et al., 2006; SLOTMAN et al., 2007).

### 1.5.1 Marcadores microssatélites

Os microssatélites são um dos marcadores moleculares mais aplicados em estudos de genética de populações e ecológicos, desde a década de 1990 (SCHLOTTERER, 2000). Outras nomenclaturas também são conhecidas para os microssatélites, como *Simple Sequence Repeats* (SSR), *Short tandem repeats* (STR), *Variable number of tandem repeats* (VNTR) e *Sequence Tagged Microsatellites* (STMS).

Os microssatélites são marcadores encontrados em procariotos e eucariotos, se encontram distribuídos em todo genoma eucariótico, em especial na eucromatina e DNA nuclear, em regiões codificantes e não-codificantes (LI et al., 2002; VIEIRA et al., 2016). Os marcadores microssatélites apresentam níveis seletivamente elevados de polimorfismo, codominância, multialelismo e evolução neutra (SCHLOTTERER, 2000), três características importantes para análises de genética de populações.

Os microssatélites são regiões repetitivas do DNA, compostas de um a dez nucleotídeos, repetidas em *tandem*, distribuídas com frequência pelo genoma nuclear dos organismos (LI et al., 2002). São seletivamente neutros e sofrem altas taxas de mutação, até 10 vezes a mais do que as mutações pontuais, variando entre  $10^2$  e  $10^6$  nucleotídeos por *locus* e por geração (GEMAYEL et al., 2012; SCHLOTTERER, 2000).

A classificação dos marcadores microssatélites é de acordo com o número de nucleotídeos e pelos motivos das repetições. Em relação ao número de nucleotídeos podem ser: mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídicos; segundo os motivos de repetição são classificados em: perfeitos, quando os nucleotídeos dispõem-se sem interrupções (ex: CACACACACACA); imperfeitos, quando há uma interrupção na sequência nucleotídica por um ou dois

nucleotídeos diferentes (ex: CACACACATGCCACACACA); compostos, são formados por mais de um tipo de motivo de repetição (ex: CACACACATGTGTGTG) e interrompidos, quando há uma sequência pequena de nucleotídeos entre os motivos de repetição (ex: CACACACATGGGATCACACACA) (OLIVEIRA et al., 2006).

O polimorfismo dos microssatélites varia de acordo com o motivo de repetição e com a quantidade de repetições (LI et al., 2002). Os microssatélites são resultados dos vários eventos mutacionais, os quais podem ser justificados a partir de duas hipóteses: o *crossing-over* desigual (recombinação genética desigual) acontece quando há troca de sequências nucleotídicas de tamanhos diferentes entre cromátides de cromossomos homólogos, causando adições ou deleções na região das repetições; ou *slippage*, causada pelo “escorregão” da DNA Polimerase durante a replicação do DNA em uma região repetitiva, adicionando ou deletando nucleotídeos. Esta última é a hipótese mais aceita (ROSE; FALUSH, 1998; ZHU; STRASSMANN; QUELLER, 2000).

Os microssatélites, além de serem marcadores muito informativos para estudos populacionais, apresentam facilidade na amplificação dos *loci* via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e por sistema *multiplex*, a qual permite a amplificação conjunta de mais de um *locus* gênico, reduzindo o gasto com reagentes e tempo. A genotipagem dos *loci* também podem ser realizadas por sistema *multiplex* em analisador automático de fragmentos de DNA.

### **1.5.2 Uso de marcadores microssatélites em genética de populações de *Ae. aegypti***

O conhecimento da variação genética de *Ae. aegypti*, espécie vetora de, pelo menos, quatro arbovírus que causam doenças epidemiologicamente graves ao homem, tem sido ampliado com o uso dos microssatélites. Estes, são uma ferramenta eficiente para detectar a diferenciação entre populações geograficamente e geneticamente isoladas, acompanhar eventos migratórios e avaliar variação temporal (sazonal) dentro de suas populações (HUBER et al., 2002; RAVEL et al., 2002).

Até o momento, foram desenvolvidos *primers* que amplificam 36 *loci* microssatélites para essa espécie (BROWN et al., 2011; CHAMBERS et al., 2007; HUBER et al., 2001; SLOTMAN et al., 2007).

Huber et al. (2002a) avaliaram a variabilidade genética por meio de marcadores isoenzimáticos e microssatélites em amostras de *Ae. aegypti* coletados durante a estação seca e chuvosa em sete localidades da cidade Ho Chi Minh (Vietnã). Os autores correlacionaram a estruturação genética das populações do mosquito com fatores ambientais (estações de seca e chuva) e antrópicos (desenvolvimento urbano), durante um curto período de tempo, sendo as populações mais estruturadas geneticamente na seca. Nessa mesma localidade, em Ho Chi Minh, Huber et al. (2002b) investigaram a diferenciação genética intra e interpopulacional das populações de *Ae. aegypti* e perceberam a diferença na estrutura genética entre as localidades centrais e periféricas da cidade, as quais são associadas à urbanização.

Os microssatélites foram essenciais para o entendimento do *status* da espécie, na diferenciação genética entre a subespécie doméstica *Ae. aegypti aegypti* e a silvestre *Ae. aegypti formosus*. Utilizando 12 *loci* microssatélites, Brown et al (2014) durante a avaliação da estrutura genética de diversas populações de ambas as subespécies coletadas pelo mundo, identificaram dois agrupamentos diferentes, o africano e o não-africano. Os autores se referiram ao agrupamento não-africano como pantropical, uma vez que abrange populações nos trópicos, subtropicais e uma população africana.

Considerando a reinfestação de *Ae. aegypti* no Brasil, mesmo após o programa de erradicação do vetor, Monteiro et al (2014) estudaram 11 localidades brasileiras, comparadas com outras oito localidades das Américas do Sul, Central e Norte previamente analisadas, utilizando 12 *loci* microssatélites e verificaram que as populações de *Ae. aegypti* formam dois grandes grupos distintos. Um grupo abrange parte das regiões Norte e Nordeste (mesmo grupo das populações de *Ae. aegypti* das Américas do Sul, Central e Norte previamente avaliadas, exceto Dominica) e outro grupo que abrange parte do Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, o mesmo grupo genético da população de *Ae. aegypti* coletados em Dominica. Os autores discutiram a probabilidade da recolonização do *Ae. aegypti* a partir dos países do Norte da

América do Sul (ex. a Venezuela) que fundou o primeiro grupo (Norte e Nordeste brasileiro), e uma de Dominica que fundou o segundo grupo (Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste brasileiro). A hipótese de que houve a recolonização do mosquito no grupo do Noroeste do país vindos da Venezuela foi confirmada por Kotsakiozi et al (2017). No entanto, os autores sugerem a hipótese do grupo Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil ter se oriundo mais recentemente das áreas do Norte do Brasil.

Em uma avaliação mundial, Glória-Sória et al (2016) (GLORIA-SORIA et al., 2016b) estudaram 79 populações mundiais de *Ae. aegypti* por meio de 12 *loci* microssatélites e identificaram uma forte estruturação populacional fora da África em contraste com uma relativamente fraca dentro da África. Analisando as amostras de *Ae. aegypti* provenientes da América do Sul, os autores perceberam que se tratam de três grupos genéticos, sendo um do norte (amostras da Colômbia, Venezuela e do norte do Brasil), um grupo do Sul do Brasil e outro da Argentina. O *Ae. aegypti* apresenta um elevado grau de diversidade e estrutura genética, tornando-o um desafio para o controle de suas populações com o intuito de diminuir seu impacto na saúde humana.

## 2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, não é só o vírus do dengue que vem ameaçando novas epidemias no país. Os vírus do chikungunya e Zika têm causado o aumento no número de casos de indivíduos infectados com arbovírus transmitidos pelo *Ae. aegypti*. Além disso, a re-emergência da febre amarela também tem sido preocupante. *Ae. aegypti* está presente em mais de 70% dos 5.561 municípios brasileiros, deixando o país exposto às novas e constantes ameaças de epidemias. Além de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* também está presente em altas densidades e tem se mostrado competente na transmissão desses arbovírus em laboratório. *Ae. albopictus* é considerado um importante elo de transmissão entre casos de epizootias e também de epidemias humanas. O Rio de Janeiro é um dos estados que mais tem contribuído com altas taxas de transmissão de arboviroses no país, além de ter sido porta de entrada de novos sorotipos de DENV, CHIKV e ZIKV. O Rio de Janeiro recebe muitos turistas (1º no Brasil) e é uma cidade heterogênea, do ponto de vista espacial de seu cenário urbano retalhado em habitações subnormais ou favelas. Essa estrutura urbana heterogênea é apropriada e conveniente para a reprodução e o estabelecimento de *Ae. aegypti*, dificultando seu controle eficiente. As medidas de controle adotadas pelo PNCD não têm surtido os efeitos desejados, principalmente, em função das condições socioambientais, que favoreceram a proliferação e dispersão do vetor. Somado a isso, o número reduzido de agentes de saúde não permite cobrir todas as áreas, na maioria das cidades.

Neste contexto, é necessário desenvolver métodos (ou combinação de métodos) de controle que sejam eficientes, práticos, de baixo custo e facilmente aplicáveis, e que otimizem o esforço dos agentes de saúde na adoção de medidas de combate ao vetor. Uma melhor compreensão dos diferentes aspectos da biologia e da diversidade de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, são importantes tanto na adequação das metodologias utilizadas quanto na implementação ou na criação de novas estratégias.

Diante disso, nossa proposta foi avançar no conhecimento destes vetores, avaliando a distribuição espacial de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, bem como o perfil de resistência à inseticidas e a diversidade genética das populações de *Ae. aegypti*, da ilha de Paquetá e das áreas dos portos que mantem fluxo contínuo

de indivíduos humanos, para obter informações importantes sobre o fluxo migratório entre as populações *Ae. aegypti*. Além disso, utilizamos as ovitrampas como ferramenta para monitorar a densidade populacional de *Aedes* e direcionar as ações de controle de vetores para os quarteirões mais críticos quanto a densidade identificada de ovos de *Aedes*, no intuito de otimizar o controle destes mosquitos na Ilha de Paquetá. Por ser um local isolado e de frequência sazonal de pessoas, a eficiência do controle do vetor em Paquetá é ainda mais dificultada. Há um maior fluxo de pessoas no verão e no inverno muitas casas ficam abandonadas e com isso pode haver um aumento de potenciais criadouros nesses imóveis da Ilha de Paquetá. Por essa razão, além da capacitação dos profissionais envolvidos com o controle, promovemos eventos de instruções e treinamento para os caseiros responsáveis pela vigilância dos domicílios de veraneio.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Conhecer a distribuição espacial e a flutuação sazonal de *Aedes* na Ilha de Paquetá e avaliar os níveis de resistência à inseticidas organofosforados e piretroides, a diversidade e estruturação genética por meio de marcadores genéticos de *Ae. aegypti* da Ilha de Paquetá e de outras quatro áreas portuárias da região metropolitana do Rio de Janeiro.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a dinâmica temporal e distribuição espacial de populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá durante dois anos;
- Direcionar as ações de controle vetorial baseadas na densidade de ovos de *Aedes* na Ilha de Paquetá durante dois anos;
- Verificar o *status* de susceptibilidade/ resistência de larvas e adultos de *Ae. aegypti* das áreas avaliadas obtido em duas estações de coleta, por meio de bioensaios dose-resposta com os organofosforados - temephos e malathion e piretroide - deltametrina;
- Quantificar as frequências de mutações Val1016Ile e Phe1534Cys do gene do canal de sódio dependente de voltagem (*AaNav*) relacionadas com a resistência à piretroides, nas populações de *Ae. aegypti* de seis áreas avaliadas, de duas estações de coleta;
- Caracterizar a diversidade genética, estrutura genética e fluxo gênico de populações naturais de *Ae. aegypti* entre a Ilha de Paquetá e localidades continentais próximas, em duas estações de coleta, por meio de marcadores microssatélites;
- Promover eventos de treinamento e capacitação de vigilantes de residências e profissionais envolvidos com o controle dos vetores na Ilha de Paquetá, sobre a biologia e controle de mosquitos vetores.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Monitoramento e direcionamento do controle de *Aedes* na Ilha de Paquetá**

#### **4.1.1 Breve histórico sobre a Ilha de Paquetá**

Com uma história tão antiga quanto a da cidade do Rio de Janeiro, a Ilha de Paquetá foi descoberta em 1555 pelo francês André Thevet, um frade franciscano, cosmógrafo e escritor, que chegou ao Brasil com a expedição de Villegagnon. Nesse momento, os franceses lutavam pelo domínio da região da Baía de Guanabara, sendo o objetivo da expedição estabelecer uma colônia e transformá-la em uma grande base militar e naval francesa, por onde tentariam o controle do comércio com as Índias (BELCHIOR, 2008). André Thevet nomeou essa batalha na Baía de Guanabara como França Antártica.

Foi um período marcado por inúmeras batalhas entre franceses e portugueses em prol do domínio do Brasil. Os franceses tinham como aliados os índios Tamoios, os quais reagiam com hostilidade aos portugueses em resposta às tentativas de captura de indivíduos para escravização em plantações de cana-de-açúcar. Os conflitos entre Tamoios e portugueses começaram anos antes da chegada dos franceses. Os portugueses venceram a guerra, liderados por Mem de Sá, expulsando os franceses das ilhas do entorno e implantando novamente na baía de Guanabara o domínio de Portugal em 1560 (BELCHIOR, 2008; KEVORKIAN, 2002).

Anos após o final dos confrontos, em 1565, Estácio de Sá instituiu a cidade de São Sebastião do Rio de Janeiro, fundando a cidade nas proximidades do Pão de Açúcar (CARVALHO, 1990).

Nesse mesmo ano de 1565, Estácio de Sá concedeu várias sesmarias (lotes de terras cedidas pela Coroa Portuguesa como pagamento) na Baía de Guanabara e regiões do entorno, e Paquetá foi incluída na relação de terras doadas a seus aliados que lutaram junto a Portugal contra os franceses. A ilha foi dividida ao meio, pela Ladeira do Vicente, sendo cada metade considerada

uma sesmaria. A parte Norte foi doada a Inácio de Bulhões e a parte Sul doada a Fernão Valdez (KEVORKIAN, 2002).

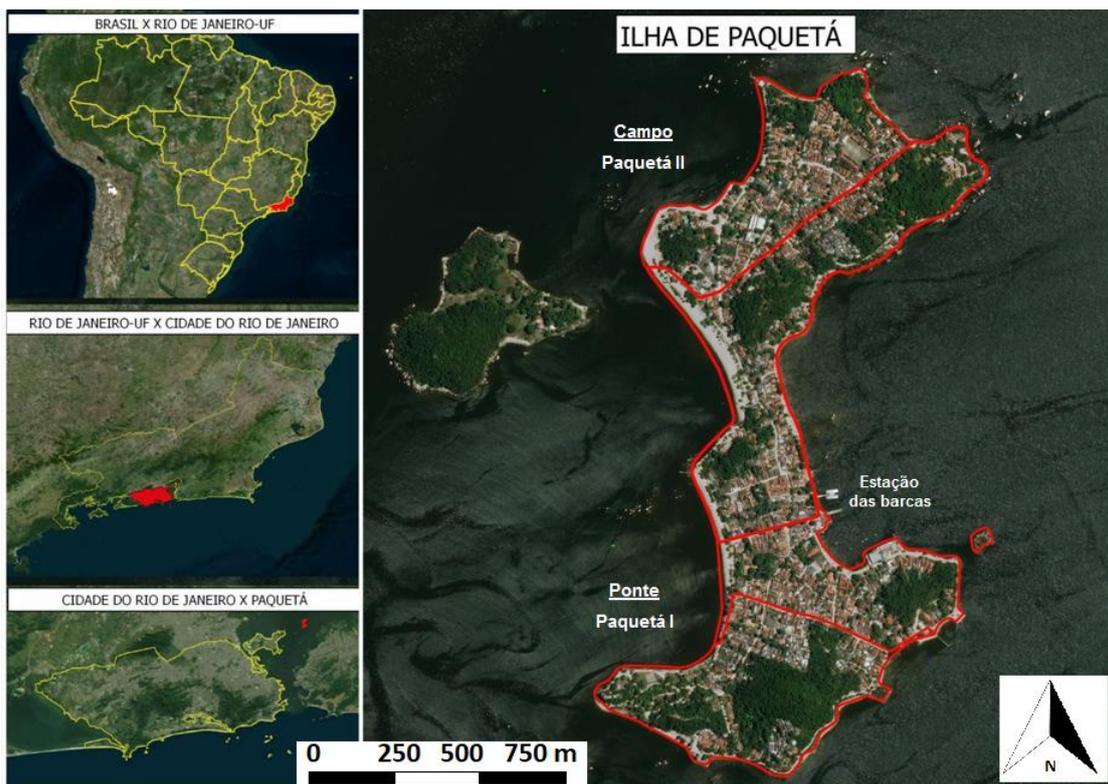
A longo prazo, Paquetá foi sendo colonizada, tornando-se próspera. Foram criadas diversas chácaras e terras produtoras de agronegócio. A parte Sul, atualmente conhecida como bairro Ponte, teve ocupação habitacional mais acelerada. A parte Norte, hoje é o bairro Campo, foi construída a fazenda São Roque, de produções agrícola e bovina (BELCHIOR, 2008; KEVORKIAN, 2002).

A Ilha de Paquetá passou a ser visitada e habitada por nobres da Corte Portuguesa e foi local de descanso preferido de D. João VI, chamando-a de ilha dos amores. Com a frequência regular do rei de Portugal na Ilha, Paquetá tornou-se centro político da Coroa. Nessa mesma fase da história do Brasil, a Ilha de Paquetá foi local de reclusão de José Bonifácio, o Patrono da Independência do Brasil, perseguido por lutar pelo fim da escravidão africana, ficando exilado em sua casa após abandonar a vida política (CARVALHO, 1990; KEVORKIAN, 2002).

Paquetá foi cenário de um dos romances mais conhecidos escritos por Joaquim Manuel de Macedo, em 1844, *A Moreninha*, cujo nome foi dado a uma das principais praias da Ilha: Praia da Moreninha. No final desta praia tem uma pedra, também chamada de Pedra da Moreninha, um dos principais pontos turísticos de Paquetá. A Ilha de Paquetá era vinculada administrativamente ao Município de Magé até o ano de 1833. A partir de um decreto Real passou a pertencer ao Município do Rio de Janeiro. Desde 1975 que é considerada a XXI Região Administrativa do Rio de Janeiro (KEVORKIAN, 2002).

#### **4.1.2 Aspectos socioeconômicos e geográficos sobre a Ilha de Paquetá**

A ilha de Paquetá (43°06'33"W, 22°45'30"S) (Figura 4.1) é um bairro do município do Rio de Janeiro, localizada na baía oceânica de Guanabara. Apresenta o formato de um “número oito”, com 1.2 Km<sup>2</sup> de área total. É a principal ilha de um arquipélago e a única habitada. Há outras ilhotas que circundam Paquetá, sendo a principal a Ilha do Brocoió, usada como residência de verão pelo Governo do Estado do Rio de Janeiro (Figura 4.1).



**Figura 4.1:** Ilha de Paquetá, situada na cidade do Rio de Janeiro (RJ), Brasil. Fonte: Google Earth (2018).

O clima da Ilha é padrão aos demais bairros do Município do Rio de Janeiro, tropical e com sazonalidade branda entre as estações do ano, caracterizado por ter um inverno seco e verão chuvoso, com temperatura média anual de 22 °C e precipitação anual entre 1.200 e 1.800mm (PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO, 2010).

A Ilha de Paquetá tem uma subdivisão interna em dois bairros, Ponte e Campo, seguindo a mesma partição de quando foram doadas como sesmarias. A Ponte, na porção sul, fica voltada para o Rio de Janeiro e é onde existe um porto para a atracação das barcas e catamarãs; O Campo, na região norte, fica voltada para o fundo da Baía de Guanabara, na direção do Município de Magé e São Gonçalo.

A Ilha de Paquetá é um ambiente extremamente tranquilo e pacato. Considerado turístico e bastante visitada, a Ilha de Paquetá é procurada por pessoas que desejam relaxar e fugir da zona metropolitana. O único meio de transporte para chegar até a Ilha de Paquetá é o marítimo, por barcas e

catamarãs, com saída da Praça XV, no centro do Município do Rio de Janeiro. Na Ilha de Paquetá não são permitidos carros e motos particulares e é um ambiente livre de asfalto.

A população moradora e frequentadora da Ilha é extremamente sazonal, com 3.361 moradores fixos, segundo o Censo 2010 do IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e 2.200 domicílios, o qual se acredita que, aproximadamente, 50% sejam de veranistas (PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO, 2010; RIO COMO VAMOS, 2018a). Dentre o total de moradores da Ilha de Paquetá, 908 (27%) habitam área de favela (CAP1.0, 2014). A maioria dos moradores da Ilha de Paquetá trabalha e estuda na região metropolitana do Rio de Janeiro (KEVORKIAN, 2002), o que resulta na grande frota diária de pessoas nas embarcações.

A vigilância entomológica responsável pelo controle de vetores na Ilha é Coordenadoria de Saúde da Área de Planejamento 1.0 - CAP 1.0.

#### **4.1.3 Instalação e Georreferenciamento das ovitrampas na Ilha de Paquetá**

As ovitrampas para mosquitos são armadilhas fáceis de trabalhar. Uma de suas vantagens é a não necessidade de fonte de energia, o que representa maior praticidade em campo (BRAGA et al., 2000).

As ovitrampas são compostas por um recipiente preto (9 cm de altura x 12 cm de diâmetro), uma palheta retangular de eucatex (3x12 cm) fixado por um grampo ou clipe e 200 mL de água com atrativo. Como atrativo foi utilizado levedo de cerveja a 0.04% por ser eficiente e prático (CORRÊA, 2013). As palhetas são fixadas na borda do recipiente com a face áspera voltada para o centro da armadilha, que serve como substrato para as fêmeas depositarem os ovos.

As áreas de monitoramento para a instalação das ovitrampas foram selecionadas de acordo com o número de imóveis por quarteirão na Ilha. A avaliação da área total foi realizada com auxílio de mapas de base aerofotográfica contendo o levantamento planimétrico das quadras e seus respectivos lotes dispostos pela Prefeitura do Município do Rio de Janeiro. A

instalação das ovitrampas foi randômica e no peridomicílio, sempre protegidas do sol e chuva. Os quarteirões com maior número de imóveis tiveram mais armadilhas instaladas.

Foram considerados dois estratos na Ilha de Paquetá, seguindo a separação interna da ilha em dois bairros: Ponte (Paquetá I) e Campo (Paquetá II) (Figura 4.1). Em toda ilha foram monitoradas 90 ovitrampas durante dois anos (de maio de 2014 a maio de 2016), distribuídas espacialmente de forma a cobrir toda a área. No entanto, o objetivo da vigilância das armadilhas foi diferente, seguindo a divisão dos bairros.

No primeiro estrato, Paquetá I foram instaladas 50 ovitrampas para acompanhamento da distribuição espacial de *Aedes*. Estas armadilhas ficaram permanentes por dois anos seguidos, monitoradas semanalmente e as densidades de ovos de *Aedes* estimadas serviram como base para o direcionamento das ações de controle de vetores. No segundo estrato de Paquetá II, 40 ovitrampas foram instaladas bimestralmente por dois anos seguidos. As ovitrampas permaneciam em campo por duas semanas consecutivas e as paletas eram recuperadas semanalmente. Essa parte da Ilha foi utilizada como uma área controle,

Todas as ovitrampas foram georreferenciadas, utilizando um *Global Positioning System* (GPS), Garmin, com projeção *Universal Transversa de Mercato – South American Datum 69* (UTM - SAD 69). Os dados geográficos foram transferidos para um sistema de informação geográfica (SIG) no *software* Qgis Wien 2.8. Todos os imóveis tiveram suas localizações espaciais geradas no sistema e pontuadas em um *shape* da ilha de Paquetá. Mensalmente, os dados de densidade de ovos foram projetados em mapas de kernel para o monitoramento pontual de *Aedes* na Ilha de Paquetá. Kernel é um estimador de intensidade que permite ponderar a quantidade de eventos por unidade de área que recobre a região do mapa e uma rápida visualização das áreas que merecem mais atenção (BAILEY; GATRELL, 1955). Estas áreas são os pontos quentes (*hotspots*) do mapa, os quais são demonstrados segundo a intensidade das cores, conforme os dados projetados (número de ovos). A base cartográfica digital utilizada na elaboração dos mapas foi obtida na Prefeitura do Município do Rio de Janeiro.

#### **4.1.4 Monitoramento temporal contínuo e bimestral de ovitrampas na Ilha de Paquetá**

O acompanhamento da flutuação temporal de *Aedes* foi realizado a partir do monitoramento de 50 ovitrampas instaladas em Paquetá I. As armadilhas permaneceram nos mesmos imóveis durante todo período de avaliação, de maio de 2014 a maio de 2016. Só foram transferidas em caso de desistência do proprietário ou perda da armadilha. A vigilância das mesmas foi realizada todas as quintas-feiras, com o apoio dos agentes de vigilância em saúde (AVS) cedidos pela Gerência de Fatores de Riscos Biológicos da Cap 1.0.

Enquanto em Paquetá I 50 ovitrampas permaneciam continuamente fixas nos pontos instalados, na outra porção da Ilha, em Paquetá II, 40 armadilhas foram monitoradas bimestralmente. Esse intervalo de instalação teve como proposta utilizar essa parte da Ilha como uma área controle, já que as ações direcionadas foram realizadas somente em Paquetá I.

Durante a vigilância das ovitrampas, as palhetas eram trocadas junto com a água e atrativo e as palhetas da semana anterior eram reservadas e levadas para o Laboratório de Fisiologia e Controle de Ártropodes Vetores – Laficave, IBEx, Fiocruz. No momento do recolhimento, os ovos de *Aedes* presentes nas palhetas positivas eram contados com o auxílio de uma lupa de mão. Para isso, os AVSs foram previamente treinados para estimar a quantidade de ovos próximo da quantidade real, de acordo com uma faixa pré-estabelecida: 0 ovos; 1 – 50; 51 – 200; 201 - ou mais ovos.

No insetário do Laficave, as palhetas eram dispostas em bacias para a secagem. Em seguida, todas foram analisadas pelas superfícies e laterais para a contagem precisa dos ovos em estereomicroscópio com ampliação de 40 x. A quantidade de ovos de *Aedes* das armadilhas de cada semana eram anotadas e somadas para cada mês. Os resultados mensais eram inseridos e projetados em mapas temáticos (kernel) identificando as áreas mais infestadas pelo vetor e repassadas ao supervisor de área para a execução das ações de controle dos vetores, realizadas pelos AVSs da Gerência de Fatores de Risco Biológico da Prefeitura do Rio de Janeiro, CAP 1.0.

A frequência da distribuição espacial e densidade sazonal de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foi avaliada a partir das 90 ovitrampas instaladas espacialmente por toda Ilha de Paquetá a cada dois meses, durante os dois anos de monitoramento. As paletas provenientes de todas as coletas bimestrais foram encaminhadas para o Laboratório de Fisiologia de Artrópodes Vetores - Laficave e as paletas positivas foram resguardadas para a eclosão dos ovos, criação das larvas até a emergência dos adultos para a identificação das espécies. O procedimento de criação e identificação está descrito no item 4.3.

A partir de duas coletas em estações diferentes, sendo uma no inverno (maio de 2014) e outra no verão (dezembro de 2014), amostras de *Ae. aegypti* foram reservadas para a avaliação da resistência a inseticidas e estudos moleculares, comparadas com amostras obtidas em outras quatro localidades portuárias, como descrito nos itens seguintes desta tese.

#### **4.1.5 Direcionamento das ações de controle em Paquetá I**

A partir dos mapas confeccionados, nossa perspectiva foi atuar diretamente nas áreas com maior densidade de ovos de *Aedes* indicados pelas ovitrampas inspecionadas semanalmente e, com isso, diminuir os focos do mosquito. O manejo foi praticado conforme a proposta do PNCD, onde prioriza-se o controle integrado. A rotina de campo dos agentes foi mantida e priorizada nas áreas indicadas pelos mapas. Também foram avaliados os tipos de depósitos. A Tabela 4.1 apresenta a classificação dos tipos de depósitos e as ações preconizadas para a eliminação e/ou controle dos recipientes encontrados em campo (BRASIL, 2009).

**Tabela 4.1:** Classificação dos tipos de depósitos e ações preconizadas pelo Programa Nacional de Controle da Dengue – PNCD. Fonte: Brasil (2009).

<b>Grupo</b>	<b>Tipo de depósito</b>	<b>Tipo de recipiente</b>	<b>Tratamento</b>
<b>A</b>	Depósitos de armazenamento de água	<b>A1</b> Depósitos elevados - Caixa d'água.	Vedação com tela; uso de larvicida como última alternativa.
		<b>A2</b> Depósitos ao nível do solo: Caixa d'água, poço, filtros, etc.	Descartar a água, quando possível; vedação com telas; uso de larvicida como última alternativa.
<b>B</b>	Depósitos móveis	Vasos, pingadeira, bebedouros, etc.	Descarte da água; lavagem; colocação de areia; uso de larvicida como última alternativa.
<b>C</b>	Depósitos fixos	Calhas, ralos, sanitários, piscinas, depósitos em cemitérios, etc.	Descarte da água; lavagem; proteção e vedação; colocação de areia; uso de larvicida como última alternativa.
<b>D</b>	Depósitos passíveis de remoção	<b>D1</b> Pneumáticos	Encaminhamento para o descarte adequado; se indispensável, proteger e vedar; uso de larvicida como última alternativa.
		<b>D2</b> Lixos, sucatas e entulhos	Encaminhamento para o descarte adequado; se indispensável, proteger e vedar; uso de larvicida como última alternativa.
<b>E</b>	Depósitos naturais	Bromélias, ocos de árvores, buracos em pedras, etc.	Tampar buracos em árvores; descartar, se possível.

A supressão dos criadouros encontrados aconteceu principalmente pela intervenção de ações físicas. O controle químico por meio de larvicidas só ocorreu em situações em que o controle físico não foi possível de ser realizado. Comunicação e sensibilização dos moradores sempre foram praticados na Ilha de Paquetá, contudo, foi intensificado como uma das proposta deste trabalho, vinculado ao Programa Brasil Sem Miséria (Descrito no item 4.5).

#### 4.1.6 Análise dos dados

Todos os resultados obtidos foram registrados e tabulados em planilhas de formato eletrônico, com todas as variáveis discriminadas, de acordo com a localização e numeração da armadilha. A análise estatística foi realizada com o auxílio do *software* R v.3.5.1.

Os número de ovos obtidos através das ovitrampas foram utilizados para determinar os índices entomológicos de ovitrampas, que consiste no:

a) Índice de Positividade de Ovitrampas (IPO) - permite mensurar a infestação e a distribuição espacial do vetor na área avaliada a partir da presença de ovos nas palhetas (GOMES, 1998):

$$\text{IPO} = \text{n}^\circ \text{ de ovitrampas positivas} / \text{n}^\circ \text{ de ovitrampas examinadas} \times 100$$

b) Índice de densidade de ovos (IDO) - possibilita a detecção precoce de novas infestações pelo vetor pela abundância de ovos por armadilha (GOMES, 1998):

$$\text{IDO} = \text{n}^\circ \text{ total de ovos} / \text{n}^\circ \text{ de ovitrampas positivas}$$

c) Índice médio de ovos (IMO) – avalia o número total de ovos pelo total de ovitrampas instaladas.

$$\text{IMO} = \text{n}^\circ \text{ total de ovos} / \text{n}^\circ \text{ de ovitrampas instaladas}$$

As variáveis ambientais de precipitação e temperatura foram utilizadas para a análise de associação com a oviposição total, durante todo o período de estudo (de maio de 2014 a maio de 2016). Os dados de temperatura foram obtidas a partir da estação meteorológica mais próxima da ilha (Aeroporto Galeão, Ilha do Governador  $\cong$  10 Km de distância) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2014). A precipitação acumulada mensal foi obtida pelo Sistema de Alerta da Prefeitura do Rio de Janeiro (RIO DE JANEIRO, 2017). Os dados de temperatura e precipitação utilizados nas análises estatísticas foram referentes a uma e duas semanas de defasagem.

Em relação ao direcionamento das ações de combate ao vetor em Paquetá I que era a área de estudo, a avaliação estatística dos dados foi

realizada por série temporal somente nas semanas em que houve monitoramento em toda a Ilha. Isso aconteceu em detrimento de Paquetá II que era a área controle ter sido monitorada bimestralmente.

A análise dos dados foi realizada para testar a associação entre o número total de ovos por semana epidemiológica - SE, temperatura mínima e as ações de rotina realizadas nas áreas propostas indicadas pelas ovitrampas. Os dados das ações de controle foram referente as ações ocorridas no mês seguinte a coleta dos ovos, tendo em vista que estas ações aconteceriam nas áreas indicadas pelas ovitrampas. As variáveis das ações avaliadas foram: número de imóveis trabalhados; número de depósitos tratados; número de depósitos eliminados e quantidade de larvicida utilizada. Para essa análise, foi mantida a organização da Ilha em territórios (estratos), conforme o planejamento regular dos AVSs da CAP 1.0. No total, são três territórios, sendo dois territórios referentes a Paquetá I e um território referente a Paquetá II.

Para testar as diferenças entre os índices entomológicos IPO, IDO e IMO entre a área controle e a de estudo, foi utilizado teste *t Student*. Modelos de regressão logística foram aplicados para avaliar a associação entre o IPO e as temperaturas mínimas e entre o IPO e as ações de controle. Esse modelo é utilizado para estimar a probabilidade de um evento ocorrer em função de outros fatores, ou seja, indentificar os fatores que poderiam estar associados com a positividade das ovitampas (FOX, 2002). Na Tabela 4.2 encontram-se o nome das variáveis e os códigos R utilizados nas análises.

**Tabela 4.2:** Variáveis e códigos R utilizados nos modelos de regressão logística para os testes de associação entre os estratos de Paquetá I e Paquetá II, na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro.

Variável	Explicação	Código R
Armadilhas positivas	Número total de ovitrampas positivas	Armad_Post
Total de armadilhas	Número total de ovitrampas instaladas	Total_Armad
Carga de larvicida	Quantidade (g) de larvicida utilizado nos depósitos positivos para <i>Ae. aegypti</i>	Carg_Larv
Depósitos eliminados	Número total de depósitos eliminados durante as vistorias dos imóveis	Deps_Elim
Temperatura mínima	Temperatura mínima por semana epidemiológica	Temp_Min
Total de ovos	Número total de ovos	Total_Ovos

Os modelos regressão logística testados foram os seguintes (em notação do R):

a) No território com ação direcionada (Paquetá I):

Variável resposta ao IPO = armadilha positiva/negativa

```
#mod <- glm(cbind(Armad_Post,Total_Armad) ~ Carg_Larv + Deps_Elim
+ Temp_Min, data=dados, family = "binomial",
# subset=dados$acao=="acao proposta")
#summary(mod)
```

b) Nos territórios controle (Paquetá II):

Variável resposta ao IPO = armadilha positiva/negativa

```
# Nas areas sem acao (controle)
#modC <- glm(cbind(Armad_Post,Total_Armad) ~ Carg_Larv +
Deps_Elim + Temp_Min, data=dados, family = "binomial",
# subset=dados$acao=="acao padrao")
#summary(modC)
```

Modelo de regressão binomial negativo foi utilizado para testar a associação das ações de controle e temperatura no efeito positivo sobre o número total de ovos (FOX, 2002). O modelo regressão binomial negativo testado foi (em notação do R):

a) Variável resposta ao número total de ovos

```
#mod <- glm.nb(Total_Ovos ~ offset(log(Total_Armad)) +  
intervencao + Temp_Min, data=dados)  
#summary(mod)
```

Ambos os modelos de regressão utilizados são modelos lineares generalizados (GLM). O logístico é aplicado para proporções e o binomial negativo para contagem. O modelo estatístico escolhido foi o que melhor se ajustou as variáveis avaliadas, comparado pelo Critério de Informação de Akaike (AIC) (AKAIKE, 1974).

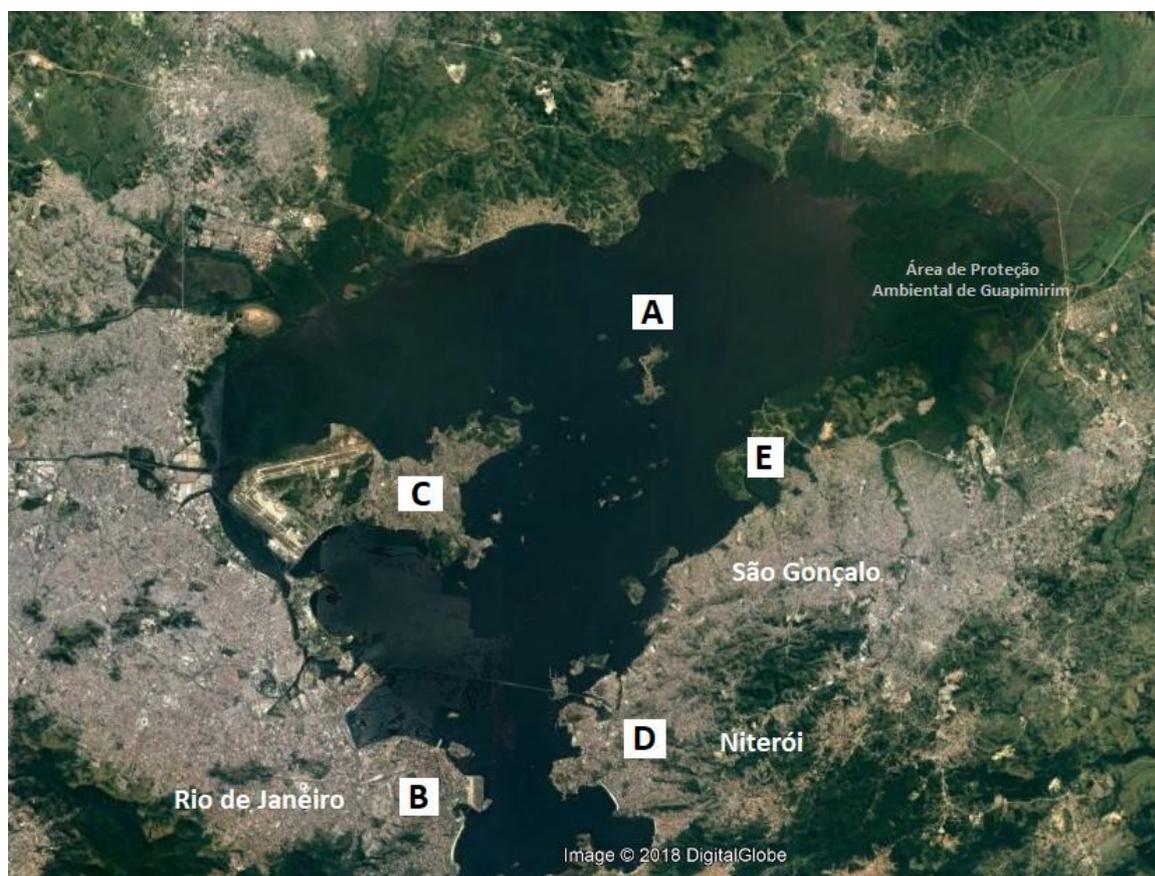
Gráficos de linha e *boxplot* foram elaborados com os dados das séries temporais dos dados das ovitrampas. O *software* utilizado nas análises estatísticas foi o R v3.1.2.

