

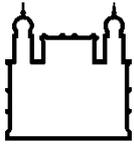
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Avaliação da resistência a inseticidas e mecanismos
selecionados em populações de *Aedes aegypti*
Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae) da fronteira entre
Brasil e Guiana Francesa**

MONIQUE DE MELO COSTA

Rio de Janeiro
Abril de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Monique de Melo Costa

Avaliação da resistência a inseticidas e mecanismos selecionados em populações de *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae) da fronteira entre Brasil e Guiana Francesa

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Biologia Parasitária.

Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Junior

Rio de Janeiro

Abril de 2017

Costa, Monique de Melo.

Avaliação da resistência a inseticidas e mecanismos selecionados em populações de *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae) da fronteira entre Brasil e Guiana Francesa / Monique de Melo Costa. - Rio de Janeiro, 2017.

123 f.; il.

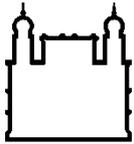
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientador: Ademir de Jesus Martins Junior.

Bibliografia: f. 81-106

1. vetor de arbovírus. 2. controle de vetor. 3. mutações kdr. 4. expressão e duplicação gênica. 5. Amapá. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Monique de Melo Costa

Avaliação da resistência a inseticidas e mecanismos selecionados em populações de *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae) da fronteira entre Brasil e Guiana Francesa

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Junior

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dra. Rafaela Vieira Bruno - Presidente e Revisora do texto
FIOCRUZ/ Instituto Oswaldo Cruz/ Laboratório de Biologia Molecular de Insetos

Dr. Mario Antônio Navarro da Silva
UFPR/ Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná

Dra. Vanessa Bottino Rojas
UFRJ/ Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis

Dra. Luana Cristina Farnesi Ferreira
FIOCRUZ/ Instituto Oswaldo Cruz/ Laboratório de Biologia Molecular de Insetos

Dra. Gabriela de Oliveira Paiva e Silva
UFRJ/ Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis

Rio de Janeiro, abril de 2017

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

Dedico essa dissertação a todos os professores que de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. De maneira especial à toda comunidade UERJ.

AGRADECIMENTOS

Obrigada Mãe, Marineth, pelo árduo trabalho de criar meus irmãos e eu para que sigamos por bons caminhos. Parece que deu certo! Rs. Ao meu papai, Luiz, que olha por mim de onde estiver. Aos meus irmãos, Rafael e Júnior que me completam e estão sempre a postos quando eu preciso.

Agradeço a toda minha família. Vocês são meu alicerce e meu amor por vocês é incondicional, sobretudo às minhas afilhadas (Lívia e Rafaela) e a minha vizinha arretada, Dona Maria Helena.

Aos amigos que a vida me deu, obrigada por cada sorriso, cada choro, cada abraço apertado. Amo vocês: Felipe Steinhagem, Camilla Rodrigues, Helena Vargas, Ingrid Régis, Kailani Guimarães, Hellen Soares, Marcelly Barros, Carolina Werkhaizer, Carolina Monteiro, Roberta Rodrigues.

Agradeço a meu namorado, Ruan Lopes, por toda paciência neste período, por compreender e abdicar de momentos de diversão com nossos amigos para me dar forças nos estudos. Por acreditar tanto em mim e me encorajar sempre. Amo você!

À companheiríssima desse período, Taiza Braga! Foram muitas aflições, muitas horas de trânsito na Av. Brasil, muitos “fica quietinha, fica!”, muita luta para ficar acordada nas aulas, essa você perdeu de longe, mas vencemos essa etapa! Vamos comemorar no Kikokó com muita picanha e baconnnn, porque a gente trabalhou muito, mas se divertiu também!

Ao meu orientador, Dr. Ademir Martins. Obrigada pela paciência e por estar sempre disposto a ensinar. Você inspira! Quando seus olhos brilham discutindo sobre algum resultado/artigo, é contagiante! Dá vontade de sair correndo e fazer centenas de experimentos. Tenho imenso respeito e admiração pela pessoa e profissional que é. Obrigada pela confiança e oportunidade de compor sua equipe.

A toda equipe LAFICAVE: Cynara Rodovalho, Bento Lima, Luciana Dias, Kiko Bauzer, Paula Figliuolo, Thaís Nunes, Daniel Mello, Raquel Santos, Priscila

Serravale, Gilberto Alcântara, Sandro Pereira, Daiane Machado, Yasmin Veiga, Bárbara Souza. De maneira especial agradeço aos mosquiteiros da molecular: Aline Loureiro, Luana Carrara, Luiz Britto, Ramon Lopes, Rafi Rahman, Yan Dias e Júlia Santos. Incluo aqui, as pessoas que sempre serão Laficave para mim: Gabriela Azambuja, Priscila Fernandes, Diogo Bellinato, André Torres (vulgo Exuzin), Thiago Belinato e Luana Farnesi. Obrigada por todos os toques e ajudas, vocês também foram essenciais!

Ao Dr. Allan Kardec Gallardo e sua equipe (IEPA, AP) por conduzir as coletas do material aqui utilizado, sempre de forma generosa, eficiente e proativa.

A toda galera do LABMI, por serem tão solícitos e estarem sempre dispostos a compartilhar seus conhecimentos (e, reagentes e equipamentos rrsrs), sempre nos socorrendo e apoiando. Não sei o que seriam das minhas clonagens sem vocês! Meu muito obrigado a: Rafaela Bruno, Saori Araki, Robson Silva (Robão), Rayane Freitas, Karine Padilha, Gustavo Rivas, Luciana Araripe, Lourdes Barros e aos demais que fazem parte dessa equipe maravilhosa.

Não poderia deixar de agradecer também a turma do LATHEMA. Foi um tal de “me empresta o cartão?”. “Faltou Luz! Corre! Põe as amostras no gelo seco!”. Muito companheirismo e diversão com vocês. Um muito obrigado especial para Anielly Ferreira, Rafaella Miranda, Keli Antunes, Stéphanie Campos, Iule Bonnelly, Marcia Castro, Maria Ignês e Cris.

À turma de Mr. BP 2015.1 que sacudiu a secretaria acadêmica e passou por toda aflição dos testinhos de Parasito II.

Estendo o agradecimento a toda equipe e coordenação do programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária por todo suporte neste período.

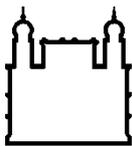
Aos membros da banca examinadora pelas contribuições, em especial a Dra Rafaela Bruno pela revisão do texto.

À toda equipe do apoio, Jose, Rogério, Lídia e Cleide que ajudaram nas burocracias e na manutenção do nosso ambiente de trabalho. Ainda, não

poderia nunca deixar de homenagear nossa queridíssima secretária ESTHER. Vizinha você estará sempre em nossos corações, obrigada por toda alegria e zelo que espalhou pelo prédio durante todos esses anos.

Ao Instituto de Biologia do Exército (IBEX), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Pasteur pelo suporte e financiamento no desenvolvimento desta pesquisa.

À todos que me apoiaram e também fazem parte dessa conquista!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

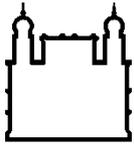
Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

Avaliação da resistência a inseticidas e mecanismos selecionados em populações de *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae) da fronteira entre Brasil e Guiana Francesa

A prática excessiva do uso de inseticidas tem selecionado populações resistentes de *Aedes aegypti* em todo o mundo. Os principais mecanismos selecionados são modificação na molécula alvo do inseticida e alterações metabólicas que melhor detoxifiquem os compostos. Neste estudo, foram avaliados o perfil de resistência e os principais mecanismos selecionados em duas populações de *Ae. aegypti* do Amapá, Brasil: Macapá, capital do estado e Oiapoque, que faz fronteira com Guiana Francesa, uma das portas de entrada para o vírus chikungunya no país. Bioensaio dose-resposta indicou resistência ao larvicida organofosforado temephos em Macapá ($RR_{50} = 6,5$) e ainda maior em Oiapoque ($RR_{50} = 21,8$). Larvas de ambas as populações também apresentaram alta tolerância ao piretroide deltametrina, avaliadas em um ensaio simplificado de *knockdown*, que revelou índices de susceptibilidade de 30 e 36, respectivamente em Macapá e Oiapoque, em uma escala de 1 a 36. Testes com adultos revelaram a mesma tendência de maior resistência em Oiapoque. Em ensaios dose-resposta com kits tipo OMS e papéis impregnados com inseticida, observou-se RR_{50} para o organofosforado malathion e o piretroide deltametrina, respectivamente, de 3,1 e 46,4 (em Macapá) e 6 e 143,9 (em Oiapoque). Paralelamente, ensaio semi-quantitativo do tipo tempo-resposta a uma única dose (7 g/L de malathion e 1,2 g/L de deltametrina) confirmou resistência das populações do Amapá, principalmente ao piretroide. Mecanismos de resistência do sítio-alvo foram investigados para os piretroides, através de análise de mutações *kdr* no canal de sódio (Nav). Genotipagem de SNPs, por qPCR TaqMan, nos sítios 1016 e 1534 do Nav , revelaram a presença dos alelos *kdr NavR1* (84 e 23%, respectivamente em Macapá e Oiapoque) e *NavR2* (67% apenas em Oiapoque). Somando, as frequências de genótipos para resistência (R1R1, R1R2 e R2R2) foram de 71 e 80% em Macapá e Oiapoque, nesta ordem. Mutação no sítio 1011 foi encontrada, via PCR alelo-específica, somente em heterozigotos em Macapá, correlacionada à presença de duplicação no gene Nav . Variação no número de cópias deste gene foi avaliada por qPCR, indicando variação de duas a quatro cópias em indivíduos de ambas as populações. Dados de genotipagem dos sítios 1011, 1016 e 1534, somados à clonagem e sequenciamento da região IIS6 do gene Nav de alguns indivíduos, sugerem a duplicação gênica de diversos alelos deste gene. A seleção de mecanismos da resistência metabólica, também foi avaliada através de análise de expressão de quatro genes da família CYP e um da família CCE, comparada à linhagem Rockefeller. Superexpressão (acima de duas vezes o valor de Rockefeller) foi encontrada em ambas as populações para os genes *CYP6BB2*, *CYP9J10*, *CYP9J28* e *CCEae3a*, mas não para o *CYP9M6*. *CYP6BB2* foi o mais expresso, cerca de 6X nas duas populações e *CCEae3a*, que está mais relacionado à resistência a organofosforados, cerca de 6 e 4X, respectivamente em Oiapoque e Macapá. Em suma, as diferenças entre as RR ao piretroide entre Macapá e Oiapoque podem ser parcialmente explicadas pela presença do alelo *NavR2*, bem como de maior expressão do *CCEae3a* em Oiapoque aos organofosforados. Contudo, é provável que outros mecanismos estejam envolvidos. O monitoramento da resistência a inseticidas em *Ae. aegypti* na região de fronteira entre Brasil e Guiana Francesa, bem como a elucidação dos mecanismos envolvidos, podem ajudar a melhor orientar o controle químico do vetor naquela importante região.

Palavras-chave: vetor de arbovírus, controle de vetor, mutações *kdr*, genes CYP, *CCEae3a*, deltametrina, organofosforados, duplicação gênica



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ABSTRACT

Evaluation of insecticide resistance and selected mechanisms in *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae) populations from the border between Brazil and French Guiana

Excessive practice of insecticide use has selected resistant populations of *Aedes aegypti* throughout the world. The main mechanisms selected are modification in the insecticide target-molecule and metabolic changes that enhance detoxification of compounds. In this study, the resistance profile and the main mechanisms selected in two populations of *Ae. aegypti* from Amapá, Brazil: Macapá, the state capital and Oiapoque, which borders French Guiana, one of the gateways to the Chikungunya virus in the country. Dose-response bioassay indicated resistance to the organophosphate larvicide temephos in Macapá ($RR_{50} = 6.5$) and even higher in Oiapoque ($RR_{50} = 21.8$). Larvae from both populations also showed a high tolerance to the pyrethroid deltamethrin, evaluated in a simplified *knockdown* test, which revealed susceptibility indices of 30 and 36, respectively, in Macapá and Oiapoque, on a scale of 1 to 36. Tests with adults revealed the same trends of higher resistance in Oiapoque. In dose-response assays with WHO kits and papers impregnated with insecticide RR_{50} was observed for organophosphate malathion and pyrethroid deltamethrin, respectively, of 3.1 and 46.4 (in Macapá), and 6 and 143.9 (in Oiapoque). In parallel, a single-dose time-response type test (7 g/L malathion and 1.2 g/L deltamethrin) confirmed resistance of the Amapá populations, mainly to the pyrethroid. Target-site resistance mechanisms were investigated for the pyrethroids through analysis of *kdr* mutations in the sodium channel (Na_v). Genotyping of 1016 and 1534 SNPs, by TaqMan qPCR, revealed the occurrence of the *kdr* alleles Na_vR1 (84 and 23%, respectively in Macapá and Oiapoque) and Na_vR2 (67% only in Oiapoque). Summing, the frequencies of the resistance genotypes (R1R1, R1R2 and R2R2) were 71 and 80% in Macapá and Oiapoque, in this order. Mutation at 1011 site was found, via allele-specific PCR, only in heterozygotes in Macapá, correlated to the presence of a duplication in the Na_v gene. Variation in the number of copies of this gene was assessed by qPCR, indicating variation of two to four copies in individuals of both populations. Genotyping data from 1011, 1016 and 1534 sites, added to the cloning and sequencing of the IIS6 Na_v gene segment of some individuals, suggest duplication of several alleles of this gene. The selection of metabolic resistance mechanisms was also evaluated through the expression analysis of four CYP family genes and one of the CCE family, compared to the Rockefeller lineage. Overexpression (up to twice the Rockefeller value) was found in both populations for the *CYP6BB2*, *CYP9J10*, *CYP9J29* and *CCEae3a* genes, but not for *CYP9M6*. *CYP6BB2* was the most expressed, about 6X in both populations and *CCEae3a*, which is more related to resistance to organophosphates, about 6 and 4X, respectively in Oiapoque and Macapá. Taking all together, the pyrethroid RR differences between Macapá and Oiapoque can be partially explained by the presence of the Na_vR2 allele, as well as the greater expression of *CCEae3a* in Oiapoque to the organophosphates' RR. However, other mechanisms are likely to be involved. The monitoring of insecticide resistance in *Ae. aegypti* in the border region between Brazil and French Guiana, as well as the elucidation of the mechanisms involved, may help to better guide the chemical control of the vector in that important region.

Key-words: arboviruses vector, vector control, *kdr* mutations, *CYP* genes, *CCEae3a*, deltamethrin, organophosphate, gene duplication

ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O <i>Aedes aegypti</i> e sua importância epidemiológica	1
1.1.1. <i>Aedes aegypti</i> como vetor	1
1.1.1. Principais arboviroses no Brasil com atuação do <i>Aedes aegypti</i> ...	3
Febre Amarela Urbana (FAU)	4
Dengue	5
Chikungunya	5
Zika	6
Outras Arboviroses	7
1.2. Controle do <i>Aedes aegypti</i>	9
1.3. Resistência a Inseticidas	14
1.3.1. Resistência Metabólica	15
1.3.2. Resistência sítio-alvo em organofosforados e piretroides.....	19
Acetilcolinesterase (AChE)	19
Canal de Sódio Regulado por Voltagem (Nav)	21
Duplicações gênicas e resistência	24
1.4. Municípios avaliados	25
1.4.1. Arboviroses no Estado do Amapá	26
1.5. Hipótese	29
1.6. Justificativa	29
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Coleta de ovos e estabelecimento de colônias de <i>Ae. aegypti</i> no laboratório	31
3.2. Avaliação da resistência	32

3.2.1	Bioensaios com larvas	32
3.2.2.	Bioensaios com Mosquitos Adultos	34
3.3.	Investigação dos Mecanismos de Resistência	36
3.3.1.	Genotipagem de mutações <i>Knockdown resistance (Kdr)</i>	36
3.3.2.	Clonagem e Sequenciamento do segmento IIS6 do <i>Nav</i>	39
3.3.3.	Variação no número de cópias gênicas do <i>Nav</i>	40
3.3.4.	Análise da Expressão de Genes Envolvidos com a Resistência Metabólica	42
4.	RESULTADOS	44
4.1.	Determinação dos perfis de susceptibilidade a inseticidas	44
4.1.1.	Bioensaios com larvas	44
4.1.1.1.	Ensaio simplificado de <i>knockdown</i> com o piretroide deltametrina	44
4.1.1.2.	Ensaio com o organofosforado temephos	45
4.2.	Bioensaios com adultos	46
4.2.1.	Bioensaios dose-resposta.....	46
4.2.2.	Bioensaios tempo-resposta	49
4.3.	Ensaio Moleculares	51
4.3.1.	Genotipagem dos sítios 1016 e 1534 do gene <i>Nav</i>	51
4.3.2.	Genotipagem do sítio 1011 do gene <i>Nav</i>	52
4.3.3.	Variação do número de cópias gênicas do <i>Nav</i>	54
4.3.4.	Clonagem e sequenciamento do segmento IIS6 do <i>Nav</i> de <i>Ae. aegypti</i> do Amapá.....	58
4.3.5.	Expressão de genes envolvidos com a resistência metabólica em <i>Ae. aegypti</i> do Amapá.....	61
5.	DISCUSSÃO	64
6.	CONCLUSÕES	80
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa global da distribuição estimada de <i>Aedes aegypti</i>	1
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	2
Figura 3. Processos possíveis para seleção de resistência metabólica.....	16
Figura 4. Atuação da enzima acetilcolinesterase (AChE) na transmissão do impulso nervoso.....	20
Figura 5. Estrutura do canal de sódio regulado por voltagem (Nav).....	21
Figura 6. Casos confirmados de dengue, chikungunya e Zika no Amapá.....	28
Figura 7. Localização das populações em estudo.....	32
Figura 8. Bioensaio de susceptibilidade ao OP temephos em larvas de <i>Aedes aegypti</i>	33
Figura 9. Esquema de Bioensaio Simplificado de <i>Knockdown</i> para larvas	34
Figura 10. Metodologia adaptada da OMS para avaliação da resistência em adultos de <i>Aedes aegypti</i>	35
Figura 11. Esquema de AS-PCR (A) e Curva de dissociação para o sítio 1011 do Nav (B)	37
Figura 12. Exemplo de um perfil de genotipagem pelo ensaio TaqMan.....	38
Figura 13. Perfil de <i>knockdown</i> para o piretroide deltametrina em larvas de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá.....	45
Figura 14. Perfil de susceptibilidade ao larvicida organofosforado em populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá.....	46

Figura 15. Perfil de suscetibilidade a adulticidas em populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá.	48
Figura 16. Perfil de suscetibilidade a adulticidas em populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá..	50
Figura 17. Frequência dos alelos <i>Nav</i> em populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá.....	52
Figura 18. Genotipagem do sítio 1011 do <i>Nav</i> de populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá.....	53
Figura 19. Número de cópias do gene <i>Nav</i> em <i>Aedes aegypti</i> do Amapá e de linhagens de laboratório.	55
Figura 20. Produtos de amplificação (A) e purificação (B) do seguimento IIS6 do <i>Nav</i>	58
Figura 21. Rede de haplótipos de sequências “tipo A” da região IIS6 do <i>Nav</i> de <i>Aedes aegypti</i> de Macapá e Oiapoque..	59
Figura 22. Rede de haplótipos de sequências “tipo B” da região IIS6 do <i>Nav</i> de <i>Aedes aegypti</i> de Macapá e Oiapoque.	60
Figura 23. Exemplo de trecho de sequenciamento ‘direto de produto de PCR’ de indivíduos com diferentes genótipos para o sítio 1534.....	60
Figura 24. Exemplo de um resultado de PCR quantitativo em tempo real para análise da expressão de genes relacionados à resistência metabólica.	62
Figura 25. Alteração no nível de expressão de genes relacionados à resistência metabólica em populações de <i>Aedes aegypti</i> do Estado do Amapá.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos e formulações recomendados pela WHOPES para o controle de larvas de mosquitos.....	13
Tabela 2. Compostos e formulações recomendados pela WHOPES para o controle de mosquitos, via tratamento espacial.....	13
Tabela 3. Casos de Dengue, Chikungunya e Zika no estado do Amapá. Ano 2016.	27
Tabela 4. Sequências de primers e sondas usadas nas reações de genotipagem para os sítios 1011, 1016 e 1534, amplificação dos segmentos IIS6 e IIS6 e reações de variação do número de cópias gênicas do <i>Na_v</i> de <i>Aedes aegypti</i>	41
Tabela 5. Sequência de <i>primers</i> utilizados na avaliação de expressão gênica em <i>Aedes aegypti</i>	43
Tabela 6. Análise quantitativa de resistência ao organofosforado temephos em larvas de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá.....	46
Tabela 7. Análise quantitativa de resistência ao piretroide deltametrina e ao organofosforado malathion em populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá.....	48
Tabela 8. Análise semi-quantitativa do perfil de susceptibilidade ao piretroide deltametrina e ao organofosforado malathion em populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá.....	50
Tabela 9. Frequências genótípicas nos sítios 1016 e 1534 do <i>Na_v</i> , em populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá.	52
Tabela 10. Frequências alélicas e genótípicas para o sítio1011 do <i>Na_v</i> em populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá.	53
Tabela 11. Variação no número de cópias no <i>Na_v</i> em populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá.	54

Tabela 12. Genótipos e variação no número de cópias do *Nav* em *Ae. aegypti* do Amapá..... 57

Tabela 13. Parâmetros obtidos na análise da expressão de genes relacionados à resistência metabólica em populações de *Aedes aegypti* do Estado do Amapá..... 63

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
Ach	Acetilcolina
<i>ace-1</i>	Gene da acetilcolinesterase
BL	Larvicida bacteriano
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis variedade israelenses</i>
<i>BU</i>	<i>Benzoilureas</i>
CA	Carbamato
CCE	Carboxilesterase
cDNA	DNA complementar
CHIKV	Chikungunya vírus
CL	Concentração letal
CNV	do inglês: <i>Copy number variation</i> ; variação no número de cópias
CT	do inglês: <i>threshold cycle</i>
CYP	Família gênica de P450
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DEF	S,S,S-tributil fosforotioato
DEM	Dietil-maleato
DENV	Dengue vírus
DNA	do inglês: Deoxyribonucleic Acid; Ácido Desoxirribonucleico
EST	Esterases
FAU	Febre amarela urbana
GABA	do inglês: <i>Gamma-AminoButyric Acid</i> ; Ácido gama-aminobutírico
GST	Glutathione-S-transferase
IBEX	Instituto de Biologia do Exército
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEPA	Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá
ID	do inglês: <i>dissemination rate</i>
IGR	do inglês: <i>insect growth regulator</i> ; Regulador de hormônio juvenil
IR	do inglês: <i>infection rate</i>
IS	Índice de Susceptibilidade
JH	Análogos de hormônio juvenil
<i>Kdr</i>	do inglês: <i>knockdown resistance</i>
KdT	Tempo de <i>knockdown</i>
KT ₅₀	'Tempo mediano de <i>Knockdown</i> '
LAFICAVE	Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores
L _T	tempo de letalidade
<i>MACE</i>	do inglês: <i>modified acetylcholinesterase</i>
Met (M)	Metionina
MFO	Monoxigenase de função mista, também referida como P450
MoReNAa	Rede Nacional de Monitoramento da Resistencia de <i>Aedes aegypti</i> a Inseticidas
MS	Ministério da Saúde
nAChR	Receptores nicotínicos de acetilcolina

NaV	Canal de sódio regulado por voltagem
<i>NaV</i>	Gene do Canal de sódio regulado por voltagem
<i>NaVR1</i>	Alelo contendo mutação apenas no sítio 1534
<i>NaVR2</i>	Alelo contendo a mutação nos sítios 1016 e 1534
<i>NaVR3</i>	Alelo contendo a mutação apenas no sítio 1016
Nc	Número de cópias gênicas
OC	Organoclorado
OMS	Organização Mundial de Saúde
OP	Organofosforado
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBO	Butóxido de piperonila
PBS	do inglês: <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	do inglês “Polymerase chain reaction”; Reação em cadeia da Polimerase
PI	Piretroide
PNCD	Programa Nacional de Controle de Dengue
ppm	parte por milhão
Pro (P)	Prolina
qPCR	do inglês “quantitative Polymerase chain reaction” Reação em cadeia da Polimerase quantitativa
<i>Rdl</i>	Gene codificante do canal receptor de GABA
RNA	do inglês: Ribonucleic Acid; Ácido Ribonucleico
RIDL	do inglês: release of insect containing a gene dominant lethal
RR	Razão de Resistência
SFB	Soro fetal bovino
SIT	do inglês: Sterile Insect Technique
SNP	do inglês: <i>Single nucleotide polymorphism</i> ; Polimorfismo de nucleotídeo único
SP	Spinosad
TL	Tempo letal
Tm	Temperatura de “ <i>melting</i> ”
WHO	World Health Organization
WHOPES	WHO Pesticide Evaluation Scheme
ZIKV	Zika vírus

1. INTRODUÇÃO

1.1. O *Aedes aegypti* e sua importância epidemiológica

O *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) pertence à família *Culicidae* (ordem Diptera). Transmissor dos vírus da febre amarela, dengue, chikungunya e Zika, é uma preocupação mundial na saúde pública. De origem africana, o *Ae. aegypti* chegou às Américas devido às grandes navegações no período colonial. Desde então acompanhou as migrações do homem que avançaram junto com o desenvolvimento dos meios de transporte (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Embora as mudanças no meio ambiente causadas pelo homem possam prejudicar algumas espécies, para o *Ae. aegypti* a formação de um novo ambiente proporcionou sua evolução em duas subespécies distintas a partir da ancestral africana: *Ae. aegypti formosus* (Walker) e *Ae. aegypti aegypti* (Linnaeus), sendo aquela uma espécie mais bem adaptada ao ambiente silvestre e esta ao ambiente urbano e às condições humanas - como a preferência pelo desenvolvimento em ambientes artificiais (Tabachnick, 1991; Brown et al., 2014). Em consequência da globalização, o *Ae. aegypti* se tornou cosmopolita e é encontrado em amplo espectro, sobretudo nos países tropicais e subtropicais em que o clima favorece seu desenvolvimento (Figura 1) (Kraemer et al., 2015).

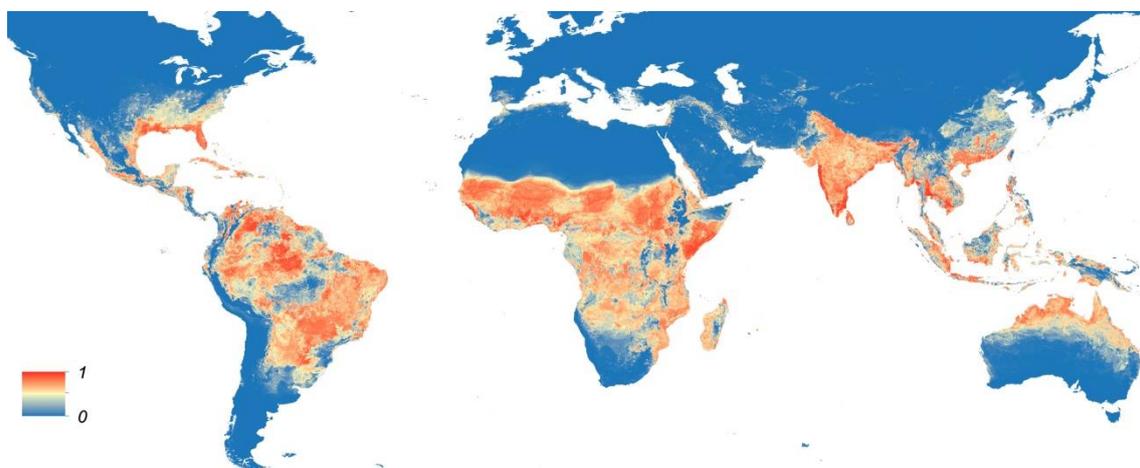


Figura 1. Mapa global da distribuição estimada de *Aedes aegypti*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência (de zero - azul a um - vermelho). Figura de Kraemer et al. (2015).

Os mosquitos são holometábolos, logo sofrem metamorfose completa com os estágios imaturos ocupando hábitat diferente da forma adulta. No caso do *Ae. aegypti*, o desenvolvimento até a forma adulta dura em torno de sete a dez dias e é dividido em fase aquática e terrestre. Na primeira encontram-se os quatro ínstares larvares (L1-L4) que, após eclodirem do ovo, se alimentam de matéria orgânica contidas na água. Já no próximo estágio, no formato de pupa, não ocorre alimentação, enquanto o organismo se transforma drasticamente para a fase terrestre, onde se encontram os mosquitos adultos (Figura 2) (Forattini, 2002).

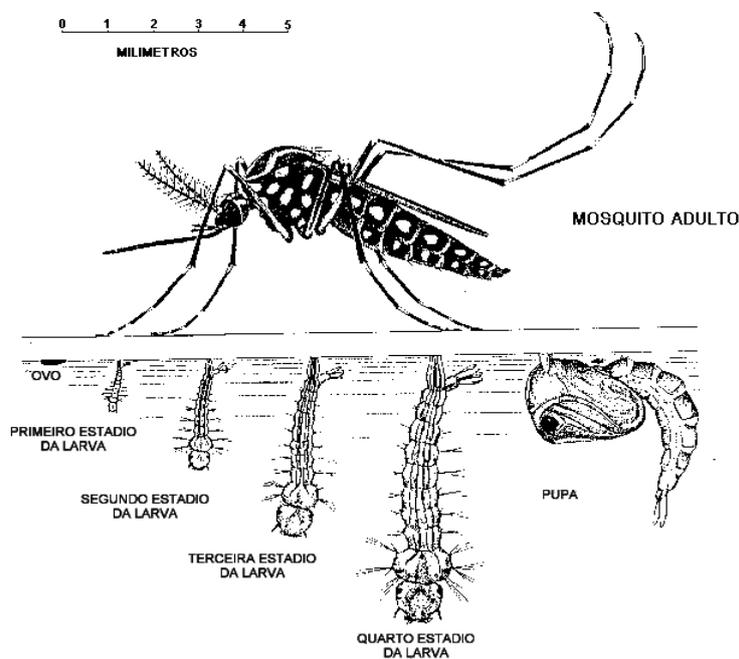


Figura 2. Ciclo de vida do *Aedes aegypti*. As formas imaturas são observadas na fase aquática e o adulto se encontra na fase terrestre do ciclo. Figura retirada de “UNICAMP sem dengue”, <http://dengue.cecom.unicamp.br/wp-content/uploads/2014/07/AEDES-AEGYPTI.gif>.

Com picos de atividade ao amanhecer e no período crepuscular, os mosquitos adultos vivem em média de 30 a 35 dias e se alimentam de seiva vegetal. As fêmeas também se alimentam de sangue, de onde conseguem os componentes fundamentais para a maturação dos ovos. Estes são distribuídos em diferentes locais em torno do mesmo terreno, através da “oviposição em saltos” e são preferencialmente depositados em criadouros artificiais escuros ou sombreados, sujeitos a futuros alagamentos (Forattini, 2002). Contudo,

estes ovos podem se manter viáveis por longos períodos devido à resistência à dessecação (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994; Rezende, 2008).

Cada fêmea produz cerca de 120 ovos e não há concordância gonotrófica, ou seja, pode ser realizada mais de uma alimentação para produção dos ovos, em especial quando perturbada antes de totalmente ingurgitada (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994; Forattini, 2002). Este fato resulta na variação de hospedeiros, com uma possível disseminação de patógenos a vários deles. O fato de o *Ae. aegypti* ser um importante vetor de arbovírus associado ao seu caráter antropofílico e endofílico reflete diretamente na alta capacidade vetorial deste inseto (Lourenço-de-Oliveira, 2005).

1.1.1 *Aedes aegypti* como vetor

O *Ae. aegypti* é atualmente o mais importante vetor no mundo, capaz de transmitir pelo menos quatro importantes vírus aos humanos. Três desses vírus pertencem à família *Flaviridae* (gênero *Flavivirus*), sendo eles o vírus amarelo (YFV), os quatro sorotipos do vírus dengue (DENV-1; DENV-2; DENV-3 e DENV-4) e o Zika vírus (ZIKV). Já o vírus chikungunya (CHIKV) pertence à família *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*). De modo geral, os sintomas das doenças ocasionadas por estes arbovírus são febre, dores de cabeça, musculares e nas articulações, náuseas e vômitos. Insuficiência renal e hepática, hemorragias, poliartralgia bilateral e distúrbios neurológicos são manifestações diferenciais das formas graves de febre amarela urbana (FAU), dengue, chikungunya e Zika, respectivamente (OMS, 2016a,c,d).

