

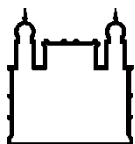
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MUTAÇÕES RELACIONADAS COM RESISTÊNCIA A INSETICIDAS E  
DIVERSIDADE DE *Wolbachia pipientis* HERTIG E WOLBACH, 1924 EM  
POPULAÇÕES DE *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823 DO BRASIL

RAMON PEREIRA LOPES

Rio de Janeiro  
Junho de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*RAMON PEREIRA LOPES*

Mutações relacionadas com resistência a inseticidas e diversidade de *Wolbachia pipientis* Hertig e Wobach, 1924 em populações de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 do Brasil

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

**Orientador:** Dr. Ademir de Jesus Matins Júnior

**RIO DE JANEIRO**

Junho de 2020

PEREIRA LOPES, RAMON.

Mutações relacionadas com resistência a inseticidas e diversidade de *Wolbachia pipientis* Hertig e Wobach, 1924 em populações de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 do Brasil / RAMON PEREIRA LOPES. - Rio de Janeiro, 2020.

XVII, 165 f.

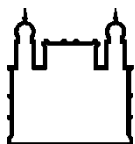
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientador: Dr. Ademir de Jesus Matins Júnior .

Bibliografia: f. 97-141

1. *Nav*. 2. *ace-1*. 3. *cqm1*. 4. controle de vetores. 5. entomologia molecular.

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**

***AUTOR: RAMON PEREIRA LOPES***

**Mutações relacionadas com resistência a inseticidas e diversidade de  
*Wolbachia pipientis* Hertig e Wobach, 1924 em populações de *Culex*  
*quinquefasciatus* Say, 1823 do Brasil**

**ORIENTADOR: Dr. Ademir de Jesus Martins Júnior**

**Aprovada em: 08 / 06 / 2020**

**EXAMINADORES:**

**Dra. Rafaela Vieira Bruno – Presidente e revisora (Fiocruz/IOC)**

**Dra. Roseli LaCorte dos Santos (UFS - Universidade Federal de Sergipe)**

**Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine (IBqM, UFRJ)**

**Dra. Luana Cristina Farnesi Ferreira (Fiocruz/IOC)**

**Dra. Michele Souza Lima (IBqM, UFRJ)**

Rio de Janeiro, 08 de junho de 2020




Ministério da Saúde


Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de Ramon Pereira Lopes, sob orientação do Dr. Ademir de Jesus Martins Junior. Ao oitavo dia do mês de junho de dois mil e vinte, realizou-se às nove horas, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado intitulada: "Mutações relacionadas com resistência a inseticidas e diversidade de *Wolbachia pipientis* Hertrg e *Wolbach* 1924 em populações de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 do Brasil", no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Genética de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Rafaela Vieira Bruno – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Roseli Lacorte dos Santos– UFS/SE, Dr<sup>a</sup>. Luana Cristina Farnesi Ferreira – FIOCRUZ/RJ e como suplentes: Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine- UFRJ/RJ e Dr<sup>a</sup>. Michele Souza Lima - UFRJ/RJ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota, o Coordenador do Programz Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 08 de junho de 2020.

Dr<sup>a</sup>. Rafaela Vieira Bruno (Presidente da Banca): 

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa): 

Em tempo: Onde se lê, *Wolbachia pipientis* Hertrg  
Leia - se, *Wolbachia pipientis* Hertrg

  
Dr. Rafael Maciel de Freitas  
Coordenador de Pós-Graduação  
em Biologia Parasitária  
IOC/FIOCRUZ - SIAPE 1603050

## AGRADECIMENTOS

A lista de pessoas que contribuíram de alguma forma para conclusão desse trabalho é bem extensa, mas vou tentar ser breve. Quero começar agradecendo a minha família e em especial, a minha mãe Edna, pelo apoio eterno e incondicional. Sem dúvidas, eu não teria chegado até aqui sem o seu suporte.

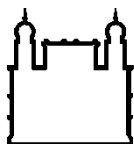
Agradeço ao meu orientador Ademir pelo voto de confiança, paciência, por ter acreditado em mim, me incentivado e me ajudado inúmeras vezes durante o meu doutorado. Você é um exemplo para mim e para a equipe do LAFICAVE.

Falando em LAFICAVE... É difícil mencionar a quem devo agradecer aqui, pois toda a equipe do laboratório me ajudou de algum modo. Iniciei meu doutorado sem experiência alguma em entomologia e graças a equipe LAFICAVE, aprendi o passo-a-passo de todo o processo e funcionamento do laboratório. Agradeço a cada um de vocês, sem exceções, pela dedicação e disponibilidade para me ajudar e tirar minhas inúmeras dúvidas.

Quero agradecer à equipe do Laboratório de Transmissores de Hematozoários (Lathema) e do *World Mosquito Program* pela doação de parte dos mosquitos utilizados neste trabalho. Agradeço também aos agentes e técnicos que me auxiliaram nas coletas de campo.

Agradeço a Dra. Rafaela Bruno por sua impecável revisão e também a cada membro da banca: Dra. Roseli LaCorte, Dr. Marcos Sorgine, Dra. Luana Farnesi e a Dra. Michele Lima por terem aceitado o convite de avaliar o meu trabalho.

Por fim, porém não menos importante, gostaria de agradecer ao suporte dado pelo Instituto Oswaldo Cruz, em especial à Pós-Graduação em Biologia Parasitária e também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio financeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Mutações relacionadas com resistência a inseticidas e diversidade de *Wolbachia pipientis* em populações de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 do Brasil

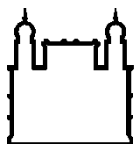
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Ramon Pereira Lopes

*Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae), vulgarmente conhecido como pernilongo, é um mosquito amplamente distribuído em todo o território brasileiro. Esta espécie antropofílica e naturalmente infectada por *Wolbachia* é principal vetora de patógenos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças como a filariose linfática e a febre do Nilo Ocidental. O manejo ambiental e o uso de inseticidas são as estratégias mais empregadas para diminuir a densidade das populações naturais desse vetor. No entanto, o uso exacerbado desses compostos tem selecionado populações resistentes em todo o mundo, diminuindo a efetividade do controle químico. Embora exista no Brasil um programa governamental bem estruturado de vigilância e monitoramento da resistência a inseticidas em *Ae. aegypti*, são raros os estudos envolvendo *Cx. quinquefasciatus* neste sentido, ainda que o controle químico exerça pressão seletiva semelhante sobre estas espécies essencialmente urbanas. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de mutações nos principais genes relacionados com resistência a inseticidas e a diversidade de *Wolbachia pipientis* em populações brasileiras de *Cx. quinquefasciatus*. Adicionalmente, foi determinado o perfil de suscetibilidade a inseticidas em linhagens de laboratório de *Cx. quinquefasciatus* por meio de bioensaios padronizados pela OMS. Foi extraído o DNA de *Cx. quinquefasciatus* de duas linhagens de laboratório e de treze localidades brasileiras, cobrindo as cinco regiões do país, totalizando 744 amostras. A presença de mutações relacionadas à resistência a piretroides, organofosforados e ao biolarvicida *Lysinibacillus sphaericus* foi investigada por sequenciamento e diferentes métodos de genotipagem baseados em PCR, nos genes do canal de sódio regulado por voltagem ( $Na_v$ ), acetilcolinesterase (*ace-1*) e *Culex quinquefasciatus* maltase 1 (*cqm-1*). Adicionalmente, determinou-se o grupo genético de *Wolbachia pipientis* naquelas mesmas amostras, baseado em amplificação por PCR dos genes bacterianos *wsp* e *ftsZ*. As duas linhagens de laboratórios foram consideradas suscetíveis aos inseticidas temefós e malathion. Foram identificados 14 haplótipos para o gene  $Na_v$  e 42 para o gene *ace-1*. A clássica mutação *kdr* L1014F do  $Na_v$  foi observada nas populações de Boa Vista (2,2%), Manaus (1,6%), Cáceres (1,9%) e na linhagem JPA (1%). O alelo mutante *ace-1<sup>R</sup>* foi observado na população de Foz do Iguaçu (3,5%). Nenhum dos alelos mutantes *cqm1<sup>REC</sup>* e *cqm1<sup>REC-2</sup>* foram observados no gene *cqm1*. Todas as amostras apresentaram *Wolbachia* do supergrupo B, exceto alguns indivíduos (0,5%) de Caseara-TO que não estavam infectados pela bactéria. Alguns indivíduos de Recife (14,8%) e Campina Grande (45%) indicam a possibilidade de superinfecção pelos supergrupos A e B. A presença de alelos classicamente relacionados à resistência em populações de *Cx. quinquefasciatus* de diferentes regiões do país indica fortemente a necessidade de se implementar um programa de monitoramento de resistência a inseticidas para esse vetor. A existência de *W. pipientis* do supergrupo A em *Cx. quinquefasciatus* do Brasil surpreende e indica necessidade de maiores estudos neste sentido.

Palavras-chave:  $Na_v$ , *ace-1*, *cqm1*, controle de vetores, entomologia molecular, pernilongo



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Resistance related mutations and *Wolbachia pipientis* diversity in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 from Brazil

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Ramon Pereira Lopes

*Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae), commonly known as the southern house mosquito, is widely distributed throughout the Brazilian territory. This anthropophilic species and naturally infected with *Wolbachia* is the main vector of pathogens responsible for the development of diseases such as lymphatic filariasis and West Nile fever. Environmental management and use of insecticides are the most employed strategies aiming at to decrease the density of natural populations of this vector. However, the exaggerated use of such compounds has selected resistant populations worldwide, decreasing the effectiveness of chemical control. Although there is a well-structured governmental program in Brazil for surveillance and monitoring of insecticide resistance in *Ae. aegypti*, studies involving *Cx. quinquefasciatus* in this sense are rare, even though chemical control exerts similar selective pressure over these essentially urban species. The aim of this study was to evaluate the presence of mutations in the main insecticide resistance related genes and the diversity of *Wolbachia pipientis* in *Cx. quinquefasciatus* Brazilian populations. In addition, the profile of susceptibility to insecticides in laboratory strains of *Cx. quinquefasciatus* was determined using WHO-standardized bioassays. The DNA of the insects was extracted from two laboratory strains and from thirteen Brazilian populations, covering the five regions of the country, totaling 744 samples. The presence of mutations related to resistance to pyrethroids, organophosphates and the biolarvicide *Lysinibacillus sphaericus* was investigated by sequencing and through different PCR-based genotyping methods, in their respective target genes: voltage-regulated sodium channel ( $Na_V$ ), acetylcholinesterase (*ace-1*) and *Culex quinquefasciatus* maltase 1 (*cqm-1*). Additionally, the genetic supergroup of *Wolbachia pipientis* was determined in those same samples, based on PCR amplification of the bacterial genes *wsp* and *ftsZ*. Both laboratory strains were considered susceptible to the insecticides temephos and malathion. The total of 14 haplotypes were identified in the  $Na_V$  gene and 42 in the *ace-1* gene. The classic L1014F *kdr* mutation was observed in the populations of Boa Vista (2.2%), Manaus (1.6%), Cáceres (1.9%) and in the JPA strain (1%). The *ace-1<sup>R</sup>* mutant allele was observed in the population of Foz do Iguaçu (3.5%). Neither of *cqm1<sub>REC</sub>* and *cqm1<sub>REC-2</sub>* mutant alleles were observed in the *cqm1* gene. All samples harbored supergroup B *Wolbachia*, except few individuals (0.5%) from Caseara-TO, which were not infected. Some samples from Recife (14.8%) and Campina Grande (45%) indicated the superinfection, containing both supergroups A and B. The presence of alleles classically related to insecticide resistance in *Cx. quinquefasciatus* natural populations from different regions strongly indicates the needs of implementing an insecticide resistance monitoring program for this vector. The occurrence of supergroup A *W. pipientis* in Brazilian *Cx. quinquefasciatus* is surprising and indicates the necessity of further studies in this regard.

Keywords:  $Na_V$ , *ace-1*, *cqm1*, vector control, molecular entomology, Southern house mosquito



## ÍNDICE

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1. Introdução.....	1
1.1 Origem e distribuição da espécie.....	2
1.2 Biologia .....	4
1.2.1 Ovos.....	4
1.2.2 Larvas .....	5
1.2.3 Pupas.....	6
1.2.4 Adultos .....	7
1.3 Hábitos, habitat e preferências alimentares.....	8
1.4 Criadouros.....	9
1.5 Fator de incômodo e importância em saúde pública.....	10
1.6 Controle vetorial .....	12
1.6.1 Controle biológico.....	13
1.6.1.1 Inseticidas bacterianos .....	15
1.6.1.2 Espinosinas .....	16
1.6.2 Controle químico .....	17
1.6.2.1 Piretroides .....	17
1.6.2.2 Organoclorados.....	19
1.6.2.3 Organofosforados.....	21
1.6.2.4 Carbamatos .....	22
1.6.2.5 <i>Insect Growth Regulator</i> – IGR.....	22
1.6.3 Controle genético.....	26
1.6.3.1 Técnica do Inseto Estéril.....	26
1.6.3.2 Inseto Transgênico com Gene Letal Dominante.....	28
1.6.3.3 <i>Wolbachia pipentis</i> .....	30
1.6.4 Resistência a inseticidas.....	32
1.6.4.1 Alteração comportamental.....	33
1.6.4.2 Redução da penetração cuticular.....	36
1.6.4.3 Detoxificação metabólica.....	41
1.6.4.4 Alteração sítio-alvo.....	45
1.6.5 Justificativa.....	53

<b>2.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>54</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>54</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>54</b>
<b>3.</b>	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Criação, coleta e obtenção dos mosquitos.....</b>	<b>55</b>
<b>3.2</b>	<b>Bioensaios com linhagens de laboratório.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Bioensaios com larvas.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Bioensaios com adultos.....</b>	<b>58</b>
<b>3.3</b>	<b>Ensaio moleculares .....</b>	<b>60</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Extração e purificação de DNA.....</b>	<b>60</b>
<b>3.4</b>	<b>Dosagem, diluição e montagem dos <i>pools</i> de DNA.....</b>	<b>61</b>
<b>3.5</b>	<b>Amplificação, clonagem e sequenciamento.....</b>	<b>61</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Gene <i>Nav</i>.....</b>	<b>61</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Gene <i>ace-1</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>3.6</b>	<b>Análise das sequências.....</b>	<b>64</b>
<b>3.7</b>	<b>Genotipagem.....</b>	<b>65</b>
<b>3.7.1</b>	<b>Gene <i>Nav</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Gene <i>ace-1</i>.....</b>	<b>66</b>
<b>3.7.3</b>	<b>Gene <i>cqm1</i>.....</b>	<b>67</b>
<b>3.7.4</b>	<b>Diversidade de <i>Wolbachia pipientis</i>.....</b>	<b>68</b>
<b>3.7.4.1</b>	<b>Supergrupo A.....</b>	<b>69</b>
<b>3.7.4.2</b>	<b>Supergrupo B.....</b>	<b>70</b>
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>71</b>
<b>5.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>88</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>96</b>
<b>8.</b>	<b>Referências.....</b>	<b>97</b>
<b>9.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>142</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição global do complexo <i>Cx. pipiens</i> .....	1
<b>Figura 2</b> - Distribuição potencial de <i>Cx. quinquefasciatus</i> baseada nas condições climáticas do ano de 2016.....	2
<b>Figura 3</b> - Distribuição potencial futura prevista para <i>Cx. quinquefasciatus</i> ...3	
<b>Figura 4</b> - Jangada de ovos de <i>Cx. quinquefasciatus</i> .....	5
<b>Figura 5</b> - Larvas de <i>Cx. quinquefasciatus</i> (quarto estágio).....	6
<b>Figura 6</b> - Pupa de <i>Cx. quinquefasciatus</i> .....	6
<b>Figura 7</b> - Mosquitos macho (esquerda) e fêmea (direita) de <i>Cx. quinquefasciatus</i> .....	7
<b>Figura 8</b> - Densidade de fêmeas de <i>Cx. quinquesfasciatus</i> atraídas por diferentes partes do corpo humano.....	8
<b>Figura 9</b> - Classificação de criadouros de <i>Cx. quinquefasciatus</i> .....	9
<b>Figura 10</b> - Peixe-mosquito <i>Gambusia affinis</i> .....	14
<b>Figura 11</b> - Peixe barrigudinho <i>Poecilia reticulata</i> .....	14
<b>Figura 12</b> - Peixe-do-paráíso <i>Macropodus opercularis</i> , variante azul.....	14
<b>Figura 13</b> - <i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> : fonte natural de piretro.....	19
<b>Figura 14</b> - Soldado do Exército Americano realizando aplicação de DDT para acabar com a epidemia de tifo na Itália.....	20
<b>Figura 15</b> - Efeito do tratamento com novaluron em <i>Culex</i> .....	24
<b>Figura 16</b> - Efeitos do inseticida análogo do hormônio juvenil (JH) metopreno no desenvolvimento do mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	25
<b>Figura 17</b> - Princípio da SIT utilizando densovírus.....	28
<b>Figura 18</b> - Representação do sistema de expressão de gene letal tetraciclina-repressível em <i>Drosophila melanogaster</i> .....	29
<b>Figura 19</b> - Representação de incompatibilidade citoplasmática uni e bidirecional em <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	31
<b>Figura 20</b> - Câmara utilizada na avaliação de comportamento.....	35
<b>Figura 21</b> - Duração média de repouso em minutos para as três espécies avaliadas .....	35
<b>Figura 22</b> - Mecanismos de resistência por redução de penetração cuticular.....	37
<b>Figura 23</b> - Localização imunohistoquímica das P450s <i>CYP4G16</i> e <i>CYP4G17</i> de <i>An. gambiae</i> .....	37

<b>Figura 24</b> - Imagem de microscopia eletrônica em escala de 1µm da ultraestrutura da cutícula das linhagens controle (à esquerda) e resistente (à direita) de <i>An. gambiae</i> .....	38
<b>Figura 25</b> - Mortalidade dos mosquitos em bioensaio OMS após silenciamento por RNAi do gene <i>CpCPLCG5</i> .....	39
<b>Figura 26</b> - Níveis de expressão do mRNA de <i>CpLac2</i> em larvas de 4º instar e pupas de <i>Culex pallens</i> suscetíveis e resistentes ao piretroide fenvalerato.....	40
<b>Figura 27</b> - Mecanismo de detoxificação de xenobióticos em insetos.....	42
<b>Figura 28</b> - Sinapse colinérgica na ausência e na presença de inibidores de AChE.....	46
<b>Figura 29</b> - Representação do canal de sódio regulado por voltagem.....	47
<b>Figura 30</b> - Representação gráfica das localizações das mutações sinônimas e não-sinônimas do canal de sódio de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	49
<b>Figura 31</b> - Representação do receptor GABA ionotrópico.....	50
<b>Figura 32</b> - Representação esquemática da ligação do componente BinB da toxina Bin do <i>L. sphaericus</i> ao receptor Cqm1, ligado à membrana plasmática das células do epitélio intestinal de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> por uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI).....	51
<b>Figura 33</b> - Locais de origem das amostras de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	56
<b>Figura 34</b> - Representação dos ensaios dose-resposta com 4 réplicas por concentração.....	58
<b>Figura 35</b> - Representação dos ensaios dose-diagnóstica com três réplicas por inseticida.....	60
<b>Figura 36</b> - Representação parcial do gene <i>cqm1</i> de <i>Culex quinquefasciatus</i> indicando a deleção de 19 nucleotídeos (del19) do alelo <i>cqm1<sub>REC</sub></i> e a substituição G1324A do alelo <i>cqm1<sub>REC2</sub></i> .....	67
<b>Figura 37</b> - Curva de mortalidade de linhagens de laboratório de <i>Culex quinquefasciatus</i> , comparadas à linhagem referência de <i>Aedes aegypti</i> , ao larvicida organofosforado temefós.....	71
<b>Figura 38</b> - Mortalidade de linhagens de laboratório a doses diagnósticas dos adulticidas piretroide deltametrina (A) e organofosforado malathion (B).....	72
<b>Figura 39</b> - Rede de haplótipos para fragmento nucleotídico correspondente ao segmento IIS6 do <i>Na<sub>v</sub></i> de populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> do Brasil.....	75
<b>Figura 40</b> - Percentual de haplótipos por população para o gene <i>Na<sub>v</sub></i> .....	75
<b>Figura 41</b> - Árvore filogenética de máxima verossimilhança para fragmento nucleotídico correspondente ao segmento IIS6 do <i>Na<sub>v</sub></i> de populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> do Brasil.....	76
<b>Figura 42</b> - Percentual de haplótipos por população para o gene <i>ace-1</i> .....	77

<b>Figura 43</b> - Rede de haplótipos para fragmento nucleotídico parcial do gene <i>ace-1</i> .....	78
<b>Figura 44</b> - Árvore filogenética de máxima verossimilhança para fragmento nucleotídico correspondente a segmento do <i>ace-1</i> de populações de <i>Culex quinquefasciatus</i> do Brasil e linhagens de laboratório.....	79
<b>Figura 45</b> - Curvas de dissociação ( <i>melting curve analysis</i> ) da reação PCR alelo-específica (AS-PCR) para variação L1014F no segmento IIS6 do gene <i>Nav</i> de populações brasileiras de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	80
<b>Figura 46</b> - Exemplo de ensaio de genotipagem do SNP G119S do gene <i>ace-1</i> de <i>Cx. quinquefasciatus</i> por qPCR TaqMan.....	82
<b>Figura 47</b> - Perfil de fragmentos do gene <i>cqm1</i> de <i>Cx. quinquefasciatus</i> por reação de PCR multiplex.....	83
<b>Figura 48</b> - Amplificação dos genes <i>wspB</i> e <i>ftsZB</i> .....	85
<b>Figura 49</b> - Amplificação do gene <i>ftsZB</i> na população de Caseara-TO.....	85
<b>Figura 50</b> - Amplificação dos genes <i>wspB</i> e <i>Nav</i> em indivíduos da população de Caseara-TO.....	86
<b>Figura 51</b> - Amplificação de fragmento do gene <i>wspA</i> em indivíduos Recife e Campina Grande.....	86
<b>Figura 52</b> - Amplificação dos genes do supergrupo A de <i>Wolbachia pipientis</i> em <i>Ae. albopictus</i> do Rio de Janeiro.....	87

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Toxicidade relativa de diferentes inseticidas em larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	26
<b>Tabela 2</b> - Locais de origem das amostras de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	56
<b>Tabela 3</b> - <i>Primers</i> utilizados para a amplificação do gene <i>Nav</i> de <i>Cx. quinquefasciatus</i> por meio das técnicas de PCR e AS-PCR.....	65
<b>Tabela 4</b> - <i>Primers</i> utilizados para a amplificação do gene <i>ace-1</i> de <i>Cx. quinquefasciatus</i> por meio das técnicas de PCR e Taqman® Real Time PCR....	66
<b>Tabela 5</b> - <i>Primers</i> utilizados para a amplificação do gene <i>cqm1</i> de <i>Cx. quinquefasciatus</i> por meio da técnica de PCR Multiplex.....	68
<b>Tabela 6</b> - <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos genes <i>wsp</i> e <i>ftsZ</i> dos supergrupos A e B de <i>Wolbachia pipientis</i> em <i>Cx. quinquefasciatus</i> por meio da técnica de PCR convencional.....	69
<b>Tabela 7</b> - Quantidade amostras de DNA de indivíduos por população ou linhagem de <i>Cx. quinquefasciatus</i> .....	73
<b>Tabela 8</b> - Índices de polimorfismos encontrados no segmento IIS6 do gene <i>Nav</i> em seis populações brasileiras de <i>Cx. quinquefasciatus</i> .....	74
<b>Tabela 9</b> - Índices de polimorfismos encontrados no segmento do gene <i>ace-1</i> nas duas linhagens de laboratório e nas seis populações de campo de <i>Cx. quinquefasciatus</i> .....	77
<b>Tabela 10</b> - Frequências genotípicas e alélicas para o sítio 1014 do gene <i>Nav</i> das populações de campo de <i>Cx. quinquefascistus</i> .....	81
<b>Tabela 11</b> -Frequências genotípicas e alélicas para o sítio 119 do gene <i>ace-1</i> das populações de campo de <i>Cx. quinquefascistus</i> .....	82

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

$\mu\text{L}$  – Microlitros

ABC - ATP-binding cassette

*ace-1* – gene acetilcolinesterase 1

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

AHJ – Análogos de Hormônio Juvenil

AM – Amazonas

AP – Amapá

AS-PCR – PCR alelo-específica

ATP – Adenosina trifosfato

Bin – Toxina binária

*Bti* – *Bacillus thuringiensis var. israelensis*

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CGWH – Comitê sobre a Guerra e Saúde do Golfo, do inglês “*Committee on Gulf War and Health*”

CL – Concentração letal

Cl<sup>-</sup> - íon cloro

CPs – Proteínas cuticulares, do inglês, “*Cuticular Proteins*”

*cqm1* – gene *Culex quinquefasciatus* maltase 1

d16 – deleção de 16 nucleotídeos no gene *cqm1*

d19 – deleção de 19 nucleotídeos no gene *cqm1*

d25 – deleção de 25 nucleotídeos no gene *cqm1*

DDT – Diclorodifeniltricloetano

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês “*deoxyribonucleic acid*”

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMAE – Empresa Metropolitana de Águas e Energia

EPA – Agência de Proteção Ambiental, do inglês “*Environmental Protection Agency*”

*ftsZ* – gene da *ftsZ*, proteína de divisão celular de bactérias

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

GABA – Ácido gama-aminobutírico

Gly – Aminoácido Glicina  
GPI – Glicosil-fosfatidilinositol  
gp-P – glicoproteína p  
GST – Glutathiona S-transferases  
HCH – Hexaclociclohexanos  
IBEx – Instituto de Biologia do Exército  
IC – Incompatibilidade citoplasmática  
IGR – Regulador de crescimento do Inseto, do inglês “*Insect Growth Regulator*”  
IIT ou TII – Técnica do Inseto Incompatível, do inglês “*Incompatible Insect Technique*”  
ISQ – Inibidores da Síntese de quitina  
JPA – Jacarepaguá  
*kdr* – do inglês, *knockdown resistance*  
LB - Luria-Bertani  
*Lac2* – *Lacase 2*  
LAFICAVE – Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores  
LATHEMA – Laboratório de Transmissores de Hematozoários  
Leu – Aminoácido Leucina  
MFO – Monooxigenases de Função Mista  
Milli-Q – Água ultra pura  
mM – Milimolar  
mRNA – RNA mensageiro  
MT – Mato Grosso  
NaCl – Cloreto de sódio  
*Nav* – gene do *Nav*, canal de sódio regulado por voltagem  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PB – Paraíba  
pb – Pares de bases  
PBO - Piperonil butóxido  
PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”  
PE- Pernambuco  
pH – Potencial hidrogeniônico



Phe – Aminoácido Fenilalanina

ppm – partes por milhão

PR – Paraná

qPCR – PCR quantitativo, do inglês “quantitative PCR”

Rdl – Gene de resistência a Dieldrin, do inglês “*Resistance to Dieldrin gene*”

RIDL – Liberação de inseto portador de um gene letal dominante, do inglês “*Release of insect carrying a dominant lethal gene*”

RJ – Rio de Janeiro

RNA – Ácido ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

RR- Razão de resistência

RR- Roraima

RS – Rio Grande do Sul

SDS –Dodecil sulfato de sódio

SE – Sergipe

Ser – Aminoácido Serina

SES – Secretaria de Estado de Saúde

siRNA – Pequeno RNA de interferência, do inglês “*Small interfering RNA*”

SIT – Técnica do Inseto Estéril, do inglês “*Sterile Insect Technique*”

S.O.C – Meio Super Ideal com repressão catabólica, do inglês “*Super Optimal broth with Catabolite repression*”

TM – Temperatura de *Melting*

TNES – Tampão de lise contendo Tris, NaCl, EDTA e SDS

TO – Tocantins

tTA – Ativação transcricional controlada por tetraciclina, do inglês “*Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation*”

USEPA – Agência do Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês “*United States Environmental Protection Agency*”

WHO – Organização Mundial da Saúde, do inglês “*World Health Organization*”

WHOPES – Esquema de Avaliação de Pesticidas da Organização Mundial da Saúde, do inglês “*WHO Pesticide Evaluation Scheme*”

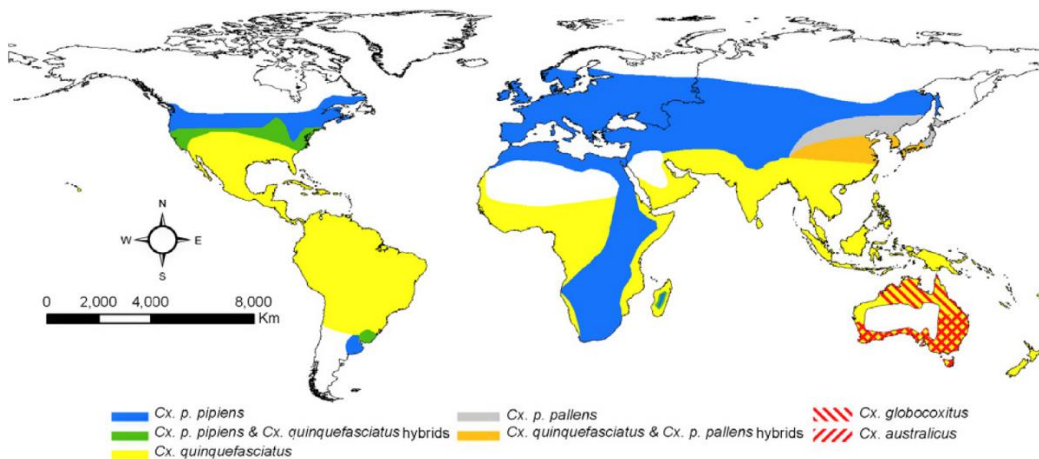
wsp – gene da wsp, proteína de superfície de *Wolbachia*, do inglês “*Wolbachia surface protein*”

X<sup>2</sup> - Teste qui-quadrado

## 1. Introdução

*Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) é um mosquito membro do complexo de espécies *Culex pipiens*, ordem Diptera, família Culicidae, filo Arthropoda. Essa espécie foi primeiramente descrita por Thomas Say no ano de 1823 quando coletada em grande quantidade ao longo do Rio Mississippi, sudeste dos Estados Unidos da América (Say 1823). Em 1828, a espécie foi redescrita por Christian Wiedemann como *Culex fatigans* (Wiedemann 1828), o que fez que ambos os nomes passassem a ser utilizados até boa parte do século XX, quando Sirivanakarn & White (1978) designaram um neótipo para *Cx. quinquefasciatus* esclarecendo e estabilizando a nomenclatura da espécie. De acordo com a Lei de Prioridade, artigo 23 do Código de Nomenclatura Zoológica, o nome *quinquefasciatus* Say, 1823 passou a ser reconhecido por preceder o *fatigans* Wiedemann, 1828. Desde então, *Cx. quinquefasciatus* foi gradualmente prevalecendo na literatura científica.

Um complexo de espécies pode ser definido como um grupo de espécies evolutivamente relacionadas e dificilmente distinguíveis morfológicamente (Collins & Paskewitz 1996). De acordo com Knight (1978), o complexo *Culex pipiens* é formado por *Cx. pipiens* Linnaeus 1758, *Cx. quinquefasciatus* Say 1823, *Cx. pipiens pallens* Coquillett 1898, *Cx. globocoxitus* Dobrotworsky 1953 e *Cx. australicus* Dobrotworsky & Drummond 1953, possuindo distribuição global (Figura 1). Entretanto, a sua classificação como “complexo” de espécies e seus componentes vêm sendo questionados, sugerindo a mudança de Complexo *pipiens* para Assembléia *pipiens*, de “*Pipiens Assemblage*” em inglês (Harbach 2012).

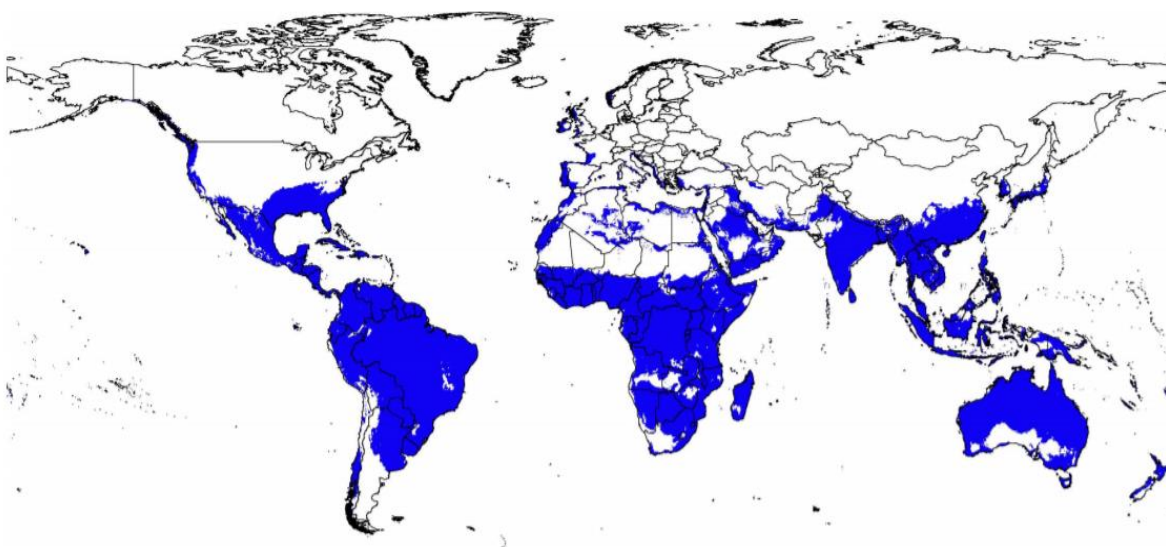


**Figura 1 - Distribuição global do complexo *Culex pipiens*.** Fonte: Copiado de Farajollahi *et al* (2011)

## 1.1 Origem e distribuição da espécie

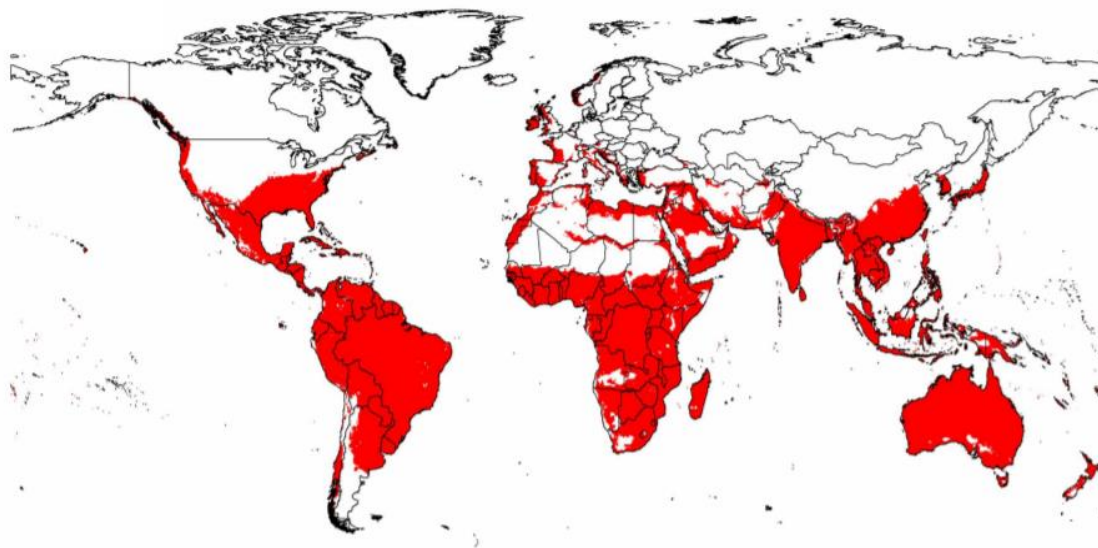
Estudos indicam que *Cx. quinquefasciatus* seja original da Ásia e suas vias de expansão para o Novo Mundo estejam relacionadas com atividade humana e que sejam semelhantes às propostas para o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Tabachnick 1991; Fonseca 2006). Há evidências de que *Cx. quinquefasciatus* tenha sido introduzido no Novo Mundo e Austrália através de embarcações à vela utilizadas durante o comércio de escravos antes de 1800 (Belkin 1962).

Um recente estudo reuniu mais de 1.400 registros de ocorrência de *Cx. quinquefasciatus* e criou mapas indicando as regiões com condições climáticas ideais para a ocorrência atual da espécie (Figura 2), bem como sua provável expansão (Figura 3) frente às perspectivas de alterações das condições climáticas (Samy *et al* 2016). Em condições atuais, a espécie já apresenta condições adequadas de distribuição nos cinco continentes, essencialmente nas zonas tropical e subtropical, podendo se expandir para regiões temperadas. As regiões do leste da Ásia, África Ocidental e Europa Ocidental foram classificadas como ambientalmente adequadas, embora poucos pontos de ocorrência tenham sido registrados nessas áreas (Figura 2).



**Figura 2 - Distribuição potencial de *Cx. quinquefasciatus* baseada nas condições climáticas.** As faixas azul e branca representam as áreas com condições climáticas adequadas e inadequadas à ocorrência da espécie, respectivamente, baseando-se nas condições climáticas até 2016. Fonte: Adaptado de Samy *et al* (2016)

Em condições futuras, a espécie demonstraria um potencial de distribuição similar ao observado para a atual (Figura 3), com alguma expansão provável nas próximas décadas em destaque para o sul da Austrália.



**Figura 3 – Possível expansão da distribuição de *Cx. quinquefasciatus* no mundo nas próximas décadas.** As cores vermelha e branca representam, respectivamente, regiões prováveis e improváveis de distribuição da espécie, de acordo com estimativas de mudanças climáticas. Fonte: Adaptado de Samy *et al* (2016).

No Brasil, *Cx. quinquefasciatus* ocorre em todo o país. Sua distribuição e abundância são fortemente influenciadas pela presença humana, sendo encontrado em maior número nos meses quentes e chuvosos em aglomerados humanos, nos centros urbanos e em regiões rurais. Pode ser encontrado durante todo o ano, ininterruptamente (Forattini *et al* 1993; Consoli & Lourenço de Oliveira 1994).

A degradação do ambiente urbano e a exposição a inseticidas aplicados em campanhas de controle representam pressões seletivas que atuam sobre a estrutura genética das populações brasileiras de *Cx. quinquefasciatus*. Tais eventos representam gargalos genéticos que aumentam a homogeneidade fenotípica da espécie (Morais 2011). Alguns estudos de estruturação populacional de *Cx. quinquefasciatus* do Brasil, baseados em análises de DNA mitocondrial, DNA ribossomal e microssatélites, indicam que as populações brasileiras do vetor possuem baixa diversidade genética e morfológica (Wilke *et al* 2014; Morais *et al* 2012; Carvalho 2017).

Morais *et al* (2012) avaliaram a diversidade dos genes mitocondriais *cox1* (citocromo C oxidase) e *nd4* (subunidade 4 do NADH desidrogenase) e dos genes ribossomais 5.8S e 28S em *Cx. quinquefasciatus* de diferentes regiões do país. Para o gene *cox1* apenas quatro haplótipos foram observados, com 3 substituições sinônimas e uma não sinônima, o que permitiu a divisão dos mosquitos brasileiros em apenas 2 grupos, com um deles localizado no sul do país. O gene *nd4* foi altamente conservado, não apresentando nenhum polimorfismo, mesmo entre populações de diferentes regiões geográficas. As análises dos genes ribossomais também apontaram baixa diversidade genética para a espécie. Característica que também foi reforçada por trabalhos com até 12 loci de microssatélites em *Cx. quinquefasciatus* do Brasil (Wilke *et al* 2014; Carvalho 2017).

## **1.2 Biologia**

O ciclo de vida do *Cx. quinquefasciatus* pode ser dividido em quatro principais fases: ovo, larva, pupa e adulto. A duração desse ciclo pode variar entre 8 e 14 dias, dependendo de fatores como umidade, disponibilidade de alimento e principalmente temperatura (Subra 1981). Em condições naturais, os machos vivem apenas uma ou duas semanas, mas as fêmeas podem viver mais de dois meses (Manimegalai & Sukanya 2014).

### **1.2.1 Ovos**

Os ovos de *Cx. quinquefasciatus* são postos individualmente na superfície da água em forma de uma jangada única (Figura 4), que contém em média 155 ovos, que eclodem entre 24 e 72 horas após a oviposição (Bates 1949). As jangadas inicialmente apresentam coloração clara e escurecem em poucas horas. O número de ovos pode variar de acordo com a fonte e o volume de sangue ingerido pela fêmea (Subra 1981). Fêmeas que se alimentam de sangue de aves geralmente colocam mais ovos em comparação as que se alimentam de sangue humano (Krishnamurthi & Pal 1958). Diferente do *Ae. aegypti*, os ovos de *Cx. quinquefasciatus* não são resistentes a dessecação, tornando-se completamente inviáveis se expostos em ambiente seco por mais de 5 horas (Vargas *et al* 2014).



**Figura 4 - Jangada de ovos de *Cx. quinquefasciatus*.** Fonte: Fotografia de Sean McCann, em Hill & Connelly (2009)

### 1.2.2 Larvas

As larvas apresentam cabeça curta e robusta, com tonalidade mais escura em direção à base (Figura 5). Seu abdômen é dividido em 8 segmentos, com padrão de cerdas exclusivo para cada segmento (Sirivanakarn & White 1978). Elas se alimentam contínua e intensamente, passando por 4 estádios de desenvolvimento que são regulados pela nutrição, temperatura e densidade populacional no criadouro (Clements 1963). Ukubuiwe *et al* (2019) demonstram que larvas de criadouros com grande densidade populacional (1 larva/1,25 mL) demoram, em média, o dobro do tempo para completar o seu desenvolvimento, quando comparadas com larvas de criadouros com baixa densidade populacional (1 larva/ 10 mL). A temperatura ótima para o desenvolvimento das larvas é de aproximadamente 30°C (Rueda *et al* 1990) e o período entre o primeiro e último estágio varia entre 5 e 10 dias, sendo mais curto para os machos (Subra 1981; Brasil 2011). Assim como larvas de outros mosquitos, as de *Cx. quinquefasciatus* progridem até o quarto estágio, param de se alimentar e passam para o estágio pupal (Gerberg *et al* 1994).



Figura 5 - Larvas de *Culex quinquefasciatus* (quarto estágio). Fonte: ICPMR (2002)

### 1.2.3 Pupas

Possuem formato de vírgula, apresentando cabeça e tórax fundidos (Figura 6). Nadam ativamente e não se alimentam. Suas reservas energéticas adquiridas durante a fase de larva são consumidas durante o processo de transformação em adulto (Brasil 2011). O estágio de pupa dura aproximadamente 36 horas, porém esse período pode variar e é dependente de fatores como a temperatura (Gerberg *et al* 1994). Em regiões onde as estações do ano são mais distintas, as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* emergem em maior número do que os machos (Hayres 1975).

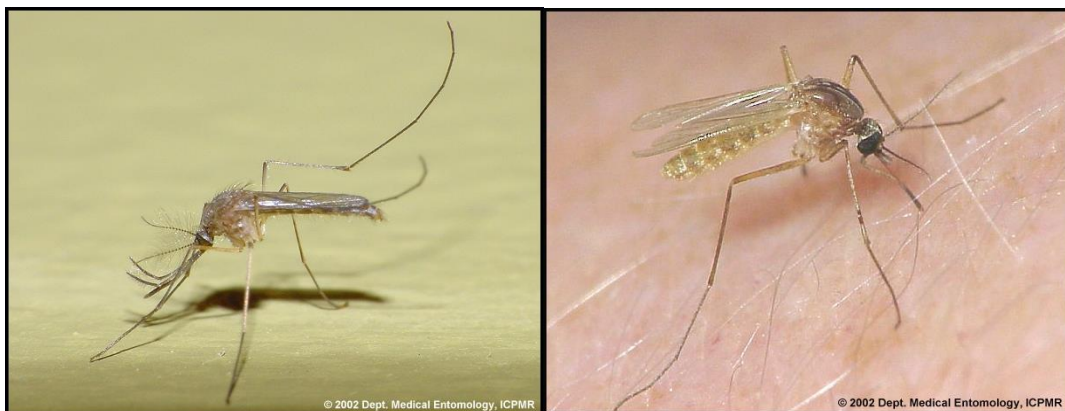


Figura 6 - Pupa de *Culex quinquefasciatus*. Fonte: copiado de Hill & Connelly (2009)

#### 1.2.4 Adultos

O indivíduo adulto é marrom, com tórax, probóscide, tarso e asas mais escuros do que o restante do corpo (Sirivanakarn & White 1978). Antenas e probóscide apresentam comprimento semelhante, podendo a antena ser um pouco mais curta em alguns casos. As escamas do tórax são estreitas, alongadas e curvas, com coloração amarelo-douradas. Na região basal de cada tergito, o abdômen tem faixas pálidas, estreitas e arredondadas (Consoli & Lourenço de Oliveira 1994; Darsie & Ward 2005). Os machos são ligeiramente menores que as fêmeas e se diferem pela presença de antena plumosa e palpos longos (Figura 7). A genitália masculina se projeta para fora do último segmento do abdômen. Depois que emergem, os adultos ficam em repouso na superfície da água por algumas horas, para que haja o endurecimento da cutícula, tornando-os aptos para os primeiros vôos, que geralmente são de distâncias de, no máximo, 100 metros (Brasil 2011). Entre 24 e 36 horas depois da emergência, as fêmeas geralmente já se encontram fertilizadas pelos machos e realizam sua primeira alimentação sanguínea.