As variáveis da frequência de espécies identificadas e variáveis ambientais foram avaliadas estatisticamente por meio do Coeficiente de Correlação de Person.

#### **4.2 Obtenção de ovos e criação das amostras de *Aedes* das áreas portuárias do Rio de Janeiro**

A aquisição de ovos de *Aedes* foi realizada em duas estações diferentes, sendo uma no inverno, nos meses de junho a setembro de 2014 e uma no verão, nos meses de dezembro/2015, janeiro a março de 2016, em localidades da região metropolitana do Rio de Janeiro (Figura 4.2) onde possuem portos de embarcações. As estações portuárias são conectadas à estação da Praça XV,

exceto a estação de Itaóca (São Gonçalo). As barcas que vão em direção à Paquetá sem exclusivamente do porto da Praça XV.



**Figura 4.2:** Baía de Guanabara e as cinco áreas portuárias da região metropolitana do Rio de Janeiro (RJ). (A) Ilha de Paquetá; (B) Praça XV; (C) Cocotá, Ilha do Governador; (D) Praça de Araribóia, Niterói; (E) Itaóca, São Gonçalo. Fonte: Google Earth (2018).

As coletas nas regiões portuárias foram realizadas através de 40 ovitrampas mantidas por 15 dias consecutivos em cada localidade. A instalação foi feita nas proximidades das estações das barcas, sendo em torno de cinco armadilhas na estação CCR Barcas e as demais em um raio de, no máximo, 1 km de distância da estação.

A finalidade das coletas foi obter amostras de *Ae. aegypti* utilizadas nas análises de genética de populações com microssatélites, na avaliação da resistência a inseticidas e na estimativa da frequência da mutação *kdr*.

As localidades onde foram instaladas as ovitrampas para a coleta de ovos de *Aedes* são bairros ou municípios do Estado do Rio de Janeiro, situadas próximas da Ilha de Paquetá, as quais são:

#### **- Praça XV**

A Praça XV de Novembro está localizada no centro do município do Rio de Janeiro, entre a Assembleia Legislativa do Estado do Rio de Janeiro - ALERJ e o porto de barcas, na baía de Guanabara (PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO, 2009). É um dos principais centros históricos e turístico da cidade, sendo um dos locais mais antigos do Rio de Janeiro, cenário de diversos momentos históricos da história da cidade e do Brasil. Atualmente toda a região portuária foi revitalizada e faz parte do passeio público chamado Porto Maravilha (PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO, 2009). A estação das barcas foi construída entre 1904 e 1912 (CCR, 2018a) e é de onde partem as embarcações que fazem o transporte de passageiros pela Baía de Guanabara, para Niterói, Ilha de Paquetá e Ilha do Governador. Segundo a CAP 1.0 (CAP1.0, 2014), a população total do centro do Município é de 41.142 pessoas e 22.646 domicílios. As ovitrampas foram instaladas dentro da área portuária e distribuídas pelas principais ruas da região, no entorno da Praça XV, até as proximidades da Rua da Quitanda.

#### **- Cocotá**

Cocotá é um bairro da Ilha do Governador localizado na zona Norte do município do Rio de Janeiro. A região era conhecida como praia da Olaria até meados de 1970. Foi aterrada e nomeada Aterro de Cocotá e inaugurada em 1978. É cercada por uma colônia de pescadores e um pequeno comércio, sendo também considerada uma das maiores áreas de lazer da Ilha do Governador. A população do bairro foi estimada em 4.877 moradores e 1.880 domicílios (RIO COMO VAMOS, 2018b). A estação de barcas de Cocotá foi criada em 2006 para atender e facilitar o transporte dos moradores da Ilha do Governador até o centro do Rio de Janeiro (CCR, 2018b). As ovitrampas foram dispostas dentro

da estação de barcas de Cocotá até as ruas perpendiculares à Praia da Olaria, da Ilha do Governador.

### **- Niterói**

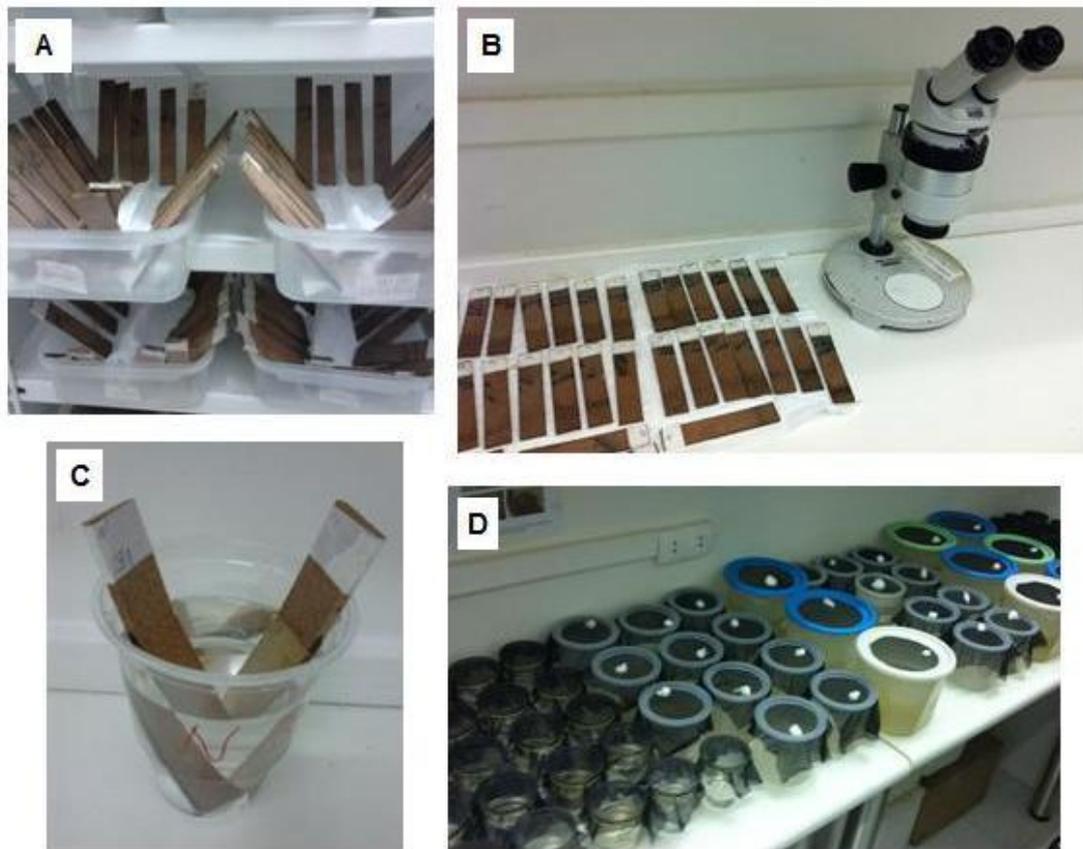
Niterói é um município da região metropolitana do estado do Rio de Janeiro, a 5ª cidade mais populosa, com população estimada de 499.028 pessoas (IBGE, 2011). É o município com maior Índice de Desenvolvimento Humano – IDH (0.837) e densidade demográfica de 3.640 hab/km<sup>2</sup> (NITERÓI, 2018). Os principais acessos a Niterói são pela Ponte Rio - Niterói e pelas linhas de barcas Praça XV - Praça de Araribóia e Praça XV – Charitas. As amostras de mosquitos foram obtidas somente na estação Praça de Araribóia, localizada no centro de Niterói (CCR, 2018c). O porto das barcas é chamado de Estação Praça de Araribóia, em homenagem ao indígena Araribóia, fundador de Niterói, que lutou junto aos portugueses nas batalhas contra os franceses na França Antártida (CARVALHO, 1990). As ovitrampas foram instaladas no centro comercial do centro de Niterói, dentro da estação de barcas na Praça de Araribóia até as ruas perpendiculares à Avenida Ernani do Amaral Peixoto no centro de Niterói.

### **- Itaóca**

Itaóca é um bairro da Zona Oeste do município de São Gonçalo, estado do Rio de Janeiro e é uma região de colônia de pescadores e criadores de suínos. Um dos bairros mais pobres e abandonados do município, tem pouco saneamento básico e vários aterros de lixo. O bairro de Itaóca é conhecido pela Praia da Luz e pela Praia da Caieira, onde há o transporte, não regularizado, de passageiros para a Ilha de Paquetá (SÃO GONÇALO, 2018; WIKIPEDIA, 2017). No entanto, a estação de barcas de Itaóca representa uma grande rota de transporte de pessoas e materiais de consumo entre elas, principalmente de pescado. O município de São Gonçalo teve progresso econômico acelerado a partir do século XVIII, pois se transformou numa rota hidroviária de pessoas e de comércio de produtos agrícolas entre todo o litoral do Rio de Janeiro. A

população de São Gonçalo estimada é de 1.049.826 pessoas, com densidade demográfica de 4.035,90 hab/km<sup>2</sup>, o segundo no ranking do Estado do Rio de Janeiro. O IDH do município de São Gonçalo foi estimado em 0,739 (IBGE, 2011).

Todas as paletas de ovitrampas provenientes do campo foram colocadas para secar (Figura 4.3 A). Após a secagem total, os ovos de *Aedes* de cada paleta foram contabilizados em estereomicroscópio (Figura 4.3 B) e, as paletas positivas, foram organizadas para a eclosão dos ovos. A eclosão foi individualizada por paleta (Figura 4.3 C), as quais foram imersas em água desclorada em copos ou bacias com tamanho adequado à quantidade ovos (Figura 4.3 D). A alimentação das larvas foi com ração para gato (Friskies Purina®) triturada e em proporção adequada para a quantidade de larvas por copo/ bacia. Após a emergência dos alados, utilizou-se um sugador de mosquitos para a triagem e identificação das espécies. A identificação seguiu a chave entomológica de Consoli e Lourenço-de-Oliveira (1994) (CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) (Figura 4.3).



**Figura 4.3:** Procedimentos com as paletas de campo em laboratório. (A) secagem das paletas; (B) contagem dos ovos de *Aedes* em estereomicroscópio; (C, D) eclosão dos ovos de *Aedes* por ovitrampa. Imagens: Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores – LAFICAVE, IOC/FIOCRUZ, localizado no Instituto de Biologia do Exército – IBEX, Benifca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

### 4.3 Avaliação da resistência a inseticidas em *Ae. aegypti*

#### 4.3.1 Bioensaios dose-resposta com inseticidas

Os ensaios do tipo dose-resposta são experimentos realizados para quantificar a resistência dos mosquitos aos inseticidas. Os experimentos consistem na exposição dos espécimes de mosquitos a um gradiente de concentrações de, no mínimo, oito doses do inseticida. Foram utilizados nos ensaios os aduicidas deltametrina (PI) e malathion (OP) e o larvicida temephos (OP), que agem diretamente no sistema nervoso central (SNC).

Os ensaios biológicos de inseticidas com larvas e adultos seguiram os protocolos da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1981; 1986). Foram realizados testes preliminares para todas as populações de *Ae. aegypti* coletadas no verão e no inverno para a avaliação da sensibilidade aos inseticidas e determinação da concentração utilizada nas soluções iniciais, que possibilitassem a mortalidade entre  $\pm 10\%$  e  $\pm 95\%$ . Para cada população de mosquito foi realizado de três a quatro ensaios com inseticidas em dias diferentes.

Todos os ensaios foram calibrados com espécimes de *Ae. aegypti* da linhagem Rockefeller. Esta linhagem é utilizada como controle de qualidade de todos os ensaios realizados em laboratório, executados antes dos experimentos com as populações de campo. A linhagem Rockefeller de *Ae. aegypti* é mundialmente conhecida e utilizada como colônia de referência susceptível, já que amostras de mosquitos foram retiradas de campo e colonizadas em laboratório antes da aplicação dos inseticidas. Em muitos países, esta linhagem tem sido mantida como modelo controle há cerca de 30 anos. Pensa-se que a primeira colônia foi estabelecida pela primeira vez em Havana, Cuba, por Finlay em 1881 e utilizada em estudos de febre amarela nos anos de 1900 e 1901 (KUNO, 2010).

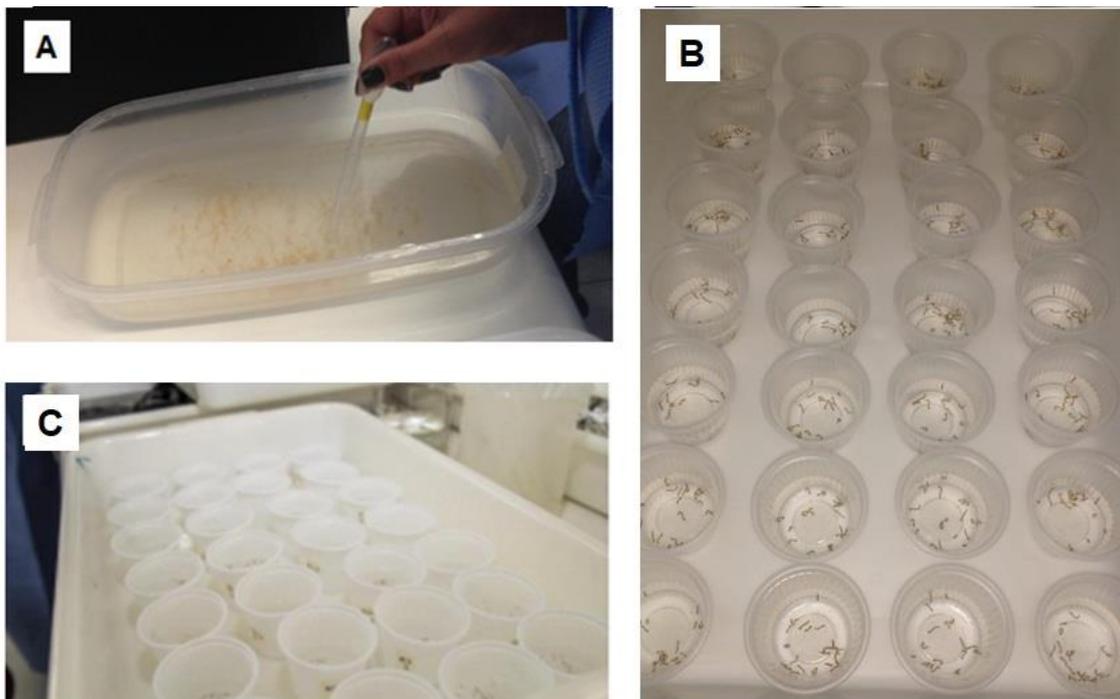
#### **4.3.2 Bioensaios com larvas**

A criação das amostras de *Ae. aegypti* seguiu o protocolo estabelecido pelo Laficave. Para cada bioensaio com larvas, cerca de 1000 ovos (ovos da geração F1) foram induzidos à eclosão “sincronizada” durante 1 h, em 50 mL de água para criação (proveniente de bacias com larvas em desenvolvimento). Seguidamente, as larvas foram transferidas para bacias com 1 L de água desclorada e 1 g de ração para alimentação de gatos da marca Friskies® e mantidas sob temperatura e umidade controladas ( $26\pm 1$  °C;  $80\pm 10$  %) em incubadora do tipo *Biochemical Oxygen Demand* - BOD. As larvas foram criadas até o terceiro estágio e então selecionadas como amostragem para execução dos experimentos.

A resistência ao temephos foi avaliada a partir de testes com larvas de terceiro estágio de *Ae. aegypti*. As amostras foram previamente separadas em grupos de 20 espécimes em 20 mL de água desclorada (Figura 4.4 A, B). Ao total, cerca de 800 larvas foram utilizadas por ensaio.

As soluções de temephos Pestanal® (Sigma-Aldrich) foram diluídas em etanol absoluto. Para todas as populações testadas, foi utilizado gradientes com, no mínimo, 10 concentrações/dose do larvicida, que variou de 0,0090 a 0,1080 mg/L. Cada dose do OP foi testada em quatro replicatas, em volume final de 100 mL de solução (Figura 4.4 C). Para o controle, foram utilizados quatro replicatas com 20 espécimes cada, contendo apenas etanol e água filtrada.

As larvas ficaram expostas por 24 h ao larvicida. Dessa maneira, a leitura do ensaio foi realizada após esse período, quando foram computados o número de larvas vivas e mortas para cada concentração.



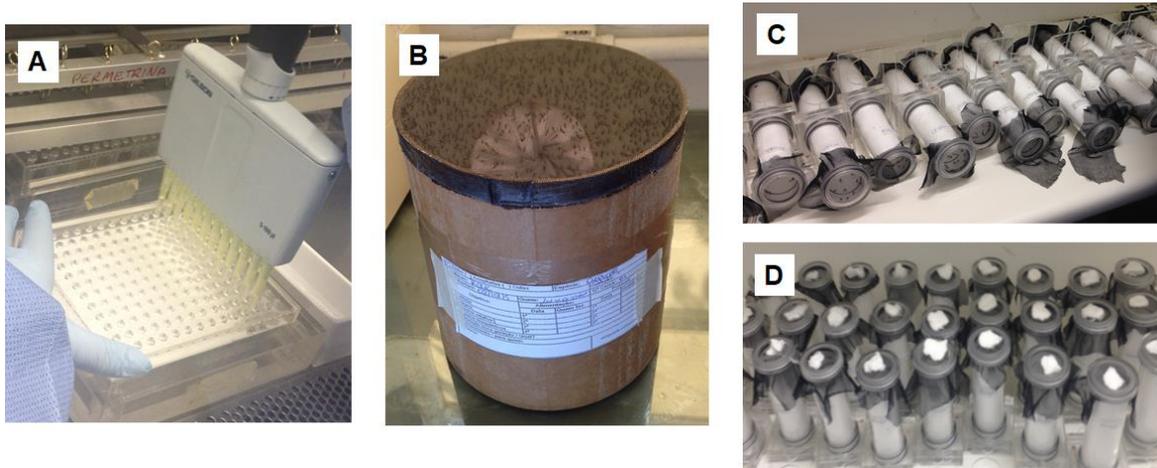
**Figura 4.4:** Procedimento para a execução de bioensaio de larvas de *Ae. aegypti* com temephos (OP). (A, B) Separação das larvas de *Ae. aegypti* em copos com 20 mL de água desclorada; (C) Replicatas do gradiente de concentrações do larvicida. Imagens: Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores – LAFICAVE, IOC/FIOCRUZ, localizado no Instituto de Biologia do Exército – IBEX, Benifca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

### 4.3.3 Bioensaios com adultos

Para cada bioensaio com adultos, aproximadamente 3000 ovos (ovos da geração F1) foram induzidos à eclosão “sincronizada” durante 1 h, em 50 mL de água para criação. Após a eclosão, as larvas foram distribuídas para bacias com até mil larvas cada, com 1 L de água desclorada e 1 g de ração para alimentação de gatos da marca Friskies® e mantidas sob temperatura e umidade controladas ( $26\pm 1$  °C;  $80\pm 10$  %) em incubadora BOD. As pupas foram transferidas para gaiolas e mantidas até a emergência dos adultos e alimentadas apenas com solução açucarada (10%). Cerca de 600 fêmeas de *Ae. aegypti* de até cinco dias após emergência foram selecionadas para os experimentos.

Os ensaios foram realizados com papéis impregnados com deltametrina Pestanal® (Sigma-Aldrich) e malathion (Bayer®). Os inseticidas foram impregnados em papel filtro Whatman 1 mm (14x12 cm) e solvente óleo de silicone (*Dow Corning 556*) (Figura 4.4 A) em diferentes concentrações. Para todas as populações testadas, foram utilizadas concentrações variando de 5 a 125 mg/m<sup>2</sup> de deltametrina e 1 a 11 g/m<sup>2</sup> de malathion.

Após a secagem total dos papéis, os tubos de acrílico (kit OMS) foram revestidos e identificados segundo a dosagem de inseticida. As fêmeas de *Ae. aegypti* foram previamente separadas e alocadas em gaiolas para, em seguida, serem utilizadas nos ensaios (Figura 4.5 B). Foram expostas o total de 45 a 65 fêmeas de *Ae. aegypti* por ensaio, de 15 a 20 fêmeas por tubo, distribuídas em três replicatas para cada dose e três tubos-controle contendo papel impregnado apenas com solvente de silicone (Figura 4.5 C). Após uma hora de exposição ao inseticida, as fêmeas de *Ae. aegypti* foram transferidas para tubos de descanso, onde foram deixadas até o dia seguinte e completar 24 h após a exposição ao inseticida para a quantificação da mortalidade. Os tubos de descanso foram revestidos somente com papel filtro e foi oferecida solução açucarada à 10% para as fêmeas de *Ae. aegypti* (Figura 4.5 D). Nos ensaios com deltametrina, os indivíduos mortos (caídos ou moribundos) foram quantificados para a averiguação do efeito *knockdown*, após uma hora de exposição ao inseticida.



**Figura 4.5:** Procedimento para a execução de bioensaio de adultos de *Ae. aegypti* com deltametrina (PI) e malathion (OP). (A) impregnação do inseticida em papel; (B) gaiola com fêmeas de *Ae. aegypti* selecionadas para o ensaio; (C) kits de tubos de ensaio padrão OMS, sendo um lado para a exposição de *Ae. aegypti* ao papel impregnado com inseticida e o outro lado para descanso de *Ae. aegypti*; (D) tubos de descanso e solução açucarada à 10% com fêmeas do mosquito, durante o experimento. Imagens: Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores – LAFICAVE, IOC/FIOCRUZ, localizado no Instituto de Biologia do Exército – IBEX, Benifca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

#### 4.3.4 Análise dos resultados dos bioensaios

Após a realização dos bioensaios dose-resposta, foi calculada a mortalidade total de fêmeas de *Ae. aegypti* para cada um dos três inseticidas testados (temephos, deltametrina e malathion) e aplicadas na determinação das concentrações letais (CL).

As CLs foram calculadas através de análise por transformação  $\log x$  *probit* (BLISS, 1935; FINNEY, 1952) seguida de regressão linear, realizadas pelo *software* desenvolvido por Raymond (1985). A análise *probit* é um método estatístico que estima doses críticas de um determinado composto químico em ensaios do tipo dose-resposta.

A partir das CLs, sendo as mais significativas  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$ , calculam-se as razões de resistência (RR), as quais são valores que quantificam os níveis de resistência das populações do vetor. As RRs são obtidas a partir da divisão da CL da população de campo pela CL equivalente da linhagem susceptível.

Os gráficos da análise *probit* apresentando a curva de resistência foram obtidos pelo programa *GraphPad Prism 6.0*.

### 4.3.5 Estimativa das frequências das mutações *kdr* em *Ae. aegypti*

#### 4.3.5.1 Extração de DNA genômico de *Ae. aegypti*

De cada população de *Ae. aegypti* coletada nas cinco áreas portuárias da região metropolitana do Rio de Janeiro. Em torno de 30 larvas (F0), provenientes de coletas realizadas durante as estações do verão e inverno do ano de 2014 foram utilizados na extração do DNA genômico. O protocolo de extração foi à base de cetyl trimethylammonium bromide - CTAB (Sigma Aldrich®), segundo o protocolo estabelecido no Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas (LBCS/ IOC/ FIOCRUZ).

As larvas de *Ae. aegypti* foram maceradas individualmente em microtubos de 1,5 mL com 150 µL de tampão CTAB (100mM Tris, 20mM EDTA, 1.42M NaCl e 2% CTAB) e adicionou-se proteinase K (10 mg/mL). As amostras de *Ae. aegypti* foram incubadas em banho-maria a 60°C por 1 h. Em seguida, adicionou-se 150 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), os tubos foram agitados e centrifugados a 13000 rpm (rotações por minuto), por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado 200 µL de etanol absoluto gelado e 5 µL de cloreto de sódio (5M). Após a precipitação em freezer *overnight* ( $\pm$  10 h), as amostras de *Ae. aegypti* foram centrifugadas a 14000 rpm, por 20 min. O sobrenadante foi descartado e adicionado 400 µL de etanol 70% ao *pellet* de DNA e novamente centrifugados por 10 min a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado pela segunda vez e o *pellet* deixado para a secagem por 20 min em temperatura ambiente ( $\pm$  24 °C). O DNA foi ressuscitado em 60 µL de água ultrapura Mili-Q e armazenado à -20 °C.

A qualidade de cada amostra de DNA de *Ae. aegypti* foi verificada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*ThermoFisher Scientific*®) e as amostras aliqüotadas em placas de 96 poços.

#### 4.3.5.2 Genotipagem e avaliação dos sítios mutantes Val1016Ile e Phe1534Cys em *Ae. aegypti*

A detecção dos alelos das mutações *kdr* relacionados à resistência a piretroides foram realizadas através de genotipagens de *Single Nucleotide Polymorphism - SNP* por meio da qPCR alelo específica (*Real Time – Polymerase Chain Reaction*) de *Ae. aegypti*. Para as reações foram utilizadas o kit *TaqMan® Genotyping Master Mix – Applied Biosystems* (BIOSYSTEMS, 2017).

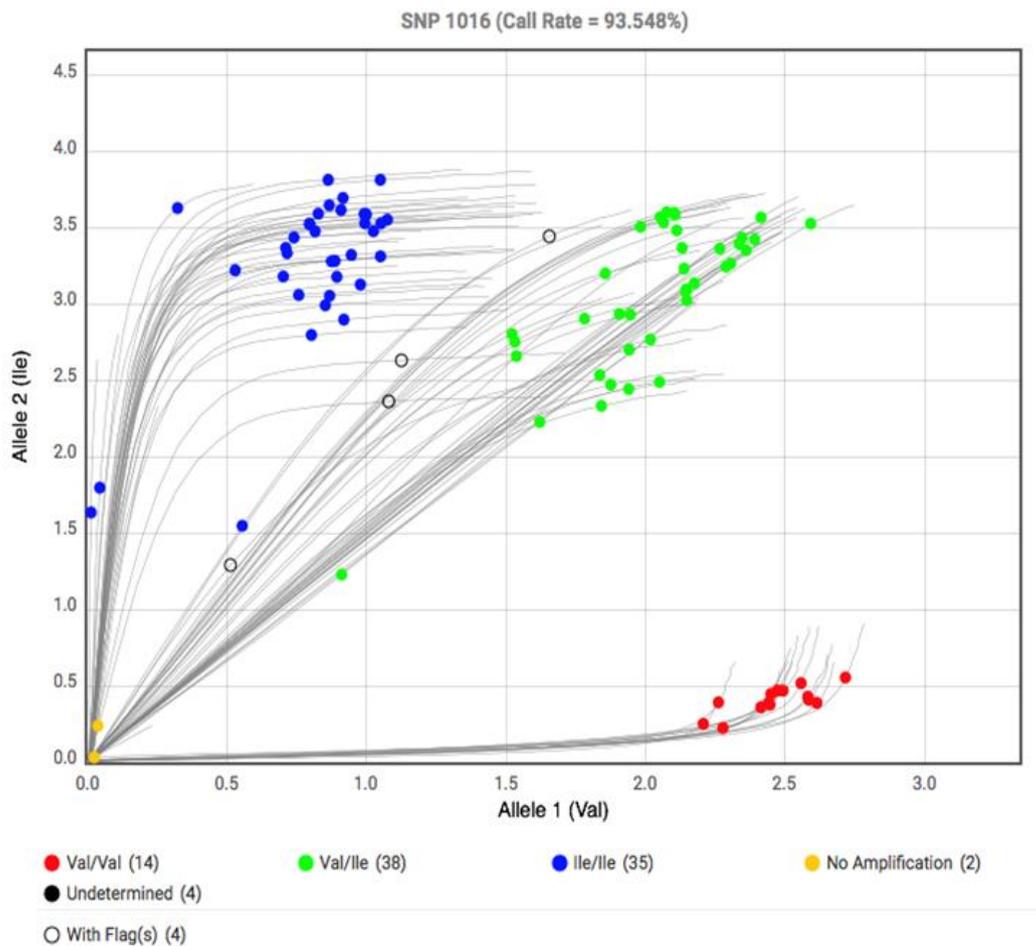
As mutações consistem na substituição de um aminoácido valina (Val) por uma isoleucina (Ile) e na substituição de uma fenilalanina (Phe) por uma cisteína (Cys), no gene que codifica o canal de sódio regulado por voltagem em *Ae. aegypti* (*AaNav*), localizados nas posições 1016 (Val1016Ile) e 1534 (Phe1534Cys), respectivamente.

As reações de genotipagem aconteceram para ambos os sítios em PCRs diferentes, com a utilização de sondas *TaqMan* (Tabela 4.3), compostas por uma molécula de fluoróforo (FAM, VIC, HEX e/ou NED) e uma molécula supressora *quencher*, cuja função é ativar ou reprimir o fluoróforo. Foi previamente estabelecida uma fluorescência específica para cada possível genótipo, como exemplificado na Figura 4.6 (BIOSYSTEMS, 2017).

**Tabela 4.3:** Sequência nucleotídica dos *primers* e das sondas utilizadas nas genotipagens por meio de RT - PCR alelo específicas para os sítios 1016 e 1534 que codificam o canal de sódio regulado por voltagem *Nav* em *Ae. aegypti*.

Sítio	Primer / Sonda	Sequência nucleotídica
1016	<i>Forward</i>	5' CGTGCTAACCGACAAATTGTTTCC 3'
	<i>Reverse</i>	5' GACAAAAGCAAGGCTAAGAAAAGG T
	Sonda Val <sup>+</sup>	VIC - 5' CCCGCACAGGTACCTTA 3' - NFQ
	Sonda Ile <sup>kdr</sup>	FAM - 5' CCGCACAGATACTTA 3' - NFQ
1534	<i>Forward</i>	5'CGAGACCAACATCTACATGTACCT 3'
	<i>Reverse</i>	5'GATGATGACACCGATGAACAGATTC 3'
	Sonda Phe <sup>+</sup>	FAM – 5'ACGACCCGAAGATGA 3' - NFQ
	Sonda Cys <sup>kdr</sup>	VIC – 5'AACGACCCGCAGATGA 3' - NFQ

NFQ = *NonFluorescent Quencher* – molécula que proporciona maior sensibilidade na amplificação e melhor precisão na quantificação do alelo (BIOSYSTEMS, 2017).

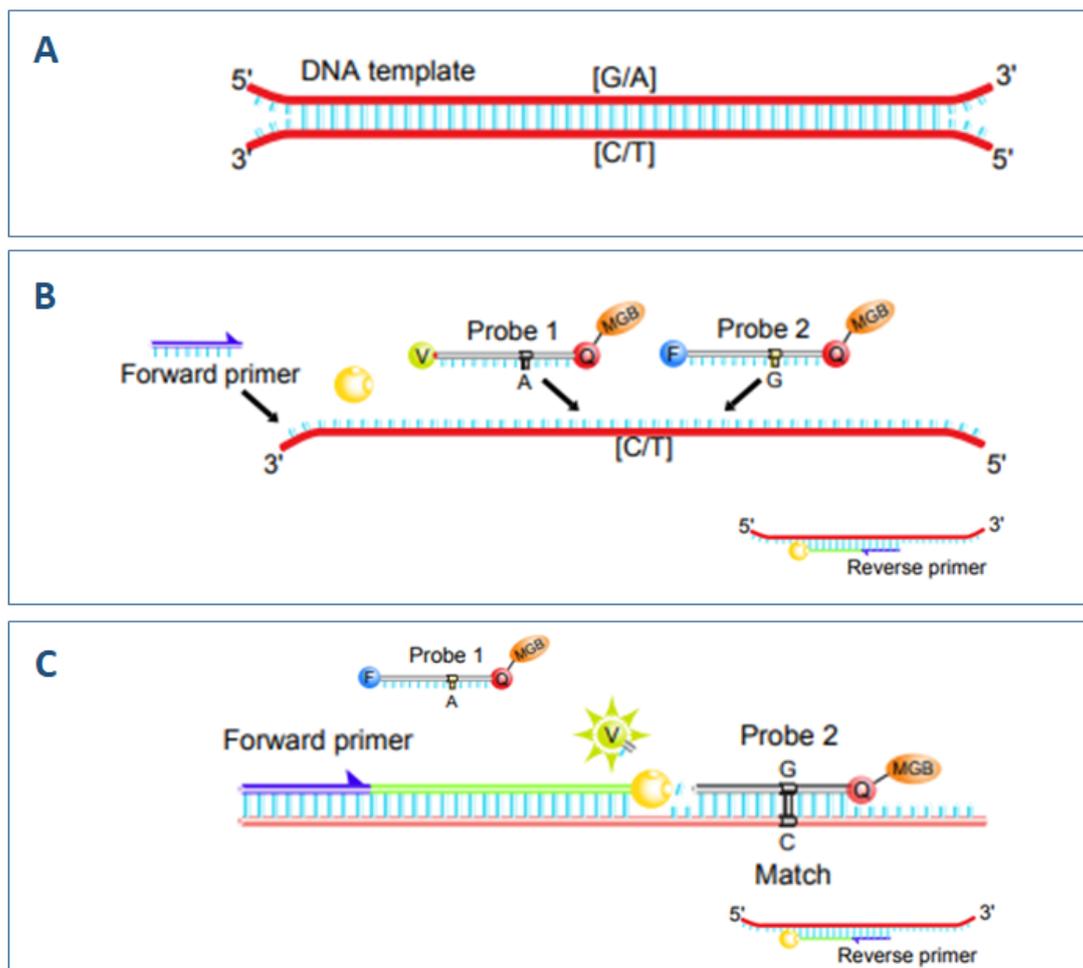


**Figura 4.6:** Gráfico com discriminação dos resultados dos alelos plotados durante a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real com *TaqMan* (BIOSYSTEMS, 2017).

A identificação dos alelos mutantes/ selvagens acontece a partir do anelamento de *primers* específicos para cada sítio, como listado na Tabela 4.3; e a amplificação da região flanqueada inicia-se com o anelamento dos *primers* e a hibridização das sondas *TaqMan* à sequência de DNA alvo, complementar aos alelos dos SNPs (1016 ou 1534). Com isso, a *Taq* Polimerase degrada a *TaqMan*, polimeriza a região alvo e o fluoróforo presente na sonda se desliga, gerando um sinal de fluorescência. Esse sinal é referente à amplificação da região alvo, indicando o alelo correspondente a cada espécime do mosquito (Figura 4.7; Tabela 4.4).

**Tabela 4.4:** Classificação dos alelos e genótipos referentes ao gene que codifica o canal de sódio regulado por voltagem *kdr* em *Ae. aegypti* (LINSS et al., 2014).

Val 1016 Ile	Phe 1534 Cys	Alelo	Genótipo	Alelo	Fenótipo
1016Val <sup>+</sup>	1534Phe <sup>+</sup>	<i>Nav<sup>S</sup></i>		Selvagem	
1016Val <sup>+</sup>	1534Cys <sup><i>kdr</i></sup>	<i>Nav<sup>R1</sup></i>		Mutante - sítio 1534	
1016Ile <sup><i>kdr</i></sup>	1534Cys <sup><i>kdr</i></sup>	<i>Nav<sup>R2</sup></i>		Mutante - sítios 1016 e 1534	
Val / Val	Phe / Phe		SS		Susceptível
Val / Val	Phe / Cys		SR1		Susceptível
Val / Ile	Phe / Cys		SR2		Susceptível
Val / Ile	Phe / Cys		R1R1		Resistente – sítio 1534
Val / Ile	Cys / Cys		R1R2		Resistente - sítio 1534
Ile / Ile	Cys / Cys		R2R2		Resistente - sítios 1016 e 1534



**Figura 4.7:** Representação de uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o kit *TaqMan® Genotyping Master Mix – Applied Biosystems*. (A) dupla fita de DNA alvo; (B) fita de DNA desnaturada e reconhecimento da região alvo à ser amplificada; anelamento dos *primers forward* e *reverse* e hibridização da sonda (C) polimerização da fita de DNA a partir do *primer*, degradação da sonda com a liberação do fluoróforo, acendendo o sinal verde (fluorescência HEX). Fonte: *TaqMan® SNP Genotyping Assays User Guide* (BIOSYSTEMS, 2017).

As reações de PCR para cada sítio (SNP 1016 e 1534) foram realizadas, separadamente, seguindo o protocolo estabelecido por Linss et al (2014). Para o sítio 1534, utilizou-se com 0,5x do kit *TaqMan® Genotyping Master Mix – Applied Biosystems*, 1 x do kit *TaqMan® SNP assay*, o qual contém as sondas específicas para os alelos Phe e Cys e os *primers* e 1 µL de DNA genômico de cada espécime de *Ae. aegypti*. Para completar o volume final de 10 µL, foi adicionado água ultrapura Milli-Q. Para o sítio 1016, foram utilizados os mesmos reagentes, porém 1x kit *TaqMan® Genotyping Master Mix* e o kit *TaqMan® SNP*

assay, que continha as sondas específicas para os alelos Val e Ile e os *primers*. Foram genotipados cerca de 30 indivíduos de *Ae. aegypti* de cada população, de cada estação (verão e inverno), totalizando 60 espécimes para cada população. Foi usado controle positivo (genótipos selvagem, mutante e heterozigoto) e controle negativo de *Ae. aegypti*.