À exceção do Zika vírus que pode ter transmissão sexual (OMS, 2016c) e o ciclo silvestre da febre amarela que possui macacos como principais reservatórios do vírus (OMS, 2016d), o ciclo de transmissão de febre amarela urbana, dengue, chikungunya e Zika se dá de humano pra humano através da picada de uma fêmea infectada com vírus. O mosquito se infecta ao picar um humano em viremia, ou seja, no período sintomático da doença que dura em média sete dias. Uma vez no intestino do inseto, o vírus se dissemina por todo corpo e ao atingir as glândulas salivares é capaz de transmiti-lo ao humano. Pelo menos para dengue, uma vez infectado pode transmitir o vírus pelo resto

de sua vida, inclusive à sua prole, mesmo que em baixa frequência (Consoli e Lourenço-de-Oliveira 1994; Zeidler et al., 2008).

1.1.2 Principais arboviroses no Brasil com atuação do *Aedes aegypti*

Febre Amarela Urbana (FAU)

A importância do mosquito *Ae. aegypti* como vetor no Brasil, data do século XVII, quando foram registradas as primeiras epidemias de febre amarela urbana no país. Em 1850 novas epidemias se instalaram no Rio de Janeiro. Com intuito de eliminar a doença, Oswaldo Cruz estabeleceu campanhas cujo foco era o combate ao então chamado *Stegomyia fasciata*, no início do século XX. Com sucesso nas campanhas, a FAU perdeu o caráter epidêmico, mas entre 1928-1929 ocorreram novas epidemias que assolaram a população. Grandes esforços foram feitos a fim de controlar a grave situação de saúde pública da época, até que em 1937 foi criada a vacina contra a febre amarela. A medida profilática foi tão eficaz que os últimos casos de FAU no país foram notificados em 1942, no Acre. Desde então só têm sido registrados casos silvestres da doença, que apesar de não ter sido erradicada é controlada por vacinação e restrita às áreas silvestres (Franco, 1969; Costa et al., 2010).

Nos últimos meses, casos de febre amarela silvestre foram relatados, sendo considerado um dos maiores surtos já ocorridos no país, com 149 casos confirmados e 52 óbitos, até o início de fevereiro de 2017. O maior número de casos vinha ocorrendo em Minas Gerais (MG), seguido de Espírito Santo (ES) e São Paulo (SP). Bahia (BA) e Tocantins (TO) também tiveram casos suspeitos e, segundo boletim da OMS de 27 de janeiro de 2017, espera-se que novos casos sejam detectados em outros estados, tendo em vista o movimento interno de pessoas, presença de macacos infectados e o baixo nível de cobertura vacinal em áreas que antes não estavam em risco de transmissão de febre amarela (MS, 2017d; OMS, 2017b; Pinho e Gomes, 2017). A extensa ocorrência de *Ae. aegypti* e sua rápida dispersão alertam para uma forte tendência de reurbanização da febre amarela no país (Leonel, 2017; MS, 2017c).

Dengue

A dengue constitui uma das doenças reemergentes que mais afeta o homem. No mundo todo, o número de notificações de dengue tem aumentado. Em 1970, apenas nove países tinham registro da doença, mas atualmente é endêmica em mais de cem (OMS, 2016b), com cerca de 400 milhões de pessoas infectadas anualmente (CDC, 2016b).

Relatos de dengue ocorrem no Brasil desde meados do século XIX e início do século XX. No entanto, acredita-se que os programas de erradicação do *Ae. aegypti* voltados para a febre amarela urbana também diminuíram a transmissão dos vírus DENV. O vetor chegou a ser erradicado em 1955 (Franco, 1969) e em 1973, no entanto, em 1976 a descontinuidade das ações de controle levou à reintrodução do *Ae. aegypti* no país (Teixeira e Barreto, 1996). Com o sucesso da vacina, a febre amarela perdeu o caráter epidêmico e os programas foram interrompidos em 1970 nas Américas. A partir de então casos de dengue começaram a ganhar maiores proporções. Os primeiros registros recentes de dengue no país datam do século XX, em 1981 em Boa Vista (RR), onde foram isolados os vírus DENV-1 e DENV-4, e em 1986 no Rio de Janeiro (RJ), com o sorotipo 1 (Braga e Valle, 2007b; Valle et al., 2015). Também no Rio de Janeiro, foram isolados os sorotipos 2 e 3, em 1990 e 2001, respectivamente (Barreto e Teixeira, 2008). Atualmente, circulam no país os quatro sorotipos com a ocorrência de epidemias, geralmente associadas com a alteração do sorotipo predominante. Entre 1990 e 2016 foram registradas várias epidemias no Brasil com aproximadamente 12,5 milhões de casos. A maior epidemia já registrada no país ocorreu em 2015 com cerca de 1,7 milhões de casos prováveis (MS, 2017b).

Chikungunya

A febre chikungunya foi descrita pela primeira vez na década de 1950, na Tanzânia. Até 2004, os casos ficaram restritos a países africanos e asiáticos (Azevedo et al., 2015). No entanto, em outubro de 2013, o CHIKV chegou às Américas pelo Caribe, resultando em milhares de infecções (Staples et al., 2015). No Brasil, a transmissão autóctone foi detectada pela primeira

vez em setembro de 2014, na cidade de Oiapoque (Amapá) e em Feira de Santana (Bahia). Acredita-se que tenha ocorrido duas introduções virais pela América, pois o genótipo encontrado em Oiapoque foi o asiático, como ocorre no Caribe, enquanto na Bahia foi o genótipo africano (Azevedo et al., 2015; Donalísio et al., 2015; Freitas et al., 2015; Honório et al., 2015). No ano de 2016, foram confirmados 152.769 casos da doença com 172 óbitos nas Américas. Só o Brasil contribuiu com 146.914 casos e 159 óbitos (OMS-OPAS, 2016).

Zika

O vírus Zika foi identificado pela primeira vez em macacos durante um estudo de transmissão de febre amarela silvestre em 1947 na floresta de Zika, em Uganda - África, onde mais tarde, em 1952, foi identificada a infecção em humanos assim como na República Unida da Tanzânia. A primeira grande epidemia ocorreu na Micronésia em 2007. Chegou às Américas em 2014 e no Brasil em maio de 2015, na região nordeste. Acreditava-se que seria uma infecção menos grave que a dengue, mas entre julho e outubro de 2015 a infecção pelo Zika foi associada à síndrome de Guillain-Barré e ao desenvolvimento de microcefalia (OMS, 2016c, 2017a; OPAS, 2015). A síndrome de Guillain-Barré provoca paralisia muscular e pode levar à morte, caso atinja os músculos respiratórios. Já a microcefalia é uma malformação congênita, em que o cérebro não se desenvolve de maneira adequada, provocando uma diminuição no perímetro cefálico de recém-nascidos (MS, 2016). Essa alteração afeta as atividades locomotora e psíquica dos bebês.

Até 02 de fevereiro de 2017, haviam sido confirmados 201.821 casos de Zika nas Américas, desses 2.632 foram associados à má formação congênita e 20 casos foram fatais. Só o Brasil registrou 130.701 casos confirmados com 11 mortes e 2.366 associações com aquela má formação (OPAS, 2017).

Outras arboviroses

No Brasil, a ocorrência de outras arboviroses representa um alerta a possíveis epidemias ainda não vistas. Doenças como o Rocio, febre Mayaro e o Oropouche são exemplos. Tal qual o DENV e o CKIKV, o vírus Rocio (ROCV) pertence à família dos Flavivírus e Mayaro (MAYV) à família Togaviridae, gênero *Alphavirus*. Já o Oropouche (OROV) pertence à família Bunyaviridae, gênero *Orthobunyavirus*. À exceção deste último e do DENV, esses vírus estão mais relacionados a ciclos silvestres, onde várias espécies de insetos hematófagos atuam como vetores e vertebrados selvagens estão envolvidos como hospedeiros. No entanto, estão suscetíveis à adaptação para um ciclo urbano, dependendo do vetor envolvido. Os vetores do vírus Rocio são *Aedes scapularis* Rondani, 1848 e *Psorophora ferox* Von Humboldt, 1819 (ambos Diptera, Culicidae) (Lopes et al., 1981), com aves selvagens migratórias como reservatórios. Testes sorológicos contínuos de aves e humanos evidenciaram a circulação do vírus em distintas regiões brasileiras. Seu isolamento se deu em uma área de Mata Atlântica em São Paulo em 1975, onde causou um surto de cerca de dois anos (Mitchell e Forattini, 1984; Straatmann et al., 1997). O vírus MAYV é transmitido por mosquitos *Haemagogus janthinomys* Dyar, 1921 (Diptera, Culicidae) e os hospedeiros vertebrados são mamíferos. Isolado pela primeira vez em 1954 em Trinidad e Tobago, Caribe, chegou ao Brasil por Belém/PA no ano seguinte. A doença é endêmica da região Amazônica, principalmente nas regiões Nordeste e Centro-Oeste, onde foram notificados entre dezembro de 2014 a janeiro de 2016, 70 casos confirmados em Goiás (60), Pará (9) e Tocantins (1) (MS - SVS 2015; Cambricoli, 2016). Recentemente, pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz registraram evidências de sua presença no Pantanal do Mato Grosso do Sul, sinal de que o vírus pode ter passado por um processo de adaptação e vir a alcançar outras regiões do país (Pauvolid-Corrêa et al., 2015; Turino, 2015). O grande número de casos e a possibilidade de transmissão por *Aedes* pode colaborar para a formação de um ciclo urbano com o *Ae. aegypti* como transmissor, assim como ocorre na febre amarela urbana.

Por último, o vírus OROV é transmitido entre preguiças, marsupiais, primatas e aves pelo mosquito *Aedes (Ochlerotatus) serratus* Theobald, 1901 e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (ambos Diptera, Culicidae) no ciclo silvestre. No entanto, esse vírus já se adaptou a um ciclo urbano, envolvendo o homem, tendo *Culicoides paraensis* Goeldi, 1905 (Diptera, Ceratopogonidae) – também chamado de maruim - como o principal vetor. O vírus teve sua primeira identificação em 1955 em Trinidad e Tobago, com entrada no Brasil em 1960 também em Belém/PA. Até 1980 o vírus ficou restrito ao estado do Pará e redondezas e foi se expandindo pela região Norte (Amazonas, Amapá, Acre, Rondônia e Tocantins), Nordeste (Maranhão) e mais recentemente no Sudeste (Minas Gerais). São conhecidos quatro genótipos do vírus Oropouche, com maior dispersão e prevalência do genótipo I. A febre Oropouche é a segunda arbovirose febril de maior importância no Brasil, ficando atrás apenas da dengue. Estima-se que 500 mil casos de infecção pelo OROV tenha ocorrido no Brasil nos últimos 48 anos (Nunes et al., 2005; Azevedo et al., 2007; Mourão et al., 2009; Vasconcelos, 2009; Lopes et al., 2014).

Todos os vírus citados já registraram o gênero *Aedes* como vetor mesmo que com importância secundária. Neste sentido, a disponibilidade de *Ae. aegypti* em ambientes urbanos traz a preocupação de que se torne vetor desses vírus naqueles ambientes. Apesar de não ter sido encontrado mosquitos dessa espécie naturalmente infectados com ROCV, OROV e MAYV, alguns testes laboratoriais mostraram a competência do vetor pelo menos para este último (Cambricoli, 2016). No entanto, a similaridade de alguns sintomas com infecção de vírus DENV, tendem a mascarar a ocorrência de diversas arboviroses em áreas urbanas (FIOCRUZ, 2016). A alta adaptabilidade do *Ae. aegypti* a diferentes tipos virais e a susceptibilidade da população, aliado a indisponibilidade de vacinas e ao controle vetorial ineficaz do *Ae. aegypti* alertam para a vigilância na transmissão desses vírus na área urbana, ainda que tenham ocorrido apenas em surtos locais e que, até então, estejam envolvidos outros mosquitos como vetores primários na transmissão.

1.1. Controle do *Aedes aegypti*

As arboviroses causadas por vírus transmitidos pelo *Ae. aegypti* não apresentam profilaxia disponíveis, ficando restritas apenas ao uso de analgésicos e antitérmicos para controle sintomático e cuidados pessoais contra a picada dos mosquitos (CDC, 2016a). Excetuando a febre amarela, que possui vacinação contra seu agente viral, dengue, chikungunya e Zika dependem do controle vetorial para redução do número de casos e potenciais surtos epidêmicos. O controle vetorial é um grande desafio nos dias atuais, sobretudo com os problemas de infraestrutura das cidades. Assim, o Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD) recomenda três principais metodologias de controle ao *Ae. aegypti*: os controles mecânico, biológico e químico (MS, 2009).

O controle mecânico é baseado em medidas de cuidados e eliminação de possíveis criadouros evitando-se a procriação do mosquito ou mesmo seu contato com o humano. Atualmente é a mais eficaz das metodologias disponíveis. Baseado neste método, a campanha “10 minutos contra o *Aedes*”, desenvolvida por pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz, tem sido utilizada em diversos Estados do país, atuando na conscientização da população no combate ao mosquito (<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/10minutos.html>).

O controle biológico visa a utilização de organismos patogênicos ou predatórios para o controle populacional do mosquito. Existem produtos no mercado bastante difundidos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*). Essas bactérias apresentam cristais nos seus esporos que são pró-toxinas, que ao serem clivadas por proteases digestivas das larvas ativam o componente inseticida. Em consequência, ocorre a diminuição do peristaltismo, da alimentação e a morte da larva. Outros organismos como fungos e vírus entomopatogênicos são também sugeridos (Braga e Valle, 2007b). Pode-se ainda estimular a procriação de outros insetos, cujas larvas são predadoras, como Odonatas e *Toxorhynchites sp.*, entre outros organismos que possam preda ou impedir o desenvolvimento do vetor (Moreira et al., 2012; Braga e Valle, 2007b).

O controle químico diz respeito ao uso de inseticidas, entre os quais aqueles de efeito direto sobre o sistema nervoso do inseto (neurotóxicos) e os

reguladores do desenvolvimento (IGRs, do inglês *insect growth regulators*). Embora mais tóxico e menos seletivo, os neurotóxicos são os mais utilizados devido a sua ação imediata, causando a rápida morte do inseto. Foram também os primeiros a serem utilizados em saúde pública, de forma que profissionais e população estão mais habituados com seu efeito. Já os IGRs são divididos em agonistas de ecdisona, análogos de hormônios juvenis e inibidores de síntese de quitina e atuam no processo de desenvolvimento, metamorfose e muda das larvas, culminando na inibição da emergência do adulto ou na formação de indivíduos deficientes, não apresentando portanto um resultado imediato (Braga e Valle, 2007b).

Entre os inseticidas neurotóxicos destacam-se as principais classes: organoclorados, piretroides, carbamatos, organofosforados e espinosinas. Estes compostos atuam no sistema nervoso central do inseto e alteram a propagação do impulso nervoso, levando-o à morte. Organoclorados e piretroides se ligam ao canal de sódio regulado por voltagem (Nav) dos axônios, mantendo-os abertos por mais tempo, o que gera impulsos nervosos repetitivos, seguido de paralisia e morte (conhecido como efeito *knockdown*) (Narahashi et al., 1998, 2007; Davies et al., 2007; Martins et al., 2009b; Martins e Valle, 2012). Os carbamatos e organofosforados atuam na sinapse nervosa, inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE), cuja função é hidrolisar a acetilcolina, cessando a propagação do impulso nervoso (Weill et al., 2002; Alout et al., 2012). Já as espinosinas atuam em receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) da membrana pós sináptica e causam hiperexcitação neuromuscular (Salgado et al., 1998; Kirst, 2010).

O uso de inseticidas neurotóxicos foi eficaz durante muito tempo na história de controle de vetores. No entanto, o aparecimento da resistência aos compostos disponíveis tem inviabilizado essa metodologia e estimulado pesquisas em relação a alternativas no controle vetorial (Hemingway e Ranson, 2000). Neste sentido, novas tecnologias têm sido desenvolvidas para o controle do vetor, baseadas na substituição ou na supressão da população de uma localidade, como o uso da bactéria *Wolbachia* ou utilização de mosquitos estéreis, respectivamente (Moreira et al., 2009; Araújo et al., 2015).

O sucesso de eliminação do *Ae. aegypti* no Brasil e outros países da América Latina no anos de 1950 e 1960, além de incentivo à eliminação de

criadouros para larvas, contou com maciço uso de inseticidas neurotóxicos, no cenário de epidemias de febre amarela urbana. Neste contexto, o principal composto utilizado entre as décadas de 1940 e 1960 foi o organoclorado DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) que apresentava custo relativamente baixo e elevado poder residual (Beaty e Marquardt, 1996; Braga e Valle, 2007a). No entanto, devido a esta alta persistência ambiental, havia tendência de acúmulo nos organismos, com efeito tóxico na cadeia trófica, fazendo com que os organoclorados tivessem utilização reduzida ou mesmo banida em muitos países. Além disso, resistência a estes compostos em mosquitos também foi detectada nas décadas seguintes. Atualmente, a OMS recomenda o uso de DDT para borrifação contra anofelinos, em situações específicas de países africanos com altos níveis de malária (Hougard et al., 2003; OMS, 2012).

Com a proibição do uso de DDT, os organofosforados e carbamatos foram os primeiros inseticidas alternativos para o controle de mosquitos vetores. Por serem biodegradáveis e possuírem pouca estabilidade no ambiente, há necessidade de aplicações periódicas do produto, sendo ainda relativamente tóxicos aos vertebrados. No Brasil, foram utilizados de 1967 a 1999 em campanhas nacionais para o controle de *Ae. aegypti* (Braga et al., 2004). Todavia, com a detecção de populações resistentes, produtos de outras classes foram recomendados. Preferencialmente, compostos com natureza química distinta entre produtos aplicados contra larvas e adultos, a fim de se diminuir a pressão seletiva para a mesma classe de inseticida. Vale destacar que o PNCD vem apenas indicando os compostos que são aprovados pela WHOPES (do inglês *World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme*). Naquele momento, que se estende até hoje, poucos compostos eram recomendados para uso em saúde pública, de forma que as alternativas de substituição eram (e ainda são) escassas (Tabelas 2 e 3).

A partir de 2000, o larvicida organofosforado temephos, até então amplamente utilizado no país, foi substituído pelo biolarvicida *Bti* (Lima et al., 2003; Braga e Valle, 2007b) e os adulticidas, também organofosforados, substituídos pelos piretroides (Braga et al., 2004). Contudo, após um ano de indicação para aplicação nacional destes adulticidas, já foi detectada alteração na susceptibilidade a piretroides (Da-Cunha et al., 2005; Martins et al. 2009a).

Diante do cenário de resistência aos inseticidas neurotóxicos clássicos, os *IGRs* representaram uma alternativa no manejo do controle de *Ae. aegypti*, tendo em vista que atuam em alvos distintos, neste caso no desenvolvimento do inseto. Além de alvo diferenciado, os *IGRs* surgiram como um novo grupo de inseticidas de ação mais específica e menor toxicidade para mamíferos (Fournet et al., 1993; Martins e Da Silva, 2004; OMS, 2016e). Ainda que não tenham sido registradas em *Ae. aegypti*, mutações no gene denominado *Met* (de *Methoprene-tolerant*), em *Drosophila melanogaster* foram relacionados a diminuição dos efeitos deletérios do inseticida análogo de hormônio juvenil methoprene (Wilson et al., 2006; Moreira et al., 2012). Um fator limitante, é que como os *IGRs* inibem a formação de adultos, a mortalidade é um efeito indireto e não instantâneo, como no caso dos neurotóxicos. Com isto, as pessoas tendem a não confiar em seu efeito letal ao ver que larvas e pupas ainda estão em desenvolvimento após aplicação do produto (Garcia, 2012).

Retornando-se às Tabelas 2 e 3, atualmente a WHOPES recomenda apenas 14 compostos larvicidas, sendo quatro *Bti*, quatro organofosforados, três *IGRs* e três spinosinas (Tabela 2) (WHOPES, 2016b). Para adultos, via uso espacial, a restrição é bem maior, com recomendação apenas de piretroides e um organofosforado, além de uma combinação de piretroide com um sinergista (Tabela 3) (WHOPES, 2016c). Deste modo, há poucas opções para utilização de inseticidas, decorrente da perda de eficácia destes diante dos insetos. O uso exacerbado de compostos químicos ao longo dos anos vem selecionando populações resistentes aos compostos utilizados, particularmente em *Ae. aegypti* (Braga e Valle, 2007b). A resistência aos inseticidas é atualmente um dos principais problemas de saúde pública, contribuindo para a emergência e reemergência de parasitas e arbovírus transmitidos por mosquitos.

Tabela 1. Compostos e formulações recomendados pela WHOPES para o controle de larvas de mosquitos

Larvicida e formulação	Classe
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , strain AM65-52 (3000 ITU/mg), WG	BL
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , strain AM65-52 (200 ITU/mg), GR	BL
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , strain AM65-52 + <i>B. sphaericus</i> strain ABTS-1743; 50 BspH ITU/mg), GR	BL
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> , strain 266/2 (≥ 1200 ITU/mg), SC	BL
Clorpirifos EC	OP
Fention EC	OP
Pirimifós-metil EC	OP
Temephos EC, GR	OP
Spinosad DT, EC, GR, SC	SP
Spinosad 83.3 monolayer DT	SP
Spinosad 25 extended release GR	SP
Diflubenzuron DT, GR, WP	BU
Novaluron EC	BU
Piriproxifen GR	JH

Atualizado em 18/03/16 (WHOPES, 2016b).

Tabela 2. Compostos e formulações recomendados pela WHOPES para o controle de mosquitos, via tratamento espacial

Adulticida e formulação	Classe	Domicílio	Peridomicílio
Deltametrina EW, UL	PI	X	X
Lambda-cialotrina EC	PI		X
d-d, transcifenotrina EC	PI	X	X
Malathion EW, UL	OP		X
Permetrina (25 cis:75 trans; 10.35% w/w) + s-bioaletrina (0.14 w/w) + butóxido de piperonila (9.85% w/w) EW		X	

Atualizado em 05/02/16 (WHOPES, 2016c))

Significado das classes de inseticidas: BL-larvicida bacteriano, BU-benzoilureas, JH-análogos de hormônio juvenil, OP-organofosforados, SP-espinosinas; PI-piretroides.

Significado das formulações: DT-tablete de aplicação direta, GR-grânulado, EC-concentrado emulsional, WG-grânulo dispersível em água, WP-pó molhável, EW-emulsão, UL-ultra-baixo volume (UBV).

1.3. Resistência a Inseticidas

A resistência a inseticidas é uma característica genética que confere mecanismos capazes de evitar ou impedir que os inseticidas atuem no processo de intoxicação, permitindo que alguns indivíduos tolerem doses de inseticidas letais à maioria da população suscetível da mesma espécie. Em um ambiente com pressão de seleção, os indivíduos com fenótipo vantajoso para a resistência são selecionados, aumentando a frequência desses alelos nas gerações seguintes (IRAC, 2016; OMS 2016f).

Os mecanismos que permitem a seleção para resistência a inseticidas podem ser resumidos em quatro categorias: (I) alterações comportamentais, em que é selecionada uma subpopulação de insetos com comportamento diferenciado que evitam o contato com o inseticida; (II) redução de penetração do inseticida, causada pelo espessamento da cutícula desses insetos. Geralmente seu efeito sozinho não está relacionado a altos níveis de resistência, mas pode atuar com outros mecanismos, intensificando seus efeitos (IRAC, 2017; Wood et al., 2010); (III) alteração metabólica envolvendo a participação de enzimas detoxificantes na metabolização do inseticida; e (IV) alterações no sítio-alvo dos inseticidas, interferindo na sensibilidade destes. Estes dois últimos mecanismos são os mais investigados em insetos vetores (Hemingway, 2000; Hemingway et al., 2004; Nkya et al., 2013).

Cabe ressaltar que esses mecanismos não são específicos e podem atuar sozinhos ou em conjunto com outros. Assim, dependendo do tipo de mecanismo selecionado para a resistência, a pressão exercida pelo uso de um determinado composto pode gerar resistência também a um inseticida distinto. A esse fenômeno dá-se o nome resistência cruzada. Um exemplo são as alterações na molécula do canal de sódio regulado por voltagem (Nav), que conferem resistência tanto a DDT como a piretroides. Já a seleção de mecanismos menos específicos, podem gerar resistência a diversas classes de inseticidas, configurando a chamada resistência múltipla. Devido à forte pressão de seleção de diferentes inseticidas, atualmente não é raro encontrar populações resistentes a mais de um composto com diferentes mecanismos selecionados (Valle et al., 2015).

Para se evitar a seleção de resistência, algumas medidas são recomendadas no âmbito do controle químico, tais como a combinação, a mistura, a rotação e o mosaico de inseticidas. Todas incluem a utilização de compostos com diferentes modos de ação. Na combinação, ocorre aplicação de diferentes inseticidas para as fases de desenvolvimento aquático e terrestre do inseto. Na mistura, sugere-se a produção de um produto formulado com mais de um inseticida, de modo que o inseto entre em contato com todos inseticidas da formulação simultaneamente. Na rotação, os diferentes inseticidas devem ser aplicados sequencial e alternadamente, a fim de que não haja tempo hábil para a seleção da resistência aos compostos usados. Já o mosaico consiste na aplicação de diferentes inseticidas em áreas geográficas vizinhas, uma técnica mais laboriosa e de difícil aplicabilidade. Em todos os casos, é importante que se conheça previamente o perfil de susceptibilidade/resistência das populações alvo a fim de se evitar a seleção de resistência cruzada ou múltipla aos inseticidas, o que inviabilizaria a metodologia (OMS, 2016f; OMS, 2016e). O controle de *Ae. aegypti* preconizado pelo PNCD no Brasil prevê a combinação e a rotação de inseticidas (MS - SVS, 2014).

1.3.1 Resistência Metabólica

A resistência metabólica consiste no aumento da capacidade de detoxificação do inseticida, impedindo que atinja seu alvo. Essa alteração deve-se ao maior número ou melhor eficiência das enzimas detoxificantes existentes no organismo do inseto. Diferentes processos estão envolvidos nesses eventos, como (A) duplicação gênica, (B) aumento na expressão do gene alvo, resultando estas duas em maior produção da enzima e, conseqüentemente, maior detoxificação dos xenobióticos e (C) mutações que levem ao aumento na capacidade de metabolização do inseticida (Figura 4) (Hemingway et al., 2004).

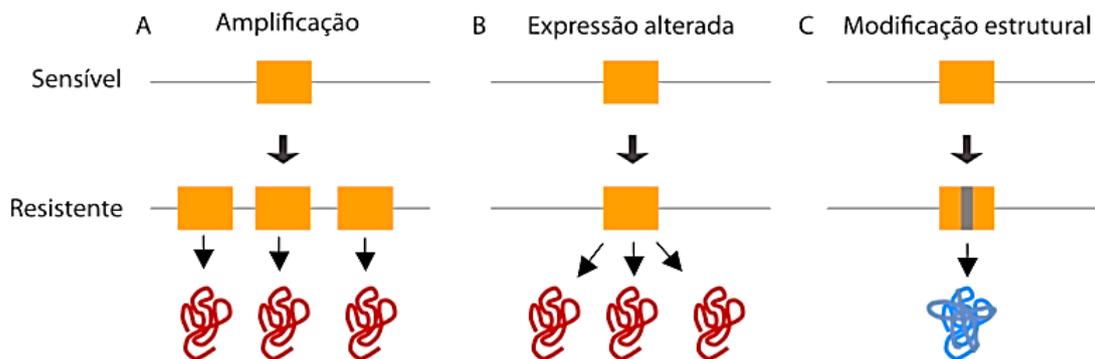


Figura 3. Processos possíveis para seleção de resistência metabólica. Quadrados laranjas representam os genes, novelos em vermelho as proteínas e em azul a proteína mutante. Em A e B mais enzimas são produzidas, já em C uma modificação estrutural torna a enzima mais eficiente na detoxificação. Fonte: Torres (2013).

As principais enzimas envolvidas com a resistência metabólica são as monooxigenases ou oxidases de função mista (OFM/ P450), carboxilesterases (CCE), glutionaS-transferase (GSTs) e transportadores ABC. As enzimas dessas famílias gênicas atuam em diferentes fases da detoxificação dos inseticidas, fazendo com que estes sejam metabolizados de forma mais eficiente, de forma que o organismo do inseto não sofra seus efeitos (Xu et al. 2005). Monooxigenases e carboxilesterases atuam diretamente sobre o composto, modificando estruturalmente o substrato (Fase I), por meio de oxidação e hidrólise dos alvos, respectivamente. Já as GSTs participam da fase de conjugação (Fase II) da glutiona reduzida de compostos lipofílicos, tornando-os mais solúveis, facilitando sua excreção. Por fim, os transportadores ABC promovem a excreção (Fase III) do xenobiótico para fora da célula através da energia da hidrólise de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) (Dermauw e Van Leeuwen, 2014). A hidrólise de ligações ésteres presentes nos compostos pelas carboxilesterases implicam seu maior papel na resistência a organofosforados e carbamatos. As esterases também agem sequestrando estes inseticidas mais rapidamente do que os metabolizam, impedindo, desse modo, que cheguem ao local de ação (Montella et al., 2012). Já as famílias P450 e GSTs são importantes na maioria das classes de inseticidas (Hemingway e Ranson, 2000; Hemingway et al., 2004; Xu et al., 2005). Essas enzimas possuem um sistema de classificação complexo e estão divididas em superfamílias gênicas de até centenas de genes, com maior diversidade das superfamílias das P450. A grande

variedade desses genes está associada muito provavelmente a eventos de duplicações ocorridas ao longo do processo evolutivo (Ranson, 2002; Montella et al., 2012; Nardini et al., 2012; Torres, 2013).

A avaliação da participação dessas enzimas na resistência pode ser feita por bioensaios de exposição ao inseticida com inibidores específicos de cada classe enzimática, através de ensaios bioquímicos que avaliam alteração na atividade enzimática e por ensaios moleculares que quantificam a expressão gênica de forma específica. Para o primeiro caso, junto ou previamente com o inseticida, expõe-se o inseto a um composto sinergista, como butóxido de piperonila (PBO), S,S,S-tributilfosforotioato (DEF) e dietil-maleato (DEM), inibidores específicos para P450, ESTs e GSTs, nesta ordem. Assim, quando há reversão parcial ou total da resistência pelo uso do sinergista, sugere-se participação de alterações metabólicas naquela população (OMS, 2016f). Os ensaios bioquímicos medem a atividade enzimática de extratos do inseto frente a substratos específicos ou ainda na presença de inibidores. No primeiro caso, compara-se a atividade total da enzima entre população teste e linhagem susceptível e, no segundo, a atividade na presença e na ausência de um inibidor (MS, 2006). Com isto, pode-se sugerir alteração na atividade enzimática (Rodríguez et al., 2007).

Perfis de atividade de P450, ESTs e GSTs foram identificadas por ensaios bioquímicos em populações de *Ae. aegypti* de diversas localidades do país resistentes a piretroides e ao larvicida organofosforado temephos (Macoris et al., 2003; Montella et al., 2007; Medeiros, 2011; Lima et al., 2011; Bellinato et al., 2016).

Tanto os ensaios biológicos com sinergistas como os bioquímicos podem indicar as classes enzimáticas envolvidas com a resistência, porém não indicam quais os genes, tampouco a natureza da alteração. Com o advento do sequenciamento de genomas e transcriptomas de diversos insetos vetores, tem sido possível desenvolver ferramentas moleculares para avaliar com precisão, e em larga escala, alteração na taxa de transcrição de genes específicos, além da indicação de duplicações gênicas. Por exemplo, para o *Anopheles gambiae* e *Ae. aegypti* são utilizados *microchips* para *microarrays* com virtualmente todos os genes conhecidos que podem ter relação com a resistência metabólica (*detox chips*) (Vontas et al., 2005; Marcombe et al., 2009; Strode et

al., 2012; Saavedra-Rodriguez et al., 2014). Amplificação por PCR quantitativo (qPCR) podem comprovar as alterações nos níveis de expressão e também indicar a ocorrência de duplicação gênica. Mais recentemente, métodos avançados de sequenciamento total de genomas (Strode et al., 2008; Faucon et al., 2015) ou de busca de polimorfismos (do inglês SNP, *single nucleotide polymorphism*) (Evans et al., 2015), permitem que se compare o genoma total de indivíduos susceptíveis e resistentes de uma mesma população, o que tem impulsionado o estudo da resistência a inseticidas para uma nova era em termos de complexidade e determinação de marcadores moleculares mais precisos.