Macho e fêmea se alimentam de carboidratos provenientes de tecido vegetal em decomposição, néctar de flores e frutos, porém as fêmeas necessitam de sangue para maturação e desenvolvimento dos ovos. Após a digestão do sangue, que leva aproximadamente 70 horas (Lehane 2005), a fêmea procura um local adequado para colocar seus ovos e, dessa forma, o ciclo recomeça. Uma única fêmea coloca até 5 jangadas de ovos durante sua vida. O tempo entre a oviposição e um novo repasto sanguíneo é de até 12 horas (Subra 1981, Gerberg *et al* 1994).

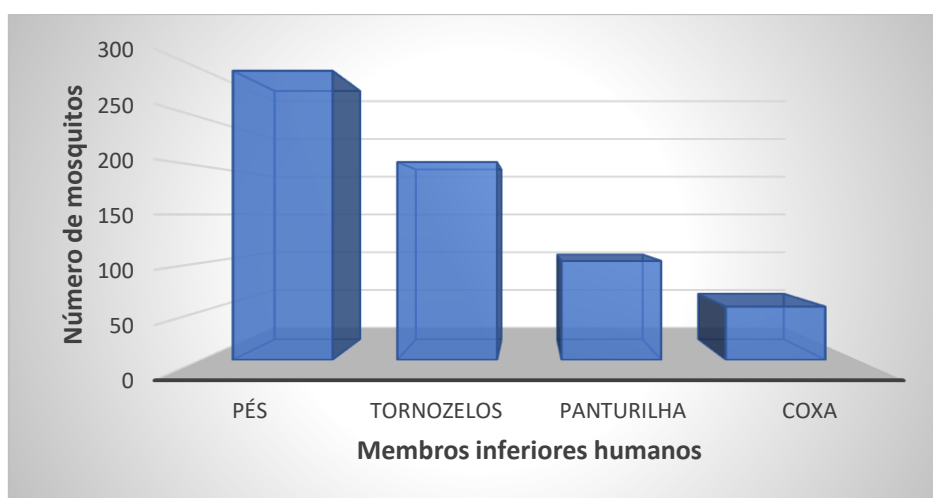


**Figura 7 - Adultos macho (esquerda) e fêmea (direita) de *Cx. quinquefasciatus*.**  
Fonte:ICPMR (2002).



### 1.3 Hábitos, habitat e preferências alimentares

*Culex quinquefasciatus* é altamente antropofílico e de hábitos noturnos, picando as pessoas dentro e fora das residências (Subra 1981). Estudos sugerem que o pico de maior atividade da espécie ocorre durante a madrugada, entre 1 e 2 horas da manhã e que o número máximo de tentativas de picadas fora e dentro das casas ocorre nesse mesmo período ou um pouco mais cedo (Subra 1972; Brunhes 1975). De forma geral, as fêmeas da espécie realizam picadas em qualquer parte do corpo humano, mas aparentemente têm preferência por membros inferiores (Self *et al* 1969; Oduola & Awe 2006), principalmente pés e tornozelos (Figura 8). Essa espécie é considerada oportunista, sendo capaz de realizar repasto sanguíneo de forma eficiente em diferentes fontes. Além de humanos, há registros de fêmeas se alimentando de vários animais, como por exemplo: aves, anfíbios, répteis, cavalos, porcos, gado, coelhos, ovelha e cães (Bhattacharya *et al* 1982, Lee *et al* 1989; Holder *et al* 1999).



**Figura 8- Densidade de fêmeas de *Culex quinquefasciatus* atraídas por diferentes partes do corpo humano.** Fonte: Adaptada de Oduola & Awe (2006)

Durante o dia, fora do período de atividade ou depois de realizarem o repasto sanguíneo, fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* repousam em diferentes abrigos. Têm preferência por locais úmidos, pouco ventilados e escuros. No peridomicílio, podem ser encontradas repousando debaixo de tanques de lavar roupas, entulhos e folhagens. Já dentro das casas, se abrigam em qualquer cômodo ou móvel, dando preferência para os locais escuros, dormitórios e para

o banheiro da residência, devido a uma maior umidade do local (Consoli & Lourenço de Oliveira 1994). Em regiões mais afastadas das casas, como nas proximidades de córregos e rios poluídos, esses mosquitos se abrigam nas vegetações marginais e aquáticas. A vegetação rasteira desses locais cria um ambiente úmido, ideal para o abrigo dos mosquitos. Nessas regiões é possível encontrar um grande número de machos e também de fêmeas em estágios fisiológicos distintos (Brasil 2011).

#### 1.4 Criadouros

Qualquer local contendo água parada ou com pouca movimentação é um potencial criadouro para *Cx. quinquefasciatus*. Entretanto, há preferência por criadouros artificiais com água rica em matéria orgânica em decomposição, de aspecto sujo e com mal cheiro (Forattini 1962). Os criadouros podem ser caracterizados de acordo com o seu volume, acesso, natureza, extensão e duração. Um quadro disponibilizado em Brasil (2011) reúne e classifica exemplos de criadouros para a espécie (Figura 9).

1 – Criadouros artificiais			
Em recipientes		No solo	
Permanentes ou semipermanentes	Temporários	Permanentes ou semipermanentes	Temporários
Exemplos:		Exemplos:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tanques</li> <li>▪ Caixas d'água</li> <li>▪ Bebedouros</li> <li>▪ Lages sem dreno</li> <li>▪ Canoas abandonadas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Latas, vidros</li> <li>▪ Potes</li> <li>▪ Vasos e floreiras</li> <li>▪ Pneus, barris</li> <li>▪ Calhas entupidas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Represas e açudes</li> <li>▪ Poços (cacimbas)</li> <li>▪ Piscinas abandonadas</li> <li>▪ Tanques de piscicultura</li> <li>▪ Caixa de inspeção de gordura</li> <li>▪ Tanques de contenção de águas pluviais</li> <li>▪ Fossa negra</li> <li>▪ Bueiros</li> <li>▪ Riachos, valas e valões assoreados</li> <li>▪ Covas em cemitérios</li> <li>▪ Poço de elevador</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Acúmulo de pedras</li> <li>▪ Caixas de retenção de chuva</li> </ul>
2 – Criadouros naturais			
Em recipientes		No solo	
Permanentes ou semipermanentes	Temporários	Permanentes ou semipermanentes	Temporários
Exemplos:		Exemplos:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bambus quebrados</li> <li>▪ Buracos de árvores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pedras côncavas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Lagoas e pântanos</li> <li>▪ Alagadiços</li> <li>▪ Remansos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Enchentes</li> <li>▪ Poças de chuvas</li> <li>▪ Várzeas inundáveis</li> </ul>

Figura 9 - Classificação de criadouros de *Cx. quinquefasciatus*. Fonte: Brasil (2011)

Tais criadouros não são exclusivos de *Cx. quinquefasciatus* e podem ser utilizados para oviposição de outros mosquitos, como o *Aedes aegypti* (Subra 1981). Larvas de ambas as espécies podem ser encontradas em uma grande variedade de criadouros, como recipientes artificiais, fossas sépticas, piscinas abandonadas e valões (Obando *et al* 2007, Burke *et al* 2010). Em criadouros onde a quantidade de alimento é escassa, larvas de *Ae. aegypti* levam vantagem sobre as de *Cx. quinquefasciatus* devido ao hábito de alimentação ativa e seu rápido desenvolvimento. Apesar disso, não há indícios de competição assimétrica entre *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*, o que permite a coexistência nos criadouros (Santana-Martinez *et al* 2017).

Em culicídeos, a seleção de criadouros é feita por atrativos ou repelentes encontrados nesses locais, como compostos voláteis resultantes da fermentação de matéria orgânica e feromônios de oviposição (Bentley & Day 1989). Para *Cx. quinquefasciatus*, o composto 3-metilindol (escatol), produzido pela degradação de matéria orgânica, é um dos principais atrativos de oviposição presente nos criadouros (Millar *et al* 1992). Além disso, ovos com um dia de idade liberam da sua porção apical o composto (5R,6S)-6-acetoxy-5-hexadecanolida (acetoxihexadecanolida), um feromônio que funciona como um sinalizador natural para outras fêmeas grávidas (Bruno & Laurence 1979). A presença desse feromônio funciona como um atrativo, indicando para a fêmea que o criadouro é adequado para o desenvolvimento das larvas. Porém, quando este composto se encontra em alta concentração, passa a exercer efeito contrário, atuando como repelente (Mboera *et al* 1999; Clements 1999).

### **1.5 Fator de incômodo e importância em saúde pública**

Os mosquitos talvez tenham maior influência sobre a saúde do ser humano do que qualquer outro inseto e isso se justifica não só na sua importância na transmissão de patógenos, mas também no desconforto e incômodo que causam na população humana (Pratt *et al* 1963). *Cx. quinquefasciatus* é capaz de promover considerável aborrecimento para pessoas constantemente expostas às picadas. Esse fator de incômodo é um índice subjetivo que depende de variáveis como idade, predisposição genética pessoal e também da densidade de mosquitos (Kirk *et al* 2000).

Em Bamaco (capital do Mali, África), foram registrados índices de centenas de picadas de *Cx. quinquefasciatus* por pessoas no interior das casas durante uma única noite (Subra 1965). O efeito das picadas é algo complexo de se mensurar, mas não há dúvidas de que podem provocar alergias, perda de sono e ulcerações na pele, que por sua vez, reduzem a qualidade de vida do indivíduo (Brasil 2011). As populações mais expostas às picadas de *Cx. quinquefasciatus* são aquelas que vivem em regiões com habitações precárias e sem saneamento básico adequado. Esses locais são propícios para a proliferação e disseminação dos mosquitos (Bonfim 2009).

No Brasil, onde o *Cx. quinquefasciatus* é conhecido como pernilongo ou muriçoca, sua alta infestação em determinadas regiões faz com que seja considerado uma praga (Forattini 2002). Em São Paulo, por exemplo, há vários anos, moradores que vivem próximos às margens do Rio Pinheiro sofrem com o incômodo causado pelas altas densidades e picadas deste inseto (Bracco *et al* 1997, Morais *et al* 2006), mas recentemente a situação parece ter saído de controle. Em 2017, a infestação do mosquito foi tão alta que a população do local chegou a exigir da prefeitura uma pulverização de inseticida emergencial por meio de um abaixo assinado com mais de 8 mil assinaturas (Brasil 2017). No ano de 2018, os moradores chegaram a realizar uma força-tarefa para tentar conter a proliferação do *Culex*, que pela primeira vez permaneceu alta, mesmo durante o inverno (Brasil, 2018). A infestação por *Cx. quinquefasciatus* não é exclusiva de São Paulo. Centros urbanos em outros estados também sofrem com o mesmo problema, como é o caso da Bahia (Santos & Calado 2014), Minas Gerais (Borges 2014) e de Pernambuco (Correia *et al* 2012).

Além de representar um fator de incômodo, *Cx. quinquefasciatus* também é vetor de patógenos responsáveis pelo desenvolvimento de algumas doenças de importância significativa em saúde pública. É considerado o principal vetor de *Wuchereria bancrofti* (Cobbold 1877), nematoide agente etiológico da filariose linfática e que tem o homem como seu único hospedeiro definitivo (Bran 1967). *Culex* também é capaz de transmitir o nematoide *Dirofilaria immitis* (Leidy 1856), responsável pelo desenvolvimento da filariose canina que é capaz de afetar outros mamíferos, inclusive o homem (Labarthe *et al* 1998). Este mosquito também é competente para transmitir alguns arbovírus como os vírus do Nilo Ocidental (Lanciotti *et al* 1999), encefalite de Saint Louis (Tsai & Mitchell 1989),

Encefalite Japonesa (Reuben *et al* 1994), chikungunya (Rudnick & Hammon 1961; White 1971) e Rift Valley (Meegan 1979). Em Bhattacharya & Basu (2016) está disponível uma lista de patógenos encontrados e isolados de *Cx. quinquefasciatus* em condições naturais e de laboratório.

No Brasil, os patógenos transmitidos por *Cx. quinquefasciatus* e de maior importância médica são *Wuchereria bancrofti* (Azevedo & Dobbin 1952), vírus da febre do Nilo Ocidental (Ometto *et al* 2013), vírus mayaro (Serra *et al* 2016) e, possivelmente, o vírus Zika (Fernandes *et al* 2017; Ayres *et al* 2019).

### **1.6 Controle vetorial**

Como outras espécies de mosquitos, *Culex* apresenta curto ciclo de vida, elevada fecundidade e alto nível reprodutivo. Tais características por si só já dificultam o controle da espécie, pois favorecem rápida recuperação da densidade populacional caso as ações de controle sejam interrompidas. Adicionalmente, as fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* tem preferência por criadouros ricos em matéria orgânica, como esgotos, valões e cursos d'água poluídos. A água presente nesses locais é pobre em oxigênio dissolvido, o que reduz a presença e o desenvolvimento de predadores naturais (Weinstein *et al* 1997). Este fato associado à grande disponibilidade de alimento colabora para a manutenção dos altos níveis de densidade populacional desse mosquito. Portanto, para que sejam eficazes, as ações de controle da espécie devem ser realizadas de forma constante, priorizando medidas que funcionem a longo prazo (Brasil 2011).

De acordo com a OMS, as melhores formas de controle vetorial envolvem o ordenamento ambiental, prevenindo sua proliferação e o contato vetor-hospedeiro. As medidas para prevenir a proliferação de mosquitos devem ser compostas por intervenções permanentes ou temporárias visando a eliminação ou vedação dos criadouros em potencial. Quando bem empregadas, tais intervenções reduzem ou dispensam a necessidade de aplicação de inseticidas. A prevenção e redução do contato vetor-hospedeiro têm como objetivo reduzir a exposição humana às picadas do mosquito, tendo impacto direto na redução do risco de infecção por patógenos e na melhoria da qualidade de vida e saúde da

população. Caso a execução dessas ações não seja possível, é indicado que se realize o controle biológico ou químico (WHO 1980).

### 1.6.1 Controle biológico

O controle biológico é feito por meio da utilização de predadores, competidores e patógenos de mosquitos com o intuito de reduzir a densidade populacional do inseto. Até o final da década de 1970, o controle biológico utilizava prioritariamente peixes que se alimentam de larvas, o que fez desse método o mais antigo e bem conhecido dentro do controle biológico de mosquitos (Chandra *et al* 2008). O primeiro obstáculo encontrado para o uso de predadores como método de controle de *Cx quinquefasciatus* é encontrar espécies que se adaptem e sobrevivam aos criadouros preferenciais da espécie, ou seja, ambientes com água altamente poluída e pobre em oxigênio (Subra 1981). Na literatura, os dois peixes descritos como mais utilizados para o controle de *Culex* e que conseguem sobreviver nessas condições são as espécies *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853) e *Poecilia reticulata* Peters, 1859 (Figuras 10 e 11), nativas da América Central e mais conhecidas como peixe-mosquito e barrigudinho, respectivamente (Bangy *et al* 1973; Sasa *et al* 1965). *Macropodus opercularis* (Linnaeus, 1758) ou peixe-do-paráiso (Figura 12), é natural da Ásia e também foi introduzido no Brasil. Essa espécie foi registrada na Represa Billings, um dos maiores reservatórios de água da região metropolitana de São Paulo, predando larvas de *Cx. quinquefasciatus* com eficiência, graças a sua habilidade de viver em ambientes eutrofizados, com pouco ou nenhum oxigênio dissolvido (Costa *et al* 1985,1987).



**Figura 10 – Peixe-mosquito *Gambusia affinis*. Fêmea (acima) e macho (abaixo).** Fonte: Nico *et al* (2019).



**Figura 11- Peixe barrigudinho *Poecilia reticulata*. Macho (acima) e fêmea (abaixo).** Fonte: Deacon *et al* (2015).



**Figura 12 - Peixe-do-paráíso *Macropodus opercularis*, variante azul.** Fonte: Hristov (2016).

Insetos também podem ser utilizados como predadores de larvas de *Cx. quinquefasciatus*, como por exemplo larvas de mosquitos dos gêneros *Lutzia* (Gratz 1973) e *Toxorhynchites* (Steffan *et al* 1980), libélulas (Mandal *et al* 2008), percevejos (Saha *et al* 2007) e besouros (Chandra *et al* 2008). Embora haja

vários exemplos bem-sucedidos utilizando-se de insetos como predadores de mosquitos (Shaalan & Canyon 2009), existem algumas dificuldades na sua aplicação e talvez a maior delas esteja associada com a criação, colonização e manuseios desses insetos (Garcia 1982).

### **1.6.1.2 Inseticidas bacterianos**

Em 1976, a partir da descoberta de bactérias patogênicas às larvas de mosquitos, iniciou-se uma nova era no controle de vetores. Durante a fase esporulação, *Bacillus thuringiensis var. israelensis* – *Bti* e *Lysinibacillus sphaericus* – *Lbs* produzem cristais proteicos que se tornam altamente tóxicos quando ingeridos pelas larvas de mosquitos (Becker 2000). Essas toxinas foram submetidas a uma série de testes, que demonstraram especificidade para larvas de dípteros (Becker & Margalit 1993).

A ação inseticida do *Bti* é resultante do efeito de 4 diferentes tipos de protoxinas que agem de forma sinérgica e com alta toxicidade para larvas de Simuliidae, Chironomidae, Tipulidae e Culicidae. Já o *Lbs* produz uma toxina binária que também age em sinergismo, possui maior efeito residual em comparação ao *Bti*, independente da formulação, principalmente em águas ricas em matéria orgânica. É utilizado principalmente para a maioria das espécies dos gêneros *Culex* e *Anopheles* (Regis *et al* 2001; Brasil 2011).

No Brasil, após uma série de testes-pilotos realizados em áreas urbanas de Recife, o *Lbs* foi adotado como larvicida pelo Programa de Eliminação da Filariose, no controle de *Cx. quinquefasciatus* (Regis *et al* 1995, 2000). Posteriormente o *Lbs* também passou a ser usado regularmente nas margens do Rio Pinheiros, no município de São Paulo-SP (Andrade & Santos 2004).

Tanto o *Bti* quanto o *Lbs* não são tóxicos para o homem e outros animais. Isso representa um fator de segurança ambiental, visto que geralmente serão aplicados em ambiente urbano. Essas protoxinas também apresentam relativa facilidade de produção em massa, fácil aplicação e são comercializadas em diferentes formulações. Todas essas características colaboraram para a sua rápida integração e utilização e vários programas de controle vetorial (Vilarinhos *et al* 1998).



### 1.6.1.3 Espinosinas

São metabólicos de fermentação produzidos por uma bactéria de solo, a *Saccharopolyspora spinosa*. Esse microorganismo foi descoberto e identificado em 1985, em uma amostra de solo coletada em 1982 nas Ilhas Virgens Britânicas, ao leste de Porto Rico (Mertz & Yao 1990). As espinosinas compõem uma nova classe de inseticidas, representada pelo espinosade (uma mistura de espinosinas A e D, daí o nome SpinosAD) e mais recentemente, o espinetoram (Marques 2018).

O espinosade foi registrado em 1997, sob a Iniciativa de Pesticidas de Risco Reduzido da Agência de Proteção Ambiental do Estados Unidos - USEPA (*United States Environmental Protection Agency* em inglês). Possui baixa toxicidade humana, curta persistência ambiental e alta seletividade, características que lhe renderam o Prêmio Presidencial do Desafio de Química Verde em 1999. Já o espinetoram (mistura das espinosinas J e L) é um inseticida semi-sintético de uso agrícola (Crouse *et al* 2007). Possui atividade e controle residual superiores ao espinosade, mantendo a baixa toxicidade em mamíferos e a curta persistência ambiental. Foi registrado nos Estados Unidos em 2007 pela mesma agência, recebendo o Prêmio Presidencial do Desafio de Química Verde em 2008 (Dripps *et al* 2008).

As espinosinas atuam no sistema nervoso central dos insetos, agindo como moduladores alostéricos dos receptores nicotínicos de acetilcolina e receptores GABA (ácido gama-aminobutírico). Alteram a conformação desses receptores, tornando-os mais ativos. Essa hiperatividade prolongada provoca a transmissão contínua e descontrolada dos impulsos nervosos, que por sua vez, geram fadiga muscular e morte (Salgado *et al* 1998, Watson 2001; Orr *et al* 2006).

Apesar de ter sido inicialmente empregado como inseticida agrícola, o potencial da utilização do espinosade no controle de vetores já foi evidenciando antes mesmo do isolamento dos seus princípios ativos, quando Kirst *et al* observaram ação inseticida de extratos do caldo de fermentação de *S. spinosa* em larvas de *Ae. aegypti* (Kirst *et al* 1992). No Brasil, a utilização de espinosade em saúde pública é permitida e recomenda desde 2008 (Brasil 2008), entretanto

não é frequentemente utilizado, apesar de demonstrar efeito inseticida satisfatório contra *Ae. aegypti* (Dias *et al* 2017; Fonseca *et al* 2019) e *Cx. quinquefasciatus* (Carraro 2013).

### **1.6.2 Controle químico**

De acordo com o Ministério da Saúde, o uso de compostos químicos deve ser a última alternativa a ser considerada para o controle de vetores e sua aplicação deve ser restrita a situações de emergência ou quando não se disponha de outras estratégias de controle. A necessidade de sua aplicação pode representar uma falha no controle de vetores, indicando que os procedimentos menos agressivos não foram adotados ou não tiveram efeito, tornando necessário o uso de inseticidas (Brasil, 2001).

Os inseticidas registrados no Ministério da Saúde são classificados em duas categorias: os de uso livre (produtos formulados e diluídos que podem ser comercializados livremente) e os de uso profissional (produtos concentrados e de acesso restrito às empresas de desinsetização e órgãos públicos). Esses compostos podem ter ação neurotóxica ou de interferência no desenvolvimento do inseto (Brasil, 2001).

Compostos de ação neurotóxica atuam por contato (adulcidas e larvicidas) ou por ingestão (larvicidas), interferindo na transmissão de impulso nervoso nos neurônios (piretroides e organoclorados) ou nas sinapses (organofosforados e carbamatos).

#### **1.6.2.1 Piretroides**

São inseticidas a base de piretro, um composto natural extraído de flores de crisântemos (Figura 13). Inicialmente, o piretro tinha pouca aplicação no controle de pragas na agricultura, sendo mais utilizado para fins domésticos e para proteção de estoques de comida. Esse uso restrito era justificado por fatores econômico e fato de o composto ser altamente fotossensível (Glynn-Jones 1973). Apesar dessas desvantagens, os piretroides naturais combinam a alta atividade inseticida com baixa toxicidade para mamíferos, sendo rapidamente metabolizados, além de serem biodegradáveis, com baixa ou nula retenção de resíduos no ambiente (Wouters & van Den Bercken 1978).

Essas propriedades favoráveis despertaram o interesse pela busca de inseticidas sintéticos baseados nos piretroides naturais. Os primeiros piretroides sintéticos surgiram no final da década de 1940 e eram pouco estáveis e menos eficientes que os compostos naturais (O'Brien 1967). Durante a década de 1960, piretroides mais estáveis e com alta atividade inseticida começaram a ser desenvolvidos (Elliott 1976, 1977). Atualmente os piretroides comercializados são produzidos em laboratório, apresentam fotoestabilidade e são efetivos, mesmo quando aplicados em pequenas concentrações (Ware & Whitacre 2004).

Os piretroides possuem ação rápida, afetando o sistema nervoso central e periférico do inseto, mais precisamente nos canais de sódio regulados por voltagem ( $Na_v$ ) presentes nos axônios, mantendo-os abertos e impedindo assim a interrupção do impulso nervoso. Esse fenômeno gera hiperexcitação seguida de paralisia e morte (Camougis 1973).

Há dois tipos de piretroides: os do tipo I, com coeficiente de temperatura negativo (quanto menor a temperatura, maior sua toxicidade). São exemplos de piretroides tipo I: aletrina, bioaletrina, resmetrina, bifentrina, tetrametrina e a permetrina. Esses piretroides agem principalmente no sistema nervoso periférico (Yamamoto *et al* 1983). Já os piretroides tipo II são considerados mais potentes que os do tipo I por manterem os  $Na_v$  abertos por mais tempo. Agem principalmente no sistema nervoso central e possuem coeficiente de temperatura positivo (quanto maior a temperatura, maior seu efeito tóxico) (Vijverberg & van den Bercken 1990). Quando administrados em altas concentrações, os piretroides tipo II também são capazes antagonizar os efeitos do receptor GABA, impedindo a entrada de cloro nos neurônios, levando o inseto à morte por esgotamento (Bloomquist *et al* 1986, Soderlund & Bloomquist 1989). Fenpropatina,  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina, deltametrina e fenvalerato são exemplos de piretroides tipo II (CGWH 2003).



**Figura 13 - *Chrysanthemum cinerariaefolium*: fonte natural de piretro.** Fonte: Borden *et al* (2018).

#### **1.6.2.2 Organoclorados**

São inseticidas que contém carbono, hidrogênio e cloro. Podem ser divididos em difenil afiláticos, hexaclociclohexanos (HCH), ciclodienos, e policloroterpenos. Os policloroterpenos são os únicos organoclorados sem registro de utilização no Brasil (Ware & Whitacre 2004, CETESB, 2018). O grupo dos difenil afiláticos é o mais antigo dos organoclorados e abriga um dos inseticidas mais conhecidos, o DDT – diclorodifeniltricloroetano (Ware & Whitacre 2004). O DDT foi o primeiro inseticida a ser usado em grande escala, principalmente durante a Segunda Guerra Mundial, para controle da malária e tifo (Brasil 2001). Na Itália, durante os anos de 1943 e 1944, o DDT chegou a ser pulverizado na pele da população (Figura 14) para controlar a epidemia de tifo (Wheeler 1946), cuja bactéria é transmitida por piolhos, pulgas e ácaros. Já no Brasil, os primeiros registros de utilização de organoclorados datam de 1946, no controle de pragas agrícolas. A produção brasileira de DDT foi iniciada em 1950, sendo muito utilizado na agricultura e nos programas de controle da malária e leishmaniose. Seu uso em saúde pública ficou sobre responsabilidade da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), que realizou em 1991 a última compra do produto para o controle de *Anopheles darlingi* Root 1926 na Amazônia (Filho 1997).



**Figura 14 - Soldado do Exército Americano realizando aplicação de DDT contra a epidemia de tifo na Itália. Fonte: Carson (1962).**

De forma similar aos piretroides, o organoclorado DDT age no Nav, mantendo-os abertos por mais tempo. Com isso, ocorre transmissão contínua do impulso nervoso e o inseto acaba morrendo devido a hiperexcitação (Guedes 1999). Já os organoclorados ciclodienos e HCH inibem a ação do receptor GABA, que em condições normais, aumentam a permeabilidade do íon cloro nos neurônios. Essa inibição antagoniza o efeito calmante do receptor GABA, promovendo frequente estímulo nervoso seguido de paralisia e morte (Narahashi *et al* 1992).

Os organoclorados possuem alta persistência no ambiente, baixa solubilidade em água e alta solubilidade em lipídios. A combinação dessas características faz com que esses inseticidas se acumulem ao longo da cadeia alimentar (Wong & Lee 1997). Os organoclorados podem ser absorvidos pelo organismo por vias cutâneas, digestivas ou respiratórias (Mariconi 1985). A absorção por via cutânea é maior para os hexaclorocicloexanos, incluindo o Lindano, e ciclodienos, como aldrin, dieldrin, endrin e endossulfan. Já para o DDT, em vertebrados e humanos, a maior absorção ocorre por inalação das partículas de pó do inseticida ou por ingestão de alimentos contaminados, especialmente os gordurosos (Fernícula 1985, Brasil 1996).

A intoxicação por organoclorados pode causar sérios danos à saúde humana, como por exemplo: gerar lesões hepáticas e renais, afetar o sistema nervoso e imunológico, além de provocar danos cerebrais e lesões na medula óssea. Em Flores *et al* (2004), é possível encontrar um levantamento dos principais casos de intoxicação causados por organoclorados em várias partes do mundo, incluindo o Brasil. Por esses motivos, o uso e comercialização de organoclorados, em especial o DDT, para fins agrícolas passou a ser proibido em vários países. Em 1970, a Suécia se tornou o primeiro país a banir o DDT e outros organoclorados (D'Amato *et al* 2002). No Brasil, a proibição da comercialização, uso e distribuição desses compostos para fins agrícolas ocorreram em 1985 (Brasil 1985) e seu uso em saúde pública só foi proibido em 1998 (Brasil 1998).

### **1.6.2.3 Organofosforados**

São inseticidas derivados de ácido fosfórico e considerados os compostos mais tóxicos para vertebrados. Foram sintetizados pela primeira vez em 1820 (Lassaigne 1820) e introduzidos como arsenal químico durante a Segunda Guerra Mundial. Posteriormente foram convertidos em compostos menos potentes, sendo utilizados no controle de pragas na agricultura, pecuária e em saúde pública. Os organofosforados ganharam popularidade em todo o mundo por se decomporem rapidamente no ambiente, apresentando menor impacto e persistência quando comparados aos organoclorados (Sullivan & Blose 1992).

Entre os organofosforados existem compostos altamente tóxicos como o pesticida agrícola parathion (EPA 1999) e outros com baixa toxicidade como o temefós, larvicida amplamente utilizado no controle de vetores do Brasil e com aplicação permitida em água potável (Chavasse & Yap 1997). Além do temefós, outros organofosforados são utilizados no controle de vetores no Brasil, como por exemplo os adulticidas fenitrothion e malathion (Brasil 2018, Camargo Said & Croda 2019). O clorpirifós também já foi utilizado no controle de vetores no Brasil, porém devido ao seu perigo à saúde humana, sua aplicação como inseticida domissanitário foi proibida no ano de 2004. Entretanto, sua utilização para fins agrícolas continua liberada (Brasil 2004).

Os inseticidas organofosforados agem inibindo de forma irreversível a enzima acetilcolinesterase. Essa inibição provoca o acúmulo do

neurotransmissor acetilcolina nas sinapses, causando superestimulação e subsequente interrupção da transmissão nervosa no sistema nervoso central e periférico, acarretando a morte do inseto (Tafari & Roberts 1987).

#### **1.6.2.4 Carbamatos**

São ésteres de ácido carbâmico, que assim como os organofosforados, inibem a enzima acetilcolinesterase. Os primeiros inseticidas carbamatos sintetizados foram os dimetil carbamatos, porém sem atividade inseticida adequada (Wiesmann *et al* 1951). O primeiro carbamato com ação inseticida satisfatória foi o carbaryl (Servin<sup>®</sup>), introduzido em 1956 e que possui o maior histórico de utilização dentre os inseticidas do grupo (David *et al* 1960; Ware & Whitacre 2004).

O modo de ação dos inseticidas carbamatos é similar aos organofosforados, porém têm como principal diferença a característica de inibir reversivelmente a enzima acetilcolinesterase. Quando essa enzima é inibida por um carbamato diz-se que ela foi “carbamilada”. Depois de algum tempo, a enzima carbamilada passa por um processo de regeneração espontânea, voltando a sua atividade normal. O tempo de meia vida para uma enzima carbamilada se recuperar é aproximadamente 30 minutos (Fukuto 1990).

Os únicos carbamatos recomendados e utilizados para o controle de vetores no Brasil são propoxur e bendiocarb (Brasil 2019). Esses inseticidas foram bastante utilizados na década de 1980, principalmente para o controle de *Ae. aegypti* (Gebara & Almeida 1988; Macoris *et al* 1999, 2014). Também há registros de sua utilização no controle do mosquito *Cx. quinquefasciatus* (Bracco *et al* 1997), do percevejo-de-cama *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Silva *et al* 2016) e dos triatomíneos *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Pinchin *et al* 1984) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Sherlock & Piesman 1984).

#### **1.6.2.5 Insect Growth Regulator - IGR**

Os reguladores de crescimento de insetos são inseticidas que não matam diretamente o inseto, mas interferem de alguma forma no seu crescimento e desenvolvimento. Atuam principalmente no desenvolvimento embrionário, larval ou ninfal, interferindo na metamorfose e na reprodução. A grande maioria dos

IGRs exigem mais tempo para reduzir a densidade de insetos do que os inseticidas químicos tradicionais. Essa característica limita sua aplicação, fazendo com que esses inseticidas sejam preferencialmente utilizados em combinação com outros compostos de efeito imediato (Graf 1993).

Os principais IGRs utilizados em saúde pública podem ser divididos em duas categorias, de acordo com o seu modo de ação: I – Inibidores de Síntese de Quitina e II – Análogos de Hormônio Juvenil.

### **I - Inibidores de Síntese de Quitina - ISQ**

A quitina é um polissacarídeo que serve de suporte para estruturas extracelulares. É produzida em abundância por invertebrados, principalmente artrópodes, como insetos e crustáceos e em menor extensão em moluscos, anelídeos e nemátodes. Também é o principal componente da parede celular dos fungos, com exceção dos Oomicetos (Muzzarelli *et al* 1986, Cohen 2001).

Os ISQs interferem na biossíntese da quitina em insetos e são seguros para a maioria dos organismos não-alvo. Sua ação é exercida sobre a quitina sintetase, enzima encontrada em abundância na membrana celular e de fundamental importância no processo de formação daquele polissacarídeo (Cohen 1987). O primeiro ISQ recomendado e utilizado no Brasil para o controle de mosquitos foi o diflubenzuron em 2008 (Garcia Neto 2011) e posteriormente o novaluron também passou a ser utilizado nas campanhas de combate ao *Ae. aegypti* (Brasil 2009). Ambos os inseticidas interferem na deposição de quitina, principal componente da cutícula dos insetos. Após a ingestão desses produtos, as larvas apresentam dificuldade para realizar a ecdise. Com a cutícula mal-formada, a musculatura do novo instar fica sem suporte, resultando na incapacidade de liberar a exúvia e consequente morte da larva (Figura 15).

Alguns estudos vêm demonstrando a efetividade dos ISQs no controle de *Cx. quinquefasciatus* (Su *et al* 2003, 2014; Tawatsin *et al* 2007; Jambulingam *et al* 2009; Sadanandane *et al* 2012), inclusive em avaliações feitas em campo (Carraro 2013) e laboratório (Belinato *et al* 2013) no Brasil. Entretanto, não há registro da utilização de ISQs em campanhas de controle desse mosquito no país.



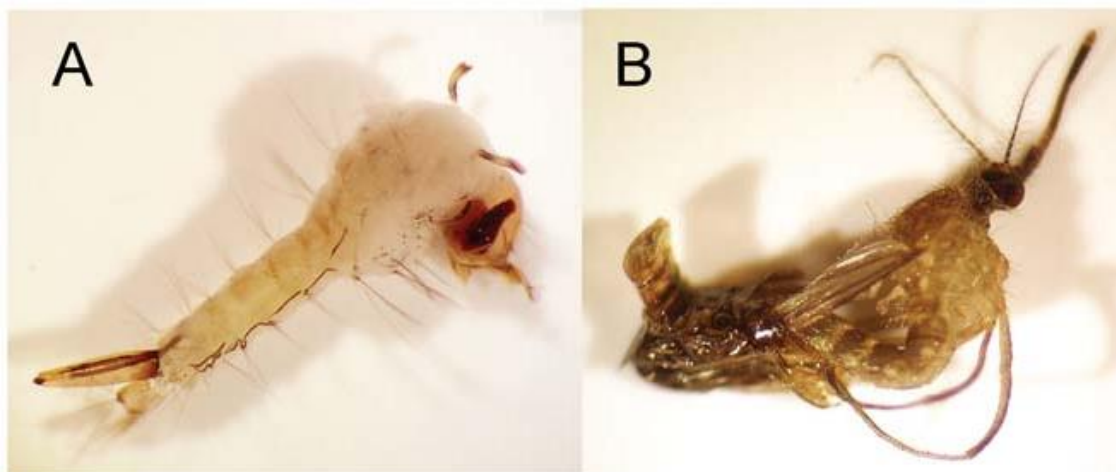


**Figura 15- Efeito do tratamento com novaluron em *Culex*.** Larva com ecdise incompleta no 5º dia após tratamento com o ISQ (Esquerda). Comparação entre pupa controle, não tratada (centro) e tratada com novaluron (direita). Observe a ausência de melanização. As setas indicam a cutícula antiga ligada à epiderme (esquerda) e ausência de nova cutícula (direita). Fonte: Figura adaptada de NourElhouda *et al* (2013).

## II- Análogos de Hormônio Juvenil – AHJ

Hormônios juvenis são produzidos na maioria dos insetos pela *corpora allata*, um aglomerado de células localizado atrás do cérebro. Esses hormônios têm a principal função de evitar a metamorfose até que a larva cresça completamente. A ocorrência desses hormônios em insetos foi primeiramente postulada por Wigglesworth (1934) na década de 1930.

Os AHJ, de forma geral, atuam no desenvolvimento do inseto inibindo a emergência do adulto (Figura 16). O único inseticida dessa categoria que é atualmente indicado pelo Ministério da Saúde brasileiro para o controle de vetores é o pyriproxifen (Brasil 2019). A partir do segundo semestre de 2014, o MS passou a utilizar o pyriproxifen para substituir o novaluron no controle de formas imaturas do *Ae. aegypti* (Brasil 2014). O pyriproxifen afeta a morfogênese, reprodução e embriogênese dos insetos, tendo efeito mais pronunciado durante o estágio de transformação larva-pupa, de forma que o maior percentual de mortalidade seja observado na fase pupal (Invest & Lucas 2008).



**Figura 16 - Efeitos do IGR análogo do hormônio juvenil (AHJ) metopreno no desenvolvimento do mosquito *Culex quinquefasciatus*.** Em (A) morfologia de uma larva morta durante a metamorfose larva/pupa. Em (B) indivíduo incapaz de completar a emergência. Fonte: Figura adaptada de Kamita *et al* (2011).

Apesar de possuir baixos níveis de toxicidade para seres humanos e para a fauna não-alvo de vertebrados e invertebrados aquáticos, esse inseticida é considerado como um dos IGRs mais potentes do mercado. Um estudo conduzido por Arshad (1999) constatou que a toxicidade do pyriproxifen para larvas de *Cx. quinquefasciatus* foi maior do que todos os outros inseticidas avaliados (Tabela 1). Outros trabalhos também demonstram a eficiência do pyproxifen no controle de *Cx. quinquefasciatus* (Kan *et al* 2016; Mian *et al* 2017; Khemrattrakool *et al* 2019). Porém, mesmo sendo indicado para o controle de vetores no Brasil, até a presente data, não foram encontrados registros da utilização de pyriproxifen em campanhas de controle de *Cx. quinquefasciatus* no país.

**Tabela 1** - Toxicidade relativa de diferentes inseticidas em larvas de *Culex quinquefasciatus*.

Larvicida	CL <sub>90</sub> (ppm)	Toxicidade relativa*	Classe
Pyriproxyfen	0.0011	118	IGR
Diflubenzuron	0.0034	39	IGR
Metopreno	0.052	3	IGR
Temefós	0.0096	13	Organofosforado
Fenthion	0.130	1	Organofosforado
Permetrina	0.017	8	Piretroide

\* Valor numérico proporcional à toxicidade do composto

CL<sub>90</sub> :Concentração letal em partes por milhão (ppm)

Fonte: Adaptado de Arshad (1999).

### 1.6.3 Controle genético

O controle genético de mosquitos surgiu como uma nova alternativa de controle, desenvolvido para tentar contornar as falhas de estratégias tradicionais, como a utilização de inseticidas. Esse método apresenta algumas vantagens relevantes, como alta especificidade, não prejudicial ao meio ambiente, potencialmente com baixo custo e alta eficácia (Wilke *et al* 2009). As estratégias baseadas em controle genético são principalmente utilizadas para limitar o tamanho da população do vetor (supressão populacional) ou alterar as populações para que sejam menos suscetíveis a patógenos (substituição populacional) (Jasinkiene *et al* 2007).

#### 1.6.3.1 Técnica do Inseto Estéril (SIT, do inglês “*Sterile Insect Technique*”)

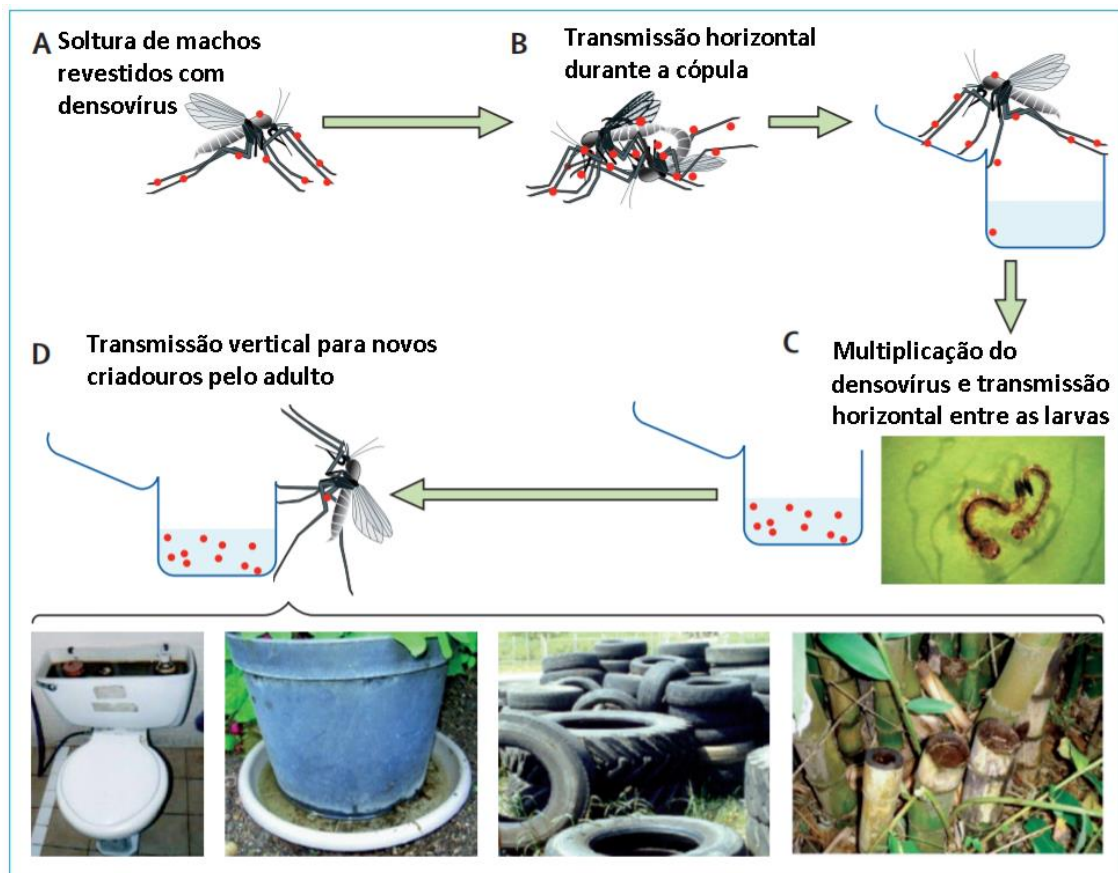
A técnica do inseto estéril consiste na criação, esterilização por radiação e liberação em massa de mosquitos machos. Os machos estéreis liberados irão cruzar com as fêmeas selvagens, reduzindo assim o potencial reprodutivo da espécie, diminuindo, portanto, a densidade populacional (Robinson *et al* 2000). Trata-se de uma técnica espécie-específica, que se aproveita do comportamento natural e eficiente dos mosquitos machos em localizar fêmeas da mesma espécie para acasalar (Wyss 2000). Entretanto, os machos estéreis por radiação podem ser menos competitivos que os machos selvagens e também podem apresentar redução no seu tempo de vida. Além disso, as fêmeas podem evitar acasalar com machos estéreis, dando preferência para os selvagens. Portanto,

para que essa técnica funcione é necessária a soltura de um elevado número de machos irradiados em períodos determinados (Milby *et al* 1983; Alphey 2002).