As PCRs foram realizadas em 45 ciclos em termociclador *Real Time QuantStudio® Flex System – ThermoFischer Scientific®*, nas seguintes condições de amplificação: 95 °C por 15 segundos de desnaturação e o anelamento dos *primers* em 60 °C por um minuto, seguido de 60 °C por 30 segundos de extensão final.

Após as genotipagens, os genótipos referentes às amostras de *Ae. aegypti* foram analisadas, conforme a classificação descrita na Tabela 4.3 e os dados organizados em planilhas pelo *software* Excel Microsoft®. Posteriormente, os resultados das frequências gênicas e genóticas foram aplicados em gráficos elaborados no *software* GraphPad Prisma®.

#### **4.4 Análise da variabilidade genética de *Ae. aegypti* com marcadores microssatélites**

##### **4.4.1 Obtenção de genótipos derivados de loci microssatélites**

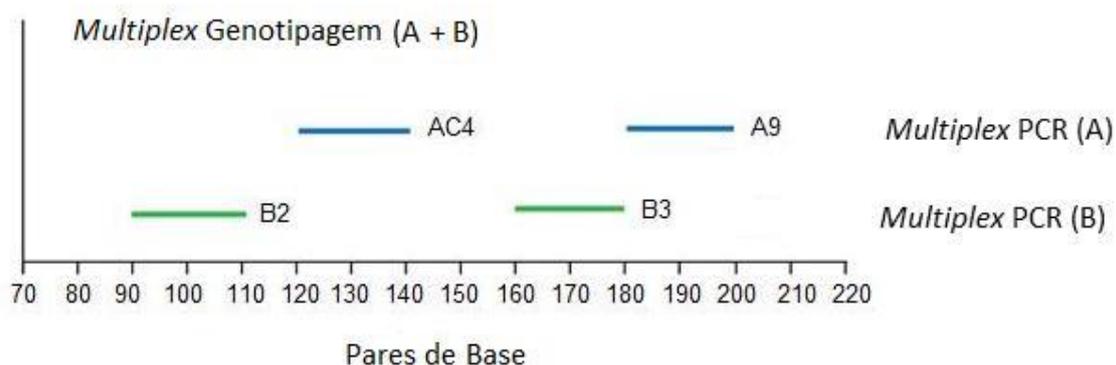
Um total de 30 larvas de *Ae. aegypti* por localidade foram utilizadas para a extração de DNA genômico, conforme detalhado no Item 4.3.5.1.

Foram analisados 12 marcadores microssatélites (BROWN et al., 2011; SLOTMAN et al., 2007), os quais foram caracterizados como polimórficos e eficientes para estudos de populações brasileiras de *Ae. aegypti* (KOTSAKIOZI et al., 2017; MONTEIRO et al., 2014). A genotipagem utilizando estes *primers* foi padronizada no laboratório do Dr. Jeffrey Powell da Yale University, New Haven, Connecticut, Estados Unidos da América (BROWN et al., 2011).

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram sintetizados de acordo com o protocolo econômico de genotipagem desenvolvido por Schuelke (2000) (SCHUELKE, 2000). O protocolo consiste na inserção de uma sequência

universal fluorescent M13 (5'-3') no *primer forward*, o qual se anela em uma sequência de primer complementar marcada com fluorescências (FAM - fluorescência azul ou HEX - fluorescência verde) que permitirão a visualização dos alelos referentes aos fragmentos microssatélites. Com essa metodologia é possível minimizar os custos na síntese dos *primers*.

As ampliações dos 12 *loci* foram realizadas por meio de PCR *multiplex* em termociclador *Veriti Applied Biosystems*<sup>®</sup>, separadamente para cada estação de coleta (inverno e verão/2014). As reações *multiplex*, conforme a ilustração da Figura 4.8, foram preparadas com a organização de dois *loci* por reação, levando em consideração o tamanho e a cor da fluorescência, para evitar sobreposição dos alelos, seguindo o protocolo estabelecido por Brown et al. (2011) (BROWN et al., 2011) (Tabela 4.5).



**Figura 4.8:** Exemplos de uma combinação de *loci* utilizados nas PCRs e genotipagens *multiplex* de *Ae. aegypti*, com os possíveis tamanhos de alelos que cada *locus* pode apresentar em pares de bases. Bandas azuis (fluorescência FAM), bandas verdes (fluorescências HEX). Fonte: (LIMA, 2017), com modificações.

Os ciclos de ampliações iniciaram-se com uma incubação a 94 °C por 10 minutos, seguindo de 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos para a desnaturação; 54 °C por 30 segundos para o anelamento dos *primers*; 72 °C por 30 segundos de extensão, finalizando com 72 °C durante 5 minutos (SLOTMAN et al., 2007). Esses microssatélites foram amplificados em 10 µL de volume final, utilizando 1 × Type-it PCR Master Mix (Qiagen<sup>®</sup>), 25 nM dos *primers forward*, 250 nM dos *primers reverse*, 500 nM do primer M13 marcado com fluorescência

e 1  $\mu$ L de DNA genômico. Todas as amostras foram previamente diluídas igualmente na proporção 1:10, com concentração de aproximadamente 10 ng.

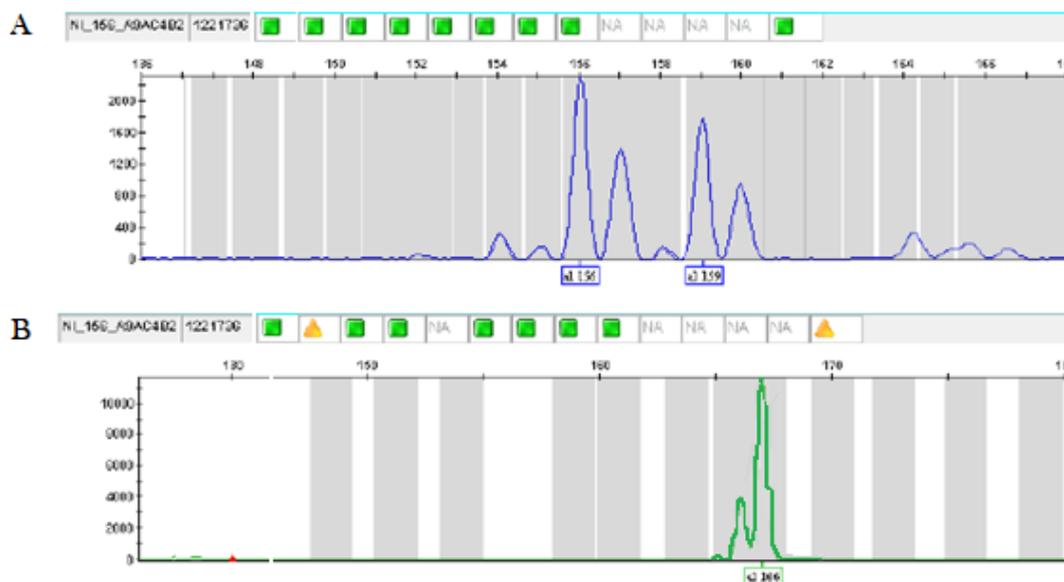
Seguida à amplificação, todas as amostras foram genotipadas por eletroforese capilar em um sequenciador ABI 3500 (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>) cedido pelo Dr. Rodolpho Mattos Albano do Laboratório Genoma da Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ. Essas genotipagens também foram feitas em sistema *multiplex* (Figura 4.8) em três grupos de quatro *loci* cada (Tabela 4.5). Antes das genotipagens todos os produtos de PCR foram diluídos 1:90  $\mu$ L em água ultra pura, misturados com marcador de tamanho padrão *GeneScan* ROX500-pb (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>) e formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*<sup>®</sup>). As amostras foram então desnaturadas durante 2 minutos a 95 °C e imediatamente colocadas em gelo.

**Tabela 4.5:** Descrição dos grupos *multiplex* utilizados nas PCRs e genotipagens, nome e sequência dos *primers*, motivos de repetição e fonte bibliográfica referente aos 12 *loci* microssatélites utilizados nas análises da variabilidade e estrutura genética de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil.

<i>Multiplex</i> PCR	<i>Locus</i>	Motivo de repetição	Sequência do <i>primer</i> (5' - 3')	<i>Multiplex</i> Genotipagem	Fonte
A	A9	TRI	F: FAMTCCCAGTCACGACGTGCAGCATGCACTTCACATTT R: CGAATGGCATCTGATTCAAG	1 (A + B)	2
	AC4	DI	F: FAMTCCCAGTCACGACGTGCGAATCGGTCCCATAGTA R: CTTTATCGATCGACGCCATT		1
B	B2	TRI	F: HEXTCCCAGTCACGACGTGAAAACACTTGCAGGGACAT R: GCAGATGGTGGCAGTAGTA	2	2
	B3	TRI	F: HEXTCCCAGTCACGACGTGCAAGTTGCAAAGTGCTCAA R: ACCCACCGTTTGCTTTGTAG		2
C	AC1	DI	F: FAMTCCCAGTCACGACGTTCGGTGGGTTAAGGATAGA R: ACTTCACGCTCCAGCAATCT	2 (C + D)	1
	AC5	DI	F: FAMTCCCAGTCACGACGTGGATTGTTCTTAACAAACACGAT R: CGATCTCACTACGGGTTTCG		1
D	AG1	DI	F: HEXTCCCAGTCACGACGTAATCCCCACACAAACACACC R: GGCCGTGGTGTACTCTCTC	1	1
	AG5	DI	F: HEXTCCCAGTCACGACGTTGATCTTGAGAAGGCATCCA R: CGTTATCCTTTCATCACTTGTGTTG		1
E	A1	TRI	F: FAMTCCCAGTCACGACGTGACGTAAACCGAGTGGGAGA R: GCATTTAACCGCGCTAGAAC	3 (E + F)	2
	AC2	DI	F: FAMTCCCAGTCACGACGTAATACAACGCGATCGACTCC R: AACGATTAGCTGCTCCGAAA		1
F	CT2	DI	F: HEXTCCCAGTCACGACGTGCGCAGTAGGCGATATTCGTT R: ACCACCACCAACACCATTCT	1	1
	AG2	DI	F: HEXTCCCAGTCACGACGTTCCCTTTCAAACCTAATGG R: TTTGCCCTCGTATGCTCTCT		1

Fonte 1: Slotman et al (2007); Fonte 2: Brown et al (2011).

Os resultados foram analisados com o software *GeneMapper 3.7* (*Applied Biosystems*®), onde avaliamos o perfil dos picos e tamanho de alelos para cada *locus* (Figura 4.9).



**Figura 4.9:** Exemplos de eletroferogramas de alelos microssatélites de *Ae. aegypti*. (A) indivíduo heterozigoto (alelos 156 e 159) para o *locus* AC5 com fluorescência FAM; (B) indivíduo homozigoto (alelo 166) para o *locus* B3 com fluorescência HEX.

#### 4.4.2 Análise dos parâmetros evolutivos

##### 4.2.2.1 Análise da diversidade genética intrapopulacional de *Ae. aegypti*

Os resultados obtidos nas genotipagens foram exportados para o software *GenAlEx v6.5* (PEAKALL; SMOUSE, 2012) na plataforma *Microsoft Excel*® onde foi elaborada uma matriz de genótipos para cada *locus* em cada população. Foi calculado o número de alelos (A) e frequências gênicas para todos os *loci* em todas as populações. Em seguida, os genótipos foram exportados para outros softwares para análises genéticas subsequentes.

Com o auxílio do software *Genepop v1.2* (RAYMOND; ROUSSET, 1995; ROUSSET, 2008), o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e o desequilíbrio de ligação (DL) foram verificados com os seguintes parâmetros da cadeia de

Markov: 10000 demorizações, 1000 *batches*, 10000 iterações. O método sequencial de Bonferroni para testes múltiplos (RICE, 1989) foi utilizado para corrigir os níveis de significância para o teste de EHW ( $p=0,05/144$ ,  $\leq 0,0003$ ). As heterozigosidades esperadas e observadas ( $H_E$  e  $H_o$ ) para cada população foram calculadas usando o *software* Arlequin v3.5.1.2 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005). A riqueza alélica (RA) e o número de alelos encontrado por *locus* foi quantificada pelo método de rarefação de alelos privados, no *software* *Hp-rare* (KALINOWSKI, 2005). Neste mesmo programa foi avaliada a presença de alelos privados ( $N_P$ ), por população e por *locus*. A probabilidade de alelos nulos foi avaliada pelo Micro-checker v2.2.3 (OOSTERHOUT et al., 2004). É importante quantificar esta probabilidade, pois a presença de alelos nulos pode afetar a estimativa da diferenciação populacional, reduzindo a diversidade genética dentro das populações (CHAPUIS; ESTOUP, 2007).

#### **4.2.2.2 Estrutura genética das populações de *Ae. aegypti***

A fim de verificar a existência de estrutura genética entre as seis populações de *Ae. aegypti* amostradas, obteve-se uma matriz com valores de  $F_{ST}$  (WRIGHT, 1951) par-a-par e sua significância com auxílio do *software* Arlequin v3.5.1.2 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005), com 1000 permutações. A análise de variância molecular (AMOVA) (MICHALAKIS; EXCOFFIER, 1996) foi realizada para avaliar o grau de diferenciação genética entre as localidades estudadas, inter e intrapopulacional, a partir da distância genética estimada pelos valores de  $F_{ST}$ .

Para as análises bayesianas de estrutura populacional, foi utilizado o *software* *Structure* v2.3 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), para inferir o número de classes genéticas (K) em todas as populações de *Ae. aegypti* analisadas. Foram utilizadas 10 corridas (réplicas) independentes para cada valor de K (que variou de 1 ao número total de populações avaliadas). Os valores de corte (*burn in*) foram de 100000 permutações e 600000 simulações em cadeias de Monte Carlo (MCMC), para atingir o melhor número de classes. Em seguida, os resultados foram analisados pelo *Structure Harvester* v0.694

(EARL; VONHOLDT, 2012), disponível no site: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>, onde foi elaborado o gráfico de  $\Delta K$ , constando o número provável de grupos genéticos (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005). A partir desse último foram gerados os arquivos de saída para serem usados nos softwares *Clumpp* (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) e *Distruct* (ROSENBERG, 2003), onde é feito um resumo das 10 corridas feitas no programa *Structure* e o gráfico representativo da estrutura genética das populações é gerado.

#### **4.5 Atividades de treinamento e capacitação em controle de mosquitos vetores - Brasil Sem Miséria (BSM)**

O estudo foi inserido no contexto do Programa Brasil sem Miséria (BSM). Promovemos oficinas de sensibilização, treinamento e capacitação de AVS e agentes comunitário em saúde (ACS) sobre a biologia e controle de mosquitos vetores. Estes agentes estão em contato direto com os moradores e frequentadores da Ilha, o que os torna multiplicadores de informação e promoção da saúde. Diante disso, nossa proposta foi utilizar os dados de densidade de ovos de *Aedes* como suporte informativo e de sensibilização da população paquetaense acerca dos cuidados contra o mosquito. Para tanto, mapas de calor (kernel) foram elaborados identificando as áreas com maior e menor infestação em Paquetá I de outubro de 2016 a março de 2017 e distribuídos aos moradores. A entrega dos mapas foi realizada pelos ACS durante a rotina de visita domiciliar.

## 5. RESULTADOS

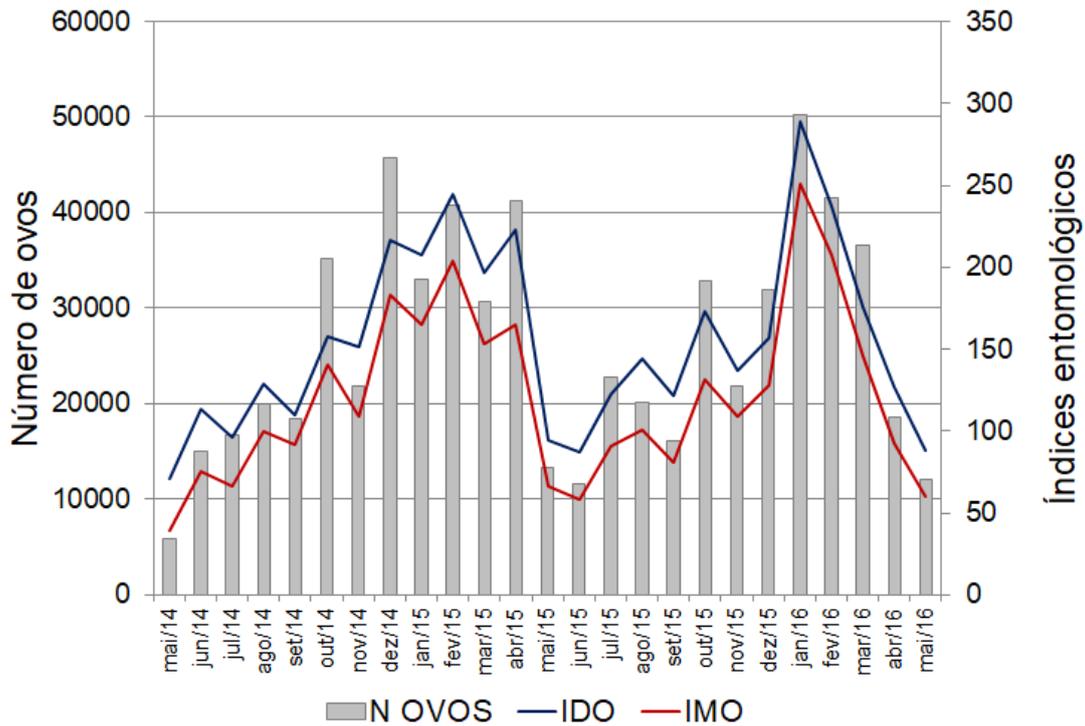
### 5.1 Monitoramento e direcionamento do controle na Ilha de Paquetá

#### 5.1.1 Distribuição espacial de *Aedes* na área de estudo (Paquetá I)

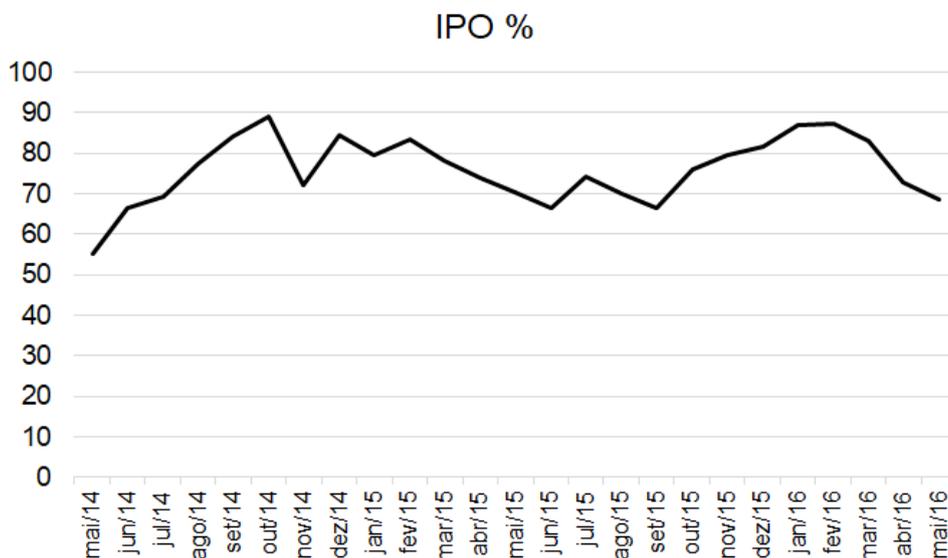
Na Figura 5.1 estão apresentados os resultados obtidos através de 50 ovitrampas instaladas em Paquetá I durante 25 meses, de maio de 2014 a maio de 2016 (107 semanas). Foram obtidos mais de 760.000 ovos de *Aedes*, gerando uma média global de 126 ovos por ovitrampa/ semana e 4.927 ovos/ ovitrampa durante todo período. A sazonalidade dos níveis de infestação foi bem visível, com picos elevados nos períodos mais quentes do ano, entre os meses de outubro a abril. O IDO variou de 70,8 (mai/14) a 288,8 (jan/16).

Durante todo o período de monitoramento da densidade de *Aedes* em Paquetá I, as 50 ovitrampas instaladas sempre estiveram com o IPO elevado, acima de 50%, variando de 55% (mai/14) a 89% (out/14) (Figura 5.2). O valor para a positividade das ovitrampas foi considerada na presença na paleta de apenas um ovo, o que foi incomum de acontecer, considerando que as paletas geralmente continham muitos ovos, principalmente nos meses mais quentes e chuvosos.

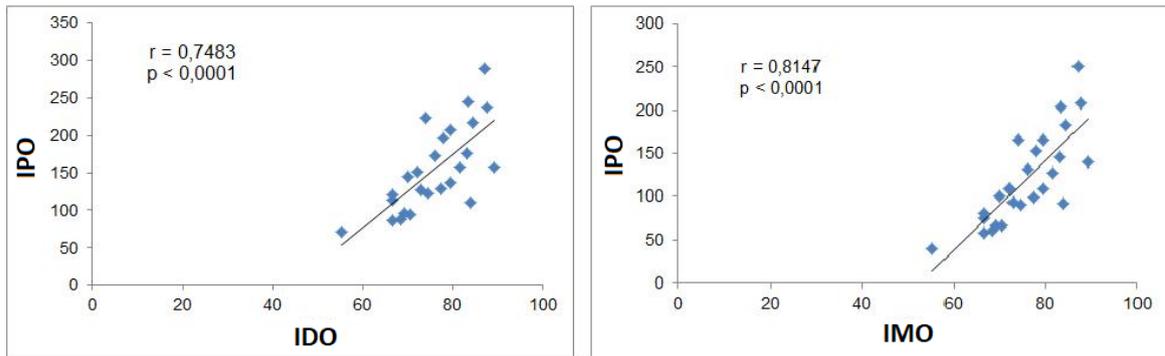
A análise de correlação mostrou que houve associação significativa entre o IPO e o IDO ( $r= 0,748$ ;  $p<0.001$ ) e do IPO e IMO ( $r= 0,814$ ;  $p<0.001$ ), durante o período estudado (Figura 5.3).



**Figura 5.1:** Dinâmica temporal de *Aedes* em Paquetá I (bairro Ponte) da Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. Índice de Densidade de Ovos - IDO (linha azul), Índice Médio de Ovos – IMO (linha vermelha) e número de ovos mensal - n ovos (barras cinzas).

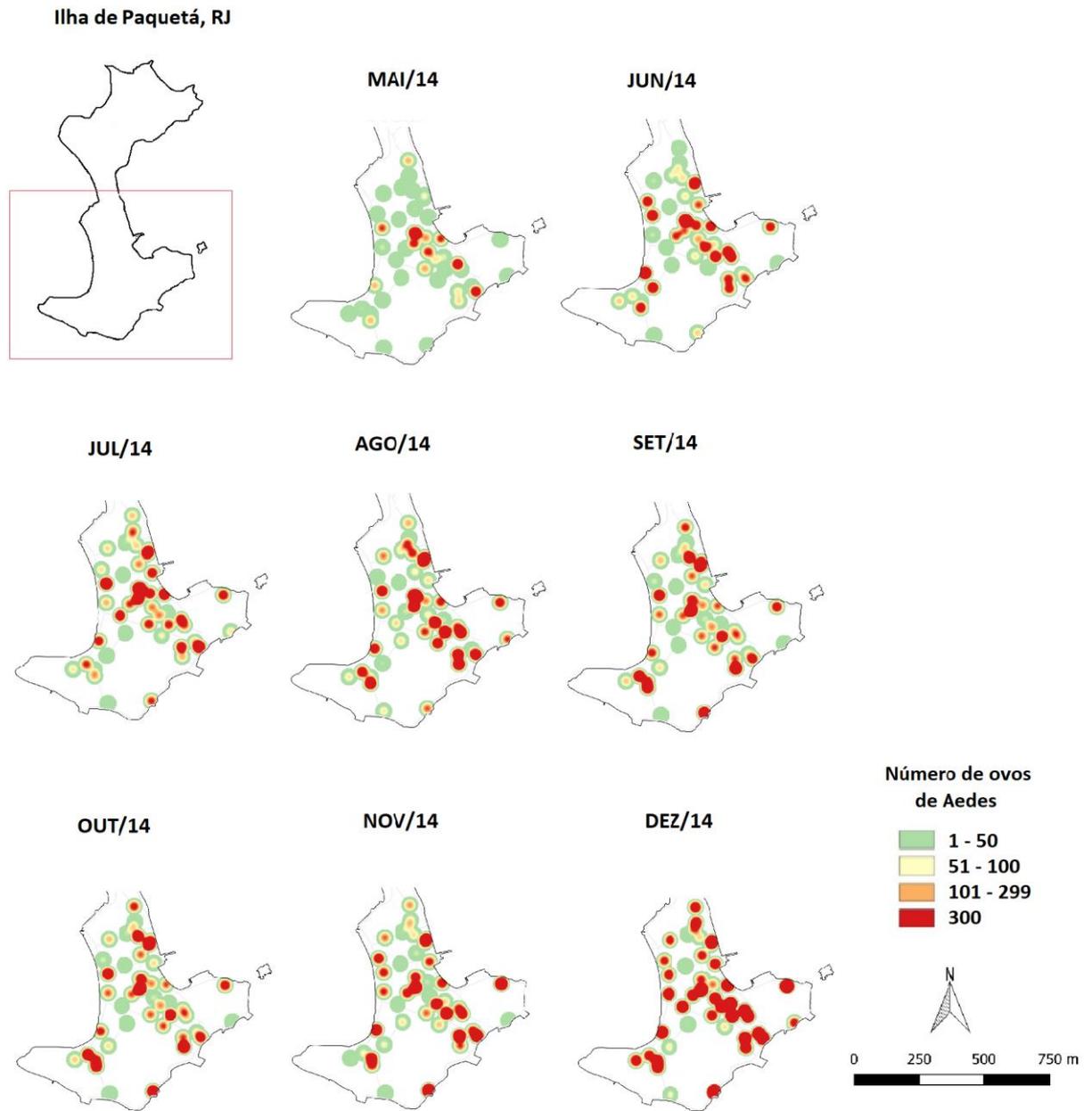


**Figura 5.2:** Dinâmica temporal do índice de positividade de ovitampas de *Aedes* em Paquetá I (bairro Ponte) da Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. Índice de Positividade de Ovitampas - IPO (linha preta).

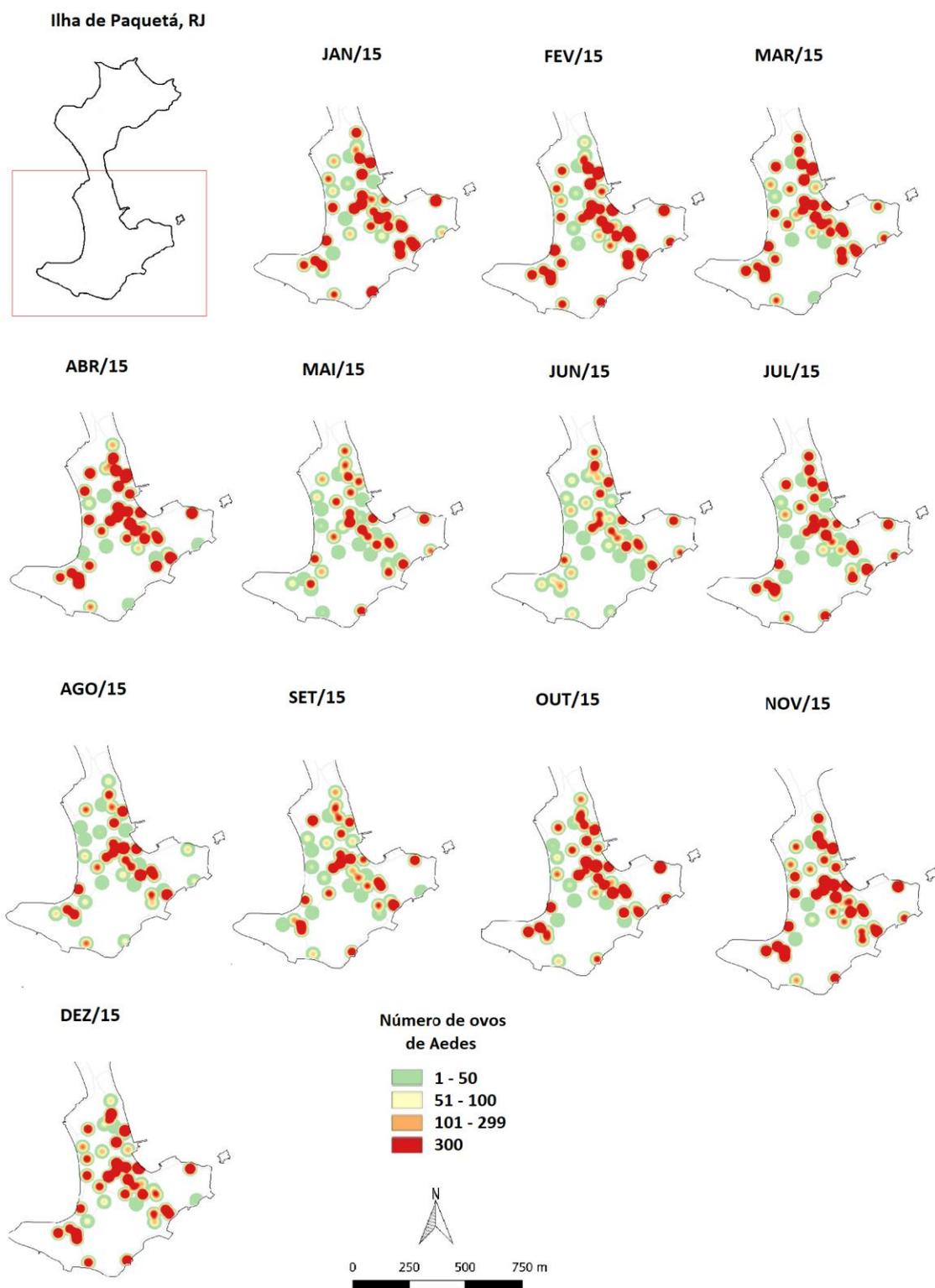


**Figura 5.3:** Correlação entre os índices de infestação para *Aedes* – Índice de Positividade de Ovitrapas (IPO) x Índice de Densidade de Ovos (IDO) e IPO x Índice Médio de Ovos (IMO), avaliados para Paquetá I (bairro Ponte), Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016.

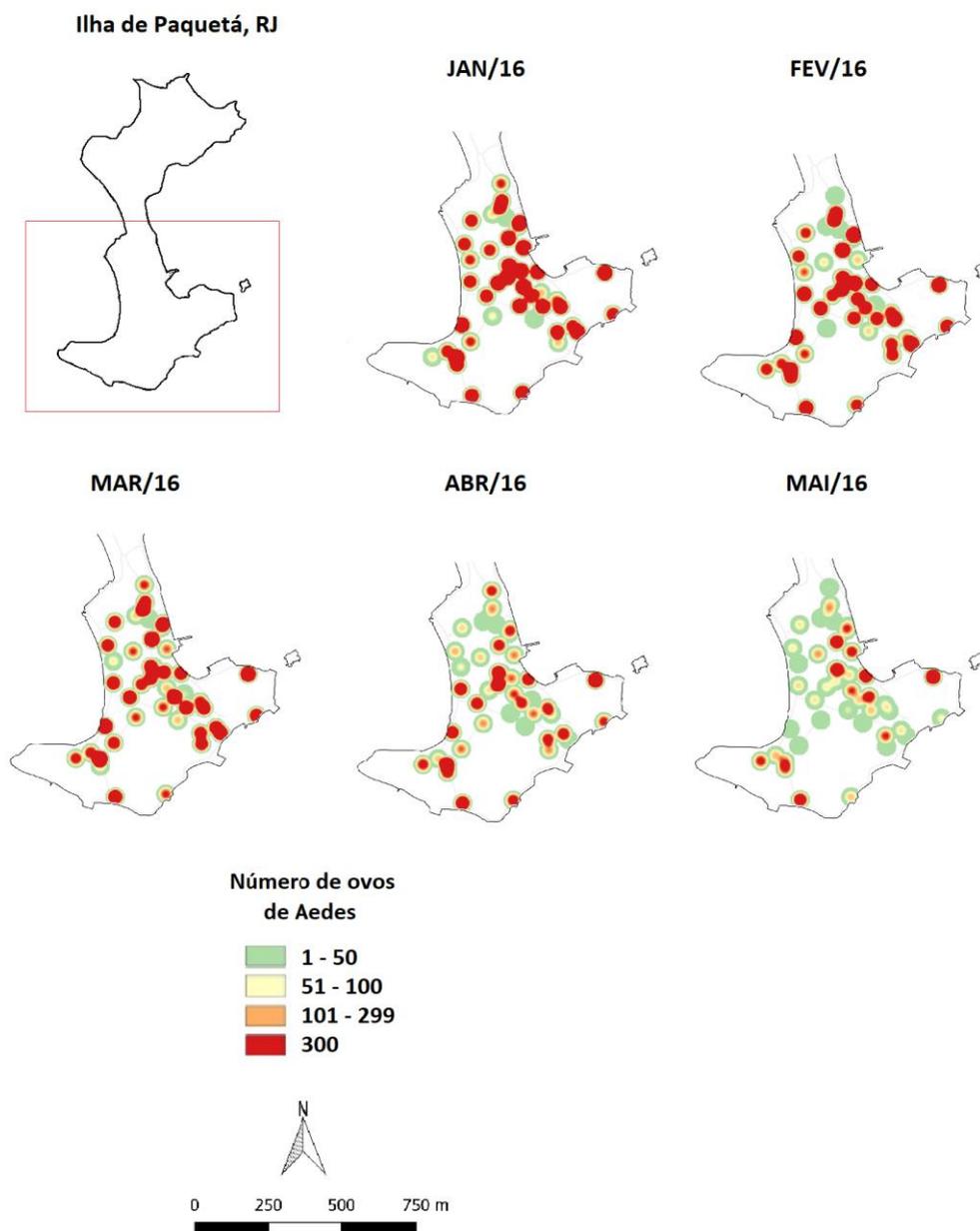
Com o número total de ovos de *Aedes* contabilizados em cada ovitrapa, os mapas de kernel foram elaborados e utilizados para o acompanhamento da infestação e direcionamento das ações de combate aos vetores. Nas Figuras 5.4, 5.5 e 5.6 estão apresentados os mapas de kernel com a densidade mensal, cuja variação de cores está relacionada com a quantidade de ovos. Todos os mapas foram confeccionados com a mesma escala de cores e estimativa de ovos. Quanto maior a intensidade de vermelho, maior quantidade de ovos depositados nas ovitrapas. Os mapas mostram uma distribuição espacial heterogênea dos ovos de *Aedes* durante todo o estudo, porém com períodos em que houve concentração de ovos em determinados quarteirões (dez/14 a abr/15 e out/15 a mar/16).



**Figura 5.4:** Mapas de kernel de meses do ano de 2014, com a distribuição espacial de ovos de *Aedes* em Paquetá I (bairro Ponte), Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016.



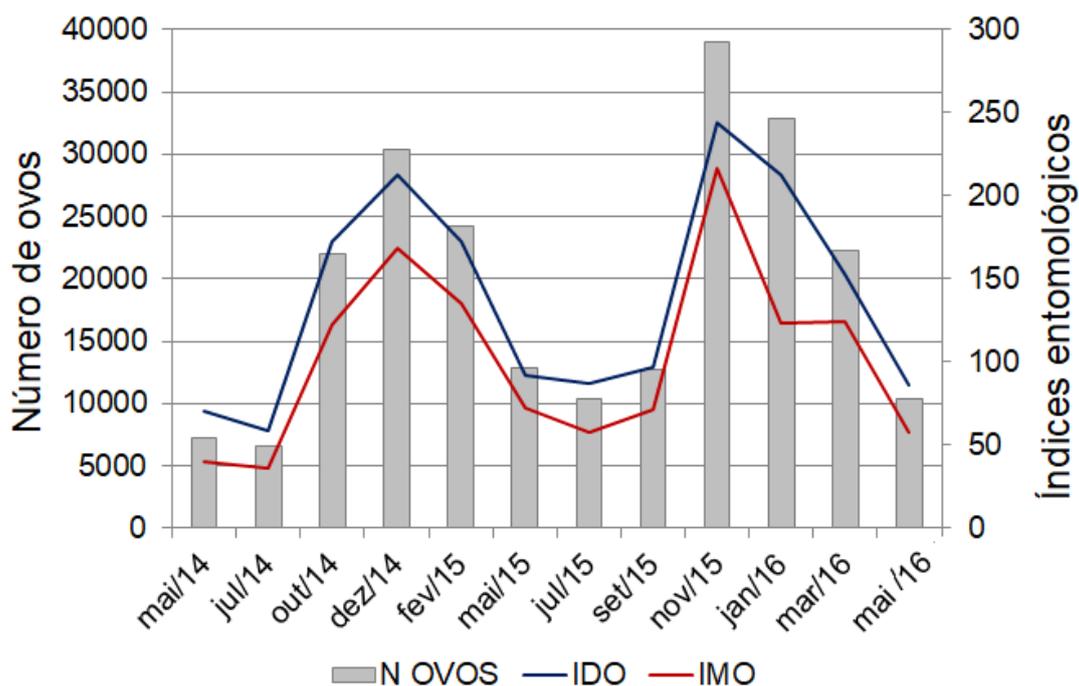
**Figura 5.5:** Mapas de kernel de meses do ano de 2015, com a distribuição espacial de ovos de *Aedes* em Paquetá I (bairro Ponte), Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016.