Os ensaios moleculares têm revelado alta complexidade da resistência metabólica, uma vez que são observados diferentes perfis de expressão e participação de genes distintos em populações de uma mesma espécie. Em *Ae. aegypti* a determinação de genes marcadores para a resistência metabólica tende a ser ainda mais complexa. Por exemplo, esta espécie possui um número de genes detoxificantes (citocromo P450, GST e CCE) 36% maior que o *An. Gambiae* Giles, 1926 (Diptera, Culicidae). Esta expansão se deu principalmente nas famílias gênicas *CYP6* e *CYP9* (de citocromos P450), além de alfa-esterases (Strode et al. 2008; Faucon et al., 2015). Na prática, estudos tem demonstrado uma grande diversidade de genes diferencialmente superexpressos em populações de *Ae. aegypti*, principalmente em se tratando de resistência a piretroides, o que talvez inviabilize o apontamento de um ou poucos genes como verdadeiramente associado(s) à resistência a estes inseticidas (Saavedra-Rodriguez et al., 2012). Em todo caso, superexpressão de alguns genes é comumente citada em populações diferentes de *Ae. aegypti*, como o gene de carboxilesterase *CCEae3A* em populações resistentes a temephos da Ásia e da América Latina (Poupardin et al., 2014; Saavedra-Rodriguez et al., 2014) e alguns genes *CYP* na resistência a piretroides (David et al., 2013; Dusfour et al. 2015; Faucon et al., 2015).

1.3.2 Resistência sítio-alvo em organofosforados e piretroides

Acetilcolinesterase (AChE)

A enzima acetilcolinesterase (AChE), é alvo dos inseticidas organofosforados e carbamatos. Ela atua na fenda sináptica hidrolisando moléculas do neurotransmissor acetilcolina (Ach) em colina e ácido acético (AcOH) para a interrupção da transmissão do impulso nervoso (Figura 5). Inseticidas organofosforados e carbamatos se ligam no sítio ativo da AChE, impedindo que a reação de hidrólise da Ach ocorra. Em consequência há um acúmulo do neurotransmissor na fenda sináptica causando impulso nervoso contínuo, levando o inseto a paralisia e morte (Fukuto, 1990).

Insetos insensíveis a organofosforados e carbamatos por meio da resistência sítio-alvo, sofrem modificações em sua molécula alvo, impedindo-as de reconhecer a molécula do inseticida, passando então a não ter o efeito esperado. Mutações pontuais no gene da AChE (*ace-1*), conhecidas por *MACE* (de *modified acetylcholinesterase*), levam portanto à resistência a organofosforados e carbamatos. Estas mutações são conservadas entre diferentes espécies. Em *Culex* e *Anopheles sp.*, a substituição Gly/Ser no sítio 119, conhecida por *ace-1^R*, é a mais comum. Há ocorrência inclusive de duplicação neste gene, mantendo uma cópia selvagem e outra mutante no mesmo indivíduo, de forma a se reduzir o efeito da mutação no *fitness* do inseto em ambientes livres de inseticida (Labbé et al. 2007a,b). Duas outras mutações no gene *ace-1* foram encontradas no gênero *Culex*, a Phe/Val no sítio 290 e a Phe/Trp no sítio 331 (Alout et al., 2007; Weill et al., 2004; Patel, 2006).

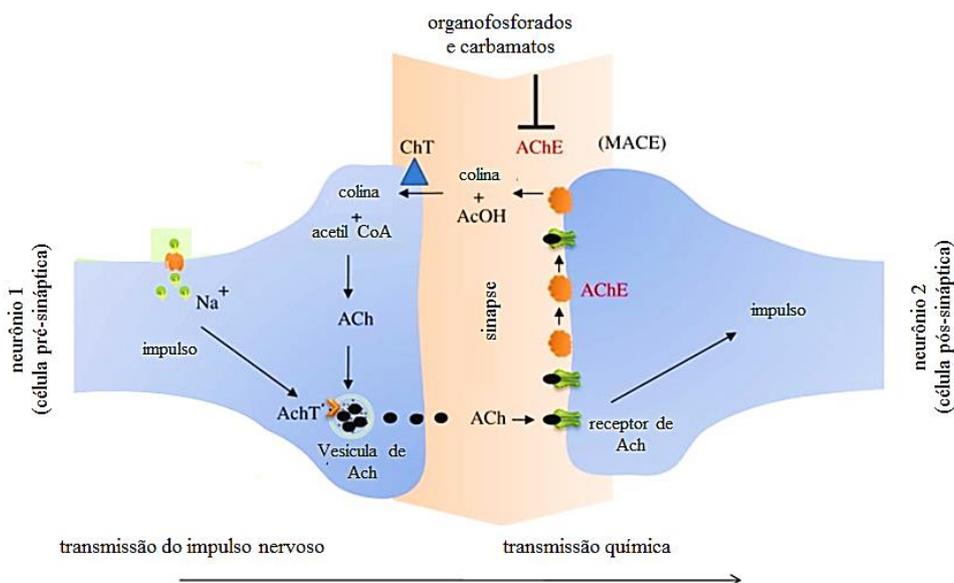


Figura 4. Atuação da enzima acetilcolinesterase (AChE) na transmissão do impulso nervoso. A sensibilidade reduzida da AChE a inseticidas organofosforados e carbamatos está representada na mutação genética (MACE). ACh, acetilcolina; AchT, transportador de Ach; AcOH, ácido acético; ChT, transportador de colina; MACE, de *modified acetylcholinesterase*; Figura adaptada de (David et al. 2013).

Apesar da sequência de aminoácidos do gene *ace-1* ser altamente conservada com outros mosquitos, chegando a 90 e 80% de identidade com *Culex spp.* e *Anopheles gambiae*, respectivamente, em *Ae. aegypti* nunca foi observada alguma mutação no gene *ace-1* associada à resistência (Mori et al. 2007). De acordo com Weill e colaboradores (Weill et al. 2004), alteração no sítio 119 do *ace-1* desta espécie seria improvável devido a uma diferença nos códons para gerar a mutação. A glicina 119 em *Ae. aegypti* é dada pelo códon GGA, enquanto em *Culex* e *Anopheles* é dada pelo GGC. Logo, seriam necessárias duas substituições independentes para a substituição Gly/Ser em *Ae. aegypti*, visto que a serina é dada pelo códon TCN ou AGY. O mesmo ocorre para a mutação Phe331Trp, em que o códon teria que mudar de TTT para TGG, mas não para Phe290Val onde é necessária a mudança de um só nucleotídeo (TTT-GTT) (Mori et al., 2007).

Desta forma, dado o alto perfil de resistência a organofosforados observado em populações de *Ae. aegypti*, principalmente ao larvicida temephos, é importante investigar outras regiões, bem como sobre a ocorrência de duplicação no gene *ace-1* deste vetor.

Canal de Sódio Regulado por Voltagem (Na_v)

Piretroides e DDT tem como alvo o canal de sódio regulado por voltagem (Na_v). O Na_v é uma proteína transmembranar responsável por gerar o potencial de ação, permitindo o influxo de íons sódio para o interior das células excitáveis, possibilitando assim a transmissão do impulso nervoso (Catterall 2000). Sua estrutura é composta por quatro domínios homólogos (I-IV), cada um destes constituído por seis subunidades em alfa-hélice (S1-S6) e um *loop* entre os segmentos S5 e S6. Os segmentos S1-S4 são sensíveis à voltagem da membrana e o segmento S5-S6 formam o poro, responsável pela seletividade do canal (Figura 6) (Catterall, 2000; Martins e Valle, 2012).

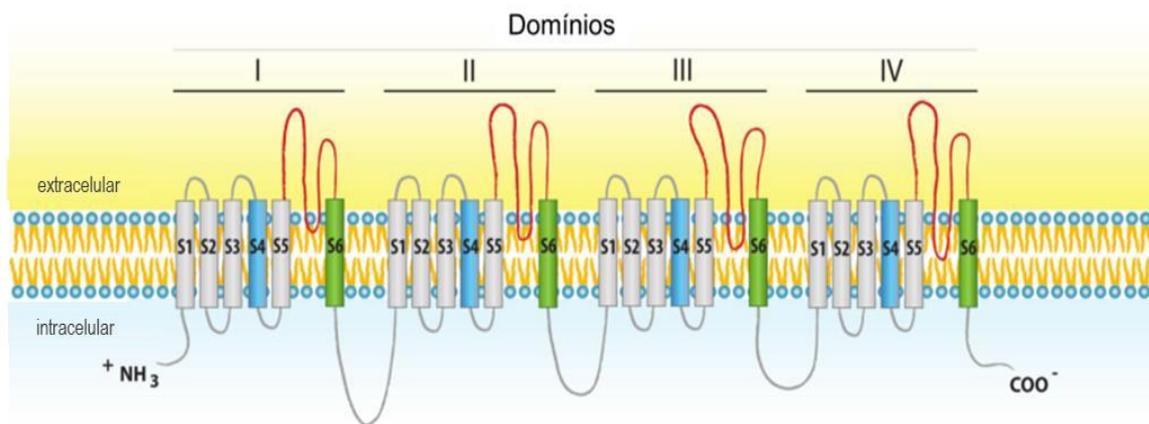


Figura 5. Estrutura do canal de sódio regulado por voltagem (Na_v). Estão representados os seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6) para cada domínio (I-IV). Em azul, segmentos S4, responsáveis pela percepção de alteração da voltagem e, em verde, segmento S6, responsáveis pela cinética do poro. Figura adaptada de (Martins e Valle, 2012)

A ativação do Na_v se dá a partir de um estímulo nervoso que induz a despolarização da membrana plasmática. Esta se torna permeável, permitindo a entrada de Na^+ na célula. Em pouco tempo é atingido o potencial de equilíbrio de Na^+ , inativando o canal. Neste estado, o poro do canal continua aberto, porém assume conformação que impede a entrada do íon na célula. A membrana é repolarizada rapidamente e o canal se fecha, voltando à sua conformação de repouso (Davies et al., 2007; Narahashi et al., 2007). Na presença de inseticidas DDT e piretroides, o canal mantém conformação aberta, permitindo o influxo contínuo de íons Na^+ , fazendo com que o estímulo

nervoso não cesse e, portanto, levando a contrações musculares repetitivas, seguidas de paralisia e morte, efeito conhecido por *Knockdown* (Narahashi et al., 1998; Martins e Valle, 2012).

Mutações no gene da molécula do canal de sódio (Na_V) modificam sua estrutura dificultando ou impedindo a interação inseticida-alvo. Assim, indivíduos resistentes são insensíveis ao piretroide ou apresentam paralisia momentânea, seguida por recuperação completa dos movimentos, fenótipo chamado de “*knockdown resistance*” (*kdr*) (Busvine, 1951). Essas mutações, portanto chamadas de mutações *kdr*, são de caráter recessivo e produzem um aumento significativo na resistência ao DDT e piretroides, primeiramente descrito em *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera, Muscidae). A alteração no sítio 1014 do Na_V (Leu 1014 Phe, segmento IIS6) ou esta em adição a outra no sítio 918 (Met918Thr, entre segmentos IIS4 e IIS5) representaram um aumento de cerca de 10 a 20 vezes e 500 vezes, respectivamente, na resistência a piretroides em *M. domestica* (Williamson et al., 1996; Davies et al., 2007).

Em diversas espécies de insetos, incluindo mosquitos dos gêneros *Culex* e *Anopheles*, a substituição homóloga Leu/Phe no códon 1014 também confere resistência ao efeito *Knockdown*. Em *Ae. aegypti*, contudo, mutação neste sítio é improvável, uma vez que deveriam ser selecionadas duas substituições nucleotídicas, simultaneamente, como acima apresentado para o gene *ace-1*. Contudo, mutações em pelo menos quatro sítios principais no Na_V deste mosquito tem sido apresentadas como importantes para resistência: 989, 1011, 1016 e 1534 (Martins e Valle, 2012). A substituição Ser989Pro é encontrada em populações asiáticas, geralmente ligada a Val1016Gly (Du et al., 2016). Na posição 1016, a Val1016Gly ocorre na Ásia, enquanto que outra substituição, Val 1016 Ile, é encontrada em populações das Américas e da África (Saavedra-Rodriguez et al., 2007; Martins et al., 2009a; Kawada et al., 2016). No sítio 1534, a Phe1534Cys já foi descrita em diversas localidades (Harris et al., 2010; Yanola et al., 2011; Linss et al., 2014; Dusfour et al., 2015; Vera-Maloof et al., 2015; Kawada et al., 2014; Wuliandari et al., 2015; Sayono et al., 2016b).

A mutação dupla 989Pro + 1016Gly é comum no sudeste asiático, conferindo resistência a piretroides de classes I e II (Plernsub et al. 2016a,

2016b) e a tripla 989Pro + 1016Gly + 1534Cys foi detectada em baixas frequências em Myanmar (Kawada et al., 2014) e Java (Sayono et al., 2016). Acredita-se que esta seja fruto de recombinação entre um cromossomo contendo a dupla mutação (989Pro + 1016Gly) e outro com a 1534Cys (Saavedra-Rodriguez et al., 2008) e possa ser de muita importância para a resistência a piretroides. As mutações pontuais isoladas podem apresentar nenhum (989Pro) ou baixo (1016Gly) impacto, ou ser específica para alguns tipos de piretroide (1534Cys) (Hu et al., 2011; Rinkevich et al., 2013; Hirata et al., 2014). Esta última confere resistência à permetrina e deltametrina, quando em combinação com outras mutações, podendo também estar relacionada à resistência a DDT (Harris et al., 2010; Kushwah et al., 2015). Ambas mutações 1016Ile e 1534Cys são observadas nas Américas (García et al., 2009; Harris et al., 2010; Linss et al., 2014; Marcombe et al., 2009; Martins et al., 2009a).

Linss e colaboradores (Linss et al., 2014) mostraram recentemente que no Brasil estão presentes os alelos susceptível (*NavS* – sem mutação) e dois *kdr* (*NavR1* - apenas com a 1534Cys e *NavR2* - com ambas 1016Ile + 1534Cys), com distribuição regionalizada pelo país. Na região Norte, por exemplo, há predominância do alelo *NavR1*, enquanto Centro-oeste e Sul apresentam alta frequência do *NavR2*. Embora ainda não tenha sido encontrado em populações brasileiras, um alelo contendo apenas a mutação 1016Ile (chamado *NavR3*) foi identificado em população caribenha de Guadalupe (Dusfour et al., 2015). O alelo *NavR2* (1016Ile + 1534Cys) confere maiores níveis de resistência que o *NavR1* (1016Val + 1534Cys) ao piretroide deltametrina (Souza, 2014).

Outras duas mutações foram observadas no sítio 1011 em populações da América Latina: Ile1011Val e Ile1011Met. A primeira não parece ter alguma influência com a resistência, ao passo que a segunda afetou a sensibilidade do Nav a permetrina, mas não a deltametrina (Hu et al., 2011; Rinkevich et al., 2013). Lima et al. (2011) encontraram correlação entre 1011Met em duas de três populações de *Ae. aegypti* do Ceará resistentes ao piretroide tipo II cipermetrina. Contudo, como alteração no sítio 1534 não foi investigada e, como sabemos que naquela época o alelo 1534Cys já estava disseminado pelo Nordeste brasileiro, é possível que essa resistência tenha relação com o sítio 1534 em si. Além disso, a mutação 1011Met foi encontrada apenas em

heterozigotos em 15 populações do Brasil o que, somado a outras evidências, sugeriram estar envolvida em uma duplicação do gene *Nav* de *Ae. aegypti* (Martins et al., 2013).

Duplicações gênicas e resistência

A duplicação gênica representa uma classe de mutação que resulta em polimorfismo no número de cópias dos genes (Assogba et al., 2016). No contexto de pressão exercida por inseticidas, duplicações gênicas são frequentemente associadas à compensação ao custo no *fitness* provocado pelos mecanismos selecionados para resistência. A ocorrência de dois alelos no mesmo cromossomo, um “resistente” e outro selvagem, pode permitir diferentes funções para cada cópia do gene no organismo do inseto. Assim, em um cenário mais simples o alelo resistente exerceria a função de tolerância a inseticidas, enquanto o susceptível continuaria com suas funções biológicas sem prejuízo à fisiologia normal do inseto (Labbé et al., 2007a).

Duplicações já foram relatadas no gene *ace-1* de *Anopheles gambiae* e *Culex pipiens*, com relação à mutação clássica Gly119Ser (alelo *ace-1^R*). Em *Culex*, indivíduos portadores do *ace-1^R* tinham atividade da enzima AChE reduzida em 60%. Portanto, o alelo mutante tendia a diminuir rapidamente de frequência em ambientes livres de organofosforado (Berticat et al., 2002; Kingdom et al., 2004). A mesma tendência foi observada em *An. gambiae* (Alout et al., 2008). A emergência de duplicação no gene *ace-1*, contendo ambos *ace-1⁺* e *ace-1^R*, garantiu resistência ao organofosforado, sem apresentar efeitos deletérios no *fitness* do inseto (Labbé et al., 2007a).

Amplificação gênica, ou seja múltiplas cópias de uma região do genoma também tem sido observada com relação a resistência a organofosforados. Ainda em espécies do complexo *Culex pipiens*, acredita-se que a amplificação de genes de CCE seja difundida em localidades que organofosforados tenham sido usados (Buss e Callaghan, 2004). Por exemplo, em uma população de *Cx. pipiens* de Ciprus os loci de carboxilesterase A5 e B5 foram co-amplificados em mais de 60 cópias, gerando uma razão de resistência acima de 90 a temefos e chlorpirifos (Poirié et al., 1992). Em um estudo recente,

envolvendo novos métodos de sequenciamento de alta vazão de genomas inteiros, revelou-se duplicação (ou amplificação) de pelo menos 41 genes em populações de *Ae. aegypti* da Tailândia e da Guiana Francesa, resistentes a deltametrina. A relação entre aumento do número de cópias com maiores níveis de expressão destes genes foi confirmada por qPCR (Faucon et al., 2015).

Evidências para duplicação no gene *Nav* foram também observadas em população de *Cx. quinquefasciatus* (Xu et al., 2011) e em diversas populações brasileiras de *Ae. aegypti* (Martins et al., 2013). Neste último caso, foi observado ainda que a mutação Ile1011Met está associada à duplicação do *Nav*, contendo pelo menos uma cópia selvagem (Ile1011) e outra mutante (1011Met). Por este motivo, todos os indivíduos genotipados para o sítio 1011 eram “heterozigotos”. Adicionalmente, em uma linhagem de laboratório pressionada com o piretroide deltametrina, a partir de uma população de campo sem as mutações *kdr* 1016Ile e 1534Cys, foram encontradas dez cópias do *Nav*. Contudo, a relação entre duplicação do *Nav*, em *Culex* e *Aedes*, com a resistência a piretroides ainda não está bem definida (Martins et al., 2013).

1.4. Municípios avaliados

Nesta dissertação, avaliamos populações de *Ae. aegypti* de dois municípios do Estado do Amapá (BR): Macapá, capital do Estado e Oiapoque, fronteira com Guiana Francesa. As duas cidades são separadas por 590 km (Google Earth, 2017), em contrapartida somente 196 km distanciam Oiapoque de Cayenne, capital da Guiana Francesa.

Segundo o censo 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Macapá é a cidade mais populosa do Amapá, com densidade demográfica de 62,14 hab/ km² e Oiapoque com apenas 0,91 hab/ km². Em 2016, a população estimada foi de 465.495 e 24.892 habitantes, respectivamente. Oiapoque é um dos municípios menos populosos comparado a outros municípios brasileiros (IBGE, 2016). Macapá e Oiapoque diferem também quanto ao Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), que avalia o desenvolvimento com base na renda, educação e saúde da população.

Macapá ocupa o 940º lugar no ranking geral dos municípios brasileiros com IDH de 0,733 e Oiapoque o 2.946º lugar, com IDH de 0,658 em uma escala que vai de 0 a 1 (Atlas Brasil, 2013).

Em relação ao saneamento básico, Macapá e Oiapoque possuem ambas apenas cerca de 25 % de domicílios com esgotamento sanitário adequado, destes somente 8,8 % e 0,2 % possuem urbanização adequada, na capital e em Oiapoque, respectivamente (IBGE, 2017). Esses dados indicam uma precariedade no saneamento básico dessas regiões, propiciando maior proliferação de pragas urbanas, como é o caso do *Aedes*.

Outro fator que corrobora com o perfil de resistência de vetores é a pouca disponibilidade de compostos para o controle químico (WHOPES, 2016b,c), culminando no uso contínuo de inseticidas da mesma classe pelos municípios. Dados de distribuição de inseticidas pelo Ministério da Saúde à Secretaria de Estado e Saúde do Amapá no período de 2003 a 2014 mostram a distribuição ininterrupta de piretroides neste período. No caso de organofosforados, ocorreu a distribuição de temephos até 2012, com substituição nos anos de 2004 e 2014 por *Bti* e IGR, respectivamente, para o controle larvar. Para adultos, a distribuição de malathion só ocorreu em 2014, concomitante a distribuição de inseticidas piretroides (Ministério da Saúde, dados não publicados).

Apesar da distribuição de inseticidas pelo Ministério da Saúde às Secretarias de Saúde dos municípios não representar necessariamente a troca imediata do inseticida em uso (por questões logísticas e burocráticas), essas informações podem ajudar a compreender o perfil de resistência das populações de *Ae. aegypti* e no estabelecimento de melhores estratégias de controle do vetor.

1.4.1 Arboviroses no Estado do Amapá

No ano de 2016, o estado do Amapá notificou 3.515, 1.168 e 939 casos de dengue, chikungunya e Zika, respectivamente. Desses, foram confirmados 1.684, 182 e 296 casos, na mesma ordem (Tabela 1) (Pinto e Chaves, 2017). Neste estudo, avaliamos populações de *Ae. aegypti* de Oiapoque e Macapá, respectivamente a porta de entrada do vírus CHIKV do Caribe para o país e a

capital do Estado do Amapá, principal ponto de partida de mercadorias e passageiros para outros estados. Estes municípios obtiveram maiores notificações e subseqüentes confirmações de infecções. Somados, representam 78,7% do total de casos confirmados para as três arboviroses no Estado. A capital Macapá teve maior importância na aquisição dos casos, com confirmação em 51,8% para dengue, 64,8% chikungunya e 90,2% para Zika (Figura 3). No ano de 2017 até a semana epidemiológica sete, haviam sido notificados respectivamente 140, oito e dois casos de dengue, chikungunya e Zika (MS, 2017).

Tabela 3. Casos de dengue, chikungunya e Zika no estado do Amapá. Ano 2016.

Municípios	Casos Notificados			Casos Confirmados		
	Dengue	Chikungunya	Zika	Dengue	Chikungunya	Zika
Amapá	2			0		
Calçoene	92	4	1	76	0	0
Cutias	0			0		
F. Gomes	148	14		122	1	
Itaubal	0		1	0		0
Lar. do Jari	33	4	2	1	3	0
Macapá	2321	957	843	873	118	267
Mazagão	24	2	1	10	0	0
Oiapoque	395	40	29	382	35	26
P. B. Amapari	120	20	1	103	8	0
Prto Grande	1	0	2	1	2	0
Pracuúba	0			0		
Santana	167	76	51	62	10	3
S. do Navio	83	50	7	18	5	0
Tzinho	129	1	1	35	0	0
Vitria do Jari	0			1		
Estado	3515	1168	939	1684	182	296

Monitoramento semanal dos casos de dengue, chikungunya e Zika até a semana epidemiológica 03/2017 (01 a 21/01/2017). Os municípios de interesse neste estudo estão destacados. Fonte: Informe Epidemiológico da Coordenadoria de Vigilância em Saúde do Amapá n°5/2017.

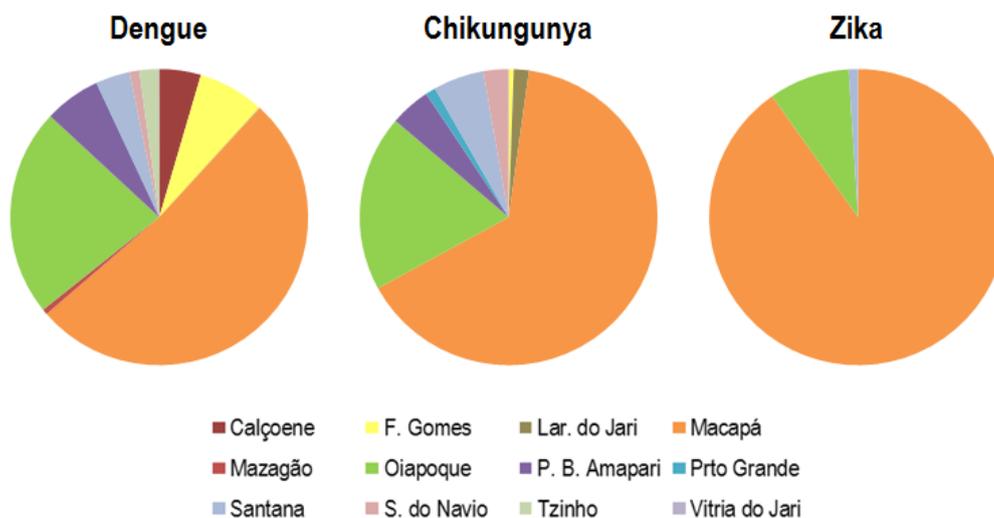


Figura 6. Casos confirmados de dengue, chikungunya e Zika no Amapá.

Em suma, o monitoramento do perfil de populações quanto à resistência tem importância imediata para avaliação da efetividade do controle químico, mas é também fundamental para se evitar pressão de seleção exacerbada, inviabilizando este tipo de controle no futuro. Além disso, é fundamental conhecer quais mecanismos, tenham sido selecionados, a fim de se definir melhores estratégias de manejo da resistência. Neste sentido, foram realizados ensaios biológicos de exposição a inseticidas para determinar o perfil de resistência a piretroides e organofosforados de duas populações de *Ae. aegypti* do Estado do Amapá (AP, Brasil), Macapá e Oiapoque. Adicionalmente, investigou-se alterações na expressão de enzimas detoxificantes envolvidas com a resistência e/ou mutações nas moléculas alvo dos inseticidas. Além do panorama de resistência a inseticidas, os resultados obtidos permitirão maior entendimento sobre a dinâmica populacional de *Ae. aegypti* entre os municípios avaliados e Guiana Francesa.

1.5. Hipótese

O município de Oiapoque/ AP foi uma das portas de entrada do vírus chikungunya no Brasil. O controle do vetor *Ae. aegypti* naquela região sofre influência de programas de controle brasileiros e também da Guiana Francesa, com quem faz fronteira. Nossa proposta inicial, portanto, se concentrou em avaliar os níveis de susceptibilidade/ resistência aos adjuvantes empregados contra o vetor na região e seus principais mecanismos selecionados. Concomitantemente, foi também avaliada uma amostragem de *Ae. aegypti* de Macapá, a capital do estado, distante 590 Km de Oiapoque. Neste caso, nossa hipótese a ser testada é que a densa floresta e o limitado acesso entre as duas cidades deve limitar o fluxo gênico entre as populações do mosquito, possibilitando, portanto a emergência de distintos perfis e mecanismos de resistência entre as populações de *Ae. aegypti* de Macapá e Oiapoque.

1.6. Justificativa

A resistência a inseticidas é um desafio para o controle de mosquitos vetores. No Brasil, há registro de populações resistentes de *Ae. aegypti* em diversas localidades do país ao adjuvante mais comumente utilizado, o piretroide deltametrina, mas não ao seu alternativo, o organofosforado malathion. Dada a importância estratégica e epidemiológica da região de fronteira aqui estudada, é importante conhecer o perfil de susceptibilidade/ resistência do vetor naquelas localidades. A fim de se monitorar e sugerir ações de combate ao vetor mais eficientes, baseadas no controle químico, faz-se também necessário investigar os mecanismos selecionados para resistência. Neste projeto, foram determinados os perfis de resistência a deltametrina, temephos e malathion em populações de *Ae. aegypti* de Macapá e Oiapoque/ AP. Quanto aos mecanismos selecionados, foram identificadas mutações *kdr*, relacionadas a alterações no alvo dos piretroides, assim como análise do número de cópias no gene *Na_v* e possíveis alterações na expressão de genes relacionados com a resistência metabólica a ambos piretroides e organofosforados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o perfil de resistência de *Ae. aegypti* aos inseticidas utilizados no controle do vetor dos vírus dengue, chikungunya e Zika na região de fronteira entre Brasil e Guiana Francesa.

2.2. Objetivos Específicos

a) Estabelecimento de colônias em laboratório de *Ae. aegypti* provenientes do Amapá

- *a partir de coleta de ovos de Ae. aegypti nas localidades de Oiapoque e Macapá/ AP*

b) Determinação do perfil de resistência aos inseticidas

- *realização de bioensaio de susceptibilidade com piretroide deltametrina e organofosforados temephos e malathion.*

c) Investigação de mecanismos de resistência aos inseticidas

- *genotipagem dos sítios 1011, 1016 e 1534 do gene Nav*
- *clonagem e sequenciamento de regiões do gene Nav*
- *avaliação de variação no número de cópias do gene Nav*
- *análise da expressão de alguns dos principais genes envolvidos com a resistência metabólica*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta de ovos e estabelecimento de colônias de *Ae. aegypti* no laboratório

As análises foram feitas com mosquitos *Ae. aegypti* provenientes de duas populações do estado do Amapá, região Norte do Brasil: Macapá, capital do estado e Oiapoque, município de fronteira com Guiana Francesa (Figura 7).

Foram realizadas coletas com ovitrampas, conforme Lima et al. (2003), abrangendo a zona residencial nas duas cidades, com pelo menos uma armadilha por quarteirão. As capturas foram organizadas pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE) e pelo Laboratório de Entomologia do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA), com participação de agentes municipais de endemias de Oiapoque e de Macapá, entre dezembro de 2014 e janeiro de 2015. As paletas com os ovos foram trazidas para o Laficave, para geração de colônias, que atualmente se encontram na geração F6. Seguindo o Procedimento Operacional Padrão criado pelo laboratório (POP-LAFICAVE-BIO-002), os ovos foram estimulados a eclodir em água desclorada e, após 24h, as larvas foram transferidas para bacias plásticas, distribuídas em cerca de 350 a 500 larvas/bacia contendo 1 L de água desclorada e cerca de 1 g de ração de gato triturada (Purina, Friskies®). As pupas foram retiradas das bacias e colocadas em copinhos plásticos descartáveis (50 mL) e alocadas em gaiolas cilíndricas de papelão (17 cm de diâmetro X 17 cm de altura), contendo Erlenmeyer com solução de sacarose a 10%, que foi fornecida *ad libitum* aos adultos como fonte de alimentação. Para criação de gerações subsequentes, fêmeas foram alimentadas com sangue de cobaio (CEUA-Fiocruz, licença LW-20/14) e após três dias eram colocados copos de postura nas gaiolas para que pudessem ovipor. Esse procedimento foi feito para obtenção de 3-4 posturas.

A linhagem Rockefeller, controle de susceptibilidade e vigor (Kuno, 2010) é continuamente mantida no laboratório e foi usada como controle interno dos ensaios de susceptibilidade, nas análises de variação do número de cópias gênicas do gene *Nav* e de expressão gênica. Outra linhagem

mantida no laboratório é a chamada Bora-Bora, originária Ásia, aqui utilizada nos ensaios moleculares, como base de comparação de uma linhagem homogênea.



Figura 7. Localização das populações em estudo. Mapa da América do Sul, destacando a Guiana Francesa, o Brasil e os municípios de coleta de ovos de *Aedes aegypti*, no Estado do Amapá.