Apesar das desvantagens, SIT foi aplicada com sucesso no controle de *Cx. quinquefasciatus* na década de 1970. Por meio de esterilização química e por radiação, Patterson *et al* (1970; 1977) erradicaram o mosquito na ilha Seahorse Key, na Flórida, EUA. Outros exemplos de sucesso na aplicação da técnica contra *Cx. quinquefasciatus* ocorreram na Índia na mesma década (Patterson *et al* 1975; Sharma *et al* 1976; Yasuno *et al* 1976). Entretanto, mesmo apresentado resultados satisfatórios, o programa foi cancelado posteriormente devido a questões operacionais e políticas (Anon 1975).

No Brasil, devido às epidemias de dengue, chikungunya e Zika, o principal foco da SIT é o *Ae. aegypti* (Yang & Thomé 2007, Lima 2015, Imperato & Raga 2015, Santos *et al* 2018). Porém, também há registros da utilização dessa técnica para *Culex* no país. Devido ao grande número de reclamações feitas pela população, a Empresa Metropolitana de Águas e Energia – EMAE, em parceria com a Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, fez utilização da SIT para o controle de *Cx. quinquefasciatus* nas imediações do Rio Pinheiros em São Paulo, entre 2010 e 2013 (EMAE 2010; Carraro 2013).

Mais recentemente, vem sendo proposta a utilização da SIT para transmissão de vírus patogênicos para mosquitos (Figura 17). Nesse método os machos estéreis seriam usados para transportar e disseminar densovirus entre os mosquitos selvagens (Bouyer *et al* 2016). Densovirus são parvovirus que se replicam nos núcleos das células dos mosquitos e causam a hipertrofia nuclear característica (denonucleose) que lhes dá o nome (Carlson *et al* 2006). A infecção por densovirus afeta todos os estágios de vida do mosquito e reduz de forma considerável a vida útil do mosquito adulto, tendo assim o potencial de modificar a estrutura etária das populações de mosquitos adultos. Por sua vez, isso deve reduzir significativamente a capacidade vetorial da população (Suchman *et al* 2006). Inicialmente a utilização de SIT associada com dispersão de densovirus foi proposta para o controle de *Aedes*, mas também possui potencial de aplicação para *Culex* (Jousset *et al* 2000).



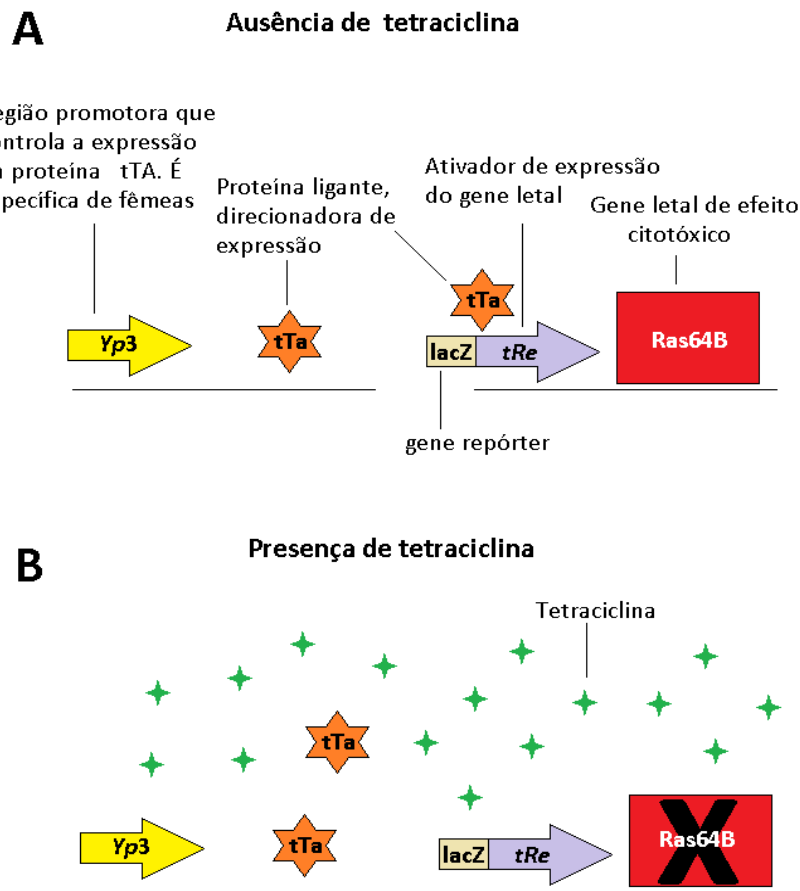
**Figura 17 - Princípio da SIT associada à transmissão de denguevírus.** (A) Machos estéreis são revestidos com denguevírus e liberados. (B) Parte dos denguevírus são transmitidos durante o acasalamento para a fêmea selvagem, que os transporta para os criadouros. (C) O denguevírus contamina as larvas presentes no criadouro e se multiplica com persistência a longo prazo. (D) Algumas larvas sobrevivem e emergem como adultos contaminados que posteriormente carregam o denguevírus para o criadouro vizinho. Fonte: Figura adaptada de Bouyer *et al* (2016).

### 1.6.3.2 Inseto transgênico com gene letal dominante

Mais conhecida como RIDL – *release of insect carrying a dominant lethal gene*, essa técnica consiste na associação de um gene letal dominante. Utiliza-se de uma proteína fator de transcrição (tTA), cuja expressão é restrita às fêmeas, de forma que tTA ativa a expressão de um gene letal inserido via transgênese (Figura 18 A). A tetraciclina atua como um antídoto ao efeito letal, impedindo a ligação de tTA ao promotor do transgene. (Figura 18 B) (Thomas *et al* 2000; Wilke *et al* 2009).

Em uma das vertentes desta técnica, os insetos são criados com uma dieta suplementada com tetraciclina, que impede a expressão do gene letal. Em ambiente livre do antídoto as fêmeas morrem, deixando apenas os machos para serem liberados. Esses machos são viáveis, férteis e homocigotos para o gene

letal dominante e ao acasalarem com fêmeas selvagens, produzem uma prole heterozigota, cujas fêmeas serão inviáveis no ambiente (Thomas *et al* 2000).



**Figura 18 - Representação do sistema de expressão de um gene letal tetraciclina-repressível em *Drosophila melanogaster*.** Em (A) ligação tTa - tRe seguida da expressão do gene letal Ras64B. Em (B) a presença de tetraciclina reprime a ligação tTa- tRe, impedindo a expressão do gene letal. Fonte: Figura adaptada de Wilke *et al* (2009).

A técnica RIDL apresenta algumas vantagens em comparação a SIT, como facilidade para a manutenção da colônia, separação de machos e fêmeas, ser aplicável para insetos sensíveis à radiação, além de não comprometer a competitividade e longevidade dos machos na natureza (Alphey & Andreasen 2002).

No Brasil, essa técnica está em período de avaliação com o uso de *Ae. aegypti* transgênicos. Até o momento, os *Ae. aegypti* transgênicos (linhagem OX513A) foram liberados em duas cidades baianas, Juazeiro e Jacobina. Em ambos os locais, houve redução em média de 70% da população selvagem do mosquito. Entretanto, já foi observado que o efeito de supressão não é permanente e que tem duração média de 5 meses após a interrupção de

liberação da linhagem OX513A (Carvalho *et al* 2015; Garziera *et al* 2017). Além disso, porções do genoma da linhagem transgênica foram incorporadas pela população selvagem de mosquitos e ainda não se sabe quais implicações que essa introgressão poderiam ter na biologia do vetor (Evans *et al* 2019).

A uso da RIDL em *Cx. quinquefasciatus* ainda está em estágio inicial, devido à dificuldade de se estabelecer uma linhagem transgênica para a espécie. Até o momento o mosquito foi transformado em apenas três ocasiões (Allen *et al* 2001; Allen & Christensen 2004; Wilke 2013). O fato de a fêmea colocar os ovos em jangada é citado como uma dificuldade para a transformação de *Culex*, pois os ovos precisam ser individualizados e colocados em um ângulo de 90° para a realização das microinjeções. A manipulação desses ovos reduz significativamente a sua taxa de sobrevivência da espécie (Wilke 2008).

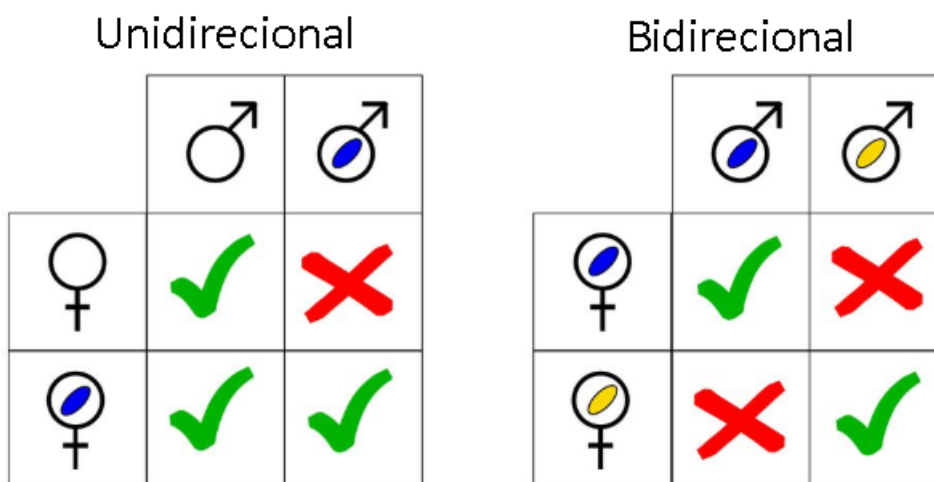
#### 1.6.3.3 *Wolbachia pipientis*

*Wolbachia pipientis* é uma  $\alpha$ -proteobactéria endossimbionte naturalmente encontrada em alta proporção em ácaros, isópodos, nematoides filariais e insetos (Stouthamer *et al* 1999). Foi descrita pela primeira vez em 1924 como uma Rickettsia presente nos ovários de *Culex pipiens* (Hertig & Wolbach 1924) e em 1936 foi formalmente nomeada por Hertig como *Wolbachia pipientis* em homenagem ao seu colaborador Wolbach (Hertig 1936). Essa bactéria é capaz de alterar a biologia do seu hospedeiro, provocando fenômenos reprodutivos como partenogênese (Huigens & Stouthamer 2003), feminização (Rousset *et al* 1992), mortalidade de machos (Hurst *et al* 1999) e também incompatibilidade citoplasmática – IC (Figura 19), que por sua vez, é um dos fenômenos mais comuns encontrados em hospedeiros de *Wolbachia*, incluindo o mosquito *Cx. quinquefasciatus* (Irving-Bell 1983).

Apesar de ainda não possuir um mecanismo de ação totalmente compreendido (Beckmann *et al* 2019), a IC é definida como uma incompatibilidade gerada durante a fertilização entre um espermatozoide produzido por um macho infectado com *Wolbachia* e o óvulo de uma fêmea não infectada (IC unidirecional), ou que possuam cepas de *Wolbachia* diferentes e incompatíveis (IC bidirecional), resultando na morte do embrião na maioria dos casos (Jost 1970; Lassy & Karr 1996) ou ainda no desenvolvimento de machos

haploides em espécies haplodiplobiontes (Reed & Werren 1995). A incompatibilidade nos diferentes cruzamentos ocorre por uma falha de sincronia na primeira divisão mitótica do embrião causado por um atraso na quebra do envelope nuclear e na condensação das cromátides do pró-núcleo do macho (Tram *et al* 2006).

### Incompatibilidade Citoplasmática



**Figura 19 - Representação de incompatibilidade citoplasmática uni e bidirecional em *Culex quinquefasciatus*.** Símbolos sem preenchimento representam ausência de *Wolbachia*. As diferentes cores (azul e amarelo) representam diferentes cepas de *Wolbachia*. Fonte: Figura adaptada de Mateos *et al* (2019).

O fenômeno de IC foi primeiramente reportado por Laven (1951) e Ghelelovitch (1952) depois de observarem cruzamentos incompatíveis em *Culex*, onde nenhuma ou pouca prole nascia. Laven acreditava que esse fenômeno era resultante de herança citoplasmática e acabou o nomeando como IC. Porém, a IC só foi associada à presença de *Wolbachia* em 1971, quando Yen e Barr (1971) observaram que se tratassem os mosquitos com antibiótico para eliminar a bactéria, o fenômeno não ocorria.

Antes mesmo de conhecer o agente causador, Laven já pensou em usar a IC como um método de controle vetorial de *Cx. quinquefasciatus*. Em 1967 usou a IC para tentar erradicar o mosquito em um campo de arroz em Burma - atual Myanmar (Laven 1967). Atualmente, o uso da IC para o controle de vetores recebeu o nome de Técnica do Inseto Incompatível – TII ou IIT - *Incompatible Insect Technique*, em inglês, e além do *Cx. quinquefasciatus*, vem sendo empregada no controle de outros vetores, como por exemplo: *Aedes albopictus*



(Skuse, 1894) (Dimopoulos 2019), *Ae. aegypti* (Mains *et al* 2019) e *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Nikolouli *et al* 2017).

*Wolbachia* também pode ser utilizada no controle de transmissão de doenças e neste caso sua aplicação visa realizar a substituição da população atual do vetor por outra com *Wolbachia*. A presença da bactéria pode estimular o sistema imune dos mosquitos, protegendo-os de outras infecções e impedindo a transmissão de patógenos. Moreira *et al* (2009) observaram que *Ae. aegypti* transinfectados com *Wolbachia* eram incapazes de transmitir os vírus da dengue, chikungunya e também o protozoário *Plasmodium*. Mais recentemente, outros estudos vêm demonstrando que *Wolbachia* é capaz de bloquear a transmissão do Zika vírus em *Ae. aegypti*, incluindo os isolados do vírus que circularam pelo Brasil (Dutra *et al* 2016; Chouin-Carneiro *et al* 2019). Em *Culex*, *Wolbachia* foi capaz de aumentar a resistência à infecção pelo Vírus do Nilo Ocidental em *Cx. quinquefasciatus* (Glaser & Meola 2010) e *Culex tarsalis* Coquillett, 1896 (Dodson *et al* 2014).

#### **1.6.4 Resistência a inseticidas**

A Organização Mundial da Saúde definia a resistência a inseticidas como “O desenvolvimento de uma habilidade de uma linhagem de insetos de tolerar doses de substâncias tóxicas que seriam letais para a maioria dos indivíduos em uma população normal da mesma espécie” (WHO 1957). Essa definição reconhece a resistência como um fenômeno de base populacional, porém não evidencia a sua base genética como resposta à exposição e seleção causadas pela aplicação de inseticidas (Guedes 2016). O claro reconhecimento das bases genéticas da resistência a inseticidas só foi postulado por Crow (1960) e posteriormente aprimorado por Sawicki (1987), definindo o fenômeno como um processo microevolutivo e ecológico resultante do uso excessivo de inseticidas.

A seleção de insetos naturalmente resistentes reduz a eficácia dos inseticidas e as opções disponíveis para o controle vetorial. Além disso, em alguns casos a seleção de insetos resistentes não só torna o produto ineficaz, mas também pode conferir resistência cruzada a outros compostos que possuem mecanismos de ação similares e que nem chegaram a ser utilizados nas ações de controle (Brongdon & McAllister 1998). Essas características tornam a

resistência a inseticidas um problema em saúde pública e no controle de vetores (Rivero *et al* 2010).

O fenômeno de resistência se baseia em quatro possíveis mecanismos: metabólico ou de detoxificação enzimática, alteração de sítio-alvo, alteração comportamental e redução da penetração cuticular, sendo que os dois primeiros mecanismos são os mais comuns e bem estudados em insetos (Hemingway & Ranson 2000).

Uma revisão sobre o histórico de resistência a inseticidas em *Cx. quinquefasciatus* do Brasil está disponível no Anexo I.

#### **1.6.4.1 Alteração comportamental**

A resistência comportamental é definida como o desenvolvimento de comportamentos que evitam a exposição do inseto a compostos tóxicos ou permitem que ele sobreviva em um ambiente que é nocivo e/ou fatal para a maioria dos indivíduos da mesma espécie (Sparks *et al* 1989). Esse mecanismo pode ser dividido em estímulo-dependente ou estímulo-independente. No primeiro caso, a alteração comportamental envolve a irritabilidade, que é quando o inseto entra em contato com a superfície tratada com o inseticida e é estimulado a sair de imediato do ambiente tóxico, e a repelência, que também estimula o inseto a deixar o ambiente tóxico de imediato, porém antes mesmo de entrar em contato com a superfície tratada com o inseticida. No mecanismo estímulo-independente, o inseto altera o seu período de atividade ou habitat evitando o contato com resíduos do inseticida (Georghiou 1972).

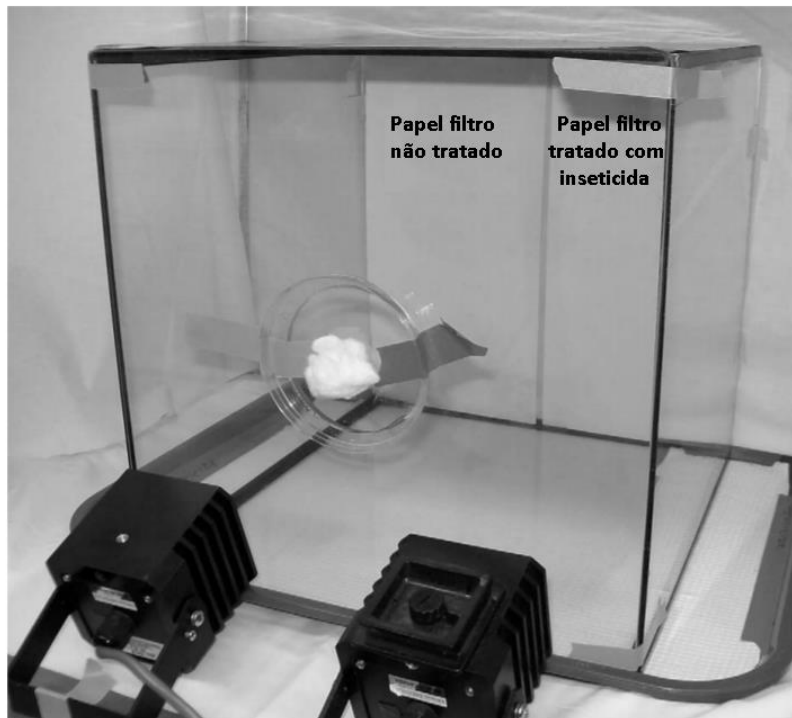
As alterações comportamentais descritas para mosquito incluem: redução do número de mosquitos que entram nas residências, antecipação do horário de saída das casas e mudanças no tempo de picada (Liu *et al* 2006). Um estudo realizado no Quênia, avaliou o comportamento de *Anopheles* em casas com mosquiteiros impregnados e casas sem o mosquiteiro (Mathenge *et al* 2001). Foi observada uma redução significativa no número *Anopheles funestus* Giles 1900 encontrados nas casas com mosquiteiros. Além disso, *Anopheles gambiae* Giles 1902 e *Anopheles funestus* foram menos propensos a realizar alimentação

sanguínea e significativamente mais propensos a abandonar as casas com mosquiteiros.

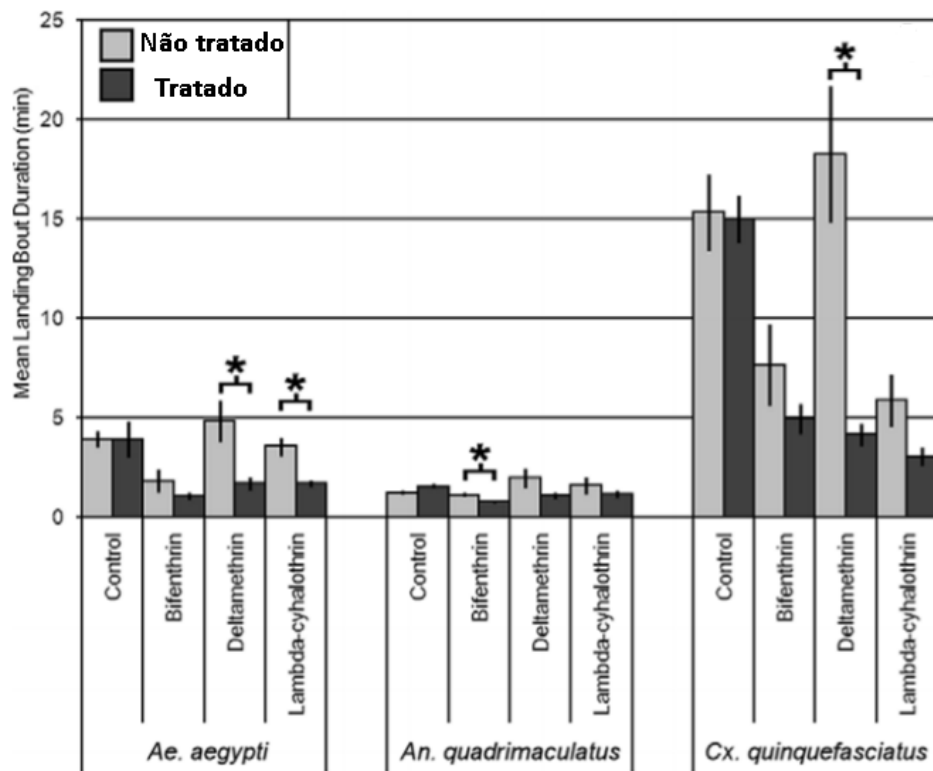
Um outro estudo realizado em laboratório (Figura 20), avaliou o efeito de diferentes piretroides no comportamento de repouso de fêmeas de *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* e *Anopheles quadrimaculatus* Say 1824 (Cooperband & Allan 2009). As fêmeas de *Cx. quinquefasciatus* foram as que mais evitaram o contato com os inseticidas testados durante todo o experimento, permanecendo em repouso na área não tratada por um longo período (Figura 21).

Sathantriphop *et al* (2006) avaliaram a resposta comportamental de *Cx. quinquefasciatus* de campo a três classes de inseticidas: piretroide deltametrina, organofosforado fenitrothion e o carbamato propoxur. A resposta dos mosquitos foi classificada em dois diferentes efeitos (repelente ou irritante) propostos por Roberts *et al* 1997. Efeito irritante sendo aquele provocado pelo contato com o inseticida e efeito repelente quando não há contato com o composto. Como resultado, observaram que deltametrina apresentou o maior efeito irritante e o fenitrothion, maior efeito repelente. Mais recentemente, Boonyuan *et al* (2016) avaliaram o comportamento de *Cx. quinquefasciatus* suscetíveis e resistentes ao piretroide permetrina em um teste de repelência por excitação, utilizando duas concentrações do inseticida. Todas as populações testadas, independente do status de suscetibilidade, escaparam rapidamente das câmaras tratadas com permetrina, demonstrando que irritação foi a resposta predominante no estudo.

Os exemplos citados acima e outros estudos (Miller & Gibson 1994; Liu *et al* 2013; Boonyuan *et al* 2017) com *Cx. quinquefasciatus* evidenciam a influência do comportamento da espécie na resposta aos inseticidas e a importância da implementação desse tipo de avaliação nos programas de controle.



**Figura 20 - Câmara utilizada na avaliação de comportamento.** Ao fundo, papéis (tratado e não tratado com inseticida) dispostos lado a lado. Fonte: Figura adaptada de Cooperband & Allan (2009).



**Figura 21 - Duração média de repouso em minutos para as três espécies de mosquitos avaliadas.** Área não tratada em cinza claro e área tratada com inseticida em cinza escuro. Fonte: Figura adaptada de Cooperband & Allan (2009).

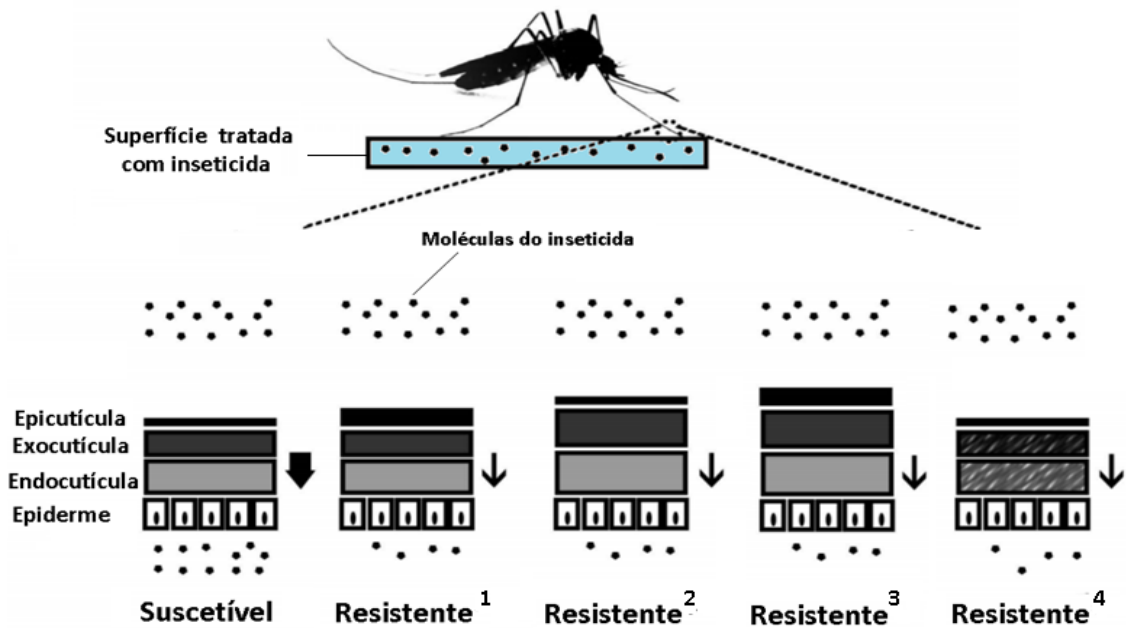
#### **1.6.4.2 Redução da penetração cuticular**

A cutícula ou exoesqueleto é a parte mais externa do corpo do inseto. A sua estrutura é constituída por diferentes camadas e geralmente é bem conservada entre as espécies de insetos (Wigglesworth 1948). A camada mais externa é chamada de epicutícula, constituída principalmente de hidrocarbonetos, proteínas e lipídios, que em sua maioria são ácidos graxos livres e ésteres de cera. Abaixo da epicutícula está a procutícula, responsável por grande parte da massa cuticular, sendo formada principalmente por fibras de quitina e proteínas, sendo subdividida em exocutícula (parte superior e mais rígida) e endocutícula (parte inferior e mais macia). Por último está uma única camada de células epidérmicas que ficam na base da cutícula e secretam a maioria dos componentes cuticulares (Filshie & Waterhouse 1969; Filshie 1982).

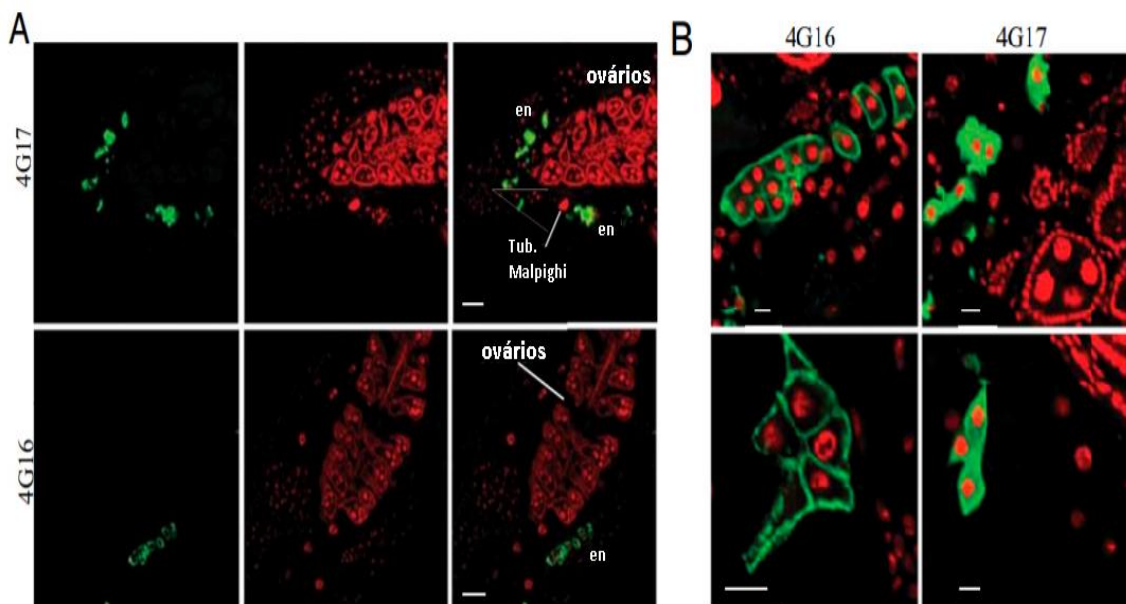
A cutícula desempenha uma variedade de funções, como proteção do inseto contra dessecação, suporte mecânico para a locomoção, auxílio na percepção sensorial do ambiente, além de funcionar como a primeira e principal barreira contra a penetração de compostos externos, incluindo os inseticidas (Gilby 1984). A redução da penetração cuticular ocorre por modificações na cutícula que reduzem ou desaceleram a entrada das moléculas do inseticida no corpo do inseto (Perry & Agosin 1974). Até o momento, foram descritos dois mecanismos de resistência por redução de penetração cuticular (Figura 22): espessamento e alteração de composição da cutícula (Balabanidou *et al* 2018).

#### **Espessamento da cutícula**

Por meio de microscopia eletrônica, já foi observado que mosquitos *An. gambiae* resistentes a inseticidas apresentam cutícula notavelmente mais grossa devido a uma deposição extra de hidrocarbonetos na sua epicutícula (Balabanidou *et al* 2016). Os hidrocarbonetos de insetos são elementos muito variáveis e são produzidos por células específicas conhecidas como enócitos (Blomquist & Bagnères 2010). A biossíntese dos hidrocarbonetos nos enócitos é regulada principalmente por duas enzimas P450 (CYP4G16 e CYP4G17), que estavam superexpressas pelos enócitos abdominais de *An. gambiae* resistentes (Figura 23).

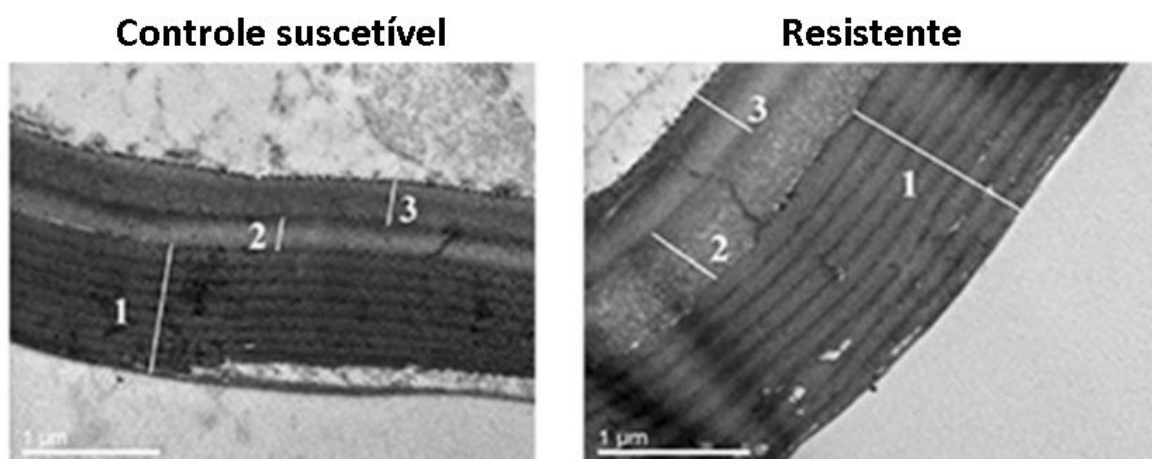


**Figura 22 – Mecanismos de resistência por redução de penetração cuticular.** Todas as modificações cuticulares propostas para sustentar a captação reduzida de inseticida são descritas. A espessura das setas representa a permeabilidade da cutícula. (1) Resistência por espessamento da epicutícula. (2) Resistência por espessamento da procutícula. (3) Resistência por espessamento da epi e procutícula. (4) Resistência por alteração da composição da cutícula. Fonte: Figura adaptada de Balabanidou *et al* (2018).



**Figura 23 – Localização imunohistoquímica das P450s CYP4G16 e CYP4G17 de *An. gambiae* resistentes a inseticidas.** Em (A, coluna à esquerda) Corte longitudinal de mosquitos imunocorados com os anticorpos  $\alpha$ -CYP4G17– e  $\alpha$ -CYP4G16– (em verde). Núcleos das células são corados em vermelho com TOPRO (coluna central). Imagens mescladas das P450s e os núcleos corados (coluna à direita). Escala, 50  $\mu$ m. Túbulos de Malpighi; (en) enócitos. Em B imagem ampliada focando nos enócitos, mostrando a sublocalização da CYP4G16 (associada à membrana citoplasmática) e CYP4G17 (associada ao retículo endoplasmático). Escala, 10  $\mu$ m. Fonte: Figura adaptada de Balabanidou *et al* (2016).

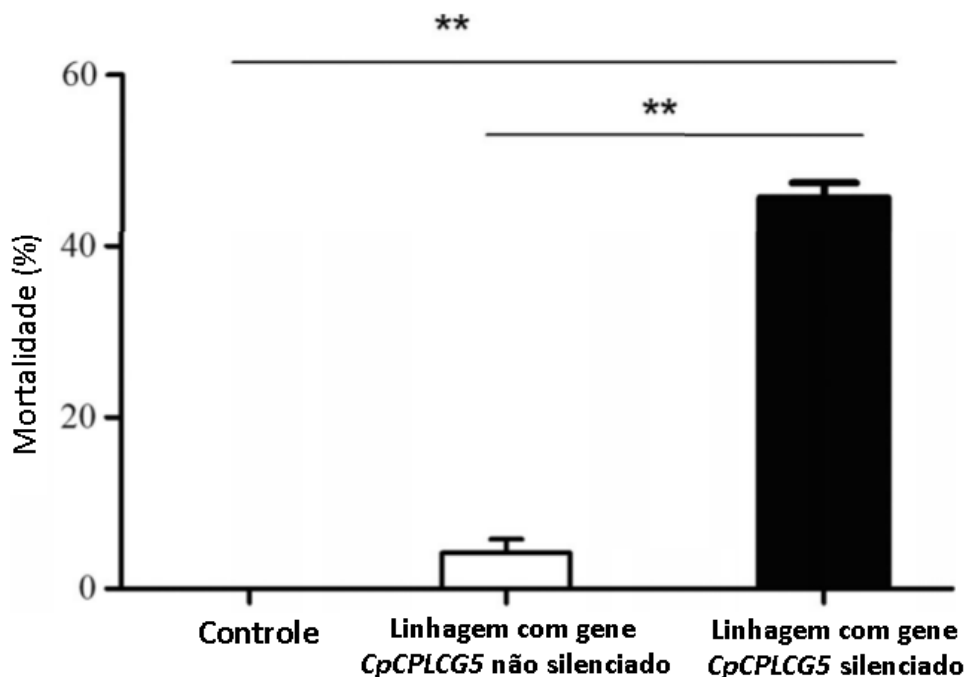
Uma forma alternativa de espessamento é a super expressão de proteínas cuticulares (CPs - *Cuticular Proteins*, em inglês). Uma linhagem africana de *An. gambiae* resistente a piretroides e DDT apresentou espessamento de todas as camadas da cutícula (Figura 24). Esses mosquitos, além de super expressarem enzimas de detoxificação (P450 e GST), também apresentaram uma alta expressão de um conjunto de proteínas CP (*CPLCG3*, *CPR124*, *CPR127*, *CPR129*) ligantes de quitina (Yahouédo *et al* 2017). As proteínas (*CPLCG3*, *CPLCG4* e *CPLCG5*) também foram encontradas em super expressão em outras linhagens de *Anopheles* resistentes a inseticidas (Vontas *et al* 2007; Awolola *et al* 2009; Nkya *et al* 2014). Essas proteínas são encontradas principalmente na endocutícula dos membros dos mosquitos e sua elevada expressão consiste em um mecanismo de resistência por espessamento da cutícula (Vannini *et al* 2014).



**Figura 24 - Imagem de microscopia eletrônica em escala de 1µm da ultraestrutura da cutícula das linhagens controle (à esquerda) e resistente (à direita) de *An. gambiae*. (1) Epicutícula, (2) Exocutícula e (3) Endocutícula. Fonte: Figura adaptada de Yahouédo *et al* (2017)**

Em *Culex*, as CPs foram relacionadas com resistência a deltametrina. Uma linhagem de *Cx. pallens* resistente ao piretroide apresentou super expressão de 14 CPs, mas o silenciamento de um único gene (*CpCPLCG5*) foi capaz de aumentar a suscetibilidade a deltametrina dessa linhagem, aumentando a mortalidade dos mosquitos em 40% (Figura 25). A análise do alinhamento da sequência de aminoácidos do gene silenciado evidenciou grande

similaridade com o *CpCPLCG5* ortólogo de *Cx quinquefasciatus* (Fang *et al* 2015).



**Figura 25 - Mortalidade dos mosquitos em bioensaio tipo OMS após silenciamento por RNAi do gene *CpCPLCG5*.** Três dias após a injeção com siRNA as fêmeas foram expostas a deltametrina 0,05% por 15 minutos. Mortalidade foi registrada 24 horas após a exposição. Os dados de 3 experimentos independentes foram analisados. Os resultados são mostrados como médias de mortalidade. \*\* diferença significativa. Fonte: Adaptada de Fang *et al* (2015)

### **Alteração da composição da cutícula**

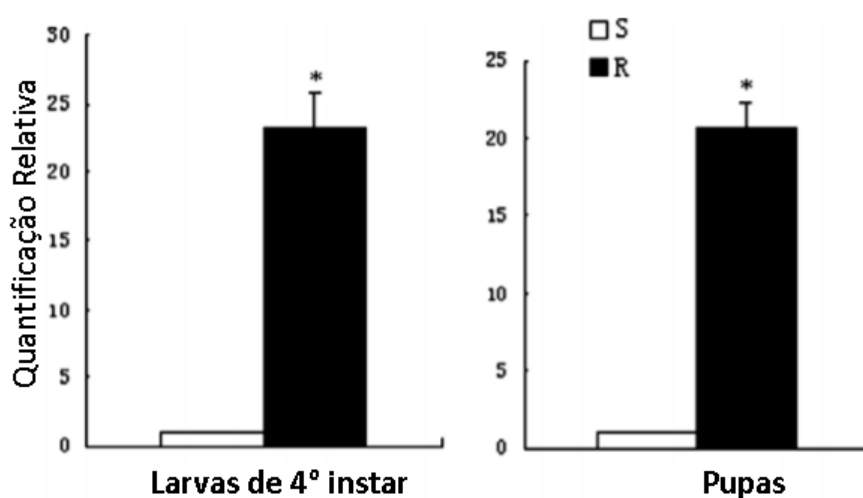
Mudanças na composição das diferentes camadas da cutícula podem reduzir a capacidade de penetração dos inseticidas. Essas alterações podem ser mediadas por dois tipos de processos:

#### **I – Super expressão de *Lacase 2***

*Lacase 2* (*Lac2*) é uma enzima envolvida no processo de pigmentação e endurecimento da cutícula, catalisando as reações de oxidação de dopamina, formando quinonas que serão utilizadas para a síntese de melanina (Arakane *et al* 2005). Quando a expressão dessa enzima é silenciada em besouros *Monochamus alternatus* Hope 1842, o inseto apresenta um desenvolvimento anormal da cutícula, tornando-se mole, mais larga e com a procutícula muito mais fina quando comparado com os insetos controle (Niu *et al* 2008).



Em *Culex*, a *Lac2* é produzida pela expressão do gene *CpLac2* e essa expressão é abundante em ovos, no 4º estágio larval e nas pupas, o que reforça hipótese de sua participação no endurecimento do córion dos ovos e na esclerotização da cutícula. Além disso, foi observada em larvas de 4º instar e pupas de *Culex pallens* resistentes a piretroide, a superexpressão do *CpLac2* em comparação a larvas e pupas suscetíveis ao inseticida (Figura 26). Esses resultados indicam que a resistência ao piretroide nessas linhagens pode ser derivada de um reforço da cutícula, o que reduz a penetração do inseticida (Pan *et al* 2009).



**Figura 26 – Níveis de expressão de *CpLac2* em larvas de 4º estágio e pupas de *Culex pallens* suscetíveis e resistentes ao piretroide fenvalerato.** A expressão foi mensurada por qPCR. Os níveis de expressão de *CpLac2* na linhagem suscetível foi considerada como basal (ou 1). O gene  $\beta$ -actin foi utilizado para normalizar o nível de expressão. Os dados são médias de três experimentos independentes. \* diferença significativa ( $p < 0.05$ ). Fonte: Figura adaptado de Pan *et al* (2009).

## II – Super expressão de transportadores ABC e translocações cuticulares

Transportadores ABC, “*ATP-binding cassette*” em inglês, atuam como bomba de efluxo em células eucariotas e sua expressão na epiderme facilita a exportação de componentes como lipídios e hidrocarbonos cuticulares em direção à cutícula (McFarlane *et al* 2010). A expressão aumentada de transportadores ABC da subfamília G nas patas de *An. gambiae* resistentes tem sido relacionada com a elevada deposição de hidrocarbonos cuticulares e consequente redução da penetração cuticular nessas regiões (Pignatelli *et al* 2017).

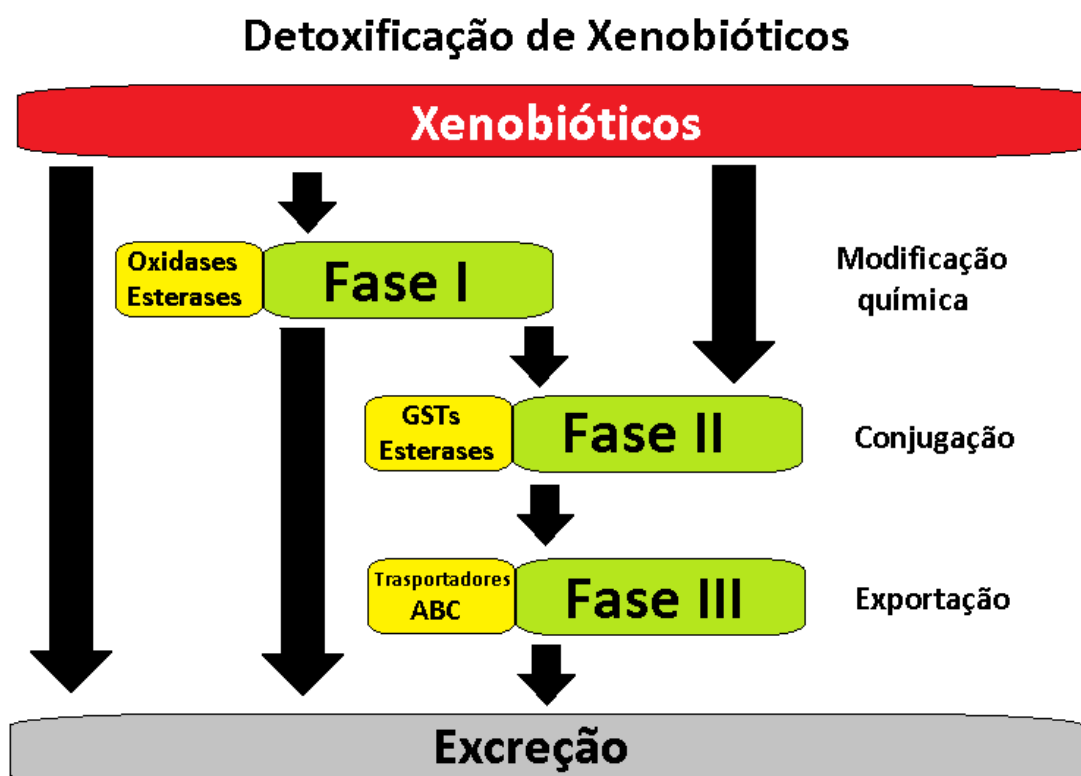
Além da super expressão de transportadores ABC, aparentemente o aumento de translocações cuticulares também pode afetar não só a composição da cutícula, mas também aumentar sua rigidez. A super regulação de uma glicoproteína-p (gp-P), localizada principalmente na cutícula e no corpo gorduroso de lagartas do tabaco, *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) resistentes a pesticidas piretroides e carbamatos foi relacionada com a redução da penetração cuticular dos compostos. Apesar de não observarem a correlação entre a expressão da glicoproteína-p e a resistência, a expressão de gp-P em larvas com resistência a pesticidas variando de moderada a alta foi de 5 a 6 vezes maior em comparação a larvas suscetíveis (Lanning *et al* 1996).