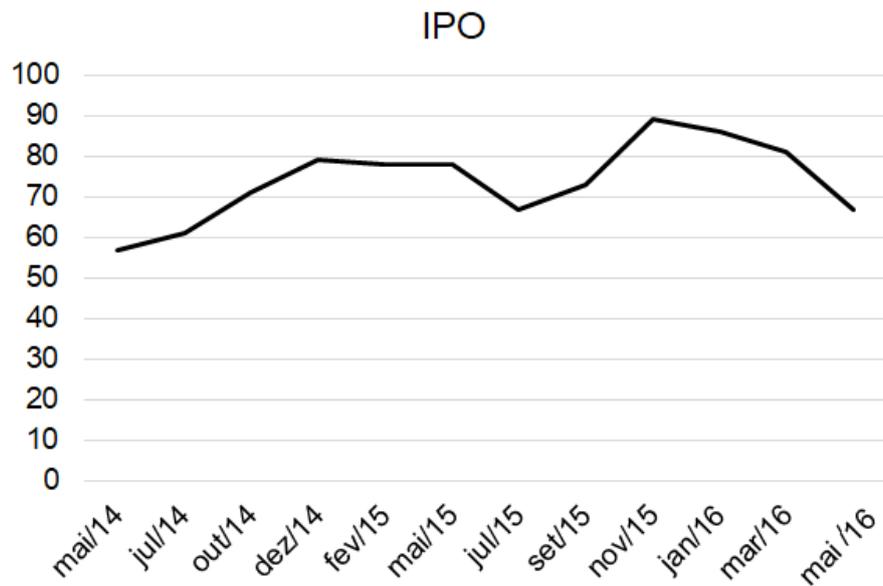
**Figura 5.6:** Mapas de kernel de meses do ano de 2016, com a distribuição espacial de ovos de *Aedes* em Paquetá I (bairro Ponte), Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016.

### 5.1.2 Monitoramento bimestral de *Aedes* na Ilha de Paquetá

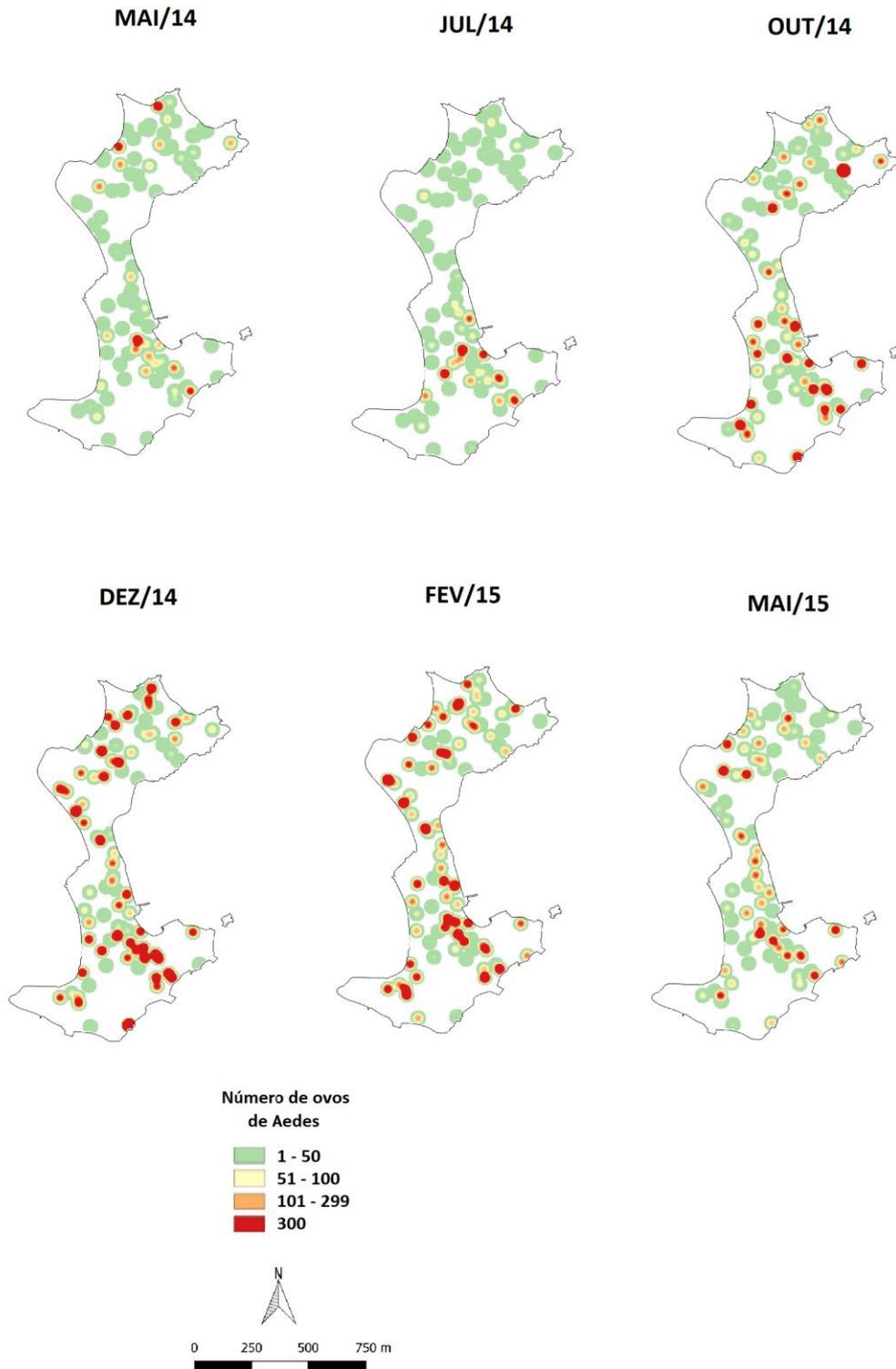
As 12 coletas de ovos bimestrais (24 semanas) na Ilha de Paquetá resultaram na coleta de 213.206 ovos, com média de 222 ovos por ovitrampa/semana (Figura 5.5). Os índices de infestação IPO e IDO mostraram flutuações sazonais durante todo período de coleta, sendo alta do início ao fim do estudo, com as taxas mais baixas durante a estação seca e fria (Figura 5.5 e 5.6). A densidade de ovos nas ovitrampas foi mais alta no período chuvoso e quente e sempre permaneceu elevada (IDO – 59,4 a 243,7) (Figura 5.4). O IPO (Figura 5.6) sempre foi maior que 50% (IPO – 57% a 89%), principalmente durante os meses em que a temperatura e chuva foram mais intensas, de outubro até maio. As Figura 5.9 e 5.10 apresentam os mapas de kernel com a distribuição espacial dos ovos de *Aedes* por toda a Ilha.



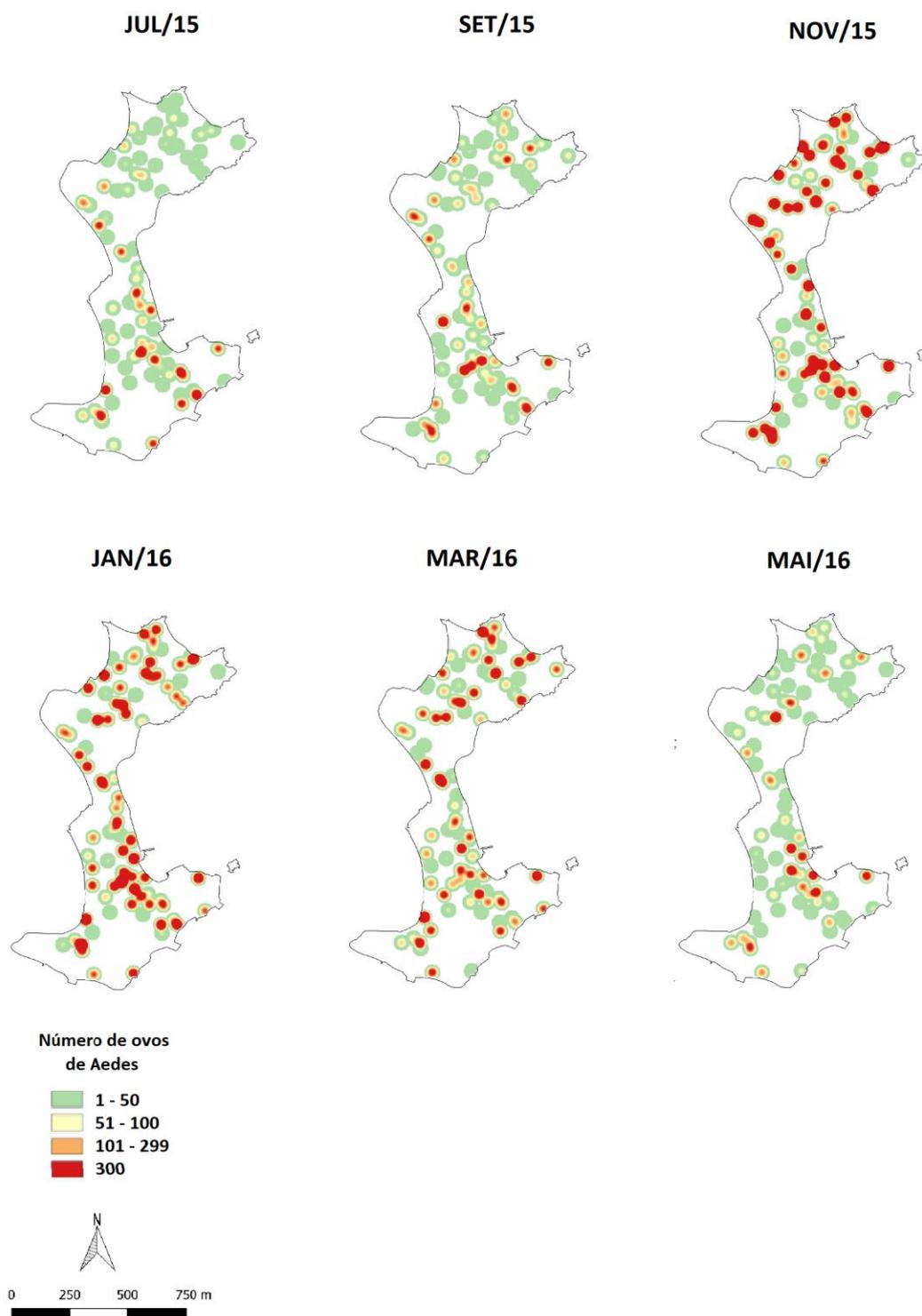
**Figura 5.7:** Dinâmica temporal e espacial de *Aedes* avaliadas bimestralmente na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. Índice de Densidade de Ovos - IDO (linha azul), Índice Médio de Ovos – IMO (linha vermelha) e número de ovos mensal - n ovos (barras cinzas).



**Figura 5.8:** Dinâmica temporal do índice de positividade de ovitrampas de *Aedes* na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. Índice de Positividade de Ovitrampas - IPO (linha preta).



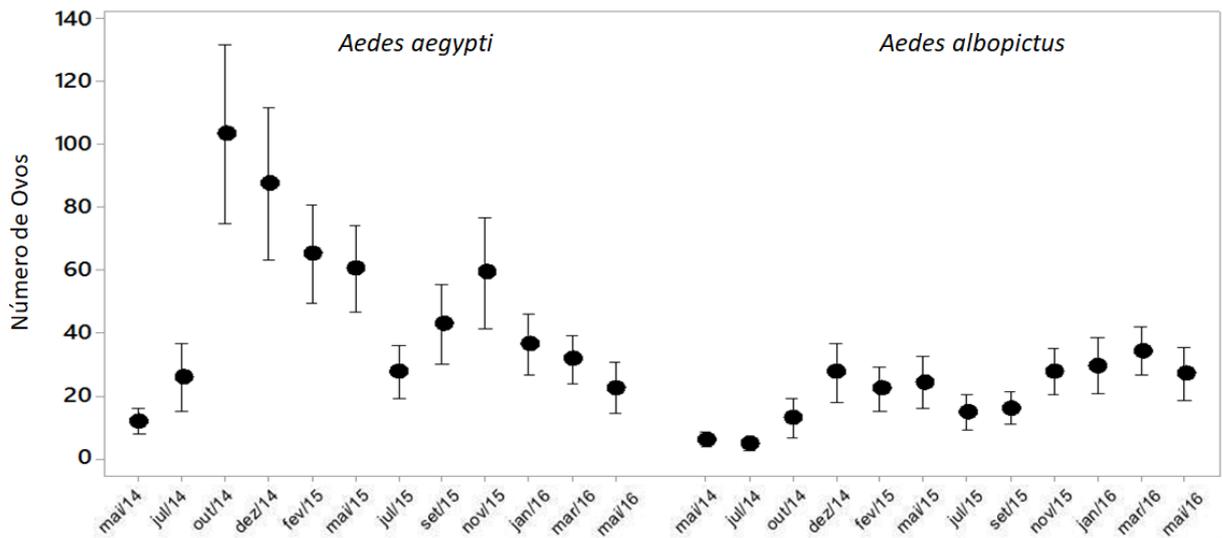
**Figura 5.9:** Mapas de kernel dos primeiros meses de coletas bimestrais, com a distribuição espacial de ovos de *Aedes* na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016.



**Figura 5.10:** Mapas de kernel dos últimos meses de coletas bimestrais, com a distribuição espacial bimestral de ovos de *Aedes* na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016.

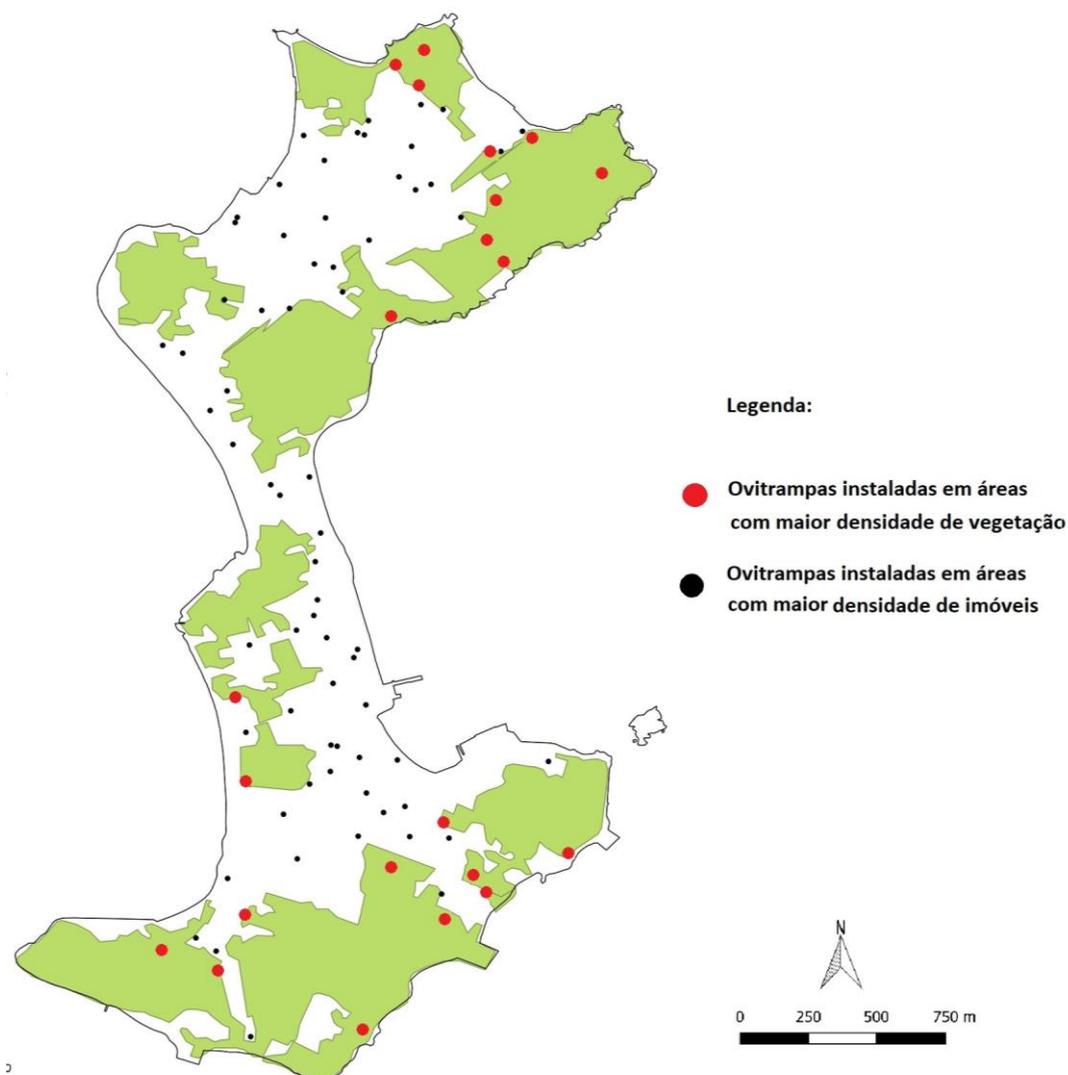
Após a criação dos indivíduos obtidos nas coletas, foram identificados 69.453 espécimes, sendo 48.434 (70%) *Ae. aegypti* e 21.019 (30%) *Ae. albopictus*. Da sexagem, 45% foram fêmeas e 55 % machos de *Ae. aegypti* e, de *Ae. albopictus*, 63% fêmeas e 37 % machos. A proporção por espécie foi de 48 indivíduos de *Ae. aegypti* e 21 indivíduos de *Ae. albopictus* por ovitrapa/coleta.

No início da coleta, nos meses 1 (mai/14) e 2 (jul/14), ambas as espécies apresentaram as menores densidades, seguida de um aumento significativo entre os meses 3 (out/14) e 6 (mai/15), com os picos máximos de produtividade de *Ae. aegypti*. Enquanto a população de *Ae. aegypti* tende a uma estabilização baixa ( $p < 0,0001$ ), a densidade de *Ae. albopictus* aumenta nos últimos quatro períodos do estudo, meses 10 (jan/16), 11 (mar/16) e 12 (mai/16) ( $p < 0,0001$ ) (Figura 5.11). No geral, a relação da quantidade de indivíduos das duas espécies é de dois *Ae. aegypti* para um *Ae. albopictus*.



**Figura 5.11:** Frequência de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016.

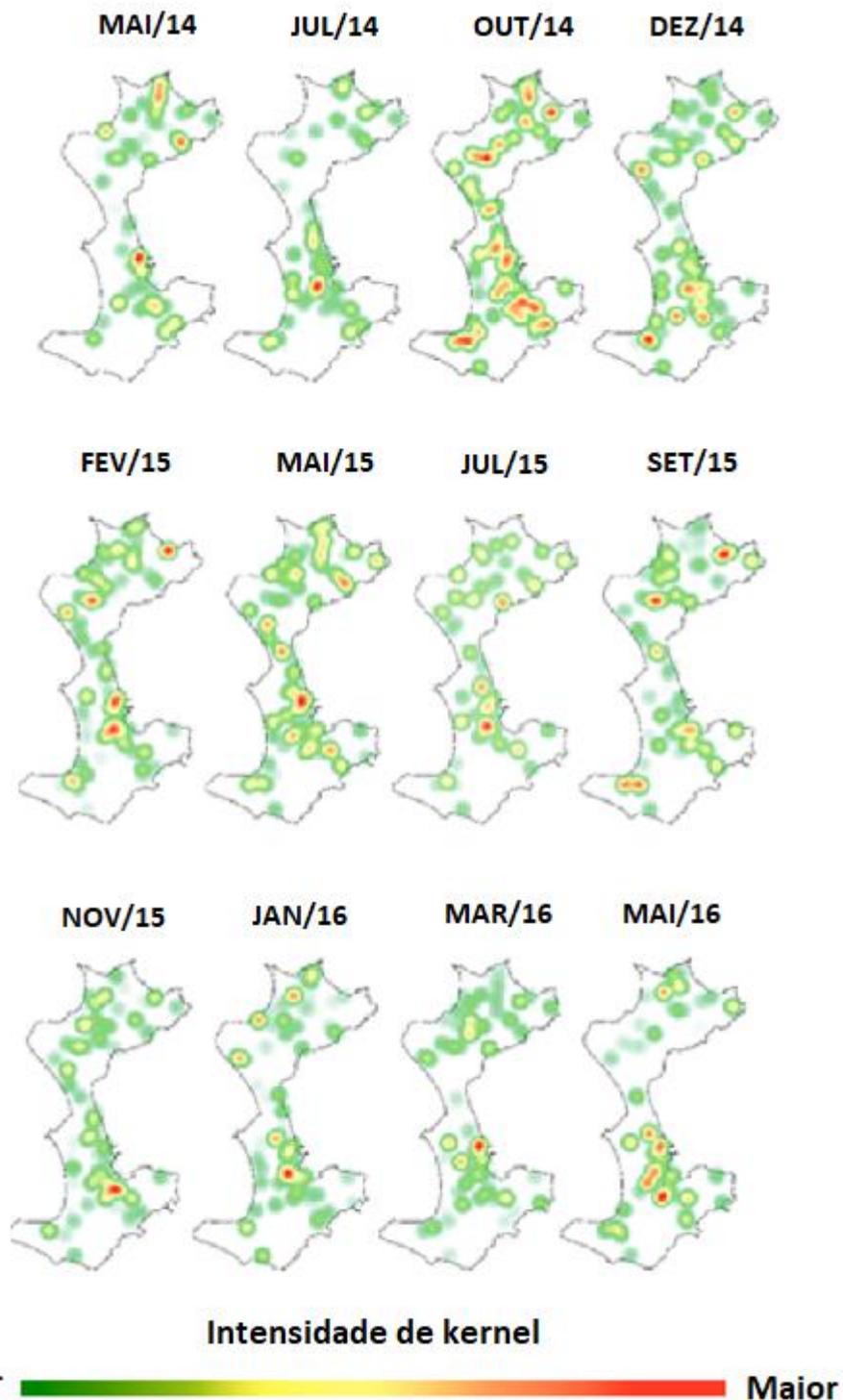
Do total de *Ae. aegypti*, 67% foram coletados em Paquetá I e 33% em Paquetá II e, de *Ae. albopictus*, 61% em Paquetá I e 39% em Paquetá II. A cobertura vegetal da Ilha de Paquetá tem uma densidade bem diversificada (Figura 5.12) com ecossistema profundamente modificado, devido a interferência antrópica. Em Paquetá I há uma área de densa cobertura vegetal, o Parque Darke de Matos, que compreende 63% da vegetação da Ilha e, em Paquetá II, tem o Parque dos Tamoios com 51% da cobertura vegetal.



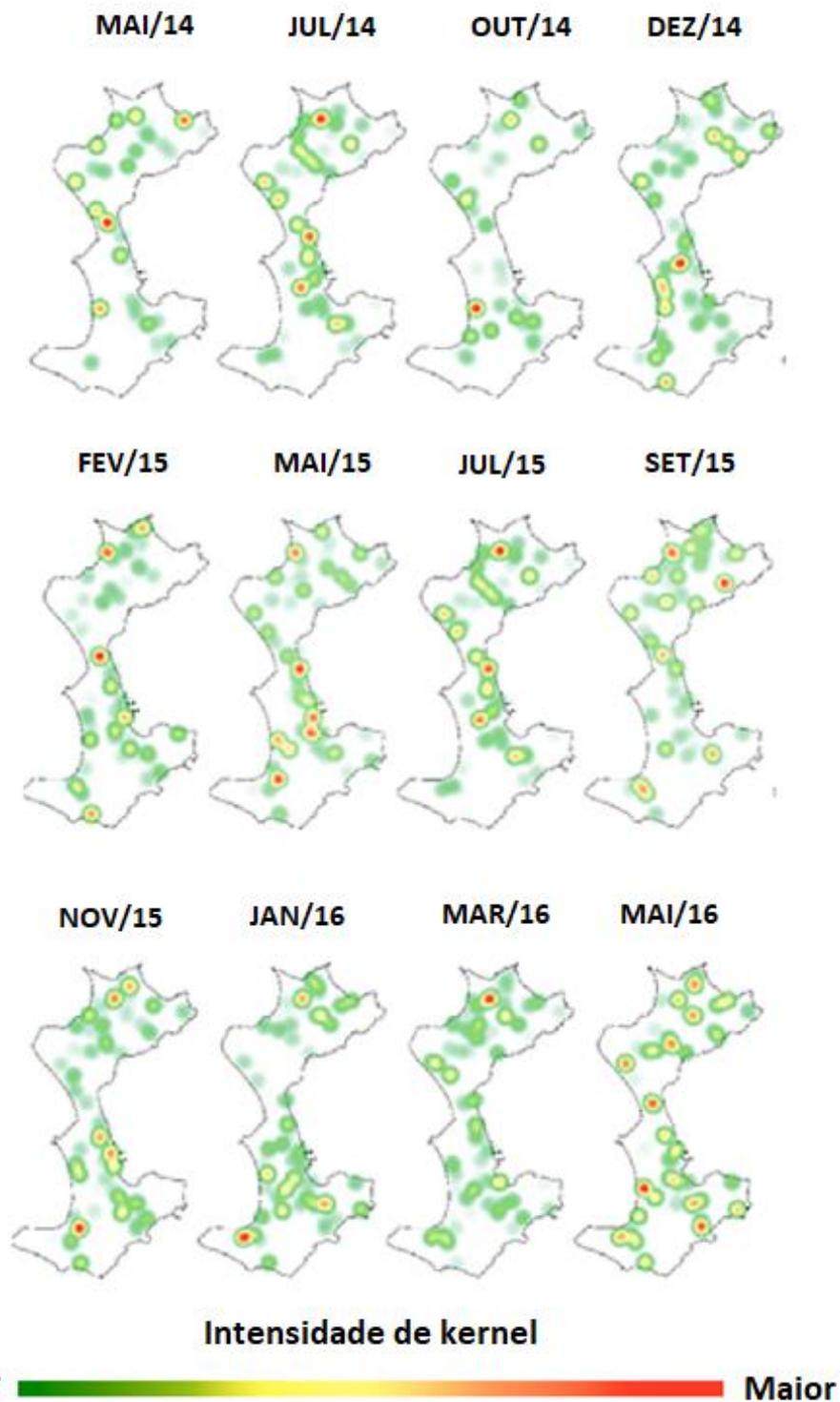
**Figura 5.12:** Mapa com a cobertura vegetal e ovitampas na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil. Áreas em verde representam vegetação densa. Fonte: QGis (2018).

A produtividade de ovos de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* apresenta um padrão espaço-temporal heterogêneo, com cobertura espacial por toda Ilha por ambas as espécies (Figura 5.10 e 5.11). *Ae. aegypti* foi mais frequente que *Ae. albopictus* em todas as estações, no entanto, *Ae. albopictus* esteve presente, pelo menos uma vez, em todas as ovitrampas.

Pelos mapas de kernel disponíveis na Figura 5.11, pode-se notar que a frequência de *Ae. aegypti* durante todo período estudado foi mais elevada nos quarteirões com menor cobertura vegetal, com pontos de maior intensidade estimados pelo kernel, representados em vermelho (Figura 5.13). *Ae. albopictus* teve momentos com maior abundância em localidades próximas das áreas com mais vegetação, como por exemplo, nas coletas de maio e novembro/15 e janeiro e maio/16, nas armadilhas instaladas nas proximidades do Parque Darke de Matos (Figura 5.14).

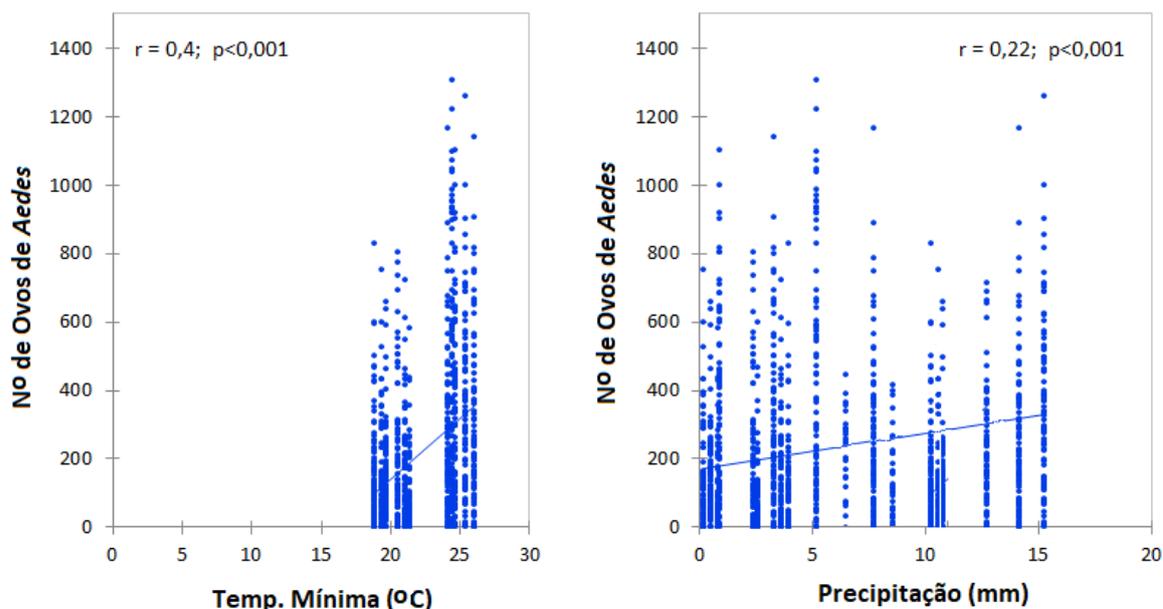


**Figura 5.13:** Distribuição espacial-temporal de *Ae. aegypti* na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. De acordo com a barra de intensidade de kernel, os pontos com coloração mais clara (tons verde e amarelo) representam as armadilhas com menor quantidade de *Ae. aegypti* e os pontos mais escuros (laranja e vermelho) representam as armadilhas com maior quantidade de *Ae. aegypti*. Fonte: QGis (2018).



**Figura 5.14:** Distribuição espacial-temporal de *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. De acordo com a barra de intensidade de kernel, os pontos com coloração mais clara (tons verde e amarelo) representam as armadilhas com menor quantidade de *Ae. albopictus* e os pontos mais escuros (laranja e vermelho) representam as armadilhas com maior quantidade de *Ae. albopictus*. Fonte: QGis (2018).

A significativa associação entre variáveis ambientais e a densidade de ovos foi positiva, porém baixa, tanto para a temperatura mínima ( $p < 0,001$ ) como para a precipitação de duas semanas anteriores ( $p < 0,001$ ). Verificou-se que a densidade de ovos é alta independente de ter havido pouca ou muita chuva (Figura 5.15).



**Figura 5.15:** Associação entre variáveis ambientais e número total de ovos de *Aedes* na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016.

### 5.1.3 Direcionamento das ações de controle em Paquetá I

A partir dos dados de boletins de campo fornecidos pela CAP 1.0, 9.302 imóveis foram vistoriados, onde 9.086 depósitos foram tratados com larvicida e 1.306 depósitos eliminados (Tabela 5.1). Os tipos de depósitos encontrados durante as inspeções casa a casa em toda a Ilha estão classificados na Tabela 5.2. O tipo mais frequente foi o C, denominado como depósito fixo, identificados em calhas, ralos, sanitários, piscinas e reservatórios em cemitérios, entre outros.

**Tabela 5.1:** Total de ovos de *Aedes* e resumo das atividades de campo obtidos durante o direcionamento das ações de controle de vetores. na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016.

Ano	nº SE avaliadas	nº imóveis trabalhados	nº depósitos tratados	nº depósitos eliminados
2014	33	4032	3448	580
2015	53	3361	2829	498
2016	21	1909	2809	228
Total	107	9302	9086	1306

**Tabela 5.2:** Classificação dos depósitos inspecionados com foco de *Aedes* na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. A1 (depósitos de água elevados); A2 (depósitos de água ao nível do solo); B (depósitos móveis); C (depósitos fixos); D1 (depósitos de remoção: pneus); D2 (depósitos de remoção: lixo); E (depósitos naturais).

Ano	A1	A2	B	C	D1	D2	E	Total
2014	7	2	8	60	0	5	1	83
2015	10	10	113	96	3	36	2	270
2016	15	12	120	154	0	16	8	325
Total	32	24	241	310	3	57	11	678

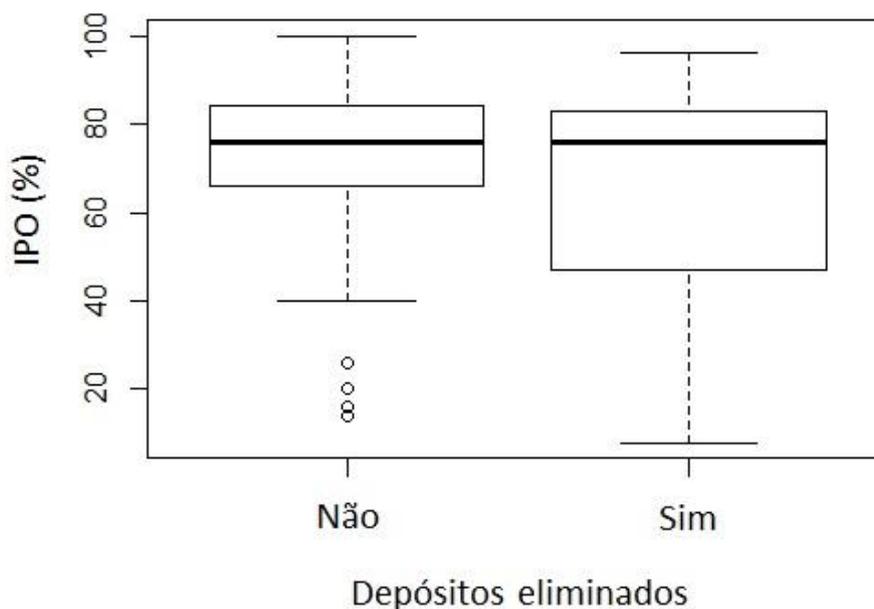
Nas análises comparativas entre Paquetá I e II, foi possível observar que a quantidade de ações implementadas em campo foi maior na área controle. A proporção de depósitos tratados e eliminados foi superior na área controle (Tabela 5.3).

**Tabela 5.3:** Comparação entre as ações de controle de *Aedes* (PNCD) realizadas durante as vistorias domiciliares em Paquetá I e Paquetá II, Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016.

Variáveis	Área controle Paquetá I	Área estudo Paquetá II
Imóveis trabalhados	6349	2953
Depósitos tratados	6809	2277
Depósitos eliminados	1073	233
Carga de larvicida utilizada (g)	50,82	10,96

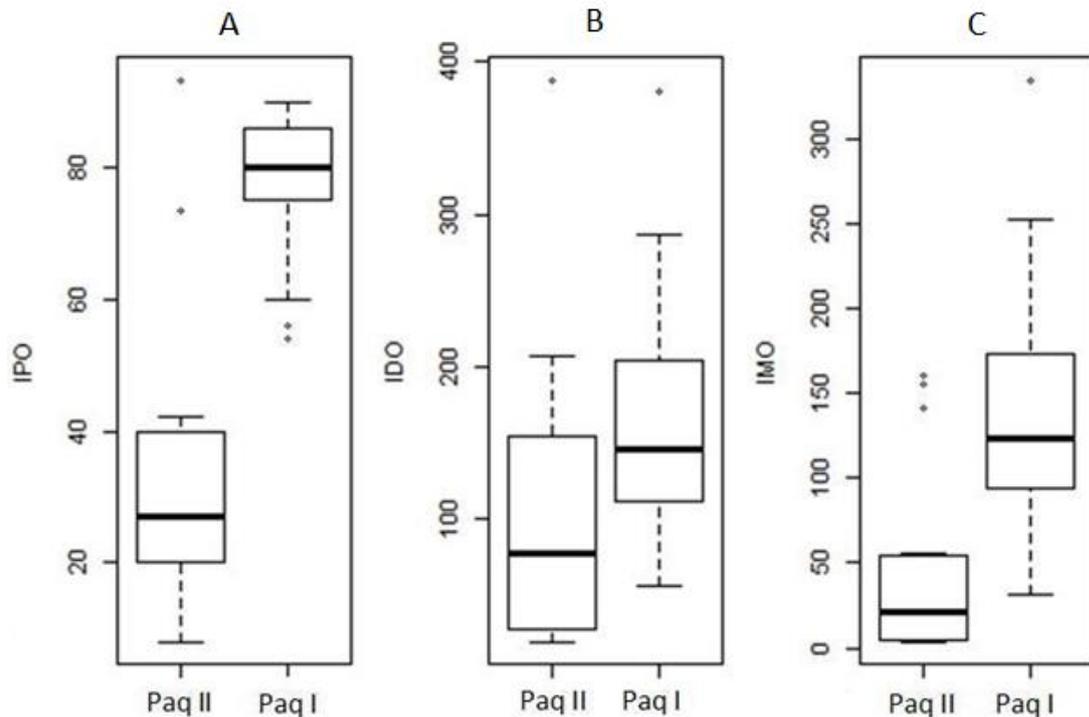
Ao nível de 5% de significância não foram observadas diferenças significativas quando testadas a associação entre a eliminação dos depósitos e os índices de infestação entre a área controle e de estudo: IPO ( $t= 1.8012$ ;  $df= 36.533$ ;  $p= 0.07$ ), IDO ( $t= -0.9203$ ;  $df= 45.418$ ;  $p= 0.3$ ) e IMO ( $t= -0.38488$ ;  $df= 40.756$ ;  $p= 0.7$ ). Contudo, o IPO mostrou-se com diferença de 7%.

Para a associação entre a remoção de depósitos e a positividade de ovitrampas, foi utilizado as variáveis *sim* (maior quantidade de depósitos eliminados) e *não* (menor quantidade de depósitos eliminados). Pelo gráfico *boxplot* da Figura 5.16, pode-se observar que não houve diferença significativa entre a remoção dos depósitos contendo larvas de *Aedes* e a não remoção dos depósitos, não resultando positivamente na redução do IPO. Isso significa que, mesmo com maior quantidade de depósitos eliminados (variável *sim*) durante as vistorias, o IPO permaneceu elevado, com número alto de ovitrampas positivas distribuídas por toda Ilha de Paquetá.