3.2. Avaliação da resistência a inseticidas

3.2.1. Bioensaios com larvas

Larvas de terceiro instar (L3) foram avaliadas quanto ao perfil de susceptibilidade a inseticidas piretroide e organofosforado por meio de dois testes quantitativos diferenciados. Para o piretroide deltametrina foi realizado o 'Bioensaio Simplificado de *Knockdown*' de acordo com Kawada et al. (2009) que avalia o efeito de *knockdown* para duas doses do inseticida em um curto período de tempo. Diferentemente de piretroides, organofosforados possuem longo tempo de ação, portanto esse tipo de ensaio não se aplicaria a essa classe de inseticidas. Assim, para o organofosforado temephos (*PESTANAL*[®],

Sigma-Aldrich), foi realizado o teste dose-resposta, seguindo recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS, 1981) com concentrações variando de 1,5 a 90 µg/L. Para cada concentração foram utilizadas quatro réplicas em copos plásticos de 200 mL com 100 mL de solução com inseticida, as quais eram adicionadas 20 larvas/ réplica. Nos controles negativos, o inseticida foi substituído pela quantidade do solvente etanol contida na maior concentração de temephos utilizada (Figura 8). A mortalidade foi verificada 24h após a exposição ao inseticida. Os cálculos das concentrações letais (CL) foram realizados por meio de análise Probit, seguida de regressão linear, com auxílio do software Statgraphics Centurion V.16.103. A partir destes, foram obtidas razões de resistência (RRs), pela razão dos valores da população teste pelos de Rockefeller, ou ainda de uma população pela outra.

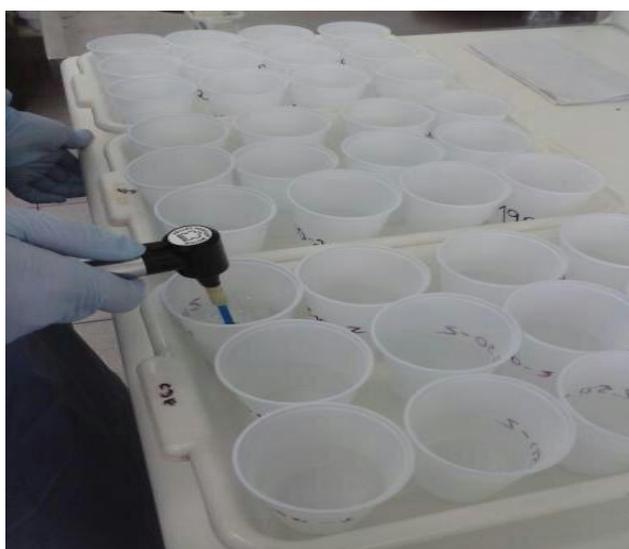


Figura 8. Bioensaio de susceptibilidade ao OP temephos em larvas de *Aedes aegypti*. A figura exemplifica a realização de quatro réplicas para cada concentração e o inseticida sendo homogeneizado com um triturador manual antes da exposição das larvas. Foto de Monique Costa.

Para o piretroide deltametrina, foi realizado o 'Bioensaio Simplificado de *Knockdown*' de acordo com (Kawada et al., 2009). Foram avaliadas as concentrações de 0,1 e 0,4 ppm, com um total de 20 larvas individualmente avaliadas para cada concentração, por teste. Cada teste foi realizado em três dias consecutivos. As larvas foram individualmente colocadas em um copo de 50 mL, contendo 20 mL de solução de deltametrina. Nos copos do controle negativo foram adicionados quantidade do solvente etanol contida na maior

concentração de deltametrina utilizada (Figura 9). A mortalidade foi contabilizada a cada 5 minutos até o ensaio completar 30 minutos de exposição à deltametrina, de forma que o ‘tempo mediano de *Knockdown*’ (KT₅₀) foi estabelecido pelo tempo em que 50% das larvas sofreram *knockdown*. O produto do KT₅₀ das duas concentrações gerou então o ‘Índice de Susceptibilidade’ (IS), dividido em seis categorias: (1) <5 min, (2) 5-10 min, (3) 10-15 min, (4) 15-20 min, (5) 20-30 min e (6) >30min. Com isto os IS podiam variar de 1 a 36, tendo as populações mais sensíveis os menores IS.

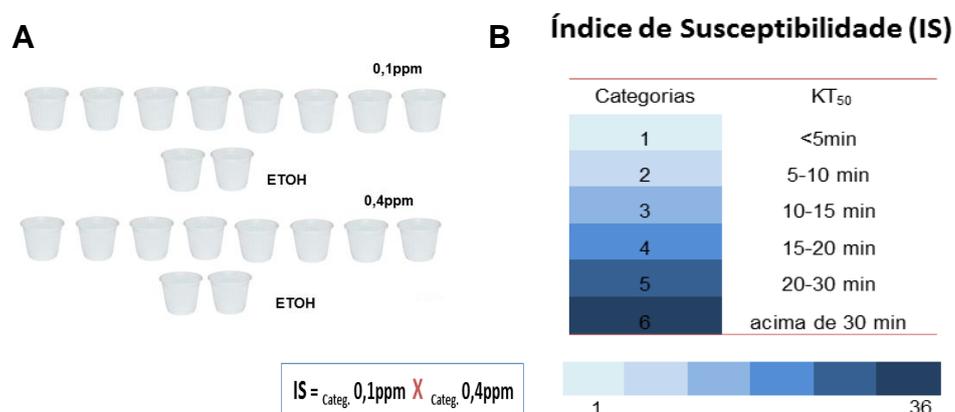


Figura 9. Esquema de Bioensaio Simplificado de *Knockdown* para larvas. (A) Montagem do bioensaio; (B) Obtenção do índice de susceptibilidade. Esquema de Monique Costa.

3.2.2. Bioensaios com Mosquitos Adultos

O perfil de susceptibilidade das populações foi avaliado para os compostos piretroide deltametrina (*Sigma-Aldrich*) e organofosforado malathion (*De Sangosse Agroquímica LTDA*). Fêmeas não alimentadas com sangue, de 3 a 5 dias pós-emergência, foram submetidas a dois tipos de bioensaio quantitativo. No primeiro, do tipo dose-resposta, as CLs dos inseticidas foram determinadas a partir de um gradiente de concentrações, que variou de 0,005 a 3,2 g/L para piretroide e de 0,6 a 25 g/L para organofosforado (dependendo da população), ao qual as fêmeas foram expostas por 1h e a mortalidade registrada 24 h depois.

No outro teste, do tipo tempo de letalidade (L_T) ou de *knockdown* (K_d), as fêmeas foram submetidas a uma dose única para cada um daqueles

inseticidas e o tempo de mortalidade ou de *knockdown*, foi verificado a cada 10 minutos para as populações e 2 minutos para Rockefeller, respectivamente para 7 g/L do organofosforado malathion e 1,2 g/L do piretroide deltametrina. Ambos os testes foram feitos com os kits “tipo-OMS” (OMS, 1998; 2016f), sendo a impregnação do papel com inseticida realizada no próprio laboratório como em Brito et al. (2013) (Figura 10B). Cada ensaio utilizou cerca de 20 fêmeas por tubo com o papel impregnado, idealmente em triplicada, sendo todo o teste repetido por mais duas vezes no mínimo (Figura 10C). Foram utilizados preferencialmente indivíduos da geração F1. A linhagem Rockefeller foi empregada como controle interno dos ensaios em todas as ocasiões em que as populações foram testadas. Em paralelo, uma triplicada impregnada apenas com o solvente carreador (óleo de silicone Dow Corning® 556) foi utilizada como controle negativo dos kits tipo-OMS. Os cálculos de CL e L_T ou Kd foram realizados por meio de análise Probit, seguida de regressão linear, com auxílio do software Statgraphics Centurion V. 16.103. A partir destes, foram obtidas razões de resistência (RRs), pela razão entre os valores da população e os de Rockefeller, ou ainda de uma população por outra.



Figura 10. Metodologia adaptada da OMS para avaliação da resistência em adultos de *Aedes aegypti*. (A) Kit “tipo-OMS”. Detalhes para as partes do *kit*, o separador móvel entre as câmaras e o *kit* acoplado. (B) Procedimento de impregnação de papéis. (C) Realização de bioensaio do tipo dose-resposta. Fotografias de Laficave.

3.3. Investigação dos Mecanismos de Resistência

3.3.1. Genotipagem de mutações *Knockdown resistance* (*Kdr*)

Foram genotipados três sítios do canal de sódio regulado por voltagem (Nav) que apresentam alguma relação com a resistência a piretroides: as variações Ile1011Met e Val1016Ile no seguimento IIS6 e Phe1534Cys no IIIS6. Ao todo 35 indivíduos de cada população foram individualmente avaliados para os três sítios, a partir de PCR alelo-específica (sítio 1011) e PCR em tempo real/ TaqMan (1016 e 1534) em reações independentes para cada SNP. O DNA genômico foi obtido por extração individual de fêmeas da F0 de cada população, com Kit ZR Tissue & Insect DNA MiniPrep™ (*Zymo Research*), seguindo recomendações do fabricante. A concentração do DNA foi medida em Nanodrop e alíquotas de 5 ng/μL foram diluídas em TE (Tris-EDTA).

Para o sítio 1011, a reação de PCR alelo-específica (AS-PCR) continha 0,24 μM do primer comum a ambos os alelos (1011_for) e 0,12 μM de cada um dos *primers* específicos (1011_Ile e 1011_Met – Tabela 4), além de 1x de SYBR® Green Master Mix (*ThermoFischer*), 20 ng de DNA e água suficiente para um volume final de 12,5 μL. As condições de desnaturação, anelamento e extensão foram de 94°C/30", 57°C/1' e 72°C/45", submetidas a 35 ciclos com acréscimo de análise de curva de dissociação ao fim da reação.

Como mencionado, esta técnica de AS-PCR utilizou três *primers* em uma mesma reação: dois *primers reverse* específicos, um para o alelo selvagem (1011_Ile) e outro para o alelo mutante (1011_Met), além de um *forward* comum a ambos. Os *primers* específicos possuem a mesma orientação (reversos), no entanto diferem em 20 nucleotídeos na sua cauda GC adicionada à extremidade 5', o que permite picos diferenciados na curva de dissociação (Figura 11A). Aqui, o *primer* 1011_Met tem maior cauda GC e, portanto, o produto da PCR do alelo mutante apresenta maior temperatura de *melting* (T_m) que o selvagem. O indivíduo heterozigoto apresenta dois picos em diferentes T_ms (Figura 11B). Além de diferença nos tamanhos dos *primers*, uma transversão foi adicionada no terceiro nucleotídeo à extremidade 3', aumentando a especificidade da ligação (Yanola et al., 2011; Liu et al., 2012).

Na curva de dissociação os picos em torno de 75 e 82°C representam os alelos 1011 Ile e 1011 Met, respectivamente (Figura 11B).

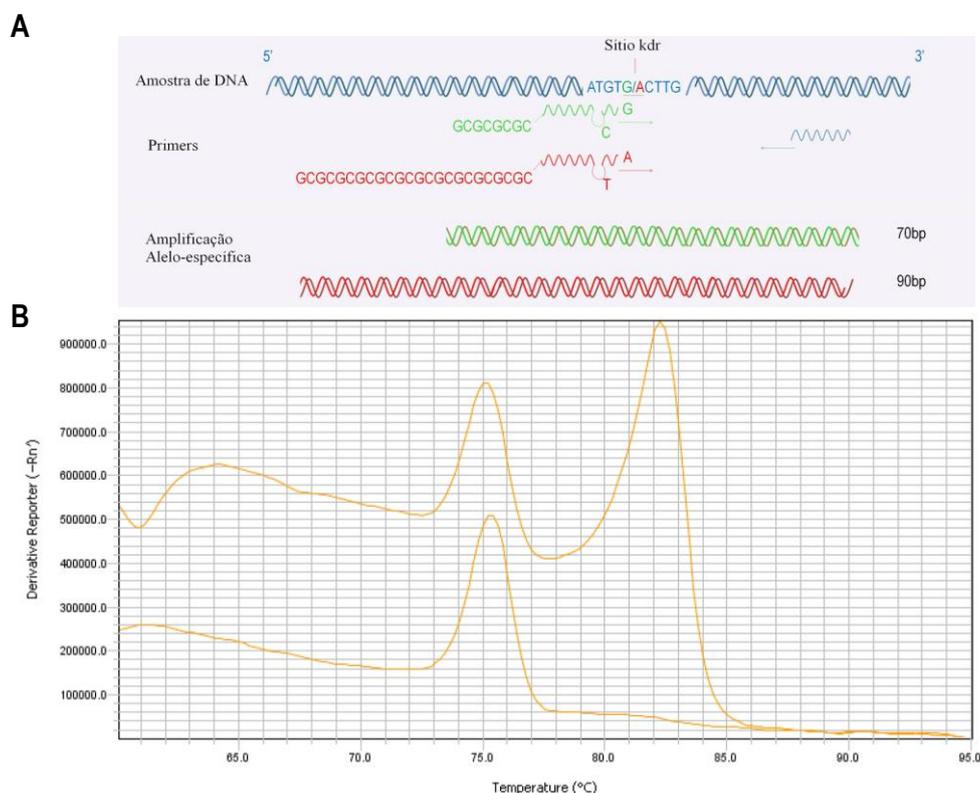


Figura 11. Esquema de AS-PCR (A) e Curva de dissociação para o sítio 1011 do Nav (B). Representação da PCR alelo-específica, evidenciando os *primers* específicos e a diferença no tamanho dos produtos gerados (A). Pico único em torno de 75°C evidencia um indivíduo homocigoto 1011Ile/Ile e o pico duplo em 75 e 82°C indica um indivíduo heterocigoto 1011Ile/Met (B). Figura (A) adaptada de Martins e Valle, 2012(Martins, A.J. Valle 2012)) e figura (B) deste trabalho.

Para os sítios 1016 e 1534 foi utilizada a estratégia de amplificação por PCR de região ao redor do sítio polimórfico de interesse, seguida de hibridização a sondas específicas marcadas com fluoróforos distintos para cada um dos alelos (*Custom TaqMan SNP Assay, ThermoFischer*), conforme (Linss et al., 2014). Para o sítio 1016, as reações continham 1x de TaqMan Genotyping Master Mix (*ThermoFisher*), 1x do reagente *TaqMan SNP assay Val1016Ile* (contendo *primers* e sondas – Tabela 4), 1 µL de DNA e água suficiente para completar 10 µL, submetida a 45 ciclos de 95°C/15”, 60°C/1’ e 60°C/30”. Essas condições são as mesmas para o sítio 1534, exceto pelo *TaqMan SNP assay* que neste caso foi o *Phe1534Cys*, em concentração de 0,5X. Foi utilizado o termociclador em tempo real QuantStudio™ 6 Flex

System (*ThermoFischer*) em todas as análises. As sequências dos *primers* e sondas utilizados se encontram na Tabela 4. A Figura 12 exemplifica o formato de genotipagem por este método.

Considerando-se os sítios 1016 e 1534 constituintes de um mesmo *locus*, três alelos podem ser observados: *NavS* - sem mutação *kdr* (1016 Val⁺ + 1534 Phe⁺), *NavR1* - mutante para o sítio 1534 (1016 Val⁺ + 1534 Cys^{*kdr*}) e *NavR2* - mutante para os dois sítios (1016 Ile^{*kdr*} + 1534 Cys^{*kdr*}), conforme (Linss et al. 2014). Dados de nosso grupo, ainda não publicados, mostram que a mutação *kdr* tem um fenótipo recessivo, de forma que os genótipos com potencial para resistência são R1R2, R1R1 e R2R2. Além disso, o alelo *kdr* R2 tem maior potencial para resistência que o R1. Apesar de estar no mesmo gene, e em total desequilíbrio de ligação com os demais sítios, o sítio 1011 foi considerado separadamente uma vez que sabe-se que o alelo *1011 Met* está envolvido em uma duplicação gênica, o que dificultaria a resolução da fase real do haplótipo, considerando os três sítios.

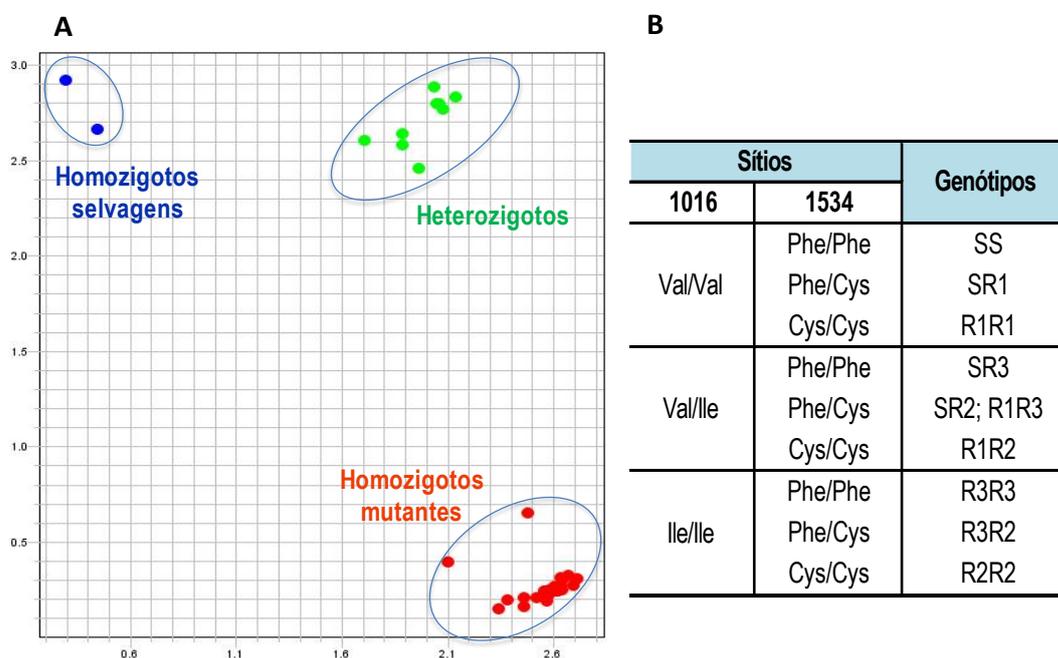


Figura 12. Exemplo de um perfil de genotipagem pelo ensaio TaqMan. (A) Os eixos representam a intensidade de fluorescência para as sondas de seus respectivos alelos e cada ponto um indivíduo. As cores discriminam os genótipos em homozigotos e heterozigotos. Para cada sítio é realizado um ensaio independente, e forma que, para configuração dos genótipos **(B)** considera-se o resultado de ambos os sítios como único *locus*.

3.3.2. Clonagem e Sequenciamento do segmento IIS6 do *AaNav*

Para comprovação do genótipo de alguns indivíduos, foram realizados amplificação e sequenciamento de seus segmentos IIS6 e IIS6 do gene *Nav*. Para o caso do IIS6 foi necessário clonar o produto da PCR, uma vez que o íntron entre os exons 20 e 21 neste segmento é altamente polimórfico, dificultando a resolução da sequência em indivíduos heterozigotos. Já os produtos do IIS6 foram submetidos diretamente para a reação de sequenciamento.

Foram realizados amplificação, clonagem e sequenciamento de parte do IIS6 do *Nav* de quatro amostras de Macapá e Oiapoque. Para Macapá foram escolhidos indivíduos com diferentes genótipos para as mutações nos sítios 1016 e 1534 (um SS, dois SR1 e um R1R1), tendo estes Ile/Met no sítio 1011, exceto o indivíduo R1R1, que é 1011 Ile/Ile. Para Oiapoque foram escolhidos os indivíduos de genótipos SR2 (que poderiam também ser R1R3) (ver resultados). As PCRs para a região IIS6 foram realizadas com o *kit* contendo polimerase de alta fidelidade FideLiTaq Master Mix (*Affymetrix*) a 1x, 1 µM de cada primer (5'para3 e 3'para3, vide Tabela 4), 20 ng de DNA genômico e água suficiente para completar 40 µL de reação. As condições de amplificação foram de 35 ciclos de 94°C/30", 60°C/30" e 72°C/1', para desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente. Os produtos foram purificados com *kit* de *beads* magnéticas (Agencourt Ampure® XP, Beckman Coulter), seguindo recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram submetidos à ligação em plasmídeo com o Kit CloneJET PCR Cloning (*ThermoFisher*), conforme orientações do fabricante. A reação de transformação foi realizada em bactérias *Escherichia coli* DH5- α , mantidas e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular de Insetos/ IOC/ Fiocruz. Após plaqueamento em meio seletivo LB (Luria-Bertani) ágar com ampicilina (100 mg/µL), pelo menos oito colônias de cada indivíduo foram aleatoriamente selecionadas para purificação do DNA plasmidial, como em Martins et al., 2009a. Estes produtos foram então submetidos à reação de sequenciamento com o *Kit* BigDye 3.1 (*ThermoFisher*) e levados para a Plataforma de Sequenciamento PDTIS/Fiocruz para obtenção das sequências.

Ao todo seis e sete indivíduos de Macapá e Oiapoque, respectivamente, representando genótipos de interesse, tiveram o segmento IIS6 amplificado e sequenciado. As condições da PCR foram idênticas aquelas descritas acima para o IIS6, exceto que os *primers* usados foram (AaEx31P e AaEx31Q, vide Tabela 4. Os produtos foram purificados como acima, divididos em duas alíquotas (para cada qual foi adicionado o primer *forward* ou o *reverse*) e submetidos para a plataforma de Sequenciamento PDTIS/Fiocruz para obtenção das sequências. As sequências foram alinhadas e analisadas com auxílio do programa Geneious, versão R9.1.6 (*Biomatters Ltd*).

3.3.3. Variação no número de cópias gênicas do *AaNa_v*

Estudos prévios mostraram a ocorrência de duplicação gênica no *Nav* em populações naturais brasileiras de *Ae. aegypti* e em uma linhagem selecionada em laboratório, podendo chegar a até 10 cópias em um indivíduo (Martins et al., 2013). Aqui avaliou-se a quantidade de cópias do *Nav* em indivíduos de Macapá e Oiapoque, comparadas às linhagens de laboratório Rockefeller e Bora-Bora. Para tanto, a partir do mesmo DNA extraído (item 3.3.1), foi feita amplificação simultânea do gene alvo (região IIS6 do *Nav*) e um gene ribossomal de referência (*rp49*, número de acesso GenBank AY539746), pela metodologia *TaqMan Copy Number Assay* (*ThermoFischer*) em qPCR em tempo real, para cada indivíduo. As reações continham o *kit Genotyping Master Mix* (*ThermoFischer*) a 1X e os conjuntos de *primers* e sondas (Tabela 4) para os genes alvo (*Nav*) e referência (*rp49*) a 1X, 20 ng de DNA genômico e água em quantidade suficiente para 10 µL. Cada amostra foi processada em triplicata. A reação foi levada ao equipamento QuantStudio™ 6 Flex System (*ThermoFisher*), sob as condições de 95°C/10' para desnaturação inicial, seguido de 40 ciclos de, 95°C/15", 60°C/1', para desnaturação e anelamento/amplificação, nesta ordem.

Os CTs dos genes alvo e referência foram determinados, baseados em um *threshold* fixado em 0,2, calculado pelo software QuantStudio™ Real-Time PCR V1.1 (*ThermoFischer*) para cada gene. Foi então calculada a diferença entre os CTs dos genes alvo e referência (Δ CT) para cada indivíduo, de onde

se obteve a diferença entre seu ΔCT e a média dos ΔCT s dos indivíduos de Bora-Bora ($\Delta\Delta CT$). Finalmente, para o cálculo do número de cópias diploide do gene alvo (N_c) usou-se a fórmula $2^{\Delta\Delta CT}$.

Tabela 4. Sequências de primers e sondas usadas nas reações de genotipagem para os sítios 1011, 1016 e 1534, amplificação dos segmentos IIS6 e IIIS6 e reações de variação do número de cópias gênicas do Na_v de *Aedes aegypti*.

Sítio / Região/ Gene	Primer	Sequência dos primers (sentido 5'-3')
1011	1011_For	GTCCTGTATTCCGTTCTTTTT
	1011_Rev Ile ⁺	GCGGGCTACTTACTACTAGATTTACT
	1011_Rev Met ^{kdr}	GCGGGCAGGGCG GCGGGGGCGGGGCCT ACTTACTACTAG ATT TGCC
1016	Forward	CGT GCT AAC CGA CAA ATT GTT TCC
	Reverse	GAC AAA AGC AAG GCT AAG AAA AGG T
	Sonda Val ⁺	VIC-CCCGCACAGGTACTTA-NFQ
	Sonda Ile ^{kdr}	FAM-CCGCACAGATACTTA-NFQ
1534	Forward	CGAGACCAACATCTACATGTACCT
	Reverse	GATGATGACACCGATGAACAGATTC
	Sonda Phe ⁺	FAM-ACGACCCGAAGATGA-NFQ
	Sonda Cys ^{kdr}	VIC-AACGACCCGCAGATGA-NFQ
IIS6 Nav	5'para3'_For	ACAATGTGGATCGCTTCCC
	3'para3'_Rev	TGGACAAAAGCAAGGCTAAG
IIIS6 Nav	AaEx31P_For	TCGCGGGAGGTAAGTTATTG
	AaEx31Q_Rev	GTTGATGTGCGATGGAAATG
AaRP49	Foward	ACATCGGTTACGGATCGAACA AG
	Reverse	TGTGGACCAGGAACTTCTTG AAG
	Sonda	VIC-CACCCGCCA TATGCT-MGB-NFQ
Na_v	ex20_Foward	ACCGACTTCATGCACTCATTTCAT
	ex20_Reverse	ACAAGCATACAATCCCACATGGA
	ex20_Sonda	FAM-CCACTCGCCGCATAAT- MGB-NFQ

(⁺) alelos selvagens, (^{kdr}) alelos *kdr*

3.3.4. Análise da Expressão de Genes Envolvidos com a Resistência Metabólica

Foram avaliados os níveis de expressão de alguns dos genes relacionados à resistência metabólica, entre aqueles previamente identificados como os mais alterados em populações caribenhas de *Ae. aegypti* (Dusfour et al., 2015; Faucon et al., 2015): quatro genes da superfamília *CYP* das monooxigenases P450 (*CYP6BB2*, *CYP9J10*, *CYP9J28* e *CYP9M6*) e um gene da superfamília *CCE* das carboxilesterase (*CCEae3a*). O gene *Rps14* foi utilizado como controle normalizador de referência. Foram utilizadas fêmeas adultas, com três dias pós-emergência, das populações Oiapoque e Macapá (geração F3) e Rockefeller, previamente criopreservadas a seco em freezer - 80°C.

O RNA total foi extraído de quatro *pools* com cinco indivíduos para cada população. A extração foi feita com o reagente Trizol (*Invitrogen*), como descrito em Gentile et al. (2006) e quantificado com o *kit Qubit® RNA HS Assay (ThermoFisher)* em *Qubit® 3.0 Fluorometer (ThermoFischer)*. A retrotranscrição em cDNA foi feita utilizando-se 4 µL do *kit SuperScript™ VILO™ Master Mix (Invitrogen)*, 4 µL de RNA e quantidade suficiente de água livre de nucleasse para completar 20 µL de reação. O *kit SuperScript™ VILO™ Master Mix* é composto por enzima transcriptase reversa (*SuperScript™ III RT*), inibidor de ribonuclease recombinante (*RNaseOUT™*), cloreto de magnésio ($MgCl_2$), *random primers* e dNTPs. O cDNA foi obtido após consecutivas incubações: primeiro a 25°C/ 10', seguido de 42°C/ 60' e por fim, 85°C/ 5'. A quantificação do cDNA obtido foi feita com o *kit Qubit®dsDNA HS Assay (ThermoFisher)* no *Qubit*. A reação de quantificação da expressão gênica foi feita por qPCR em tempo real com o *Kit KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix 2X (Kapa Biosystems)*, seguindo recomendações do fabricante e com adaptações de Dusfour e cols. (2015) contendo 2X *KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix* e *RoxDye* a 1X, 0,2 µM de cada *primer* (Tabela 5), 2 ng de cDNA e água suficiente para 10 µL, sob condições de 95°C/3" de desnaturação e 60°C/1' de anelamento e extensão em 40 ciclos, seguida de curva de dissociação para avaliação de amplicon único. Cada *pool* foi avaliado em triplicatas em microplacas de 96 poços, de forma que as reações para os

genes de interesse e de referência, além de um controle negativo, foram aplicados na mesma placa, contendo os quatro *pools* de Macapá, Oiapoque e Rockefeller e, adicionalmente, três *pools* de Bora-Bora.

Uma vez que para análise dos seis genes aqui investigados utilizamos os *primers* previamente consolidados (Dusfour et al., 2015; Faucon et al., 2015), não realizamos ensaios de curvas de calibração para cálculos de eficiência (*E*) e linearidade das PCRs. Os níveis de expressão dos genes das enzimas detoxificantes foram obtidos pelo método de quantificação relativa ‘delta-delta CT’, a partir da fórmula: Razão de expressão = $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde se presume que *E* dos genes alvo e referência foram ótimas e idênticas [*E*_{alvo} = *E*_{referência} = 2] (Pfaffl, 2001). A linhagem Rockefeller foi parâmetro de perfil genético de susceptibilidade a inseticidas.

Tabela 5. Sequência de *primers* utilizados na avaliação de expressão gênica em *Aedes aegypti*.

Gene	Sequência de <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> (sentido 5'-3')
<i>RpS14</i>	AGGAACTAGCAGAATGGCTCCC ACAGATCCGTGACATGGACGAAG
<i>CYP6BB2</i>	AGTTCAAGGGCCGAGGATTG CGGATCCACGAAAATTCCGC
<i>CYP9J10</i>	AATACGTACGAGGGATCCAAGA CTATCTCCTCCGACCTCGTCCTC
<i>CYP9J28</i>	CTATTTCCGGAGTCCTAGTGGCC CTTTGACTCCTCGGTACTTGTCG
<i>CYP9M6</i>	AGCTTGGCAATGACATCATCAC TAAGTCCCTGAAATCCACCAGTG
<i>CCEae3a</i>	TCTAAGAAACCCGAATATGACG TTGAGGAGGCACGAACAG

4. RESULTADOS

4.1. Determinação dos perfis de susceptibilidade a inseticidas

A avaliação da resistência nas populações de Macapá e Oiapoque foi realizada para os inseticidas piretroide deltametrina (adulticida) e organofosforados malathion (adulticida) e temephos (larvicida). Em todos os bioensaios, foi possível observar certo padrão de tolerância aos inseticidas utilizados: foram necessárias nas populações avaliadas, faixas de concentração/tempo muito superiores às utilizadas na linhagem referência de susceptibilidade, Rockefeller. A maior tolerância aos inseticidas frente à linhagem de susceptibilidade evidenciou o perfil de resistência nas populações do Amapá.

4.1.1. Bioensaios com larvas

4.1.1.1 Ensaio simplificado de *knockdown* com o piretroide deltametrina

Apesar do piretroide não ser utilizado como larvicida, o ensaio rápido ou bioensaio simplificado de *knockdown*, primeiramente proposto por Kawada et. al. (2009) é utilizado como um método preliminar para um indicativo de resistência a piretroides em populações de *Ae. aegypti*, via mecanismos comuns a larvas e adultos, como as mutações *kdr*. Neste trabalho, para ambas as doses avaliadas, 0,1 e 0,4 ppm, não houve *knockdown* de 100% das larvas do Amapá. De acordo com este ensaio, quanto maior o índice de susceptibilidade (IS), que varia em uma escala de 1 a 36, mais resistente deve ser a população. Macapá e Oiapoque apresentaram, respectivamente, IS de 30 e 36 (Figura 13), sugerindo portanto que Oiapoque seja mais resistente.