Em mamíferos, gp-P atua como uma bomba de efluxo ATP-dependente que transporta drogas e xenobióticos para fora da célula. Sua elevada expressão é relacionada com ação protetora contra xenobióticos (Azevedo *et al* 2009). A denominação P dessa glicoproteína foi atribuída ao seu potencial de modulação de permeabilidade da membrana (Juliano & Ling 1976) e sua homologia com a gp-P de insetos ainda é desconhecida. Entretanto, Rao *et al* (1994) avaliaram a atividade da gp-P humana quando expressa em células de insetos e observaram que ela desempenha função análoga quando expressa em mamíferos, reduzindo o acúmulo de xenobióticos na célula. Portanto, além de reduzir a permeabilidade da cutícula das larvas, a gp-P também parece atuar no bombeamento ativo dos inseticidas para fora da célula, implicando em alterações fisiológicas e possível propagação da resistência (Lanning *et al* 1996).

### **1.6.4.3 Detoxificação metabólica**

Insetos possuem naturalmente enzimas que os protegem da ação de xenobióticos. Essas enzimas detoxificantes compõem um eficiente mecanismo que provavelmente foi desenvolvido em co-evolução com a extensa variedade de compostos tóxicos produzidos pelas plantas (Rosenthal & Berenbaum 1992). Portanto, não é de se surpreender que a detoxificação metabólica seja um dos mecanismos de resistência a inseticidas mais comuns (Scott 1991). A detoxificação de xenobióticos em insetos pode ser feita em até três fases e é realizada por três principais grupos de enzimas (esterases, oxidades e glutathione S-transferases - GSTs) (Figura 27). Na primeira fase, os xenobióticos passam

por uma série de modificações químicas (oxidação, redução e hidrólise) realizadas pelas oxidases de função mista (MFO ou P450). Na segunda fase os substratos da reação anterior são conjugados (adição de -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, ou -COOH) pelas GSTs, tornando-os mais hidrossolúveis. Finalmente, na terceira fase os metabólicos gerados nas fases anteriores são excretados da célula de forma ativa via transportadores ABC. As esterases podem participar das duas primeiras fases de detoxificação de xenobióticos, sendo responsáveis pela hidrólise de grupamentos éster (Xu *et al* 2005; Dermauw & Van Leeuwen 2014).



**Figura 27 - Mecanismo de detoxificação de xenobióticos em insetos.** Em amarelo estão representadas as principais famílias gênicas envolvidas no processo de detoxificação. Na fase I ou fase de modificação química há maior participação de oxidases (MFO – P50), na fase II ou fase de conjugação há maior atividade das Glutathione S-Transferases (GSTs) e na fase III ou fase de exportação, os metabólicos resultantes das fases anteriores são excretados via transportadores ABC. Note que as esterases podem participar das duas primeiras fases do processo e que nem todos os xenobióticos precisam passar por todas as fases para serem excretados. Fonte: Figura adaptada de Torres (2013).

### Esterases

Provavelmente, o mecanismo de detoxificação mais comum em insetos seja a modificação da quantidade ou da atividade de enzimas esterases que são capazes de hidrolisar diferentes tipos de inseticidas (Cygler *et al* 1993). Em

mosquitos, o mecanismo de resistência relacionados com esterase tem sido mais estudado a nível bioquímico e molecular em *Culex*, onde o espectro de resistência a organofosforado é resultado de alta atividade dessa família de enzimas. Em *Cx. quinquefasciatus*, *aest* e *best* são os *loci* mais comumente relacionados com esse tipo de resistência (Vaughan 1997). Essas enzimas atuam catalisando reações de hidrólise de grupamento éster, componente da estrutura química de inseticidas como organofosforados, carbamatos e piretroides (Hemingway *et al* 2004).

Vários estudos têm associado a resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos em *Cx. quinquefasciatus* com a detoxificação mediada por esterases (Georghiou *et al* 1980; Bisset *et al* 1990, 1991; Peiris & Hemingway 1990; Wirth *et al* 1990; Norris & Norris 2011; Gordon & Ottea 2012; Viswan *et al* 2019). O mecanismo de resistência a inseticidas mediado por esterases pode ser dividido em dois grupos: baseados em esterases elevadas e não elevadas. No primeiro grupo, há superprodução de esterases geradas por amplificação gênica, já no segundo grupo a resistência é mediada por regulação gênica e não por amplificação (Reymond *et al* 1998).

### **Oxidases de Função Mista - MFO (ou citocromos P450 monooxigenases)**

São uma complexa família de enzimas encontrada na maioria dos organismos, incluindo insetos. Essas enzimas estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos e também no metabolismo endógeno (Hemingway & Ranson 2000). As citocromo P450 monooxigenases de insetos são importantes para a detoxificação de inseticidas e fitotoxinas (Scott *et al* 1998). Estão envolvidas no metabolismo de praticamente todos os inseticidas, levando à ativação de moléculas, no caso de inseticidas organofosforados ou mais geralmente na detoxificação desses compostos. A detoxificação por P450 é importante não só pelos altos níveis de resistência que elas conferem, mas também porque podem fornecer resistência cruzada a compostos não relacionados devido à variedade de substratos que essas enzimas são capazes de metabolizar (Bergé *et al* 1998; Yang *et al* 2004). A resistência a inseticidas pode resultar de alterações na atividade catalisadora da P450 envolvida e/ou nos níveis de expressão gênica (Oppenoorth 1984).

Em *Cx. quinquefasciatus* a detoxificação por P450 é relacionada com resistência a inseticidas organofosforados (Hemingway *et al* 1990) e piretroides (Hemingway *et al* 1990; Kasai *et al* 1998; Yanola *et al* 2015). Em larvas de linhagens resistentes ao piretroide permetrina, pelo menos treze P450 são mais expressas: *CYP9M10*, *CYP4H34*, *CYP6AA7*, *CYP6Z12*, *CYP9J33*, *CYP9J34*, *CYP9J40*, *CYP9J43*, *CYP9J45*, *CYP306A1*, *CYP6PF1*, *CYPPAL1* e *CYP4C52v1* (Kasai *et al* 2000; Komagata *et al* 2010; Liu *et al* 2011; Gong *et al* 2013, 2017) enquanto que apenas a *CYP6AA7* foi superexpressa em adultos (Liu *et al* 2011).

### **Glutathione S-Transferases – GSTs**

GSTs formam uma classe de enzimas com amplo repertório de substratos específicos, que lhes confere uma notável importância na detoxificação de xenobióticos, incluindo inseticidas (Salinas & Wong 1999). As GSTs normalmente estão envolvidas na conjugação de xenobióticos com substratos endógenos, como a glutathione (Atkins *et al* 1993). Níveis de atividade elevada dessas enzimas estão associados com resistência em praticamente todas as classes de inseticidas. A detoxificação dos organoclorados DDT e lindano são catalisadas pelas GSTs (Clark & Shamaan 1984; Enayati *et al* 2005). A conjugação das GSTs com inseticidas organofosforados também resulta em detoxificação desses compostos (Oppenoorth *et al* 1979; Chiang & Sun 1993). Essas enzimas estão envolvidas em muitos casos de resistência a organofosforados (Hayes & Wolf 1988) e há evidências da sua participação também no metabolismo de piretroides (Kostaropoulos *et al* 2001; Vontas *et al* 2001).

Em insetos, pelo menos seis classes de GSTs são encontradas (Enayati *et al* 2005), e três dessas classes (delta, epsilon e theta) foram identificadas em *Cx. quinquefasciatus* através da análise do genoma da espécie (Niranjan Reddy *et al* 2011). Em *Cx. quinquefasciatus*, a detoxificação por GSTs foi relacionada com resistência aos inseticidas piretroides (Norris & Norris 2011; Low *et al* 2013; Muthusamy *et al* 2015), organofosforados (Liu *et al* 2005; Low *et al* 2013; Muthusamy *et al* 2015; Viswan 2016, 2019), carbamatos (Low *et al* 2013, Viswan *et al* 2016, 2019) e o organoclorado DDT (Kasai *et al* 2009; Norris & Norris 2011, Low *et al* 2013).

#### 1.6.4.4 Alteração de sítio-alvo

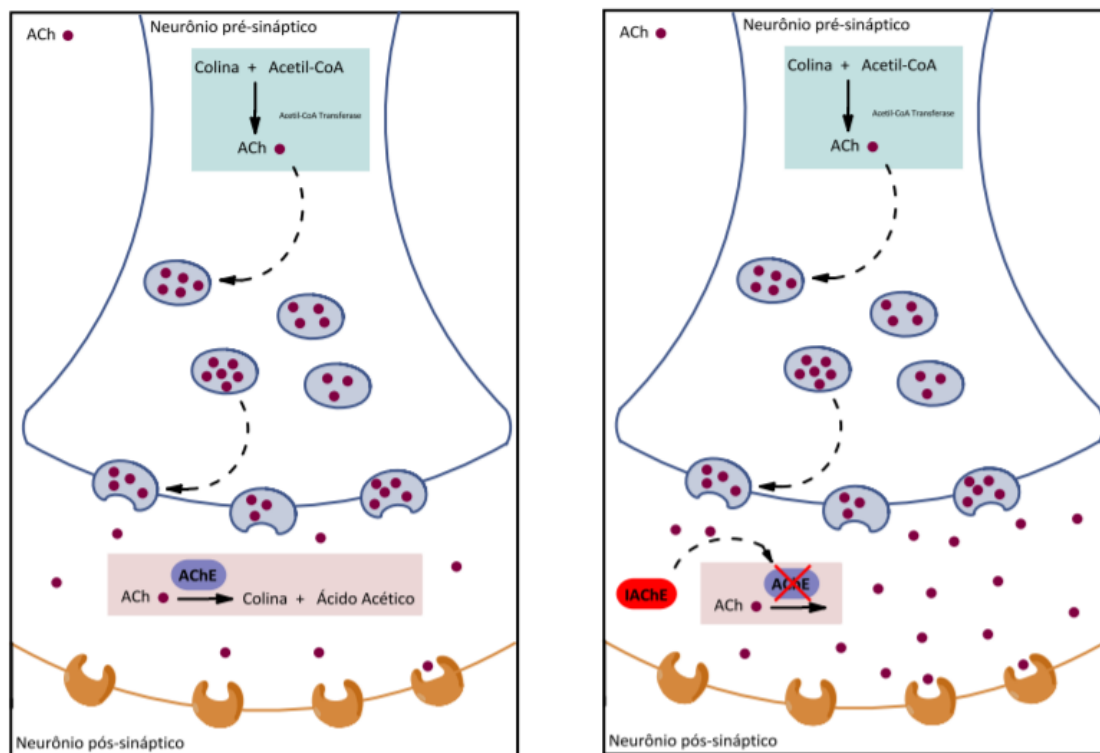
Mesmo com o surgimento de novas classes de inseticidas, os carbamatos, organoclorados, piretroides e organofosforados ainda são muito utilizados em saúde pública e todos eles afetam o sistema nervoso dos insetos (Ndiath 2019). Deleção, substituição ou adição de nucleotídeos no DNA podem alterar a sequência de aminoácidos das proteínas-alvo desses compostos. Quando isso ocorre, a interação entre o composto selecionado e o seu sítio-alvo é comprometida, reduzindo ou até mesmo anulando seu efeito inseticida (Feyereisen 1995).

#### Acetilcolinesterase (AChE)

A AChE é o alvo dos inseticidas organofosforados e carbamatos. Em situações normais, o neurotransmissor excitatório acetilcolina (ACh) se liga aos receptores pós-sinápticos para que ocorra a transmissão do impulso nervoso e sem seguida se desconecta desses receptores, voltando para a fenda sináptica, onde é hidrolisada pela AChE (Rosenberry 1975). Na presença de organoclorados e/ou carbamatos, a AChE é inibida de forma reversível (carbamatos) ou irreversível (organofosforados), gerando o acúmulo de acetilcolina (Figura 28) e provocando a estimulação descontrolada do sistema nervoso, resultando na morte do inseto (Ayad & Georghiou 1975).

Em *Culex*, as AChEs são codificadas por dois genes, *ace-1* e *ace-2* (Bourguet *et al* 1996a). Entretanto, aparentemente só as enzimas codificadas pelo gene *ace-1* estão relacionadas com resistência a inseticidas (Malcom *et al* 1998). Três substituições de aminoácidos na AChE1 (G119S, F290V e F331W) são relacionadas com resistência aos inseticidas organofosforados e carbamatos em *Culex*. A mutação G119S é reconhecida como “clássica” por ser a mais frequente em mosquitos resistentes a organofosforados e carbamatos. Essa mutação de caráter recessivo ocorre pela substituição do aminoácido glicina (GGC) por serina (AGC) no sítio 119 do gene *ace-1* (Weill *et al* 2003). A mutação F290V só foi identificada em *Cx. pipens* e ocorre pela substituição de fenilalanina (TTT) por valina (GTT) no sítio 290 do mesmo gene (Alout *et al* 2009). Já a mutação F331W só foi encontrada até o momento em *Culex tritaeniorhynchus* Giles, 1901 da Ásia e ocorre pela substituição de fenilalanina

(UUC) por triptofano (UGG) no sítio 331 (Nabeshima *et al* 2004; Alout *et al* 2007). Em *Cx. quinquefasciatus*, apenas a mutação G119S foi identificada até o momento (Corbel *et al* 2007; Tantely *et al* 2015; Yadouléton *et al* 2015; Delannay *et al* 2018; Silva Martins *et al* 2017, 2019).



**Figura 28 - Sinapse colinérgica na ausência e na presença de inibidores de AChE.** Fonte: Araújo *et al* (2016)

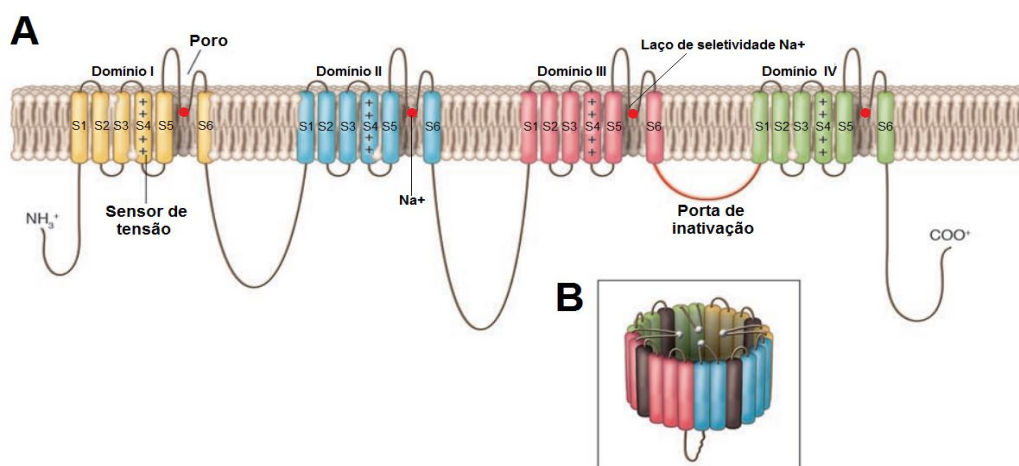
A presença da mutação G119S está relacionada com um alto custo no *fitness* do inseto (Bourguet *et al* 1996b), que pode ser definido como um gasto energético ou desvantagem significativa na aptidão do inseto resistente em comparação aos indivíduos susceptíveis da mesma população (Kliot & Ghanim 2012), como por exemplo alta mortalidade no estágio pupal (Djogbénu *et al* 2010). A enzima mutante, apesar de conferir resistência aos inseticidas, apresenta uma atividade 60% menor em relação à enzima sem mutação (Berticat *et al* 2004). No entanto, foi identificada uma duplicação do gene *ace-1*, onde os indivíduos apresentavam ambos os alelos, mutante (*ace-1<sup>R</sup>*) e selvagem (*ace-1<sup>S</sup>*). A presença de duplicação gênica garantiu os efeitos de resistência aos organofosforados e carbamatos e também diminuiu os efeitos deletérios

resultantes da mutação (Labbé *et al* 2007). Efeitos no *fitness* das mutações F290V e F311W ainda são desconhecidos (Alout *et al* 2009).

### Canal de sódio regulado por voltagem (Nav)

Os neurônios possuem canais dependentes de voltagem que regulam a condução elétrica através de processos de entrada e saída de íons. O Nav regula a permeabilidade ao sódio durante o início do potencial de ação, permitindo a transmissão do impulso nervoso ao longo da célula (Hille 1978). Quando estimulado, o Nav sai de seu estado de repouso, mudando sua conformação e permitindo o influxo de sódio. O canal permanece aberto por milissegundos e depois volta a se fechar enquanto os canais de potássio se abrem. Esse processo permite a transmissão do impulso nervoso e a repolarização da membrana, reestabelecendo o seu potencial de repouso (Hodgkin & Huxley 1952).

O canal de sódio é formado por uma proteína transmembranar onde a subunidade  $\alpha$  é funcional e forma o núcleo do canal. A subunidade  $\alpha$  pode ser dividida em 4 domínios homólogos (I, II, III e IV) dispostos de forma circular, formando um poro. Essa disposição aproxima os domínios I e IV. Cada domínio é formado por seis segmentos (S1-S6) helicoidais e transmembranares (Figura 29), sendo o S4 o segmento mais conservado e responsável pela abertura do canal (Catterall 1992).



**Figura 29 - Representação do canal de sódio regulado por voltagem.** Em (A), os quatro domínios homólogos da subunidade  $\alpha$  são representados por diferentes cores. Cada domínio é constituído de seis segmentos transmembranares que formam o poro revestido pelo laço de seletividade para  $\text{Na}^+$ . Em (B), disposição dos domínios da subunidade  $\alpha$ . Fonte: Figura adaptada de Meisler & Kearney (2005)

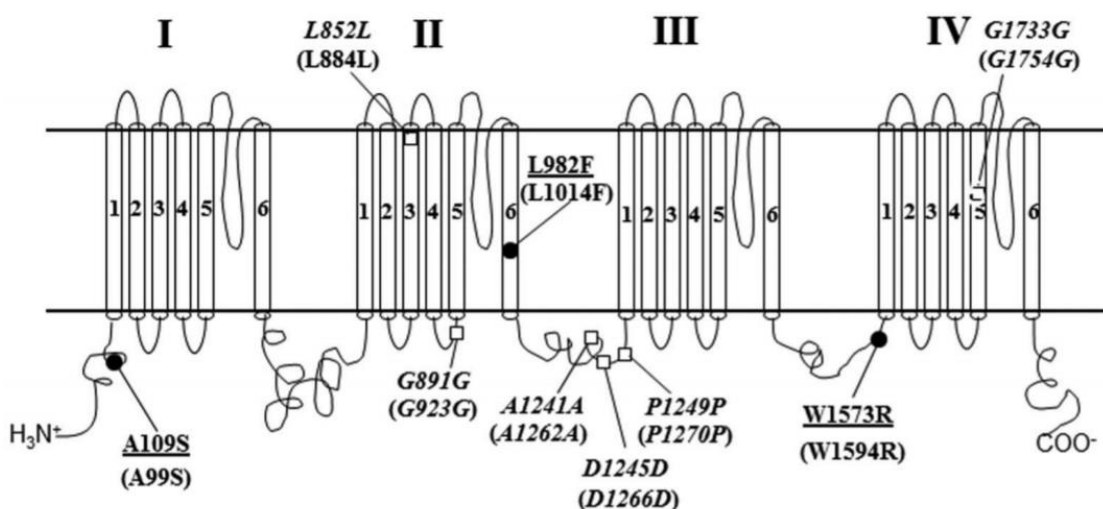


Os inseticidas piretroides e o DDT se ligam aos segmentos S5 e S6 da subunidade  $\alpha$  fazendo com que o canal de sódio permaneça aberto, impedindo a regulação entre os íons sódio e potássio, resultando em impulso nervoso constante seguidos de paralisia e morte do inseto, fenômeno também conhecido como *knockdown* (Soderlund & Bloomquist 1990). Mutações no canal de sódio podem resultar em alteração conformacional da proteína, impedindo a ligação das moléculas dos inseticidas e conseqüentemente a perda do efeito desejado.

Os alelos responsáveis pela alteração de conformação do canal de sódio e resistência aos inseticidas piretroides e DDT são recessivos e comumente chamados de *knockdown resistance* ou simplesmente alelos *kdr* (Milani 1954). Em mosquitos, a evidência da presença desses alelos foi primeiramente descrita por Plapp & Hoyer (1968) em *Culex tarsalis* resistentes a piretroides e DDT. Posteriormente, mecanismos similares foram descritos para outras espécies, como *Ae. aegypti* (Chadwick *et al* 1977), *Cx. quinquefasciatus* (Priester & Georghiou 1978) e *An. stephensi* Liston, 1901 (Omer *et al* 1980).

Substituições convergentes para o códon 1014 do Nav, cujo aminoácido se localiza no sexto segmento do domínio II (IIS6), são as mais frequentemente observadas em insetos resistentes a piretroides e DDT entre as mais variadas ordens como Blattodea, Hemiptera e Lepidoptera (Soderlund & Knipple 2003). As mutações *kdr* comumente descritas em *Culex* estão também no códon 1014, sendo a substituição de uma leucina (TTA) por fenilalanina (TTT ou TTC), L1014F; leucina por serina (TCA ou TCT), L1014S; ou leucina por cisteína (TGT), L1014C (Martinez-Torres *et al* 1999; Wondji *et al* 2008; Zhou *et al* 2009; Liu *et al* 2012; Wang *et al* 2012). A mutação L1014C só foi observada em *Cx. molestus* Forskal, 1775 da China e sua relação com a resistência a inseticidas ainda é incerta (Wang *et al* 2012). Apesar de terem sido descritas outras mutações sinônimas e não-sinônimas no canal de sódio de *Cx. quinquefasciatus* (Figura 30), as suas influências na resistência a inseticidas ainda não foram esclarecidas (Li *et al* 2012). Portanto, até o momento, a L1014F é única substituição no canal de sódio que foi encontrada em *Cx. quinquefasciatus* e que é relacionada com resistência a piretroides e ao DDT (Priester & Georghiou 1978).

Além do papel desempenhado na resistência, foram observados efeitos variados da mutação *kdr* L1014F no fitness de *Cx. quinquefasciatus*, em ambiente livre de inseticida. Por exemplo, no estudo realizado por Berticat *et al* (2008) foi observado que portadores da mutação *kdr* apresentaram uma redução significativa no número de fêmeas que emergiam em um ambiente livre de inseticidas. Entretanto, indivíduos com ambas as mutações *kdr* e *ace-1<sup>R</sup>*, apresentaram efeitos deletérios amenizados, com relação aqueles portando somente a *ace-1<sup>R</sup>*.



**Figura 30 – Esquema representando os sítios de ocorrência de mutações sinônimas e não-sinônimas no canal de sódio de *Culex quinquefasciatus*.** Mutações não-sinônimas são indicadas por pontos sólidos e suas localizações estão sublinhadas. Mutações sinônimas são indicadas por quadrados abertos e suas localizações estão em itálico. As posições das mutações estão numeradas de acordo com as sequências de aminoácidos de *Cx. quinquefasciatus* (números de acesso: JN695777, JN695778, JN695779). As posições correspondentes na proteína do canal de sódio ortóloga de *Musca domestica* Linnaeus, 1758<sup>1</sup> estão mostradas entre parênteses. Fonte: Figura adaptada de Li *et al* 2012.

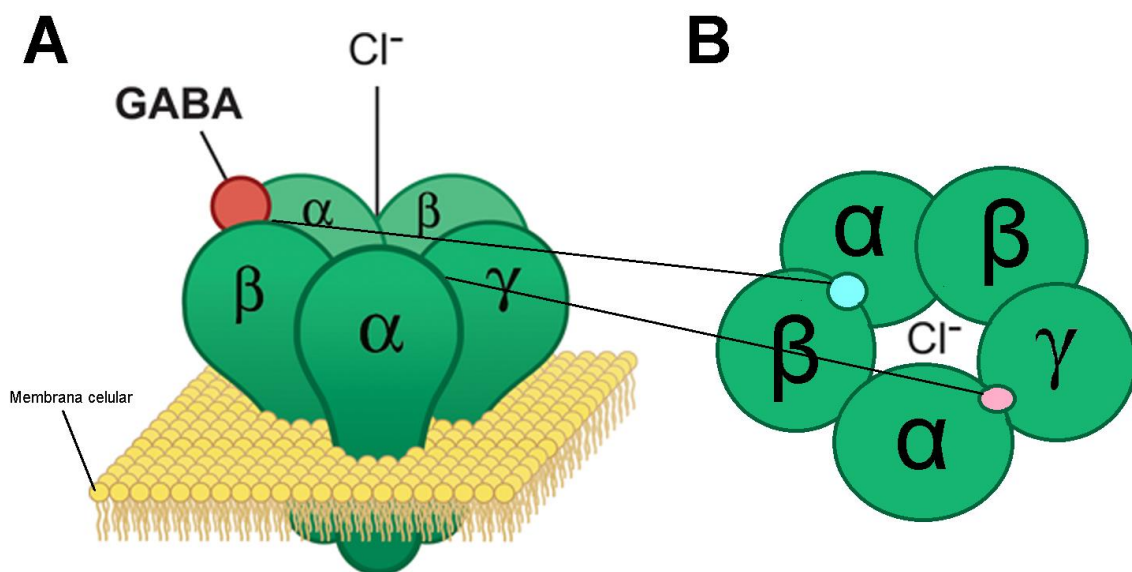
## Receptores GABA

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso em vertebrados e invertebrados (Nistri & Constanti 1979). Além do sistema nervoso central, em insetos os receptores GABA também são encontrados no sistema neuromuscular e são responsáveis pelo controle de íons  $\text{Cl}^-$  no interior da célula. Após a ligação do GABA ao seu receptor pós-sináptico,

<sup>1</sup> *M. domestica* é utilizada como referência por ser a primeira espécie a ter as mutações *kdr* estudadas e identificadas (Milani 1954; Williamson *et al* 1996).

em condições normais, ocorre um aumento da permeabilidade da membrana aos íons cloro, desencadeando o efeito inibitório do sistema nervoso (Lummis 1990).

Os receptores GABA que agem como canais iônicos são chamados de receptores ionotrópicos e são constituídos de cinco subunidades, duas  $\alpha$ , duas  $\beta$  e uma  $\gamma$  (Figura 31A). O sítio de ligação GABA fica localizado entres as partes superiores das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  e entres as subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$  é encontrado um sítio de ligação alostérico (Figura 31B). Esses receptores são alvos dos inseticidas avermectinas, piretroides tipo II e organoclorados ciclodienos. As avermectinas são utilizadas na agricultura e agem como agonistas, competetindo com o GABA e ligando-se em seus receptores pós-sinápticos de maneira irreversível. Essa ligação provoca super inibição do impulso nervoso, desencadendo ataxia e paralisia do inseto. Já os inseticidas piretroides tipo II e ciclodienos antagonizam o efeito inibitório do GABA, ligando-se no sítio alostérico e impedindo a entrada de íons cloro na célula, provocando tremores, convulsões e morte do inseto (Sattelle 1990).



**Figura 31 - Representação do receptor GABA ionotrópico.** Em (A), vista lateral do receptor e suas subunidades, destacando a ligação do GABA (círculo vermelho). Em (B), vista superior do receptor, destacando o sítio de ligação GABA (círculo azul) e o sítio de ligação alostérico (círculo rosa). Inseticidas avermectinas competem com o GABA pela ligação no seu sítio e os inseticidas piretroides tipo II e organoclorados ciclodienos se ligam no sítio alostérico, antagonizando os efeitos do GABA pelo impedimento da entrada de  $Cl^-$  na célula. Fonte: Adaptada de Hansen (2016).

Os receptores de GABA são codificados pelo gene *rdl* (*Resistance to Dieldrin*, em inglês) e algumas alterações na sequência de aminoácidos desse gene podem conferir resistência aos inseticidas que interagem com os receptores de GABA (Ffrench-Constant & Roush 1991). Em mosquitos, duas mutações (A302S e A302G) no gene *rdl* estão relacionadas com resistência a inseticidas. A mutação A302S ocorre pela substituição de alanina (GCA) por serina (TCA) no codon 302 do *rdl*, onde também pode ocorrer substituição por glicina (GGA), A302G (Du *et al* 2005). Em *Culex*, apenas a mutação A302S foi identificada até o momento (Tantely *et al* 2010; Pocquet *et al* 2013; Taskin *et al* 2016).

### Receptor Cqm1

A Cqm1 (*Culex quinquefasciatus* maltase 1) é uma  $\alpha$ -glicosidase ligada à membrana plasmática das células do epitélio intestinal de *Cx. quinquefasciatus* por meio de uma âncora do tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) (Darboux *et al* 2001). É alvo das toxinas produzidas pela *L. sphaericus*. Quando são ingeridas pelas larvas do mosquito, as protoxinas binárias são solubilizadas em pH alcalino intestinal, tornando-se ativas após clivagem por serinaproteases (Baumann *et al* 1985). A toxina Bin ativa se liga ao receptor Cqm1 presente no epitélio intestinal das larvas por meio do componente BinB (Figura 32), promovendo a destruição das microvilosidades e posterior degeneração do epitélio intestinal, com conseqüente morte da larva (Charles *et al* 2006; Silva-Filha *et al* 1999).

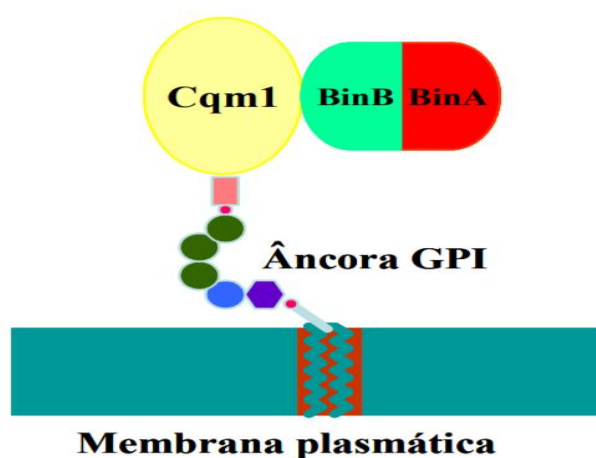


Figura 32 - Representação esquemática da ligação do componente BinB da toxina Bin do *L. sphaericus* ao receptor Cqm1, ligado à membrana plasmática das células do epitélio intestinal de larvas de *Culex quinquefasciatus* por uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Fonte: Melo (2008)

O gene *cqm1* possui cerca de 1870 nucleotídeos (Romão *et al* 2006). Algumas alterações nesse gene podem contribuir para a formação de um receptor solúvel, sem ancôra GPI e que não se prende ao epitélio intestinal ou ainda resultar na mudança de conformação do receptor no epitélio (Chalegre 2008). Três deleções no gene *cqm1* causam uma mudança na fase de leitura, gerando um códon de terminação de tradução prematuro, levando à produção de uma proteína solúvel e desprovida de ancôra GPI: i) alelo *cqm1*<sub>REC</sub> com deleção de 19 nucleotídeos (*d19*) entre as posições 1276-1294 (Romão *et al* 2006), ii) alelo *cqm1*<sub>REC-D16</sub>, com deleção de 16 nucleotídeos (*d16*) entre 1306-1321 e iii) alelo *cqm1*<sub>REC-D25</sub> com deleção de 25 nucleotídeos (*d25*), que engloba os nucleotídeos da *d19* e as seis bases subsequentes, posição 1256-1300 (Chalegre *et al* 2012).

Além das deleções, ocorre ainda o alelo *cqm1*<sub>REC-2</sub>, caracterizado pela transição de A por G no nucleotídeo 1324, ocasionando a substituição não sinônima de triptofano (TGG) para um *stop* códon (TAG). Essa mutação também gera uma proteína truncada, sem âncora GPI (Chalegre *et al* 2015). Todas as alterações citadas impedem a ligação da toxina ativa ao receptor Cqm1, impossibilitando conseqüentemente, sua ação inseticida.

### 1.6.5 Justificativa

A premissa de uma estratégia de controle vetorial eficiente é a obtenção do máximo de conhecimento possível sobre a espécie que se queira combater. Entre outras características, é importante que se conheça o seu ciclo de vida, preferência alimentar, distribuição geográfica, dinâmica populacional e interação com o homem e com outras espécies.

No controle químico é de extrema necessidade que se conheça o perfil genético da população alvo para que melhor se entenda sua dinâmica populacional, fluxo gênico, bem como sobre a predisposição à susceptibilidade ou resistência a compostos que sejam de fato efetivos na redução da densidade populacional ou até mesmo em sua erradicação. O Brasil possui alta infestação de *Cx. quinquefasciatus* em centros urbanos de norte a sul do país, de forma que não faz sentido esperar que surjam epidemias emergentes ou reemergentes de arbovírus em que este mosquito faça parte do ciclo de transmissão, para que se iniciem estudos mais aprofundados acerca da espécie.

Ao contrário do *Ae. aegypti*, tanto o perfil genético quanto a susceptibilidade ao controle químico das populações brasileiras de *Cx. quinquefasciatus* ainda são muito pouco conhecidos e explorados, pois não existe um programa de monitoramento para a espécie no país. Por exemplo, até o momento, um número ínfimo de trabalhos avaliou a presença de mutações relacionadas com resistência a inseticidas em *Cx. quinquefasciatus* do Brasil, ou mesmo a extensão da diversidade do endossimbionte *Wolbachia* nesse vetor. Neste estudo, são trazidas novas informações referentes a ocorrência ou ausência de mutações relacionadas à resistência a inseticidas em populações de *Cx. quinquefasciatus* das cinco regiões do país, bem como a identificação da diversidade de *Wolbachia* presente nesses mosquitos. Essas informações serão úteis para um melhor conhecimento do perfil genético de *Cx. quinquefasciatus* do Brasil, com o potencial de direcionar as ações de controle da espécie, que podem auxiliar na implementação de um programa nacional de monitoramento da resistência para a espécie.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a diversidade e a presença de mutações nos principais genes relacionados com resistência a inseticidas e a diversidade de *Wolbachia pipiens* em populações brasileiras de *Cx. quinquefasciatus*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar o perfil de susceptibilidade a inseticidas piretroides e organofosforados em linhagens de *Cx. quinquefasciatus* de laboratório;
- Identificar se há ocorrência de mutações classicamente relacionadas com resistência a inseticidas nos genes *ace-1*, *Nav* e *cqm1* nas linhagens de laboratório e em populações de campo de *Cx. quinquefasciatus*;
- Explorar a diversidade de *Wolbachia pipiens* em populações naturais de *Cx. quinquefasciatus* e nas linhagens de laboratório.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Criação, coleta e obtenção dos mosquitos

O Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (Laficave) possui duas colônias de *Cx. quinquefasciatus*. Ambas foram coletadas na cidade do Rio de Janeiro no ano de 2002, nos bairros de Benfica e Jacarepaguá. Os mosquitos provenientes de Benfica foram coletados no Instituto de Biologia do Exército (IBEx) e são identificados como “colônia IBEx”. Já os mosquitos provenientes de Jacarepaguá foram coletados próximos ao então existente Autódromo Internacional Nelson Piquet e são identificados como “colônia JPA”. Essas colônias são mantidas no Laficave desde então. As larvas são criadas em bacias plásticas contendo água desclorada com aproximadamente 3 gramas de ração para gatos triturada (Purina® Friskies®). A ração é adicionada a cada três dias para alimentar as larvas. As pupas são recolhidas diariamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferidas para gaiolas de papelão cilíndricas (16,5 cm de diâmetro x 17,5 cm de altura). Nessas gaiolas é adicionado um Erlenmeyer com algodão embebido em solução de sacarose a 10% para alimentação dos mosquitos adultos. Para a produção de ovos, as fêmeas realizam repasto sanguíneo em cobaias anestesiadas (de acordo com protocolo número L-004/2018, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz, Anexo II). Os adultos são mantidos a  $26 \pm 1$  °C e 70-80% de umidade relativa (UR).

Já os mosquitos *Cx. quinquefasciatus* de campo foram coletados pela equipe do Laficave nas cidades de Boa Vista/RR, Caseara/TO e Oiapoque/AP por meio da *BG-Sentinel Trap*<sup>TM</sup> (Biogents), ou ainda gentilmente cedidos por equipes colaboradoras, como a do Laboratório de Transmissores de Hematozoários (Lathema)/ IOC/ Fiocruz e do *World Mosquito Program*. A identificação em espécie foi feita por meio de chave dicotômica de Consoli & Lourenço de Oliveira (1994). Ao todo, obtivemos amostras de treze localidades (Aracaju/SE, Boa Vista/RR, Cáceres/MT, Campina Grande/PB, Caseara/TO, Cuiabá/MT, Foz do Iguaçu/PR, Manaus/AM, Oiapoque/AP, Pelotas/RS, Recife/PE, Rio de Janeiro/RJ e São Lourenço do Sul/RS) que abrangem as cinco regiões do país (Figura 33, tabela 2). Todas coletas ocorreram entre os anos 2015 e 2018.





Figura 33 - Locais de origem das amostras de *Culex quinquefasciatus*

Tabela 2 -Locais de origem e ano de obtenção das amostras de *Culex quinquefasciatus*

Localização	Ano	Coordenada geográfica	
		Latitude	Longitude
Aracaju – SE	2018	10° 54' 34" Sul	37° 4' 29" Oeste
Boa Vista – RR	2018	2° 49' 10" Norte	60° 40' 17" Oeste
Cáceres – MT	2016	16° 4' 1" Sul	57° 41' 12" Oeste
Campina Grande – PB	2016	7° 13' 51" Sul	35° 52' 54" Oeste
Caseara – TO	2016	9° 16' 15" Sul	49° 56' 47" Oeste
Cuiabá – MT	2017	15° 35' 56" Sul	56° 5' 42" Oeste
Foz do Iguaçu – PR	2017	25° 32' 49" Sul	54° 35' 18" Oeste
Manaus – AM	2017	3° 6' 26" Sul	60° 1' 34" Oeste
Oiapoque – AP	2017	3° 49' 53" Norte	51° 50' 7" Oeste
Pelotas – RS	2015	31° 46' 34" Sul	52° 21' 34" Oeste
Recife – PE	2016	8° 3' 15" Sul	34° 52' 53" Oeste
Rio de Janeiro – RJ	2018	22° 54' 13" Sul	43° 12' 35" Oeste
São Lourenço – RS	2015	31° 21' 46" Sul	51° 58' 44" Oeste

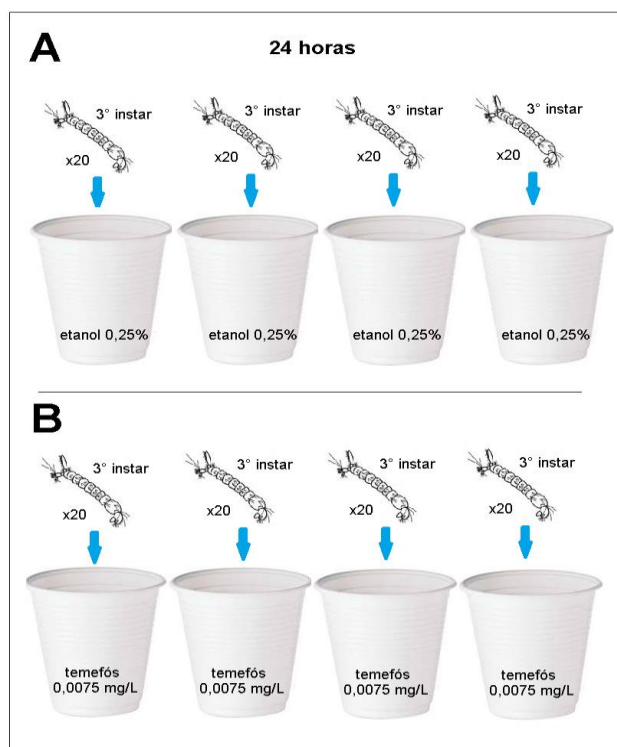
### 3.2 Biosaos com as linhagens de laboratório

Bioensaos de exposição aos inseticidas larvicidas temefós (organofosforado) e aos adulticidas malathion (organofosforado) e deltametrina (piretroide) foram realizados com as linhagens de laboratório, a fim de se determinar seus níveis de susceptibilidade ou resistência. Uma vez que não há uma linhagem referência de susceptibilidade para *Culex*, realizamos os ensaios utilizando sempre *Ae. aegypti* da linhagem Rockefeller em paralelo, como controle interno das condições do ensaio e como base para comparações entre diferentes ensaios.

#### 3.2.1 Bioensaio com larvas

O organofosforado temefós foi o larvicida mais utilizado em reservatórios de água potável no país, em campanhas contra *Ae. aegypti*. Foi gradativamente sendo substituído por compostos IGR a partir de 2010 (Valle *et al* 2019). Na avaliação de suscetibilidade ao temefós, foram realizados três ensaios do tipo dose-resposta, de acordo com o protocolo OMS (WHO 2016) para cada linhagem de *Cx. quinquefasciatus* (JPA e IBEx) de laboratório, e em paralelo à linhagem Rockefeller de *Ae. aegypti* (Figura 33). Utilizou-se o produto grau técnico Temephos (Sigma-Aldrich), dissolvido em etanol absoluto (Merck) para o preparo das soluções testada. As larvas foram expostas a 11 diferentes concentrações do inseticida (0,0015-0,0075 mg/L), com quatro réplicas por concentração. Adicionalmente, uma condição contendo apenas o solvente etanol (300 µL, que equivale à quantidade usada na maior concentração da solução com inseticida) foi feita em paralelo, como controle negativo. Para cada réplica foram utilizadas 20 larvas de terceiro instar, totalizando 960 larvas por ensaio, por linhagem (880 larvas para as 11 concentrações + 80 larvas para o controle). Ou seja, nos três ensaios, foram utilizadas 2.880 larvas para cada uma das linhagens de laboratório. A mortalidade das larvas foi registrada após 24h de exposição.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise Probit (Raymond 1985), com auxílio do programa IBM SPSS Statistics versão 22.0 (IBM Corp. 2013) para o cálculo das concentrações letais (CL) das populações, como por exemplo a CL<sub>50</sub> – concentração necessária para matar 50% das larvas expostas.



**Figura 34 - Representação dos ensaios dose-resposta com quatro réplicas por concentração.** Em (A) copos controle com 20 larvas de terceiro instar expostas a etanol 0,25% por 24 horas, representando a situação controle. Em (B) exemplo de exposição a uma das 11 concentrações de temefós utilizadas no ensaio. Fonte: Próprio autor.

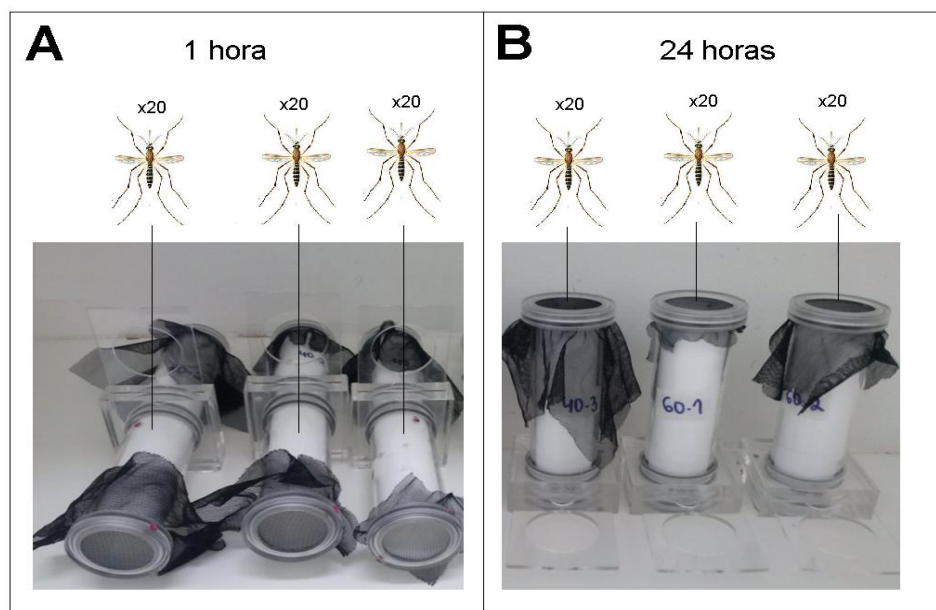
### 3.2.2 Bioensaios com adultos

A susceptibilidade aos adulticidas malathion (organofosforado) e deltametrina (piretroide), que são os mais comumente utilizados em campanhas contra mosquitos, em especial o *Ae. aegypti*, foi avaliada nas linhagens de laboratório de *Cx. quinquefasciatus* JPA e IBEx. Para tanto, foram realizados bioensaios do tipo dose-diagnóstica, de acordo com protocolo da OMS para papéis impregnados (WHO 2016). Os papéis foram impregnados no Laficave, como feito por Brito *et al* (2013), com reagente grau técnico Deltamethrin Pestanal (Sigma-Aldrich) dissolvido em acetona (Merck) e com malathion (Sangosse). As soluções foram diluídas em óleo de silicone (Dow Corning) à concentração desejada, sendo 840 µL uniformemente aplicadas sobre papel filtro (Whatman 1) 12 x 14 cm. Os papéis impregnados ficaram secando ao ar por dois dias e foram depois mantidos em geladeira até o uso. As doses diagnósticas utilizadas foram aquelas indicadas para *Ae. aegypti* pela OMS (WHOPES 2016): 0.05% e 0.8%, respectivamente para deltametrina e malation.