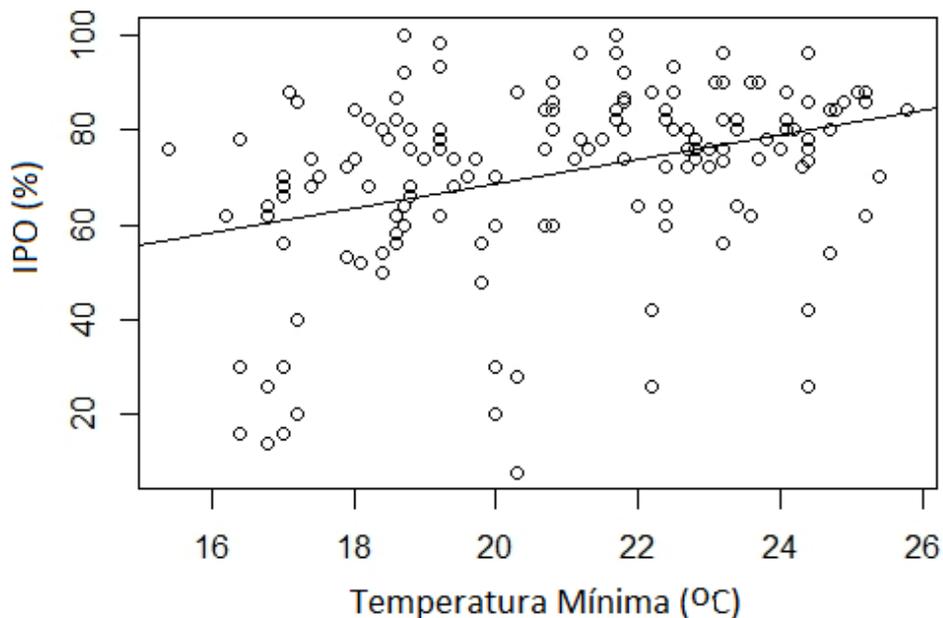
**Figura 5.16:** *Boxplot* da associação entre o Índice de Positividade de Ovitampas - IPO e a remoção de depósitos positivos para *Aedes*, na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil.

De modo geral, não houve diferença nos índices entomológicos avaliados entre as áreas de Paquetá I e Paquetá II, mostrando que as ações de controle vetorial direcionadas não tiveram impacto na redução da infestação de *Aedes* em Paquetá I (área de estudo). Os valores não significativos foram para IPO ( $t = -3.4232$ ,  $df = 66.347$ ,  $p = 0.0011$ ), IDO ( $t = -1.4898$ ,  $df = 61.53$ ,  $p = 0.141$ ) e IMO ( $t = -1.314$ ,  $df = 42.197$ ,  $p = 0.196$ ). Os resultados de comparação entre Paquetá I e Paquetá II também podem ser visualizados nos gráficos *boxplot* da Figura 5.17, cujas medianas da variável Paquetá I sempre permaneceram mais elevadas.



**Figura 5.17:** *Boxplot* dos Índices entomológicos de ovitrampas e número máximo de ovos de *Aedes* em Paquetá I e Paquetá II, Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016. Paq I (Paquetá I); Paq II (Paquetá II) (A) Índice de Positividade de Ovitampa - IPO; (B) Índice de Densidade de Ovos - IDO; (C) Índice Médio de Ovos – IMO.

Na avaliação da associação entre a proporção de ovitrampas positivas e as ações direcionadas testadas pelo modelo de regressão logística, não foi encontrado efeito significativo entre as variáveis utilizadas ( $p= 0.01$ ). No entanto, a temperatura mínima teve efeito sobre o IPO ( $p= 0.008$ ), onde para cada grau aumentado na temperatura, o IPO aumentou 0,03%, que pode ser visualizado no gráfico de dispersão da Figura 5.18, com a discreta tendência do aumento da reta, quando a temperatura mínima aumenta. O valor de AIC foi de 942,26.



**Figura 5.18:** Diagrama de dispersão do Índice de Positividade de Ovitampa (IPO) em relação a temperatura mínima na Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil, de maio de 2014 a maio de 2016.

O modelo de regressão binomial negativa utilizado para avaliar se as ações de controle foram eficientes sobre a diminuição do número total de ovos encontrado nas ovitampas também apresentou valores não significativos ( $p=0.009$ ). Em contrapartida, da mesma forma que para o IPO, a temperatura mínima teve associação significativa com o aumento do número total de ovos. O valor de AIC foi de 2898.4.

### 5.3 Bioensaios dose-resposta com inseticidas

O critério utilizado para a determinação dos níveis de resistência aos inseticidas avaliados neste estudo (temephos, malathion e deltametrina) seguiu o protocolo estabelecido pela OMS (2016) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016), que considera:

- $RR_{50} < 5$ : susceptível
- $RR_{50} 5 - 10$ : resistência moderada
- $RR_{50} > 10$ : altamente resistente

### 5.3.1 Bioensaios com larvas

Os resultados da avaliação de resistência e de susceptibilidade de cinco populações de *Ae. aegypti* de áreas portuárias da região metropolitana do Rio de Janeiro para o temephos estão apresentadas na Tabela 5.4.

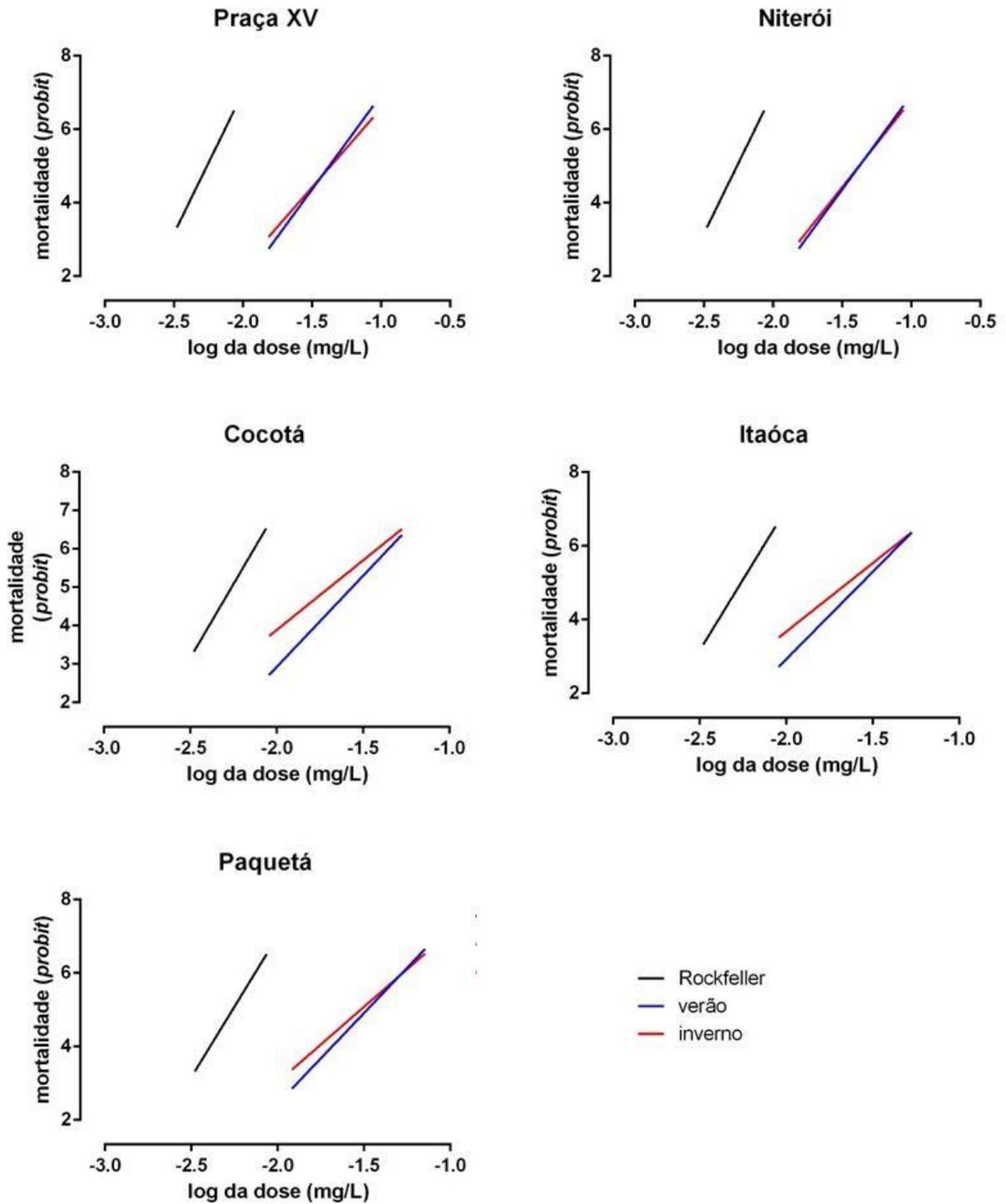
Como se pode observar, a maioria das populações de *Ae. aegypti* avaliadas em duas estações de coletas está com valores de  $RR_{50}$  acima de 5,0 consideradas, portanto, resistentes ao larvicida. Valor abaixo de 5,0 foi calculado para a população de Itaóca e Cocotá. Nenhuma população foi considerada altamente resistente com valor de  $RR_{50}$  acima de 10. As  $RR_{50}$  variaram de 3,7, em mosquitos de Cocotá coletados no inverno e 8,0, na Praça XV, em amostras coletadas no inverno. Considerando todas as populações, houve pouca variação na resistência ao temephos entre as amostras do verão e do inverno (Tabela 5.4).

Todas as populações apresentaram coeficientes angulares da regressão linear (*slope*) menores que os da linhagem de *Ae. aegypti* de referência Rockefeller, caracterizando-as como populações heterogêneas (TSUKAMOTO, 1963), quanto à sua suscetibilidade ao temephos. O menor valor de *slope* foi encontrado na população de *Ae. aegypti* de Cocotá (3,6) o maior valor na população da Praça XV (5,2) (Tabela 5.4 e Figura 5.19).

**Tabela 5.4:** Concentrações letais (CL) (mg/L) obtidas em bioensaio dose-resposta de larvas, calculadas por análise *probit* e razões de resistência (RR) para o organofosforado temephos, de cinco populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil. Em negrito, na RR50, se mostram as populações resistentes, segundo a OMS (2016) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Pop.	Coleta	CL <sub>50</sub>	CL <sub>95</sub>	RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>	IC 95 % - CL <sub>50</sub>	IC 95 % - CL <sub>95</sub>	slope
Rock		0,005	0,01	1,0	1,0	0,004 >CL< 0,007	0,004 >CL< 0,02	7,7
PXV	verão	0,04	0,08	<b>7,8</b>	9,8	0,03 >CL< 0,06	0,05 >CL< 0,14	5,2
	inverno	0,04	0,10	<b>8,0</b>	11,7	0,03 >CL< 0,06	0,05 >CL< 0,19	4,3
NIT	verão	0,04	0,08	<b>7,7</b>	9,9	0,03 >CL< 0,06	0,05 >CL< 0,14	5,1
	inverno	0,04	0,09	<b>7,6</b>	10,4	0,04 >CL< 0,05	0,07 >CL< 0,12	4,7
CCT	verão	0,03	0,06	<b>5,0</b>	6,8	0,02 >CL< 0,04	0,04 >CL< 0,09	4,7
	inverno	0,02	0,06	<b>3,7</b>	6,5	0,02 >CL< 0,03	0,03 >CL< 0,08	3,6
ITC	verão	0,03	0,05	<b>5,0</b>	5,8	0,02 >CL< 0,04	0,02 >CL< 0,14	4,7
	inverno	0,02	0,06	<b>4,1</b>	6,6	0,02 >CL< 0,03	0,04 >CL< 0,09	3,9
PQT	verão	0,03	0,07	<b>6,0</b>	8,0	0,03 >CL< 0,04	0,05 >CL< 0,09	4,9
	inverno	0,03	0,07	<b>5,5</b>	8,5	0,02 >CL< 0,04	0,06 >CL< 0,10	4,1

Rock (linhagem susceptível Rockefeller); PXV (Praça XV); NIT (Niterói); CCT (Cocotá); ITC (Itaóca); PQT (Paquetá).



**Figura 5.19:** Curvas de regressão linear de análise log x *probit* em bioensaio dose-resposta de larva, de cinco populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil, avaliadas com o organofosforado temephos, coletados em junho e dezembro de 2014.

### 5.3.2 Bioensaio com adultos

#### 5.3.2.1 Ensaios com deltametrina

A Tabela 5.5 apresenta o perfil de resistência das cinco populações de *Ae. aegypti* adultos avaliadas neste estudo. As  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$  foram comparadas com as mesmas CLs da linhagem susceptível Rockefeller e assim obtiveram-se as  $RR_{50}$  e  $RR_{95}$ .

Os ensaios biológicos dose-resposta indicaram níveis baixos de mortalidade, mostrando que todas as populações foram consideradas altamente resistentes ao piretroide.

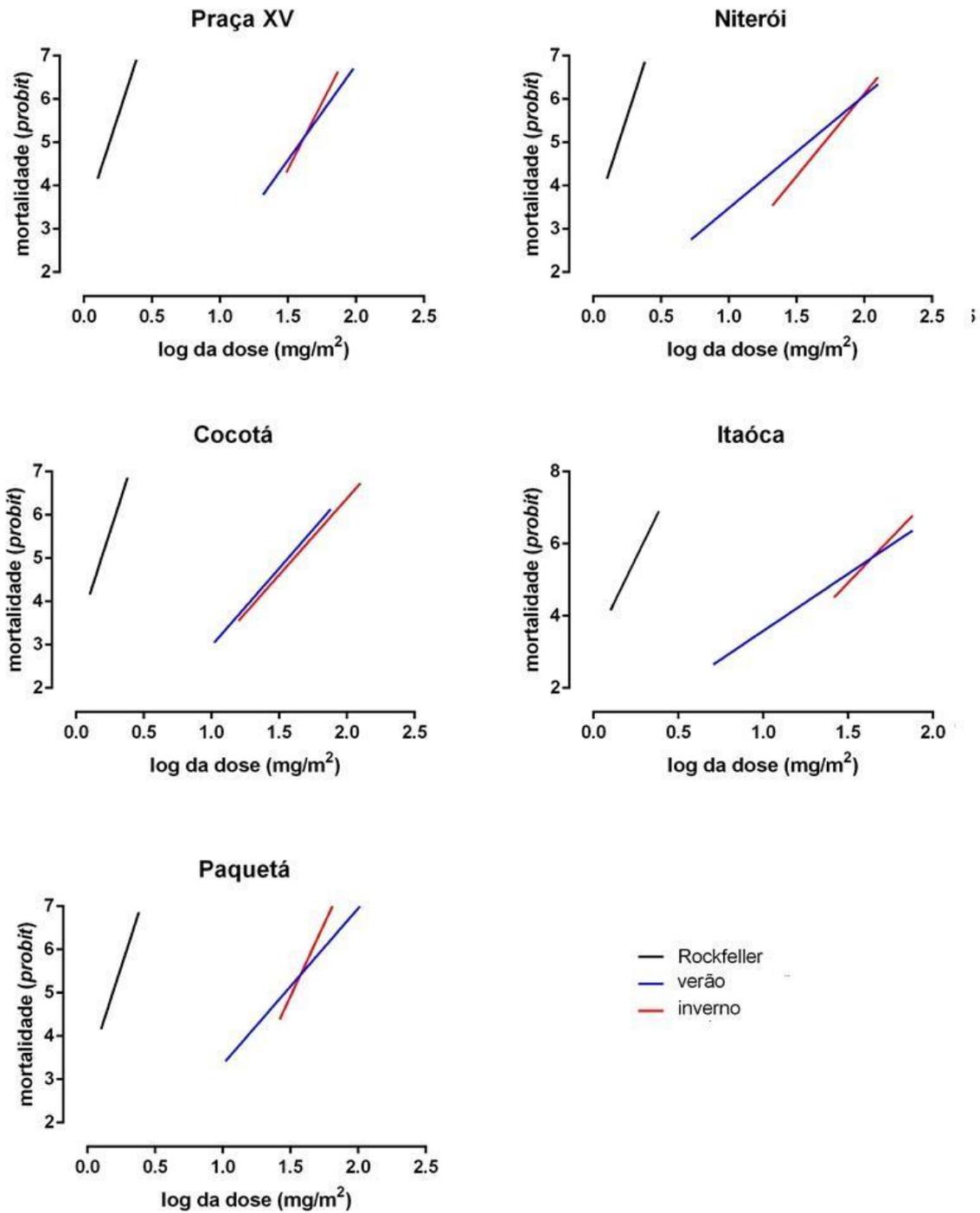
A variação da  $RR_{50}$  foi de 19,2 em Itaóca, para mosquitos coletados no verão, e 34,7 em Niterói, coletados no inverno. Os maiores valores de razão de resistência, tanto  $RR_{50}$  e  $RR_{95}$ , foram encontrados na população da cidade de Niterói. As menores  $RR_{50}$  encontradas, entre as populações avaliadas, foram os bairros da Ilha de Paquetá e Itaóca (Figura 5.20).

Os *slopes* de todas as populações foram menores que o de Rockefeller, ou seja, são classificadas como populações heterogêneas (TSUKAMOTO, 1963). O menor valor de *slope* foi encontrado na população de Niterói, coletadas no verão e, o maior valor de *slope* foi detectado nas amostras do inverno da população de Paquetá (Tabela 5.5 e Figura 5.20).

**Tabela 5.5:** Concentrações letais (CL) (mg/m<sup>2</sup>) obtidas em bioensaio dose-resposta com adultos, calculadas por análise *probit* e razões de resistência (RR) para o piretroide deltametrina, de cinco populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil. Em negrito, na RR50 se mostram as populações resistentes, segundo a OMS (2016) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Pop.	Coleta	CL <sub>50</sub>	CL <sub>95</sub>	RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>	IC - CL <sub>50</sub>	IC - CL <sub>95</sub>	slope
<b>Rock</b>		1,46	2,3	<b>1</b>	1	0,6 >CL< 3,2	1,0 >CL< 5,361	8,2
<b>PXV</b>	verão	39,1	92,3	<b>26,8</b>	40	25,7 >CL< 59,4	43,6 >CL< 195,5	4,4
	inverno	39,9	73,4	<b>27,4</b>	31,8	19,6 >CL< 81,1	21,7 >CL< 248,2	6,2
<b>NIT</b>	verão	38,3	164,0	<b>26,3</b>	71	26,7 >CL< 54,7	77,7 >CL< 345,8	2,6
	inverno	50,6	136,6	<b>34,7</b>	59,1	35,9 >CL< 71,2	67,2 >CL< 277,8	3,8
<b>CCT</b>	verão	36,6	105,3	<b>25,1</b>	45,6	26,4 >CL< 50,7	49,6 >CL< 223,2	3,6
	inverno	40,5	118,6	<b>27,8</b>	51,3	29,7 >CL< 55,1	63,6 >CL< 221,0	3,5
<b>ITC</b>	verão	27,9	92,7	<b>19,2</b>	40,1	18,6 >CL< 41,8	43,2 >CL< 199,1	3,2
	inverno	32,9	70,8	<b>22,6</b>	30,7	15,5 >CL< 69,5	21,4 >CL< 233,9	4,9
<b>PQT</b>	verão	28,6	81,8	<b>19,6</b>	35,4	21,9 >CL< 37,3	56,2 >CL< 119,1	3,6
	inverno	32,4	56,9	<b>22,2</b>	24,6	19,1 >CL< 54,9	29,5 >CL< 109,8	6,7

Rock (linhagem susceptível Rockefeller); PXV (Praça XV); NIT (Niterói); CCT (Cocotá); ITC (Itaóca); PQT (Paquetá).



**Figura 5.20:** Curvas de regressão linear de análise log x *probit* em bioensaio dose-resposta de adulto, de cinco populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil, avaliadas com o piretroide deltametrina, coletados em junho e dezembro de 2014.

### 5.3.2.2 Ensaios com malathion

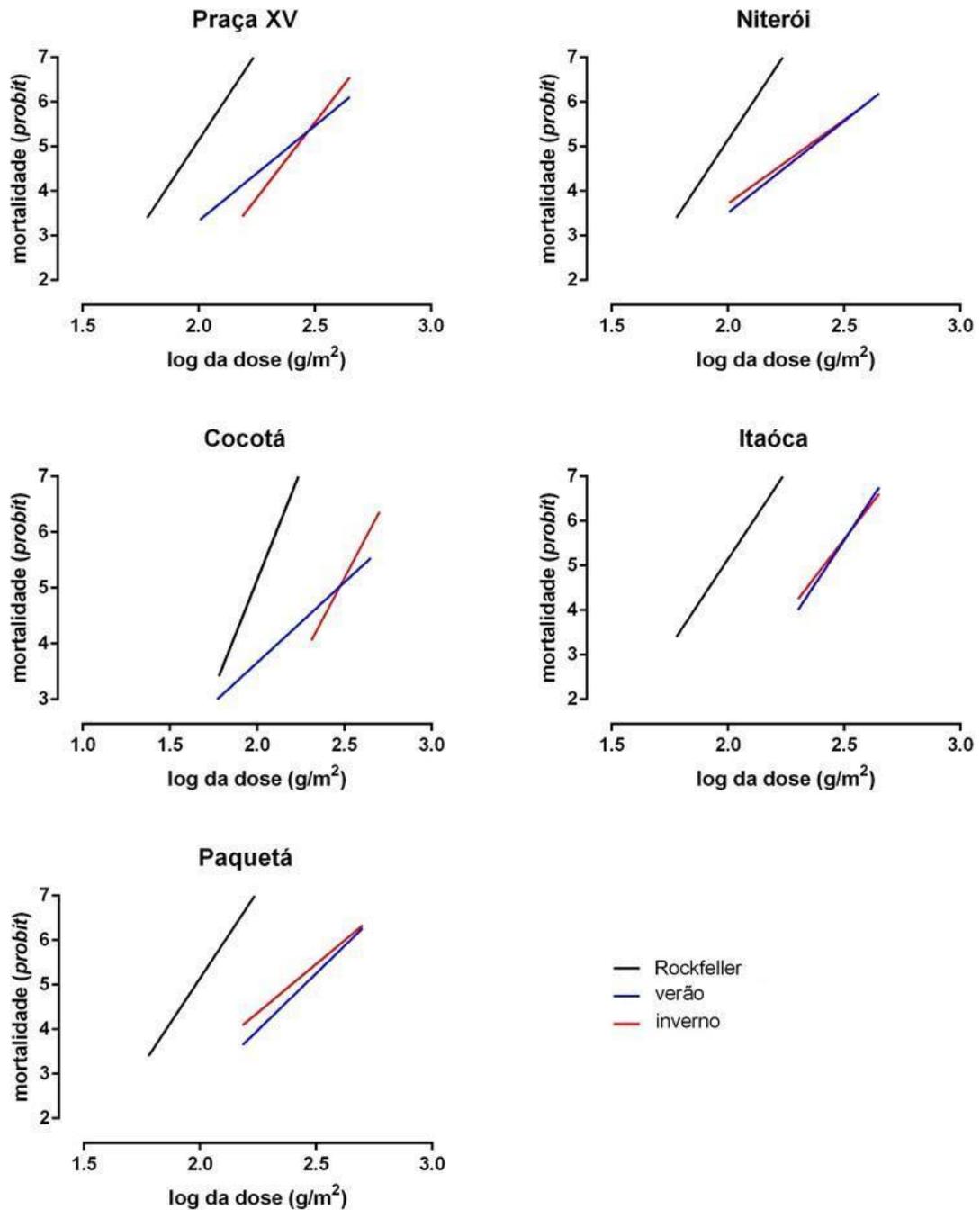
Os resultados para o OP malathion das cinco populações de *Ae. aegypti* utilizadas neste estudo apresentaram valores de RR<sub>50</sub> abaixo de 5,0, consideradas susceptíveis ao inseticida (Tabela 5.6). Houve pouca variação das razões de resistência entre as populações e entre as estações de coletas, tanto para a RR<sub>50</sub> quanto para RR<sub>95</sub>. As RR<sub>50</sub> variaram entre 2,1 para a população de Niterói a 2,9 para Cocotá, ambas coletadas no inverno.

Os valores de inclinação da reta menores que a da linhagem de referência aponta heterogeneidade das populações (TSUKAMOTO, 1963) (Tabela 5.6 e Figura 5.21).

**Tabela 5.6:** Concentrações letais (CL) (g/m<sup>2</sup>) obtidas em bioensaio dose-resposta de adultos, calculadas por análise *probit* e razões de resistência (RR) para o organofosforado malathion, de cinco populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil. Em negrito, na RR<sub>50</sub>, se mostram as populações resistentes, segundo OMS (2016) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Pop.	Coleta	CL <sub>50</sub>	CL <sub>95</sub>	RR <sub>50</sub>	RR <sub>95</sub>	IC 95 % - CL <sub>50</sub>	IC 95 % - CL <sub>95</sub>	slope
Rock	verão	0,10	0,18	1,0	1,0	0,07 >CL< 0,14	0,09 >CL< 0,24	7,0
PXV	verão	0,24	0,60	<b>2,4</b>	3,4	0,18 >CL< 0,34	0,30 >CL< 1,19	4,2
	inverno	0,26	0,46	<b>2,6</b>	2,6	0,20 >CL< 0,36	0,27 >CL< 0,80	6,6
NIT	verão	0,23	0,58	<b>2,2</b>	3,3	0,13 >CL< 0,42	0,19 >CL< 1,80	4,1
	inverno	0,22	0,60	<b>2,1</b>	3,4	0,12 >CL< 0,40	0,16 >CL< 2,30	3,7
CCT	verão	0,30	0,54	<b>2,8</b>	3,1	0,20 >CL< 0,43	0,43 >CL< 1,75	2,8
	inverno	0,2952	0,56	<b>2,9</b>	3,2	0,16 >CL< 0,55	0,18 >CL< 1,75	5,8
ITC	verão	0,30	0,43	<b>2,6</b>	2,5	0,16 >CL< 0,44	0,22 >CL< 0,85	7,8
	inverno	0,26	0,45	<b>2,5</b>	2,6	0,14 >CL< 0,47	0,20 >CL< 1,04	6,7
PQT	verão	0,28	0,60	<b>2,7</b>	3,4	0,17 >CL< 0,46	0,22 >CL< 1,62	5,0
	inverno	0,25	0,60	<b>2,4</b>	3,4	0,14 >CL< 0,44	0,21 >CL< 1,66	4,3

Rock (linhagem susceptível Rockefeller); PXV (Praça XV); NIT (Niterói); CCT (Cocotá); ITC (Itaóca); PQT (Paquetá).



**Figura 5.21:** Curvas de regressão linear de análise log x *probit* em bioensaio dose-resposta de adulto, de cinco populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil, avaliadas com o organofosforado malathion, coletados em junho e dezembro de 2014.

## 5.4 Frequências das mutações *kdr*

Durante este estudo foram genotipados 349 indivíduos de *Ae. aegypti* de seis populações de áreas portuárias do Rio de Janeiro, para diagnosticar a presença e frequência das duas principais mutações que codificam o fenótipo que confere resistência em *Ae. aegypti*, Val1016Ile e Phe1534Cys.

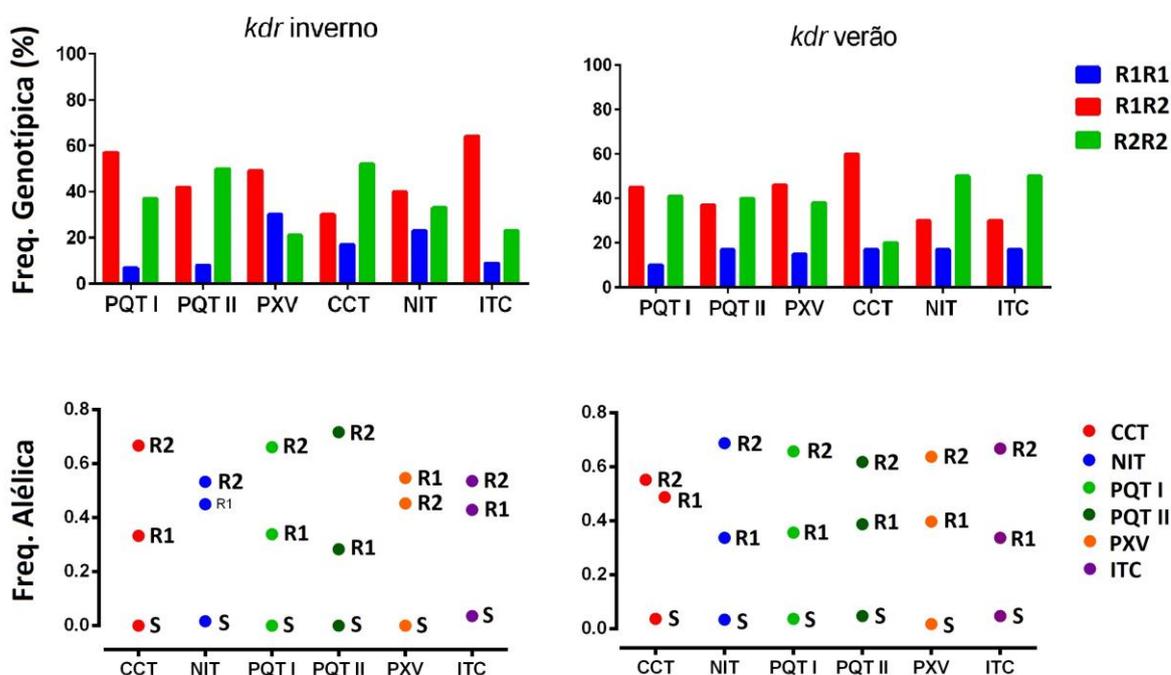
A Tabela 5.7 demonstra as frequências alélicas e genotípicas de resistência de cada população, em relação à soma das frequências genotípicas dos dois sítios avaliados juntos. Foram identificados três alelos de  $Nav$ : S (1,3 %), R1 (38,2 %) e R2 (60,5 %) (Figura 5.22 A). De maneira geral, observamos frequência quase nula do alelo  $Nav^S$ , moderada frequência (29 – 55 %) do alelo  $Nav^{R1}$  (1016Val<sup>+</sup> + 1534Cys<sup>*kdr*</sup>) e alta frequência (52 – 71 %) do alelo  $Nav^{R2}$  (1016Ile<sup>*kdr*</sup> + 1534Cys<sup>*kdr*</sup>) (Tabela 5.7 e Figura 5.22 A). A Figura 5.23 demonstra a distribuição dos alelos *kdr* pelas localidades avaliadas.

**Tabela 5.7:** Frequências alélicas, genotípicas e dos genótipos resistentes (R1R1, R1R2, R2R2) referentes aos sítios 1016 e 1534 do canal de sódio regulado por voltagem ( $Nav$ ) em *Ae. aegypti*, obtidos em seis populações do Rio de Janeiro, Brasil, coletados em junho e dezembro de 2014.

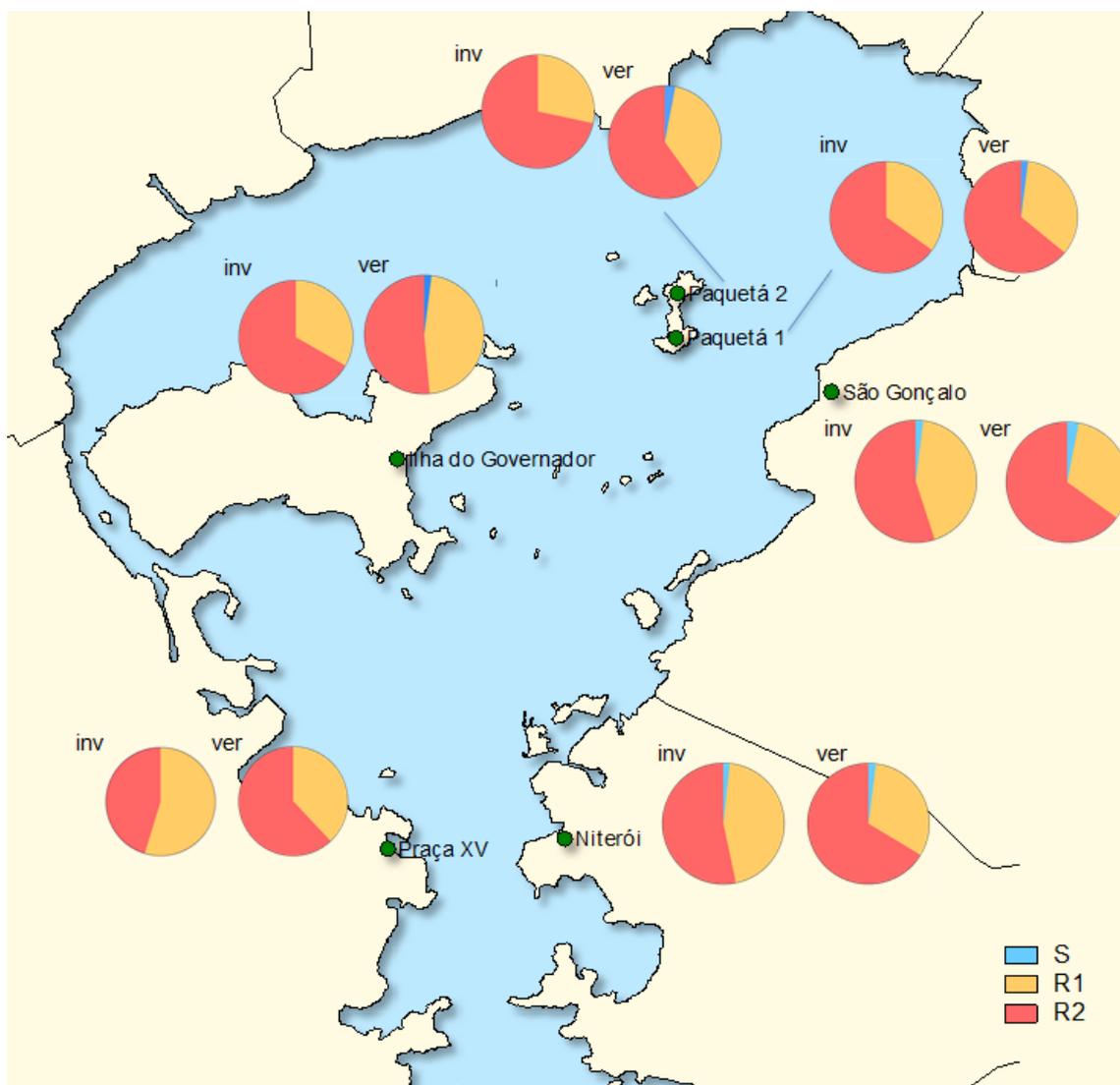
Pop.	Coleta	Frequência Alélica			Frequência Genotípica						Genótipos resistentes (%)
		$Nav^S$	$Nav^{R1}$	$Nav^{R2}$	SS	SR1	SR2	R1R1	R1R2	R2R2	
PQT I	inverno	0,0	0,35	0,65	0,0	0	0,0	0,07	0,57	0,37	100
	verão	0,02	0,34	0,64	0,0	0,03	0,0	0,10	0,45	0,41	93,3
PQT II	inverno	0,0	0,29	0,71	0,0	0,0	0,0	0,08	0,42	0,50	100
	verão	0,03	0,37	0,60	0,0	0,03	0,33	0,17	0,37	0,40	93,3
PXV	inverno	0,0	0,55	0,45	0,0	0,0	0,0	0,30	0,49	0,21	100
	verão	0,0	0,38	0,62	0,0	0,0	0,0	0,15	0,46	0,38	100
CCT	inverno	0,0	0,33	0,67	0,0	0,0	0,0	0,17	0,30	0,52	100
	verão	0,02	0,47	0,52	0,0	0,0	0,33	0,17	0,60	0,20	96,7
NIT	inverno	0,02	0,45	0,53	0,0	0,03	0,0	0,23	0,40	0,33	96,7
	verão	0,02	0,32	0,67	0,0	0,0	0,33	0,17	0,30	0,50	96,7
ITC	inverno	0,02	0,43	0,55	0,0	0,04	0,0	0,09	0,64	0,23	95,5
	verão	0,03	0,32	0,65	0,03	0,0	0,0	0,17	0,30	0,50	96,7

Pop. (População); PXV (Praça XV); NIT (Niterói); CCT (Cocotá); ITC (Itaóca); PQT (Paquetá); Genótipos resistentes (R1R1, R1R2, R2R2).

Como se pode observar, a proporção de genótipos mutantes mostra-se acima de 90%, em todas as localidades, nas duas coletas realizadas, com pouca variação entre as estações. A média geral dos genótipos resistentes foi de 16% para R1R1, 44% para R1R2 e 38% para R2R2. A frequência do genótipo R2R2, resistente para ambos os sítios, manteve-se de baixa a média entre as populações. A localidade com menor frequência foi Cocotá (20%) coletados no verão e Praça XV (21%) e Itaóca (23%) coletados no inverno. A maior frequência para esse mesmo genótipo (R2R2) foram as populações de Niterói (50%) e Itaóca (50%) coletados no verão e Paquetá II (50%) e Cocotá (52%) coletados no inverno (Tabela 5.7 e Figura 5.22 B).



**Figura 5.22:** Frequências alélicas e genotípicas referentes aos sítios 1016 e 1534 do canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_V$ ) em *Ae. aegypti*, obtidos em seis populações do Rio de Janeiro, Brasil, coletados em junho e dezembro de 2014. Lado esquerdo = amostras do inverno; lado direito = amostras do verão; (A) frequência dos alelos  $Na_V$  S, R1 e R2; (B) frequência genotípica R1R1, R1R2 e R2R2. Legenda das populações: PQT= Paquetá; PXV= Praça XV; CCT= Cocotá; NIT= Niterói; ITC= Itaóca.



**Figura 5.23:** Mapa da distribuição das frequências dos alelos S (selvagem), R1 (mutante sítio 1534) e R2 (mutante sítios 1016 e 1534) do canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_v$ ) em *Ae. aegypti*, estimados em seis populações de *Ae. aegypti* de regiões portuárias da região metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil, coletados em junho e dezembro de 2014. Inv: inverno; ver: verão.