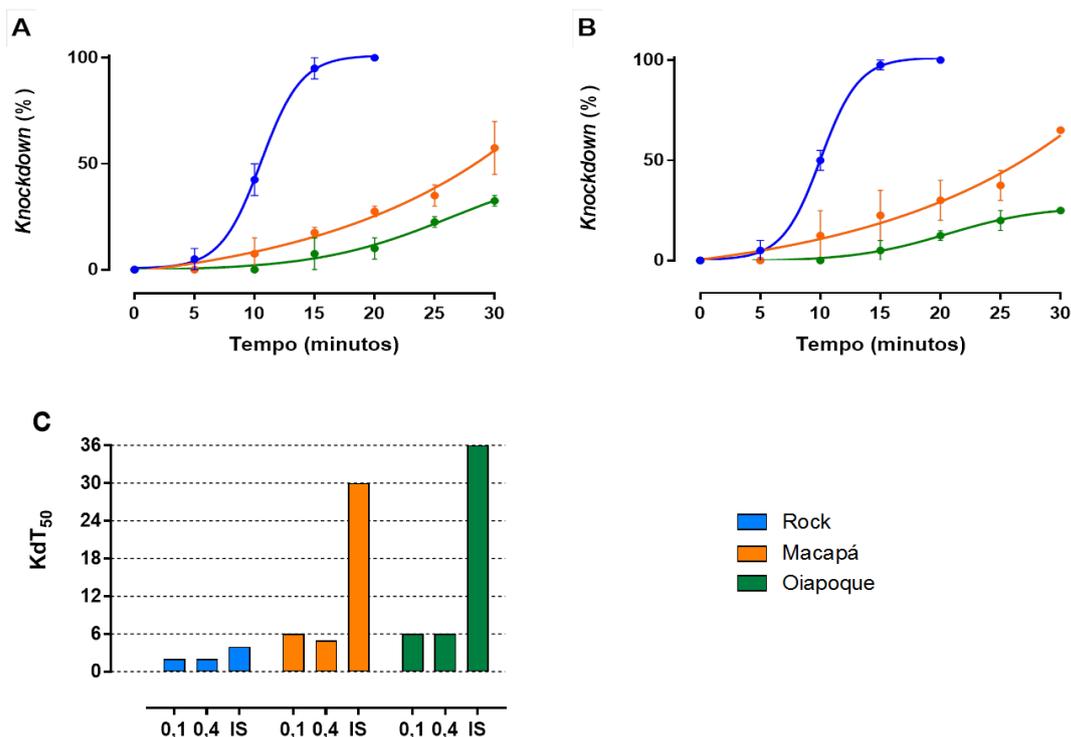


Figura 13. Perfil de *knockdown* para o piretroide deltametrina em larvas de *Aedes aegypti* do Amapá. Bioensaio do tipo simplificado de *knockdown* com as doses 0,1 (A) e 0,4 (B) ppm de deltametrina, ao longo do tempo. Estão representados as médias com seus erros padrões e curvas de regressão não-linear. Os índices de *knockdown* médio (KdT₅₀) para cada dose e o índice de susceptibilidade (IS) estão apresentados no painel C.

4.1.1.2. Ensaio com o organofosforado temephos

As populações de *Ae. aegypti* do Amapá mostraram-se resistentes ao temephos (Figura 14). A maior dose utilizada (0,090 mg/L) alcançou a mortalidade média máxima de 53,0% em Oiapoque. A dose que matou 50% da população (CL₅₀) de Macapá e Oiapoque foi de 0,027 e 0,087 mg/L, respectivamente, ao passo que a CL₅₀ de Rockefeller foi de 0,004 mg/L de temephos. Ou seja, Macapá precisou de 6,5 vezes mais inseticida do que a linhagem de referência para atingir a mortalidade da metade de sua população (RR₅₀), enquanto que a RR₅₀ de Oiapoque (21,8) foi cerca de três vezes maior que a de Macapá (Tabela 6).

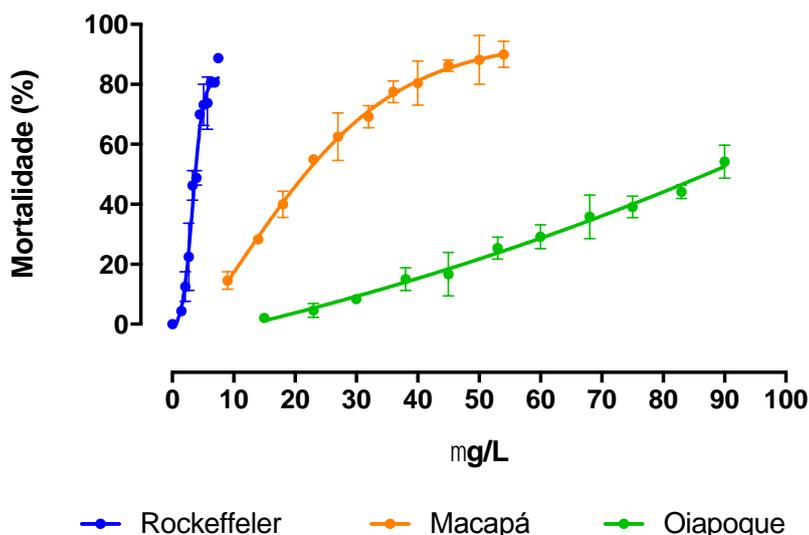


Figura 14. Perfil de susceptibilidade ao larvicida organofosforado em populações de *Aedes aegypti* do Amapá. Bioensaio do tipo dose-resposta para temephos. A linhagem Rockefeller foi utilizada como controle de susceptibilidade.

Tabela 6. Análise quantitativa de resistência ao organofosforado temephos em larvas de *Aedes aegypti* do Amapá.

Linhagem ou população	Temephos (mg/L)		
	CL ₅₀	IC 95%	RR ₅₀
Rockefeller	0,004	0,004 - 0,004	1
Macapá	0,027	0,025 - 0,029	6,5
Oiapoque	0,087	0,084 - 0,092	21,8
Oiapoque/ Macapá	3,2		

4.2. Bioensaios com adultos

4.2.1. Bioensaios dose-resposta

Bioensaios do tipo dose-resposta idealmente estabelecem uma curva de 0-100% de mortalidade de dada população frente diferentes doses de um inseticida. A Figura 15 a seguir mostra as curvas obtidas para Macapá e Oiapoque, comparativamente à linhagem de susceptibilidade.

Os bioensaios com inseticida deltametrina revelaram uma alta resistência das duas populações testadas. A CL₅₀ em Macapá e Oiapoque foi

de aproximadamente 1 g/L e 3 g/L, respectivamente, ao passo que CL_{50} de Rockefeller foi de 0,02 g/L de deltametrina. Ou seja, Macapá precisou de 46 vezes mais inseticida do que a linhagem de referência para atingir a mortalidade da metade de sua população, enquanto que a RR_{50} de Oiapoque foi ainda cerca de três vezes maior que a de Macapá (Tabela 7). Cabe ressaltar, que mesmo com doses extremamente altas, conseguimos atingir mortalidade média máxima de 59,7% em Oiapoque. Portanto, não foram calculadas concentração letal e a razão de resistência 95 (RR_{95}) para esta população.

Em relação ao inseticida organofosforado malathion, foram observadas CL_{50} de 1,6, 5,0 e 9,6 g/L, respectivamente para Rockefeller, Macapá e Oiapoque. Portanto, Oiapoque obteve a RR_{50} igual a 6,0, ou seja, o dobro da RR_{50} de Macapá (Tabela 7).

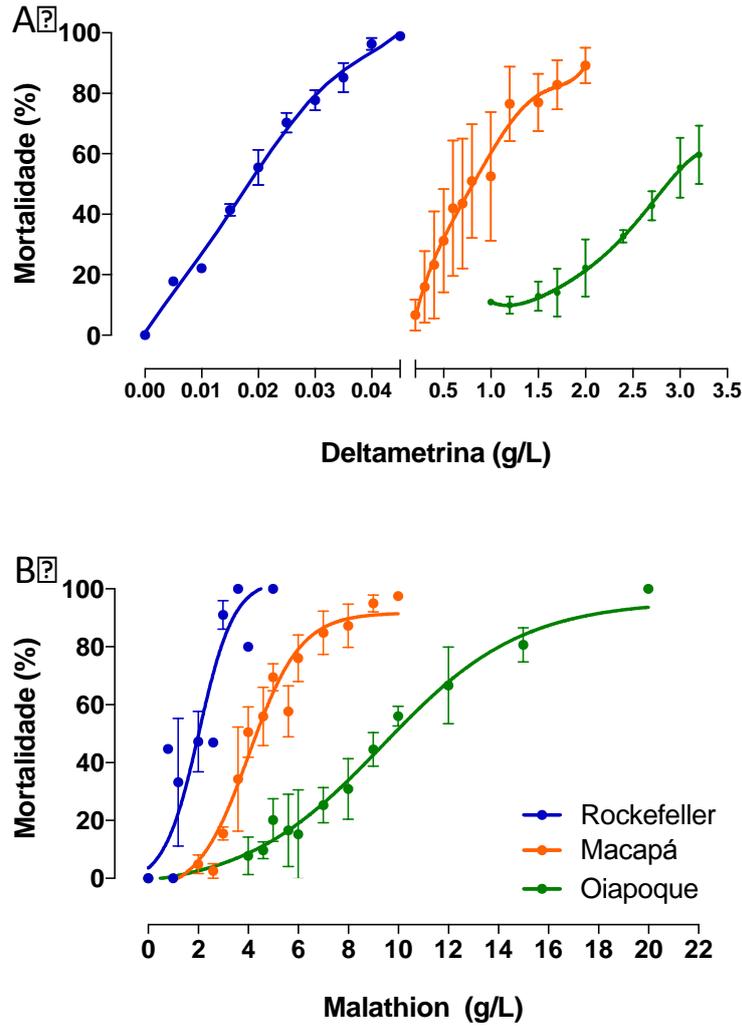


Figura 15. Perfil de suscetibilidade a adulticidas em populações de *Aedes aegypti* do Amapá. Bioensaio do tipo dose-resposta para o piretroide deltametrina (A) e o organofosforado malathion (B). A linhagem Rockefeller foi utilizada como controle de susceptibilidade.

Tabela 7. Análise quantitativa de resistência ao piretroide deltametrina e ao organofosforado malathion em populações de *Aedes aegypti* do Amapá.

Linhagem /população	Deltametrina (g/L)			Malathion (g/L)		
	CL ₅₀	IC 95%	RR ₅₀	CL ₅₀	IC 95%	RR ₅₀
Rockefeller	0,019	0,018 - 0,020	1	1,6	1,48 - 1,84	1
Macapá	0,887	0,855 - 0,920	46,4	5	4,8 - 5,08	3,1
Oiapoque	2,752	2,648 - 2,873	143,9	9,6	9,2 - 10,2	6
Oiapoque/ Macapá	3,1			1,9		

4.2.2. Bioensaios tempo-resposta

O bioensaio do tipo tempo-resposta avalia o tempo de efetividade (*knockdown* ou mortalidade para piretroides e organofosforados, nesta ordem) em única dose do inseticida. As doses utilizadas foram de 1,2 e 7,0 g/L para deltametrina e malathion, respectivamente (Figura 16).

O tempo de *knockdown* para 50% da população (KdT_{50}) para deltametrina foi de 6,2, 21,3 e 154,8 minutos, respectivamente para Rockefeller, Macapá e Oiapoque. Portanto, Oiapoque teve a RR_{50} de 24,9, mais de sete vezes superior a de Macapá (3,4) (Tabela 8). Já o organofosforado malathion, que é um inseticida de ação mais tardia, provocou mortalidade em 50% da população (TL_{50}) em 57,4, 88,8 e 110,8 minutos para Rockefeller, Macapá e Oiapoque, respectivamente. As populações do Amapá tiveram RR_{50} bem parecidas, menores do que dois (Tabela 8).

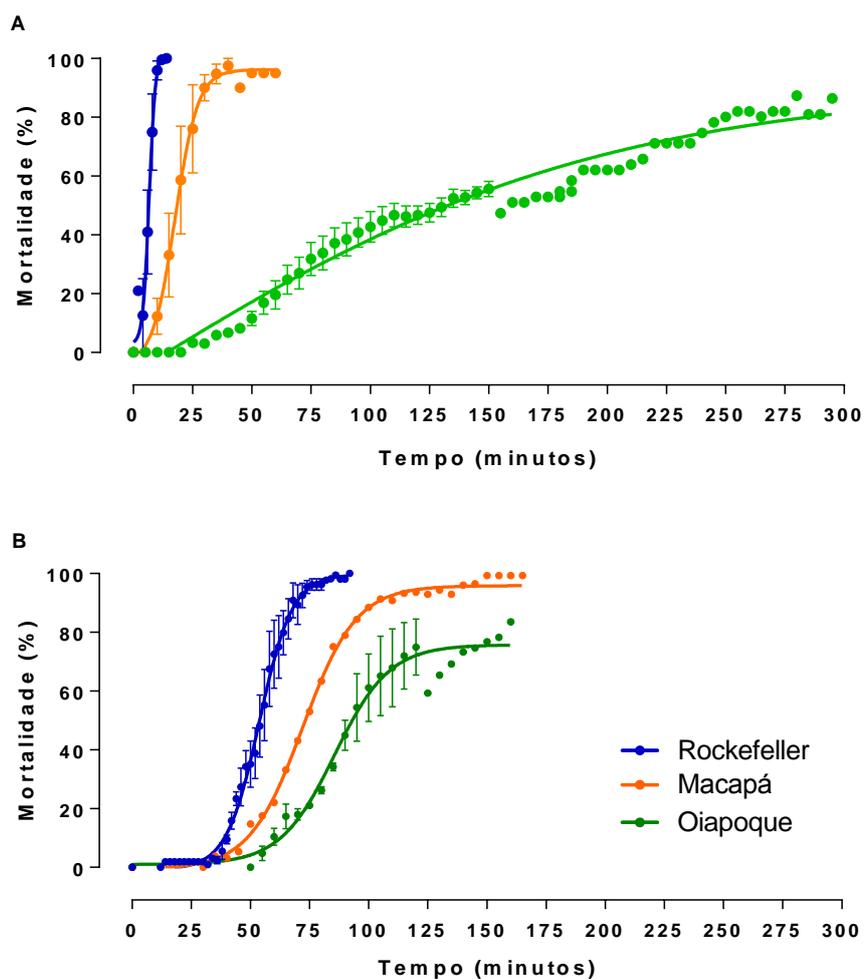


Figura 16. Perfil de suscetibilidade a adulticidas em populações de *Aedes aegypti* do Amapá. Bioensaio do tipo tempo-resposta para o piretroide deltametrina a 1,2 g/L (A) e o organofosforado malathion 7,0 g/L (B). A linhagem Rockefeller foi utilizada como controle de suscetibilidade.

Tabela 8. Análise semi-quantitativa do perfil de suscetibilidade ao piretroide deltametrina e ao organofosforado malathion em populações de *Aedes aegypti* do Amapá.

Linhagem ou população	Deltametrina (1,2 g/L)			Malathion (7 g/L)		
	KdT ₅₀	IC 95%	RR ₅₀	TL ₅₀	IC 95%	RR ₅₀
Rockefeller	6,2	6,07 - 6,37	1	57,4	57,05 - 57,77	1
Macapá	21,3	20,58 - 22,01	3,4	88,8	88,02 - 89,54	1,6
Oiapoque	154,8	151,02 - 157,26	24,9	110,8	109,56 - 112,08	1,9
Oiapoque/ Macapá	7,3			1,2		

4.3. Ensaios Moleculares

Os bioensaios quantitativos determinaram diferentes perfis de resistência para Macapá e Oiapoque. A fim de se investigar os mecanismos selecionados para a resistência, ensaios moleculares foram realizados em torno dos dois principais mecanismos possivelmente envolvidos: modificação do sítio-alvo e resistência metabólica. Para o mecanismo de sítio-alvo, foi feita genotipagem de mutações *kdr* (*knockdown resistance*) para os sítios 1011, 1016 e 1534 do Na_V , alvo dos piretroides, além de avaliação de variação do número de cópias de seu gene. Com relação à resistência metabólica, investigou-se os níveis de expressão de alguns dos principais genes de enzimas detoxificantes, quatro da família *CYP* das MFO P450 e um da família *CCE* das carboxilesterases.

4.3.1. Genotipagem dos sítios 1016 e 1534 do gene Na_V .

Foram genotipados os sítios 1016 e 1534 do Na_V em reações independentes para cada indivíduo, por PCR em tempo real para detecção diferencial de SNPs (*Single nucleotide polymorphism*). Uma vez que estes sítios estão no mesmo gene, ambas as reações foram consideradas para composição dos alelos e genótipos. Em Macapá o alelo do Na_V mais frequente foi o Na_VR1 , com frequência de 84,3%, contra 15,7% do Na_VS . O alelo *kdr* Na_VR2 não foi encontrado em nenhum indivíduo desta população. Já em Oiapoque, o Na_VR2 foi o mais frequente (67,0%), seguido do Na_VR1 (23,0%) e Na_VS (10,0%) (Figura 17). Macapá e Oiapoque tiveram 71,4 e 79,8%, respectivamente, dos indivíduos com genótipos propícios para resistência a piretroides (R1R1, R1R2 e R2R2). No entanto, uma vez que o Na_VR2 confere maiores níveis de resistência, é esperado que esta população seja de fato mais resistente, considerando-se pelo menos este mecanismo (Tabela 9). Não foi indicada a possível presença do alelo Na_VR3 , embora pudesse estar presente no chamado genótipo SR2 em Oiapoque (ver discussão).

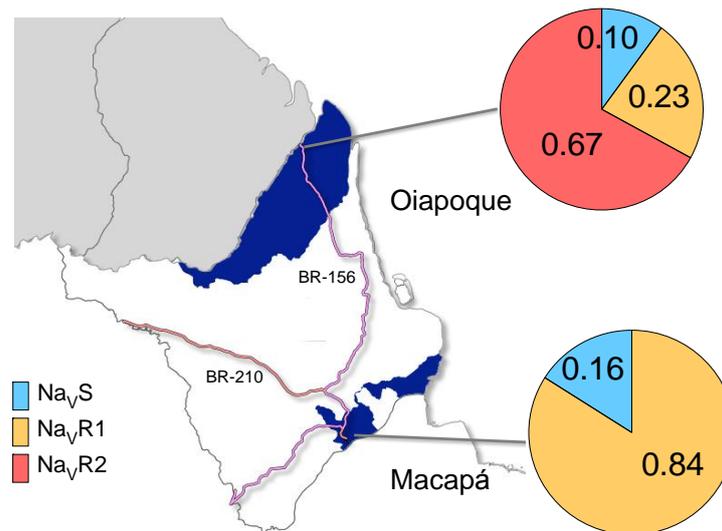


Figura 17. Frequência dos alelos Na_V em populações de *Aedes aegypti* do Amapá. Na_V_{R1} e Na_V_{R2} são os alelos *kdr*.

Tabela 9. Frequências genotípicas nos sítios 1016 e 1534 do Na_V , em populações de *Aedes aegypti* do Amapá.

População	n	Frequências genotípicas						EHW*		Σ genótipos "para resistência"
		SS	SR1	SR2	R1R1	R1R2	R2R2	c^2	p	
Macapá	35	0,029	0,257	0	0,714	0	0	0,0244	0,8758	0,714
Oiapoque	35	0	0	0,200	0,085	0,286	0,429	3,8746	0,2753	0,798

*Teste para 'Equilíbrio de Hardy-Weinberg', mostrando que a hipótese de equilíbrio não pôde ser rejeitada. Foram considerados um e três graus de liberdade, respectivamente, para Macapá e Oiapoque.

4.3.2. Genotipagem do sítio 1011 do gene Na_V

Além dos sítios 1016 e 1534, foi também genotipado o sítio 1011 para a variação Ile1011Met, através de PCR alelo-específica, revelada pelas curvas de dissociação em tempo real (Figura 18). As linhagens de laboratório Rockefeller e Bora-Bora foram também genotipadas, ambas revelando-se 100% 1011 Ile/Ile. O alelo 1011 Met foi observado apenas em Macapá (14,3%), somente em indivíduos heterozigotos 1011 Ile/Met (28,6%) (Tabela 10).

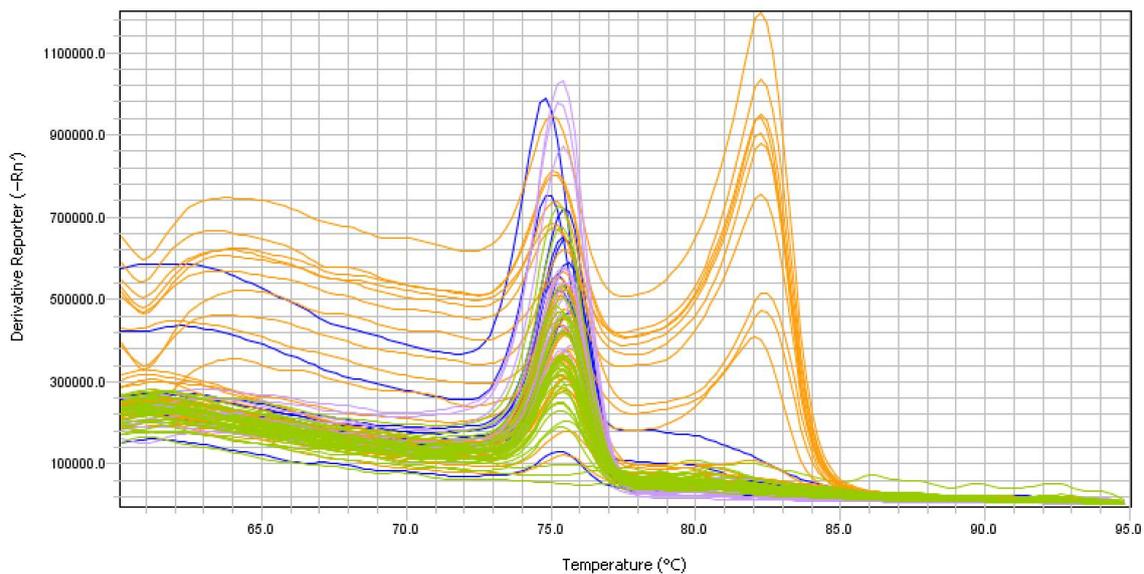


Figura 18. Genotipagem do sítio 1011 do Na_V de populações de *Aedes aegypti* do Amapá. Exemplo de uma reação de PCR alelo-específica com curva de dissociação em tempo real. Os picos representam o T_m dos produtos amplificados: cerca de 75°C e 82°C, representam respectivamente 1011 Ile e 1011 Met. As populações utilizadas foram Macapá (laranja), Oiapoque (verde) e as linhagens de laboratório Rockefeller (azul) e Bora-Bora (rosa).

A ausência de homozigotos 1011 Met/Met era esperada, uma vez que o alelo 1011 Met está presente em uma duplicação gênica contendo uma cópia do alelo 1011 Ile. Os mesmos indivíduos já haviam sido genotipados para os sítios 1016 e 1534 e, portanto, conhecia-se seus genótipos para os alelos Na_VS , Na_VR1 e Na_VR2 . Entre os 10 indivíduos 1011 Ile/Met de Macapá, um era SS (10%) e nove SR1 (90%) (Tabela 10). A região IIS6 do indivíduo SS e de três SR1 de Macapá foi clonada e sequenciada, corroborando o resultado da AS-PCR. A ausência de 1011 Met nos indivíduos R1R1 corrobora a hipótese de duplicação em sequências do tipo S (ou seja, as mutações *kdr* nos sítios 1016 e 1534).

Tabela 10. Frequências alélicas e genotípicas para o sítio 1011 do Na_V em populações de *Aedes aegypti* do Amapá.

População	n	Frequência alélica		Frequência genotípica			EHW χ^2 ; p*
		Ile	Met	Ile/ Ile	Ile/ Met	Met/ Met	
Macapá	35	0,857	0,143	0,714	0,286	0	0,972; 0,3241
Oiapoque	35	1	0	1	0	0	

*Teste para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, probabilidade pela distribuição χ^2 com 1 grau de liberdade.

4.3.3. Variação do número de cópias gênicas do *Nav*

A variação no número de cópias do *Nav* foi avaliada em populações de *Ae. aegypti* do Amapá, através de amplificação por qPCR em tempo real da região IIS6 do *Nav*, em quantificação relativa à amplificação do *RP49*, utilizado como gene referência de cópia única, na mesma reação. As linhagens Rockefeller e Bora-Bora foram empregadas como referência. As reações foram feitas nos mesmos indivíduos previamente genotipados (sítios 1011, 1016 e 1534).

Os mosquitos de Bora-Bora apresentaram valores muito homogêneos, de forma que esta linhagem foi considerada como referência para duas cópias gênicas de um indivíduo diploide. As médias dos valores do número de cópias (N_c) gênicas do *Nav* das populações Macapá e Oiapoque foram significativamente iguais ($P = 0,4651$) e diferentes (maiores) que da referência Bora-Bora ($p < 0,0001$ para ambas). Curiosamente, Rockefeller também diferiu de Bora-Bora ($P = 0,0012$) e de Macapá ($P = 0,0118$), mas não de Oiapoque ($P = 0,3493$). (Tabela 11 e Figura 19-A). Se considerados apenas os 10 indivíduos que apresentaram maior e os 10 que com menor N_c , fica mais clara a visualização daqueles com duas, três ou quatro cópias (Figura 19-B).

Tabela 11. Variação no número de cópias no *Nav* em populações de *Aedes aegypti* do Amapá.

População	$\mu\Delta CT$	ΔCT (SD)	$\Delta\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$ (SD)	N_c
Bora-Bora	0,079	0,079	0,000	0,079	2,0
Rock	0,322	0,214	0,243	0,214	2,4
Macapá	0,485	0,268	0,406	0,268	2,7
Oiapoque	0,405	0,265	0,326	0,265	2,5

Os valores de ΔCT correspondem à média da diferença dos CTs de *Nav* e *RP49* em cada população ou linhagem; $\Delta\Delta CT$ é a diferença entre o ΔCT da população e de Bora-Bora; (SD) corresponde ao desvio padrão e N_c ao número de cópias do *Nav*.

Essas diferenças dependem porém da quantidade de indivíduos na população com o *Nav* duplicado, bem como com o número de cópias duplicadas em cada indivíduo. Se o indivíduo for homocigoto para uma única duplicação, o esperado seria observar um N_c igual a quatro. Da mesma forma, um indivíduo heterocigoto deveria ter N_c igual a três e o homocigoto sem

duplicação com N_c igual a dois. O ensaio realizado não forneceu respostas diretas para uma categoria discreta como número de cópias de um gene (como dois, três ou quatro), mas um contínuo entre dois e quatro, dificultando caracterizar cada indivíduo com maior clareza, como é comum para o tipo de reação realizada.

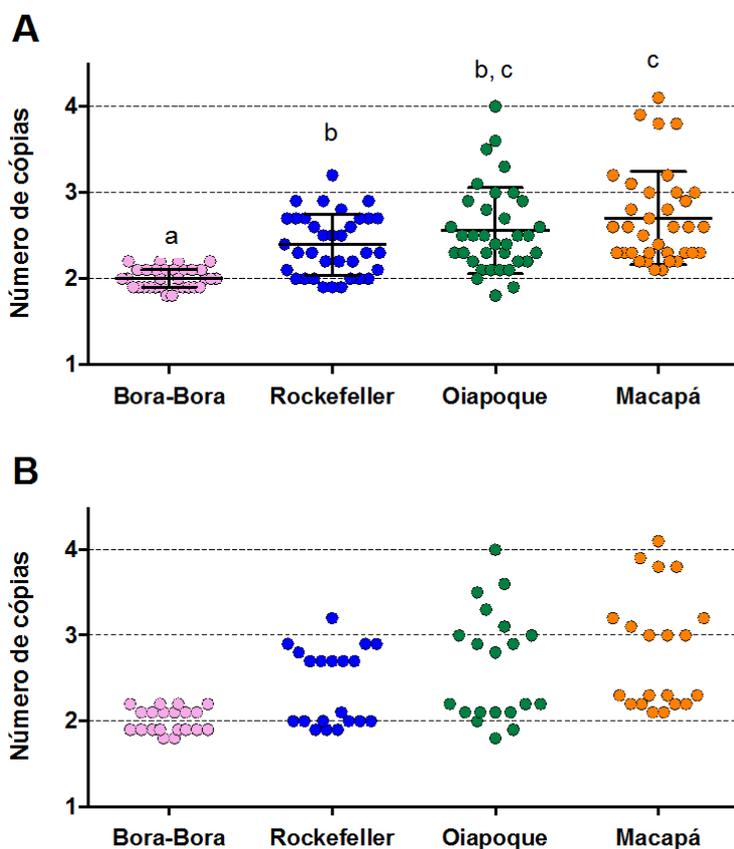


Figura 19. Número de cópias do gene N_{av} em *Aedes aegypti* do Amapá e de linhagens de laboratório. A - Cada ponto representa um indivíduo, com média e desvio padrão da população indicados pelas barras. Letras iguais indicam aqueles cujas médias não diferiram significativamente (ANOVA, seguida de teste de comparação múltipla de Tukey). B – Estão representados apenas os 10 indivíduos com maior e menor N_c .

A Tabela 12 mostra os genótipos para os sítios 1011 e 1016 + 1534, em ordem crescente do N_c para cada indivíduo de Macapá e Oiapoque. É possível observar que nas duas populações, grande parte dos indivíduos com maiores N_c são também os que possuem o alelo $N_{av}S$, sendo em Macapá todos os indivíduos SS ou SR1 e em Oiapoque todos os indivíduos SR2. Mais uma vez, esta análise sugere que o maior número de cópias gênicas no N_{av} pode estar associado à presença do alelo $N_{av}S$. Contudo, como não há a

mutação 1011 Met em indivíduos de Oiapoque, mas indivíduos SR2 apresentaram $N_c > 2$, sugere-se que devem haver outros alelos duplicados além daquele que contém uma cópia com a mutação no sítio 1011. Além disso, indivíduos R1R1 em Macapá e R2R2 em Oiapoque também apresentaram $N_c > 2$, reforçando portanto que deve haver mais variações de alelos duplicados além da previamente sugerida.

Tabela 12. Genótipos e variação no número de cópias do *Nav* em *Ae. aegypti* do Amapá.

Indivíduos de Macapá	Genótipos		Nc*	Indivíduos de Oiapoque	Genótipos		Nc*
	1011	1016 +1534			1011	1016 +1534	
MAC-16	Ile/Ile	R1R1	2,1	OIA-26	Ile/Ile	R2R2	1,8
MAC-8	Ile/Ile	R1R1	2,1	OIA-13	Ile/Ile	R1R2	1,9
MAC-19	Ile/Ile	R1R1	2,2	OIA-28	Ile/Ile	R2R2	2,0
MAC-4	Ile/Ile	R1R1	2,2	OIA-1	Ile/Ile	R1R1	2,1
MAC-15	Ile/Ile	R1R1	2,2	OIA-24	Ile/Ile	R2R2	2,1
MAC-32b	Ile/Ile	R1R1	2,2	OIA-10	Ile/Ile	R2R2	2,1
MAC-34	Ile/Ile	R1R1	2,3	OIA-3	Ile/Ile	R1R2	2,1
MAC-35	Ile/Ile	R1R1	2,3	OIA-19	Ile/Ile	R1R1	2,2
MAC-9	Ile/Ile	R1R1	2,3	OIA-35	Ile/Ile	R1R2	2,2
MAC-11	Ile/Ile	R1R1	2,3	OIA-15	Ile/Ile	R2R2	2,2
MAC-10	Ile/Ile	R1R1	2,3	OIA-34	Ile/Ile	R1R2	2,3
MAC-27	Ile/Ile	R1R1	2,3	OIA-2	Ile/Ile	R2R2	2,3
MAC-17	Ile/Ile	R1R1	2,3	OIA-33	Ile/Ile	R1R2	2,3
MAC-29	Ile/Ile	R1R1	2,3	OIA-5	Ile/Ile	R1R2	2,3
MAC-30	Ile/Ile	R1R1	2,4	OIA-7	Ile/Ile	R1R2	2,3
MAC-23	Ile/Ile	R1R1	2,5	OIA-30	Ile/Ile	R1R2	2,4
MAC-1	Ile/Ile	R1R1	2,6	OIA-31	Ile/Ile	R2R2	2,4
MAC-18	Ile/Ile	R1R1	2,6	OIA-18	Ile/Ile	R2R2	2,5
MAC-20	Ile/Ile	R1R1	2,6	OIA-8	Ile/Ile	R1R2	2,5
MAC-7	Ile/Ile	R1R1	2,6	OIA-25	Ile/Ile	R1R2	2,5
MAC-5	Ile/Ile	R1R1	2,6	OIA-22	Ile/Ile	R1R1	2,5
MAC-3	Ile/Ile	R1R1	2,7	OIA-4	Ile/Ile	R2R2	2,5
MAC-6	Ile/Ile	R1R1	2,8	OIA-12	Ile/Ile	R2R2	2,6
MAC-2	Ile/Ile	R1R1	2,8	OIA-27	Ile/Ile	R2R2	2,6
MAC-28	Ile/Met	SR1	2,9	OIA-14	Ile/Ile	R2R2	2,7
MAC-14a,b	Ile/Met	SR1	3,0	OIA-23	Ile/Ile	R2R2	2,8
MAC-25	Ile/Met	SR1	3,0	OIA-9b	Ile/Ile	SR2	2,9
MAC-33	Ile/Met	SR1	3,0	OIA-17	Ile/Ile	R2R2	2,9
MAC-24	Ile/Met	SR1	3,1	OIA-21	Ile/Ile	R2R2	3,0
MAC-12a,b	Ile/Ile	R1R1	3,2	OIA-32a,b	Ile/Ile	SR2	3,0
MAC-21	Ile/Met	SR1	3,2	OIA-29b	Ile/Ile	SR2	3,1
MAC-13a,b	Ile/Met	SS	3,8	OIA-6a,b	Ile/Ile	SR2	3,3
MAC-31a,b	Ile/Met	SR1	3,8	OIA-16b	Ile/Ile	SR2	3,5
MAC-26	Ile/Met	SR1	3,9	OIA-11a,b	Ile/Ile	SR2	3,6
MAC-22b	Ile/Met	SR1	4,1	OIA-20a,b	Ile/Ile	SR2	4,0

a = clonagem para IIS6

b = direto da PCR para IIS6

*Nc = número de cópias (veja Tabela 12 e Figura 19) Os indivíduos sombreados em azul foram utilizados para sequenciamento da região IIS6 do *Nav*.