Para os ensaios, 20 fêmeas com idade entre 3-5 dias, não alimentadas com sangue, foram transferidas com ajuda de aspirador de Castro para o tubo sem inseticida, sendo ali aclimatadas por cerca de 30 minutos. Em seguida, foram gentilmente sopradas para o tubo contendo o papel impregnado com a dose diagnóstica do inseticida, onde permaneceram por 1 hora. Os insetos foram em seguida soprados de volta para o respectivo tubo livre de inseticida. A taxa de *knockdown* ou mortalidade foi registrada após 1h de exposição, respectivamente, para o piretroide e o organofosforado. Um novo registro de mortalidade foi feito 24 horas após a exposição para ambos os inseticidas. Em cada ensaio foram utilizadas três réplicas para cada linhagem e para cada inseticida, além de um controle negativo contendo papel impregnado apenas com o solvente (Figura 35). Os ensaios foram realizados em três momentos distintos. A linhagem Rockefeller de *Ae. aegypti* foi avaliada em paralelo, como controle das condições do ensaio, onde era esperado 100% de mortalidade.

No total, foram utilizadas 540 fêmeas de cada linhagem para a realização dos três ensaios. Vale destacar que as doses de deltametrina e malathion recomendadas pela OMS para avaliação de *Cx. quinquefasciatus* foram publicadas depois da realização destes ensaios e são menores do que as aqui utilizadas: 0,025% e 5%, respectivamente (WHOPES, 2016).

Para ensaios do tipo dose-diagnóstica, a OMS indica que populações com mortalidade  $\geq 98\%$  serão consideradas susceptíveis, entre 90-97% com possível resistência e  $< 90\%$  com resistência confirmada (WHO, 2016).



**Figura 35 - Representação dos ensaios tipo dose-diagnóstica com três réplicas por inseticida.** Em (A), 20 fêmeas adultas, não alimentadas e com idade entre 3 e 5 dias foram expostas aos papéis impregnados com inseticida durante 1 hora. Em seguida, foram transferidas para tubos de descanso, sem inseticida (B), onde foram mantidas até o registro de mortalidade, 24 horas após a exposição. Fonte: Próprio autor.

### 3.3 Ensaios moleculares

#### 3.3.1 Extração e purificação de DNA

As extrações de DNA genômico individual foram feitas por meio do método de lise por trituração em tampão TNES (250 mM de Tris pH 7.5, 2 M de NaCl, 100 mM de EDTA e 2.5% de SDS) (Martins *et al* 2007) modificado. Mosquitos adultos foram individualmente transferidos para tubos de polipropileno livres de nucleases de 1.5 mL contendo 25  $\mu$ L de TNES e macerados com auxílio de um triturador portátil. Após a maceração foi adicionado mais 475  $\mu$ L de TNES em cada tubo, seguido de agitação em vortex por 10 segundos. Posteriormente, foi adicionado 3  $\mu$ L de proteinase K (20 mg/mL) em cada tubo, seguido de nova agitação. Na sequência, os tubos foram deixados em banho-maria a 55°C por no mínimo 3 horas. Logo após esse tempo, foi adicionado 2  $\mu$ L de RNase A 10mg/mL em cada tubo, seguindo-se agitação por inversão 25 vezes e incubação em banho maria por 30 minutos a 37°C. Em seguida, 200  $\mu$ L de NaCl 5M foi adicionado para precipitação de proteínas. Os tubos foram então agitados em vortex por 20 segundos e centrifugados por 6 minutos a 15.000 g. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo tubo, onde se

seguiram lavagens do DNA para remoção do sal com 600  $\mu$ L de isopropanol 100%, misturado ao sobrenadante por inversão, seguindo-se de precipitação do DNA por centrifugação por 6 minutos a 15.000 g e descarte do sobrenadante, para nova lavagem, agora com 600  $\mu$ L de etanol 70% e nova centrifugação semelhante à anterior. Todo o etanol foi cuidadosamente descartado e os tubos foram encaminhados para a estufa a 55°C por 10 minutos para secarem. Finalmente, o precipitado de DNA foi ressuspensionado com 30  $\mu$ L de água Milli-Q.

### **3.4 Dosagem, diluição e montagem dos *pools* de DNA**

A concentração e a pureza de todo DNA genômico extraído foram mensuradas por espectrofotômetro NanoDropOne (Thermo Scientific™) e posteriormente, cada amostra foi diluída à 20 ng/  $\mu$ L. Após a dosagem e diluição, foram construídos *pools* de DNA para cada população. Para tanto, 1  $\mu$ L de DNA genômico a 20 ng/ $\mu$ L de cada amostra de uma linhagem ou população foi acrescido a um tubo representativo do pool de sua respectiva linhagem ou população. Os DNAs individuais e seus respectivos *pools* foram criopreservados a -20°C, para constituição de um banco de DNA de *Cx. quinquefasciatus* do Brasil e para utilização nos ensaios moleculares.

### **3.5 Amplificação, clonagem e sequenciamento**

Inicialmente, a diversidade dos genes *Nav* e *ace-1* foi explorada por meio de amplificação, clonagem e sequenciamento, que permitiram identificar os polimorfismos (substituições sinônimas e não sinônimas), número de haplótipos e a ocorrência ou ausência das clássicas mutações relacionadas com resistência a inseticidas.

#### **3.5.1 Gene *Nav***

Amplificação de fragmento do gene *Nav* foi feita para as populações de Boa Vista, Cáceres, Campina Grande, Caseara, Cuiabá e Recife, utilizando-se o kit *Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer* (Biolabs). Este kit contém polimerase com atividade corretiva (*proofreading*) a fim de se evitar falsos polimorfismos induzidos na PCR. Nesta reação foram utilizados 1X de *Phusion Master Mix*, 1 mM de cada primer (*CqNalls6 forward* e *reverse*, tabela 3), DMSO 3%, 20 ng de DNA do *pool* da população e água Milli-Q q.s.p. 25  $\mu$ L

de volume total. As condições de reação foram: 98°C por 30 segundos para ativação da enzima, PCR com 35 ciclos de 98°C por 10 segundos para desnaturação do DNA, 72°C por 30 segundos para anelamento dos primers e 72°C por 30 segundos para extensão da nova fita, e por fim 72°C por 7 minutos para extensão final do fragmento. A eficiência da amplificação foi averiguada pela eletroforese de uma alíquota em gel de agarose a 1%. Checada a amplificação em banda única e de tamanho esperado (456 pb), os fragmentos amplificados foram purificados com o kit Angecourt Ampure® XP (Backman Coulter), de acordo com as recomendações do fabricante. Depois de purificados, os fragmentos foram inseridos em um vetor de clonagem, utilizando o kit *pJet* (Thermo Fischer Scientific™) para posterior transformação em células competentes (*Escherichia coli* DH5- $\alpha$ ) por meio de choque térmico em banho-maria a 37°C por 45 segundos e adição de 1 mL de meio de cultura S.O.C (Invitrogen™), voltando para o banho-maria a 37°C por mais 1 hora. Passado esse período, as células foram retiradas do banho-maria para serem transferidas para placas de petri contendo meio LB-ágar com ampicilina (100 mg/mL). Essas placas foram incubadas a 37°C por cerca de 16 horas para que as colônias formadas fossem individualmente inoculadas em 1 mL de meio líquido CG (Circle-Growth, Biomedicals) com ampicilina (100 mg/mL), em uma placa de 96 poços fundos. A placa foi então acondicionada em estufa a 37°C com agitação de 220 rpm por 22 horas.

A purificação do DNA plasmidial foi realizada por meio do método de lise alcalina de Sambrook & Russel (2001). Antes de serem utilizados na reações de sequenciamento, os fragmentos clonados foram verificados por meio de uma reação de PCR contendo 1X de GoTaq Green Master Mix (Promega®), 1 mM dos *primers* pJET1.2\_for 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3' e pJET1.2\_rev 5' – AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3', 0.5  $\mu$ L de DNA plasmidial purificado e 8.7  $\mu$ L de água Milli-Q, para um volume final de 20  $\mu$ L. As condições dessa reação consistem em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos para desnaturação, 60°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 1 minutos e 30 segundos para a extensão. O produto dessa reação foi verificado em gel de agarose 1%.

Para as reações de sequenciamento dos plasmídeos dos clones que foram positivos para a presença do inserto foi utilizado o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), com 1 µL de DNA plasmidial purificado e 1 mM de um dos primers pJET1.2 citados anteriormente. Essas reações foram realizadas com 60 ciclos de 96°C por 10 segundos para desnaturação, 50°C por 5 segundos para o anelamento dos primers e 60°C por 2 minutos para extensão. Após essa reação, as placas foram encaminhadas para a Plataforma de Sequenciamento PDTIS/FIOCRUZ para a purificação com precipitação por etanol e ressuspensão em formamida HiDi (Applied Biosystems), desnaturação a 95°C por 3 minutos e sequenciamento em sequenciador ABI 3730.

### **3.5.2 Gene *ace-1***

As amplificações do gene *ace-1* das linhagens de laboratório IBEx e JPA e das populações de Boa Vista, Cáceres, Campina Grande, Cuiabá, Foz do Iguaçu e Recife foram feitas com o kit Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (Biolabs), a fim de se evitar falsos polimorfismos induzidos na PCR. Nesta reação foram utilizados 1X de Phusion Master Mix, 1mM dos *primers* Exon2dir e Exon3rev (Tabela 4), DMSO 3%, 20 ng do *pool* de DNA da população e 8.25 µL de água Milli-Q, com volume final de 25 µL. As condições de corrida da reação foram: 98°C por 30 segundos para ativação da enzima, PCR com 35 ciclos de 98°C por 10 segundos para desnaturação do DNA, 57°C por 30 segundos para anelamento dos primers e 72°C por 30 segundos para extensão da nova fita e por fim 72°C por 7 minutos para extensão final do fragmento. O produto dessa reação de PCR é um fragmento de 747 pares de bases (pb) que foi verificado em gel de agarose 1%.

Após a confirmação da amplificação, os fragmentos do gene *ace-1* também foram submetidos as mesmas etapas de purificação, clonagem e sequenciamento descritas para o gene *Nav*.



### 3.6 Análise das sequências

Os eletroferogramas obtidos nas reações de sequenciamento foram analisados quanto à qualidade e manualmente editados, quando necessário, com auxílio do programa Geneious Prime 2019 (<http://www.geneious.com>), para obtenção das sequências. As sequências obtidas foram comparadas com sequências dos genes *Nave ace-1* de *Cx. quinquefasciatus* disponíveis no banco de dados do *National Center of Biotechnology Information*, pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>). Determinada identidade com os respectivos genes alvo, o alinhamento das sequências foi feito com o auxílio do programa Geneious Prime 2019 (<http://www.geneious.com>), pelo método Geneious Alignment, baseado nos algoritmos de Needleman & Wunsch (1970) e Smith & Waterman (1981). As análises de polimorfismos, como número de haplótipos (h), número de sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica (hd), diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), e número médio de diferenças nucleotídicas (k) foram feitas utilizando o programa DnaSP 6.0 (Rozas *et al* 2017).

Para a tradução das sequências codificantes e quantificação dos sítios variáveis, foi utilizado o programa MEGA X (Kumar *et al* 2018). A construção das redes de haplótipos foi realizada no programa Network 5.0 (Bandelt *et al* 1999). As árvores filogenéticas foram obtidas com o programa MEGA 5.2 (Tamura *et al* 2001) pelo método de máxima verossimilhança, por meio do modelo de padrões heterogêneos de Tamura & Nei (1993), com valores de bootstrap obtidos mediante 1000 permutações.

### 3.7 Genotipagem

#### 3.7.1 Gene *Nav*

Para genotipagem individual da clássica mutação *kdir* (L1014F) no gene *Nav*, desenvolvemos uma reação de PCR utilizando um mix de *primers* alelo-específicos, contendo um primer *forward* comum a ambos os alelos e dois *reverse* específicos, diferenciados pela especificidade na ponta 3' e uma transversão no antepenúltimo nucleotídeo a 3' para aumentar a especificidade (Okimoto & Dodgson 1996; Wang *et al* 2005; Saavedra-Rodriguez *et al* 2007), além de uma cauda GC a 5' com 6 ou 26 nucleotídeos no primer específico para o alelo selvagem e mutante, respectivamente (Tabela 3). Esta diferença de 20 nucleotídeos é suficiente para gerar picos com diferentes temperaturas de *Melting* (TM) em uma curva de dissociação avaliada após a AS-PCR, em um equipamento de qPCR. Desta forma, utilizamos o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) para a qPCR, seguida de curva de dissociação, que geraram produtos com TM de 82.5 e 85°C para os alelos selvagem (1014 L) e mutante (1014 F), respectivamente. A reação de AS-PCR foi constituída por 1X de GoTaq® qPCR Master Mix, 0.9 mM dos primers CqNav1014rev\_Phe e CqNavfor\_diag, 0.5 mM do primer CqNav1014\_Ile, 2X de SyBr Safe, 20 ng de DNA e 1.6 µL de água Milli-Q, com volume final de 10 µL. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 50°C por 2 min e 95°C por 10 min para ativação da enzima; PCR com 30 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min, seguidos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 min e 95°C por 15 segundos.

**Tabela 3 - Primers utilizados para a amplificação do gene *Nav* de *Cx. quinquefasciatus* por meio das técnicas de PCR e AS-PCR**

PRIMER	SEQUÊNCIA 5'– 3'	TÉCNICA	FONTE
CqNaVIIS6for	CATGCTGGTGGGCGACGTGT	PCR	Nosso grupo
CqNaVIIS6rev	TCGCCGACAGACTTGAGGAACCA		
CqNav1014rev_Phe	GCGGGCAGGGCGGGGGGCGGGGCC CGCTGGAATACTCACGTCA	AS-PCR	Nosso grupo
CqNav1014rev_Ile	GCGGGCCGCTGGAATACTCACGCCT		
CqNavfor_diag	ATGTGGGACTGCATGCTGG		

### 3.7.2 Gene *ace-1*

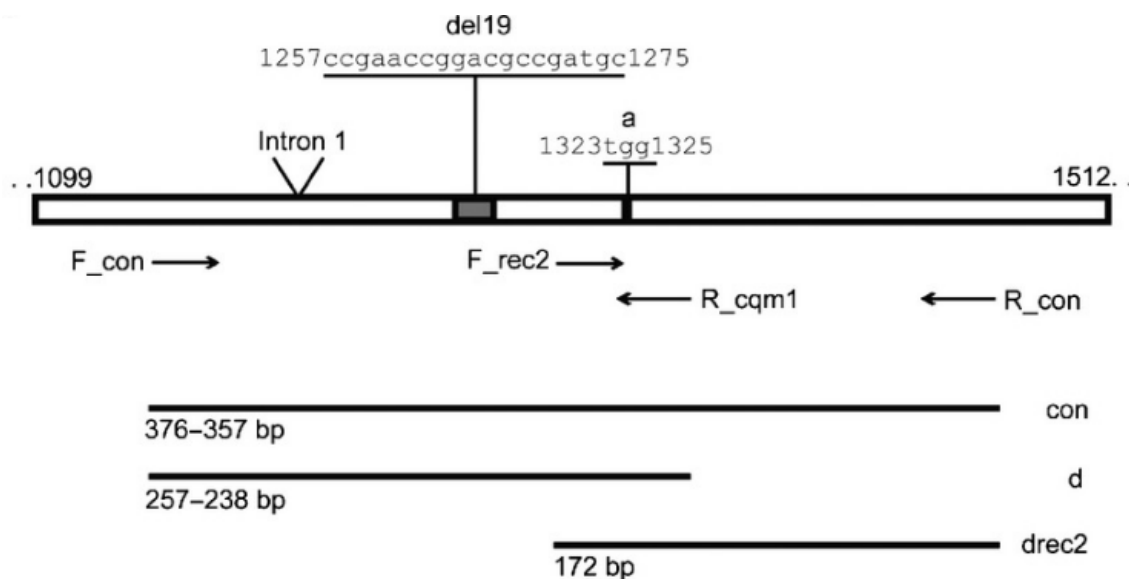
Para a genotipagem individual da mutação G119S, alelo *ace-1<sup>R</sup>*, desenvolvemos um ensaio de amplificação de região alvo e hibridização com sondas alelo-específicas, ligadas a um fluoróforo específico para cada SNP (Taqman<sup>®</sup>, ThermoFisher) para realização em qPCR em tempo real. Para essas reações foram utilizados 1X de Taqman Genotyping Master Mix (ThermoFisher), 1X do ensaio customizado, ID AN9HMRG, contendo primers e sondas (Tabela 4), 20 ng de DNA e 3,5 µL de água milli-Q, com volume final de 10 µL. As condições de amplificação e detecção específica dos SNPs dessas reações foram: 60°C por 30 segundos e 95°C por 10 minutos para ativação da enzima, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, como uma etapa final de 60°C por 1 minuto.

**Tabela 4 - Primers utilizados para a amplificação do gene *ace-1* de *Cx. quinquefasciatus* por meio das técnicas de PCR e Taqman<sup>®</sup> Real Time PCR**

TÉCNICA	PRIMER	SEQUÊNCIA 5'– 3'	FONTE
Taqman <sup>®</sup> Real Time PCR	Forward	GCCGTCATGCTGTGGATCTT	Nosso grupo
	Reverse	CGTCCGGTGGTCGTACAC	
	Sonda Ser ( <i>ace-1<sup>R</sup></i> )	VIC - CGGAGTAGAAGCTACCCC - NFQ	
	Sonda Gly	FAM - CGGAGTAGAAGCCACCCC - NFQ	

### 3.7.3 Gene *cqm1*

Para a identificação dos dois principais alelos relacionados à resistência ao *L. sphaericus*, *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>*, foi utilizada a técnica de PCR Multiplex desenvolvida por Chalegre *et al* (2015). Essa técnica utiliza a combinação de quatro *primers* para gerar fragmentos de tamanho específicos para cada mutação (Figura 36).



**Figura 36 – Representação parcial do gene *cqm1* de *Culex quinquefasciatus* indicando a deleção de 19 nucleotídeos (del19), representativo do alelo *cqm1<sub>REC</sub>* e a substituição G1324A do alelo *cqm1<sub>REC-2</sub>*. Amplificação esperada dos fragmentos amplificados por três combinações de quatro *primers*: (con) fragmentos-controle de 376-357 pb para os alelos selvagem (*cqm1*) e mutante (*cqm1<sub>REC</sub>*), respectivamente, a partir dos *primers* F\_con/R\_con, (d) fragmentos diagnósticos de 257-238 pb também para os alelos selvagem (*cqm1*) e mutante (*cqm1<sub>REC</sub>*), pelos *primers* F\_con/R\_cqm1, e (drec2) fragmento de 172 pb para o alelo mutante (*cqm1<sub>REC-2</sub>*), pelos *primers* F\_rec2/R\_con. Fonte: Adaptada de Chalegre *et al* (2015).**

Na reação Multiplex foram utilizados GoTaq Green Master Mix 1X (Promega®), 0,5 mM de cada primer (F\_con, R\_con, R\_cqm1 e R\_rec2, tabela 5), 20 ng de DNA e 1.6 µL de água milli-Q para um volume final de 15 µL. As condições dessas reações foram: 94°C por 2 minutos para desnaturação inicial, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para a desnaturação do DNA, 60°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 1 minuto para extensão da nova fita e na última etapa da reação, 72°C por 5 minutos para a término da extensão dos fragmentos. A amplificação dos fragmentos foi verificada em gel de agarose 1%.

**Tabela 5 – Primers utilizados para a amplificação do gene *cqm1* de *Cx. quinquefasciatus* por meio da técnica de PCR Multiplex**

<b>PRIMER</b>	<b>SEQUÊNCIA 5'– 3'</b>	<b>TÉCNICA</b>	<b>FONTE</b>
F_con	ACCGTCTTGTGCACGTA CT CACCACTCT	PCR Multiplex	Chalegre <i>et al</i> (2015)
R_con	GTTGATCAGGTCATGACGTTGCTGCATA		
R_cqm1	AGCATAGTCCGGATGAACTCGGATCC		
F_rec2	CCGGGTT CAGTACCAACACCAACTCATA		

### 3.7.4 Diversidade de *Wolbachia pipientis*

Para avaliarmos a diversidade de *Wolbachia pipientis* em *Cx. quinquefasciatus*, foi feita a identificação dos supergrupos A e B por meio da análise de dois genes, *wsp* e *ftsZ*. O gene *wsp* é amplamente utilizado em estudos de diversidade de *Wolbachia* (Zhou *et al* 1998; Van Meer *et al* 1999; Werren & Bartos 2001; Karimian *et al* 2018; Arai *et al* 2019; Gonçalves *et al* 2019). Esse gene codifica a maior proteína de superfície da bactéria, apresenta rápida evolução e possui quatro regiões hipervariáveis separadas por regiões conservadas (Braig *et al* 1998; Baldo *et al* 2005). O gene *ftsZ* codifica uma proteína relacionada com a divisão celular de bactérias (Lutkenhaus 1990; Werren *et al* 1995). Este gene é mais conservado que o *wsp* e ambos vêm sendo utilizados mais recentemente em conjunto nos estudos de diversidade dos supergrupos de *Wolbachia* (Lo *et al* 2002; Almeida & Stouthamer 2017; Balaji *et al* 2019; Konecka *et al* 2019).

Para a identificação dos supergrupos A e B foram utilizados *primers* que amplificam fragmentos específicos dos genes *wsp* e *ftsZ* de cada supergrupo em reação de PCR convencional independente para cada gene e cada supergrupo (total de quatro reações por amostra) (Tabela 6). As amostras que foram negativas para a infecção por *Wolbachia* foram submetidas a uma reação para amplificação do gene *Nav*, conforme o item 3.5.1, a fim de se comprovar que o DNA estaria íntegro, sendo, desta forma, um controle da qualidade do DNA utilizado. Portanto, aquelas amostras negativas para amplificação de *wsp* e *ftsZ*, mas que amplificaram fragmento do gene *Nav* foram consideradas sem *Wolbachia*.

**Tabela 6 – Primers utilizados para amplificação dos genes *wsp* e *ftsZ* dos supergrupos A e B de *Wolbachia pipientis* em *Cx. quinquefasciatus* por meio da técnica de PCR**

<b>GENE</b>	<b>PRIMER</b>	<b>SEQUÊNCIA 5'– 3'</b>	<b>FONTE</b>
<b><i>wsp A</i></b>	136F	TGAAATTTTACCTCTTTTC	Zhou <i>et al</i> (1998)
	691R	AAAAATTAACGCTACTCCA	
<b><i>wsp B</i></b>	81F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	
	522R	ACCAGCTTT TGC TTGATA	
<b><i>ftsZ A</i></b>	ftsZ_AspecF1	AAAGATAGTCATATGCTTTTC	Baldo <i>et al</i> (2006)
	ftsZ_AspecR1	CATCGCTTTGCCCATCTCG	
<b><i>ftsZ B</i></b>	ftsZ_BspecF1	AAAGATAGCCATATGCTCTTT	
	ftsZ_BspecR1	CATTGCTTTACCCATCTCA	

### **3.7.4.1 Supergrupo A**

A amplificação do gene *wspA* foi realizada com 1X de Gotaq® Hot Start Green Master Mix (Promega), 0.5 mM dos *primers* 136F e 691R, 20 ng de DNA e 3.8 µL de água milli-Q para um volume final de 12 µL. As condições de amplificação incluíram um período inicial de desnaturação de 94°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 50°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 1 minuto para a extensão e uma etapa final de extensão de 72°C por 5 minutos. O fragmento resultante esperado dessa reação era de 556 pb e sua amplificação foi verificada em gel de agarose 1%.

Na amplificação do gene *ftsZA* foi utilizado 1X de Gotaq® Hot Start Green Master Mix (Promega), 0.5 mM dos *primers* ftsZ\_AspecF1 e ftsZ\_AspecR1, 20 ng de DNA e 3.8 µL de água milli-Q para um volume final de 12 µL. As condições de amplificação foram: período inicial de desnaturação de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 59°C por 45 segundos para anelamentos dos *primers* e 72°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão e uma etapa final de extensão de 72°C por 10 minutos. O fragmento resultante esperado dessa reação era de 432 pb e sua amplificação foi verificada em gel de agarose 1%.

#### 3.7.4.2 Supergrupo B

Para a amplificação do gene *wspB* foi utilizado 1X de Gotaq<sup>®</sup> Hot Start Green Master Mix (Promega), 0.5 mM dos *primers* 81F e 522R, 20 ng de DNA e 3.8 µL de água milli-Q para um volume final de 12 µL. As condições de amplificação incluíram um período inicial de desnaturação de 94°C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 55°C por 1 minuto para anelamento dos primers e 72°C por 1 minuto para a extensão e uma etapa final de extensão de 72°C por 5 minutos. O fragmento resultante esperado dessa reação era de 449 pb e sua amplificação foi verificada em gel de agarose 1%.

A amplificação do gene *ftsZB* foi realizada com 1X de Gotaq<sup>®</sup> Hot Start Green Master Mix (Promega), 0.5 mM dos *primers* *ftsZ\_BspecF1* e *ftsZ\_BspecR1*, 20 ng de DNA e 3.8 µL de água milli-Q para um volume final de 12 µL. As condições da reação foram constituídas por uma etapa inicial de desnaturação de 94°C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 5°C por 45 segundos para anelamentos dos *primers* e 72°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão e uma etapa final de extensão de 72°C por 10 minutos. O fragmento resultante dessa reação possui teoricamente 432 pb e sua amplificação foi verificada em gel de agarose 1%.

## 4. Resultados

### 4.1 Bioensaios

#### Bioensaios com larvas

As linhagens de *Cx. quinquefasciatus* de laboratório IBEx e JPA apresentaram  $CL_{50}$  de 0,0032 (0,0021-0,0049) e 0,0045 (0,0037-0,0056) mg/L, ou seja, similares pela sobreposição de seus IC 95%. O perfil destas linhagens de *Cx. quinquefasciatus* foi similar ao da linhagem Rockefeller de *Ae. aegypti*, que apresentou  $CL_{50}$  0,0043 (0,0032-0,0058) mg/L (Figura 37).

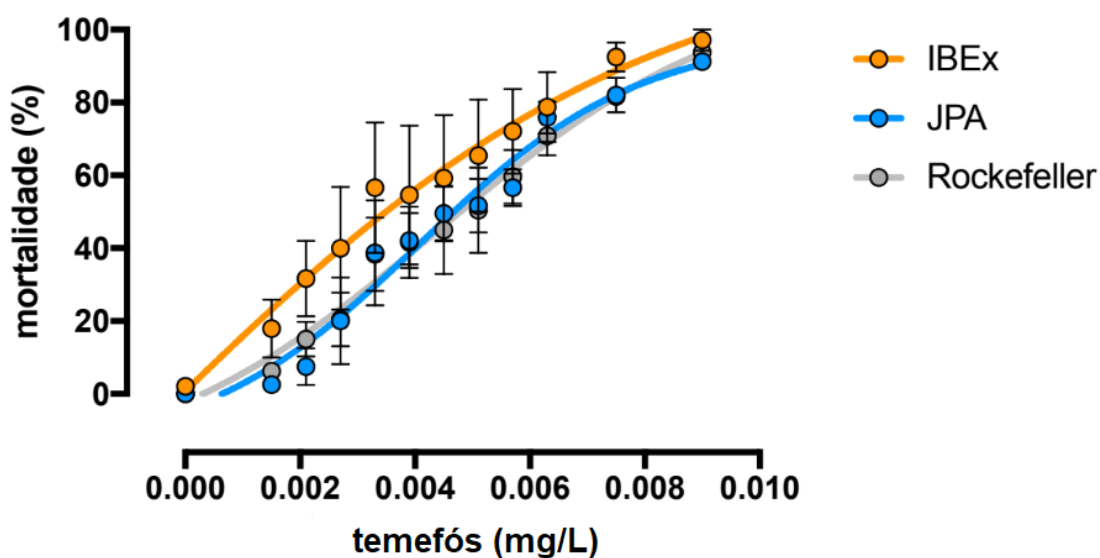


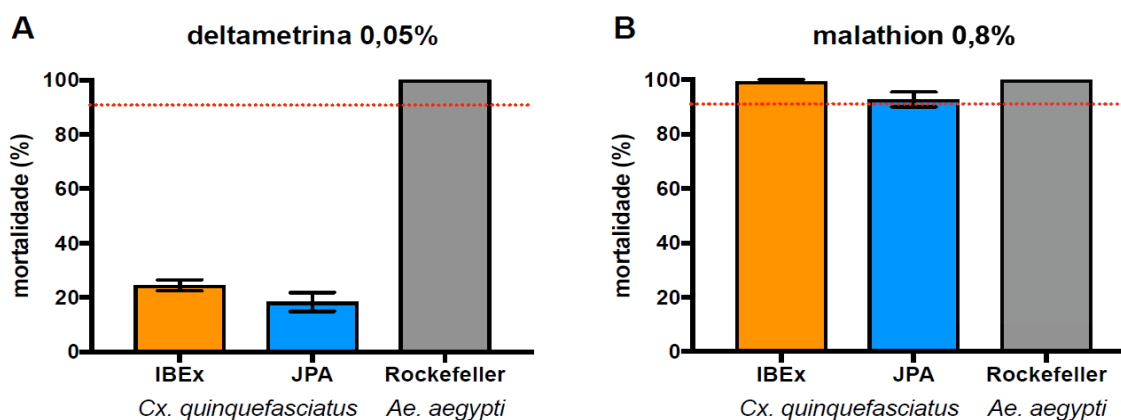
Figura 37 - Curva de mortalidade de linhagens de laboratório de *Culex quinquefasciatus*, comparadas à linhagem referência de *Aedes aegypti*, ao larvicida organofosforado temefós. Estão representados médias, erros-padrão e curvas de regressão não-linear para cada linhagem.

#### Bioensaios com adultos

Ambas as linhagens de laboratório de *Cx. quinquefasciatus* apresentaram baixo percentual de mortalidade quando expostas ao piretroide deltametrina (0,05%): 18,3% para JPA e 24,4% para IBEX. A linhagem de *Ae. aegypti* Rockefeller sofreu 100% de mortalidade (Figura 38A). Para o inseticida organofosforado malathion (0,8%), os percentuais de mortalidade foram de 92,7 e 99,4% para as linhagens de *Cx. quinquefasciatus* JPA e IBEX, respectivamente. A linhagem de *Ae. aegypti* Rockefeller também obteve mortalidade de 100% para o organofosforado (Figura 38B). De acordo com critérios sugeridos pela OMS, as linhagens de *Cx. quinquefasciatus* são,



portanto, resistentes a deltametrina. A linhagem JPA foi classificada como “possível resistência” para malathion.



**Figura 38 – Mortalidade de linhagens de *Culex quinquefasciatus* de laboratório a doses diagnósticas dos adulticidas piretroide deltametrina (A) e organofosforado malathion (B).** A linha vermelha tracejada em 90% de mortalidade representa a linha de corte estipulada pela OMS (WHO 2016) para a classificação das populações como resistente (<90%) ou suscetível ( $\geq 98\%$ ). A Linhagem Rockefeller de foi empregada como controle de susceptibilidade aos inseticidas em suas doses diagnósticas.

#### 4.2 Investigação da presença de marcadores moleculares associados à resistência a inseticidas

Ao todo, obtivemos o DNA de 744 mosquitos (tabela 7), que foram utilizados nos ensaios moleculares. Todas estas amostras foram submetidas à genotipagem em fragmentos dos genes *Na<sub>v</sub>*, *ace-1* e *cqm1* por métodos baseados em PCR. A amplificação de todos os genes citados foi bem-sucedida utilizando a concentração de 20 ng de DNA individual.

Inicialmente, a diversidade dos genes *Na<sub>v</sub>* e *ace-1* foi explorada por meio de amplificação, clonagem e sequenciamento. Para o gene *Na<sub>v</sub>* utilizamos *pools* de DNA das populações de Boa Vista-RR, Cáceres-MT, Campina Grande-PB, Caseara-TO, Cuiabá-MT e Recife-PE. Para o gene *ace-1* foram utilizados *pools* de DNA das linhagens de laboratório (IBEx e JPA) e as populações de campo de Boa Vista-RR, Cáceres-MT, Campina Grande-PB, Cuiabá-MT, Foz do Iguaçu-PR e Recife-PE.

Entre os polimorfismos observados nas sequências obtidas, identificamos as clássicas mutações associadas à resistência a inseticidas em ambos os genes. Mediante tal observação, decidimos realizar a genotipagem individual de todas as amostras para a obtenção das frequências alélicas e genotípicas nos *loci* daquelas mutações.

**Tabela 7 – Quantidade de amostras de DNA de indivíduos por população ou linhagem de *Cx. quinquefasciatus*.**

<b>Localização</b>	<b>Número de indivíduos</b>
<b>IBEx</b>	48
<b>JPA</b>	48
Aracaju – SE	47
Boa Vista – RR	67
Cáceres – MT	26
Campina Grande – PB	40
Caseara – TO	52
Cuiabá – MT	26
Foz do Iguaçu – PR	43
Manaus – AM	61
Oiapoque – AP	73
Pelotas – RS	28
Recife – PE	54
Rio de Janeiro – RJ	102
São Lourenço – RS	29
<b>Total</b>	<b>744</b>

As linhagens de *Cx. quinquefasciatus* de laboratório estão em negrito.

#### **4.2.1 – Diversidade nucleotídica do segmento IIS6 do gene *Nav***

Obtivemos ao todo sequências de 101 clones contendo o fragmento do segmento IIS6 do *Nav* para as populações de Boa Vista (19), Cáceres (9), Campina Grande (23), Caseara (21), Cuiabá (13) e Recife (16) (Tabela 8). As sequências contêm 460-461 pares de bases, apresentando os éxons 20 e 21 de acordo com numeração de gene ortólogo em *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Williamson *et al* 1996) com respectivamente 67 e 61 pb e um íntron de 332-333 pb.

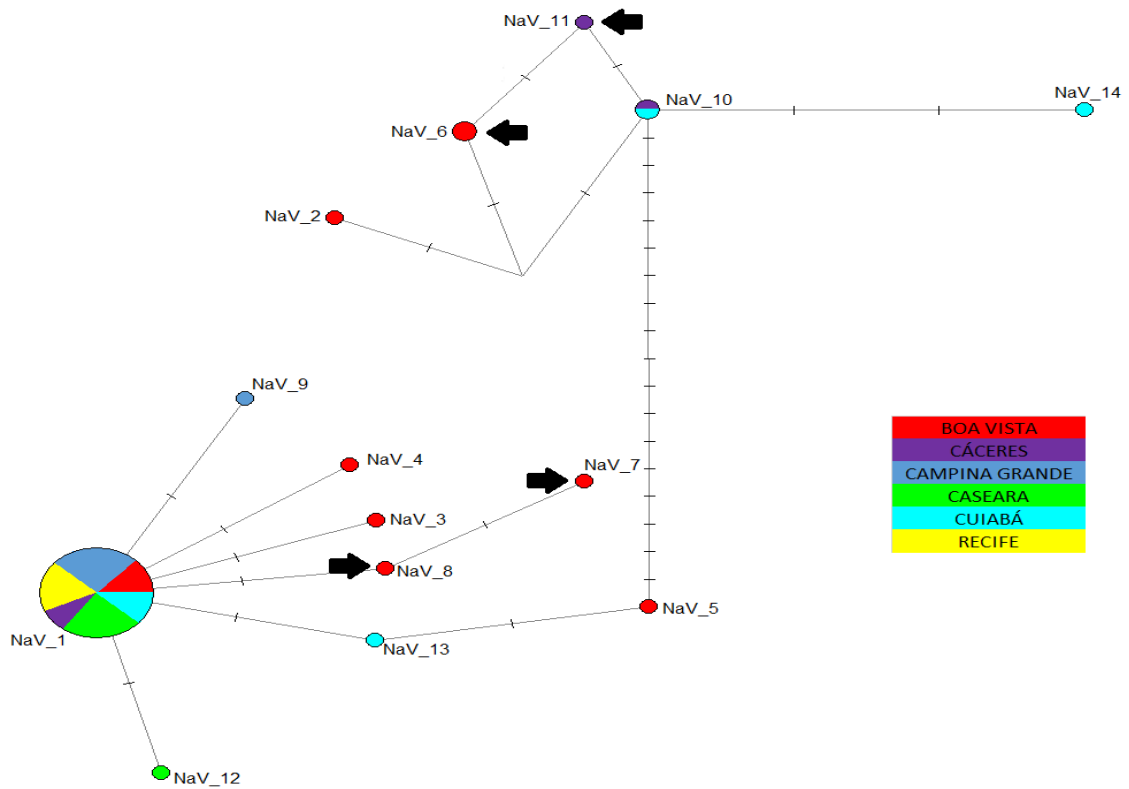
De forma geral, a variabilidade nucleotídica foi baixa. Foram identificados 24 sítios polimórficos, uma substituição não-sinônima no éxon 20 e 23 substituições no íntron. A substituição não-sinônima corresponde justamente à clássica mutação *kdr* L1014F (numeração de acordo com *Nav* de *M. domestica*). Ao todo, foram observados 14 haplótipos (Figura 39, Anexo III), sendo o haplótipo *Nav\_1* o mais frequente (Figuras 39 e 40), contendo 86 sequências (85,1%) e presente em todas as populações: 11 de Boa Vista (57,9%), 7 de Cáceres (77,8%), 22 de Campina Grande (95,7%), 20 de Caseara (95,2%), 10 de Cuiabá (76,9%) e 16 de Recife (100%). A população de Boa Vista apresentou

a maior diversidade haplotípica ( $hd$ ), com oito haplótipos, sendo sete exclusivos. Cáceres teve o maior valor de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) (Tabela 8). A mutação *kdr* L1014F apareceu em quatro haplótipos distintos ( $Nav\_6$ ,  $Nav\_7$ ,  $Nav\_8$  e  $Nav\_11$ ), sendo um em Cáceres ( $Nav\_11$ ) e os outros três em Boa Vista. As análises filogenéticas e de rede haplotípica (Figuras 39 e 41) sugerem que os haplótipos com a mutação *kdr* tenham pelo menos duas origens distintas ( $Nav\_11 + Nav\_6$  e  $Nav\_7 + Nav\_8$ ). A árvore de máxima verossimilhança revelou a divisão das sequências em dois clados (A e B), suportada por 100% de *bootstrap* (Figura 41). No clado A estão representadas nove haplótipos, estando o haplótipo 1, presente em todas as localidades avaliadas. O clado B apresentou cinco haplótipos, onde não foram representadas as populações nordestinas Recife e Campina Grande.

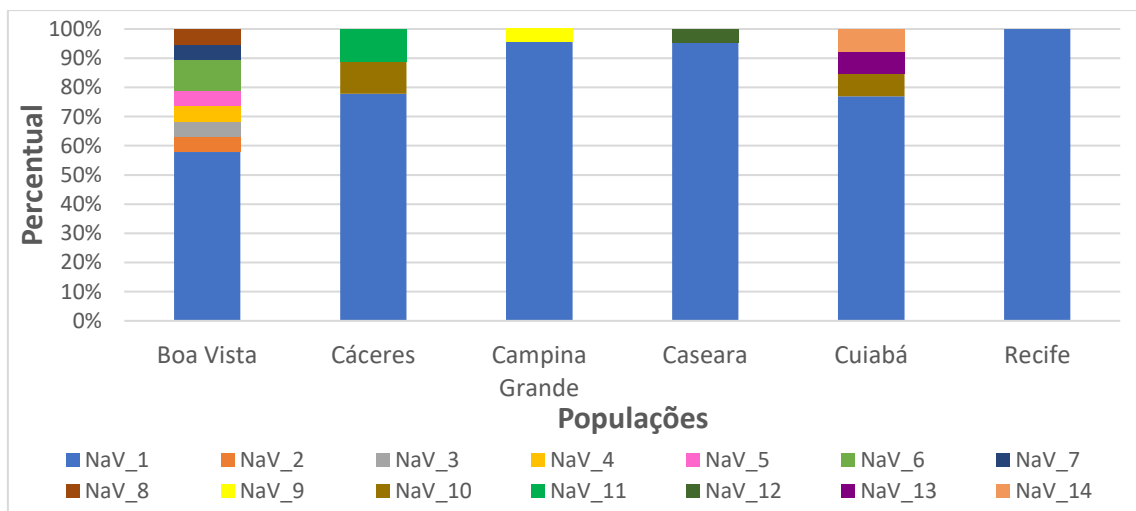
**Tabela 8 - Índices de polimorfismos encontrados no segmento IIS6 do gene *Nav* em seis populações brasileiras de *Cx. quinquefasciatus***

População	N	h	S	hd	$\pi$	k
Boa Vista	19	8	22	0,673 (0,119)	0,01446 (0,00524)	6,45
Cáceres	9	3	20	0,417 (0,191)	0,01703 (0,00723)	7,611
Campina Grande	23	2	1	0,087 (0,078)	0,00019 (0,00017)	0,087
Caseara	21	2	1	0,095 (0,084)	0,00021 (0,00019)	0,095
Cuiabá	13	4	20	0,423 (0,164)	0,01228 (0,00599)	5,487
Recife	16	1	0	0	0	0
Total	101	14	24	0,276 (0,059)	0,00628 (0,00195)	2,794

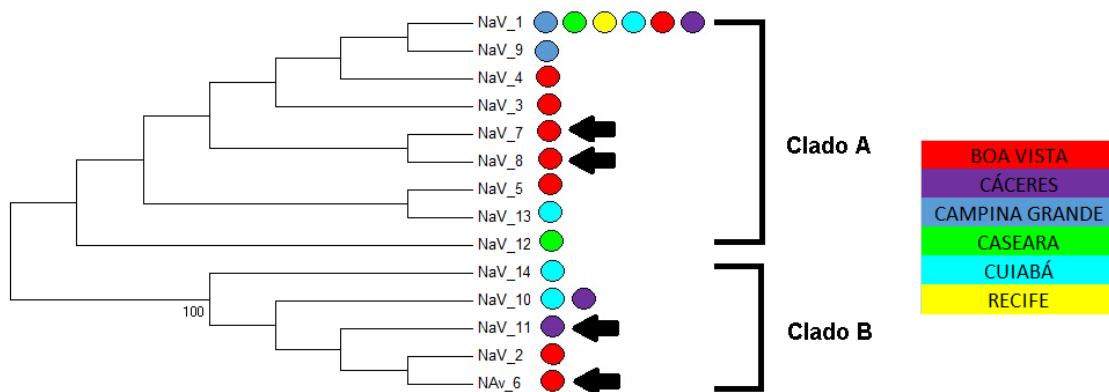
N: número de sequências para cada população; h: número de haplótipos; S: número de sítios polimórficos; hd: diversidade haplotípica;  $\pi$ : diversidade nucleotídica; k: número médio de diferenças nucleotídicas. Desvio padrão em parênteses.



**Figura 39 - Rede de haplótipos para fragmento nucleotídico correspondente ao segmento IIS6 do *Nav* de populações de *Culex quinquefasciatus* do Brasil.** O tamanho dos círculos é proporcional à quantidade de seqüências obtidas para cada haplótipo no total, de forma que o menor círculo é representado por apenas uma seqüência. Os traços que atravessam as linhas que unem os haplótipos representam a quantidade de passos mutacionais entre eles. As setas indicam os haplótipos que apresentaram a clássica mutação *kdr* L1014F.