## 5.5 Genética populacional de *Ae. aegypti* por meio de marcadores microssatélites

### 5.5.1 Diversidade genética dos loci microssatélites

A partir da genotipagem dos 12 *loci* microssatélites desenvolvidos para *Ae. aegypti* utilizados neste estudo, obteve-se o total de 336 indivíduos genotipados, cujos genótipos foram avaliados quanto aos padrões evolutivos de genética de populações.

As tabelas 5.8 e 5.9 mostram as frequências alélicas por *locus* e por população e os padrões de diversidade genética encontrados nas amostras coletadas no inverno e verão, respectivamente. Todos os *loci* mostraram-se polimórficos nas duas estações, tendo sido obtidos de três alelos (*locus* A9, AC4, B2 e B3) a 19 alelos (*locus* AG2) alelos no inverno (Tabela 5.8) e de três (*locus* A9, B2 e B3) a 20 (*locus* AG2) alelos no verão (Tabela 5.9).

A média da riqueza alélica ( $N_a$ ) foi de quatro alelos por população de *Ae. aegypti* nas duas estações. A variação da heterozigosidade observada ( $H_o$ ) total na estação do inverno foi de 0,328 a 0,437 e a esperada ( $H_e$ ) foi de 0,466 a 0,502 (Tabela 5.8) e, na estação do verão a  $H_o$  variou de 0,392 a 0,509 e a  $H_e$  foi de 0,456 a 0,546 (Tabela 5.9).

**Tabela 5.8:** Frequências alélicas e estimativas de variabilidade genética de 12 *loci* microssatélites analisados em seis populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro (RJ), Brasil, coletados no inverno (junho/2014). Em negrito: nome do *locus* e nome do alelo; N: número de indivíduos genotipados; *Hprare* – Na: riqueza alélica; Ne: número efetivo de alelos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada.

<b>Locus</b>	<b>Alelo/n</b>	<b>Cocotá</b>	<b>Niterói</b>	<b>Paquetá I</b>	<b>Paquetá II</b>	<b>Praça XV</b>	<b>Itaóca</b>
	<b>N</b>	29	30	30	28	30	25
<b>A9</b>	<b>182</b>	0,138	0,217	0,100	0,036	0,283	0,020
	<b>188</b>	0,431	0,600	0,650	0,411	0,467	0,440
	<b>191</b>	0,431	0,183	0,250	0,554	0,250	0,540
	<b>N</b>	30	33	30	29	30	25
<b>AC4</b>	<b>126</b>	0,000	0,106	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>128</b>	0,850	0,742	0,783	0,897	0,850	0,880
	<b>130</b>	0,150	0,152	0,217	0,103	0,150	0,120
	<b>N</b>	30	33	30	30	30	25
<b>B2</b>	<b>95</b>	0,083	0,136	0,050	0,117	0,050	0,200
	<b>107</b>	0,033	0,000	0,017	0,033	0,050	0,000
	<b>113</b>	0,883	0,864	0,933	0,850	0,900	0,800
	<b>N</b>	30	32	30	30	30	25
<b>B3</b>	<b>166</b>	0,833	0,891	0,833	0,683	0,933	0,880
	<b>172</b>	0,017	0,094	0,100	0,067	0,033	0,060
	<b>175</b>	0,150	0,016	0,067	0,250	0,033	0,060
	<b>N</b>	30	30	30	29	30	24
<b>AC1</b>	<b>195</b>	0,267	0,183	0,233	0,207	0,100	0,104
	<b>197</b>	0,167	0,167	0,250	0,310	0,233	0,188
	<b>201</b>	0,017	0,033	0,017	0,000	0,000	0,000
	<b>203</b>	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>207</b>	0,050	0,033	0,000	0,000	0,000	0,021
	<b>209</b>	0,500	0,567	0,500	0,466	0,667	0,688
	<b>211</b>	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000
	<b>N</b>	30	29	29	28	30	24
<b>AC5</b>	<b>146</b>	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000
	<b>147</b>	0,017	0,000	0,034	0,036	0,000	0,000
	<b>148</b>	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000
	<b>154</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>155</b>	0,000	0,034	0,034	0,000	0,000	0,000
	<b>156</b>	0,133	0,103	0,103	0,089	0,167	0,125
	<b>157</b>	0,017	0,052	0,034	0,054	0,000	0,104
	<b>158</b>	0,000	0,086	0,034	0,089	0,000	0,083
	<b>159</b>	0,583	0,621	0,552	0,464	0,833	0,583
	<b>160</b>	0,233	0,103	0,138	0,214	0,000	0,104
	<b>161</b>	0,017	0,000	0,052	0,000	0,000	0,000
<b>197</b>	0,000	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	
	<b>N</b>	30	30	30	30	30	24
<b>AG1</b>	<b>115</b>	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>117</b>	0,433	0,567	0,500	0,517	0,400	0,521
	<b>119</b>	0,133	0,083	0,150	0,083	0,183	0,063
	<b>121</b>	0,433	0,267	0,350	0,400	0,417	0,417
	<b>N</b>	29	29	30	29	30	24
<b>AG5</b>	<b>166</b>	0,103	0,034	0,067	0,103	0,050	0,083
	<b>168</b>	0,293	0,259	0,300	0,241	0,217	0,292

Locus	Alelo/n	Cocotá	Niterói	Paquetá I	Paquetá II	Praça XV	Itaóca
AG5	170	0,172	0,207	0,183	0,310	0,033	0,125
	172	0,017	0,017	0,000	0,069	0,100	0,021
	174	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	176	0,310	0,414	0,300	0,224	0,450	0,479
	178	0,103	0,069	0,150	0,052	0,150	0,000
N		30	33	30	30	30	25
A1	156	0,033	0,030	0,017	0,000	0,000	0,000
	158	0,017	0,015	0,017	0,033	0,050	0,000
	160	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000
	162	0,183	0,152	0,150	0,100	0,217	0,440
	166	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AC2	168	0,750	0,788	0,800	0,850	0,733	0,560
	174	0,017	0,015	0,017	0,000	0,000	0,000
	N		30	33	30	30	25
	180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	182	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AG2	184	0,317	0,182	0,333	0,367	0,233	0,360
	186	0,117	0,045	0,100	0,067	0,250	0,060
	188	0,567	0,773	0,567	0,567	0,517	0,580
	N		29	32	30	30	25
	113	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
AG2	114	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	115	0,241	0,328	0,200	0,267	0,183	0,360
	117	0,034	0,063	0,000	0,050	0,050	0,000
	119	0,483	0,344	0,467	0,483	0,317	0,360
	131	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	143	0,000	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000
	145	0,000	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000
	149	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000
	151	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000
	153	0,000	0,000	0,033	0,017	0,000	0,000
	155	0,000	0,000	0,033	0,000	0,133	0,000
	157	0,034	0,000	0,000	0,033	0,050	0,080
	159	0,069	0,047	0,100	0,017	0,017	0,000
	161	0,017	0,063	0,000	0,000	0,000	0,080
	163	0,000	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000
164	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,080	
167	0,069	0,000	0,067	0,117	0,050	0,000	
169	0,052	0,063	0,033	0,017	0,133	0,020	
171	0,000	0,031	0,033	0,000	0,033	0,020	
173	0,000	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	
174	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
N		30	32	30	29	30	25
CT2	182	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	184	0,733	0,750	0,633	0,879	0,717	0,520
	188	0,267	0,250	0,367	0,121	0,267	0,480
	190	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000
Ne		2,294	2,195	2,306	2,299	2,304	2,123
Ho		0,424	0,328	0,437	0,354	0,400	0,353
He		0,502	0,481	0,500	0,486	0,466	0,485
Hp rare - Na		3,85	4,45	4,03	4,00	3,62	3,32

**Tabela 5.9:** Frequências alélicas e estimativas de variabilidade genética de 12 *loci* microssatélites analisados em seis populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro (RJ), Brasil, coletados no verão (dezembro/2014). Em negrito: nome do *locus* e nome do alelo; N: número de indivíduos genotipados; *Hprare* – Na: riqueza alélica; Ne: número efetivo de alelos; Ho: heterozigiosidade observada; He: heterozigiosidade esperada.

<i>Locus</i>	Alelo/n	Cocotá	Niterói	Paquetá	Paquetá II	Praça XV	Itaóca
<b>A9</b>	N	12	23	12	9	17	15
	<b>182</b>	0,000	0,130	0,125	0,000	0,206	0,067
	<b>188</b>	0,917	0,370	0,500	0,444	0,559	0,400
<b>AC4</b>	<b>191</b>	0,083	0,500	0,375	0,556	0,235	0,533
	N	13	24	12	10	17	15
	<b>126</b>	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>B2</b>	<b>128</b>	0,769	0,688	0,958	1,000	0,882	0,867
	<b>130</b>	0,231	0,271	0,042	0,000	0,118	0,133
	N	13	26	12	10	17	15
<b>B3</b>	<b>95</b>	0,000	0,077	0,042	0,100	0,147	0,267
	<b>107</b>	0,077	0,000	0,000	0,050	0,088	0,000
	<b>113</b>	0,923	0,923	0,958	0,850	0,765	0,733
<b>AC1</b>	N	13	26	12	10	17	14
	<b>166</b>	0,885	0,750	0,500	0,700	0,971	0,857
	<b>172</b>	0,038	0,135	0,083	0,050	0,029	0,036
<b>AC5</b>	<b>175</b>	0,077	0,115	0,417	0,250	0,000	0,107
	N	27	25	16	27	18	26
	<b>195</b>	0,074	0,120	0,313	0,222	0,111	0,135
	<b>197</b>	0,204	0,340	0,063	0,093	0,278	0,212
	<b>201</b>	0,074	0,040	0,000	0,019	0,028	0,019
	<b>203</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>207</b>	0,074	0,020	0,063	0,037	0,028	0,077
<b>209</b>	0,574	0,480	0,563	0,630	0,556	0,558	
<b>AG1</b>	<b>211</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	25	25	16	24	18	23
	<b>146</b>	0,000	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000
	<b>147</b>	0,000	0,000	0,000	0,042	0,000	0,000
	<b>148</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>154</b>	0,000	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000
	<b>155</b>	0,000	0,060	0,188	0,000	0,111	0,000
	<b>156</b>	0,160	0,060	0,000	0,125	0,000	0,217
	<b>157</b>	0,020	0,080	0,063	0,000	0,028	0,000
	<b>158</b>	0,000	0,500	0,656	0,021	0,778	0,174
	<b>159</b>	0,700	0,220	0,000	0,771	0,056	0,543
<b>160</b>	0,100	0,000	0,063	0,042	0,028	0,065	
<b>161</b>	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>197</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
<b>AG5</b>	N	27	24	15	27	18	26
	<b>115</b>	0,019	0,000	0,000	0,000	0,028	0,019
	<b>117</b>	0,463	0,438	0,600	0,444	0,306	0,385
	<b>119</b>	0,130	0,063	0,167	0,259	0,250	0,135
<b>AG5</b>	<b>121</b>	0,389	0,500	0,233	0,296	0,417	0,462
	N	25	20	15	24	18	23
	<b>166</b>	0,080	0,100	0,067	0,125	0,083	0,043
	<b>168</b>	0,140	0,150	0,400	0,188	0,194	0,370

<i>Locus</i>	<i>Alelo/n</i>	<i>Cocotá</i>	<i>Niterói</i>	<i>Paquetá</i>	<i>Paquetá II</i>	<i>Praça XV</i>	<i>Itaóca</i>	
AG5	170	0,060	0,100	0,067	0,250	0,083	0,196	
	172	0,100	0,050	0,000	0,125	0,083	0,043	
	174	0,020	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	
	176	0,460	0,400	0,367	0,229	0,361	0,348	
	178	0,140	0,175	0,100	0,083	0,194	0,000	
N	28	28	18	27	23	28		
A1	156	0,107	0,125	0,000	0,000	0,043	0,000	
	158	0,071	0,036	0,056	0,056	0,000	0,000	
	160	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	162	0,089	0,250	0,139	0,111	0,196	0,357	
	166	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
AC2	168	0,696	0,589	0,806	0,833	0,761	0,643	
	174	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	N	28	28	18	27	23	29	
	180	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000	
	182	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	
AG2	184	0,482	0,339	0,306	0,241	0,283	0,379	
	186	0,107	0,054	0,111	0,019	0,196	0,086	
	188	0,411	0,589	0,583	0,741	0,522	0,517	
	N	22	26	19	23	19	29	
	113	0,000	0,000	0,026	0,000	0,000	0,000	
AG2	114	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	
	115	0,045	0,288	0,237	0,239	0,079	0,259	
	117	0,114	0,423	0,421	0,130	0,632	0,000	
	119	0,386	0,000	0,026	0,478	0,026	0,328	
	131	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,000	
	143	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	
	145	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	149	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	151	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	153	0,023	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	
	155	0,068	0,000	0,000	0,000	0,053	0,017	
	157	0,068	0,058	0,026	0,022	0,053	0,052	
	159	0,136	0,000	0,079	0,022	0,026	0,052	
	161	0,000	0,038	0,026	0,000	0,000	0,052	
	163	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	
AG2	164	0,000	0,019	0,026	0,000	0,053	0,034	
	167	0,023	0,115	0,079	0,022	0,026	0,052	
	169	0,045	0,000	0,053	0,043	0,000	0,069	
	171	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	
	173	0,045	0,019	0,000	0,000	0,026	0,017	
	174	0,000	0,000	0,000	0,022	0,000	0,000	
	N	28	28	19	24	23	29	
	182	0,000	0,000	0,053	0,000	0,000	0,000	
	CT2	184	0,500	0,589	0,658	0,500	0,717	0,483
	188	0,500	0,393	0,289	0,500	0,283	0,517	
190	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000		
Ne		2,281	2,463	2,209	2,201	2,183	2,431	
Ho		0,509	0,452	0,392	0,421	0,435	0,396	
He		0,473	0,546	0,482	0,456	0,470	0,528	
Hprare Na		4,11	4,05	3,75	3,64	3,95	3,98	

Desvios significativos após a correção de Bonferroni para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram observados em cinco *loci*, mas em um número maior de populações apenas nos *loci* A9 e AC5. A maioria dos *loci* que apresentaram desvios significativos possuem valores de  $F_{IS}$  positivos (Tabela 5.10), o que significa que as populações tem excesso de homozigotos. Uma possibilidade, que já foi encontrada para os *loci* mais problemáticos (*loci* A9 e AC5), é a presença de alelos nulos nessas populações (Tabela 5.11).

Segundo as análises da presença de alelos nulos nos *loci* avaliados, o programa Micro-checker indicou a ocorrência de alelos nulos nos *loci* A9 e AC5 nos mosquitos de *Ae. aegypti* do inverno e nos *loci* A9, B3, AC5, AG1 e AG2 nas amostras do verão: todos em baixas frequências (Tabela 5.11). Não foi sinalizada a presença de *stutters* e *dropout* de alelos.

Vale ressaltar que os *loci* A9 e AC5 já foram considerados problemáticos (BROWN et al., 2011), devido à presença constante de alelos nulos, também já relatados em outros estudos que utilizaram o mesmo conjunto de marcadores (GLORIA-SORIA et al., 2016a; KOTSAKIOZI et al., 2017; MONTEIRO et al., 2014). Apesar dos alelos nulos ainda serem considerados um problema para estudos populacionais, pois podem aumentar medidas de diferenciação genética e criar falsos homozigotos (CHAPUIS; ESTOUP, 2007), Carlsson (2008) verificou que microssatélites com alelos nulos ainda podem ser utilizados de forma eficiente para estudos populacionais. O autor constatou que o efeito de superestimação no  $F_{ST}$  é moderado e não é prejudicial para testes de atribuição. Diante disso, nossas análises foram realizadas com a presença dos *loci* que continham estes alelos.

Para o teste de desequilíbrio de ligação realizado pelo *software* Genepop, foram realizados 66 comparações par-a-par para todas as amostras (verão e inverno). Dos 66 testes realizados, seis (9,1%) permaneceram significativos mesmo após a correção de Bonferroni. Este nível de LD é baixo e não influencia significativamente os métodos que avaliam a independência dos *loci* (KOTSAKIOZI et al., 2017).

**Tabela 5.10:** Coeficientes de endogamia (FIS) estimados para 12 *loci* microssatélites utilizados em análises populacionais em seis populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil, coletados no inverno (junho/2014) e verão (dezembro/2014). Em negrito estão os valores significativos para desequilíbrio de Hardy-Weinberg.

Pop.	Loci											
	A9	AC4	B2	B3	AC1	AC5	AG1	AG5	A1	AC2	AG2	CT2
CCT_inv	<b>0,8356</b>	0,1018	-0,086	0,4246	-0,011	<b>0,4455</b>	0,0279	-0,017	0,0225	-0,045	0,1227	0,1643
NIT_inv	<b>0,7687</b>	0,3557	0,3701	0,5373	0,2033	0,4221	<b>0,4523</b>	0,0983	0,3307	0,1089	0,273	0,1821
PQT I_inv	<b>0,7436</b>	-0,261	0,2232	<b>0,5538</b>	0,0161	<b>0,438</b>	0,0252	-0,037	0,0268	0,0607	0,0484	0,0122
PQT II_inv	<b>0,802</b>	-0,098	0,1288	<b>0,6523</b>	0,0535	<b>0,6129</b>	0,3088	0,218	0,1398	0,0293	0,0325	0,2045
PXV_inv	0,4917	0,3612	-0,064	0,4867	0,4034	0,5323	-0,142	0,1302	-0,114	0,0971	0,0014	0,1332
ITC_inv	<b>0,9252</b>	0,2615	-0,231	-0,079	-0,019	<b>0,6074</b>	0,114	0,265	0,3684	0,2649	0,1874	0,3766
CCT_ver	1	0,1724	-0,044	-0,059	-0,07	0,1753	0,1186	-0,022	-0,003	0,106	-0,226	-1
NIT_ver	0,5064	0,1914	-0,064	0,3542	-0,109	<b>0,4875</b>	-0,03	0,1739	-0,041	0,1491	0,2147	0,2996
PQT I_ver	0,7396	NA	NA	0,7284	0,1667	-0,039	0,1967	-0,034	-0,155	0,0258	0,1818	0,2588
PQT II_ver	1	NA	-0,08	0,5862	-0,071	0,2648	0,2172	0,0459	-0,13	0,0764	0,0808	<b>-1</b>
PXV_ver	<b>0,9059</b>	-0,103	-0,191	NA	-0,176	0,2917	0,1158	0,0943	0,1089	-0,048	0,0341	-0,158
ITC_ver	<b>1</b>	0,451	0,3488	-0,095	0,3349	0,3908	0,0898	0,2757	0,2394	0,2448	0,2048	-0,366

Pop. (População); PXV (Praça XV); NIT (Niterói); CCT (Cocotá); ITC (Itaóca); PQT (Paquetá); Inv (inverno), ver (verão).

**Tabela 5.11:** Frequência dos alelos nulos encontrados nas populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil, coletados no inverno (junho/2014) e verão (dezembro/2014).

<b>Locus</b>	<b>inverno</b>	<b>verão</b>
	<b>Frequência do alelo nulo</b>	
<b>A9</b>	0,2985	0,2325
<b>AC4</b>		
<b>B2</b>		
<b>B3</b>	0,1697	
<b>AC1</b>		
<b>AC5</b>	0,2496	0,2354
<b>AG1</b>	0,1511	
<b>AG5</b>		
<b>A1</b>		
<b>AC2</b>		
<b>AG2</b>	0,0902	
<b>CT2</b>		

### 5.5.2 Variação e estrutura genética das populações

Os valores de índice de fixação ( $F_{ST}$ ) entre as populações de *Ae. aegypti* nas seis localidades estudadas estão apresentadas na Tabela 5.12, para as amostras do verão e do inverno. Nas análises do inverno, o valor geral de  $F_{ST}$  = 0,071 sugere um baixo nível de estruturação populacional, variando de 0,008 entre Cocotá e Paquetá I a 0,019 entre Itaóca e Cocotá. Nas amostras do verão, o  $F_{ST}$  geral foi 0,026, o qual variou de 0,017 entre Itaóca e Cocotá a 0,083 entre Paquetá II e Praça XV, também indicando baixa diferenciação genética entre as populações. Em relação a variabilidade avaliada pela AMOVA, os mosquitos de *Ae. aegypti* apresentaram baixa diferenciação entre as populações tanto no inverno (3%) quanto no verão (7 %) (Tabela 5.12).

**Tabela 5.12:** Matriz de índice de fixação (FST) entre seis populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil, coletados no inverno (junho/2014) e verão (dezembro/2014).

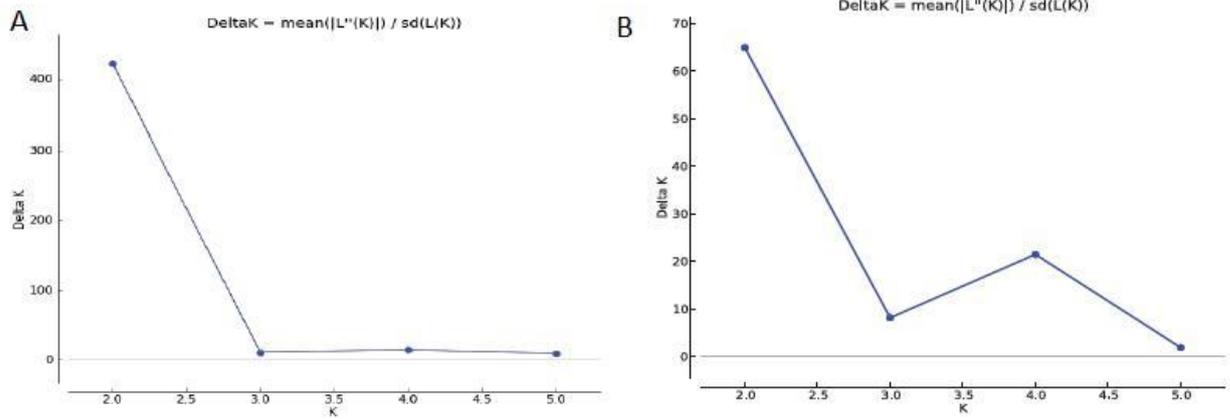
	CCT_inv	NIT_inv	PQT I_inv	PQT II_inv	PXV_inv	ITC_inv	CCT_ver	NIT_ver	PQT I_ver	PQT II_ver	PXV_ver	ITC_ver
CCT_inv	0,000											
NIT_inv	0,015	0,000										
PQT I_inv	0,008	0,012	0,000									
PQT II_inv	0,011	0,028	0,022	0,000								
PXV_inv	0,016	0,018	0,018	0,036	0,000							
ITC_inv	0,019	0,027	0,025	0,036	0,027	0,000						
CCT_ver	0,034	0,035	0,019	0,059	0,029	0,043	0,000					
NIT_ver	0,034	0,039	0,034	0,042	0,046	0,034	0,055	0,000				
PQT I_ver	0,050	0,057	0,051	0,046	0,073	0,065	0,081	0,035	0,000			
PQT II_ver	0,024	0,035	0,030	0,031	0,037	0,031	0,054	0,057	0,056	0,000		
PXV_ver	0,056	0,053	0,053	0,064	0,058	0,062	0,070	0,031	0,041	0,083	0,000	
ITC_ver	0,017	0,030	0,024	0,033	0,028	0,006	0,043	0,031	0,060	0,029	0,054	0,000

Pop. (População); PXV (Praça XV); NIT (Niterói); CCT (Cocotá); ITC (Itaóca); PQT (Paquetá). Inv (inverno), ver (verão).

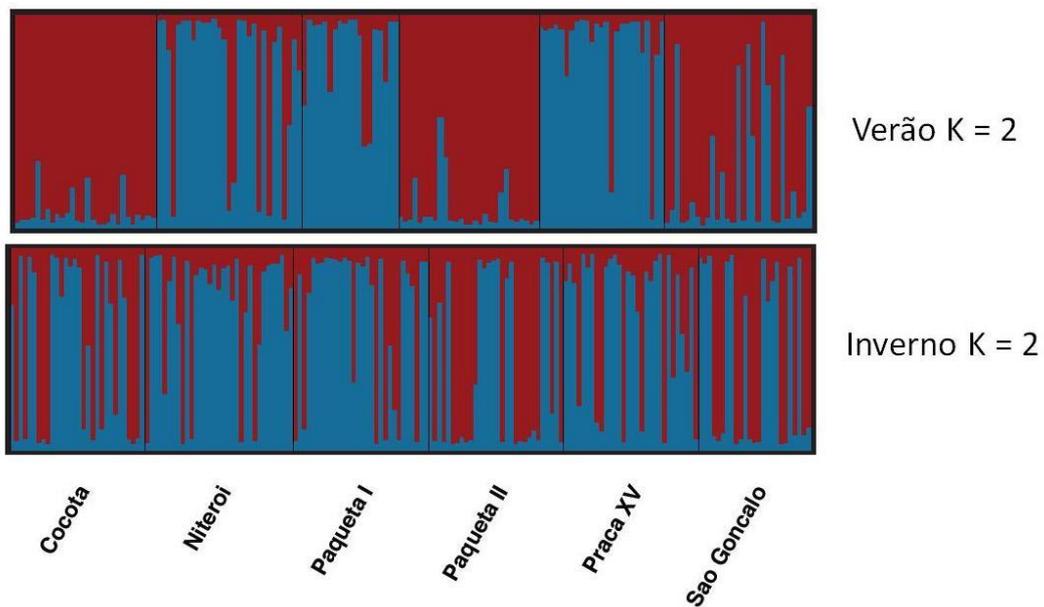
**Tabela 5.13:** Análise de variância molecular (AMOVA) entre seis populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil, coletados no inverno (junho/2014) e verão (dezembro/2014).

Origem das amostras	Porcentagem de variação (%)	Índice de Fixação
<b>Amostras do inverno</b>		
entre	3	$F_{ST} = 0,028$
dentro	97	
<b>Amostras do verão</b>		
entre	7	$F_{ST} = 0,0719$
dentro	93	
<b>Amostras total (verão e inverno)</b>		
entre	3	$F_{ST} = 0,031$
dentro	97	

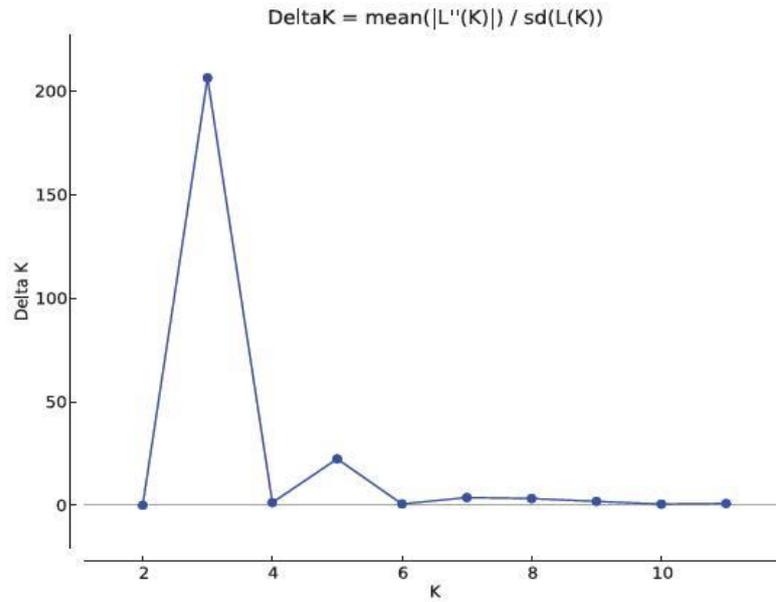
Na análise bayesiana de agrupamento populacional avaliada pelo programa *Structure* (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), utilizado para quantificar o número de populações geneticamente homogêneas ( $K$ ), o número mais provável de agrupamentos genéticos igual nas duas estações. Nas amostras coletadas no verão e no inverno foi observado  $K=2$  pelo gráfico de Evanno (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005) (Figura 5.24) e de barras (Figura 5.25). Quando avaliamos as populações e as estações do ano em conjunto (amostras do verão e inverno juntas), o melhor é o  $K=3$  (Figura 5.26 e 5.27), e evidencia um grupo genético distinto formado pelas populações de Paquetá I, Praça XV e Niterói.



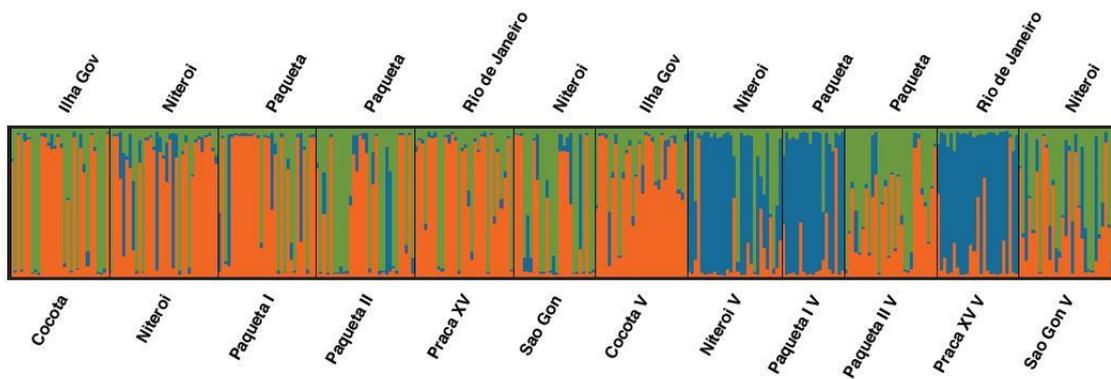
**Figura 5.24:** Gráfico de Evanno para as populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro, Brasil, do verão (A) e inverno (B) ( $K= 2$ ). Coleta do inverno (junho/2014) e do verão (dezembro/2014).



**Figura 5.25:** Gráfico de barras do Structure para as amostras de *Ae. aegypti* do verão (acima) e do inverno (abaixo) ( $K= 2$ ). Coleta do inverno (junho/2014) e do verão (dezembro/2014).



**Figura 5.26:** Gráfico de Evano para as amostras de *Ae. aegypti* do verão e inverno juntas (K= 3). Coleta do inverno (junho/2014) e do verão (dezembro/2014).



**Figura 5.27:** Gráfico de barras do Structure para as amostras de *Ae. aegypti* de coletas do verão e inverno juntas (K= 3). Coleta do inverno (junho/2014) e do verão (dezembro/2014).

## **5.6 Atividades de treinamento e capacitação em controle de mosquitos vetores - Brasil Sem Miséria (BSM)**

As atividades educativas realizadas na Ilha de Paquetá compreenderam a temática das doenças causadas por arbovírus transmitidos por mosquitos e a biologia dos vetores. Durante o período de monitoramento de ovitrampas (maio/14 a maio/16) foram realizadas palestras de capacitação teórica aos agentes que atuavam na Ilha, com apresentação das principais áreas de infestação de *Aedes*, diagnosticadas pelas ovitrampas. Atividades de sensibilização também foram aplicadas aos caseiros de imóveis de veraneio. Esses públicos-alvo são extremamente importantes para evitar possíveis focos nos imóveis sem moradores permanentes (Figura 5.28).

Participamos de eventos de promoção de saúde idealizados pelo Centro Municipal de Saúde Manoel Arthur Villaboim, como passeatas do dia D contra a dengue, gincanas educativas em escolas e amostras de temas diversos em saúde (Figura 5.29).

Todas as atividades foram direcionadas ao tema dos “Dez minutos contra a dengue”, com demonstração dos vetores nas fases de ovo, imaturos e adultos, tipos de criadouros de larvas e formas de eliminação.

De outubro de 2016 a março de 2017, a densidade de *Aedes* foi monitorada com 50 ovitrampas em Paquetá I para a sensibilização dos moradores quanto as medidas preventivas de controle de focos dos mosquitos. Os mapas foram elaborados com o número total de ovos de *Aedes* por mês e inseridos em mapas de kernel, identificando as áreas mais quentes, como exemplificado na Figura 5.30. Nas duas primeiras semanas de cada mês, os mapas foram distribuídos em residências e pontos comerciais, com cobertura quase total, para que todos pudessem estar cientes da quantidade de ovos encontrados pelas armadilhas distribuídas ns quarteirões próximos ao imóvel.

De 1.425 imóveis existentes em Paquetá I, foram visitados 2.850 imóveis durante as 25 SE de acompanhamento, com pendência de 45% por estarem fechados.



**Figura 5.28:** Eventos de capacitação aos agentes de vigilância em saúde (AVS) e caseiros vigilantes de domicílios da Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil.



**Figura 5.29:** Eventos educativos e de sensibilização sobre o ciclo de vida do *Aedes* e os arbovírus transmitidos que causam de doenças, aos moradores e estudantes da Ilha de Paquetá, Rio de Janeiro, Brasil.



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Direcionamento do controle de *Aedes* em Paquetá I

Uma parte deste estudo acompanhou os níveis de infestação por *Aedes* em toda Ilha de Paquetá por meio da coleta contínua de ovos utilizando ovitrampas georreferenciadas durante 24 semanas, de maio de 2014 a maio de 2016. O objetivo principal foi monitorar a dinâmica espacial e os índices de infestação dos vetores e, a partir desses resultados, também direcionar o controle para as áreas mais críticas.

Os índices de infestação estimados pela presença e quantidade de ovos coletados nas ovitrampas indicaram uma ampla distribuição e altas densidades de *Aedes* em Paquetá I. As 40 armadilhas nunca apresentaram índice de positividade 0 e abaixo de 50%, mesmo durante o inverno. A densidade de ovos foi sazonal durante o estudo, com redução nos meses de maio e junho de 2015 provavelmente por causa dos mutirões realizados em toda a Ilha de Paquetá nos meses anteriores. Os mutirões eram eventos que aconteciam em decorrência da pouca quantidade de AVSs disponíveis para o trabalho de campo. Em vista disso, a Coordenação da CAP 1.0, responsável pela vigilância na Ilha, organizou algumas ações conjuntas para tentar reduzir o número de criadouros de mosquitos. Os mutirões ocorriam durante uma semana completa, geralmente a cada dois meses, com cerca de 10 agentes espalhados por toda Ilha de Paquetá.

Das análises bimestrais, o IPO permaneceu elevado durante as 24 semanas avaliadas ( $\geq 40\%$ ) detectando a presença constante de fêmeas de *Aedes* por toda extensão da Ilha. Em outro estudo, a flutuação na positividade de ovitrampas também foi observada em três bairros de zonas urbanas e suburbanas do Rio de Janeiro (HONÓRIO et al., 2009b), com valores acima de 60%. Codeço et al (2015) encontraram flutuação no IPO, geralmente entre 20 e 60% em cinco cidades de diferentes Estados brasileiros, sendo duas cidades do Estado do Rio de Janeiro. Em nossos dados, a densidade de ovos coletados pelas armadilhas também se manteve elevada durante todo o monitoramento, com média de 222 ovos por armadilha. Número elevado de

ovos por ovitrampa também foi detectado em outros estudos realizados em outras localidades do Rio de Janeiro, Belo Horizonte (MG) e Recife (PE) (HONÓRIO et al., 2009b, 2009a; PESSANHA et al., 2014; REGIS et al., 2008).

As ovitrampas são armadilhas preconizadas pelo PNCD, utilizadas como método de investigação secundária (o principal é a pesquisa larvária), em áreas não infestadas pelo vetor (BRASIL, 2009). A ovitrampa é uma estratégia de vigilância eficiente, que já vem sendo utilizadas no Brasil (BRAGA et al., 2000; CODEÇO et al., 2015; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2008; PESSANHA et al., 2014; REGIS et al., 2008, 2014; RUEDA, 2008) e em outros países (HO et al., 2005; TORRES-ESTRADA; C; RODILES-CRUZ, 2013; WONG et al., 2011), pois aumenta a sensibilidade do diagnóstico da presença do vetor e o emprego de ações preventivas. No município do Rio de Janeiro, as ovitrampas são utilizadas em conjunto com a pesquisa larvária, em quantidade variável entre as CAPs. Em toda Ilha de Paquetá, são utilizadas apenas cinco ovitrampas, com intervalo de dois meses entre as instalações.

Paquetá foi o ambiente de escolha para o estudo pois é uma ilha, é isolada e aparentemente seria mais fácil de aplicar nossa estratégia de direcionamento do controle. No entanto, nossos resultados mostraram-se contrários às nossas perspectivas. Quando testamos a associação entre índices entomológicos e as ações realizadas em campo na área de estudo e na área controle, obtivemos os resultados de baixos valores de significância estatística. O controle foi realizado, direcionando as áreas cujas ovitrampas tinha maior quantidade de ovos, ou seja, os quarteirões com maior densidade de ovos de *Aedes*. As ações de controle seguiram as atividades de rotina preconizadas pelo PNCD (BRASIL, 2009), aplicadas pela vigilância da CAP 1.0, porém com a quantidade insuficiente de 2AVSs para a cobertura total da Ilha. Para dificultar, cerca de 40% dos imóveis em Paquetá são de veraneio, frequentados apenas aos finais de semanas que, muitas vezes, permanecem fechados por muito tempo, aumentando o número de imóveis pendentes durante as inspeções. Esse pode ter sido o principal motivo das ações de controle não terem alcançado o resultado que esperávamos. Considerando este fator, pendências na inspeção dos domicílios, uma alternativa seria que as atividades de controle vetorial ocorressem também aos finais de semana,

assim talvez, haveria a redução de imóveis não inspecionados e provavelmente os criadouros seriam eliminados. Para complicar, os criadouros mais prevalentes na Ilha são do tipo C (Tabela 5.2), como piscinas, calhas de telhado e ralos, os quais são de difícil acesso e eliminação da água contida no recipiente. Para um trabalho eficiente de controle, o ideal seria ter um número apropriado de agentes para toda a extensão da Ilha, considerando os mais de 3.000 imóveis existentes, trabalhando em cerca de 800 imóveis por agente, durante dois meses de visita casa a casa.