4.3.4. Clonagem e sequenciamento do segmento IIS6 do *Nav* de *Ae. aegypti* do Amapá

A fim de melhor elucidar a questão da duplicação do *Nav*, a região IIS6 deste gene (contendo parte dos exons 20 e 21, e do íntron entre eles) foi amplificada, purificada e clonada (Figura 20) de quatro indivíduos de Macapá (com três genótipos distintos: SS, SR1 e R1R1) e quatro de Oiapoque (todos SR2). Todos estes indivíduos estavam entre aqueles com maior Nc (Tabela 12). Foram obtidas sequências de pelo menos oito clones de cada indivíduo, que corroboraram seus genótipos testados por PCR/ curva de dissociação (sítio 1011) e TaqMan SNP (sítio 1016).

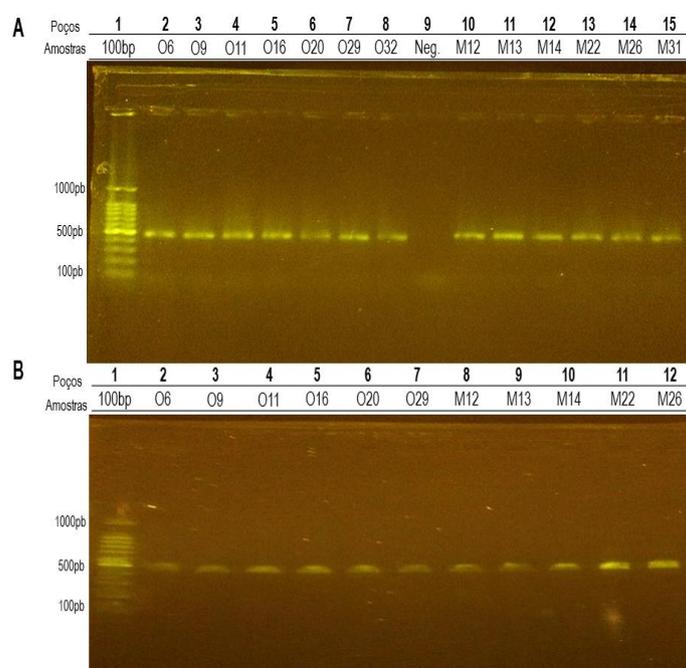


Figura 20. Produtos de amplificação (A) e purificação (B) do seguimento IIS6 do *Nav*. Gel de agarose a 1% corado com SYBR® Safe (Invitrogen) diluído 1:10 em TBE 1X. Marcador 100pb DNA Ladder (Fermentas) (A e B). .

Foram identificadas sequências classificadas como tipo “A” ou “B”, respectivamente de acordo com o intron maior ou menor na região IIS6. Em Macapá, todos os indivíduos SS e SR1 tinham ambas as sequências. Já o indivíduo R1R1 apresentou apenas sequências do tipo B. Em Oiapoque, nos quatro indivíduos SR2, todas as sequências do alelo *Nav*_S eram tipo B e as do *Nav*_{R2} tipo A. Foram geradas redes de haplótipos para as sequências do tipo

“A” e “B”, revelando que para as sequências do tipo A (Figura 21) apenas dois passos mutacionais separam os haplótipos das populações, que são as mutações 1011 Met em Macapá e 1016 Ile^{kdr} em Oiapoque. Já as do tipo “B” (Figura 22) são similares para Macapá e Oiapoque.

Considerando-se apenas as sequências cujos polimorfismos foram encontrados em mais de um clone, a fim de se evitar as mutações possivelmente induzidos por PCR, nenhum indivíduo apresentou mais do que dois haplótipos diferentes. Ou seja, as duplicações devem ser de sequências idênticas, pelo menos nesta região IIS6 avaliada.

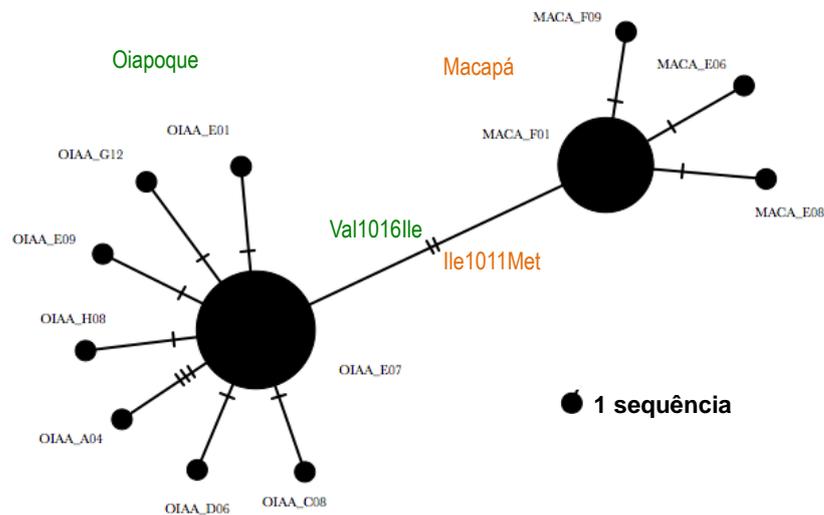


Figura 21. Rede de haplótipos de sequências “tipo A” da região IIS6 do *Nav* de *Aedes aegypti* de Macapá e Oiapoque. Os círculos representam os haplótipos, com tamanho proporcional à quantidade de sequências. Cada traço indica um passo mutacional entre os haplótipos conectados. Os polimorfismos que separam as sequências de Macapá e Oiapoque (Ile1011Met e Val1016Ile) estão indicados.

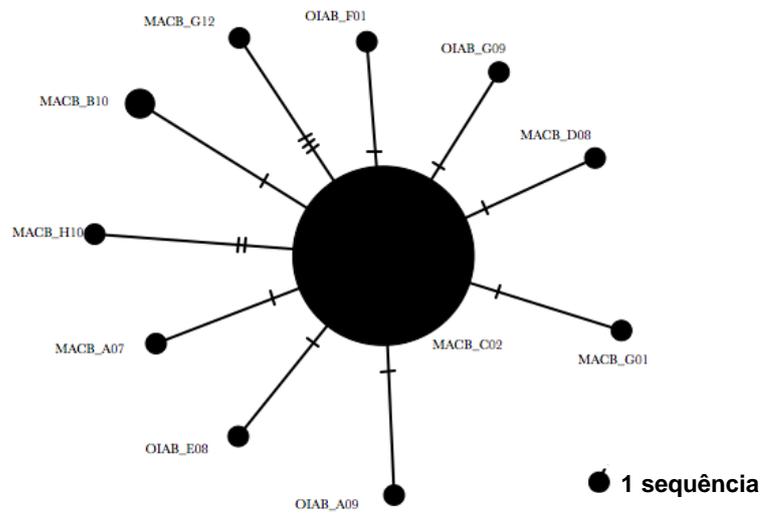


Figura 22. Rede de haplótipos de seqüências “tipo B” da região IIS6 do *Nav* de *Aedes aegypti* de Macapá e Oiapoque. Os círculos representam os haplótipos, com tamanho proporcional à quantidade de seqüências. Cada traço indica um passo mutacional entre os haplótipos conectados.

Adicionalmente, o sequenciamento direto do segmento IIS6 também confirmou os resultados de genotipagem para o sítio 1534 por qPCR/ TaqMan, para os diferentes genótipos possíveis: 1534Phe/Phe, Phe/Cys e Cys/Cys. (Tabela 12 e Figura 23). Dentre os indivíduos sequenciados estavam todos aqueles já sequenciados para o IIS6 do *Nav*.

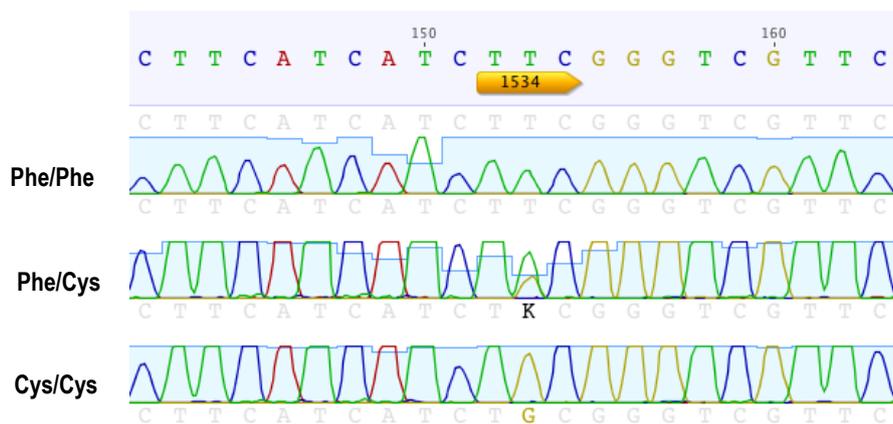


Figura 23. Exemplo de trecho de sequenciamento ‘direto de produto de PCR’ de indivíduos com diferentes genótipos para o sítio 1534. Eletroferogramas evidenciam os picos TTC, TKC e TGC, respectivamente para os indivíduos Phe/Phe, Phe/Cys e Cys/Cys.

4.3.5. Expressão de genes envolvidos com a resistência metabólica em *Ae. aegypti* do Amapá

Outro mecanismo recorrentemente associado à adaptação contra inseticidas é a chamada resistência metabólica, seja por seleção de modificação estrutural de enzimas detoxificantes, aumentando seu poder de degradação do inseticida, seja por amplificação gênica, ou por alterações que aumentam o nível de expressão de genes destas enzimas. Aqui realizamos para *Ae. aegypti* de Macapá e Oiapoque a análise da expressão de alguns dos genes de duas principais superfamílias gênicas: as monooxigenases P450 (*CYP6BB2*, *CYP9J10*, *CYP9J28* e *CYP9M6*) e a carboxilesterase *CEEae3a*, que vem recentemente sendo indicados como principais participantes na resistência metabólica em *Ae. aegypti*, principalmente em populações caribenhas. O gene ribossomal *RpS14* foi utilizado como normalizador e as linhagens Rockefeller e Bora-Bora como parâmetro de expressão não alterada. As populações estavam na geração F3 e para cada população ou linhagem foram utilizados quatro *pools* de cinco fêmeas, com três dias pós-emergência.

Os principais parâmetros de amplificação utilizados para quantificação relativa estão discriminados na tabela 13. Para todos os genes, houve amplificação de produto de tamanho único, sem interferência de amplificações inespecíficas e dímeros de *primers*, como evidenciado pelo pico único nas curvas de dissociação de cada gene (Figura 24). Houve superexpressão (acima de duas vezes relativo a Rockefeller) dos genes de P450 nas populações do Amapá exceto o P450 *CYP9M6*. O *CYP6BB2* foi o gene *CYP* mais alterado em ambas as populações, com expressão aumentada em cerca seis vezes. Houve também superexpressão do gene de carboxilesterase *CCEae3a*, com expressão de quase sete e quatro vezes em Oiapoque e Macapá, respectivamente. Apesar de diferenças de expressão em alguns genes entre as populações, os valores de ΔCT não diferiram significativamente entre Macapá e Oiapoque (One-Way ANOVA, comparação múltipla de Tukey, $P > 0,05$) (Figura 25).

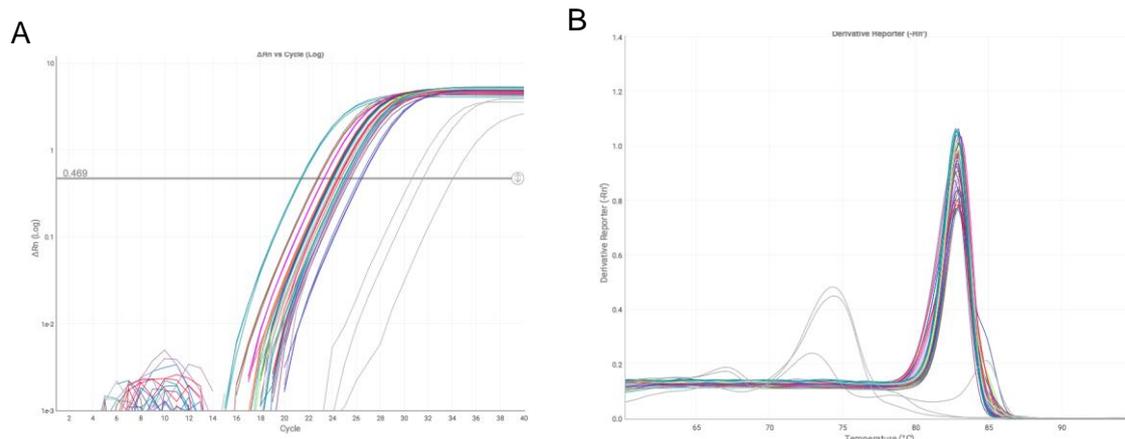


Figura 24. Exemplo de um resultado de PCR quantitativo em tempo real para análise da expressão de genes relacionados à resistência metabólica. Nesta figura estão apresentadas as curvas de amplificação (A) e de dissociação (B), evidenciando T_m com pico único para as amostras. As curvas em cinza se referem aos controles negativos

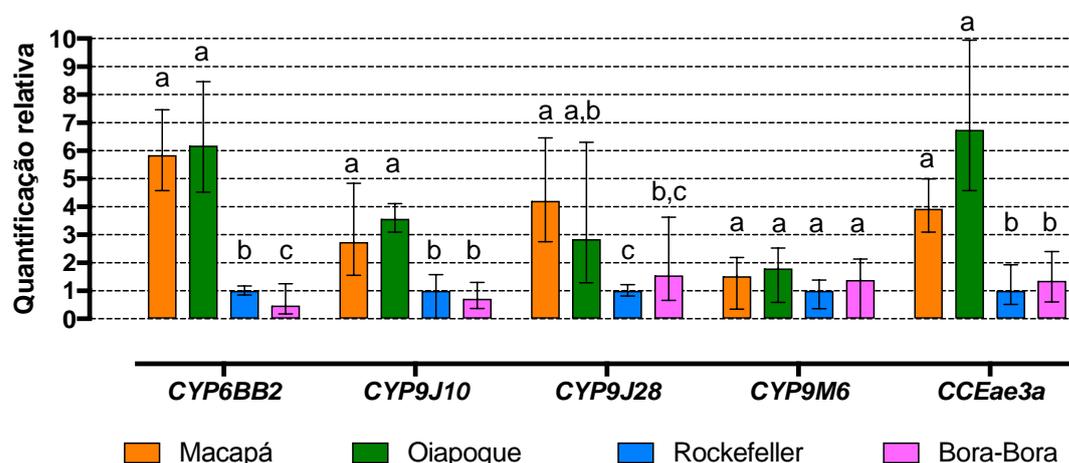


Figura 25. Alteração no nível de expressão de genes relacionados à resistência metabólica em populações de *Aedes aegypti* do Estado do Amapá. Avaliação por PCR quantitativa em tempo real de *pools* de fêmeas de três dias pós-emergência. Estão representadas as quantificações relativas médias, com os valores mínimo e máximo na barra de desvio. O gene constitutivo *RpS14* de proteína ribossomal foi utilizado como normalizador. A quantificação relativa foi feita em função dos valores de Rockefeller. Outra linhagem de laboratório, Bora-Bora foi também avaliada. Para cada enzima, letras iguais representam valores de ΔCT significativamente iguais ($P > 0,05$), de acordo com teste ANOVA, seguido de comparação múltipla de Tukey.

Tabela 13. Parâmetros obtidos na análise da expressão de genes relacionados à resistência metabólica em populações de *Aedes aegypti* do Estado do Amapá.

genes e populações	T _m (°C)	C _T médio	ΔC_T média (SE)	$\Delta\Delta C_T$ médio	quantificação relativa* média (min - max)
<i>CYP6BB2</i>					
Macapá	80,9	20,3	0,7 (0,11)	-2,5	5,8 (4,6 - 7,5)
Oiapoque	80,9	20,9	0,7 (0,14)	-2,6	6,2 (4,5 - 8,5)
Rockefeller	81,2	22,8	3,3 (0,07)	0,0	1,0 (0,9 - 1,2)
Bora-Bora	80,8	24,1	4,4 (0,32)	1,1	0,5 (0,2 - 1,3)
<i>CYP9J10</i>					
Macapá	82,9	23,5	4,0 (0,26)	-1,5	2,7 (1,5 - 4,8)
Oiapoque	82,9	23,8	3,6 (0,06)	-1,8	3,6 (3,1 - 4,1)
Rockefeller	81,6	24,8	5,4 (0,21)	0,0	1,0 (0,6 - 1,6)
Bora-Bora	82,8	25,4	5,9 (0,23)	0,5	0,7 (0,4 - 1,4)
<i>CYP9J28</i>					
Macapá	83,7	23,8	3,9 (0,19)	-2,1	4,2 (2,8 - 6,5)
Oiapoque	83,6	25,1	4,4 (0,36)	-1,5	2,9 (1,3 - 6,3)
Rockefeller	83,7	25,7	5,9 (0,09)	0,0	1,0 (0,8 - 1,2)
Bora-Bora	83,4	25,2	5,3 (0,28)	-0,6	1,6 (0,6 - 3,6)
<i>CYP9M6</i>					
Macapá	80,9	25,3	5,4 (0,26)	-0,6	1,5 (0,9 - 2,7)
Oiapoque	80,9	25,8	5,2 (0,23)	-0,9	1,8 (1,1 - 3,0)
Rockefeller	81,0	25,7	6,0 (0,22)	0,0	1,0 (0,6 - 1,6)
Bora-Bora	80,9	25,5	5,6 (0,26)	-0,5	1,4 (0,6 - 3,0)
<i>CCEae3a</i>					
Macapá	78,5	25,9	6,5 (0,11)	-2,0	3,9 (3,1 - 5,0)
Oiapoque	78,1	25,8	5,8 (0,18)	-2,8	6,7 (4,6 - 10,0)
Rockefeller	78,6	27,8	8,5 (0,30)	0,0	1,0 (0,5 - 1,9)
Bora-Bora	78,5	27,6	8,1 (0,27)	-0,4	1,4 (0,6 - 3,0)
<i>RpS14**</i>					
Macapá	84,2	19,7			
Oiapoque	84,3	20,4			
Rockefeller	84,3	19,6			
Bora-Bora	84,2	19,8			

* Quantificação relativa a Rockefeller

** A reação para cada gene foi feita em paralelo ao RpS14 na mesma placa, Aqui se encontram os valores médios de todas as cinco reações

SE = erro padrão

5. DISCUSSÃO

O mosquito *Aedes aegypti* se tornou de importância mundial nos últimos anos. A emergência dos vírus DENV, CHIKV e ZIKV em localidades ainda não constatadas e a indisponibilidade de vacinas públicas contra esses agentes, vem causando uma intermitência de surtos e epidemias com graves quadros clínicos em função de complicações neurológicas de algumas delas. Este cenário tem mobilizado a comunidade científica como um todo para melhores estratégias de controle ao vetor (Ferreira-de-Brito et al., 2016). Estratégias alternativas, como o uso de mosquitos estéreis geneticamente modificados (Proverbs, 1969; Phuc et al., 2007) e da bactéria *Wolbachia* (McMeniman et al., 2009; Moreira et al., 2009; Hoffmann et al., 2011; Maciel-de-Freitas et al., 2012), respectivamente para supressão ou substituição da população do vetor, estão sendo desenvolvidas e aprimoradas a todo momento. Contudo, aliado à eliminação de possíveis criadouros de larvas, o controle químico deve perdurar ainda entre as principais ferramentas no controle ao *Ae. aegypti* (Braga e Martin, 2015). Devido ao histórico do uso indiscriminado de inseticidas nos últimos 50 anos, mecanismos de resistência têm sido selecionados em diversas populações do vetor no mundo, prejudicando fortemente a eficácia destes compostos e, conseqüentemente, o manejo do vetor (Labbé et al., 2007b).

Desde o final dos anos 1990, resistência de *Ae. aegypti* a organofosforados tem sido reportada em vários países das Américas como El Salvador, Martinica, Colômbia, Argentina e Brasil (Lima et al., 2003; Macoris et al. 2003; Braga et al., 2004; Beserra et al., 2007; Lazcano et al., 2009; Marcombe et al., 2009; Llinás et al., 2010; Horta et al., 2011; Grisales et al., 2013); Lima et al., 2006; Lima et al., 2011). Devido aos relatos de resistência a organofosforados, que vinham sendo utilizados há cerca de três décadas contra *Ae. aegypti* no Brasil, ao final dos anos 1990 o Programa Nacional do Controle de Dengue adotou a substituição do larvicida temephos por *Bti* ou compostos IGRs. Além disso, os adulticidas foram substituídos por piretroides entre os anos 2000-2001 (Braga e Valle, 2007b). No entanto, poucos anos após foram identificadas populações do vetor resistentes também a piretroides

(Da-Cunha et al., 2005). Publicações seguintes comprovaram a resistência a piretroides em diversas regiões do país (Macoris et al., 2007; Martins et al. 2009a; Lima et al., 2011; Medeiros, 2011; Linss et al., 2014; Bellinato et al., 2016). Além do Brasil, países da América Latina, Ásia, Oriente Médio e África também vem detectando resistência de *Ae. aegypti* a piretroides, principal classe de inseticidas atualmente utilizada, principalmente na forma de *sprays* em residências e por termo-nebulização pela iniciativa privada (Moyes et al., 2017).

Em setembro de 2014 foram confirmados os primeiros casos autóctones de chikungunya no Brasil, registrados nos municípios de Oiapoque, Amapá e Feira de Santana, Bahia (Nunes et al., 2015). Após confirmar os primeiros casos da doença, com centenas de casos suspeitos, Oiapoque decretou situação de emergência. Além da atenção ao paciente, o Ministério da Saúde recomendou intensificação na eliminação dos criadouros do *Ae. aegypti* e bloqueio pelo uso de adulticidas (MS, 2014). A região do Oiapoque é de particular interesse, entre outros por ser rodeada pela densa Floresta Amazônica e fazer fronteira com a Guiana Francesa. A localidade é endêmica em uma série de doenças, incluindo as causadas por agentes etiológicos transmitidos por artrópodos, tem grande circulação de pessoas que cruzam a fronteira, com destaque aquelas vindas do extrativismo ilegal em áreas silvestres, como garimpos. É portanto, uma importante porta de entrada do país para quem vem da selva amazônica e do Caribe rumo a Macapá, capital do estado, e de lá para as diversas regiões do Brasil.

Pela proximidade com a Guiana Francesa e intenso fluxo de pessoas entre os dois países, as populações naturais do vetor sofrem influência de diferenciadas formas de combate, estando sujeitas a pressões seletivas simultâneas com diferentes classes de inseticidas. No Brasil, a recomendação vinha sendo a do uso de IGRs inibidores da síntese de quitina contra larvas e do organofosforado malathion contra adultos. Durante nossa coleta, no entanto, fomos informados que o controle químico vinha sendo exercido exclusivamente com piretroides. Além disso, presenciamos agentes do exército parar nosso ônibus de Oiapoque sentido Macapá para aplicação de inseticida piretroide dentro do veículo (*sprays*). Do lado da Guiana Francesa, pelo menos até 2014, o piretroide deltametrina era o único adulticida para

aplicações espaciais no passado recente, embora organofosforados (malathion e fenitrothion) tenham sido usados anteriormente. Aplicações intradomicílio contra anofelinos e telas impregnadas também utilizam deltametrina. O uso doméstico de piretroides também é altamente praticado na Guiana Francesa (Isabelle Dusfour, dados não publicados).

Perfis de susceptibilidade à inseticidas piretroides e organofosforados

Neste trabalho, detectou-se os perfis de resistência em *Ae. aegypti* de Macapá e Oiapoque aos organofosforados temephos (larvicida) e malathion (adulticida), mas principalmente ao piretroide deltametrina (adulticida). A OMS recomenda doses discriminatórias e tempos de exposição específicos, de acordo com o inseticida e a espécie do inseto (OMS, 2016f); (WHOPES, 2016b). Os bioensaios do tipo dose-diagnóstica, por exemplo, preconizam a exposição do inseto a uma única concentração do inseticida, durante 1 hora. O resultado discrimina a população como susceptível ou resistente, de acordo com a mortalidade observada 24h após aquela exposição. Este é, portanto, um ensaio qualitativo (Halliday e Burnhaw, 1990).

Ensaio quantitativos do tipo dose-resposta permitem o cálculo das concentrações letais (CLs) e razões de resistência (RRs). Uma vez que diversas doses são utilizadas, toda a heterogeneidade da população é considerada, fornecendo maiores informações sobre o perfil de susceptibilidade/ resistência da população (Halliday e Burnham, 1990). O ensaio do tipo tempo-resposta é intermediário entre dose-diagnóstica e dose-resposta, portanto de forma geral poderia ser considerado um teste semi-quantitativo. Este ensaio apresenta mais informações do que uma análise dose-diagnóstica e requer menor quantidade de insetos, além de menos gastos com insumos do que a dose-resposta (OMS, 1970; Brogdon e McAllister, 1998). No entanto, alguns parâmetros (como tempo total de exposição) devem ser melhor definidos a fim de que possa ser amplamente utilizado de forma comparável entre diferentes grupos de pesquisa.

A dose a ser utilizada para os ensaios do tipo tempo-resposta é também um parâmetro que precisa ser bem definido. Para isso, devem ser levados em consideração os diferentes níveis de resistência observados em populações

naturais do inseto. Talvez a primeira escolha seria utilizar a dose discriminatória dos ensaios dose-diagnóstica indicados pela OMS, como tem feito diversos trabalhos. No caso de deltametrina a dose indicada é de 0,3 g/L (WHOPES, 2016), mas que não seria suficiente para analisar Oiapoque, por exemplo. Tentamos adotar uma dose intermediária entre Macapá e Oiapoque, a fim de que pudéssemos utilizá-la para se obter *knockdown* ou mortalidade naquela dose para ambas as populações. No entanto, avaliações com outras populações seriam necessárias para que estas doses sejam sugeridas de forma geral para *Ae. aegypti* do país.

Outro fator importante a ser determinado é a correlação entre as razões de resistência obtidas por ensaios dose e tempo-reposta. Por exemplo, para Macapá a RR_{50} de deltametrina foi 14 vezes menor no ensaio tempo-resposta. No entanto, para Oiapoque essa diferença foi de seis vezes. Talvez estes ensaios meçam diferenças intrínsecas da população, como os diferentes mecanismos selecionados para a resistência.

Nas diferentes avaliações para o perfil de susceptibilidade, as duas populações testadas demonstraram altos níveis de resistência para o piretroide deltametrina e certa tolerância ao organofosforado malathion. Muito provavelmente, o perfil de Oiapoque sofreu influência da fronteira com Guiana Francesa, pois embora pertençam ao mesmo estado, o município e a capital Macapá ficam distantes 590 km, de modo que a densa floresta e o acesso precário entre as duas cidades deve limitar o fluxo gênico entre suas populações de mosquito, favorecendo o estabelecimento de distintos perfis e mecanismos de resistência.

Com relação ao temephos, Oiapoque foi cerca de três vezes mais resistente que Macapá, considerando-se suas RR_{50} do ensaio dose-resposta. Dados anteriores sobre a resistência a temephos em Macapá mostraram uma variação de RR_{50} de 8,3 em 2004 (Braga et al., 2005) a 9,1 em (Araújo et al., 2013). No presente estudo observamos uma diminuição da RR_{50} para 6,5. Esta diminuição pode estar relacionada à substituição do larvicida por IGRs idealizada para o país inteiro desde 2009 (Bellinato et al., 2016). Em 2010 Oiapoque já exibia uma RR_{50} de 42,1 (Araújo et al., 2013), ou seja, 4,6 vezes maior que a de Macapá naquele ano. Na coleta de 2014/2015 aqui avaliada, a RR_{50} de Oiapoque diminuiu pela metade, ficando em 21,8. Ainda assim, cerca

de 3,3 vezes maior que a de Macapá no mesmo ano. De forma geral no país, entre 1999 e 2011 a resistência a temephos vinha aumentando (Chediak et al., 2016).

A resistência a inseticidas pode ter como efeitos colaterais uma série de problemas no *fitness* do inseto em ambientes livres do inseticida, que podem ser percebidos em parâmetros de desenvolvimento e reprodução da tabela de vida (Belinato e Martins, 2016). Isto tem sido notado em populações naturais (Belinato et al., 2012) e de laboratório (Brito et al., 2013; Araújo et al., 2013) de *Ae. aegypti* resistentes a temephos. Desta forma, é esperado que a resistência a este organofosforado esteja diminuindo em populações de *Ae. aegypti* do Brasil, uma vez os larvicidas em uso são das classes *Bti* e IGRs inibidores da síntese de quitina. Por exemplo, nas cidades de Duque de Caxias/RJ, Campo Grande/MS, Juazeiro do Norte/CE, Santarém/PA e Parnamirim/RN, os níveis resistência ao temephos decresceram em 40% nas duas primeiras, 30% em Juazeiro do Norte após substituição por *Bti* e 15% nas duas últimas (Lima et al., 2011; Garcia, 2012). Por outro lado, isto não é regra, já que o uso de outros compostos pode selecionar mecanismos de resistência cruzada a outros inseticidas. Este pode ser o caso de dois municípios do Ceará, Crato e Barbalha, onde houve um aumento expressivo da RR_{95} : 21 (9,0 para 192,7) e 4 (7,5 para 30) vezes, respectivamente (Lima et al., 2011).

Havia preocupação de que o malathion fosse ser ineficiente contra populações resistentes a temephos. Ensaio dose diagnóstica com malathion a 8 g/L já haviam indicado resistência em populações de *Ae. aegypti* do nordeste (Aracaju, Itabaiana e Recife) e do estado de São Paulo (Araçatuba e Santos), coletadas em 1999 (Macoris et al., 2007). Aqui, observou-se RR_{50} de 3,1 e 6,0, para malathion em Macapá e Oiapoque, respectivamente, que de fato indica resistência ao composto em ambas as localidades. Como não havia registro de uso recente de malathion até 2014 no Amapá e na Guiana Francesa, e considerando os resultados com temephos, sugere-se que esta resistência pode ser fruto de resistência cruzada previamente selecionada pelo larvicida, ou por resistência cruzada selecionada pelos piretroides, há mais tempo utilizados no controle de outros vetores.

Vale aqui ressaltar que a dose discriminatória para os ensaios qualitativos dose-diagnóstica de malathion recomendada pela WHOPES, como

visto acima, é de 0,8% (WHOPES, 2016a). Considerando então os resultados observados em nosso ensaio dose-resposta para esta dose (8,0 g/L), temos taxas de mortalidade de 87,3 e 30,9%, respectivamente, para Macapá e Oiapoque. Portanto, em uma análise qualitativa ambas as populações poderiam ser consideradas como resistentes a malathion, já que a mortalidade à dose-diagnóstica foi inferior a 90% (OMS, 2016).