**Figura 40 - Percentual de haplótipos por população para o gene *Nav*.**



**Figura 41 -** Árvore filogenética de máxima verossimilhança para fragmento nucleotídico correspondente ao segmento IIS6 do *Nav* de populações de *Culex quinquefasciatus* do Brasil. As setas indicam os haplótipos que apresentaram a clássica mutação *kdr* L1014F. Foi utilizado o modelo de padrões heterogêneos de Tamura & Nei (1993), com valores de *bootstrap* obtidos mediante 1000 permutações. Apenas os valores acima de 80 são mostrados.

#### 4.2.2 – Amplificação, clonagem e sequenciamento de fragmento do gene *ace-1*

Obtivemos sequências de 95 clones correspondentes ao fragmento do gene *ace-1* para as linhagens de laboratório IBEx (6) e JPA (4) e das populações de Boa Vista (12), Cáceres (7), Campina Grande (18), Cuiabá (14), Foz do Iguaçu (16) e Recife (18) (Tabela 9). As sequências contêm 744-746 pares de bases, apresentando os éxons 2 e 3, de acordo com numeração de gene ortólogo em *Torpedo californica* Ayres, 1855 (Schumacher *et al* 1986) e *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Hall & Spierer 1986; Fournier *et al* 1989; Weill *et al* 2004), com respectivamente 136 e 524 pb e um íntron de 84-86 pb.

De forma geral, a variabilidade nucleotídica foi alta. Foram identificados 43 sítios polimórficos, três no éxon 2, 24 no éxon 3 e 16 no íntron, com 10 substituições não-sinônimas: uma no éxon 2 (A018V) e nove no éxon 3 (D029E, P091L, S119\*<sup>2</sup>, V099M, A109T, G247S, A253V, A264T, E290K) (Anexo IV). As sequências foram distribuídas em 39 haplótipos, formando uma complexa rede (Figura 43). Apenas quatro haplótipos (*ace-1\_1*, *ace-1\_6*, *ace-1\_11*, *ace-1\_20*) estavam compartilhados por mais de uma população. O haplótipo 1 (*ace-1\_1*) foi o mais frequente (Figuras 42 e 43), com 27 sequências: quatro de Boa Vista (33,3%), quatro de Campina Grande (22,2%), dois de Cáceres (28,6%), quatro de Recife (22,2%), três de Cuiabá (21,4%), uma de Foz do Iguaçu (6,2%), seis

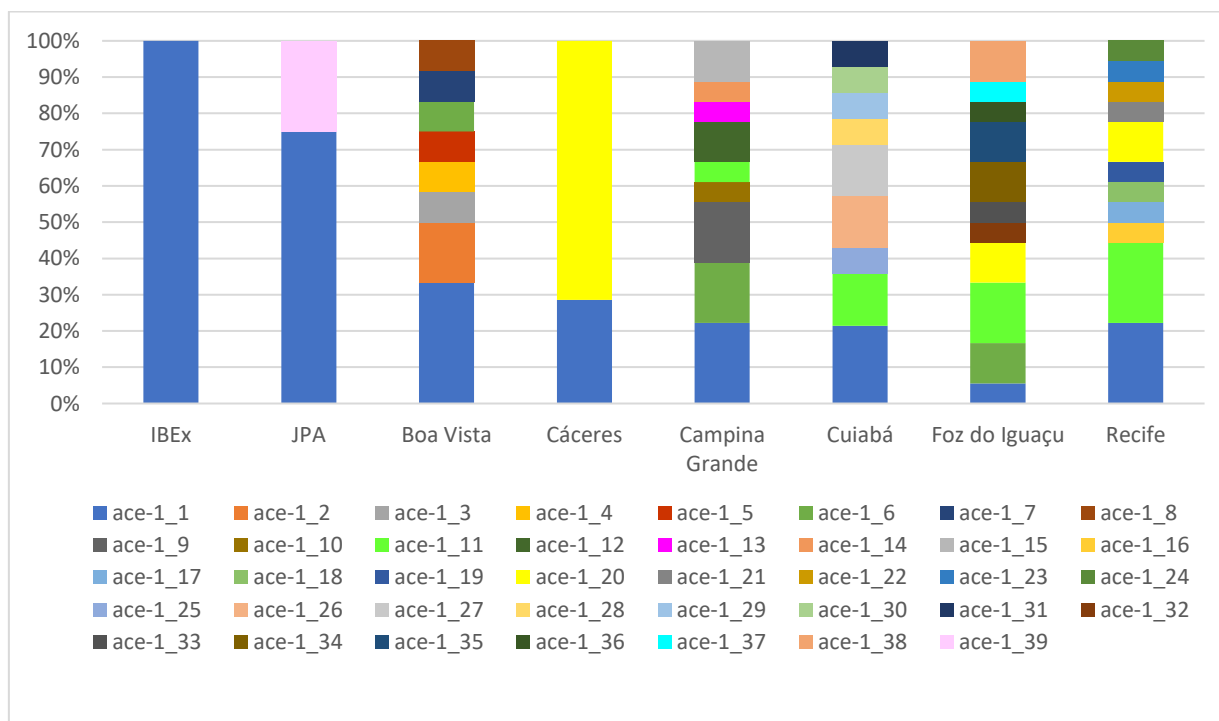
<sup>2</sup> \*Stop códon (TAG)

da linhagem IBEx (100%) e três da linhagem JPA (75%). A população de Recife apresentou o maior número de haplótipos exclusivos, seguida de Cuiabá e Foz do Iguaçu, com sete haplótipos cada. A clássica mutação G119S (numeração de acordo com o AChE1 de *T. californica*) foi identificada no haplótipo ace-1\_38, exclusivo de Foz do Iguaçu. Análise filogenética não sugeriu qualquer agrupamento entre haplótipos do gene *ace-1* com suporte estatístico (Figura 44).

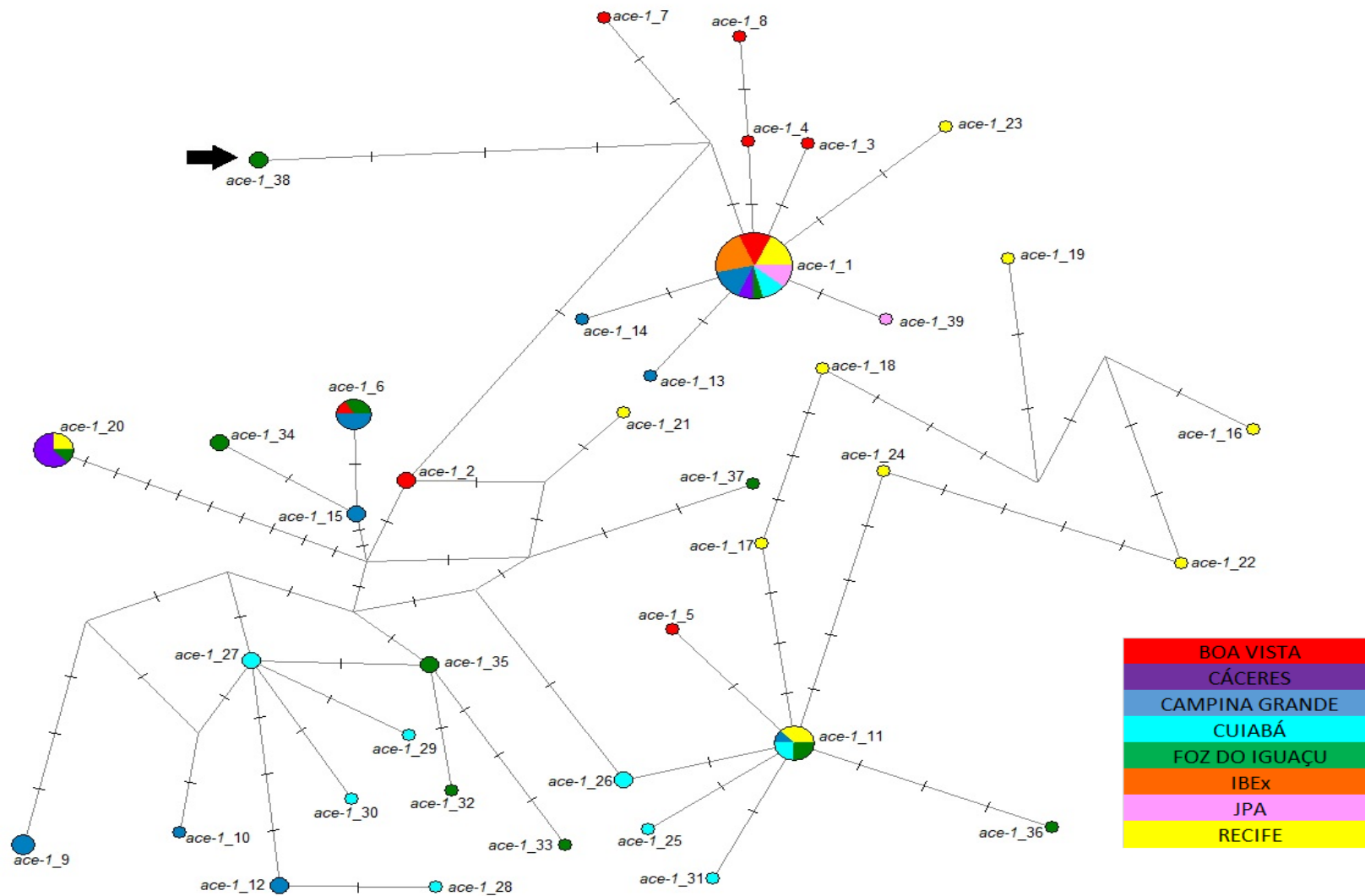
**Tabela 9 - Índices de polimorfismos encontrados no segmento do gene *ace-1* nas duas linhagens de laboratório e nas seis populações de campo de *Cx. quinquefasciatus***

População	N	h	S	hd	$\pi$	k
IBEx	6	1	0	0	0	0
JPA	4	2	1	0,5 (0,265)	0,00069 (0,00036)	0,5
Boa Vista	12	8	14	0,894 (0,078)	0,00489 (0,00124)	3,561
Cáceres	7	2	12	0,0476 (0,171)	0,00785(0,00282)	5,714
Campina Grande	18	9	17	0,908 (0,039)	0,00807 (0,00071)	5,869
Cuiabá	14	9	16	0,934 (0,045)	0,00679 (0,00075)	4,945
Foz do Iguaçu	16	11	27	0,958 (0,031)	0,00948 (0,00118)	6,900
Recife	18	11	24	0,908 (0,051)	0,01108 (0,00121)	8,065
Total	95	39	43	0,897 (0,025)	0,00923 (0,00923)	6,709

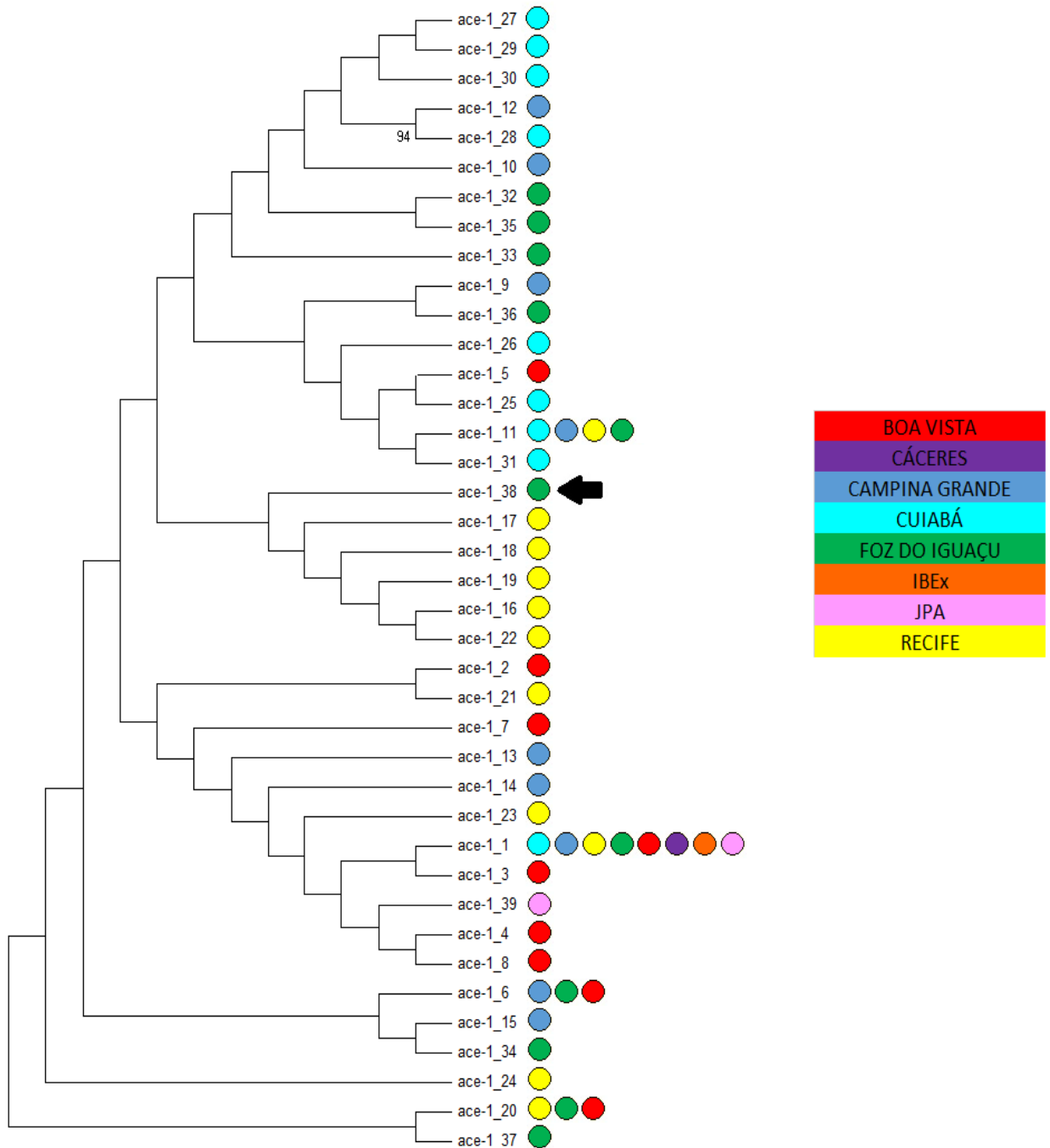
N: número de sequências para cada população; h: número de haplótipos; S: número de sítios polimórficos; hd: diversidade haplotípica;  $\pi$ : diversidade nucleotídica; k: número médio de diferenças nucleotídicas. Desvio padrão em parênteses.



**Figura 42 - Percentual de haplótipos por população para o gene *ace-1*.**



**Figura 43 – Rede de haplótipos para fragmento nucleotídico parcial do gene *ace-1*.** O tamanho dos círculos é proporcional à quantidade de sequências obtidas para cada haplótipo, de forma que o menor é representado por apenas uma sequência. Os traços que atravessam as linhas que unem os haplótipos representam a quantidade de passos mutacionais entre eles. A seta indica o haplótipo que apresentou as sequências com a clássica mutação G119S.



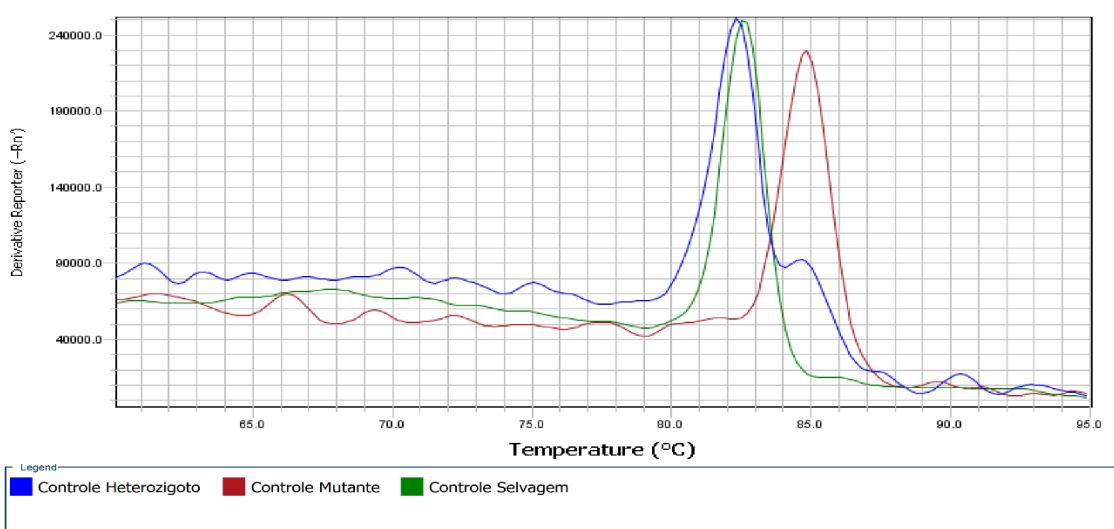
**Figura 44 – Árvore filogenética de máxima verossimilhança para fragmento nucleotídico correspondente a segmento do ace-1 de populações de *Culex quinquefasciatus* do Brasil e linhagens de laboratório.** A seta indica o haplótipo que apresentou as sequências com a clássica mutação G119S. Foi utilizado o modelo de padrões heterogêneos de Tamura & Nei (1993), com valores de *bootstrap* obtidos mediante 1000 permutações. Somente valores acima de 80, foram incluídos na imagem.



### 4.2.3 – Genotipagem do SNP L1014F do gene do canal de sódio regulado por voltagem (*Nav*)

Uma vez que encontramos a clássica mutação *kdr* L1014F no *Nav* de *Cx. quinquefasciatus* entre nossas amostras, realizamos genotipagens individuais por meio de AS-PCR a fim de obtermos as frequências alélicas e genotípicas das populações para o sítio 1014 do *Nav*. Foram ao todo analisadas as duas linhagens de laboratório e as 13 populações de campo (744 indivíduos). Como controle positivo das genotipagens, foram utilizados o DNA plasmidial purificado de clones cujas sequências identificaram L1014 (L/L+) e 1014F (F/F+). Para o controle heterozigoto (L/F+) foi preparada uma mistura com quantidades equimolares de ambos os clones. De acordo, as curvas de dissociação das reações de AS-PCR revelaram picos de aproximadamente 82.5 e 84.8°C, referentes aos produtos específicos para os alelos L1014 e 1014F, respectivamente (Figura 45).

O alelo *kdr* 1014F foi identificado na linhagem de laboratório JPA e nas populações de campo de Cáceres/MT, Boa Vista/RR e Manaus/AM, contudo em baixa frequência (0,010-0,022). Apenas um indivíduo homozigoto mutante (1014 F/F) foi encontrado, na população de Boa Vista/RR (Tabela 10). Estes ensaios confirmaram que a clássica mutação *kdr* está presente em populações de *Cx. quinquefasciatus*, pelo menos das regiões Norte e Centro-Oeste do país.



**Figura 45 - Curvas de dissociação (melting curve analysis) da reação PCR alelo-específica (AS-PCR) para variação L1014F no segmento IIS6 do gene *Nav* de populações brasileiras de *Culex quinquefasciatus*. Exemplo de análise com os controles positivos heterozigoto (1014 L/F), homozigoto mutante (1014 F/F) e homozigoto selvagem (1014 L/L).**

**Tabela 10 - Frequências genotípicas e alélicas para o sítio 1014 do gene *Nav* das linhagens de laboratório e populações de campo de *Cx. quinquefasciatus* do Brasil.**

População	Frequencia Genotípica			Frequência Alélica		HWE*		
	N	L/L	L/F	F/F	L	F	$\chi^2$	P**
<b>IBEx</b>	48	1	0	0	1	0	-	-
<b>JPA</b>	48	0,980	0,020	0	0,990	0,010	0,0053	0,9418
Aracaju-SE	47	1	0	0	1	0	-	-
Boa Vista-RR	67	0,97	0,015	0,015	0,978	0,022	29	-
Cáceres-MT	26	0,962	0,038	0	0,981	0,019	0,0099	0,9203
Camp. Grande-PB	40	1	0	0	1	0	-	-
Caseara- TO	52	1	0	0	1	0	-	-
Cuiabá-MT	26	1	0	0	1	0	-	-
Foz do Iguaçu - PR	43	1	0	0	1	0	-	-
Manaus-AM	61	0,968	0,032	0	0,984	0,016	0,0166	0,8922
Oiapoque-AP	73	1	0	0	1	0	-	-
Pelotas-RS	28	1	0	0	1	0	-	-
Recife-PE	54	1	0	0	1	0	-	-
Rio de Janeiro-RJ	102	1	0	0	1	0	-	-
São Lourenço-RS	29	1	0	0	1	0	-	-
<b>TOTAL</b>	744							

As linhagens de *Cx. quinquefasciatus* de laboratório estão em negrito.

\* Teste para a avaliação da hipótese do Equilíbrio de Hard-Weinberg

\*\* Probabilidade para  $\chi^2$  com um grau de liberdade

#### 4.2.4. Genotipagem do SNP G119S do gene da acetilcolinesterase (*ace-1*)

Toda aquela coleção de DNA dos 744 indivíduos foi também avaliada para o SNP G119S na acetilcolinesterase (AChE), uma vez que o alelo mutante clássico 119S (*ace-1<sup>R</sup>*) foi encontrado entre nossas amostras. Ensaio de genotipagem do tipo Taqman<sup>®</sup> (Figura 46) indicaram a presença do alelo mutante 119S *ace-1<sup>R</sup>* apenas na população de Foz do Iguaçu/PR, em baixa frequência (0,035) (Tabela 11). Essa amostra com a mutação passou a ser utilizada como controle positivo, desde então. A presença da mutação G119S foi confirmada por clonagem e sequenciamento de fragmento do gene *ace-1* daquela amostra (Anexo IV).

Tabela 11 - Frequências genotípicas e alélicas para o sítio 119 (G119S) do gene *ace-1* em populações de campo e linhagens de laboratório de *Cx. quinquefasciatus*.

Localização	N	Frequencia Genotípica			Frequência Alélica		HWE*	
		G/G	G/S	S/S	G	S	$\chi^2$	p**
<b>IBEx</b>	48	1	0	0	1	0	-	-
<b>JPA</b>	48	1	0	0	1	0	-	-
Aracaju-SE	47	1	0	0	1	0	-	-
Boa Vista-RR	67	0	0	0	0	0	-	-
Cáceres-MT	26	1	0	0	1	0	-	-
Campina Grande-PB	40	1	0	0	1	0	-	-
Caseara- TO	52	1	0	0	1	0	-	-
Cuiabá-MT	26	1	0	0	1	0	-	-
Foz do Iguazu - PR	43	0,954	0,023	0,023	0,965	0,035	18,426	0,000018
Manaus-AM	61	1	0	0	1	0	-	-
Oiapoque-AP	73	1	0	0	1	0	-	-
Pelotas-RS	28	1	0	0	1	0	-	-
Recife-PE	54	1	0	0	1	0	-	-
Rio de Janeiro - RJ	102	1	0	0	1	0	-	-
São Lourenço - RS	29	1	0	0	1	0	-	-
<b>TOTAL</b>	744							

As linhagens de *Cx. quinquefasciatus* de laboratório estão em negrito.

\* Teste da hipótese do Equilíbrio de Hard-Weinberg

\*\* Probabilidade para  $\chi^2$  com um grau de liberdade

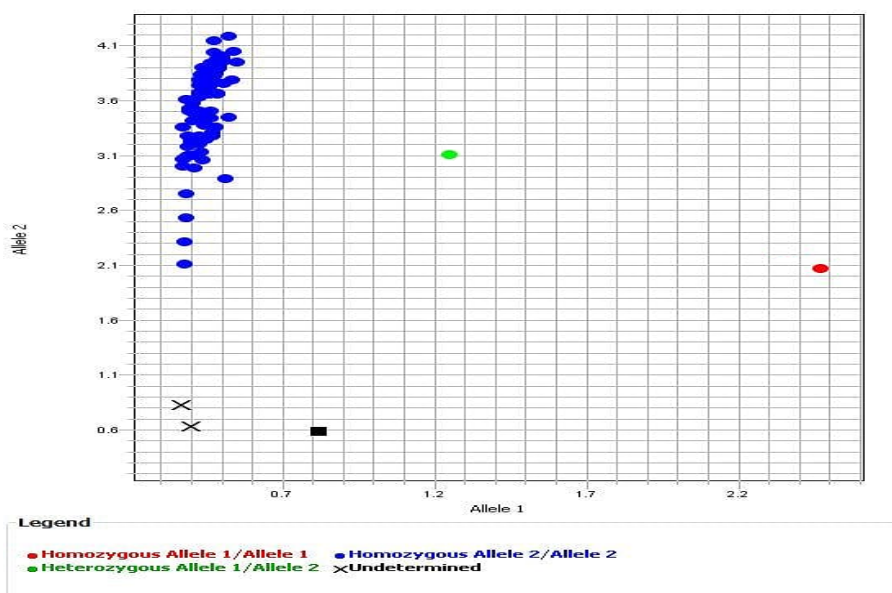
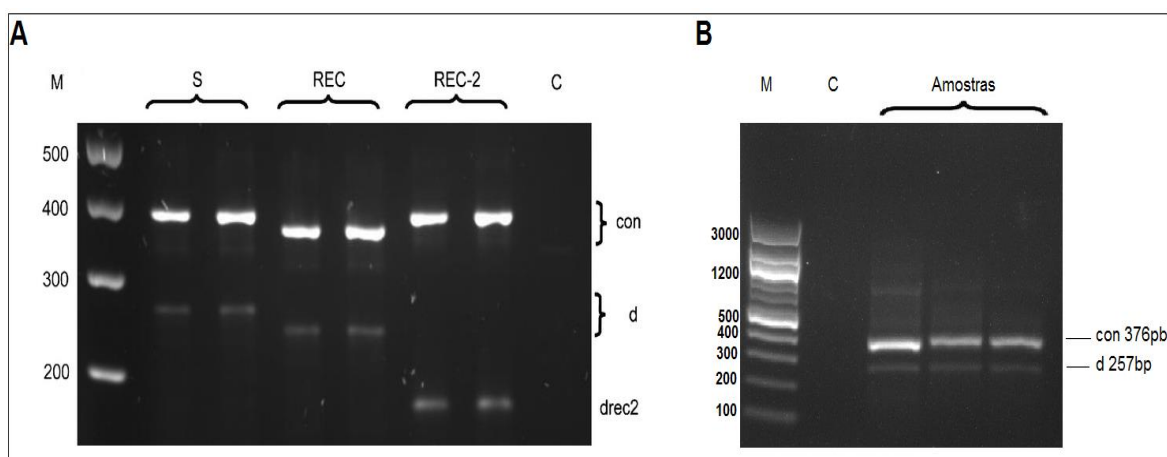


Figura 46 – Exemplo de ensaio de genotipagem do SNP G119S do gene *ace-1* de *Cx. quinquefasciatus* por qPCR TaqMan. Neste exemplo, mosquitos da população de Boa Vista. Cada círculo representa um indivíduo. Todos os indivíduos foram genotipados como homocigotos selvagem (119 G/G, em azul). Estão destacados os controles positivos 119 S/S (homocigoto mutante, em vermelho), 119 G/S (heterocigoto, em verde), além de amostras quem não amplificaram (X) e o controle negativo (quadrado negro).

#### 4.2.5. Genotipagem de variações no gene *maltase 1* de *Culex quinquefasciatus* (*cqm1*)

Todas as amostras foram adicionalmente utilizadas para investigação de variações no gene *cqm1* por PCR Multiplex e os fragmentos amplificados foram comparados com o perfil de fragmentos desenvolvido por Chalegre *et al* (2015) (Figura 47A). De acordo com este método, a reação deve amplificar fragmentos controles de 376 pb e 357 pb (referente ao alelo selvagem *cqm1* ou mutante *cqm1<sub>REC</sub>*), fragmentos diagnósticos de 257 e 238 pb que discriminam entre o alelo selvagem *cqm1* e mutante *cqm1<sub>REC</sub>*, respectivamente ou um fragmento único de 172 pb para o alelo mutante *cqm1<sub>REC-2</sub>*. Em todas as 744 amostras avaliadas apenas os fragmentos referentes ao alelo selvagem foram amplificados, de forma que as duas mutações específicas para resistência ao *L. sphaericus* não foram detectadas em nossa amostragem (Figura 47B).



**Figura 47 - Perfil de fragmentos do gene *cqm1* de *Cx. quinquefasciatus* por reação de PCR multiplex.** Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Nancy-520 [50x] (Sigma-Aldrich). Em (A) figura extraída de Chalegre *et al* (2015), exibindo em “con” referentes aos alelos *cqm1* ou *cqm1<sub>REC-2</sub>* (376 pb) e *cqm1<sub>REC</sub>* (357 pb); “d” fragmentos confirmatórios para *cqm1<sub>REC</sub>* (238 pb) e *cqm1* (257 pb); “*drec2*” fragmento de 172 pb discriminatório para o alelo mutante *cqm1<sub>REC-2</sub>*. Em (B), um exemplo do perfil observado para todas as amostras avaliadas, onde foram visualizados os fragmentos “con” de 376 e o “d” de 257 pb, caracterizando o alelo *cqm1* em homocigose. M = marcador molecular de 100 pb e C = controle negativo da reação de PCR.

#### 4.3 - Diversidade de *Wolbachia pipientis*

Uma avaliação na diversidade nos genes *wsp* e *ftsZ* foi utilizada para classificação da bactéria endossimbionte *W. pipientis* em supergrupos A ou B.

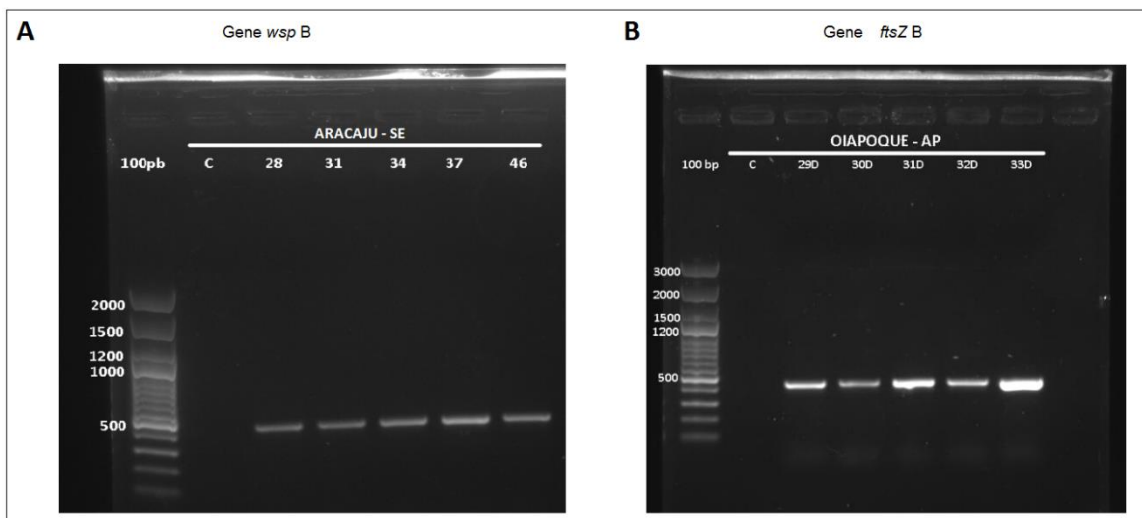
O diagnóstico foi obtido pela amplificação (ou ausência de amplificação), em reações específicas para cada um dos supergrupos A ou B, para ambos os genes. Portanto, todas as amostras foram avaliadas para as reações *wspA*, *ftsZA*, *wspB* e *ftsZB*.

Quase a totalidade das amostras analisadas amplificaram produto nas reações *wspB* e *ftsZB* (Figura 48), indicando que a *W. pipiensis* das amostras brasileiras de *Cx. quinquefasciatus* são em sua grande maioria do supergrupo B. Apenas quatro amostras da população de Caseara-TO não amplificaram em nenhuma das quatro reações, sugerindo ausência de infecção por *Wolbachia* (Figuras 49 e 50). A fim de averiguarmos a integridade do DNA destas amostras, testamos a amplificação do segmento IIS6 do *Nav*, o que revelou produto de tamanho esperado (Figura 50). Portanto, confirmamos a integridade do DNA, corroborando que aquelas amostras deviam ser livres de *W. pipiensis*. Em oito amostras de Recife (14,8%) e 18 de Campina Grande (45%) houve amplificação nas reações *wspA* e *ftsZA*, sugerindo copresença de *Wolbachia* do supergrupo A nestas amostras. Contudo, para a reação *wspA* o tamanho do produto esperado é de 577 pb (Zhou *et al* 1998) e estas amostras amplificaram algo em torno de 700 pb (Figura 51).

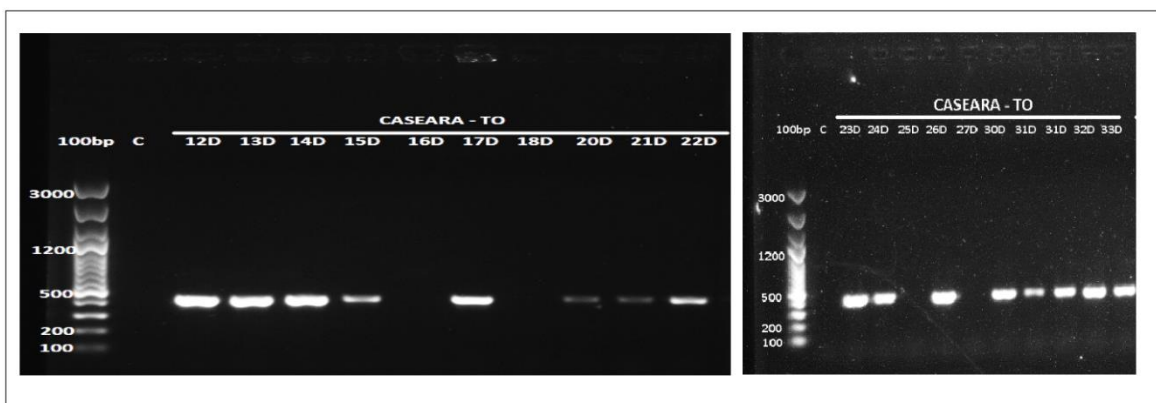
De fato, o anelamento dos *primers* aqui usados para *wspA* com a sequência KJ140133 (GenBank) de *W. pipiensis* super grupo A, extraída de *Cx. quinquefasciatus* da China (Nugapola *et al* 2017), indica uma região de 577 pb. A fim de confirmar a eficiência das reações *wspA* e *ftsZA*, utilizamos algumas amostras de *Aedes albopictus* (espécie que notoriamente apresenta *Wolbachia* do supergrupo A), que também amplificaram um produto de cerca de 700 pb na reação *wspA* (Figura 52A). Para a reação *ftsZA*, tanto aquelas nossas amostras de *Cx. quinquefasciatus* quanto essas de *Ae. albopictus* amplificaram produto entre 400 e 500 pb (Figura 52B), conforme esperado (432 pb).

Para testar a hipótese de contaminação de nossas amostras com pedaços do corpo de outros insetos provenientes das armadilhas de coleta, fizemos amplificação do gene *Nav* das amostras de *Cx. quinquefasciatus* que indicaram *W. pipiensis* do supergrupo A ou que não amplificaram nas reações para ambos os supergrupos. A análise das sequências permitiu descartar essa hipótese,

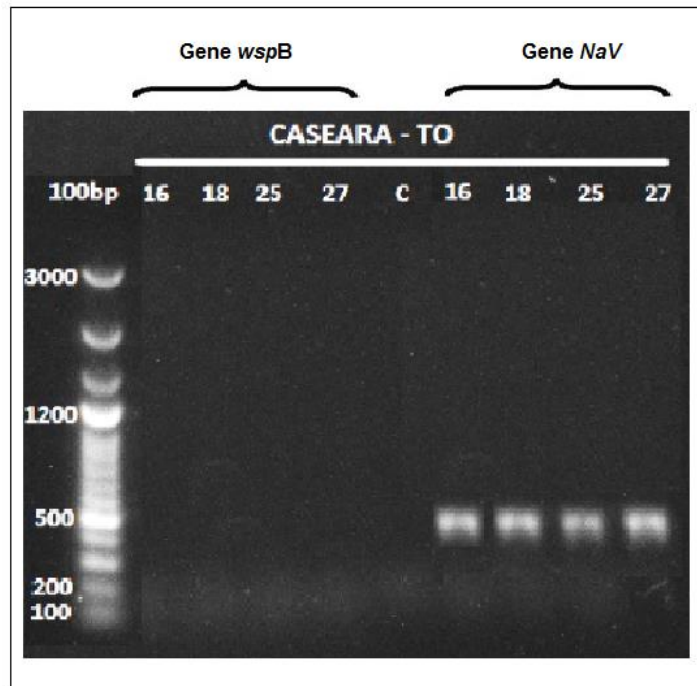
pois todas as sequências apresentaram alta identidade com os haplótipos do  $Nav$  de *Culex quinquefasciatus* identificados nesse trabalho (Anexo V).



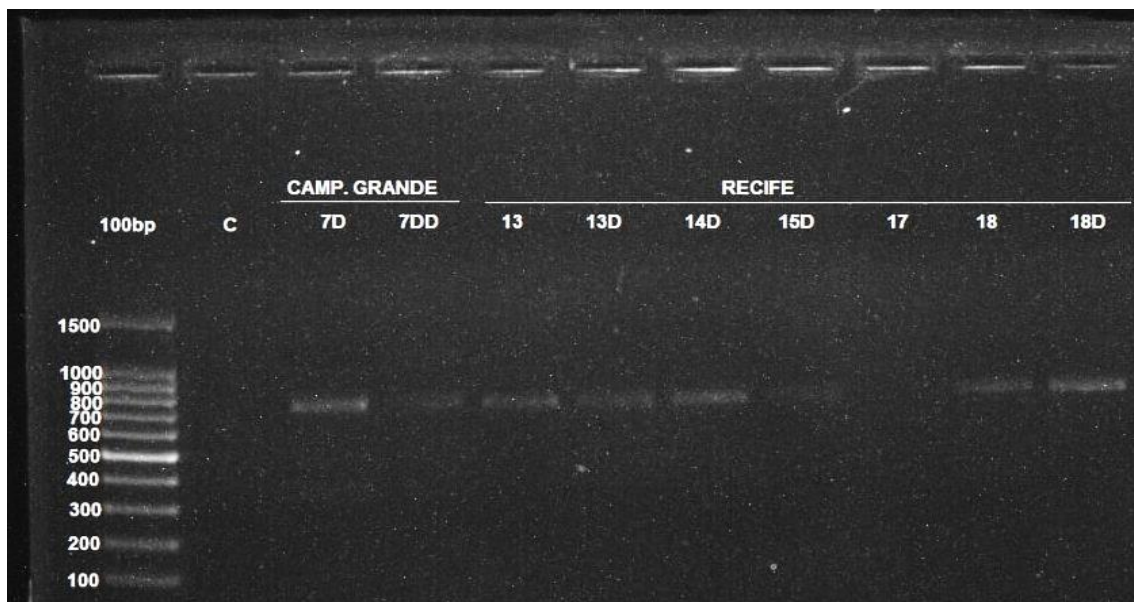
**Figura 48 - Amplificação de fragmentos dos genes *wspB* e *ftsZB*.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Nancy-520 [50x] (Sigma-Aldrich). Em (A), exemplo de amplificação do fragmento de 449 pb do gene *wspB* na população de Aracaju-SE. Em (B), exemplo de amplificação do fragmento de 432 pb do gene *ftsZB* na população de Oiapoque- AP. 100 pb – Marcador molecular, C – Controle negativo.



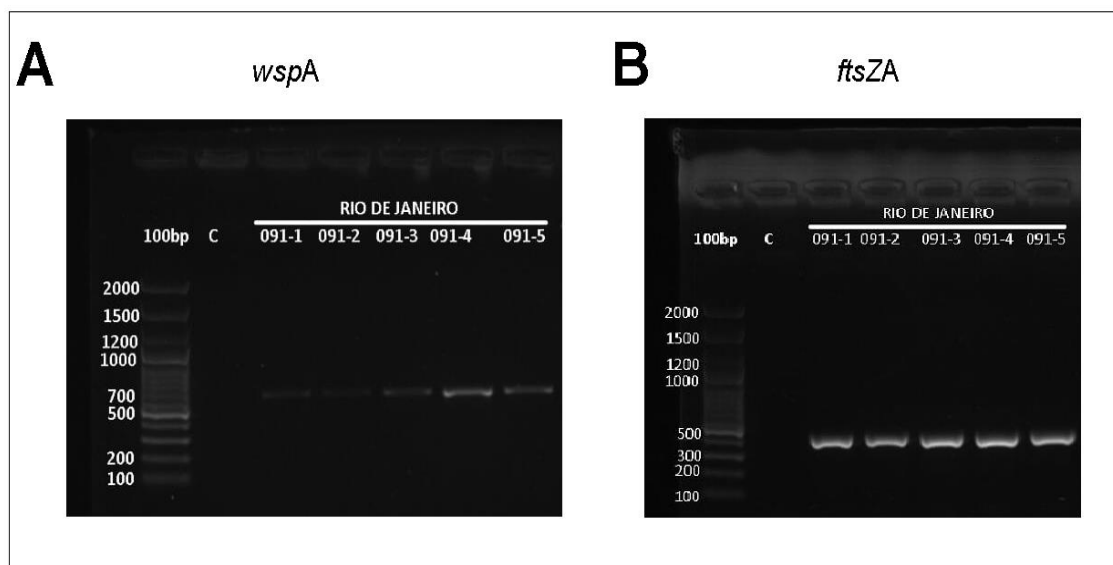
**Figura 49 - Amplificação de fragmento do gene *ftsZB* na população de Caseara-TO.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Nancy-520 [50x] (Sigma-Aldrich). Observe que não houve amplificação nas amostras 16D, 18D, 25D e 27D. 100 pb – Marcador molecular, C – Controle negativo.



**Figura 50 - Amplificação de fragmentos dos genes *wspB* e *Nav* em indivíduos da população de Caseara-TO.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Nancy-520 [50x] (Sigma-Aldrich). Observe que não houve amplificação para o gene *wspB*, porém o fragmento de 467 pb do gene *Nav* foi amplificado normalmente, indicando a boa qualidade do DNA. 100pb – Marcador molecular, C – Controle negativo.



**Figura 51 - Amplificação de fragmento do gene *wspA* em indivíduos Recife e Campina Grande.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Nancy-520 [50x] (Sigma-Aldrich). Houve amplificação de fragmento do gene *wspA*, porém o fragmento amplificado possui tamanho aproximado de 700 pb e não 577 pb, como esperado. 100pb – Marcador molecular, C – Controle negativo.



**Figura 52 - Amplificação dos genes do supergrupo A de *Wolbachia pipientis* em *Ae. albopictus* do Rio de Janeiro.** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com Nancy-520 [50x] (Sigma-Aldrich). Em (A), amplificação do fragmento de aproximadamente 700 pb do gene *wspA*. Em (B) amplificação do fragmento de 432 pb do gene *ftsZA*. 100pb – Marcador molecular, C – Controle negativo.



## 5. Discussão

Segundo a WHO (2016), os mosquitos são classificados como resistentes a inseticidas se apresentarem razão de resistência (RR) superior a 5 nos bioensaios com dose-resposta ou mortalidade inferior a 90% nos bioensaios com dose-diagnóstica. Nos ensaios do tipo dose diagnóstica com o inseticida temefós, a razão de resistência das linhagens IBEx e JPA não foi calculada devido ao fato de termos utilizado a linhagem de outra espécie (Rockefeller de *Aedes aegypti*) como controle interno. Entretanto, nesses ensaios, os valores de  $CL_{50}$  encontrados para as linhagens IBEx e JPA foram de 0,0032 e 0,0045, respectivamente. Esses resultados são similares aos de outras linhagens de *Cx. quinquefasciatus* utilizadas como referência em ensaios com temefós no Brasil (Campos & Andrade 2003; Amorim *et al* 2013), o que indica que essas linhagens de *Cx. quinquefasciatus* mantidas no LAFICAVE podem ser utilizadas como linhagens de referência para ensaios com o temefós. O perfil de suscetibilidade das linhagens IBEx e JPA também foi evidenciado nos ensaios dose-diagnóstica com outro inseticida organofosforado, o malathion. Porém, a linhagem JPA é classificada como “possível restência”, por ter apresentado mortalidade entre 90 e 98% à dose diagnóstica de malathion (0,8%). No entanto, esta dose utilizada era recomendada para *Ae. aegypti*. Como a dose recomendada para *Cx. quinquefasciatus* é mais de seis vezes maior (5%), de acordo com documento da WHOPEs atualizado em 2016 (WHOPEs, 2016), é necessário que se caracterize melhor as linhagens de laboratório com a dose atualmente recomendada. Em todo caso, pela alta mortalidade observada com 0,8%, é provável que essas linhagens sejam de fato susceptíveis ao malathion.