Já é sabido que as ovitrampas são armadilhas eficientes no monitoramento e vigilância de *Aedes*, para acompanhar a infestação, dinâmica temporal e espacial. As ovitrampas são versáteis e já mostraram-se eficazes no controle desses vetores de diversas formas, com mudanças na estrutura do depósito, no tipo de substrato para oviposição, na composição do atrativo para as fêmeas e na adição de larvicidas para a supressão da população do vetor (ABAD-FRANCH et al., 2015; LUZ; ABAD-FRANCH; ZAMORA-PEREA, 2017).

Em um estudo de vigilância continuada no município do Recife (PE), baseada na coleta e contagem de ovos usando ovitrampas georreferenciadas e com *Bti*, Regis et al (2008) afirmaram que esta é uma estratégia eficiente, sendo as ovitrampas preditoras de possíveis aumentos na densidade de *Ae. aegypti*. A partir desse estudo, os autores desenvolveram um sistema de monitoramento e controle de populações de *Ae. aegypti*, com base na amostragem de ovos coletados pelas ovitrampas georreferenciadas, o SMCP-*Aedes* (REGIS et al., 2009). Esse sistema foi similar à nossa estratégia de monitoramento, na questão do direcionamento do controle e georreferenciamento das armadilhas, porém com intervenções de controle adaptadas às condições de cada área trabalhada. O sistema foi positivo com a supressão do vetor, a partir da remoção de ovos do ambiente, com o controle dos imaturos com o uso de peixes larvófagos em depósitos de grande porte e, pelo uso de aspiradores para a captura dos vetores adultos, realizadas quinzenalmente ou mensalmente (REGIS et al., 2009).

Apesar de nossos dados não apresentarem os resultados desejados, com a redução da densidade populacional de *Aedes* na Ilha de Paquetá, nossa pesquisa só vem a acrescentar o quão necessário é ter o apoio e eficiência dos

agentes de saúde disponíveis para o trabalho em campo. Ademais, acreditamos no potencial das ovitrampas no direcionamento do controle, uma vez que são armadilhas fáceis e de custo reduzido para o monitoramento espacial do vetor.

## **6.2 Distribuição espacial de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá**

Durante os 12 meses de coletas bimestrais, foi observado que a dinâmica espacial-temporal de *Aedes* é sazonal e heterogênea por toda Ilha de Paquetá, com *Ae. aegypti* (70%) mais prevalente que *Ae. albopictus* (30%). A Ilha de Paquetá é um ambiente com aspectos urbano-rurais equilibrados, densidade da vegetação distribuída homogênea por toda Ilha e algumas áreas isoladas com maior concentração florestal. A partir dos mapas de kernel (Figura 5.13 e 5.14), foi possível notar que ambas as espécies coexistem, apresentaram ampla distribuição espacial e, em algumas coletas, *Ae. albopictus* foi mais abundante nas áreas próximas de vegetação, seguindo parâmetros similares avaliados por outros autores no Rio de Janeiro (BRAKS et al., 2003; HONÓRIO et al., 2009a; LIMA-CAMARA, 2006).

Durante todo o estudo, ambas as espécies frequentaram as 90 ovitrampas, sendo a proporção de *Ae. albopictus* praticamente a metade de *Ae. aegypti* por ovitrampa. Braks et al (2003) também encontraram a co-ocorrência das espécies nas mesmas armadilhas de oviposição e abundância semelhante na maioria das áreas suburbanas avaliadas do Rio de Janeiro. Diferente do esperado, os autores constataram altas densidades de *Ae. aegypti* nas bordas de florestas dentro no município do Rio de Janeiro (BRAKS et al., 2003). *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, já foram encontradas frequentando as proximidades da Floresta da Tijuca, que é a maior floresta urbana do Rio de Janeiro (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2004; MACIEL-DE-FREITAS et al., 2006). Nos arredores da Floresta da Tijuca, *Ae. albopictus* foi mais prevalente em todas as ovitrampas e identificado em armadilhas em até 1.000 metros para dentro da floresta (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2004). Ao contrário, *Ae.*

*aegypti* foi identificado em até 100 metros de distância das casas (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2004; MACIEL-DE-FREITAS et al., 2006).

Em uma área de transição urbana-floresta no município do Rio de Janeiro, Honório et al (2009) descreveram a co-ocorrência de *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* na zona de transição entre áreas altamente povoadas e vegetadas, com maior abundância da primeira espécie em áreas com maior cobertura vegetal, enquanto a segunda foi mais abundante em áreas mais povoadas.

A maioria das armadilhas monitoradas neste estudo foi instalada no peridomicílio, o que poderia também ter favorecido *Ae. albopictus*, considerando que é uma espécie essencialmente exofílica. No entanto, as ovitrampas podem ter sido desfavorecidas pela ampla presença de depósitos naturais distribuídos pelo peridomicílio, em razão da abundância de vegetação e jardins.

A relação entre infestação e temperatura, como já descrito por outros autores (CODEÇO et al., 2009, 2015; COSTA et al., 2008; WONG et al., 2011), também foi identificada em nossos resultados. Em nossas análises, a associação utilizou dados da temperatura mínima e precipitação de duas semanas de defasagem, da mesma forma que o observado na maioria das populações de *Aedes* coletadas com ovitrampas por Codeço et al (2015).

A série temporal da positividade das ovitrampas apontou sazonalidade, com alto percentual de ovitrampas positivas durante o verão e queda do índice no inverno, parâmetros comuns para *Aedes*. Esses parâmetros biológicos relacionados ao desenvolvimento do vetor (CHRISTOPHERS, 1960; HAWLEY, 1988) são favorecidos pela sazonalidade climática do Rio de Janeiro, que varia entre forte e fraca (LANA et al., 2014).

O IPO e IDO apresentaram associação significativamente positiva com a temperatura, uma vez que, quanto mais elevada a temperatura mínima do ambiente, maior foi a quantidade de armadilhas positivas e conseqüentemente, maior o número de ovos nas ovitrampas. A correlação maior da temperatura com o número de ovos totais foi entre 20 e 25 °C, similar aos resultados encontrados em Recife (COSTA et al., 2010) e em três bairros urbanos do Rio de Janeiro (HONÓRIO et al., 2009b). A precipitação ocorrida duas semanas antes da coleta de ovos apresentou maior correlação com o número total de

ovos encontrado nas ovitrampas, principalmente quando alcançava entre 5 e 10 mm. Wong et al (2011) também detectaram alta correlação entre precipitação ocorrida nas duas semanas anteriores e densidade de ovos de *Aedes*, em Iquitos no Peru.

A dinâmica da distribuição temporal de *Aedes* na Ilha de Paquetá e a associação entre dois fatores abióticos avaliados neste estudo, temperatura e precipitação, são importantes para o melhor entendimento da biologia desses vetores. Diante disso, novas estratégias de controle poderão ser planejadas para o manejo eficiente desses mosquitos na Ilha.

### **6.3 Resistência a inseticidas**

O controle do vetor tem como principal ferramenta a eliminação dos depósitos que são potenciais criadouros para o desenvolvimento das larvas do mosquito. No entanto, o uso de inseticidas químicos ainda se faz muito necessário e muitas vezes obrigatório. A utilização indiscriminada de alguns compostos tem levado à seleção de populações resistentes de mosquitos e, conseqüente falha no controle (BRAGA; VALLE, 2007b). Por este motivo, recomenda-se o acompanhamento do nível de resistência aos inseticidas utilizados no controle, em testes biológicos e moleculares.

Nesse contexto, o monitoramento da resistência é realizado com o intuito de conhecer o *status* da resistência/susceptibilidade a inseticidas em populações de *Ae. aegypti*. No Brasil, desde o final dos anos 90, com o estabelecimento da Rede MoReNAa (Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* a Inseticidas), instituído pelo Ministério da Saúde que ficou ativa até meados de 2013, diversos municípios do país foram avaliados, principalmente os que estavam com altas densidades do vetor ou com casos de dengue (BRAGA et al., 2004). Desde 2017 e até hoje, o monitoramento retomou as atividades em todo Brasil com foco no manejo racional dos produtos utilizados no controle químico em campo.

É a primeira vez que a resistência a inseticidas por meio de bioensaios foi avaliada na população de *Ae. aegypti* da Ilha de Paquetá. Entretanto, a frequência das mutações *kdr* já tinha sido anteriormente verificada (BRITO et

al., 2018). Nas demais localidades avaliadas neste estudo, a resistência já foi confirmada, anteriormente, para algum dos inseticidas utilizados em nossos experimentos (LIMA et al, 2003; Braga et al, 2004; Montella et al, 2007). Segundo Macoris (2002) os resultados de resistência servem como registro para comparações futuras na avaliação da manutenção dos níveis, diante das estratégias de controle químico realizadas em cada localidade.

O critério utilizado para a classificação das populações aqui estudadas seguiu os parâmetros determinados pela OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Os critérios são avaliados pela  $RR_{50}$ , os quais determinam que populações do mosquito são consideradas susceptíveis com  $RR_{50} < 5,0$ , moderadamente resistentes com  $RR_{50}$  de 5,0 a 10 e, altamente resistentes com  $RR_{50} > 10$ .

Com base nos resultados de bioensaios com temephos, pode-se notar que a sensibilidade ao OP continua instalada em todas as localidades, com reduzida variação da resistência entre as estações. Em amostras de *Ae. aegypti* coletadas nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, no ano de 1999, Lima et al (2003) detectaram resistência disseminada aos OPs. No Rio de Janeiro e nos municípios da região metropolitana a situação pareceu pior em relação a outros municípios menos populosos e no Espírito Santo. Na capital, Niterói e São Gonçalo não ultrapassaram 35% de taxa de mortalidade ao temephos. Para a população de São Gonçalo, a razão de resistência ( $RR_{50} = 7,6$ ) foi próxima a encontrada neste estudo ( $RR_{50} = 6,8$ ). Braga et al (2004), avaliaram amostras dos estados do Sergipe, Alagoas e Rio de Janeiro, incluindo Niterói e São Gonçalo, e detectaram as taxas mais elevadas nessas localidades ( $RR_{50} = 13,5$ ;  $RR_{50} = 15,5$ , respectivamente), superiores aos nossos dados. Montella et al (2007) estudaram populações de *Ae. aegypti* das cinco regiões do Brasil, inclusive a Ilha do Governador ( $RR_{95} = 7,4$ ) e Niterói ( $RR_{95} = 11,7$ ). Para esta avaliação do *status* da resistência, os autores utilizaram o critério do Ministério da Saúde, com avaliação pela  $RR_{95}$ .

Os organofosforados são inseticidas que foram demasiadamente aplicados para o controle larvário de *Ae. aegypti*. Após a epidemia de dengue de 1986, o Rio de Janeiro intensificou o controle químico do vetor com três OPs: malathion e fenitrothion como adulticidas e temephos como larvicida

(LIMA et al., 2003). Considerando que o uso do temephos foi interrompido oficialmente em 2009, até o presente estudo já se passaram mais de 10 anos e o perfil de resistência não mudou muito, indicando o processo de estabelecimento da resistência e a ineficácia do composto contra essas populações atualmente resistentes.

Neste trabalho também foi quantificada a resistência ao malathion. Apesar do malathion ainda estar sendo aplicado, pois foi reintroduzido para controle de adultos a partir de 2009 em substituição aos piretroides, ainda não foi relatada resistência a esse produto no Brasil. Nossos resultados mostram que a susceptibilidade do *Ae. aegypti* ao malathion persiste, conforme observada nas populações das áreas portuárias da região metropolitana do Rio de Janeiro, avaliadas neste estudo.

Lima et al (2003) relataram alterações incipientes na suscetibilidade de *Ae. aegypti* em Campos dos Goytacazes, Duque de Caxias e Niterói (RJ). Os ensaios com amostras de São Gonçalo e Rio de Janeiro apresentaram sensibilidade ao malathion, embora essas populações tenham apresentado altos níveis de resistência a temephos. Avaliando larvas e adultos de *Ae. aegypti* provenientes de sete municípios do nordeste brasileiro (Alagoas, Pernambuco e Sergipe), Macoris et al (2007) detectaram *status* de susceptibilidade ao malathion alterado. Nas amostras do estado de São Paulo nenhuma alteração foi encontrada, considerando que a mortalidade foi em torno de 98%. Os autores elaboraram um dendograma onde agruparam no mesmo *cluster* as populações de São Paulo junto à linhagem de referência Rockefeller.

A alternância periódica na aplicação de classes de inseticidas tem se mostrado uma estratégia eficiente no propósito de racionalizar o uso destes compostos químicos em campo e colaborar com a reposição de espécimes susceptíveis nas populações de vetores (VALLE, 2015). Embora o malathion esteja sendo aplicado como adulticida há quase 10 anos, seu uso é restrito à ações de bloqueio do vetor em casos de risco de surtos ou com epidemia declarada (BRASIL, 2009), não submetendo os mosquitos a um intenso e constante contato direto com o agente químico. Outra razão da sensibilidade das populações de *Ae. aegypti* é a possível existência de outros mecanismos

de resistência envolvidos, como por exemplo, enzimas de detoxificação. Hidayati et al (2011) observaram em laboratório a seleção de indivíduos resistentes ao malathion após 45 gerações. Mesmo sendo consideradas resistentes, as razões de resistência não foram tão elevadas, sugerindo que enzimas detoxificantes, como glutathione-S-transferases, e outros fatores genéticos podem estar envolvidos no processo de resistência a esse OP em *Ae. albopictus*.

O uso indiscriminado de inseticidas com base nos PI foi a grande razão da disseminação da resistência aos piretroides no Brasil (MARCOMBE et al., 2009), assim como para outras classes de inseticidas em vários lugares do mundo (HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010; MOYES et al., 2017). Desde a primeira vez que foi detectada no país em 2001, a resistência aos PI encontra-se hoje espalhada por todo território nacional. No estado do Rio de Janeiro foi constatada pela primeira vez por da-Cunha et al (2005), os quais avaliaram amostras de *Ae. aegypti* coletados nos anos de 2001 – 2003 em 10 municípios (entre eles a capital, Niterói e São Gonçalo) e, em municípios de Sergipe e de Alagoas. Os testes dose-diagnósticos foram com garrafas impregnadas com cypermetrina e, apesar de incipiente, a resistência já estava sendo detectada.

Nas cinco populações avaliadas em nosso estudo, todas apresentaram altas taxas de resistência a deltametrina, com  $RR_{50}$  acima de 19, durante todo estudo (Tabela 5.5). Esse perfil de resistência pôde ser também verificado pela alta frequência de genótipos mutantes relacionados a resistência a piretroides, cujos valores foram sempre acima de 90% (Tabela 5.7). Na Figura 5.22 é possível ver como se comporta a distribuição dos alelos e genótipos nas populações de *Ae. aegypti* avaliadas neste estudo. Diante dos resultados temporais apresentados, as populações apresentaram razões de resistência maior na época do verão, exceto em Cocotá. Esse fato pode ser resultado de um maior uso de inseticida doméstico aerossol, durante o verão, a maioria a base de piretroide, já que a dengue tem um padrão sazonal, com maior incidência de casos nos períodos mais quentes e úmidos (HONÓRIO et al., 2009b).

Aqui no Brasil, são reconhecidas duas mutações *kdr*, Val1016Ile e Phe1534Cys, que codificam o gene no *Nav* (HARRIS; RAJATILEKA; RANSON, 2010; SAAVEDRA-RODRIGUEZ et al., 2007). Linss et al (2014) avaliaram a distribuição e disseminação dessas mutações em diversas populações brasileiras, incluindo três municípios do Rio de Janeiro, sendo um deles São Gonçalo. Encontraram altas taxas de frequências das mutações e descreveram como se comportam genotipicamente organizados em três alelos: o selvagem (S, que não apresenta mutação), o alelo mutante na posição 1534 ( $Nav^{R1}$ ) e o alelo mutante nas posições 1534 e 1016 ( $Nav^{R2}$ ). Os três alelos são encontrados distribuídos por todo Brasil, sendo que o  $Nav^{R2}$  se apresentou menos frequente em municípios do Nordeste (LINSS et al., 2014).

A frequência dos alelos  $Nav^{R1}$  e  $Nav^{R2}$  estão distribuídas proporcionalmente entre todas as populações de *Ae. aegypti* aqui avaliadas, sendo a frequência alélica maior do duplo mutante  $Nav^{R2}$ , atingindo até 70%, principalmente no período de verão. Esses dados corroboram a avaliação biológica dos ensaios dose-resposta com deltametrina, cujas populações de *Ae. aegypti* foram consideradas altamente resistentes, com valores de  $RR_{50}$  variando de 19,2 a 34,7.

Em amostras de *Ae. aegypti* de São Gonçalo coletadas em 2002 e 2008, Linss et al (2014) perceberam que houve um grande aumento na frequência dos alelos mutantes entre o intervalo de coleta, de 0 para 31% do  $Nav^{R2}$ . Em 2002, apenas o alelo selvagem do tipo  $Nav^S$  foi detectado. Nossas amostras foram coletadas em 2014 e a frequência do  $Nav^{R2}$  aumentou para 65%, no verão.

Uma mudança na composição genética em relação à susceptibilidade e à resistência aos PI durante os anos (de 2012 para 2014) foi vista também na Ilha de Paquetá. Levando em consideração que a Ilha tem uma estrutura organizacional separada em dois bairros, nossos experimentos moleculares foram realizados subdividindo a Ilha em duas populações, nomeadas Paquetá I e II. Brito et al (2018) quantificaram a frequência dos alelos *kdr* da Ilha de Paquetá coletados em 2012, bem como de outros municípios do Grande Rio de Janeiro. O genótipo R2R2 foi o mais frequente (50%) e, considerando os genótipos resistentes, Paquetá foi a população que apresentou menor

frequência (60%) e portanto, a frequência do *Nav<sup>S</sup>* de Paquetá foi a maior diante das demais localidades, com 22,5%.

Dois anos depois, quando coletamos nossas amostras, no verão e inverno do ano de 2014, evidenciamos a redução drástica dos indivíduos susceptíveis nesta localidade. A frequência do *Nav<sup>S</sup>* encontrada foi de 0 e 3%, respectivamente em Paquetá I e II (Tabela 5.7). Esses resultados corroboram com os dados obtidos a partir de ensaios biológicos realizados com deltametrina (PI), dos quais os valores de  $RR_{50}$  da população de Paquetá também foram elevados, em ambas as coletas (19,6 no verão e 22,2 no inverno).

Os PI foram oficialmente utilizados por nebulização de 2001 a 2009 em todo Brasil. Ainda hoje os PIs são utilizados por meio de inseticidas domésticos em *sprays*, sendo sazonalmente intensificados a cada período de epidemia de dengue (GARCIA et al., 2018), uma vez que grande parte das pessoas acreditam que estejam se autoprotegendo contra as doenças causadas por patógenos transmitidos pelos mosquitos. Provavelmente, esses inseticidas aerossóis contribuem significativamente para a rápida disseminação da resistência, porém sua magnitude e real influência no aumento da resistência ainda não foram quantificadas e permanecem desconhecidas (MACIEL-DE-FREITAS; VALLE, 2014). Essa situação foi observada por Macoris et al (2018) (MACORIS et al., 2018), cujas populações de *Ae. aegypti* do Estado de São Paulo permaneceram resistentes ao PI, mesmo São Paulo tendo sido o primeiro no País a interromper o uso do inseticida em 2000. Essa resistência também foi observada por Garcia et al (2018) (GARCIA et al., 2018), que encontraram altos níveis de resistência ao PI, disseminadas nas populações de *Ae. aegypti* avaliadas (Santarém – PA, Parnamirim – RN, Duque de Caxias – RJ e Campo Grande – MS), indicando uma participação significativa do uso doméstico dessa classe de compostos na seleção de indivíduos resistentes ao PI.

As amostras de *Ae. aegypti* aqui estudadas foram coletadas nas proximidades e nos portos de embarcações da região, o que favorecem a introdução de novos espécimes de mosquitos nas populações ao redor dos portos. Essa migração pode ter influenciado a entrada dos alelos resistentes e,

sendo assim, dispersado para o restante da população de mosquitos. A migração é um ponto favorável para a restituição de indivíduos susceptíveis na população, contribuindo com o não-estabelecimento dos alelos resistentes nas populações do mosquito (VALLE, 2015).

Diante disso, a principal alternativa é evitar o uso contínuo de inseticidas, sejam domésticos ou nas campanhas de controle, priorizando sempre o controle mecânico, com a eliminação de potenciais criadouros do mosquito. As alternativas conjuntas de controle integrado, com a participação dos moradores, necessitam ser verdadeiramente aplicadas no cotidiano dos municípios. A participação popular é extremamente importante, levando em consideração que o *Ae. aegypti* é um mosquito doméstico altamente adaptado ao ambiente humano.

#### **6.4 Genética de populações de *Ae. aegypti* com marcadores microssatélites**

Todos os 12 *loci* microssatélites utilizados nas análises genéticas entre as populações de *Ae. aegypti* coletadas nas regiões portuárias do Rio de Janeiro foram polimórficos. Os padrões de diversidade genética encontrados dentro das populações foram moderadamente altos, similares aos encontrados nas populações em que estes *loci* foram caracterizados (BROWN et al., 2011; SLOTMAN et al., 2007). Em ambas as estações níveis moderados de variabilidade foram encontrados; na estação chuvosa (verão) os níveis de Heterozigosidade variaram de 0,392 <math>H\_o</math> 0,509 e na estação seca (inverno) de 0,328 <math>H\_o</math> 0,437. A maior média observada foi no verão ( $H_o= 0,434$ ), o que era esperado considerando que a maior densidade populacional de *Ae. aegypti* foi encontrada neste período (Figura 5.1). No entanto, não há uma diferença significativa entre os valores nas duas estações ( $H_o= 0,383$  no inverno).

Com os mesmos 12 *loci* avaliados neste estudo, Monteiro et al (2014) encontraram uma maior heterozigosidade observada nas amostras obtidas em São Gonçalo ( $H_o= 0,507$  enquanto  $H_o= 0,353$  e 0,396 em nosso estudo), mostrando que as populações podem mudar de perfil genético com o tempo. Em uma avaliação temporal com populações de *Ae. aegypti* coletadas em

quatro bairros de Manaus (AM) foram encontrados valores similares de diversidade genética ( $H_0$ ) entre as coletas do período chuvoso e seco, utilizando nove *loci* de microssatélites (MENDONÇA et al., 2014). O que também foi observado por Rasic et al (2015), avaliando populações do Rio de Janeiro (incluindo Paquetá) em três estações nos anos de 2011, 2012 e 2013. A média dos valores de  $H_0$  encontrados por Rasic et al (2015) com apenas oito *loci* microssatélites foram levemente maiores quando comparados aos nossos ( $H_0 = 0,52$ ). A pouca variação nas estimativas de variabilidade entre as diferentes estações indica que o tamanho populacional de espécimes do mosquito não deva variar significativamente entre as estações. Este dado é corroborado pela pequena diferença entre os números de armadilhas positivas encontradas em ambas as estações neste trabalho.

As análises de estrutura genética, reveladas pelas análises de distância genética ( $F_{ST}$ ) e bayesiana, entre as localidades e nas análises temporais, revelaram homogeneidade genética para as populações de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro. Os valores de  $F_{ST}$  foram baixos em ambas as estações, o que já havia sido observado (RAŠIĆ et al., 2015). Entretanto, diferente do que esperávamos, foi encontrada uma maior estruturação genética entre as amostras coletadas no período do verão ( $F_{ST} = 0,07$ ). Nesta estação do ano, as populações de Paquetá I, Niterói e Praça XV, foram formadas por indivíduos pertencentes a um grupo genético diferente das outras populações (Figura 5.26). a disponibilidade de sítios para a oviposição é inversamente proporcional ao potencial de dispersão das fêmeas de *Ae. aegypti* (EDMAN et al., 1998). Isto porque as fêmeas acabam voando para mais longe à procura de sítios de oviposição apenas quando estes são escassos. Diversos estudos mostram que a estação chuvosa (o verão no nosso caso) seria a estação onde o número de potenciais sítios de oviposição é maior. Realmente, duas semanas após as chuvas as armadilhas instaladas sempre tinham maior positividade. Em nossos resultados, devido ao menor fluxo gênico indicado pelas estimativas de  $F_{ST}$  e bayesianas entre as populações coletadas no verão, acredita-se que as fêmeas migram mais à procura de locais para oviposição durante o inverno.

No Rio de Janeiro, em um estudo utilizando marcadores isoenzimáticos, também encontraram uma maior variabilidade e estruturação genética na

estação chuvosa (COSTA-RIBEIRO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2006). Os autores perceberam que os recipientes de água não intencionais e temporários (ex. pneus e descartáveis) representam a maior parte dos habitats larvais de *Ae. aegypti*, fazendo com que as fêmeas tenham que se dispersar mais para encontrar locais adequados para depositar os ovos durante o inverno, quando este habitats não são tão frequentes. Por ser uma estação seca, com índice de precipitação inferior ao verão, os reservatórios artificiais disponibilizados pela população tornam-se criadouros importantes para o vetor durante o inverno (COSTA-RIBEIRO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2006). Considerando a Ilha de Paquetá, por exemplo, o principal tipo de depósito de oviposição de *Aedes* encontrado é do tipo fixo (C) (Tabela 5.2), sugerindo que esses depósitos permanecem positivos durante todo o ano, corroborando com a manutenção das altas densidades de indivíduos mesmo no inverno.

Resultados diferentes foram encontrados por Huber et al (2002a), que observaram uma estruturação genética mais evidente na estação seca e mais discreta na estação chuvosa, em sete populações de *Ae. aegypti* da cidade de Ho Chi Minh, no Vietnã. Maior diferenciação genética na estação seca também foi observada por Mendonça et al (2014), em quatro bairros da cidade de Manaus (AM), com redução significativa do fluxo gênico em dois bairros da cidade. Por outro lado, em uma análise temporal por cinco anos, verificou-se que as mudanças sazonais climáticas não tiveram impacto significativo nos níveis de diferenciação genética entre as amostras coletadas em Botucatu (SP), com valores de  $F_{ST}$  muito baixos e sem diferentes grupos genéticos na análise bayesiana do programa *Structure* (CAMPOS et al., 2012). Mesmo em nossos resultados, apenas três populações avaliadas mostraram uma pequena diferenciação genética encontrada no verão. As populações de Itaóca (São Gonçalo), Cocotá (Ilha do Governador) e Paquetá II continuam com o mesmo perfil genético, apesar da grande distância geográfica entre elas (e de estarem separadas pela Baía de Guanabara). O contraste entre os resultados encontrados para populações de mosquito de uma mesma espécie nos indica que os padrões de migração desta espécie são complexos. Diversos estudos tem demonstrado a importância da dispersão passiva para o fluxo gênico entre as populações de mosquitos do gênero *Aedes* (FONZI et al., 2015; GUAGLIARDO et al., 2014, 2015; HUBER et al., 2004;

MEDLEY; JENKINS; HOFFMAN, 2015; MONTEIRO et al., 2014). Efeitos da geografia, urbanização e dispersão de pessoas dentro dos centros urbanos parecem ser importantes para a dispersão do mosquito, além da disponibilidade de criadouros.

Rasic et al (2015) apontaram a importância da migração dos mosquitos machos para o fluxo gênico entre as populações de *Ae. aegypti* no Rio de Janeiro. Os autores observaram que há uma maior estruturação quando marcadores mitocondriais são comparados com nucleares indicando que os machos devem migrar mais que as fêmeas naquelas populações. No caso das populações deste estudo, é possível que no verão ocorra um maior fluxo de pessoas entre as estações portuárias, aumentando conseqüentemente a probabilidade de dispersão passiva do mosquito através das barcas. Há um fluxo maior de barcas entre as estações de Niteroi, Praça XV e Paquetá durante todo o ano quando comparado com o roteiro Praça XV e Ilha do Governador. E no verão, estação turística forte para o Rio de Janeiro, o movimento de pessoas tanto para a cidade do Rio de Janeiro, quanto para Paquetá e Niterói deve ser muito maior. Vale lembrar que as barcas chegam em Paquetá I e, em Paquetá II, chegam somente pequenos barcos de pescadores vindos de Itaóca (São Gonçalo).

A alta diversidade genética de *Ae. aegypti* do Rio de Janeiro já é conhecida (KOTSAKIOZI et al., 2017; MONTEIRO et al., 2014). Esse perfil genético é decorrente, principalmente, pelo fato da cidade ser muito turística e possuir grande fluxo de comércio. Como dito anteriormente, se acredita que este vetor se dissemina por longas distâncias através da “carona” humana, seja terrestre, marítima ou aérea (FONZI et al., 2015; GUAGLIARDO et al., 2014, 2015). São muitos os portos marítimos na cidade do Rio de Janeiro, o que pode contribuir para o transporte passivo de ovos de *Ae. aegypti* dentro das embarcações ou mesmo mosquitos adultos. Nossos resultados evidenciam que a migração acontece entre as populações do vetor nas áreas portuárias avaliadas. É possível que o perfil genético das populações de *Ae. aegypti* na cidade do Rio de Janeiro seja mais dinâmico e, possivelmente, os indivíduos recém-chegados no Rio de Janeiro sejam transportados para Niterói e Paquetá

I com mais frequência, tendo em vista a maior rotatividade de barcas entre essas estações.

Diferenças temporais também foram verificadas com a análise da frequência das mutações *kdr* quando comparamos nossos resultados com as frequências dessas mutações no trabalho de Linss et al (2014) (LINSS et al., 2014) e mesmo entre as duas estações de coleta neste trabalho. Podemos ver uma redução da frequência do alelo selvagem (*Nav<sup>S</sup>*) na população de Paquetá em apenas alguns meses, entre as estações avaliadas. No entanto, quando olhamos para a população de São Gonçalo, avaliada também por Linss et al (2014) as frequências dos alelos também foram muito diferentes das encontradas neste trabalho havendo uma queda drástica da frequência do alelo selvagem neste período de tempo (apenas dois anos).

Pela localidade da Ilha de Paquetá e seu difícil acesso, por meio apenas de barcas, anteriormente acreditava-se que o perfil genético de *Ae. aegypti* era diferenciado nesta localidade. Contrastando com nossos resultados, Rasic et al (2015) encontraram um maior isolamento genético entre mosquitos de Paquetá quando comparada com outras localidades do Rio de Janeiro, com base em análises de SNPs. Mas este trabalho comparou apenas as populações de Paquetá com Ilha do Governador e Urca, não avaliando Praça XV nem Niterói. É possível que o perfil genético destas duas últimas localidades não fosse diferente de Paquetá. Este mesmo trabalho avaliou apenas 8 *loci* de microsatélites entre várias localidades do Rio de Janeiro, incluindo agora Praça XV e Niterói e com este marcador encontraram apenas um grupo genético para todas as populações.

Entender a variabilidade genética e os padrões de diferenciação genética de *Ae. aegypti* entre as estações é fundamental para compreender os mecanismos de dispersão mediado pelo transporte humano (COSTA-RIBEIRO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2006; GLORIA-SORIA et al., 2016b) que talvez possam explicar a alta rotatividade de genótipos observada em zonas portuárias. Estes resultados impactam diretamente as campanhas de controle do vetor e fornecem dados importantes para direcionamento das ações e que podem eventualmente levar à novas estratégias de controle.

## **6.5 Atividades de educação em saúde com base no controle de mosquitos vetores - Brasil Sem Miséria (BSM)**

Um dos componentes principais do PNCD, como proposta para o controle da dengue e demais arboviroses transmitidas pelo *Ae. aegypti*, são as ações integradas de educação em saúde, comunicação e mobilização social (BRASIL, 2002). Foi nessa expectativa que nosso projeto de educação em saúde com foco no controle de mosquitos vetores foi baseado e vinculado ao Programa Brasil sem Miséria, direcionando as atividades à grupos especiais, os quais estão diretamente relacionados ao combate de vetores na Ilha de Paquetá. Sabe-se que o comprometimento e participação da comunidade na implementação de intervenções de controle vetorial são fundamentais, uma vez que a população é coautora e responsável pela manutenção das baixas densidades do vetor.

As atividades de palestras e discussões acerca do controle de *Aedes* na Ilha, realizadas em parceria com a coordenação de vigilância em saúde da CAP 1.0 e do centro de saúde Manoel Arthur Villaboim, foram realizadas com êxito. Vigilantes de imóveis, AVSs e ACSs participaram das atividades onde foram apresentadas as estratégias dos “Dez minutos contra a dengue”. Além disso, os agentes foram instruídos para a entrega dos mapas de calor informativos sobre a densidade de ovos de *Aedes* e a disseminação dos conhecimentos e a importância de combater o vetor com o uso de, pelo menos, 10 minutos do seu tempo contra a dengue. Essas ações de mobilização social são fundamentais para a propagação do conhecimento e mudanças no comportamento e hábitos da população, principalmente quando o enfoque é o combate aos criadouros potenciais de larvas de *Aedes*, intimamente relacionados ao homem, como por exemplo o descarte de resíduos humanos e reservatórios de água (TAUIL, 2001).

A educação é a maneira mais eficiente de modificar o comportamento humano em relação à disponibilização de habitats larvares favoráveis ao *Ae. aegypti* (CHIARAVALLLOTI-NETO, 1997; MADEIRA et al., 2002). O enfoque da responsabilidade social e sensibilização sobre a problemática do tema dos vetores, na perspectiva de que cada cidadão é responsável pela qualidade do

meio ambiente em que vive, adaptando ao seu cotidiano o uso de medidas que impeçam ou minimizem a propagação do vetor devem sempre ser priorizadas.

## 7. CONCLUSÕES

- As ovitrampas foram eficientes para o monitoramento populacional de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* na Ilha de Paquetá, as quais revelaram elevados índices entomológicos durante todo período de monitoramento, de maio de 2014 a maio de 2016;

- *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* tem distribuição espacial e sazonal por toda Ilha de Paquetá, com mais frequência de *Ae. albopictus* nas áreas com maior abundância de vegetação;

- O direcionamento do controle baseado no número de ovos obtidos pelas ovitrampas não resultou positivo quando avaliado estatisticamente, através da associação entre as ações de controle efetuadas em campo e os índices de infestação estimados;

- Todas as populações de *Ae. aegypti* testadas em ensaios do tipo dose-resposta revelaram-se susceptíveis ao malathion e resistentes à deltametrina e temephos;

- As populações utilizadas nas análises do canal de sódio regulado por voltagem de *Ae. aegypti* ( $Nav$ ) apresentaram frequências alélicas e gênicas elevadas, com o alelo selvagem ( $Nav^S$ ) quase nulo nas populações. As frequências dos genótipos resistentes foram acima de 90%, com pequena variação nas análises temporais do verão e inverno;

- Os 12 marcadores microssatélites utilizados nas análises moleculares foram polimórficos para todas as populações de *Ae. aegypti* avaliadas, e eficientes na estimativa da diversidade genética e estrutura genética. Apesar de baixos valores de  $F_{ST}$  em todas as populações, as amostras do verão revelaram maior diferenciação genética e fluxo migratório entre as localidades, provavelmente mediado pelo movimento das barcas, entre os cinco portos da Baía de Guanabara;

- As atividades de educação em saúde voltadas para o controle de vetores, com a participação dos AVS e vigilantes de imóveis foi satisfatório, com a sensibilização e engajamento no projeto.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F. et al. Mosquito-Disseminated Pyriproxyfen Yields High Breeding-Site Coverage and Boosts Juvenile Mosquito Mortality at the Neighborhood Scale. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 14, p. 0–3, 2015.

AGUIRRE-OBANDO, O. A.; MARTINS, A. J.; NAVARRO-SILVA, M. A. First report of the Phe1534Cys kdr mutation in natural populations of *Aedes albopictus* from Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 160, p. 1–10, 2017.

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, n. 6, 1974.

AMRAOUI, F.; FAILLOUX, A.-B. Chikungunya: an unexpected emergence in Europe. **curr Opin Virol**, v. 21, p. 146–150, 2016.

ANGELINI, P. et al. Chikungunya epidemic outbreak in Emilia-Romagna (Italy) during summer 2007. **Parassitologia**, v. 50, n. 1–2, p. 97–98, 2008.

ARAÚJO, V. E. M. DE et al. Aumento da carga de dengue no Brasil e unidades federadas, 2000 e 2015: análise do Global Burden of Disease Study 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, n. suppl 1, p. 205–216, 2017.

BAILEY, T.; GATRELL, A. **Interactive Spatial Data Analysis**. 1. ed. Inglaterra: 1955, 1955.

BELCHIOR, E. Estácio de Sá e a Fundação do Rio de Janeiro. **História, São Paulo**, v. 27, n. 1, p. 77–100, 2008.

BELLINATO, D. F. et al. Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

BENEDICT, M. Q. et al. Spread of the Tiger: Global Risk of Invasion by the Mosquito *Aedes albopictus*. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 7, n. 1, p. 76–85, 2007.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.

BIOSYSTEMS, A. **TaqMan SNP Genotyping Assays**USA, 2017.

BLISS, C. THE CALCULATION OF THE DOSAGE- MORTALITY

CURVE. **Annals of Applied Biology**, v. 22, n. 1, 1935.

BONALDO, M. C. et al. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. June, p. 447–451, 2017.

BOYCE, R. et al. *Bacillus thuringiensis israelensis* ( Bti ) for the control of dengue vectors: systematic literature review. **Tropical Medicine and International Health**, v. 18, n. 5, p. 564–577, 2013.

BRAGA, I. A. et al. Comparação entre pesquisa larvária e armadilha de oviposição , para detecção de *Aedes aegypti* Comparative study between larval surveys and ovitraps to monitor populations of *Aedes aegypti*. **Rev da Soc Bra de Medicina Tropical**, v. 33, n. 4, p. 347–353, 2000.

BRAGA, I. A. et al. *Aedes aegypti* Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro , Sergipe ,. v. 99, n. March, p. 199–203, 2004.

BRAGA, I.; VALLE, D. *Aedes aegypti* : histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113–118, 2007a.

BRAGA, I.; VALLE, D. *Aedes aegypti* : inseticidas , mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007b.

BRAKS, M. A. H. et al. Convergent Habitat Segregation of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* ( Diptera : Culicidae ) in Southeastern Brazil and Florida. **Entomological Society of America**, v. 40, n. 6, p. 785–794, 2003.