Malathion foi contraindicado desde 2009 na Guiana Francesa, porém devido ao alto nível de resistência a piretroides e à entrada do vírus chikungunya no país, as autoridades recomendaram o uso provisório do composto para controle de *Ae. aegypti*. Testes indicaram resistência para a dose de 8 g/L, porém susceptibilidade para 50 g/L (Girod e Dusfour 2014), doses diagnósticas segundo a WHOPES para controle de *Ae. aegypti* e anofelinos, respectivamente (WHOPES, 2016). Nessas condições, em agosto de 2014 foi autorizado o uso de malathion por um período de 180 dias. O uso do IGR piriproxifeno e estímulo à iniciativa da estratégia de liberação de mosquitos com *Wolbachia* foram também considerados para reforço ao controle do vetor na região (Girod e Dusfour, 2014). Vale ressaltar que as coletas realizadas para o presente estudo ocorreram em dezembro de 2014, de forma que muito provavelmente o uso do malathion ainda não estava difundido na localidade, o que significa que aquelas regiões ainda não estavam sofrendo pressão de seleção por malathion no momento da coleta.

Além do bioensaio dose-resposta com adultos, realizamos também uma análise semi-quantitativa, em que o tempo de mortalidade sob exposição a malathion a 7,0 g/L foi acompanhado por até 3h. Baseando-se no TL₅₀ das populações e de Rockefeller, Macapá e Oiapoque apresentaram RR₅₀ de 1,6 e 1,9, respectivamente. Este tipo de ensaio fornece mais indicadores do que de dose-diagnóstica, que é puramente qualitativo. Tem ainda a vantagem de necessitar de muito menos espécimes e ser menos laborioso que o de dose-resposta. Por outro lado, as RRs obtidas apresentam uma escala diferenciada àquela dos ensaios dose-resposta e as proporções não foram mantidas. Aqui, por exemplo: 3,1/ 1,6 e 6,0/ 1,9 (RR₅₀ dose-resposta/ RR₅₀ tempo-resposta) em Macapá e Oiapoque, nesta ordem. Portanto, deve-se ter atenção ao se comparar dados de RR provenientes de diferentes tipos de bioensaios.

Bioensaios realizados para avaliação de susceptibilidade ao piretroide deltametrina também revelaram ainda maior tolerância nas populações do Amapá. Em larvas, os tempos médios de *knockdown* (KT_{50}) geraram índices de susceptibilidades (IS) de 30 e 36 para Macapá e Oiapoque, respectivamente, tendo por base a linhagem Rockefeller com IS igual a 4. O IS gera uma escala de 1 a 36, de forma que quanto maior o índice, maior a tolerância ao inseticida (Kawada et al. 2009; Silva et al., 2014). Embora piretroides não sejam empregados como larvicida, é interessante fazer esse tipo de ensaio a fim de se investigar se os mecanismos selecionados para resistência tenderiam a ser estágio específicos.

Em adultos a resposta à deltametrina não foi diferente. Nos ensaios do tipo dose-resposta a maior dose utilizada em Rockefeller foi de 0,045 g/L, enquanto em Macapá e Oiapoque foram necessárias doses de 2 e 3,2 g/L, nesta ordem. Ainda sim, Oiapoque obteve mortalidade média máxima de 60%. As RR_{50} nessas populações foram de 46,4 em Macapá e 143,9 em Oiapoque. Ou seja, Oiapoque precisou de uma concentração três vezes maior de deltametrina para a mortalidade de 50% de sua população, comparado a Macapá.

A dose discriminatória de deltametrina indicada pela WHOPEs, que é de 0,3 g/L (WHOPEs, 2016), foi portanto suficiente para mortalidade de 100% de Rockefeller, mas nem de longe ideal para avaliação das populações do Amapá. Este fato se soma às argumentações de que os papéis fornecidos pela OMS para os seus ensaios padronizados, além de todos os problemas burocráticos de aquisição, não atendem para algum tipo de comparação entre populações naturais resistentes a piretroides. Pelos mesmos motivos acima mencionados para malathion, comparamos também os resultados de dose-diagnóstica do piretroide com o perfil obtido em um teste tempo-resposta. Neste caso, foi utilizada uma dose única de 1,2 g/L, que entendemos ser intermediária entre Macapá e Oiapoque, para avaliação do tempo de *knockdown* em até 5h de exposição. Todo esse tempo foi suficiente para provocar *knockdown* em 86% de Oiapoque, ao passo que 100% de Rockefeller e Macapá caíram em 15 e 50 minutos, respectivamente. A RR_{50} de Oiapoque (24,9), baseada no tempo de *knockdown*, foi sete vezes maior que a de Macapá (3,4). Aqui novamente, chama-se atenção para que, embora se guarde a relação entre a população

mais ou menos resistente, a escala das RRs para este tipo de ensaio é mais curta que para os ensaios dose-resposta.

Populações brasileiras de *Ae. aegypti* avaliadas entre 2009 e 2012 apresentaram RR₅₀ passando por 6 (Caiacó, CE), 12,5 (Parnamirim, RN), 49 (Cachoeiro de Itapemirim, ES) e 61 (Campo Grande, MT) (Lima et al., 2011; Bellinato et al., 2016). Ou seja, dentro da literatura conhecida por nosso grupo, nenhuma população brasileira de *Ae. aegypti* até então apresentou níveis tão altos de resistência a piretroide como Oiapoque (143,9), indicando a urgência de um plano de controle químico mais efetivo na região.

Na Guiana Francesa, resistência a piretroide também tem sido observada por todo território, com menores taxas de mortalidade na capital Cayenne (Girod e Dusfour, 2014). Ensaio qualitativos com uma dose diagnóstica de 0,6 g/L de deltametrina evidenciaram taxas de mortalidade variando entre 14% em Saint Laurent du Maroni a 30% em Saint Georges de l'Oyapock, localidade de fronteira com Oiapoque (Dusfour et al., 2011; Dusfour et al., 2015). Adicionalmente, Dusfour e colaboradores (2011) avaliaram a eficácia da formulação AquaK'othrine® ao qual deltametrina é o princípio ativo, onde a amplitude da mortalidade ficou entre 9 e 17% para aquelas mesmas populações. Em ensaio tempo-resposta, as populações de Cayenne e Saint Georges de l'Oyapock precisaram de mais de 8h de exposição à deltametrina a 0,5 g/L para atingir 50% de *Knockdown* (Faucon et al., 2015). Com isso, fica clara a baixa eficiência de piretroide contra *Ae. aegypti* tanto na Guiana Francesa como no Brasil.

Mecanismos selecionados para a resistência

Entre os principais mecanismos fisiológicos selecionados para resistência, os mais estudados são os chamados modificação do sitio-alvo e a resistência metabólica (Hemingway e Ranson 2000; Montella et al., 2007). Alterações no gene do sítio alvo dos piretroides e nos níveis de expressão de enzimas relacionadas à detoxificação foram aqui investigadas.

Com relação à detecção das mutações no gene do canal de sódio (*Nav*) relacionadas à resistência ao efeito *knockdown* (mutações *kdr*), foram identificados os alelos *NavR1* em Macapá (84%) e Oipaoque (23%), além do

NavR2 somente em Oiapoque (67%). Estas mutações possuem caráter recessivo, de forma que os genótipos propícios para a resistência (R1R1, R1R2 e R2R2) somaram 71,4 e 79,8% em Macapá e Oiapoque, respectivamente. O alelo *NavR2* confere maiores níveis de resistência (Souza, 2014), o que justifica em parte a maior RR observada em Oiapoque. De modo geral, no Brasil as populações mais resistentes a piretroides apresentam maiores frequências do alelo *NavR2* (Linss et al., 2014; Bellinato et al., 2016).

A distribuição dos alelos *kdr* em *Ae. aegypti* no Brasil tende a ser regionalizada, coincidindo com a disposição dos dois principais grupos populacionais no país (Monteiro et al., 2014). O alelo *NavR2* é encontrado em baixas frequências ou ausente nas regiões mais ao Norte-Nordeste, com exceção de Roraima, e frequências altas nas regiões Centro-Sul do país. Já o alelo *NavR1* está presente por todas as regiões do país (Martins et al., 2012; Linss et al., 2014; Bellinato et al., 2016; Collet et al., 2016; Dolabella et al., 2016).

Em *Ae. aegypti* de Guadalupe, no Caribe, foi observada a presença do alelo *NavR3* (1016 Ile^{*kdr*} + 1534 Phe⁺) em indivíduos heterozigotos de genótipo R2R3 (Dusfour et al., 2015). Como a população do Oiapoque contém certa semelhança com populações do Caribe, é possível que aquele alelo também estivesse ali presente. De fato, o aqui chamado genótipo SR2 pode conter na verdade indivíduos SR2 e R1R3, indistinguíveis pelo método de genotipagem utilizado¹. Contudo, como em Oiapoque a frequência do *NavR2* foi alta e não tivemos nenhuma evidência de outros genótipos contendo o *NavR3* (R3R3, SR3 e R2R3), consideramos que este alelo não estava presente e, portanto, o genótipo SR2 devia conter de fato somente indivíduos SR2.

Um estudo observando a evolução dos alelos *kdr* em populações mexicanas de *Ae. aegypti* sugeriu que o alelo *NavR1* (mutação no sítio 1534 apenas) tenha surgido antes, conferindo menores níveis de resistência a piretroide. Em seguida, uma mutação no sítio 1016 deste alelo teria originado o alelo *NavR2*, conferindo maiores níveis de resistência e, portanto, mais rapidamente selecionado. Adicionalmente, o alelo *NavR3* conferiria um alto

¹ O genótipo SR2 [S (1016 Val + 1534 Phe), R2 (1016 Ile + 1534 Cys)] é determinado pela detecção de heterozigoto em ambos os sítios 1016 (Val/Ile) e 1534 (Phe/Cys). No entanto, tal resultado poderia também configurar o genótipo R1R3 [R1 (1016 Val + 1534 Cys) e R3 (1016 Ile + 1534 Phe)].

custo evolutivo e, portanto, tenderia a ser perdido (Vera-Maloof et al., 2015). De fato outro estudo envolvendo populações de diversas partes do mundo sugere que a mutação 1534Cys^{kdr} tenha sido selecionada pela pressão dos programas de erradicação, com uso de DDT, nas décadas de 1940 e 1950. Nos anos seguintes, populações de *Ae. aegypti* já carregando essa mutação teriam se dispersado por diversos locais do mundo (Kawada et al., 2016).

Seja como tenha sido, as mutações *kdr* Val1016Ile e Phe1534Cys estão disseminadas na América Latina e no Caribe (Garcia et al., 2016; Ponce-García et al., 2016). Por exemplo, a mutação *kdr* no sítio 1016 apresentou frequência mínima de 87% em populações de *Ae. aegypti* da Martinica (Marcombe et al., 2012). No México, foi detectado um rápido aumento da frequência da mutação 1016Ile no período de 1996 a 2009 em um cenário de intensa pressão de seleção (García et al., 2009)). Em Porto Rico houve fixação do 1016Ile em quatro populações (Canovanas, Caguas, Carolina e Ponce), bem como do alelo 1534Cys em três de oito populações avaliadas (Caguas, Carolina e Guaynabo) (Ponce-García et al., 2016). Percebe-se portanto, que estavam tratando do que aqui chamamos de alelo *NavR2* (mutante em ambos os sítios).

Além das mutações nos sítios 1016 e 1534, que nos configuram os alelos *NavR1* e *NavR2*, investigamos a presença da mutação Ile/Met no sítio 1011 no segmento IIS6 do *Nav*. Esta mutação parece não estar diretamente relacionada à resistência a piretroides (Souza, 2014), contudo havíamos já associado o alelo mutante 1011 Met com duplicação no *Nav* (Martins et al., 2013). As duplicações de genes de sítios-alvo podem contribuir significativamente para a evolução da resistência aos inseticidas, pois elas permitem que mutações adaptativas ocorram na cópia duplicada, sem prejudicar então a função primária do gene a que deu origem.

Duplicações em alvos de inseticidas estão bem descritas para o gene *ace - 1* de *Anopheles gambiae* e *Culex* (Weill et al., 2004) e para o gene *rdl* que confere resistência a ciclodienos em *Drosophila melanogaster* (Remnant et al., 2013). No entanto duplicações no *Nav* de mosquitos foi descrito pela primeira vez por Xu et al. (2011) em *Cx. quinquefasciatus* e, em seguida no *Ae. aegypti* (Martins et al. 2013), mas ainda não se sabe ao certo sua relação com a resistência.

Aqui a substituição Ile1011Met foi observada apenas em Macapá, em 28,6% dos indivíduos, todos em heterozigose. Este mesmo perfil havia sido observado em *Ae. aegypti* de localidades de diversas regiões do Brasil, como Aparecida de Goiânia, Campo Grande, Cuiabá, Dourados, Uberaba, Cachoeiro do Itapemirim, Colatina e Foz do Iguaçu (Martins et al., 2013). A coleta de Macapá de 2003 não apresentou a mutação Ile1011Met (Martins et al., 2009a); (Martins et al., 2013).

Aqui foram realizados ensaios de avaliação de variação do número de cópias (Nc) do gene do *Nav* nas populações de *Ae. aegypti* do Amapá. Nas duas populações foram obtidos o número máximo de quatro cópias. Em população selecionada com o inseticida deltametrina em laboratório haviam sido identificadas até 10 cópias deste gene (Martins et al. 2013). Aqui, os indivíduos com maior número de cópias (Nc ~ 4) eram heterozigotos para alelo alelo *NavS* (SR1 em Macapá e SR2 em Oiapoque), além de um indivíduo SS em Macapá (Tabela 12). Estes genótipos foram confirmados por sequenciamento.

Conforme Martins et al. (2009), as sequências da região IIS6 do *Nav* de *Ae. aegypti* podem ser divididas em dois tipos: “A” (com íntron maior) e “B” (com íntron menor). Esta mesma diferença foi observada por Kawada et al. (2016) que agrupou as sequências da região IIS6 do *Nav* de *Ae. aegypti* de diversos locais do mundo em dois clados (chamados 1 e 2, para o que seria os nossos grupos “B” e “A”, respectivamente). A presença da duplicação foi inicialmente evidenciada com a configuração: um cópia de sequência tipo “A” 1011 Met mais uma cópia de sequência do tipo “B” Ile 1011 (Martins et al. 2013). Como nesta configuração não havia mutação nos sítios 1016 e 1534, este alelo seria classificado como *NavS* (Linss et al., 2014).

Aqui, observou-se que em Macapá todos os indivíduos 1011 Ile/Met eram de genótipo SR1 e tinham $Nc \geq 3$. Adicionalmente alguns indivíduos sem mutação no sítio 1011 (todos R1R1) apresentaram Nc próximo a 3 (veja tabela 12). Da mesma forma em Oiapoque, onde não se observou a mutação Ile1011Met, alguns indivíduos SR2, R1R2 e R2R2 apresentaram $Nc \geq 3$. Isto sugere, portanto, que deve haver outros alelos duplicados além daquele *NavS* com a mutação Ile1011Met previsto anteriormente.

Entre as sequências IIS6 analisadas de Macapá, os indivíduos Ile/Met SS e SR1 (Tabela 12) apresentaram sequências de ambos os tipos “A” e “B”. Todas as sequências do tipo “A” tinham a mutação 1011 Met. Ou seja, essas amostras devem ter a duplicação do alelo *NavS*, conforme sugerido anteriormente (Martins et al., 2013). Já o indivíduo R1R1 tinha apenas sequências do tipo “B”, sem a mutação 1011 Met. Ou seja, deve haver alelo *NavR1* duplicado. Para Oiapoque, todos os quatro indivíduos SR2 tinham sequências “A” e “B”. A mutação no sítio 1016, que configura o alelo *NavR2*, só esteve presente em sequências do tipo “A”, como previamente observado (Martins et al. 2013). Como indivíduos R2R2 apresentaram $N_c > 2$, a duplicação deve ter alelos duplicados em *NavS* (mas diferenciado daquele de que Macapá) e também de *NavR2*. Ou seja, tanto as formas sem e com mutação nos sítios 1011, 1016 e 1534 do *Nav* devem estar duplicadas e segregando nas populações naturais de *Ae. aegypti*. Uma reanálise de populações brasileiras previamente abordadas e o sequenciamento de mais amostras vai permitir uma melhor clareza sobre composição, distribuição e efeito das duplicações do *Nav* na resistência a piretroides.

Diferentemente para o sítio-alvo dos inseticidas, marcadores moleculares para a resistência metabólica são mais variados e complexos. Uma vez que superfamílias gênicas, envolvendo centenas de genes, tem papel fisiológico na detoxificação de xenobióticos, o estudo da resistência metabólica por alteração na expressão destes genes geralmente envolve métodos de avaliação em larga escala, como plataformas de *microarray* (Strode et al., 2008; Marcombe et al., 2009; Saavedra-Rodriguez et al., 2014), sequenciamento de transcriptomas (David et al., 2014) ou genomas parciais e inteiros (Faucon et al., 2015). Contudo, em se tratando de uma função biológica bastante redundante, ou seja diversos genes envolvendo funções semelhantes, é esperado que em populações distintas de insetos sejam selecionadas alterações em diferentes genes. Com isso, é difícil se determinar um marcador genético para a resistência, como se tem para mutações nos sítios-alvos de inseticidas, que tendem a ser bastante conservadas (Strode et al., 2012). Ainda assim, superexpressão em alguns genes específicos relacionada à resistência a inseticidas tem sido observada em mosquitos.

Múltiplos genes de P450, especialmente das subfamílias CYP6 e CYP9, tem sido relacionados à resistência a piretroides, ou mesmo a múltiplos inseticidas. Entre os mais consistentemente superexpressos em populações resistentes de *Ae. aegypti* citam-se *CYP9J10*, *CYP6BB2*, *CYP9J26* e *CYP9J28*, para os quais mostrou-se que seus produtos metabolizam piretroides (Kasai et al., 2014; Stevenson et al., 2012). Análises de transcriptômica indicaram superexpressão de *CYP9J28* e *CYP6BB2* em populações naturais de *Ae. aegypti* ou linhagens selecionadas para resistência a piretroides de Cuba, Cayman, México, Peru e Singapura (Moyes et al., 2017), ou seja, em populações não relacionadas, de diferentes continentes. Adicionalmente, o *CYP9J28* conferiu resistência a estes compostos quando expresso de forma transgênica em *Drosophila* (Pavlidis et al., 2012).

Para resistência a temefos, diversos genes P450 também tem sido identificados, mas não tão consistentemente os mesmos como no caso da resistência a piretroides. Entre os que foram superexpressos em populações ou linhagens de *Ae. aegypti* resistentes a temefos citam-se *CYP6N12* (Brasil e Colômbia), *CYP9M9* (Tailândia, México e Peru), *CYP4H28* (Tailândia, México e Peru) e *CYP6F3* (Colômbia, México e Peru) (Moyes et al., 2017).

Aqui avaliamos por qPCR a expressão de alguns dos genes previamente encontrados mais expressos em populações de *Ae. aegypti* da América Latina (Marcombe et al., 2009; David et al., 2013; Faucon et al., 2015). Os resultados encontrados apontaram a expressão aumentada em fêmeas com três dias de adulto dos genes de P450 *CYP6BB2*, *CYP9J10*, *CYP9J28* em Macapá e Oiapoque. Entre estes, o *CYP6BB2* foi o mais expresso, cerca de seis vezes em ambas as populações, com relação a Rockefeller. Este foi também o gene mais expresso, cerca de 34, 13 e 14 vezes, respectivamente em *Ae. aegypti* da Guiana Francesa, Guadalupe e Caledônia (Dusfour et al., 2015). *CYP9J10* também foi superexpresso em cerca de quatro vezes naquelas três populações caribenhas, além do *CYP9J28*, em cerca de 13 vezes em Caledônia (Dusfour et al., 2011).

Entre pelo menos nove genes com expressão alterada, o único que demonstrou correlação com presença da mutação *kdr* (no caso a Val1016Gly) foi o gene *CYP9J28* (Faucon et al., 2015). Aqui, o gene *CYP9M6* foi o menos expresso (abaixo de duas vezes, com relação a Rockefeller) em ambas as

populações. A propósito, este mesmo gene estava subexpresso em adultos de *Ae. aegypti* da Martinica resistentes a temephos (Marcombe et al., 2009). Por outro lado, este mesmo gene esteve superexpresso acima de 20 vezes, na população da Caledônia que apresentou fenótipo susceptível nos bioensaios com o inseticida deltametrina e teve ausência das mutações *kdr* relacionada a resistência (Dusfour et al., 2015). David et al. (2013) destacaram que *CYP9J24*, *CYP9J28* (no México) e *CYP9J32* (no México, Tailândia e Vietnã) metabolizam permetrina, com a última também metabolizando deltametrina. Os diferentes padrões de expressão nas distintas regiões geográficas indicam que a resistência depende não só da expressão, mas do *background* genético da população, de sua dinâmica populacional e da pressão a qual está submetida (Faucon et al., 2015).

Além de genes das P450, aqui foi avaliada a expressão de um gene da superfamília CCE de carboxilesterase *CCEae3a*, que foi superexpresso entre quatro (Macapá) e sete (Oiapoque) vezes, com relação a Rockefeller. Este mesmo gene esteve cerca de oito vezes mais expresso em adultos de *Ae. aegypti* da Martinica resistentes a temephos e piretroide (Marcombe et al., 2009), assim como em acima de três vezes na Guiana Francesa, Martinica e Caledônia (Dusfour et al., 2015). Populações da Tailândia resistentes a deltametrina e temephos apresentaram esse gene mais expressos do que populações de Cayenne e Saint Georges, altamente resistentes a deltametrina (Faucon et al., 2015). Ainda mais duas CCE (*CCEae4A* e *CCEae6A*) tiveram elevada expressão nas populações asiáticas, inferindo a importância dessa classe de enzimas nas populações avaliadas (Faucon et al., 2015). As carboxilesterases tem sido frequentemente relacionadas à resistência a organofosforanorados e carbamatos, seja por sequestro ou metabolismo direto do inseticida (Montella et al., 2012). Em *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, os produtos de *CCEae3a* e *CCEae6a*, são alfa-esterases candidatos principais para a resistência a temephos, já que sequestram fortemente e metabolizam lentamente a molécula temephos oxon (Grigoraki et al., 2016).

De fato, superexpressão de *CCEae3a* foi observada em populações de *Aedes* resistentes a temephos dos continentes americano, asiático e europeu (Moyes et al., 2017). Contudo, apesar da importância das CCEs, a resistência a temephos parece ser multivariada, envolvendo outras enzimas metabólicas

como múltiplas P450 e GSTs, como sugerido por mapeamento de loci quantitativos (do inglês QTL, *quantitative trait loci*) e transcriptoma (Strode et al., 2012; Saavedra-Rodriguez et al., 2014; Paiva et al., 2016).

Adicionalmente, outras enzimas da resistência metabólica podem estar envolvidas. Por exemplo, há evidências indiretas da participação de GSTs na resistência a piretroides em *Ae. aegypti*. No Brasil, à grosso modo, a disseminação da resistência a piretroides foi sendo acompanhada por aumento da atividade de GSTs, avaliada por ensaios bioquímicos (Montella et al., 2007; Bellinato et al., 2016). Além de esterases altamente alteradas, na coleta entre 2009 e 2011, Macapá e Oiapoque também apresentaram alteração nas GST, mas não nas P450 (Araújo et al., 2013). Bioensaios com *Ae. aegypti* resistentes da Martinica mostraram que a RR_{95} a piretroides diminuiu de 76 para 41 e 43 vezes quando sinergistas de P450 e GST, respectivamente, foram utilizados. Da mesma forma, a RR_{95} a temephos diminuiu de 175 para 60 e 40, com aqueles mesmos sinergistas (Marcombe et al., 2009). Ensaios moleculares, com silenciamento gênico via RNAi, evidenciaram a importância dos genes *GSTE2* e *GSTE7* na resistência a piretroides em *Ae. aegypti* (Lumjuan et al., 2011).

Genes de outras famílias além das clássicas P450, CCE e GSTs podem também ser importantes na resistência a inseticidas em *Ae. aegypti*. Por exemplo, as UDP-glicosil-transferases (UGTs), estavam superexpressas em linhagens resistentes a ambos piretroides e temephos (Saavedra-Rodriguez et al., 2014; Faucon et al., 2015). Outras enzimas importantes potencialmente envolvidas na resistência incluem os transportadores ABC, sulfotransferases, aldeído oxidases, álcool desidrogenases e desidrogenases de cadeia curta (Moyes et al., 2017).

Considerando-se então que a expressão aumentada destes genes P450 aqui estudados podem estar contribuindo com a resistência a piretroides em Macapá e Oiapoque, e uma vez que apresentaram níveis de expressão similares, sugere-se que o alelo *kdr NavR2* deve estar sendo preponderante para a alta resistência a deltametrina em Oiapoque. Análise de populações de *Ae. aegypti* da Arábia Saudita revelaram que altos níveis na expressão de genes P450 mostraram relação com resistência a piretroide. Contudo, o que mais se relacionou com altos níveis de resistência foi a combinação de

mutações *kdr* nos sítios 989 e 1016 (989Phe + 1016Gly) (Nazawi et al., 2017). No caso da *CCEae3a*, de fato a expressão foi mais aumentada em Oiapoque. Portanto, considerando-se a revisão bibliográfica acima discutida a cerca de sua participação na resistência a temephos, os dados daqui corroboram maior participação da resistência metabólica na adaptação aos organofosforados.

A participação de outros mecanismos não pode ser descartada, como espessamento de cutícula, que evita a penetração do inseticida (Hemingway et al., 2004; Nkya et al., 2013; Kasai et al., 2014). No vetor africano de *Plasmodium* da malária *Anopheles funestus* (Giles, 1900), indivíduos com aumento no espessamento da cutícula, somado a superexpressão de genes CYP, apresentavam resistência a piretroides (Wood et al., 2010). Este tipo de mecanismo dificulta ou atrasa a entrada do inseticida no organismo do inseto, potencializando o efeito das enzimas detoxificantes. Estudos neste sentido devem ser conduzidos em populações brasileiras de *Ae. aegypti*.

Esta dissertação contribuiu para o conhecimento sobre o perfil e os principais mecanismos envolvidos na resistência a piretroides e organofosforados, em Macapá e Oiapoque (AP, Brasil). Um maior grau de resistência era esperado em Macapá, tendo em vista que constitui a capital do Estado, logo, o município mais populoso e urbanizado. Acreditava-se ocorrer maior uso de inseticidas nesse município, seja por medidas sanitárias do governo ou pelo uso de inseticidas domésticos, o que elevaria significativamente a resistência ao piretroide deltametrina neste último caso. Entretanto, a maior proximidade de Oiapoque com Guiana Francesa sustenta a hipótese de que ocorra maior fluxo gênico entre essas duas localidades do que com a capital, Macapá. Como já descrito aqui, populações de *Ae. aegypti* caribenhas possuem grau elevado de resistência a inseticidas, podendo influenciar na alta resistência de Oiapoque aos compostos aqui estudados.

Deste modo, este estudo ressalta que a estratégia baseada em controle químico com o uso de inseticidas neurotóxicos em Macapá e Oiapoque, para o bloqueio de dengue, Zika e chikungunya está gravemente comprometido. Logo, medidas sanitárias alternativas, bem como melhor conscientização da população devem ser as maiores aliadas no controle do *Ae. aegypti* nessas regiões.

6. CONCLUSÕES

- As populações de *Ae. aegypti* do Amapá, principalmente Oiapoque, apresentam alta resistência à deltametrina, sugerindo que os piretroides devem ser ineficazes no combate ao vetor naquela região. Para o organofosforado malathion, uma menor razão de resistência foi observada, exigindo um constante monitoramento, bem como a realização de um ensaio de eficácia em condições de campo.
- Análise das mutações *kdr* indicou a predominância do alelo *kdr NavR1* em Macapá e do *NavR2* em Oiapoque. Isso explica a resistência a piretroide nas populações, bem como o fato de Oiapoque ser mais resistente.
- A mutação Ile1011Met foi observada em Macapá e foi associada a duplicação do gene *Nav*, como previamente indicado. Contudo, conclui-se que outros alelos duplicados estão presentes tanto em Macapá, quanto em Oiapoque. Mais estudos devem ser feitos para a compreensão desse processo e o envolvimento com a resistência a inseticidas.
- A expressão aumentada dos genes P450 de monooxigenases aqui estudados podem estar contribuindo para a resistência aos inseticidas organofosforados e piretroides nas populações de *Ae. aegypti* do Amapá. Maior expressão de *CCEae3a* deve estar contribuindo com a resistência ao malathion. Como o aumento de expressão dos genes investigados relacionados à resistência metabólica foi similar entre as populações, outros genes (ou ainda outros mecanismos) podem explicar maior resistência de Oiapoque ao organofosforado.
- Os resultados para Oiapoque refletem observações similares feitas para populações da Guiana Francesa, distintas daquelas de Macapá. Logo, as medidas de controle adotadas em ambos os lados da fronteira devem considerar resultados da região regionais e não em escala estadual ou nacional, como tem sido de praxe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad-Franch F, Zamora-Perea E, Luz SLB. Mosquito-Disseminated Insecticide for Citywide Vector Control and Its Potential to Block Arbovirus Epidemics: Entomological Observations and Modeling Results from Amazonian Brazil. *PLOS Med.* 2017;14(1):1–22.

Aliota MT, Peinado SA, Velez ID, Osorio JE. The wMel strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. *Sci Rep.* 2016;6(1):1–7.

Alout H, Berthomieu A, Hadjivassilis A, Weill M. A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochem Mol Biol.* 2007;37(1):41–7.

Alout H, Djogbénu L, Berticat C, Chandre F, Weill M. Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* Acetylcholinesterase 1 biochemical properties. *Comp Biochem Physiol.* 2008;(February):271–7.

Alout H, Labbé P, Berthomieu A, Djogbénu L, Leonetti JP, Fort P, et al. Novel AChE Inhibitors for Sustainable Insecticide Resistance Management. *PLoS One.* 2012;7(10):1–8.

Araújo AP, Felipe D, Diniz A, Helvecio E, Barros RA De, Maria C, et al. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. *Parasit Vectors.* 2013;1–9.

Araújo HRC, Carvalho DO, Ioshino RS, Costa-da-Silva AL, Capurro ML. *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. *Insects.* 2015; 6(2):576-594.

Assogba BS, Milesi P, Djogbénu LS, Berthomieu A, Makoundou P, Baba-Moussa LS, et al. The *ace-1* Locus Is Amplified in All Resistant *Anopheles gambiae* Mosquitoes: *Fitness* Consequences of Homogeneous and

Heterogeneous Duplications. PLOS Biol. 2016;14(12):1–26.

Atlas Brasil. 2013. Disponível em: <http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/ranking/>

Azevedo R do S da S, Chiang JO, Bensabath G, Vasconcelos HB, Pinto AY das N, Martins LC, et al. Reemergence of Oropouche Fever, Northern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(6):1–4.

Azevedo, R do S da S, Oliveira CS, Vasconcelos PF da C. Chikungunya risk for Brazil. *Rev Saude Publica*. 2015;49:1–6.

Barreto ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. 2008; 22(64):53–72.

Beaty BJ, Marquadt WC. The biology of disease vectors. University Press of Colorado, 1996.

Belinato TA, Martins AJ. Insecticide Resistance and Fitness Cost. In: *Insecticides Resistance*. Rio de Janeiro: InTech; 2016. p. 243–61.

Belinato TA, Martins AJ, Valle D. Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(7):916–22.

Bellinato DF, Viana-medeiros PF, Araújo SC, Martins AJ, Lima JBP, Valle D. Resistance Status to the Insecticides Temephos , Deltamethrin , and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1–12.

Berticat C, Boquien G, Raymond M, Chevillon C. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res*. 2002;41–7.

Beserra EB, Fernandes CRM, Queiroga M de FC de, Jr. FP de C. Resistência de Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera :Culicidae) ao Organofosforado Temefós na Paraíba. Neotrop Entomol. 2007;36(2):303–7.

Braga IA, Lima JBP, Da Silva Soares S, Valle D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(2):199–203.