Nos ensaios dose-diagnóstica com o piretroide tipo II deltametrina, ocorreu o inverso: a dose atualmente indicada para deltametrina é de 0.025% para *Cx. quinquefasciatus*, ao passo que usamos o dobro (0,05%) (WHOPEs, 2016). Ambas as linhagens de laboratório foram classificadas como resistentes, apresentando mortalidade abaixo de 30%. Esses resultados são interessantes, pois essas linhagens são mantidas no LAFICAVE sem pressão com inseticidas desde 2002. Além disso, em 1994, há 26 anos, uma população de *Cx. quinquefasciatus* coletados em Benfica, a qual originou a colônia IBEx, havia

sido classificada como suscetível ao inseticida deltametrina (CL<sub>50</sub>: 0,0009 mg/L, RR= 3.2) (González *et al* 1999).

Em 2002, ano em que ambas as colônias foram coletadas, o município do Rio de Janeiro passava por uma de suas maiores epidemias de dengue, com mais de 80 mil casos confirmados da doença (Casali *et al* 2004). Durante esse período (anos 2001 e 2002), houve um intenso uso de inseticidas piretroides para o combate ao *Aedes aegypti* no município. Além dos que foram utilizados pela prefeitura, houve também a contratação por parte de condomínios particulares, de empresas privadas para a aplicação de “fumacê” e maior utilização de inseticidas domésticos (Penna 2003). Tais ações podem ter selecionado, de forma indireta, *Culex quinquefasciatus* resistentes que foram coletados pelo LAFICAVE para criação das colônias.

Nos ensaios moleculares dessas linhagens foi identificado o alelo *kdr* em heterozigose na linhagem JPA (veja a tabela 10), entretanto, a frequência da mutação nessa linhagem foi baixa (0,010) e a substituição L1014F não foi encontrada na linhagem IBEx, o que nos permite supor que essa mutação não deve ser responsável pelo perfil de resistência a deltametrina encontrados nos ensaios. É provável que o perfil de resistência dessas linhagens seja resultado da alteração de outro mecanismo, como detoxificação enzimática por exemplo. Bioensaios com uso de sinergistas, como o PBO (piperonil butóxido) por exemplo, podem ajudar a elucidar se há envolvimento de enzimas relacionadas à resistência metabólica (Medeiros 2011).

Arensburger *et al* (2010), ao analisarem todo o genoma de *Cx. quinquefasciatus*, observaram que a espécie possui 18.883 genes que codificam proteínas. Esse número é 22% maior do que o de *Ae. aegypti* (15.449 genes) e 52% maior do que o de *An. gambiae* (12.457 genes). Além disso, observaram que *Cx. quinquefasciatus* apresenta expansão de múltiplas famílias gênicas, incluindo os genes associados com detoxificação metabólica. De fato, o grande repertório de enzimas P450 em *Cx. quinquefasciatus* tem sido evidenciado com um papel significativo na resistência a inseticidas piretroides (Kasai *et al* 2000; Komagata *et al* 2010).

As análises das sequências do *Nav* de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de Boa Vista, Cáceres, Campina Grande, Caseara, Cuiabá e Recife evidenciaram baixa diversidade, com 14 haplótipos e apenas uma substituição não sinônima, correspondente à mutação *kdr*. O agrupamento desses haplótipos em dois clados se deve a variações em blocos no íntron. Interessantemente, estes dois clados são separados por alta variabilidade, mas as sequências de cada clado são bastante similares entre si (Anexo III).

A baixa diversidade do *Nav* é esperada, uma vez que o gene *Nav* é classificado como altamente conservado entre os insetos, apresentando mais de 88.6% de similaridade entre as sequências de éxons em Diptera (Silva & Scott 2019). Pouco se sabe sobre a frequência da mutação *kdr* em *Cx. quinquefasciatus* do Brasil. Nesse trabalho, a clássica mutação *kdr* L1014F foi identificada em baixa frequência nas populações de Boa Vista-RO, Cáceres-MT e Manaus-AM (veja a tabela 8). Um estudo prévio já havia identificado a ocorrência desta mutação também em baixas frequências, nas localidades de Campo Grande/MS (0.01), Rio de Janeiro/RJ (0.03), Niterói/RJ (0.06) e Belo Horizonte/MG (0.03) (Muniz 2015).

As análises das sequências do gene *ace-1* de *Cx. quinquefasciatus* provenientes das suas linhagens de laboratório e das localidades de Boa Vista, Cáceres, Campina Grande, Cuiabá, Foz do Iguaçu e Recife evidenciaram alta diversidade com a existência de 39 haplótipos, sendo o haplótipo *ace-1\_1*, o mais frequente nas linhagens de laboratório (veja a Figura 41). Essa alta diversidade encontrada nesse trabalho corrobora com outros trabalhos que avaliaram a diversidade do gene *ace-1* em *Anopheles gambiae* (Elanga-Ndille *et al* 2019), *Culex pipiens* (Alout *et al* 2009) e *Cx. quinquefasciatus* do Brasil (Longo 2016). A mutação G119S, que confere resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos, foi identificada na população de Foz do Iguaçu na frequência de 0,035 (veja a tabela 9). No Brasil, essa mutação já foi identificada em baixa frequência em *Culex quinquefasciatus* do Rio Janeiro (Longo 2016), São Paulo/SP (0.12-0.17) (Bracco *et al* 1999) e Recife/PE (0,11) (Weill *et al* 2003; Amorim *et al* 2013). A associação com resistência a inseticidas não foi evidenciada para nenhuma das demais mutações identificadas (A018V, D029E, P091L, S119\*, V099M, A109T, G247S, A253V, A264T, E290K).

A ausência dos alelos de resistência *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* em todas as populações avaliadas neste estudo pode indicar inexistência ou frequência muito baixa destes nas populações de campo, incluindo a população de Recife, onde esses mesmos alelos já foram detectados (Menezes *et al* 2016). Esses resultados podem ser justificados pela baixa pressão de seleção com o inseticida nas últimas décadas. Apesar de algumas formulações de *L. sphaericus* serem eficientes também para o controle de *Ae. aegypti* (Santana-Martinez *et al* 2018), esse inseticida geralmente não é utilizado nos programas de controle do vetor e sua utilização no controle de *Cx. quinquefasciatus* foi mais acentuada na década de 1990, durante os programas de eliminação da filariose (Regis *et al* 1995, Silva-Filha *et al* 1995). Após esse período, foi usado pontualmente para o controle de *Cx. quinquefasciatus* em São Paulo (Andrade *et al* 2007) e em combinação com o *Bti* para o controle de *Culex* e *Aedes* no Recife (Santos *et al* 2018). Entretanto, vale salientar que existem outras mutações que não foram avaliadas nesse trabalho e que também conferem resistência ao *L. sphaericus* (Chalegre *et al* 2009; 2012). Além disso, há registro de populações altamente resistentes ao *L. sphaericus* e que não possuem mutações no gene *cqm1*, porém com mecanismos ainda desconhecidos (Nielsen-Leroux *et al* 2002). Todos os dados publicados até o momento sobre resistência a inseticidas em populações de *Cx. quinquefasciatus* do Brasil foram reunidos em uma revisão publicada no periódico *Parasites & Vectors* (Lopes 2019), disponível no anexo I.

Na tentativa de contornar a seleção de mosquitos resistentes a inseticidas, os programas de controle vetorial têm apostado em estratégias alternativas de controle, como por exemplo a utilização de *Wolbachia*. *Wolbachia* é uma bactéria endossimbionte bastante diversa e, até o momento, o gênero é dividido em pelo menos 16 supergrupos reconhecidos (A-Q). Entretanto, apenas os supergrupos A e B são encontrados em mosquitos (Glowska *et al* 2015; Moreira *et al* 2019). A maioria dos insetos abriga apenas um desses dois supergrupos, porém a ocorrência de superinfecção já foi registrada para algumas espécies, como *Ae. albopictus* e *Cx. vishnui* Theobald, 1901 (Kittayapong *et al* 2000). Superinfecção é o termo utilizado quando duas ou mais linhagens de *Wolbachia* são encontradas em um mesmo indivíduo (Sinkins *et al* 1995). Esse fenômeno permite a recombinação gênica entre os supergrupos, aumentando

sua diversidade e a possibilidade de ocorrência de incompatibilidade citoplasmática (Duron *et al* 2005; Walker *et al* 2008). Em *Cx. quinquefasciatus*, é consenso de que apenas *Wolbachia* do supergrupo B ocorre na espécie (Klasson *et al* 2008).

Dadas a distribuição de *Cx. quinquefasciatus* por todo o território nacional, que tem proporções contínuas, avaliamos se há presença apenas de *Wolbachia* do tipo B em nossa amostragem. De fato, a grande maioria dos mosquitos avaliados possuíam somente *Wolbachia* do supergrupo B, o que corrobora com outros estudos (Almeida 2008; Morais *et al* 2012). No entanto, quatro indivíduos da população de Caseara – TO não estavam infectados por *Wolbachia*. Além disso, em 26 indivíduos de Campina Grande (18) e Recife (8), amplificamos fragmentos dos genes *ftsZ* e *wsp* de ambos os supergrupos (A e B), o que nos indica a presença de superinfecção nesses espécimes. Estamos realizando a clonagem e sequenciamento desses indivíduos para verificar essa hipótese. Caso se confirme, este será o primeiro registro de superinfecção em *Culex quinquefasciatus*.

Indivíduos naturalmente não infectados por *Wolbachia* já foram registrados para *Cx. quinquefasciatus* (Rasgon & Scott 2003) e *Ae. albopictus* (Albuquerque 2011). A ocorrência de indivíduos naturalmente não infectados é justificada por uma falha na transmissão materna de *Wolbachia* para a prole devido a variações ambientais, como temperatura (Clancy & Hoffmann 1998; Kittayapong *et al* 2002). Alguns estudos também indicam que a exposição prolongada a inseticidas, seguida de seleção de alelos resistentes e superprodução de enzimas de detoxificação exercem impacto no *fitness* do mosquito, comprometendo a capacidade do inseto de controlar a densidade de *Wolbachia* (Berticat *et al* 2002; Echaubard *et al* 2010). No caso de Caseara, no entanto, resistência a inseticidas não deve ser o caso, uma vez que esta localidade é uma das raras encontradas no Brasil aonde *Ae. aegypti* é susceptível a inseticidas (Sá *et al* 2019).

O uso de inseticidas ainda é uma estratégia muito utilizada no controle de vetores, porém a sua aplicação reduz a variabilidade genética da população ao mesmo tempo que seleciona indivíduos naturalmente resistentes aos compostos utilizados (Guillemaud *et al* 1996). As árvores filogenéticas do *Na<sub>v</sub>* e *ace\_1*

indicam baixa estruturação genética do *Culex quinquefasciatus*, assim como outros estudos realizados com essa espécie no Brasil (Wilke *et al* 2014; Morais 2011, Morais *et al* 2012; Carvalho 2017). Entretanto, pretendemos realizar a análise de 12 loci de microssatélites para uma avaliação populacional mais precisa.

O fenótipo de resistência controlado pelas mutações identificadas nesse estudo ocorre apenas quando os alelos mutantes são encontrados em homozigose. Tal característica faz com que essas mutações demorem a se estabelecer nas populações do vetor, sendo geralmente encontradas em baixa frequência. Porém, quando os alelos mutantes atingem certa frequência, definida pela WHO (2012) como *tipping point*, a presença desses alelos aumenta de forma exponencial quando expostos aos inseticidas, tendendo a fixação. Portanto é importante que se faça um monitoramento dos alelos *kdr* e *ace-1<sup>R</sup>* enquanto estão em baixa frequência e antes que alcancem o *tipping point*, possibilitando dessa forma, o controle efetivo do *Cx. quinquefasciatus* no país.

## 6. Conclusão

- As linhagens de laboratório JPA E IBEx são suscetíveis aos organofosforados temefós e malathion e resistentes ao piretroide deltametrina. Ambas podem ser utilizadas como referências para bioensaios com temefós. Outros mecanismos, distintos da clássica mutação *kdr* L1014F podem estar presentes nestas linhagens.
- A mutação L1014F no gene *Nav* foi identificada na linhagem JPA e nas populações de Boa Vista, Cáceres e Manaus em baixa frequência. A mutação G119S no gene *ace-1* foi encontrada apenas na população de Foz do Iguaçu e, com relação ao gene *cqm1*, os alelos mutantes *cqm1<sub>REC</sub>* e *cqm1<sub>REC-2</sub>* não foram identificadas em nenhuma população avaliada no estudo.
- A maioria dos mosquitos avaliados (96%) estavam infectados somente por *Wolbachia* do supergrupo B, 4 indivíduos de Caseara não estavam infectados e 26 de Campina Grande e Recife estavam superinfectados (coexistência dos supergrupos A e B).

## 7. Perspectivas

- Dar continuidade a amplificação de 12 *loci* de microssatélites com todas as populações coletadas para a realização de análises de genética populacional.
- Clonar e sequenciar os fragmentos dos genes *wsp\_A* e *ftsZ\_A* para confirmarmos a superinfecção por *Wolbachia* nos mosquitos de Campina Grande e Recife.



## 8. Referências

- Albuquerque AL de. Diversidade genética de *Wolbachia pipientis* em populações de culicídeos vetores e no parasito *Wuchereria bancrofti*. [Tese] Doutorado em Saúde Pública - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. 2011; 104pp. Disponível em: <<http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2011albuquerque-al.pdf> > Acesso em: 15/07/2016
- Allen ML, Christensen BM. Flight muscle-specific expression of act88F: GFP in transgenic *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitol Int.* 2004; 53(4):307–314.
- Allen ML, David DA, Atkinson PW, Levesque CS. Stable, germ-line transformation of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2001; 38(5):701– 710
- Almeida F. Análise comparativa de *Culex quinquefasciatus* infectados e não infectados por *Wolbachia pipientis*. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2008; 43pp. Disponível em: <[https://teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-23092008135532/publico/FabioAlmeida\\_Mestrado.pdf](https://teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-23092008135532/publico/FabioAlmeida_Mestrado.pdf)> Acesso em: 13/05/2019
- Almeida RP, Stouthamer R. Phylogeny of the *Trichogramma* endosymbiont *Wolbachia*, an alpha-proteobacteria (Rickettsiae). *Braz J Biol.* 2017; 78(3):421–428. doi:10.1590/1519-6984.166671
- Alout H, Berthomieu A, Cui F, Tan Y, Berticat C, Qiao C, Weill M. Different amino-acid substitutions confer insecticide resistance through acetylcholinesterase 1 insensitivity in *Culex vishnui* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) from China. *J Med Entomol.* 2007; 44(3): 463–469. doi:10.1093/jmedent/44.3.463
- Alout H, Labbé P, Berthomieu A, Pasteur N, Weill M. Multiple duplications of the rare ace-1 mutation F290V in *Culex pipiens* natural populations. *Insect Biochem Mol Biol.* 2009; 39(12): 884–891. doi:10.1016/j.ibmb.2009.10.005
- Alphey L, Andreasen M. Dominant lethality and insect population control. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 2002; 121(2), 173–178. doi:10.1016/s0166-6851(02)00040-3
- Alphey L. Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem Mol Biol.* 2002; 32(10):1243–7. DOI: 10.1016/S0965-1748(02)00087-5
- Amorim LB, Helvecio E, Oliveira CMF de, Ayres CFJ. Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide temephos

in Pernambuco, Brazil. *Pest Management Science*, 2013; 69(12):1307-1314. doi:10.1002/ps.3502

Andrade CFS, Campos JC, Cabrini I, Marques Filho CAM, Hibi S. Suscetibilidade de populações de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) sujeitas ao controle com *Bacillus sphaericus* Neide no rio Pinheiros, São Paulo. *BioAssay*. 2007;2:1–4.

Andrade CFS, Santos LU. O uso de predadores no controle biológico de mosquitos, com destaque aos *Aedes*. Campinas: UNICAMP, 2004. 33 p.

Anon. Oh, New Delhi; oh, Geneva. *Nature* 1975; 256:355 -357

Arai H, Hirano T, Akizuki N, Abe A, Nakai M, Kunimi Y, Inoue MN. Multiple Infection and Reproductive Manipulations of *Wolbachia* in *Homona magnanima* (Lepidoptera: Tortricidae). *Microbial Ecology*. 2019; 77(1):257-266. doi:10.1007/s00248-018-1210-4

Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR, Kramer KJ. Laccase 2 is the phenoxidase gene required for beetle cuticle tanning. *P Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 11337–11342.

Araújo CRM, Santos VL dos A, Gonsalves AA. Acetilcolinesterase - AChE: uma enzima de interesse farmacológico. *Rev Virtual Quim*. 2016; 8(6): 1818-1834.

Arensburger P, Megy K, Waterhouse RM, Abrudan J, Amedeo P, Antelo B, Bartholomay L, Bidwell S, Caler E, Camara F, Campbell CL *et al*. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science*. 2010; 330(6000):86–88. doi:10.1126/science.1191864

Arshad A, Chowdhury MA, Hossain MI, Ul-Ameen M, Habiba DB, Aslam AFM. Laboratory evaluation of selected larvicides and insect growth regulators against field collected *Culex quinquefasciatus* larvae from urban Dhaka, Bangladesh. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc*. 1999; 15(1): 43-47.

Atkins WM, Wang RW, Bird AW, Newton DJ, Lu AHW. (1993) The catalytic mechanism of glutathione S-transferase (GST): spectroscopic determination of the pKa of Tyr-9 in rat alpha 1–1 GST. *J Biol Chem*. 1993; 268: 19188–11991.

Awolola TS, Oduola OA, Strode C, Koekemoer LL, Brooke B, Ranson, H. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto from Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009; 103(11): 1139–1145. doi:10.1016/j.trstmh.2008.08.021

Ayad H, Georghiou GP. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity to acetylcholinesterase. J Econ Entomol. 1975; 68:295–297.

Ayres CFJ, Guedes DRD, Paiva MHS, *et al.* Zika virus detection, isolation and genome sequencing through Culicidae sampling during the epidemic in Vitória, Espírito Santo, Brazil. Parasit Vectors. 2019; 12:220. doi:10.1186/s13071-019-3461-4.

Azevedo FJ, Uchôa F de T, Costa TD. P-glycoprotein role on drug pharmacokinetics and interactions. Rev Bras Farm. 2009; 90(4):321-326.

Azevedo R, Dobbin JE. Filariose (*W. bancrofti*) no grupo residencial do IAPB no bairro dos Afogados (Recife). Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães. 1952; 1: 157-162.

Balabanidou V, Grigoraki L, Vontas J. Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. Curr Opin Insect Sci. 2018; 27, 68–74. doi:10.1016/j.cois.2018.03.001

Balabanidou V, Kampouraki A, MacLean M, Blomquist GJ, Tittiger C, Juárez MP, *et al.* Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci. 2016; 113(33): 9268–9273. doi:10.1073/pnas.1608295113

Balaji S, Jayachandran S, Prabakaran SR. Evidence for the natural occurrence of *Wolbachia* in *Aedes aegypti* mosquitoes. FEMS Microbiol Lett. 2019; 366(6): fnz055. doi:10.1093/femsle/fnz055

Baldo L, Bordenstein S, Wernegreen JJ, Werren JH. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. Mol Biol Evol. 2006; 23(2):437–449. doi:10.1093/molbev/msj049

Baldo L, Lo N, Werren JH. Mosaic Nature of the *Wolbachia* Surface Protein. J Bacteriol. 2005; 187(15):5406–5418. doi:10.1128/jb.187.15.5406-5418.2005

Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol Biol Evol, 1999; 16(1):37–48. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036

Bangy H, Sabuni IB, Tonn RJ. Mosquito control service in Tanzania. III. The effects of mosquito control and urbanization on mosquito population in Dar es Salaam, from 1954 to 1971. Document WHO/ VBC173.440. 1973.

Bates M. The Natural History of Mosquitoes. Macmillian Company. New York, NY. 1949; 379 pp.

Baumann P, Unterman BM, Baumann L, Broadwell AH, Abbene SJ, Bowditch RD. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. J Bacteriol. 1985; 163(2):738-747.

Becker N, Margalit J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies, p. 147-170. In Entwistle P, Cory J, Bailey MJ & Higgs S (ed.), *Bacillus thuringiensis: an environmental biopesticide*, John Wiley & Sons, Ltd. 1993.

Becker N. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles JF, Delécluse A, LeRoux CN. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2000. p 383-98.

Beckmann JF, Bonneau M, Chen H, Hochstrasser M, Poinot D, Merçot H, Weill M, Sicard M, Charlat S. The toxin-antidote model of cytoplasmic incompatibility: genetics and evolutionary implications. Trends Genet. 2019; 35, 175-185.

Belinato TA, Martins AJ, Lima JBP, Valle D. Effect of triflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* under laboratory conditions: Culicidae). Parasit Vectors. 2013; 6: 83.

Belkin JN. The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae) Univ of California Press, 1962; 1:608.

Bentley MD, Day JF. Chemical ecology and behavioral aspects of mosquito oviposition. Annu Rev Entomol. 1989; 34:401-421.

Bergé J, Feyereisen R, Amichot M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. Philos T R Soc B: Biological Sciences. 1998; 353(1376): 1701-1705. doi:10.1098/rstb.1998.0321

Berticat C, Bonnet J, Duchon S, Agnew P, Weill M, Corbel V. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. BMC Evol Biol. 2008; 8(1):104. doi:10.1186/1471-2148-8-104

Berticat C, Duron O, Heyse D, Raymond M. Insecticide resistance genes confer a predation cost on mosquitoes, *Culex pipiens*. Genet Res. 2004; 83(3):189-96. doi: 10.1017/S0016672304006792.

Berticat C, Rousset F, Raymond M, Berthomieu A, Weill M. High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. Proc Royal Soc Lond B. 2002; 269(1498):1413–1416. doi:10.1098/rspb.2002.2022

Bhattacharya S, Basu P. The Southern House Mosquito, *Culex quinquefasciatus*: profile of a smart vector. J Entomol Zool Stud. 2016;4:73-81.

Bhattacharya S, Chakraborty S, Mitra AK, Ghosh KK, Das S, Chakraborty MS *et al*. Blood meal analysis of certain species of mosquitoes of rural West Bengal. Bull Cal Sch Trop Med. 1982; 30(2):43-45.

Bisset JA, Rodriguez MM, Diaz C, Ortiz E, Marquetti MC, Hemingway J. The mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Cuba. Bull Entomol Res. 1990; 80(3): 245-250. doi:10.1017/s0007485300050434

Bisset JA, Rodriguez MM, Hemingway J, Diaz C, Small GJ, Ortiz E. Malathion and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba: efficacy of pirimiphos-methyl in the presence of at least three resistance mechanisms. Med Vet Entomol. 1991; 5(2): 223–228. doi:10.1111/j.1365-2915.1991.tb00544.x

Blomquist GJ, Bagnères AG. Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology (Cambridge University Press, Cambridge, UK). 2010. ISBN-13978-0-511-71256-2.

Bloomquist JR, Adams PM, Soderlund DM. Inhibition of 3,-aminobutyric acid-stimulated chloride flux in mouse brain vesicle by polychlorocycloalkane and pyrethroid insecticides. NeuroToxicology. 1986; 7:11-20.

Bonfim C, Netto MJE, Pedroza D, Portugal JL, Medeiros Z. A socioenvironmental composite index as a tool for identifying urban areas at risk of lymphatic filariasis. Trop Med Intern Health. 2009;14(8):877-84. DOI:10.1111/j.1365-3156.2009.02317.x

Boonyuan W, Bangs MJ, Grieco JP, Tiawsirisup S, Prabaripai A, Chareonviriyaphap T. Excito-Repellent Responses between *Culex quinquefasciatus* Permethrin Susceptible and Resistant Mosquitoes. J Insect Behav. 2016; 29(4): 415–431. doi:10.1007/s10905-016-9570-4

Boonyuan W, Sathantriphop S, Tainchum K, Muenworn V, Prabaripai A, Bangs M J, Chareonviriyaphap T. Insecticidal and behavioral avoidance responses of *Anopheles minimus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to three synthetic repellents. J Med Entomol. 2017; 54(5):1312–1322. doi:10.1093/jme/tjx081

Borden MA, Buss EA, Brown SGP, Dale AG. Natural Products for Managing Landscape and Garden Pests in Florida<sup>1</sup>. Technical Report. University of Florida. 2018; 13. Disponível em: < <https://www.researchgate.net/publication/327895279> > Acesso em: 07/06/2019

Borges VAR. Evaluation of *Culex quinquefasciatus* gnat infestation surrounding the Palmeiras River, in the municipality of Pratápolis (MG). *Ciência et Praxis*.2014; 7(14):31-34.

Bourguet D, Pasteur N, Bisset J, Raymond M. Determination of Ace.1 genotypes in single mosquitoes: toward an ecumenical biochemical test. *Pestic. Biochem. Physiol.*1996b; 55: 122e128.

Bourguet D, Raymond M, Fournier D, Malcolm CA, Toutant J-P, Arpagaus, M. Existence of Two Acetylcholinesterases in the Mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Neurochem.*1996a; 67(5):2115–2123. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.67052115.x

Bouyer J, Chandre F, Gilles J, Baldet T. Alternative vector control methods to manage the Zika vírus outbreak: More haste, less speed. *Lancet Glob. Health* 2016, 4: e364.

Braga IA, Lima JBP, Soares S da S, Valle D. (2004). *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(2):199–203. doi:10.1590/s0074-02762004000200015

Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol.* 1998; 180(9): 2373-2378.

Bram RA. Contribution to the mosquito fauna of South East Asia II. The genus *Culex* in Thailand (Diptera: Culicidae). *Contributions of the American Entomological Institute* 1967; 2(1):1-296.

Brasil. Controle integrado de vetores da dengue. 2018. Disponível em: <<https://www.indaiatuba.sp.gov.br/download/10697/>> Acesso em: 19/03/2019

Brasil. Força-tarefa tenta acabar com proliferação de mosquito no Rio Pinheiros. Copyright © Abril Mídia S. A. Revista Veja. 2018. Disponível em: <<https://vejasp.abril.com.br/cidades/forca-tarefa-tenta-acabar-com-proliferacao-de-mosquito-no-rio-pinheiros/>> Acesso: 12/07/2019.

Brasil. Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação

Francisco Anilton Alves Araújo, Marcelo Santa Lucia. – 3ª ed. – Brasília: Ministério da Saúde. 2011;76.

Brasil. Infestação de pernilongos no Rio Pinheiros mobiliza gestão Doria. Copyright © Abril Mídia S. A. Revista Veja. 2017. Disponível em: <<https://veja.abril.com.br/brasil/infestacao-de-pernilongos-no-rio-pinheiros-mobiliza-gestao-doria/>> Acesso: 12/07/2019

Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia de Agrotóxicos. E24 – Espinosade. 2008. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/E24%2B%2BEspinosade\\_novo.pdf/00739bf6-b23f-4f9c-864c-b51a25ef0972](http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/E24%2B%2BEspinosade_novo.pdf/00739bf6-b23f-4f9c-864c-b51a25ef0972)> Acesso em: 09/06/2019

Brasil. Ministério da Saúde. Controle de Vetores: Inseticidas recomendados. 2019. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/controle-de-vetores>> Acesso em: 02/05/2019

Brasil. Ministério da Saúde. Controle de vetores: procedimentos de segurança. Brasília, DF, 2001. 121 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Orientações técnicas para a utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle de *Aedes aegypti*. 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/15/Instru----es-para-uso-de-pyriproxifen-maio-2014.pdf>> Acesso em: 12/05/2019

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Recomendações para uso do larvicida Novaluron para controle de *Aedes aegypti*. 2009. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/28/Instru----es-para-emprego-no-Novaluron.pdf>> Acesso em: 12/07/2019

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Departamento Técnico-Normativo. Divisão de Meio Ambiente e Ecologia Humana. Organização Pan-Americana de Saúde. Manual de Vigilância da Saúde de Pessoas Expostas a Agrotóxicos. Brasília, 1996; 69p.

Brasil. Resolução nº 226 de 28/09/2004 / ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2004 Disponível em: <<https://www.diariodasleis.com.br/legislacao/federal/65355-proibe-o-uso-de-organofosforado-clorpirifus-em-formulaes-de-desinfestantes-domissanituarios.html>> Acesso em: 28/05/2019

Brasil. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Marta Nóbrega Martinez. Portaria Nº11, DE 8 de janeiro de 1998. Disponível em: <[http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/prop\\_mostrarintegra;jsessionid=F540106D5CD1777FB30619F3F2D6FD4A.node1?codteor=620544&filename=Avulso+-PL+4336/2008](http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra;jsessionid=F540106D5CD1777FB30619F3F2D6FD4A.node1?codteor=620544&filename=Avulso+-PL+4336/2008)> Acesso em: 18/04/2019

Brasil. Portaria nº 329, Ministério da Agricultura e Abastecimento: Brasília, 1985.  
Brogdon WG, McAllister JC. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis.* 1998 ;4(4):605-613

Brunhes J. La filariose de Bancroft dans la sous- région malgache (Comores-Madagascar-Réunion). *Mém ORSTOM*, Paris 1975; 81: 212 pp.

Bruno DW, Laurence BR. The influence of the apical droplet of *Culex* egg rafts on oviposition of *Culex pipiens fatigans* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 1979; 16:300-305.

Burke R, Barrera R; Lewis M, Kluchinsky T, Claborn D. Septic tanks as larval habitats for the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Playa-Playita, Puerto Rico. *Med Vet Entomol* 2010; 24: 117–123.

Camargo Said RF do, Croda JHR. Nota Informativa Nº 77/2019-CGPNCMD/DEVIT/SVS/MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis Coordenação-Geral dos Programas Nacionais de Controle e Prevenção da Malária e das Doenças Transmitidas pelos *Aedes*. 2019. Disponível em: <[http://www.consultaesic.cgu.gov.br/busca/dados/Lists/Pedido/Attachments/753821/REPOSTA\\_PEDIDO\\_NOTA%20INFORMATIVA%20N%2077%20CGPNCMD.pdf?Mobile=1](http://www.consultaesic.cgu.gov.br/busca/dados/Lists/Pedido/Attachments/753821/REPOSTA_PEDIDO_NOTA%20INFORMATIVA%20N%2077%20CGPNCMD.pdf?Mobile=1)> Acesso em: 08/06/2019

Camougis G. Mode of action of pyrethrum on arthropod nerves. In *Pyrethrum. The Natural Insecticide* (edited by Casma J. E.). Academic Press, New York.1973; 211-222.

Campos J, Andrade CFS. Larval susceptibility of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations to chemical insecticides. *Rev Saúde Pública* 2003; 37(4):523-7.

Carlson J, Suchman E, Buchatsky L. Dengviruses for Control and Genetic Manipulation of Mosquitoes. *Insect Viruses: Biotechnological Applications.* 2006; 68: 361–392. doi:10.1016/s0065-3527(06)68010-x



Carraro LR. Avaliação de eficiência do novaluron e do spinosad para controle de larvas de *Culex quinquefasciatus* sp. na água do Rio Pinheiros de São Paulo-SP. [Monografia] [Internet]. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências. 2013; 14pp. Disponível em: <<https://ib.rc.unesp.br/Home/Pesquisa58/CEIS-CentrodeEstudosdeInsetosSociais/t6-avaliacao-de-eficiencia-do-novaluron-e-do-spinosadpara-controle-de-larvas-de-culex-quinquefasciatusspna-agua-do-rio-pinheiros-de-sao-paulo-sp.pdf>> Acesso em: 09/06/2019

Carson RL. Historical context of DDT. 1962 Disponível em <<http://15743117.weebly.com/historical-context-of-ddt.html>> Acesso em 12/06/2019.

Carvalho DO, McKemey AR, Garziera L, Lacroix R, Donnelly CA, Alphey L, Malavasi A, Capurro ML. Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(7): e0003864. doi:10.1371/journal.pntd.0003864

Carvalho GC. Análise da estrutura populacional de mosquitos *Culex quinquefasciatus* e *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) utilizando marcadores de microssatélites e análise de morfometria geométrica alar. [Tese] Pós-Graduação em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, 2017, 119pp.

Casali CG, Pereira MRR, Santos LMJG, Passos MNP, Fortes B de PMD, Ortiz Valencia LI, Alexandre A de J, Medronho R de A. (2004). A epidemia de dengue/dengue hemorrágico no município do Rio de Janeiro, 2001/2002. Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37(4): 296-299. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822004000400002>

Catterall WA. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1992; 72:15–48. doi:10.1152/physrev.1992.72.suppl\_4.s15

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Centro Regional da Convenção de Estocolmo sobre POPs para a América Latina e Caribe. Introdução a convenção de Estocolmo sobre poluentes orgânicos persistentes: Histórico e legislação de poluentes orgânicos persistentes (POPs) no Brasil. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/centroregional/a-convencao/poluentes-organicos-persistentes-pops/historico-e-legislacao-de-poluentes-organicos-persistentes-pops-no-brasil/>> Acesso em: 23/04/2019.

CGWH. Committee on Gulf War and Health: Literature Review of Pesticides and Solvents: National Research Council. Gulf War and Health: Volume 2. Insecticides and Solvents. Washington, DC: The National Academies Press, 2003; 616.

Chadwick PR, Invest JF, Bowron MJ. An Example of Cross-resistance to Pyrethroids in DDT-resistant *Aedes aegypti*. *Pestic Sci.* 1977; 8(6):618–624. doi:10.1002/ps.2780080605

Chalegre KD de M, Romão TP, Tavares DA, Santos EM, Ferreira LM, Oliveira CMF de, de-Melo-Neto OP, Silva-Filha MHNL. Novel mutations associated with resistance to *Bacillus sphaericus* in a polymorphic region of the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* gene. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(17):6321–6326. doi:10.1128/aem.01199-12

Chalegre KD de M, Tavares DA, Romão TP, Menezes HSG de, Nascimento NA, Oliveira CMF de, de-Melo-Neto OP, Silva-Filha, MHNL. Co-selection and replacement of resistance alleles to *Lysinibacillus sphaericus* in a *Culex quinquefasciatus* colony. *FEBS Journal.* 2015; 282(18):3592–3602. doi:10.1111/febs.13364

Chalegre KD, Romão TP, Amorim LB, Anastacio DB, de Barros RA, de Oliveira CM, Regis L, de-Melo-Neto OP, Silva-Filha MHNL. Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:1044–9.

Chalegre KDM. Diagnóstico da resistência do vetor *Culex quinquefasciatus* ao biolarvicida *Bacillus sphaericus*. [Dissertação de Mestrado em Saúde Pública] – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife. 2008; 110pp.

Chandra G, Bhattacharjee I, Chatterjee SN, Ghosh A. Mosquito control by larvivorous fish. *Indian J Med Res.* 2008; 127: 13-27.

Chandra G, Mandal SK, Ghosh AK, Das D, Banerjee SS, Chakraborty S. Biocontrol of larval mosquitoes by *Acilius sulcatus* (Coleoptera: Dytiscidae). *BMC Infect Dis.* 2008; 8:138.

Charles J-F, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Humphreys MJ, Berry C. Binding of the 51- and 42-kDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 156(1): 153–159. doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb12721.x

Chavasse DC, Yap HH. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneve: WHO; 1997. WHO/CTD/ WHOPES/97.2.

Chiang F-M, Sun C-N. Glutathione transferase isozymes of diamondback moth larvae and their role in the degradation of some organophosphorus insecticides. *Pest Biochem Physiol.* 1993; 45: 7–14.

Chouin-Carneiro, T., Ant, T.H., Herd, C., Louis, F., Failloux, A.B. and Sinkins, S.P. *Wolbachia* strain wAlbA blocks Zika virus transmission in *Aedes aegypti*. *Med Vet Entomol.* 2019. <https://doi.org/10.1111/mve.12384>.

Clancy DJ, Hoffmann AA. Environmental effects on cytoplasmic incompatibility and bacterial load in *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1998;86(1):13–24. doi:10.1046/j.1570-7458.1998.00261.x

Clark AG and Shamaan NA. Evidence that DDTdehydrochlorinase from the house fly is a glutathione Stransferase. *Pest Biochem Physiol.* 1984; 22: 249–261.

Clements AN. *The Physiology of Mosquitoes*. Pergamon Press, Oxford.1963; 393 pp.

Clements NA. *The biology of Mosquitoes*. CABI Publishing, New York, USA. 1999; 752pp.

Cohen E. Chitin Biochemistry: Synthesis and Inhibition. *Ann Rev Entomol.* 1987; 32:71-93.

Cohen E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag Sci.* 2001; 57(10):946–950. doi:10.1002/ps.363

Collins FH, Paskewitz SM. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol Biol.* 1996; 5:1–9.

Consoli R, Lourenço-de-Oliveira R. *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*, Ed. Fiocruz. 1994; 225 pp.

Cooperband MF, Allan SA. Effects of different pyrethroids on landing behavior of female *Aedes aegypti*, *Anopheles quadrimaculatus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2009; 46(2): 292–306. doi:10.1603/033.046.0214

Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, Akogbéto M, Hougard JM, Rowland, M. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Tropica*, 101(3), 207–216. doi:10.1016/j.actatropica.2007.01.005

Correia JC, Barbosa RMR, Oliveira, CMF de, Albuquerque, CMR de. Residential characteristics aggravating infestation by *Culex quinquefasciatus* in a region of Northeastern Brazil. *Rev Saúde Pública* 2012; 46(6):935-941.

Costa MJ da, Farias EC, Braghin PL. Controle Biológico de larvas e pupas de mosquitos através do peixe-do-paraíso (*Macropodus Opercularis*) – II – Sobrevivência e

reprodução do *Macropodus Opercularis* em águas poluídas e eutrofizadas do Reservatório Billings. Revista DAE. 1987; 45(148):72-74.

Costa MJ da, Farias EC, Motter OF, Neto JC. Controle biológico de larvas e pupas de mosquito (através do peixe-do-paraíso, *Macropodus Opercularis* - I). Revista DAE. 1985; 45(140):95-100.

Crouse GD, Dripps JE, Orr N, Sparks TC, Waldron C. DE-175 (Spinetoram), a new semisynthetic spinosyn in development. 2007;1013-1031. in: Modern Crop Protection Chemistry. W. Kramer and U. Schirmer, eds. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Crow JF, Genetics of insecticide resistance: general considerations. Misc Publ Entomol Soc Am 1960; 2:69-74

Cui F, Raymond M, Berthomieu A, Alout H, Weill M, Qiao C. Recent Emergence of Insensitive Acetylcholinesterase in Chinese Populations of the Mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 2006; 43(5):878–883. doi:10.1603/0022-2585(2006)43[878:reoi]2.0.co;2

Cygler M, Schrag JD, Sussman JL, Harel M, Silman I, Gentry MK, *et al.* Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. Protein Sci 1993; 2:366-82.

D'Amato C, Torres JPM, Malm O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. Química Nova 2002; 25:995-1002.

Darboux I, Nielsen-LeRoux C, Charles J-F, Pauron D. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. Insect Biochem Mol Biol. 2001; 31(10):981–990. doi:10.1016/s0965-1748(01)00046-7

Darsie Jr RF, Ward RA. Identification and Geographical Distribution of the Mosquitoes of North America, North of Mexico. University of Florida Press. Gainesville, FL. 2005; 300 pp.

David WAL, Metcalf RL, Winton M. The Systemic Insecticidal Properties of Certain Carbamates<sup>1</sup>. J Econ Entomol. 1960; 53(6): 1021–1025. doi:10.1093/jee/53.6.1021

Deacon AE, Shimadzu H, Dornelas M, Ramnarine IW, Magurran AE. From species to communities: the signature of recreational use on a tropical river ecosystem. Ecol Evol. 2015; 5(23):5561–5572.

Delannay C, Goindin D, Kellaou K, Ramdini C, Gustave J, Vega-Rúa A. Multiple insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* populations from Guadeloupe (French West Indies) and associated mechanisms. PLoS ONE. 2018; 13(6):e0199615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199615>

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;45:89-110. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.11.001.

Dias LS, Macoris MLG., Andrighetti MTM, Otrera VCG, Dias AS, Bauzer LGSR, Rodovalho CM, Martins AJ, Lima JBP. Toxicity of spinosad to temephos-resistant *Aedes aegypti* populations in Brazil. PLOS ONE. 2017; 12, e0173689.

Dimopoulos G. Combining Sterile and Incompatible Insect Techniques for *Aedes albopictus* suppression. Trends Parasitol. 2019; 35(9):671-673. doi:10.1016/j.pt.2019.07.006

Djogbénu L, Noel V, Agnew P. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. Malaria J. 2010; 9(1):12. doi:10.1186/1475-2875-9-12

Dodson B, Hughes G, Paul O, Matakchiero AC, Kramer LD, Rasgon JL. *Wolbachia* enhances West Nile Virus (WNV) infection in the mosquito *Culex tarsalis*. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 7: e2965

Dripps J, Olson B, Sparks T, Crouse G. Spinetoram: How artificial intelligence combined natural fermentation with synthetic chemistry to produce a new spinosyn insecticide. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2008-0822-01-PS.

Du W, Awolola TS, Howell P, Koekemoer LL, Brooke BD, Benedict MQ, Coetzee M, Zheng L. Independent mutations in the Rdl locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. Insect Mol Biol. 2005; 14(2):179–183. doi:10.1111/j.1365-2583.2005.00544.x

Duron O, Lagnel J, Raymond M, Bourtzis K, Fort P, Weill M. Transposable element polymorphism of *Wolbachia* in the mosquito *Culex pipiens*: evidence of genetic diversity, superinfection and recombination. Mol Ecol. 2005; 14(5):1561–1573. doi:10.1111/j.1365-294x.2005.02495.x

Dutra HL, 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. 2016; 19(6):771–774.

Echaubard P, Duron O, Agnew P, Sidobre C, Noël V, Weill M, Michalakis Y. Rapid evolution of *Wolbachia* density in insecticide resistant *Culex pipiens*. *Heredity*. 2010; 104(1):15–19. doi:10.1038/hdy.2009.100

Elanga-Ndille E, Nouage L, Ndo C, Binyang A, Assatse T, Nguiffo-Nguete D, Djonabaye D, Irving H, Tene-Fossog B, Wondji CS. The G119S acetylcholinesterase (ace-1) target site mutation confers carbamate resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae* from Cameroon: a challenge for the coming IRS implementation. *Genes*. 2019; 10(10): 790. doi:10.3390/genes10100790

Elliott M. Future use of natural and synthetic pyrethroids. In *The future for insecticides. Needs and Prospects*. (edited by Metcalf RL & McKelvey JJ Jr.) Wiley, New York. 1976; 63-193.

Elliott M. Synthetic pyrethroids. In *Synthetic Pyrethroids*, ACS Symposium Series (edited by Elliott M.) ACS Washington, D.C. 1977; 42: 1-28.

EMAE - Empresa Metropolitana de Águas e Energia. Produção em massa de mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) e utilização da técnica SIT (insetos estéreis): Método de controle e avaliação de variáveis para monitoramento da população de mosquitos no Rio Pinheiros. Código ANEEL: 0393-003/2010. Disponível em: <<http://www.emaee.com.br/conteudo.asp?id=Código-ANEEL:-0393-003/2010>> Acesos em: 23/07/2019

Enayati AA, Ranson H, Hemingway J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol*. 2005; 14(1):3–8. doi:10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x

EPA – Environmental Protection Agency. Office of pesticides programs health effect division (7509C). Washington, 1999; 313p.

Evans BR, Kotsakiozi P, Costa-da-Silva AL, Ioshino RS, Garziera L, Pedrosa MC, Malavasi A, Virginio JF, Capurro ML, Powell JR. Transgenic *Aedes aegypti* Mosquitoes Transfer Genes into a Natural Population. *Sci Rep*. 2019; 9: 13047. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49660-6>

Fang F, Wang W, Zhang D, Lv Y, Zhou D, Ma L, Shen B, Sun Y, Zhu, C. The cuticle proteins: a putative role for deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Parasitology Research*. 2015; 114(12): 4421–4429. doi:10.1007/s00436-015-4683-9

Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Marm Kilpatrick A. "Bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in

epidemiology. Infect Genet Evol. 2011;11(7):1577–1585.  
doi:10.1016/j.meegid.2011.08.013

Vargas HCM, Farnesi LC, Martins, AJ, Valle D, Rezende GL. Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. J Insect Physiol. 2014; 62, 54–60. doi:10.1016/j.jinsphys.2014.02.001

Fernandes RS, Campos SS, Ribeiro PS, Raphael LMS, Bonaldo MC, Lourenço-de-Oliveira R. *Culex quinquefasciatus* from areas with the highest incidence of microcephaly associated with Zika virus infections in the Northeast Region of Brazil are refractory to the virus. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2017; 112(8):577-579.