BRASIL, A. **Vacina dengue: esclarecimentos**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201)>. Acesso em: 12 jul. 2018a.

BRASIL, Ministério da Saúde. Resumo dos principais caracteres morfológicos diferenciais do *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Superintendência de Campanhas de Saúde Pública - SUCAM**, 1989.

BRASIL, Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue. **Vigilância Epidemiológica**, p. 1–34, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, p.

162, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Controle de vetores**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/control-de-vetores>>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 47 de 2014. **Boletim Epidemiológico**, v. 45, p. 1–7, 2014a.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Orientações larvicidas**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/control-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/larvicidas>>. Acesso em: 31 jul. 2018b.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Instruções sobre o uso do inseticida Bendiocarb PM 80 (Carbamato) em aplicações residuais no programa de controle da dengue**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/o-ministro/926-saude-de-a-a-z/control-de-vetores-inseticidas-e-larvicidas/12575-bendiocarb>>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48, 2015. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, p. 1–9, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 38, p. 1–10, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49, 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. Tabela 2, p. 1–13, 2017b.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Febre Amarela**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao>>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 25 de 2018. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, p. 1–14, 2018a.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Vacina de febre amarela será ampliada para todo o Brasil.** Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42849-vacina-de-febre-amarela-sera-ampliada-para-todo-o-brasil>>. Acesso em: 17 jul. 2018b.

BRASIL, Ministério da Saúde. Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela - Brasil 2017/2018. **Informe Epidemiológico - SVS - Ministério da Saúde**, v. 26, n. Figura 1, p. 1–12, 2018c.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Febre amarela: Ministério da Saúde atualiza casos no país.** Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/43042-febre-amarela-ministerio-da-saude-atualiza-casos-no-pais-7>>.

BRAVO, A.; GILL, S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423–435, 2007.

BRENGUES, C. et al. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, p. 87–94, 2003.

BRIEGEL, H.; TIMMERMANN, S. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): physiological aspects of development and reproduction. **J Med Entomol**, v. 38, n. 4, p. 566–571, 2001.

BRITO, L. P. et al. Levels of Resistance to Pyrethroid among Distinct *kdr* Alleles in *Aedes aegypti* Laboratory Lines and Frequency of *kdr* Alleles in 27 Natural Populations from Rio de Janeiro, Brazil. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–10, 2018.

BROWN, J. E. et al. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple ‘ domestications ’ of *Aedes aegypti* , a major vector of human diseases. **Proceedings of the royal society**, v. 278, n. January, p. 2446–2454, 2011.

BROWN, J. E. et al. Phylogeography and spatio-temporal genetic variation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations in the Florida Keys. **J Med Entomol**, v. 50, n. 2, p. 294–299, 2014.

BRYANT, J. E.; HOLMES, E. C.; BARRETT, A. D. T. Out of Africa: A Molecular Perspective on the Introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 5, p. e75, 2007.

BUSVINE, J. The newer insecticides in relation to pests of medical importance. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 3, 1952.

CAMARA, D. et al. Seasonal Differences in Density But Similar Competitive Impact of *Aedes albopictus* (Skuse) on *Aedes aegypti* (L.) in Rio de Janeiro, Brasil. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. 1–15, 2016.

CAMPOS, M. et al. Seasonal population dynamics and the genetic structure of the mosquito vector *Aedes aegypti* in São Paulo, Brazil. **Ecology and evolution**, n. 1, 2012.

CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Guillain-Barré syndrome outbreak caused by ZIKA virus infection in French Polynesia. **Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.

CAP1.0. Coordenadoria Geral de Atenção Primária da AP 1.0. **Prefeitura do Rio de Janeiro**, 2014.

CARBAJO, A. E.; VEZZANI, D. Waiting for chikungunya fever in Argentina: Spatio-temporal risk maps. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 259–262, 2015.

CARVALHO, C. **História da Cidade do Rio de Janeiro**. 2. ed. Rio de Janeiro: 1990, 1990.

CARVALHO, M. et al. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. **Rev Saúde Pública**, v. 38, n. 5, p. 623–629, 2004.

CASTRO, A.; LIMA, R.; NASCIMENTO, J. Chikungunya: vision of the pain clinician. **Revista Dor**, v. 17, n. 4, p. 299–302, 2016.

CAVALCANTE, K. R. L. J. et al. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, n. 3, p. 617–620, 2017.

CCR. **Barcas Praça XV**. Disponível em: <<http://www.grupoccr.com.br/barcas>>. Acesso em: 19 jul. 2018a.

CCR. **Barcas Cocotá**. Disponível em: <<http://www.grupoccr.com.br/barcas/estacoes/cocota?id=4>>. Acesso em: 19 jul. 2018b.

CCR. **Barcas Praça de Araribóia**. Disponível em:

<<http://www.grupoccr.com.br/barcas/estacoes/praca-arariboia?id=8>>. Acesso em: 20 jul. 2018c.

CHAMBERLAIN, W. Review Article: Insect Growth Regulating Agents for Control of Arthropods of Medical and Veterinary Importance. **Journal of Medical Entomology**, v. 12, n. 4, 1975.

CHAMBERS, E. et al. Microsatellite Isolation and Linkage Group Identification in the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*. **Journal of Heredity**, v. 98, n. 3, p. 202–210, 2007.

CHAPMAN, R. **The insects. Structure and Function**. 4. ed. New York: Cambridge University, 2013.

CHAPUIS, M.; ESTOUP, A. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. **Mol Biol Evol**, v. 24, n. 3, p. 621–631, 2007.

CHELSEA, T. et al. Evidence of Zika Virus RNA Fragments in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Field-Collected Eggs From Camaçari, Bahia, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 4, p. 1085–1087, 2017.

CHIARAVALLOTI-NETO, F. Conhecimentos da população sobre dengue, seus vetores e medidas de controle em São José do Rio Preto, São Paulo. **Cad. Saúde Pública**, v. 13, n. 3, p. 447–453, 1997.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 1–11, 2016.

CHRISTOPHERS, S. R. **Aedes aegypti (L.) The yellow fever mosquito**. New York: [s.n.].

CODEÇO, C. T. et al. Seasonal dynamics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the northernmost state of Brazil: a likely port-of-entry for dengue virus 4. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. July, p. 614–620, 2009.

CODEÇO, C. T. et al. Surveillance of *Aedes aegypti*: Comparison of House Index with Four Alternative Traps. **PLoS neglected tropical diseases**, p. 1–23, 2015.

COLLINS, L. E.; BLACKWELL, A. The biology of Toxorhynchites mosquitoes and their potential as biocontrol agents. **News and Information**, v. 21, n. 4, p. 105–116, 2014.

CONN, J. A. N. E. et al. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-endemic region of eastern Amazonian Brazil. **Am J Trop Hyg**, v. 74, n. 5, p. 798–806, 2006.

CONSOLI E LOURENÇO-DE-OLIVEIRA. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: 1994, 1994.

CORRÊA, A. P. S. DE A. **Avaliação da eficiência do levedo de cerveja como atrativo para *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) em armadilhas do tipo ovitrampas no município de Macapá, Amapá**. [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2013.

COSTA-RIBEIRO, M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A.-B. Low Gene Flow of *Aedes aegypti* between Dengue-Endemic and Dengue-Free Areas in Southeastern and Southern Brazil. **Am J Trop Hyg**, v. 77, n. 2, p. 303–309, 2007.

COSTA-RIBEIRO, M. C. V; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. B. Geographic and temporal genetic patterns of *Aedes aegypti* populations in Rio de Janeiro , Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, n. 8, p. 1276–1285, 2006.

COSTA, E. et al. Impact of small variations in temperature and humidity on the reproductive activity and survival of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **rev brasileira de entomologia**, v. 53, n. 3, p. 488–493, 2010.

COSTA, F. S. et al. Population dynamics of *Aedes aegypti* (L) in an urban area with high incidence of dengue. **Rev Soc Bras de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 309–312, 2008.

COUTO-LIMA, DI. et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

CUNHA-MACHADO, A.; SCARPASSA, V. M. New microsatellite markers for the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* sensu lato. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 8856–8861, 2014.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (Dicloro difenil tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental - Uma revisão. **Quimica Nova**, v. 25, n. 6 A, p. 995–1002, 2002.

DA-CUNHA, M. et al. Monitoring of resistance to the pyrethroid

cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 441–444, 2005.

DAVIES, T. G. E. et al. DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels. **Life**, v. 59, n. March, p. 151–162, 2007.

DE ARAÚJO, T. V. B. et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. 1356–1363, 2016.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue. **Rev Bras Epidemiol**, v. 5, n. 3, p. 259–272, 2002.

DONG, K. Insect sodium channels and insecticide resistance. **Invert Neurosci**, v. 7, n. 1, p. 17–30, 2007.

DUBRULLE, M. et al. Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: Saliva is infectious as soon as two days after oral infection. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, 2009.

DUTRA, H. et al. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 6, p. 771–774, 2016a.

DUTRA, H. et al. The influence of larval competition on Brazilian Wolbachia-infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 282, p. 1–15, 2016b.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, 2012.

EDMAN, J. D. et al. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites. **J Med Entomol**, v. 35, n. 4, p. 578–583, 1998.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis.

**Evolutionary Bioinformatics**, v. 1, p. 47–50, 2005.

FARIA, R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, v. 55, n. 33, p. 9557–9561, 2017.

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014.

FERRÃO, F. et al. Comparative study of different molecular markers for classifying and establishing genetic relationships in *Coffea canephora*. Comparative study of different molecular markers for classifying and establishing genetic relationships in *Coffea canephora*. **Plant Syst Evol**, v. 299, p. 225–238, 2012.

FFRENCH-CONSTANT, R.; DABORN, P. J.; GOFF, G. L. The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends in genetics**, 2004.

FINNEY, D. J. Probit Analysis. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 41, n. 11, 1952.

FONZI, E. et al. Human-Mediated Marine Dispersal Influences the Population Structure of *Aedes aegypti* in the Philippine Archipelago. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 6, jun. 2015.

FORATTINI, O. P. Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 20, n. 3, p. 244–245, 1986.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia**. São Paulo: 2002, 2002.

FORRESTER, N. L.; GOFFEY, L. L.; WEAVER, S. C. Arboviral Bottlenecks and Challenges to Maintaining Diversity and Fitness during Mosquito Transmission. **Viruses**, v. 6, p. 3991–4004, 2014.

FOX, J. **An R and S-Plus Companion to Applied Regression**. United States of America: 2002, 2002.

GARCIA, G. D. A. et al. Using Wolbachia Releases to Estimate *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Population Size and Survival. **PLoS ONE**, p. 1–12, 2016.

GARCIA, G. D. A. et al. The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. p. 1–20, 2018.

GEMAYEL, R. et al. Beyond Junk-Variable Tandem Repeats as Facilitators of Rapid Evolution of Regulatory and Coding Sequences. **Genes**, v. 3, p. 461–480, 2012.

GLORIA-SORIA, A. et al. Global Genetic Diversity of *Aedes aegypti* Andrea. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 21, p. 5377–5395, 2016a.

GLORIA-SORIA, A. et al. Temporal genetic stability of *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) populations. **Med Vet Entomol**, v. 30, n. 2, p. 235–240, 2016b.

GOINDIN, D. et al. 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**, p. 1–15, 2017.

GOMES, A. et al. Anthropophilic activity of *Aedes aegypti* and of *Aedes albopictus* in area under control and surveillance. **Rev Saúde Pública**, v. 39, n. 2, 2005.

GOMES, A. D. C. Vigilância da dengue: um enfoque vetorial. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 209–212, 2002.

GOMES, A. DE C. et al. *Aedes albopictus* em área rural do Brasil e implicações na transmissão de febre amarela silvestre. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n. 1, p. 95–97, 1999.

GOMES, C. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* e *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* em Programa de Vigilância Entomológica. **IESUS**, v. 5, n. 3, 1998.

GOVERNO DO RIO DE JANEIRO. **Boletim epidemiológico da febre amarela**. Disponível em: <<https://www.saude.rj.gov.br/noticias/2018/08/informe-epidemiologico-febre-amarela-2408>>. Acesso em: 31 jul. 2018a.

GOVERNO DO RIO DE JANEIRO. **Boletim epidemiológico da febre amarela**. Disponível em: <<https://www.saude.rj.gov.br/noticias/2017/12/informe-epidemiologico-febre-amarela-2408>>.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. p. 215–227, 2004.

GUAGLIARDO, S. et al. Patterns of Geographic Expansion of *Aedes aegypti* in the Peruvian Amazon. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8,

2014.

GUAGLIARDO, S. A. et al. Evidence for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Oviposition on Boats in the Peruvian Amazon. **J Med Entomol**, v. 52, n. 4, p. 726–729, 2015.

GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. v. 11, n. 3, p. 480–496, 1998.

GUIMARÃES-MARQUES, G. et al. Isolation and characterization of 25 microsatellite DNA loci for *Anopheles albitarsis* sensu lato and inter-specific amplification in 5 congeneric species. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 4198–4203, 2012.

GUIMARÃES, R.; ASMUS, C.; MEYER, A. DDT reintroduction for malaria control: the cost-benefit debate for public health. **Cad Saude Pública**, v. 23, n. 12, p. 2835–2844, 2007.

HADDOW, A. D. et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 2, 2012.

HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): A review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, v. 638, n. 1668, p. 591–638, 2007.

HARRIS, A. F.; RAJATILEKA, S.; RANSON, H. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. v. 83, n. 2, p. 277–284, 2010.

HARTL, D. **A primer of population genetics**. 3. ed. Sunderland, Massachusetts, USA: 1981, 1981.

HARTL, D.; CLARK, A. **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HAWLEY, W. A. The biology of *Aedes albopictus*. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 1, p. 1–39, 1988.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. INSECTICIDE RESISTANCE IN INSECT VECTORS OF HUMAN DISEASE. **Annu Rev Entomol**, p. 371–391, 2000.

HERVÉ, J. et al. Ecologia da Febre Amarela silvestre no Brasil. **Rev da Fundação SESP**, v. 2, p. 131–135, 1986.

HICKNER, P. V et al. Genome-Based Microsatellite Development in the *Culex pipiens* Complex and Comparative Microsatellite Frequency with *Aedes*

aegypti and Anopheles gambiae. **PloS one**, v. 5, n. 9, 2010.

HILGENBOECKER, K. et al. How many species are infected with Wolbachia? - a statistical analysis of current data. **Research Letter**, v. 281, p. 215–220, 2008.

HO, C. et al. Surveillance for Dengue Fever Vectors Using Ovitrap at Kaohsiung and Tainan in Taiwan. **Formosan Entomol**, v. 25, p. 159–174, 2005.

HOFFMANN, A. et al. Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. **Nature**, v. 24, n. 476, p. 454–457, 2011.

HONÓRIO, N. et al. The spatial distribution of Aedes aegypti and Aedes albopictus in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 6, p. 1203–1214, 2009a.

HONÓRIO, N. et al. Temporal Distribution of Aedes aegypti in Different Districts of Rio De Janeiro , Brazil , Measured by Two Types of Traps. **J Med Entomol**, v. 46, n. 5, p. 1001–1014, 2009b.

HONÓRIO, N. A. et al. Dispersal of Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) in an Urban Endemic Dengue Area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. March, p. 191–198, 2003.

HORTA, M. et al. Resistance of Aedes aegypti (L.) (Diptera: Culicidae) to Temephos in Brazil: A Revision and New Data for Minas Gerais State. **BioAssay**, v. 6, n. 7, p. 1–6, 2011.

HUBER, K. et al. Isolation and variability of polymorphic microsatellite loci in Aedes aegypti , the vector of dengue viruses. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 219–222, 2001.

HUBER, K. et al. Temporal genetic variation in Aedes aegypti populations in Ho Chi Minh City (Vietnam). **Heredity**, v. 89, p. 7–14, 2002.

HUBER, K. et al. Human transportation influences Aedes aegypti gene flow in Southeast Asia. **Acta Tropica**, v. 90, p. 23–29, 2004.

HURK, A. F. VAN DEN et al. Impact of Wolbachia on Infection with Chikungunya and Yellow Fever Viruses in the Mosquito Vector Aedes aegypti. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, 2012.

IBGE. Censo Demográfico 2010. 2011.

INMET. **BDMEP - Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v. 23, n. 14, p. 1801–1806, 2007.

KALINOWSKI, S. T. Hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 187–189, 2005.

KEVORKIAN, J. L. **Ilha de Paquetá**. Disponível em: <<http://www.ilhadepaqueta.com.br/paqueta.htm>>.

KOTSAKIOZI, P. et al. Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil , the major vector of the dengue , chikungunya and Zika viruses. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2017.

KRAEMER, L.; EBEL, G. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. **Adv Virus Res**, v. 60, p. 187–232, 2003.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae . albopictus* occurrence. **Nature**, p. 1–8, 2015.

KUNO, G. Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. **J Med Entomol**, v. 47, n. 6, 2010.

LACEY, L. A. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. **The American Mosquito Control Association**, v. 23, n. 7, 2007.

LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 5, 2010.

LANA, R. M. et al. Seasonal and nonseasonal dynamics of *Aedes aegypti* in Rio de Janeiro , Brazil : Fitting mathematical models to trap data. **Acta Tropica**, v. 129, p. 25–32, 2014.

LEISNHAM, P. et al. Interpopulation divergence in competitive

interactions of the mosquito *Aedes albopictus*. **Ecology**, v. 90, n. 9, p. 2405–2413, 2009.

LEPARC-GOFFART, I. et al. Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, 2014.

LEROY, E. M. et al. Concurrent Chikungunya and Dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 4, p. 591–593, 2009.

LI, Y. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 12, p. 2453–2465, 2002.

LIEN, NTK. et al. Two novel mutations in the voltage-gated sodium channel associated with knockdown resistance (kdr) in the dengue vector *Aedes aegypti* in Vietnam. **Journal of Vector Ecology**, n. June, p. 184–189, 2018.

LIMA-CAMARA, T. N. DE. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. **Cad Saude Pública**, v. 22, n. 10, p. 2079–2084, 2006.

LIMA, J. et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **Am J Trop Hyg**, v. 68, n. 3, p. 329–333, 2003.

LIMA, J.; MELO, N. V. DE; VALLE, D. Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in laboratory and outdoors at Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, v. 47, n. 3, p. 125–130, 2005.

LIMA, L. F. **Análise do comportamento de oviposição do mosquito *Aedes aegypti* em Paquetá / RJ**. [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2017.

LIMA, W. D. O.; GO, L. P. DE. Survival of *Betta splendens* fish (Regan, 1910) in domestic water containers and its effectiveness in controlling *Aedes aegypti* larvae (Linnaeus, 1762) in Northeast Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 12, p. 1525–1532, 2010.

LINSS, J. G. B. et al. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations.

**Parasites & Vectors**, p. 1–11, 2014.

LIU, Z. et al. Competence of *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes as Zika virus vectors, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 7, p. 1085–1091, 2017.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. The invasion of urban forest by dengue vectors in Rio de Janeiro. **Journal of Vector Ecology**, v. 29, n. 1, p. 94–100, 2004.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Rio de Janeiro against *Aedes aegypti*: yellow fever in 1908 and dengue in 2008 - Editorial. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 627–628, 2008.

LUZ, L. B.; ABAD-FRANCH, F.; ZAMORA-PEREA, E. Mosquito-Disseminated Insecticide for Citywide Vector Control and Its Potential to Block Arbovirus Epidemics: Entomological Observations and Modeling Results from Amazonian Brazil. **PLoS Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–22, 2017.

MACIEL-DE-FREITAS, R. et al. Movement of dengue vectors between the human modified environment and an urban forest in Rio de Janeiro. **Journal of medical entomology**, v. 43, n. 6, p. 1112–1120, 2006.

MACIEL-DE-FREITAS, R.; VALLE, D. Challenges encountered using standard vector control measures for dengue in Boa Vista, Brazil. **Bull World Health Organ**, v. 92, n. 9, p. 685–689, 2014.

MACORIS, M. et al. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 3, p. 1–18, 2018.

MACORIS, M. D. L. G. et al. Efeito residual de temephós em larvas de *Aedes aegypti*. **Rev Soc Bras de Medicina Tropical**, v. 28, n. 4, p. 375–377, 1995.

MACORIS, M. D. L. G. et al. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of to Organophosphates Insecticides. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. July, p. 703–708, 2003.

MACORIS, M. DE L. DA G. **Avaliação do nível de suscetibilidade de linhagens de Aedes aegypti (Díptera: Culicidae) aos inseticidas utilizados para seu controle.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista, UNESP, São Paulo, 2002.

MADEIRA, N. G. et al. Education in primary school as a strategy to control dengue. **Rev da Soc Bra de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 221–226, 2002.

MARCOMBE, S. et al. Reduced Efficacy of Pyrethroid Space Sprays for Dengue Control in an Area of Martinique with Pyrethroid Resistance. **Am J Trop Hyg**, v. 80, n. 5, p. 745–751, 2009.

MARTEN, G.; REID, J. Cyclopoid Copepods. **The American Mosquito Control Association**, v. 23, 2007.

MARTINES, R. B. et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. **The Lancet**, v. 388, n. 10047, p. 898–904, 2016.

MARTINS, A. et al. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Aedes aegypti Brazilian populations. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 11, p. 1351–1355, 2009a.

MARTINS, A. et al. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant Aedes aegypti from Brazil. **Am J Trop Hyg**, v. 81, n. 1, 2009b.

MARTINS, A. J.; VALLE, D. The Pyrethroid Knockdown Resistance. In: **Insecticides - Basic and Other Applications**. Shanghai, China: 2012, 2012.

MASSAD, E. et al. Yellow fever vaccination: how much is enough? **Vaccine**, v. 23, n. 30, p. 3908–3914, 2005.

MCBRIDE, C. S. et al. Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. 222–227, 2014.

MCELROY, K. et al. Characterization of the antigen distribution and tissue tropisms of three phenotypically distinct yellow fever virus variants in orally infected Aedes aegypti mosquitoes. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 8, n. 5, p. 675–87, 2008.

MEDLEY, K.; JENKINS, D.; HOFFMAN, E. Human-aided and natural dispersal drive gene flow across the range of an invasive mosquito. **Molecular Ecology**, v. 24, p. 284–295, 2015.

MENDONÇA, B. A. A. et al. Temporal genetic structure of major dengue vector *Aedes aegypti* from Manaus, Amazonas, Brazil. **Acta Tropica**, v. 134, p. 80–88, 2014.

MERTZ, F. P.; YAO, R. C. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. Isolated from Soil Collected in a Sugar Mill Rum Still. **Internation Journal of Systematic Bacteriology**, n. 2, p. 34–39, 2018.

MICHALAKIS, Y.; EXCOFFIED, L. A Generic Estimation of Population Subdivision Using Distances Between Alleles With Special Reference for Microsatellite Loci. **Genetics Society of America**, v. 142, 1996.

MONTEIRO, F. A. et al. Genetic diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: patterns following an eradication program. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 9, p. e3167, set. 2014.

MONTELLA, I. R. et al. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. **Am J Trop Hyg**, v. 77, n. 3, p. 467–477, 2007.

MONTELLA, I. R.; SCHAMA, R.; VALLE, D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. June, p. 437–449, 2012.

MOORE, C. et al. Congenital Zika Syndrome: Characterizing the Pattern of Anomalies for Pediatric Healthcare Providers. **JAMA Pediatr**, v. 171, n. 3, p. 29–39, 2017.

MOREIRA, L. et al. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell Research**, v. 139, p. 1268–1278, 2009.

MORRISON, T. E. Reemergence of Chikungunya Virus. **Journal of Virology**, v. 88, n. 20, p. 11644–11647, 2014.

MOYES, C. L. et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. **PLoS neglected tropical diseases**, p. 1–20, 2017.

MUSO, D.; GUBLER, D. Zika virus. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 6, p. 1090, 2014.

MUSSO, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil.

**Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1887–1889, 2015.

MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (denv-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67–70, 2015.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 205–207, 2002.

NELSON, M. J. **Aedes Aegypti: Biología y ecología**. Washington: 1986, 1986.

NITERÓI, P. DE. **Prefeitura do Município de Niterói**. Disponível em: <<http://www.niteroi.rj.gov.br/>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

NOGUEIRA, M. B. et al. Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 483–488, 2008.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990–1: Co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. **Epidemiology and Infection**, v. 111, n. 1, p. 163–170, 1993.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue Virus Type 3 in Rio de Janeiro , Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. October, p. 925–926, 2001.

OBEREMOK, V. V. et al. A short history of insecticides. **Journal of Plant Protection Research**, v. 55, n. 3, 2015.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin , evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294–307, 2006.

OLIVEIRA FILHO, A. Differences of Susceptibility of Five Triatomine Species to Pyrethroid Insecticides -- Implications for Chagas Disease Vector Control. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. August, p. 425–428, 1999.

OOSTERHOUT, C. et al. MICRO - CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535–538, 2004.

PADUAN, S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. P.; RIBOLLA, P. E. M. Genetic

variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 395, p. 391–395, 2006.

PANCETTI, F. G. M. et al. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 87–89, 2015.

PANG, T. et al. **Dengue vaccination: a more ethical approach is needed****The Lancet**. Singapore: 2018, 2018. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30245-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30245-9)>.

PASTORINO, B. et al. Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain. **J Med Virol**, v. 74, n. 2, p. 277–282, 2004.

PAUPY, C. et al. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p. 1177–1185, 2009.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAEx 6 . 5 : genetic analysis in Excel . Population genetic software for teaching and research — an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.

PÉREZ, C. et al. Spinosad, a Naturally Derived Insecticide, for Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Efficacy, Persistence, and Elicited Oviposition Response. **J Med Entomol**, v. 44, n. August 2007, 2007.

PESSANHA, J. et al. Ovitrap surveillance as dengue epidemic predictor in Belo Horizonte City , Brazil Original Article. **J Health Biol Sci**, v. 2, n. 2, p. 51–56, 2014.

PEYREFITTE, C. N. et al. Chikungunya Virus, Cameroon, 2006. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 5, p. 13–16, 2007.

PIALOUX, G. et al. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 319–327, 2017.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, 2017.

PORRETA, D. et al. Isolation of microsatellite markers in the tiger

mosquito *Aedes albopictus* (Skuse). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 3, 2006.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. October, p. 11–17, 2013.

POWERS, A. M. et al. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 2, p. 471–479, 2000.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2363–2377, 2007.

PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO. **Porto Maravilha**. Disponível em: <<http://portomaravilha.com.br/noticiasdetalhe/3826>>. Acesso em: 31 jul. 2018.

PREFEITURA DO RIO DE JANEIRO. **Ilha de Paquetá**. Disponível em: <<http://www.rio.rj.gov.br/web/riotur/exibeconteudo?id=157598>>. Acesso em: 12 jul. 2018.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics Society of America**, v. 155, p. 945–959, 2000.

PUGGIOLI, A. et al. Development of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Larvae Under Different Laboratory Conditions. **Journal of medical entomology**, v. 54, n. 1, p. 142–149, 2017.

RAJATILEKA, S. et al. Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. **Acta Tropica**, v. 108, n. 1, 2008.

RAŠIĆ, G. et al. Contrasting genetic structure between mitochondrial and nuclear markers in the dengue fever mosquito from Rio de Janeiro: implications for vector control. **Evolutionary Applications**, v. 8, n. 9, p. 901–915, 7 set. 2015.

RAVEL, S. et al. Microsatellite markers for population genetic studies in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Côte d'Ivoire: evidence for a microgeographic genetic differentiation of mosquitoes from Bouaké. **Acta**

**Tropica**, v. 82, n. 1, 2002.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetic software for exact tests and ecumenicism. **Heredity**, n. June 2015, p. 1–3, 1995.

REGIS, L. et al. Developing new approaches for detecting and preventing *Aedes aegypti* population outbreaks : basis for surveillance , alert and control system. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 50–59, 2008.

REGIS, L. et al. An entomological surveillance system based on open spatial information for participative dengue control. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 4, p. 655–662, 2009.

REGIS, L. N. et al. Acta Tropica Characterization of the spatial and temporal dynamics of the dengue vector population established in urban areas of Fernando de Noronha , a Brazilian oceanic island. **Acta Tropica**, v. 137, p. 80–87, 2014.

REITER, P. et al. Short report: Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 2, p. 177–179, 1995.

REITER, P. Oviposition, Dispersal, and Survival in *Aedes aegypti*: Implications for the Efficacy of Control Strategies. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 7, n. 2, 2007.

REITER, P.; SPRENGER, D. The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 3, n. 3, p. 494–501, 1987.

RENAULT, P.; SOLET, J.-L.; SISSOKO, D. A Major Epidemic of Chikungunya Virus Infection on Réunion Island, France, 2005–2006. **Am J Trop Hyg**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2007.

REY, J. R.; LOUNIBOS, P. Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y transmisión enfermedades. **Biomedica**, v. 35, p. 177–185, 2015.

RIBEIRO, B. N. DE F. et al. Congenital Zika syndrome and neuroimaging findings: what do we know so far? **Radiologia Brasileira**, v. 50, n. 5, p. 314–322, 2017.

RICE, W. Analyzing Tables of Statistical Testes. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223–225, 1989.

RIGOTTO, R. M.; ROCHA, M. M.; ROCHA, M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 3, 2014.

RIO COMO VAMOS. **Ilha de Paquetá**. Disponível em: <<http://riocomovamos.org.br/indicadores-regionalizados/regiao/ilha-de-paqueta/>>. Acesso em: 19 jul. 2018a.

RIO COMO VAMOS. **Ilha do Governador**. Disponível em: <<http://riocomovamos.org.br/indicadores-regionalizados/regiao/ilha-governador/>>. Acesso em: 19 jul. 2018b.

RIO DE JANEIRO, P. **Alerta Rio**. Disponível em: <<http://alertario.rio.rj.gov.br>>. Acesso em: 10 maio. 2018.

ROBERTS, D.; TREN, R. **DDT in Malaria Control: Roberts and Tren Respond**. Washington: 2010.

ROBINSON, M. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 28–32, 1955.

ROHANI, A. et al. The effect of extrinsic incubation temperature on development of dengue serotype 2 and 4 viruses in *Aedes aegypti* (L.). **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 40, n. 5, p. 942–950, 2009.

ROMANO, A. P. M. et al. Febre amarela no Brasil: recomendações para a vigilância, prevenção e controle. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 101–106, 2011.

ROSE, O.; FALUSH, D. Letter to the Editor A Threshold Size for Microsatellite Expansion. **Mol Biol Evol**, v. 15, n. 5, p. 613–615, 1998.

ROSENBERG, N. A. distruct: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology**, v. 4, n. 1, p. 137–138, 2003.

ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, 2008.

ROZENDAAL, J. A. **Vector control - Methods for use by individuals**

**and communities.** 1. ed. Geneva: 1997, 1997.

RUEDA, L. M. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 477–487, 2008.

RYCKEBUSCH, F. et al. Infection of a french population of aedes albopictus and of Aedes aegypti (Paea strain) with zika virus reveals low transmission rates to these vectors' saliva. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.

SAAVEDRA-RODRIGUEZ, K. et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American Aedes aegypti. **Insect Mol Biol**, v. 16, n. 6, 2007.

SÃO GONÇALO, P. **Prefeitura do Município de São Gonçalo**. Disponível em: <<http://www.saogoncalo.rj.gov.br/>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

SARWAR, M. Control of Dengue Carrier Aedes Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Larvae by Larvivorous Fishes and Putting It into Practice Within Water Bodies. **International Journal of Preventive Medicine Research**, v. 1, n. 4, p. 232–237, 2015.

SAVAGE, H. et al. Host-feeding patterns of Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) at a temperate North American site. **J Med Entomol**, v. 30, n. 1, p. 27–34, 1993.

SAZAMA, E. J. et al. Incidence of Wolbachia in aquatic insects. **ecology and evolution**, v. 7, p. 1165–1169, 2017.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; ROSA, A. P. A. T. DA. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 245–246, 1986.

SCHILTE, C. Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 13, 2013.

SCHLOTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma Focus**, v. 109, p. 365–366, 2000.

SCHNEPF, E. et al. Bacillus thuringiensis and Its Pesticidal Crystal Proteins. v. 62, n. 3, p. 775–806, 1998.

SCHOLTE, E. et al. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. **Journal of Insect Science**, 2004.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature**, v. 18, n. February, p. 1–2, 2000.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. 1058–1070, 2006.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59–62, 2016.

SERVICE, M. **Medical entomology for students**. 2. ed. Cambridge: 2012, 2008.

SHONO, T. Pyrethroid Resistance: Importance of the kdr-Type Mechanism\*. **J Pesticide Sci**, v. 146, p. 141–146, 1985.

SHROYER, D. A. Vertical maintenance of dengue-1 virus in sequential generations of *Aedes albopictus*. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 6, n. 2, p. 312–314, 1990.

SHUAIB, W. et al. Re-Emergence of Zika Virus: A Review on Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **American Journal of Medicine**, v. 129, n. 8, p. 879.e7-879.e12, 2016.

SINKINS, S. Wolbachia and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. **Insect Biochem Mol Biolol**, v. 34, n. 7, p. 723–729, 2004.

SLOTMAN, M. et al. Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 1, 2007.

SODERLUND, D.; KNIPPLE, D. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. **Insect Biochem Mol Biolol**, v. 33, n. 6, 2003.

SPARKS, T. et al. The role of behavior in insecticide resistance. **Pesticide Science**, 1989.

SRISAWAT, R. S. et al. Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Appl Entomol Zool**, v. 45, n. 2, p. 275–282, 2010.

STRODE, C. et al. Expression Profile of Genes during Resistance Reversal in a Temephos Selected Strain of the Dengue Vector , *Aedes aegypti*.

**PloS one**, v. 7, n. 8, p. 1–8, 2012.

TAUIL, P. L. Urbanization and dengue ecology. **Cad Saude Pública**, v. 17, p. 99–102, 2001.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cad Saude Pública**, v. 18, n. 3, p. 867–871, 2002.

TEIXEIRA, M. G. et al. East/central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 906–908, 2015.

TEMPORÃO, J. G. et al. Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 1, p. 152–159, 2011.

THOMAS V. GAFFIGAN ET AL. **Systematic Catalog of Culicidae**. Disponível em: <<http://www.mosquitocatalog.org/>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

TMA, S. et al. Primeiro Relatório do Genótipo do Vírus Chikungunya do Centro-Leste Sul-Africano no Rio de Janeiro , Brasil. **Plos currents outbreaks**, 2018.

TORRES-ESTRADA, J. L.; C, D.; RODILES-CRUZ, N. C. Diseño y evaluación de una ovitrampa para el monitoreo y control de *Aedes aegypti* , principal vector del dengue. **Salud Publica**, v. 55, n. 5, p. 505–511, 2013.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. 1895–1906, 2007.

TSETSARKIN, K. A. et al. Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 19, p. 7872–7877, 2011.

TSUKAMOTO, M. The Log Dosage-Probit Mortality Curve in Genetic Researches of Insect Resistance to Insecticides. **Botyu-Kagaku**, v. 28, n. 91, 1963.

URDANETA-MARQUEZ, L.; FAILLOUX, A. Infection, Genetics and Evolution Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 2, p. 253–261, 2011.

VALLE, D. **Dengue: Teorias e Práticas**. 1. ed. Rio de Janeiro: 2015, 2015.

VAN DEN BERG, H. et al. Global Trends in the Use of Insecticides to Control Vector-Borne Diseases. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 4, p. 577–582, 2012.

VASCONCELOS, P. F. D. C. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 244–258, 2002.

VASCONCELOS, P. F. DA C. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 6, p. 1144–1149, 2010.

VIEIRA, M. et al. Microsatellite markers : what they mean and why they are so useful. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 3, p. 312–328, 2016.

WANG, Z.; WANG, P.; AN, J. Zika virus and Zika fever. **Virologica Sinica**, v. 31, n. 2, p. 103–109, 2016.

WARE, G. W.; WHITACRE, D. M. **An Introduction to Insecticides**. Disponível em: <<https://ipmworld.umn.edu/ware-intro-insecticides>>. Acesso em: 1 jun. 2018.

WEAVER, S. C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. 6–9, 2014.

WERREN, J. H.; BALDO, L.; CLARK, M. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 10, p. 741–751, 2008.

WIKIPEDIA. **Itaóca**. Disponível em: <[https://pt.wikipedia.org/wiki/Itaoca\\_\(São\\_Gonçalo\)](https://pt.wikipedia.org/wiki/Itaoca_(São_Gonçalo))>. Acesso em: 20 jul. 2018.

WILKERSON, R. C.; ET AL. Elevation of Pseudoskusea , Rusticoidus and Protomacleaya to valid subgenera in the mosquito genus Aedes based on taxon naming criteria recently applied to other members of the Tribe Aedini (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 668, 2015.

WONG, J. et al. Oviposition Site Selection by the Dengue Vector Aedes aegypti and Its Implications for Dengue Control. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 4, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. **World**, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. **World Health Organization**, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**, p. x, 147, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Monitoring and managing insecticide resistance in Aedes mosquito populations - Interim guidance for entomologists. **World Health Organization**, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>.

WORLD MOSQUITO PROGRAM. **Eliminate dengue: our challenge**. Disponível em: <<http://www.eliminatedengue.com/>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann Eugen**, v. 15, n. 4, p. 323–354, 1951.

XAVIER, D. R. et al. Difusão espaço-tempo do dengue no Município do Rio de Janeiro, Brasil, no período de 2000-2013. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 2, p. 1–13, 2017.

YAKOB, L.; WALKER, T. Zika virus outbreak in the Americas: The need for novel mosquito control methods. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 3, p. e148–e149, 2016.

YEAP, H. L. et al. Assessing quality of life-shortening Wolbachia-infected Aedes aegypti mosquitoes in the field based on capture rates and morphometric assessments. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 58, p. 1–13, 2014.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZARA, A. et al. Estratégias de controle do Aedes aegypti : uma revisão. **Epidemio**, v. 25, n. 2, p. 391–404, 2016.

ZHU, Y.; STRASSMANN, J.; QUELLER, D. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. **Genet Res Cam**, v. 76, p. 227–236, 2000.

ZUBRIN, R. A verdade sobre o DDT. **The New Atlantis**, p. 1–12, 2012.