Braga IA, Martin JLS. Histórico do Controle de *Aedes aegypti*. Dengue: Teorias e Práticas. 1º ed Rio de Janeiro; 2015. p. 61–73.

Braga IA, Mello CB, Montella IR, Lima JBP, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, et al. Effectiveness of Methoprene , an Insect Growth Regulator , Against Temephos-Resistant *Aedes aegypti* Populations from Different Brazilian Localities , Under Laboratory Conditions. J Med Entomol; 42(5): 830-837. 2005

Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiol Serv Saúde. 2007a;16(4):279–93.

Braga I, Valle D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. Epidemiol Serv Saúde. 2007b;16(2):113–8.

Brito LP, Linss JGB, Lima-Camara TN, Belinato TA, Peixoto AA, Lima JBP, et al. Assessing the Effects of *Aedes aegypti* kdr Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. PLoS One. 2013;8(4):1–10.

Brogdon WG, McAllister JC. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. Journal of the American Mosquito Control Association. 1998; 14 (2): 159 - 164.

Brown JE, Evans BR, Zheng W, Obas V, Barrera-Martinez L, Egizi A, et al. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. Natl Institutes Heal. 2014;68(2):514–25.

Buss DS, Callaghan AÃ. Molecular comparisons of the *Culex pipiens* (L.) complex esterase gene amplicons. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004;34:433–41.

Busvine JR. Mechanism of Resistance to Insecticide in Houseflies. *Nature*; 1951.168:193–5.

Cambricoli F. Mosquitos transmitem 37 vírus no País; mais 3 doenças já registram surtos locais. 2016 [citado 21 de março de 2017]; Disponível em: <http://saude.estadao.com.br/noticias/geral,mosquitos-transmitem-37-virus-no-pais-mais-3-doencas-ja-registram-surtos-locais,10000023282>

Caragata EP, Dutra HLC, Moreira LA. Exploiting Intimate Relationships: Controlling Mosquito-Transmitted Disease with Wolbachia. *Trends Parasitol* 2016. 32(3):207–18.

Carl J. Mitchell, Oswaldo P. Forattini; Experimental Transmission of Rocio Encephalitis Virus by *Aedes Scapularis* (Diptera: Culicidae) from the Epidemic Zone in Brazil. *J Med Entomol* 1984; 21 (1): 34-37.

Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 2000;26(1):13–25.

CDC. Chikungunya- Prevention. 2016a [citado 5 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/chikungunya/prevention/index.html>

CDC. Dengue. 2016b [citado 2 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dengue/>

Chediak M, G Pimenta Jr F, Coelho GE, Braga IA, Lima JBP, Cavalcante KRL, et al. Spatial and temporal country-wide survey of temephos resistance in Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(5):311–21.

Collet ML, Frizzo C, Orlandin E, Rona LDP, Nascimento JC, Montano MAE, et

al. Frequency of the Val1016Ile mutation on the *kdr* gene in *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) in south Brazil. *Genet Mol Res.* 2016;15(4):1–10.

Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública.* 1994. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/th>

Costa ZGA, Ramaro AP, Elkhoury ANM, Flannery B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde.* 2010;1(2):11–26.

Da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(4):441–4.

David J-P, Faucon F, Chandor-Proust A, Poupardin R, Riaz M, Bonin A, et al. Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. *BMC Genomics* 2014;15(1):1–15.

David J-P, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJ. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2013;368(1612):1–12.

Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life.* 2007;59(3):151–62.

Dermauw W, Van Leeuwen T. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 2014;45 (1): 89–110.

Dolabella SS, Santos RLC, Silva MCN, Steffler LM, Ribolla PEM, Cavalcanti

SCH, et al. Short Communication Detection and Distribution of V1016I kdr Mutation in the Voltage-Gated Sodium Channel Gene in *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) Populations From Sergipe State , Northeast Brazil. J Med Entomol. 2016;53(4):967–71.

Donalisio MR, Freitas ARR. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. Rev Bras Epidemiol 2015;18(1):283–5.

Du Y, Nomura Y, Zhorov BS, Dong K. Sodium Channel Mutations and Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti*. Insects. 2016;7(4):1–11.

Dusfour I, Thalmensy V, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Girod R. Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera :Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:346–52.

Dusfour I, Zorrilla P, Guidez A, Issaly J, Girod R, Guillaumot L, et al. Deltamethrin Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* Populations from Three French Overseas Territories Worldwide. PLoS Negl Trop Dis. 2015;

Dutra HLC, Rocha MN, Dias FBS, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. Cell Host Microbe. 2016a;19(6):771–4.

Evans BR, Gloria-Soria A, Hou L, McBride C, Bonizzoni M, Zhao H, et al. A Multipurpose, High-Throughput Single-Nucleotide Polymorphism Chip for the Dengue and Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. G3 Genes|Genomes|Genetics. 2015; 5(5):711–8.

Faucon F, Dusfour I, Gaude T, Navratil V, Boyer F, Chandre F, et al. Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. Genome Res. 2015; 25(9):1347–59.

Ferreira-de-Brito A, Ribeiro IP, Miranda RM de, Fernandes RS, Campos SS, Silva KAB da, et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. Mem Inst Oswaldo Cruz 2016; 111(10):655–8.

FIOCRUZ. A banalização da dengue oculta outras doenças virais como a febre oropouche. 2016. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/banalizacao-da-dengue-oculta-outras-doencas-virais-como-febre-oropouche>

Forattini OP. Culicidologia Médica. Vol. 2. Editora da Universidade de São Paulo – EDUSP, 2002.

Fournet F, Sannier C, Monteny N. Effects of the insect growth regulators omis 2017 and diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. Journal Am Mosq Control Assoc. 1993;9(4):426–30.

Franco, O. História da Febre Amarela no Brasil. Rio de Janeiro: Divisão de Cooperação e Divulgação, Departamento Nacional de Endemias Rurais, Ministério da Saúde. 1969

Fukuto TR. Mechanism of Action of Organophosp and Carbamate Insecticides by. Environ Health Perspect. 1990;87:245–54.

Garcia GDA. Dinâmica da resistência a inseticidas de populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) de quatro regiões do Brasil. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Parasitária] - Instituto Oswaldo Cruz/ IOC-Fiocruz; 2012.

García GP, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, et al. Recent Rapid Rise of a Permethrin Knock Down Resistance Allele in *Aedes aegypti* in México. Kittayapong P, organizador. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(10):e531.

Gentile C, Meireles-Filho ACA, Britto C, Lima JBP, Valle D, Peixoto AA. Cloning and daily expression of the timeless gene in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Insect Biochem Mol Biol* 2006; 36(11): 878–84.

Girod R, Dusfour I. Emergence du chikungunya en Guyane: apport des recherches en entomologie médicale. Bulletin de veille sanitaire n° 3-4-5. Emergence du chikungunya aux Antilles-Guyane: Etudes cliniques, entomologiques, épidémiologiques et actions de gestion. Antilles-Guyane; 2014.

Google Earth. 2017. [Rotas Macapá, AP x Oiapoque, AP; Oiapoque, AP x Cayenne, Guiana Francesa]. Versão 7.1.7.2606

Grigoraki L, Balabanidou V, Meristoudis C, Miridakis A, Ranson H, Swevers L, et al. Functional and immunohistochemical characterization of *CCEae3a*, a carboxylesterase associated with temephos resistance in the major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Insect Biochem Mol Biol* 2016; 74:61–7.

Grisales N, Poupardin R, Gomez S, Fonseca-Gonzalez I, Ranson H, Lenhart A. Temephos Resistance in *Aedes aegypti* in Colombia Compromises Dengue Vector Control. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(9):e2438.

Halliday RW, Burnhaw, KP. Choosing the Optimal Diagnostic Dose for Monitoring Insecticide Resistance. *J Econ Entomol* 1990; 83 (4): 1151-1159.

Harris AF, Rajatileka S, Ranson H. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(2):277–284.

Hemingway J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol.* 2000;30:1009–15.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34(7):653–65.

Hemingway J, Ranson H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Rev Entomol.* 2000;371–91.

Hirata K, Komagata O, Itokawa K, Yamamoto A, Tomita T, Kasai S. A Single Crossing-Over Event in Voltage-Sensitive Na⁺ Channel Genes May Cause Critical Failure of Dengue Mosquito Control by Insecticides. Dinglasan RR, organizador. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8(8):e3085.

Hoffmann AA, Montgomery B, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson P, Muzzi F, et al. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature.* 2011;476(7361):454–7.

Honório NA, Câmara DCP, Calvet GA, Brasil P. Chikungunya: an arbovirus infection in the process of establishment and expansion in Brazil. *Cad Saude Publica.* 2015;31(5):906–8.

Horta MAP, Castro FI, Rosa CS, Daniel MC, Melo AL. Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to Temephos in Brazil: A Revision and New Data for Minas Gerais State. *BioAssay.* 2011;7(6):1–6.

Hougard JM, Duchon S, Darriet F, Zaim M, Rogier C, Guillet P. Comparative performances, under laboratory conditions, of seven pyrethroid insecticides used for impregnation of mosquito nets. *Bull World Health Organ.* 2003;81(5):324–33.

Hu Z, Du Y, Nomura Y, Dong K. A sodium channel mutation identified in *Aedes aegypti* selectively reduces cockroach sodium channel sensitivity to type I, but not type II pyrethroids. *Insect Biochem Mol Biol.* 2011;41:9–13.

IBGE. 2017. Disponível em:
<https://cidades.ibge.gov.br/v4/brasil/ap/macapa/panorama>

IOC/Fiocruz. Dengue: vírus e vetor. Uma semana tem mais de dez mil minutos.

Que tal usar apenas 10 para se proteger do *Aedes aegypti*? [citado 22 de março de 2017]. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/10minutos.html>

IRAC. IRAC Mode of Action Classification Scheme. 2016;8.1:1–26. Disponível em: www.irac-online.org

IRAC. Resistance Management for Sustainable Agriculture and Improved Public Health. 2017 [citado 14 de fevereiro de 2017]. p. 1–2. Disponível em: <http://www.irac-online.org/about/resistance/mechanisms/>

Kasai S, Komagata O, Itokawa K, Shono T, Ng LC, Kobayashi M, et al. Mechanisms of Pyrethroid Resistance in the Dengue Mosquito Vector , *Aedes aegypti*: Target Site Insensitivity , Penetration , and Metabolism. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(6):e2948.

Kawada H, Higa Y, Futami K, Muranami Y, Kawashima E. Discovery of Point Mutations in the Voltage- Gated Sodium Channel from African *Aedes aegypti* Populations: Potential Phylogenetic Reasons for Gene Introgression. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(6):1–21.

Kawada H, Higa Y, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Nguyen TY, et al. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(10):1–7.

Kawada H, Oo SZM, Thaung S, Kawashima E, Maung YNM, Thu HM, et al. Co-occurrence of Point Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel of Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* Populations in Myanmar. Kittayapong P, organizador. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7):e3032.

Kingdom U, Cnrs UMR, li M. Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes , *Culex pipiens*. *Genet Res, Camb*. 2004;189–96.

Kirst HA. The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *J Antibiot (Tokyo)* 2010;63(3):101–11.

Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*. 2015;1–18.

Kuno G. Early History of Laboratory Breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Focusing on the Origins and Use of Selected Strains. *J Med Entomol* 2010;47(6):957–71.

Kushwah RBS, Dykes CL, Kapoor N, Adak T, Singh OP. Pyrethroid-Resistance and Presence of Two Knockdown Resistance (kdr) Mutations, F1534C and a Novel Mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. Kittayapong P. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9(1):e3332.

Labbé P, Berthomieu A, Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T, et al. Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol*. 2007a;24(4):1056–67.

Labbé P, Berticat C, Berthomieu A, Unal S, Bernard C, Weill M, et al. Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*. *PLoS Genet*. 2007b;3(11):2190–9.

Lazcano JAB, Rodríguez MM, San Martín JL, Romero JE, Montoya R. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Rev Panam Salud Pública*. 2009;26(3):229–34.

Leonel F. Em entrevista, pesquisador analisa o cenário atual da febre amarela no país. 2017 [citado 1 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/em-entrevista-pesquisador-analisa-o-cenario-atual-da-febre-amarela-no-pais>

Lima EP, de Oliveira Filho AM, de Oliveira Lima JW, Ramos Júnior AN, de

Góes Cavalcanti LP, Pontes RJS. *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará State. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(3):259–63.

Lima EP, Paiva MHS, Araújo AP de, da-Silva EVG, da Silva, UM Lúcia Nogueira de Oliveira MAV de MS. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. Parasit Vectors. 2011;1–12. A

Lima JBP, Marcella Pereira Da-Cunha, Júnior RC da S, Galardo AKR, Soares S da S, Braga IA, 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 Med Hyg. 2003;68(3):329–333.

Linss JGB, Brito LP, Garcia GA, Araki AS, Bruno RV, Lima JBP, et al. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. Parasit Vectors. 2014;7:25.

Liu J, Huang S, Sun M, Liu S, Liu Y, Wang W, et al. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. Plant Methods. 2012;8(1):34.

Llinás GA, Seccacini E, Gardenal C, Licastro S. Current resistance status to temefos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105(1):113–6.

Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. Rev Pan-Amazônica Saúde 2014;5(3):55–64.

Lopes, O.S., L.A. Sacchetta, D.B. Francly et al. Emergenc e o f a new arboviru s diseas e in Brazil . III . Isolation of Rocio virus from *Psorophora ferox* (Humboldt, 1819) . Am. J. Epidemiol. 1981. 113 : 122-25.

Lourenço-de-Oliveira R. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas. In: Koogan G, . Dinâmica das Doenças

Infeciosas e Parasitárias. 2ª Edição. Rio de Janeiro; 2005. p. 75–97.

Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara L, et al. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 2011;41(3):203–9.

Maciel-de-Freitas R, Aguiar R, Bruno R V., Guimarães MC, Lourenço-de-Oliveira R, Sorgin MHF, et al. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in latin america? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(6):828–9.

Maciel-de-Freitas R, Sylvestre G, Garcia GA, Martins A, Villela DAM, Dias FB, et al. Lessons learnt from the local grocery store: Why Wolbachia was not able to invade a local *Aedes aegypti* population on its first release in Brazil?". In: *Entomol VI- SOVE Brazil*. Recife; 2016. Disponível em: <http://www.ove.org/SOVE folder/Conference files/Brazilconference.pdf>

Macoris MD, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Bracco JE. Resistance of *Aedes aegypti* from the State of Sao Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(5):703–8.

Macoris MDLDG, Andrighetti MTM, Otrera VCG, De Carvalho LR, Caldas AL, Brogdon WG. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(8):895–900.

Marcombe S, Mathieu RB, Pocquet N, Riaz MA, Poupardin R, Sélisior S, et al. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: Distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS One*. 2012;7(2):1–11.

Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, et al. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC*

Genomics. 2009;10:1–14.

Martins, A.J. Valle D. The Pyrethroid Knockdown Resistance. InTech; 2012. p. 17–38.

Martins AJ, Brito LP, Linss JGB, Rivas GBDS, Machado R, Bruno RV, et al. Evidence for gene duplication in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti*. *Evol Med public Heal*. 2013;2013(1):148–60.

Martins AJ, Lima JBP, Peixoto AA, Valle D. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Trop Med Int Heal* 2009a;14(11):1351–5.

Martins AJ, Lins RMM de A, Jutta Gerlinde Birgitt Linss AAP, Valle D. Voltage-Gated Sodium Channel Polymorphism and Metabolic Resistance in Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* from Brazil Ademir. *Am J Trop Med Hyg*. 2009b;81(1):108–15.

Martins F, Da Silva IG. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37(2):135–8.

McMeniman CJ, Lane R V., Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang Y-F, et al. Stable Introduction of a Life-Shortening Wolbachia Infection into the Mosquito *Aedes aegypti*. *Science* (80) 2009; 323(5910):141–4.

Mitchell, C. J; Forattini, O. P. Experimental transmission of Rocio encephalitis virus by *Aedes scapularis* (Diptera: Culicidae) from the epidemic zone in Brazil. *J. med. Ent.*, 1984. 21:34-7,.

Medeiros PFV. Investigações sobre os mecanismos de resistência em larvas e adultos de *Aedes aegypti* , Linnaeus , 1762. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Parasitária] - Instituto Oswaldo Cruz/ IOC- Fiocruz; 2011.

Ministério da Saúde. Metodologia para Quantificação de Atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em *Aedes aegypti*. Valle D, Montella IR, Ribeiro RA, Medeiros PFV, Martins A de J, Lima JBP, organizadores. Normas e Manuais Técnicos. Rio de Janeiro; 2006.

Ministério da Saúde-SVS. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue, 1a Ed, 157 pp. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília. 2009

Ministério da Saúde. Ministério atualiza situação do vírus Chikungunya. 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/15897-ministerio-atualiza-situacao-do-virus-chikungunya>

Ministério da Saúde. Prevenção e Combate: Dengue, Chikungunya e Zika. 2016 [citado 5 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <http://combateaedes.saude.gov.br/pt/tira-duvidas>

Ministério da Saúde. Dengue . 2017a [citado 2 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue>

Ministério da Saúde. Incidência de Dengue . Brasil , Grandes Regiões e Unidades Federadas , 1990 a 2016. 2017b;.

Ministério da Saúde. Informações Técnicas. 2017c [citado 1 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/informacoes-tecnicas-febre-amarela>

Ministério da Saúde. Ministério da Saúde divulga novos dados de febre amarela [Internet]. 2017d [citado 1 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/27533-ministerio-da-saude-divulga-novos-dados-de-febre-amarela-2>

Ministério da Saúde - SVS. II Seminário Internacional para Avaliação de Ações de Controle Químico de *Aedes aegypti* no Brasil. 2014 [citado 21 de março de 2017]. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/16/Resumo-Executivo-II-Semin--rio-Aedes-aegypti-final.pdf>

Ministério da Saúde - SVS. Febre do Mayaro. 2015 [citado 24 de março de 2017]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/febre-do-mayaro>

Monteiro FA, Shama R, Martins AJ, Gloria-soria A, Brown JE, Powell JR. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(9):e3167.

Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Braga IA, Valle D. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(3):467–77.

Montella IR, Schama R, Valle D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(4):437–49.

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, et al. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. Cell. 2009;139(7):1268–78.

Moreira MF, Mansur JF, Figueira-Mansur J. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. In: Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular - INCT; 2012. p. 1–23.

Mori A, Lobo NF, deBruyn B, Severson DW. Molecular cloning and characterization of the complete acetylcholinesterase gene (*Ace1*) from the mosquito *Aedes aegypti* with implications for comparative genome analysis. Insect Biochem Mol Biol. 2007;37(7):667–74.

Mourão MPG, Bastos MS, Gimaque JBL, Mota BR, Souza GS, Grimmer GHN, et al. Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil, 2007-2008. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(12):2063–4.

Narahashi T, Ginsburg KS, Nagata K, Song JH, Tatebayashi H. Ion channels as targets for insecticides. *Neurotoxicology.* 1998;19(4–5):581–90.

Narahashi T, Zhao X, Ikeda T, Nagata K, Yeh J. Differential Actions of Insecticides on Target Sites: Basis for Selective Toxicity. *Hum Exp Toxicol* 2007;26(4):361–6.

Nardini L, Christian RN, Coetzer N, Ranson H, Coetzee M, Koekemoer LL. Detoxification enzymes associated with insecticide resistance in laboratory strains of *Anopheles arabiensis* of different geographic origin. *Parasit Vectors.* 2012;5(1):113.

Nazawi A, Aqili J, M. A, McCall P, Weetman D. Combined target site (*kdr*) mutations play a primary role in highly pyrethroid resistant phenotypes in *Aedes aegypti* from Saudi Arabia. *Parasite Vector.*

Nkya TE, Akhouayrib I, Kisinzaa W, David J-P. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides : Facts , evidences and prospects. *Insect Biochem Mol Biol.* 2013;43(4):407–416.

Nunes MRT, Faria NR, Vasconcelos JM de, Golding N, Kraemer MU, Oliveira LF de, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* 2015;13(102):1–10.

Nunes MRT, Martins LC, Rodrigues SG, Chiang JO, Azevedo R do S da S, Rosa APAT da, et al. Oropouche Virus Isolation, Southeast Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(10):1610–3.

Oliveira SDL, Carvalho DO, Capurro ML. Mosquito transgênico: do paper para a realidade. Rev da Biol. 2011;6b:38–43.

OMS. Dengue Control - Whats is dengue? [Internet]. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/disease/en/>

OMS. Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Mosquito Larvae to Insecticides. 1981;81.807:1–6.

OMS. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. 1998. p. 1–43.

OMS. Chikungunya. 2016a. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>

OMS. Dengue and severe dengue. 2016b [citado 4 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>

OMS. Doença do vírus Zika. 2016c. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>

OMS. Febre amarela. 2016d. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/pt/>

OMS. Monitoring and managing insecticide resistance in Aedes mosquito populations Interim guidance for entomologists. World Heal Organ. 2016e. 1-13.

OMS. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. 2º ed. Geneva: World Health Organization, WHO/VBC/; 2016f.

OMS. The History of Zika Virus. 2017a [citado 5 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/history/en/>

OMS. Yellow fever – Brazil. Emergencies preparedness, response. 2017b [citado 1 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/27->

january-2017-yellow-fever-brazil/en/

OMS-OPAS. Number of reported cases of chikungunya fever in the Americas , by country or territory 2016. Cumulative cases. Pan Am Heal Organ. 2016.

OMS. Resistencia a los insecticidas y lucha contra los vectores. Organizacion Mundial de la Salud. Serie de Informes Tecnicos, nº443, 1970.

OMS. Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors. Geneva: World Health Organization, 2012.

OPAS. Epidemiological Alert - Zika virus infection. 2015. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=30075=en %28accessed 02 Feb 2016%29

OPAS. Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas , 2015 - 2017. Cumulative cases. Washington, D.C.; 2017. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=37948&lang=en

Paiva MHS, Lovin DD, Mori A, Melo-Santos MAV, Severson DW, Ayres CFJ. Identification of a major Quantitative Trait Locus determining resistance to the organophosphate temephos in the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. Genomics. 2016;107(1):40–8.

Patel R. A Tryptophan in the Bottleneck of the Catalytic Gorge of an Invertebrate Acetylcholinesterase Confers Relative Resistance to Carbamate and Organophosphate Inhibitors. Cell Biochem Biophys. 2006;46(3):253–64.

Pauvolid-Corrêa A, Juliano RS, Campos Z, Velez J, Nogueira RMR, Komar N. Neutralising antibodies for Mayaro virus in Pantanal, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(1):125–33.

Pavliidi N, Monastiriotti M, Daborn P, Livadaras I, Van Leeuwen T, Vontas J. Transgenic expression of the *Aedes aegypti* CYP9J28 confers pyrethroid resistance in *Drosophila melanogaster*. *Pestic Biochem Physiol* 2012;104(2):132–5.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):2002–7.

Phuc HK, Andreassen MH, Burton RS, Vass C, Epton MJ, Pape G, et al. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol.* 2007;5(1):11.

Pinho A, Gomes P. Surto de febre amarela deve se espalhar pelo Brasil, diz OMS. [28 de janeiro de 2017]. Disponível em: <http://tools.folha.com.br/print?site=emcimadahora&url=http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2017/01/1853758-surto-de-febre-amarela-deve-se-espalhar-pelo-brasil-diz-oms.shtml>

Pinto IC da S, Chaves RCG. Informe Epidemiológico - Nº05 / 2017 - Monitoramento semanal dos casos de Dengue , Chikungunya e Zika vírus até a semana epidemiológica 03/2017 (01 a 21/01/2017). Vol. 1. Amapá; 2017. Disponível em: <http://www.saude.ap.gov.br/informes.php>

Plernsub S, Saingamsook J, Yanola J, Lumjuan N, Tippawangkosol P, Sukontason K, et al. Additive effect of knockdown resistance mutations, S989P, V1016G and F1534C, in a heterozygous genotype conferring pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Parasit Vectors.* 2016a;9(1):417.

Plernsub S, Saingamsook J, Yanola J, Lumjuan N, Tippawangkosol P, Walton C, et al. Temporal frequency of knockdown resistance mutations, F1534C and V1016G, in *Aedes aegypti* in Chiang Mai city, Thailand and the impact of the mutations on the efficiency of thermal fogging spray with pyrethroids. *Acta Trop.* 2016b;162:125–32.

Poirié M, Raymond M, Pasteur N. Identification of Two Distinct Amplifications of the Esterase B Locus in *Culex pipiens* (L.) Mosquitoes from Mediterranean Countries. *Biochem Genet.* 1992;30:13–26.

Ponce-García G, Del Río-Galvan S, Barrera R, Saavedra-Rodriguez K, Villanueva-Segura K, Felix G, et al. Knockdown Resistance Mutations in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) From Puerto Rico. *J Med Entomol.* 2016;53:1410–4.

Poupardin R, Srisukontarat W, Yunta C, Ranson H. Identification of Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti*. Benedict MQ, organizador. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8(3):e2743.

Proverbs MD. Induced Sterilization and Control of Insects. *Annu Rev Entomol* 1969;14(1):81–102.

Ranson H. Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. *Science* (80) 2002; 298(5591):179–81.

Remnant EJ, Good RT, Schmidt JM, Lumb C, Robin C, Daborn PJ, et al. Gene duplication in the major insecticide target site, Rdl , in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110(36):14705–10.

Rezende GL. Investigações sobre a aquisição de resistência à dessecação durante a embriogênese de *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae*. Rio de Janeiro. Tese [Biologia Celular e Molecular] Instituto Oswaldo Cruz-IOC/Fiocruz, 2008.

Rinkevich FD, Du Y, Dong K. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol.* 2013;106:93–100.

Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D. Levels Of Insecticide Resistance and Resistance Mechanisms In *Aedes aegypti* from some Latin American Countries.

J Am Mosq Control Assoc 2007;23(4):420–9.

Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Flores AE, Garcia-Luna S, Reyes-Solis G, Ranson H, et al. Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes following temephos selection. *Insect Mol Biol*. 2014;23(2):199–215.

Saavedra-Rodriguez K, Suarez AF, Salas IF, Strode C, Ranson H, Hemingway J, et al. Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*. 2012;21(1):61–77.

Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*. 2007;16(6):785–98.

Salgado VL, Sheets JJ, Watson GB, Schmidt AL. Studies on the mode of action of spinosad: concentration dependence of neural excitation. *Pestic Biochem Physiol*. 1998;103–10.

Sayono Sa, Hidayati APN, Fahri S, Sumanto D, Dharmana E, Hadisaputro S, et al. Distribution of Voltage-Gated Sodium Channel (Nav) Alleles among the *Aedes aegypti* Populations In Central Java Province and Its Association with Resistance to Pyrethroid Insecticides. Beebe N,. *PLoS One*. 2016a;11(3):e0150577.

Silva APB, Alves WS, Martins Junior AJ, Tadei WP, Santos JMM. Adaptação de um bioensaio simplificado para avaliação do status de susceptibilidade em larvas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles marajoara* ao piretroide deltametrina. *BioAssay*. 2014;9:1–8.

Souza LPDBO. Estudo do efeito de mutações no gene do canal de sódio de *Aedes aegypti*: distribuição em populações naturais, correlação com resistência a piretroide e custo evolutivo. Rio de Janeiro. Dissertação [Biologia Parasitária] Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz; 2014.

Staples JE, Hills SL, Powers AM. Chikungunya. Chapter 3. Infectious Diseases Related to Travel. 2015.

Stevenson BJ, Pignatelli P, Nikou D, Paine MJ. Pinpointing P450s Associated with Pyrethroid Metabolism in the Dengue Vector, *Aedes aegypti*: Developing New Tools to Combat Insecticide Resistance. Kent Crockett RJ, organizador. PLoS Negl Trop Dis 2012;6(3):e1595.

Straatmann A, Santos-torres S, Vasconcelos PFC, Travassos APA, Rodrigues SG. Evidências Sorológicas da Circulação Do Arbovírus Rocio (Flaviviridae) Na Bahia. Rev Soc Bras Med Trop. 1997;30(6):511–5.

Strode C, de Melo-Santos M, Magalhães T, Araújo A, Ayres C. Expression profile of genes during resistance reversal in a temephos selected strain of the dengue vector, *Aedes aegypti*. PLoS One. 2012;7(8):e39439.

Strode C, Wondji CS, David J-P, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, et al. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol. 2008;38(1):113–23.

Tabachnick WJ. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease: the yellow fever mosquito. *American Entomologist* 1991.37: 14-26

Teixeira, M. da G. Barreto, M. L. Porque Devemos, de Novo, Erradicar o *Aedes aegypti*. Ciênc. saúde coletiva vol.1 no.1 Rio de Janeiro. 1996

Torres ALQ. Organização e Evolução da Família Gênica Carboxilesterase em Artrópodes. Rio de Janeiro. Dissertação [Biologia Computacional e Sistemas] Fiocruz/ Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

Turino F. A rota do vírus Mayaro. Fiocruz/IOC. 2015 [citado 25 de março de 2017]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=2362&sid=32>

Valle D, Pimenta D.F., da-Cunha R.V.. Dengue: Teorias e Práticas. ISBN: 978-85-7541-456-9. 2015

Vasconcelos HB. Epidemiologia Molecular Do Vírus Oropouche (Bunyaviridae : Orthobunyavirus) na Amazônia Brasileira. Universidade Federal do Pará; 2009.
Vasconcelos PFDC. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. Rev Bras Epidemiol. 2002;5:244–58.

Vera-Maloof FZ, Saavedra-Rodriguez K, Elizondo-Quiroga AE, Lozano-Fuentes S, Black IV WC. Coevolution of the Ile1,016 and Cys1,534 Mutations in the Voltage Gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* in Mexico. Lenhart A, organizador. PLoS Negl Trop Dis 2015;9(12):1–22.

Vontas J, Blass C, Koutsos AC, David J-P, Kafatos FC, Louis C, et al. Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. Insect Mol Biol. 2005;14(5):509–21.

Walker T, Johnson PH, Moreira L a, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, et al. The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. Nature 2011;476(7361):450–3.

Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. Hungarian Q. 2002;49(191):2007–16.

Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, et al. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. Insect Mol Biol. 2004;13(1):1–7.

WHOPES. Discriminating concentrations of insecticides for adult mosquitoes. 2016a;(July):1.

WHOPEs. WHOPEs-recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae. 2016b; Disponível em: http://www.who.int/whopes/Mosquito_larvicides_March_2016.pdf?ua=1

WHOPEs. WHOPEs recommended insecticides for space spraying against mosquitoes. 2016c; Disponível em: http://www.who.int/whopes/Insecticides_for_space_spraying_Jul_2012.pdf

Wilke ABB, Gomes A de C, Natal D, Marrelli MT. Controle de vetores utilizando mosquitos geneticamente modificados. Rev Saúde Pública. 2009;43(5):869–74.

Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA, Devonshire AL. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. Mol Gen Genet MGG. 1996;252(1):51–60.

Wood O, Hanrahan S, Coetzee M, Koekemoer L, Brooke B. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. Parasit Vectors. 2010;3:1–7.

Wuliandari J, Lee S, White V, Tantowijoyo W, Hoffmann A, Endersby-Harshman N. Association between Three Mutations, F1565C, V1023G and S996P, in the Voltage-Sensitive Sodium Channel Gene and Knockdown Resistance in *Aedes aegypti* from Yogyakarta, Indonesia. Insects. 2015;6(3):658–85.

Xi Z, Dobson SL. Characterization of *Wolbachia* Transfection Efficiency by Using Microinjection of Embryonic Cytoplasm and Embryo Homogenate. Appl Environ Microbiol 2005;71(6):3199–204.

Xu C, Li CY-T, Kong A-NT. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. Arch Pharm Res. 2005;28(3):249–68.

Xu Q, Tain L, Zhang L, Liu N. Sodium Channel Genes and Their Differential

Genotypes at the L-to-F Kdr Locus in the Mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;407(4):645–9.

Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang P, Prapanthadara L. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Trop Med Int Heal* 2011;16(4):501–9.

Zara AL de SA, Santos SM dos, Fernandes-Oliveira ES, Carvalho RG, Coelho GE. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol Serv Saude*. 2016;25(2):391–404.

Zeidler JD, Acosta POA, Barrêto PP, Cordeiro JDS. Dengue virus in *Aedes aegypti* larvae and infestation dynamics in Roraima, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2008;42(6):2–6.

Zug R, Hammerstein P. Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. *PLoS One* 2012;7(6):e38544.