Fernícola NAGG. Toxicologia de los insecticidas organoclorados. Boletim Santel Panama, 1985; 98:1-6.

Feyereisen R. Molecular biology of insecticide resistance. Toxicology Letters. 1995; 82-83: 83–90. doi:10.1016/0378-4274(95)03470-6

Ffrench-Constant RH, Roush RT. Gene mapping and cross-resistance in cyclodiene insecticide-resistant *Drosophila melanogaster* (Mg.). Genet Res. 1991; 57(01):17-21. doi:10.1017/s0016672300028986

Filho AMO. Proceedings of the International Workshop on Organic Micropollutants in the Environment, Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Filshie BK, Waterhouse DF. The structure and development of a surface pattern on the cuticle of the green vegetable bug *Nezara viridula*. Tissue Cell. 1969; 1:267-385

Filshie BK. Fine structure of the cuticle of insects and other arthropods. In: King RC, Akai H (eds) Insect ultrastructure, vol I. Plenum Press, New York London. 1982; 367-385.

Flores AV, Ribeiro JN, Neves AA, Queiroz ELR. Organoclorados: um problema de saúde pública. Ambient Soc. 2004; 7(2):111-125.

Fonseca DM, Smith JL, Wilkerson RC, Fleischer RC. Pathways of expansion and multiple introductions illustrated by large genetic differentiation among worldwide populations of the southern house mosquito. Am J Trop Med Hyg. 2006; 74(2):284-289.

Fonseca EOL, Macoris MDLDG, Santos RFD, Morato DG, Isabel MDSS, Cerqueira NA, Monte-Alegre AF. Experimental study on the action of larvicides in *Aedes aegypti* populations collected in the Brazilian municipality of Itabuna, Bahia, under simulated field conditions. Epidemiol Serv Saúde 2019, 28, e2017316.

Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 4-Survey of resting adults and synanthropic behaviour in South-Eastern, Brazil. Rev. Saúde Públ.1993; 27: 398-411.

Forattini OP. Culicidologia médica. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002; 2: 860 pp.

Forattini OP. Entomologia Médica. Vol. 1., Faculdade de Higiene e Saúde Pública, S. Paulo, 1962; 662 pp.

Fournier D, Karch F, Bride J-M, Hall LMC, Bergé J-B, Spierer P. *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene. J Mol Biol. 1989; 210(1):15–22. doi:10.1016/0022-2836(89)90287-8

Fukuto TR. Mechanism of action of Organophosphorus and Carbamate insecticides. Environ Health Perspect. 1990; 87:245-254.

Garcia Neto LJ. Efeito residual do Diflubenzuron sobre larvas de *Aedes aegypti* em condições simuladas de campo, no laboratório [dissertação]. Fortaleza (CE): Universidade Estadual do Ceará; 2011.

Garziera L, Pedrosa MC, Souza FA de, Gómez M, Moreira MB, Virginio JF, Capurro ML, Carvalho DO. Effect of interruption of over-flooding releases of transgenic mosquitoes over wild population of *Aedes aegypti*: two case studies in Brazil. Entomol. Experiment. Appl. 2017; 164, 327–339 (2017).

Gebara AB, Almeida MCRR de. Avaliação de termonebulizações de propoxur contra mosquitos através de testes biológicos. Rev. de Saúde Pública. 1988; 22(1), 1-7. <https://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101988000100001>

Georghiou G P, Pasteur N, Hawley MK. Linkage relationships between organophosphate resistance and a highly active esterase-b in *Culex quinquefasciatus* from California. J Econ Entomol. 1980; 73(2): 301–305. doi:10.1093/jee/73.2.301

Georghiou GP. The evolution of resistance to pesticides. Annu Rev Ecol Evol Syst. 1972; 3(1): 133–168. doi:10.1146/annurev.es.03.110172.001025

Gerberg EJ, Barnard DR, Ward RA. Manual for Mosquito Rearing and Experimental Techniques. American Mosquito Control Association Bulletin. 1994; 5: 61-62.

Ghelelovitch S. Genetic determinism of sterility in the cross-breeding of various strains of *Culex autogenicus* Roubaud. C R Hebd Seances Acad Sci.1952; 234:2386-2388.



Gilby AR. Cuticle and Insecticides In: Bereiter-Hahn J., Matoltsy A.G., Richards K.S. (eds) *Biology of the Integument*. Springer, Berlin, Heidelberg. 1984; 694–702. doi:10.1007/978-3-642-51593-4\_35

Glaser RL, Meola MA. The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. *PLoS One*. 2010; 5:e11977.

Głowska E, Dragun-Damian A, Dabert M, Gerth M. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Syringophilidae). *Infect Genet Evol*. 2015; 30, 140–146. doi:10.1016/j.meegid.2014.12.019

Glynne-Jones GD. Pyrethrum production. In *Pyrethrum. The Natural Insecticide* (edited by Casida JE). Academic Press, New York. 1973; 17-22.

Gonçalves D da S, Hooker DJ, Dong Y, Baran N, Kyrylos P, Iturbe-Ormaetxe I, Simmons CP, O'Neill SL. Detecting *wMel Wolbachia* in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasit Vectors*. 2019; 12(1):404. doi:10.1186/s13071-019-3666-6

Gong Y, Li T, Feng Y, Liu N. The function of two P450s, CYP9M10 and CYP6AA7, in the permethrin resistance of *Culex quinquefasciatus*. *Scientific Reports*. 2017; 7(1). doi:10.1038/s41598-017-00486-0

Gong Y, Li T, Zhang L, Gao X, Liu N. Permethrin induction of multiple cytochrome P450 genes in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *Int J Biol Sci*. 2013; 9(9):863–871. doi:10.7150/ijbs.6744

González T, Bisset JA, Díaz C, Rodríguez MM, Brandolini MB. Insecticide resistance in a *Culex quinquefasciatus* strain from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94:121-2.

Gordon JR, Ottea J. Association of Esterases With Insecticide Resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Econ Entomol*. 2012; 105(3): 971–978. doi:10.1603/ec11224

Graf JF. The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasitology Today*. 1993; 9(12): 471–474. doi:10.1016/0169-4758(93)90106-p

Gratz NG. Mosquito-borne disease problems in the urbanization of tropical countries. *Critic Rev Environ Contr*. 1973; 3:455-495.

Guedes RNC. Insecticide resistance, control failure likelihood and the first law of geography. *Pest Manag Sci*. 2016; 73(3): 479–484. doi:10.1002/ps.4452

Guedes RNC. Toxicologia dos inseticidas. Viçosa, MG: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1999.

Guillemaud T, Rooker S, Pasteur N, Raymond M. Testing the unique amplification event and the worldwide migration hypothesis of insecticide resistance genes with sequence data. *Heredity* 1996; 77:535–543.

Hall LMC, Spierer P. The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO J.* 1986; 5:2949–2954.

Hansen S. Origin of a theory: Excitatory/inhibitory imbalance in the brain as a factor in autism. Hussman Institute for Autism 2013 – 2017. Baltimore 2019. Disponível em: <<https://www.hussmanautism.org/ei-imbalance-origins/>> Acesso em: 12/09/2019

Harbach RE. *Culex pipiens*: species versus species complex taxonomic history and perspective. *J Am Mosq Control Assoc.* 2012; 28(4 Suppl):10–23. PMID: 23401941

Hartl DL, Clarck AG. Princípios de Genética de Populações. 4ª ed. Artmed. Porto Alegre. 2010; 298pp.

Hayes J. Seasonal changes in population structure of *Culex pipiens quinquefasciatus*, Say (Diptera: Culicidae). Study of an isolated population. *J Med Ent.* 1975; 12:167-178.

Hayes JD, Wolf CR. Role of glutathione transferase in drug resistance. In *Glutathione Conjugation: Mechanisms and Biological Significance* (Sies, H. and Ketterer, B., eds), Academic Press Ltd, London. 1988; pp. 315–355.

Hemingway J, Callaghan A, Amin AM. Mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Saudi Arabia. *Med Vet Entomol.* 1990; 4(3):275–282. doi:10.1111/j.1365-2915.1990.tb00440.x.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004; 34(7): 653–665. doi:10.1016/j.ibmb.2004.03.018

Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Ver Entomol.* 2000 45(1), 371–391. doi:10.1146/annurev.ento.45.1.371

Hertig M, Wolbach SB. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J. Med. Res.* 1924; 44:329–74.

Hertig M. The rickettsia, *Wolbachia pipiens* (gen. et sp.n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology.* 1936; 28:453–86.

Hill S, Connelly R. Southern house mosquito - *Culex quinquefasciatus* Say (Insecta: Diptera: Culicidae). In: Gillett-Kaufman JL. ed. Featured Creatures: Entomology & Nematology. University of Florida. 2009; EENY-457. Disponível em: <[http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/southern\\_house\\_mosquito.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/southern_house_mosquito.htm) > Acesso em: 15/08/2019.

Hille B. Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophys J.* 1978; 22(2):283–294. doi:10.1016/s0006-3495(78)85489-7

Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology.* 1952; 117(4):500–544. doi:10.1113/jphysiol.1952.sp004764

Holder P, Browne G, Bullians M. The mosquitoes of New Zealand and their animal disease significance. *Surveillance* 1999; 26(4):12-15.

Hristov H. Endless list of aquatic creatures I'd love to keep: *Macropodus Opercularis*, aka Paradisefish or Paradise Gourami (including blue variants). *Aquatictimes.* 2016 Disponível em: <<https://aquatictimes.tumblr.com/post/139219561893/endless-list-of-aquatic-creatures-id-love-to>> Acesso em: 06/05/2019

Huigens ME, Stouthamer R. Parthenogenesis associated with *Wolbachia*. in: Bourtzis K. Miller T. *Insect Symbiosis.* CRC Press, 2003: 247-266.

Hurst GDD, Jiggins FM, von der Schulenburg JHG, Bertrand D, West SA, Goriacheva II, Zakharov IA, Werren JH, Stouthamer R, Majerus MEN. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc R Soc Lond B.* 1999; 266(1420): 735-740. doi: 10.1098/rspb.1999.0698

IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY. 2013.

ICPMR. Institute for Clinical Pathology and Medical Research - NSW Arbovirus Surveillance & Vector Monitoring Program. *Depat Med Entomol.* 2002. Disponível em: <<http://medent.usyd.edu.au/arbovirus/mosquit/culexquinquefasciatus.htm> > Acesso em: 15/08/2019.

Imperato R, Raga A. Técnica do inseto estéril. Documento técnico 018. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Instituto Biológico. Governo do Estado de São Paulo. INSS 1989-134X. Apta, 2015; 1-16. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/dt/DT\\_tecnica\\_inseto\\_esteril.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/dt/DT_tecnica_inseto_esteril.pdf)> Acesso em: 23/07/2019

Invest JF, Lucas JR. Pyriproxyfen as a mosquito larvicide. Sixth International Conference on Urban Pests, eds Robinson WH, Bajomi D (OOK-Press Kft, Veszprém, Hungary), 2008; 239–245.

Irving-Bell RJ. Cytoplasmic incompatibility within and between *Culex molestus* and *Cx. quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1983;20: 44–48.

Jambulingam P, Sadanandane C, Nithiyannan N, Subramanian S, Zaim M. Efficacy of novaluron against *Culex quinquefasciatus* in small- and medium-scale trials, India. *J Am Mosq Contr Assoc.* 2009; 25(3):315–322. doi:10.2987/08-5806.1

Jasinskiene N, Coleman J, Ashikyan A, Salampessy M, Marinotti O, James AA. Genetic control of malaria parasite transmission: Threshold levels for infection in an avian model system. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76(6):1072–1078

Jost E. Untersuchungen zur Inkompatibilität im *Culex pipiens*-Komplex. *Wilhelm Roux' Arch.* 1970; 166:173–88.

Jousset F-X, Baquerizo E, Bergoin M. A new densovirus isolated from the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Virus Res.* 2000; 67:11–16.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976; 455:152–162.

Kamita SG, Samra AI, Liu JY, Cornel AJ, Hammock BD. Juvenile hormone (JH) esterase of the mosquito *Culex quinquefasciatus* is not a target of the JH analog insecticide methoprene. *PLoS One.* 2011; 6:e28392. doi: 10.1371/journal.pone.0028392, PMID: 22174797

Karimian F, Vatandoost H, Rassi Y, Maleki-Ravasan N, Choubdar N, Koosha M, Arzamani K, Asl EM, Veysi A, Alipour H, Shirani M, Oshaghi MA. wsp-based analysis of *Wolbachia* strains associated with *Phlebotomus papatasi* and *P. sergenti* (Diptera: Psychodidae) main cutaneous leishmaniasis vectors, introduction of a new subgroup wSerg. *Pathog Glob Health.* 2018; 112(3):152–160. doi:10.1080/20477724.2018.1471438

Kasai S, Komagata O, Okamura Y, Tomita T. Alternative splicing and developmental regulation of glutathione transferases in *Culex quinquefasciatus* Say. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2009; 94(1): 21–29. doi:10.1016/j.pestbp.2009.02.007

Kasai S, Weerasinghe IS, Shono T, Yamakawa M. Molecular cloning, nucleotide sequence and gene expression of a cytochrome P450 (CYP6F1) from the pyrethroid-

- resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Insect Biochem Mol Biol*. 2000; 30(2): 163–171. doi:10.1016/s0965-1748(99)00114-9
- Kasai S, Weerasinghe IS, Shono T. 1998. P450 Monooxygenases are an important mechanism of permethrin resistance in *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Arch Insect Biochem Physiol*. 1998; 37:47–56
- Khan GZ, Khan I, Khan IA, Salman M, Ullah K. Evaluation of different formulations of IGRs against *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016; 6(6):485-91.
- Khemrattrakool P, Yanola J, Lumjuan N, Somboon P. Pyriproxyfen-Treated Polypropylene Sheets and Resting Boxes for Controlling Mosquitoes in Livestock Operations. *Insects*. 2019; 10(2): 55. doi:10.3390/insects10020055
- Kirk KM, Eaves LJ, Meyer JM, Saul A, Martin NG. Twin study of adolescent genetic susceptibility to mosquito bites using ordinal and comparative rating data. *Genet. Epidemiol*. 2000; 19:178–190.
- Kirst HA, Michel KH, Mynderse JS, Chio EH, Yao RC, Nakatsukasa WM, Boeck LD, Occlowitz J, Paschal W, Deeter B, Thompson GD. Discovery, isolation, and structure elucidation of a family of structurally unique, fermentation-derived tetracyclic macrolides. *ACS Symposium Series*. 1992; 214–225. doi:10.1021/bk-1992-0504.ch020
- Kittayapong P, Baisley KJ, Baimai V, O'Neill SL. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2000; 37(3):340–345. doi:10.1093/jmedent/37.3.340
- Kittayapong P, Baisley KJ, Sharpe RG, Baimai V, O'Neill SL. Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. *J Trop Med Hyg*. 2002; 66(1):103-107.
- Klasson L, Walker T, Sebahia M, Sanders MJ, Quail MA, Lord A, Sanders S, Earl J, O'Neill SL, Thomson N, Sinkins SP, Parkhill, J. Genome Evolution of *Wolbachia* Strain wPip from the *Culex pipiens* Group. *Mol Biol Evol*. 2008; 25(9): 1877–1887. doi:10.1093/molbev/msn133
- Kliot A, Ghanim M. Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Manag Sci*. 2012; 68(11): 1431–1437. doi:10.1002/ps.3395
- Knight KL. Supplement to the Catalog of the mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae). *Entomol Soc Am*. 1978.

- Komagata O, Kasai S, Tomita, T. Overexpression of cytochrome P450 genes in pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2010; 40(2): 146–152. doi:10.1016/j.ibmb.2010.01.006
- Konecka E, Olszanowski Z, Koczura R. *Wolbachia* of phylogenetic supergroup E identified in oribatid mite *Gustavia microcephala* (Acari: Oribatida). *Mol Phylogenet Evol*. 2019; 135:230-235. doi:10.1016/j.ympev.2019.03.019
- Kostaropoulos I, Papadopoulos AI, Metaxakis A, Boukouvala E, Papadopoulou-Mourkidou E. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem Mol Biol*. 2001; 31:313–319.
- Krishnamurti IS, Pal R. A note on the comparative effect of different blood feed on egg productions of *Culex fatigans*. *Bull Nat Ind Mal Mosquito Dis*. 1958; 7:27-29.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018; 35:1547-1549.
- Labarthe N, Serrão ML, Melo FY, De Oliveira SJ, Lourenço-de Oliveira R. Potencial vectors of *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) in Itacoatiara, Oceanic Region of Niterói municipality, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93:425-32.
- Labbé P, Berthomieu A, Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T, Weill M. Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol*. 2007; 24(4), 1056–1067. doi:10.1093/molbev/msm025
- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubal V. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 1999; 286:2333-7.
- Lanning CL, Fine RL, Corcoran JJ, Ayad HM, Rose RL, Abou-Donia MB. Tobacco budworm P-glycoprotein: biochemical characterization and its involvement in pesticide resistance. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1291(2): 155–162. doi:10.1016/0304-4165(96)00060-8
- Lassaigne JL. Recherches sur la Decomposition mutuelle de l'alcool et de l'acide phosphorique pendant la formation de l'ether. *Ann Chim Phys*. 1820; 13: 294–297.
- Lassy CW, Karr TL. 1996. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mech Dev*. 57:47– 58.

Laven H. Speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens* complex. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1959;24:166–173.

Laven H. Crossing experiments with *Culex* strains. Evolution. 1951;5:370–375.

Laven H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. Nature. 1967;216:383-384.

Lee DJ, Hicks MM, Debenham ML, Griffiths M, Marks EN, Bryan JH *et al.* The Culicidae of the Australasian Region. Canberra, Australia: AGPS. 1989; 7:281.

Lehane MJ. The biology of blood-sucking in insects. Second edition. England: Cambridge. University Press, 2005; 321pp.

Li T, Zhang L, Reid WR, Xu Q, Dong K, Liu, N. Multiple mutations and mutation combinations in the sodium channel of permethrin resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. Sci Rep. 2012; 2(1): 1-9. doi:10.1038/srep00781

Lima, KFA. Avaliação biológica de machos esterilizados por radiação gama, para utilização em programas de controle populacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) [dissertação]. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2015.

Liu F, Chen L, Appel AG, Liu N. Olfactory responses of the antennal trichoid sensilla to chemical repellents in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. J Insect Physiol. 2013; 59(11): 1169–1177. doi:10.1016/j.jinsphys.2013.08.016

Liu H, Xu Q, Zhang L., Liu N. Chlorpyrifos Resistance in Mosquito *Culex quinquefasciatus*. J Med Entomol. 2005; 42(5):815–820. doi:10.1093/jmedent/42.5.815

Liu H-M, Cheng P, Huang X, Dai Y-H, Wang H-F, Liu L-J, Zhao Y-Q, Wang H-W, Gong M-Q. Identification of TCT, a novel knockdown resistance allele mutation and analysis of resistance detection methods in the voltage-gated Na<sup>+</sup> channel of *Culex pipiens pallens* from Shandong Province, China. Mol Med Rep. 2012; 7(2): 525–530. doi:10.3892/mmr.2012.1184

Liu N, Li T, Reid W R, Yang T, Zhang L. Multiple Cytochrome P450 Genes: Their Constitutive Overexpression and Permethrin Induction in Insecticide Resistant Mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. PLoS ONE. 2011; 6(8): e23403. doi:10.1371/journal.pone.0023403

Liu N, Zhu F, Xu Q, Pridgeon JW, Zhang L. Behavioral change, physiological modification, and metabolic detoxification: mechanisms of insecticide resistance. Acta Entomol Sin. 2006; 48:672–680.

Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C, Bandi C. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol Biol Evol.* 2002; 19(3):341–346. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a004087

Longo C. Mutações envolvidas com resistência a inseticidas em populações naturais de *Culex quinquefasciatus* (Say 1823) do Rio de Janeiro. [Monografia]. Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Rio de Janeiro. 2016: 36pp.

Lopes RP, Lima JBP, Martins AJ. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 in Brazil: a review. *Parasite Vector*, 2019; 12(1):591. doi:10.1186/s13071-019-3850-8

Low VL, Chen CD, Lee HL, Tan TK, Chen CF, Leong CS, Lim YAIL, Lim PE, Norma-Rashid Y, Sofian-Azirun, M. Enzymatic Characterization of Insecticide Resistance Mechanisms in Field Populations of Malaysian *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *PLoS ONE.* 2013; 8(11): e79928. doi:10.1371/journal.pone.0079928

Lummis SCR. GABA receptors in insects. *Camp Biochem.Physio Part C: Comparative Pharmacology.* 1990; 95(1):1–8. doi:10.1016/0742-8413(90)90073-i

Lutkenhaus J. Regulation of cell division in *E. coli*. *Trends Genet.* 1990; 6(1): 22–25. doi:10.1016/0168-9525(90)90045-8

Macoris MLG, Andrighetti MTM, Takaku L, Glasser CM, Garbeloto VC, Cirino VCB. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública.* 1999; 33(5), 521-522. <https://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101999000500013>

Macoris MLG, Andrighetti MTM, Wanderley DMV, Ribolla PEM. Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47(5):573-578. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0141-2014>

Mains JW, Kelly PH, Dobson KL, Petrie WD, Dobson SL. Localized control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Miami, FL, via inundative releases of *Wolbachia*-infected male mosquitoes. *J Med Entomol.* 2019; 56(5):1296–1303. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz051>

Malcolm CA, Bourguet D, Ascolillo A, Rooker SJ, Garvey CF, Hall LMC, Pasteur N, Raymond, M. A sex-linked *Ace* gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Mol Biol.* 1998; 7(2): 107–120. doi:10.1046/j.1365-2583.1998.72055.x



Mandal SK, Ghosh A, Bhattacharjee I, Chandra G. Biocontrol efficiency of odonate nymphs against larvae of the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say, 1823. *Acta Tropica*. 2008;106(2):109–114. doi:10.1016/j.actatropica.2008.02.002

Manimegalai K, Sukanya S. Biology of the filarial vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). *Int J Curr Microbiol App Sci* 2014; 3(4): 718–24.

Mariconi FAM. Inseticidas e seu emprego no combate às pragas. 7.ed. São Paulo: Distribuidora, 1985.

Marques, Leandro. Espinosinas: mecanismo de ação e características. 2018. Disponível em: <<https://elevagro.com/materiais-didaticos/espinosinas-mecanismo-de-acao-e-caracteristicas/>>. Data de acesso: 15 de outubro de 2019.

Martinez-Torres D, Chevillon C, Brun-Barale A, Bergé JB, Pasteur N, Pauron D. Voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. *Pest Sci*. 1999; 55(10): 1012–1020. doi:10.1002/(sici)1096-9063(199910)55:10<1012::aid-ps39>3.0.co;2-5

Martins JJ, Solomon SE, Mikheyev AS, Mueller UG, Ortiz A, Blackwell MB. Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). *Insect Mol. Biol.* 2007; 16(6): 777–784.

Mateos M, Martinez H, Lanzavecchia SB, Conte C, Guillén K, Morán-Aceves B, Toledo J, Liedo P, Asimakis ED, Doudoumis V, Kyritsis GA, Papadopoulos NT, Avgoustinos AA, Segura DE, Tsiamis G, Bourtzis K. *Wolbachia pipientis* associated to tephritid fruit fly pests: from basic research to applications. *BioRxiv*, 2019. <https://doi.org/10.1101/358333>

Mathenge EM, Gimnig J E, Kolczak M, Ombok M, Irungu LW, Hawley WA. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. *J Med Entomol*. 2001; 38(4): 531–536. doi:10.1603/0022-2585-38.4.531

Mboera LEG, Mdira KY, Salum FM, Takken W, Pickett JA. Influence of synthetic oviposition pheromone and volatiles from soakage pits and grass infusions upon oviposition site-selection of *Culex* mosquitoes in Tanzania. *J Chem Ecol*. 1999; 25(8):1855–1865. doi:10.1023/a:1020933800364

McFarlane HE, Shin JJH, Bird DA, Samuels AL. Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *The Plant Cell*. 2010; 22(9): 3066–3075. doi:10.1105/tpc.110.077974

- Medeiros PFV. Investigações sobre os mecanismos de resistência em larvas e adultos de *Aedes aegypti*, Linnaeus, 1762. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 2011; 140p.
- Meegan JM. The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977–78. Description of the epizootic and virological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1979; 73:618-623.
- Meisler MH, Kearney JA. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest.* 2005; 115(8):2010-2017. <https://doi.org/10.1172/JCI25466>.
- Melo JV. Caracterização ultra-estrutural dos efeitos citopatológicos causados por toxinas de *Bacillus sphaericus* no intestino de larvas de *Culex quinquefasciatus*. [Tese de Doutorado em Saúde Pública] – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife. 2008; 122pp.
- Menezes HSG, Chalegre KD, Romão TP, Oliveira CMF, De-Melo-Neto OP, Silva-Filha MHNL. A new allele conferring resistance to *Lysinibacillus sphaericus* is detected in low frequency in *Culex quinquefasciatus* field populations. *Parasit Vectors.* 2016, 9:1–7.
- Mertz, FP, Yao RC. 1990. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990; 40: 34-39.
- Mian, LS, Dhillon MS, Dodson L Field evaluation of pyriproxyfen against mosquitoes in catch basins in southern California. *J Am Mosquito Contr Assoc.* 2017; 33(2):145-147. <https://doi.org/10.2987/17-6649.1>
- Milani R. Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbattente del DDT: correlazione tra abbattimento e mortalità in *Musca domestica* L. *Riv Parassitol.* 1954;15: 513-542.
- Milby MM, Reisen WK, Reeves WC. Intercanyon movement of marked *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1983; 20(2):193-8.
- Millar JG, Chaney JD, Mulla MS. Identification of oviposition attractants for *Culex quinquefasciatus* from fermented Bermuda grass infusion. *J Am Mosq Control Assoc.* 1992; 8:11-17.
- Miller JE, Gibson G. Behavioral response of host-seeking mosquitoes (Diptera: Culicidae) to insecticide-impregnated bed netting: A new approach to insecticide Bioassays. *J Med Entomol.* 1994; 31(1):114–122. doi:10.1093/jmedent/31.1.114

Morais SA de; Marrelli, MT, Natal, D. Aspectos da distribuição de *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) na região do rio Pinheiros, na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. Rev. Bras. entomol. 2006; 50(3):413-418.

Morais SA, Almeida F, Suesdek L, Marrelli MT. Low genetic diversity in *Wolbachia*-Infected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Argentina. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2012; 54(6):325-329.

Morais SA. Relações morfométricas e genética populacional de *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). [Tese] Pós-graduação em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, 2011; 79pp. doi:10.11606/T.6.2011.tde-04032011-164328

Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. Cell. 2009;139:1268-78.

Moreira M, Aguiar AMF, Bourtzis K, Latorre A, Khadem M. *Wolbachia* (Alphaproteobacteria: Rickettsiales) infections in isolated aphid populations from oceanic islands of the Azores Archipelago: Revisiting the Supergroups M and N. Environ Entomol. 2019; 1-9. doi:10.1093/ee/nvy189

Muniz FS. Estudo da ocorrência de mutação envolvida com resistência a piretróides em populações brasileiras de *Culex quinquefasciatus* Say 1823. [Monografia] Faculdade de Formação de Professores. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2015; 62pp.

Muthusamy R, Shivakumar MS. Effect of Lambda cyhalothrin and temephos on detoxification enzyme system in *Culex quinquefascitus* (Diptera: Culicidae). J Environ Biol. 2015; 36:235-9.

Muzzarelli RAA, Jeuniaux C, Gooday GW. Chitin in nature and technology. New York: Plenum; 1986; 385 pp.

Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, Harada S, Kasai S, Severson DW, Kono Y, Tomita T. An amino acid substitution attributable to insecticide-resistance in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus* Biochem Biophys Res Commun. 2004; 313: 794e801.

Narahashi T, Frey JM, Ginsburg KS, Roy ML. Sodium and GABA-activated channels as the targets of pyrethroids and cyclodienes. Toxicology Letters. 1992; 64/65: 429–436. doi:10.1016/0378-4274(92)90216-7

Ndiath MO. Insecticides and Insecticide Resistance. In: Arieu F., Gay F., Ménard R. (eds) Malaria Control and Elimination. Methods in Molecular Biology, vol 2013. Humana, New York, NY. 2019; 287–304. doi:10.1007/978-1-4939-9550-9\_18

Needleman SB, Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J Mol Biol. 1970; 48(3):443-453. doi:10.1016/0022-2836(70)90057-4

Nico L, Fuller P, Jacobs G, Cannister M, Larson J, Fusaro A, Makled TH, Neilson ME. *Gambusia affinis* (Baird and Girard, 1853): U.S. Geological Survey, Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL. 2019. Disponível em: <<https://nas.er.usgs.gov/queries/factsheet.aspx?SpeciesID=846>> Acesso em: 04/05/2019

Nielsen-Leroux, C, Pasteur N, Prêtre J, Charles JF, Sheikh HB, Chevillon C. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): the complex situation of west-Mediterranean countries. J Med Entomol. 2002; 39(5):729-735. doi: <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.5.729>

Nikolouli K, Colinet H, Renault D, Enriquez T, Mouton L, Gibert P, Sassu, F, Cáceres C, Stauffer C, Pereira R, *et al.* Sterile insect technique and Wolbachia symbiosis as potential tools for the control of the invasive species *Drosophila suzukii*. J Pest Sci. 2017; 91(2): 489-503.

Niranjan Reddy BP, Prasad GBKS, Raghavendra K. (2011). In silico characterization and comparative genomic analysis of the *Culex quinquefasciatus* glutathione S-transferase (GST) supergene family. Parasitol Res. 2011; 109(4):1165–1177. doi:10.1007/s00436-011-2364-x

Nistri A, Constanti A. Pharmacological characterization of different types of GABA and glutamate receptors in vertebrates and invertebrates. Prog Neurobiol. 1979; 13, 117-235.

Niu B-L, Shen W-F, Liu Y, Weng H-B, He L-H, Mu J-J, Wu Z-L, Jiang P, Tao Y-Z, Meng Z-Q. Cloning and RNAi-mediated functional characterization of MaLac2 of the pine sawyer, *Monochamus alternatus*. Insect Mol Biol 2008; 17(3), 303–312. doi:10.1111/j.1365-2583.2008.00803.x

Nkya TE, Poupardin R, Laporte F, Akhouayri I, Mosha F, Magesa S, Kisinza W, David, J.-P. Impact of agriculture on the selection of insecticide resistance in the malaria vector

- Anopheles gambiae: a multigenerational study in controlled conditions. Parasit Vectors. 2014; 7(1):480. doi:10.1186/s13071-014-0480-z
- Norris LC, Norris DE. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes after the introduction of insecticide-treated bed nets in Macha, Zambia. J Vector Ecol. 2011; 36(2): 411–420. doi:10.1111/j.1948-7134.2011.00182.x
- NourElhouda D, Hamid B, Ali B, Noureddine S. Biological effects of a benzoylphenylurea derivative (Novaluron) on larvae of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Adv Appl Sci Res 2013; 4(4):449-456
- Nugapola NWNP, De Silva WAPP, Karunaratne SP. Distribution and phylogeny of *Wolbachia* strains in wild mosquito populations in Sri Lanka. Parasites Vectors. 2017; 10: 230. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2174-9>
- Obando RG; Gamboa F; Perefán O; Suarez MF; Lerma JM. Experiencia de un análisis entomológico de criaderos de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en Cali, Colombia. Rev Colomb Entomol. 2007; 33(2): 148–156.
- O'Brien RD. Insecticides, Action and Metabolism. Academic Press, New York, 1967.
- Oduola AO, Awe OO. Behavioural biting preference of *Culex quinquefasciatus* in human host in Lagos metropolis Nigeria J Vect Borne Dis. 2006; 43:16-20.
- Okimoto R, Dodgson J. Improved PCR amplification of multiple specific alleles (PAMSA) using internally mismatched primers. Biotechniques, 1996; 21(1):20-26.
- Omer SM, Georghiou GP, Irving SN. DDT/pyrethroid resistance inter-relationships in *Anopheles stephensi*. Mosq News. 1980; 40(2): 200-209.
- Ometto T, Durigon EL, Araujo J de, Aprelon R, Aguiar DM de, Cavalcante GT, ... Lefrançois T. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008–2010. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2013; 107: 723– 730.
- Oppenoorth FJ, Van der Pas LJT, Houx NWH. Glutathione S-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance. Pest Biochem Physiol. 1979; 11: 176–188.
- Oppenoorth FJ. Biochemistry of insecticide resistance. Pestic Biochem Physiol 1984; 22:187–93.
- Orr N, Watson GB, Hasler J, Michael J, Geng C., Cook KR, Salgado VL, Chouinard S. Sequences of *Drosophila melanogaster* nicotinic receptor alpha-6 and alpha-7 subunits for bioassay. WO 2006091672 PCT Intl Appl. 2006; 102 pp.

- Pan C, Zhou Y, Mo J. The clone of laccase gene and its potential function in cuticular penetration resistance of *Culex pipiens pallens* to fenvalerate. *Pestic Biochem Physiol.* 2009; 93(3):105–111. doi:10.1016/j.pestbp.2008.12.003
- Patterson RS, Lowe RE, Smittle BJ, Dame DA, Boston MD, Cameron AL. Release of radiosterilized males to control *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1977; 14:299-304
- Patterson RS, Sharma VP, Singh KRP, LaBrecque GC, Seetheram PL, Grover KK. Use of radiosterilized males to control indigenous populations of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say: laboratory and field studies. *Mosquito News* 1975; 35:1-7.
- Patterson RS, Weidhaas DE, Ford HR, Lofgren CS. Suppression and elimination of an island population of *Culex pipiens quinquefasciatus* with sterile males. *Science* 1970; 168:1368-70.
- Peiris HTR, Hemingway, J. Mechanisms of insecticide resistance in a temephos selected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) strain from Sri Lanka. *Bull Entomol Res.* 1990; 80(4): 453-457. doi:10.1017/s0007485300050719
- Penna MLF. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. *Cad Saúde Pública*, 2003; 19(1):305–309. doi:10.1590/s0102-311x2003000100034
- Perry AS, Agosin M. The physiology of insecticide resistance by insects. In: Rockstein M (ed) *The physiology of insecta*, 2nd edn, vol VI. Academic Press, London New York, 1974; 3-123.
- Pignatelli P, Ingham VA, Balabanidou, V, Vontas J, Lycett G, Ranson H. The *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter family: phylogenetic analysis and tissue localization provide clues on function and role in insecticide resistance. *Insect Mol Biol.* 2017 27(1):110–122. doi:10.1111/imb.12351
- Pinchin R, Fanara DM, Oliveira Filho AM. A village-scale field trial of bendiocarb (OMS 1394) for the control of the Chagas'disease vector *Triatoma infestans* in Brazil. *Int J Trop Insect Sci.* 1984; 5(2):121-126. <https://doi.org/10.1017/S1742758400001776>
- Plapp FW, Hoyer RF. Possible pleiotropism of a gene conferring resistance to DDT, DDT analogs, and pyrethins in the house fly and *Culex tarsalis*. *J Econ Entomol.* 1968; 61(3):761–765. doi:10.1093/jee/61.3.761
- Pocquet N, Milesi P, Makoundou P, Unal S, Zumbo B, Atyame C, Darriet F, Dehecq J-S, Thiria J, Bheecarry A, Iyaloo DP, Weill M, Chandre F, Labbé P. Multiple Insecticide

Resistances in the Disease Vector *Culex p. quinquefasciatus* from Western Indian Ocean. PLoS ONE. 2013; 8(10): e77855. doi:10.1371/journal.pone.0077855

Pratt HD, Ralph CB, Kent SL. Mosquitoes of public health importance and their control: Training Guide - Insect Control Series. U.S. Department of health, education, and welfare public health service. Communicable Disease Center, Atlanta. 1963; 68pp.

Priester TM, Georghiou GP. Induction of High Resistance to Permethrin in *Culex pipiens quinquefasciatus*. J Econ Entomol. 1978; 71(2):197–200. doi:10.1093/jee/71.2.197

Rao VV, Chiu ML, Kronauge JF, Piwnica-Worms D. Expression of recombinant human multidrug resistance P-glycoprotein in insect cells confers decreased accumulation of Technetium-99m-Sestamibi. J Nucl Med. 1994; 35(3): 510-515.

Rasgon JL, Scott TW. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: parameter estimates and infection dynamics in natural populations. Genetics. 2003; 165(4):2029-2038.

Raymond M, Chevillon C, Guillemaud T, Lenormand T, Pasteur N. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. Philos T R Soc B. 1998; 353(1376): 1707–1711. doi:10.1098/rstb.1998.0322

Raymond M. Présentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cah. O.R.S.T,O.M. Ser Entomol Med Parasitol. 1985; 23(2):117-121.

Reed KM, Werren JH. 1995. Induction of paternal genome loss by the paternalsex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*): a comparative study of early embryonic events. Mol Reprod Dev.1995; 40:408-418.

Regis L, Oliveira CMF, Silva-Filha MH, Silva SB, Maciel A, Furtado AF. Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda,Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000; 94: 488–492.

Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles J-F. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. Trends in Parasitology. 2001; 17(8): 377–380. doi:10.1016/s1471-4922(01)01953-5

Regis LN, Silva-Filha MH, Oliveira CMF, Rios EM, Silva SB, Furtado AF. Integrates control mesures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995;90:115-119.

Reuben R, Tewari S, Hiriyan J, Akiyama J. Illustrated keys to species of *Culex* (*Culex*) associated with Japanese Encephalitis on Southeast Asia (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics* 1994; 26(2):75-96.

Rivero A, Vezilier J, Weill M, Read AF, Gandon S. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog.* 2010; 6(8):e1001000. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001000>

Roberts DR, Chareonviriyaphap T, Harlan HH, Hshieh P. Methods for testing and analyzing excito-repellency responses of malaria vectors to insecticides. *J Am Mosq Contr Assoc.* 1997; 13(1): 13-17.

Robinson AS, Franz G, Atkinson PW. Insect transgenesis and its potential role in agriculture and human health. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34(2):113-20. DOI: 10.1016/j.ibmb.2003.10.004

Romão TP, Chalegre KDM de, Key S, Ayres CFJ, Oliveira CMF de, de-Melo-Neto, OP, Lobo Silva-Filha, MHNL. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS Journal.* 2006; 273(7):1556–1568. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05177.x

Rosenberry TL. Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1975; 43:103–218. doi:10.1002/9780470122884.ch3

Rosenthal GA, Berenbaum MR. *Herbivores: Their Interactions With Secondary Plant Metabolites*, Second Edition, Vol. II: The Chemical Participants. Academic Press, San Diego. 1992; 493 pp.

Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M. Wolbachia endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc R Soc Lond B.: Biological Sciences.* 1992; 250(1328): 91–98. doi:10.1098/rspb.1992.0135

Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2017; 34: 3299-3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248

Rudnick A, Hammon WMCD. Entomological aspects of Thai Haemorrhagic fever epidemics in Bangkok, the Philippines, and Singapore, 1956-1961. *SEATO Medical Res. Mon. 2. Proc. of the Symposium on Thai Haemorrhagic Fever.* Post Pub. Co., Bangkok, 1961; 144 pp.



Rueda LM, Patel KJ, Axtell RC, Stinner RE. Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1990; 27(5):892-898.

Sá ELR de, Rodovalho C de M, Sousa NPR de, Sá ILR de, Bellinato DF, Dias L dos S, Silva LC da; Martins AJ, Lima JBP. Evaluation of insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations connected by roads and rivers: the case of Tocantins state in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2019; 114: e180318. doi:10.1590/0074-02760180318

Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores A, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall P, Donnelly M. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 2007; 16:785-798.

Sadanandane C, Boopathi Doss PS, Jambulingam P. Efficacy of three formulations of diflubenzuron, an insect growth regulator, against *Culex quinquefasciatus* Say, the vector of Bancroftian filariasis in India. *Indian J Med Res.* 2012;136(5):783–791.

Saha N, Aditya G, Bal A, Saha GK. A comparative study of predation of three aquatic heteropteran bugs on *Culex quinquefasciatus* larvae. *Limnology.* 2007; 8(1):73–80. doi:10.1007/s10201-006-0197-6

Salgado VL, Sheets JJ, Watson GB, Schmidt A, Studies on the mode of action of spinosad: the internal effective concentration and the concentration and dependence of neural excitation. *Pestic Biochem Physiol.* 1998; 60:103-110

Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases – A review. *Current Med Chem.* 1999; 6: 279–309.

Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 3rd ed. 2001; 3: 2288 pp.

Samy AM, Elaagip AH, Kenawy MA, Ayres CFJ, Peterson AT, Soliman DE. Climate Change Influences on the Global Potential Distribution of the Mosquito *Culex quinquefasciatus*, Vector of West Nile Virus and Lymphatic Filariasis. *PLoS ONE* 2016; 11(10): e0163863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163863>

Santana-Martínez J, Molina J, Dussán J. Asymmetrical competition between *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Coexisting in breeding sites. *Insects* 2017; 8(4): 111. doi:10.3390/insects8040111

Santana-Martinez JC, Silva JJ, Dussan J. Efficacy of *Lysinibacillus sphaericus* against mixed-cultures of field-collected and laboratory larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Bull Entomol Res. 2018; 53:183–91.

Santos EM de M, Regis LN, Silva-Filha MHNL, Barbosa RMR, Melo-Santos MAV de; Gomes TCS, Oliveira CMF. The effectiveness of a combined bacterial larvicide for mosquito control in an endemic urban area in Brazil. Biol Control. 2018;121:190–8.

Santos IM dos, Calado D. Captura de mosquitos antropofílicos (Diptera, Culicidae) em uma área urbana da região oeste da Bahia, Brasil. Iheringia, Série Zoologia. 2014;104(1):32-38.

Santos MAV de M; Regis LN, Lopes CFJA, Oliveira CMF de, Barbosa RMR, Guedes DRD, et al. Tecnologias integradas para controle biológico, mecânico e genético de *Aedes aegypti*. Comun Ciênc Saúde. 2018; 28(1):58-63. Disponível em: <<http://www.escs.edu.br/revistaccs/index.php/comunicacaoemcienciasdasaude/article/view/117>> Acesso em: 23/07/2019

Sasa M, Kurihara T, Harinasuta C. Studies on mosquitoes and their natural enemies in Bangkok. Part I. Observations on the bionomics of *Culex pipiens fatigans* Wiedemann. Jap J Exp Med. 1965; 35: 2349.

Sathantriphop S, Ketavan C, Prabaripai A, Visetson S, Bangs MJ, Akratanakul P, Chareonviriyaphap T. Susceptibility and avoidance behavior by *Culex quinquefasciatus* Say to three classes of residual insecticides. J Vector Ecol. 2006; 31(2): 266–274. doi:10.3376/1081-1710(2006)31[266:saabbc]2.0.co;2

Sattelle DB. GABA Receptors of Insects. Adv Insect Physiol. 1990; 22:1–113. doi:10.1016/s0065-2806(08)60005-3

Sawicki RM, Definition, detection and documentation of insecticide resistance, in Combating Resistance to Xenobiotics: Biological and Chemical Approaches, ed. by Ford MG, Holloman DW, Khambay BPS, and Sawicki RM, Ellis Horwood, Chichester, UK. 1987; 105-117.

Say T. Descriptions of dipterous insects of the United States. J Acad Nat Sci Phila. 1823; 3: 9-54.

Schumacher M, Camp S, Maulet Y, Newton M, MacPhee-Quigley K, Taylor SS, Friedman T, Taylor P. Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. Nature 1986; 319(6052):407–409. doi:10.1038/319407a0

Scott JG, Liu N, Wen Z. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 1998; 121(1-3): 147–155. doi:10.1016/s0742-8413(98)10035-x

Scott JG. Insecticide resistance in insects, Tn D. Pimentel [ed.], *CHC handbook of pest management in agriculture*. CHC, Boca Haton, FL. 1991; 663-677.

Self LS, Abdulcader MH, Tun MM. Preferred biting sites of *Culex pipiens fatigans* on adult Burmese males. *Bull World Health Organ*. 1969;40(2):324–327.

Serra OP, Cardos BF, Ribeiro ALM, Santos FAL dos, Silhessarenko RD. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016; 111(1): 20-29.

Shalan EA-S, Canyon DV. Aquatic insect predators and mosquito control. *Trop Biomed*. 2009;26(3):223–261.

Sharma VP, Patterson RS, LaBrecque GC, Singh KRP. Three field releases with chemosterilized *Culex pipiens fatigans* Wied. in Delhi villages. *J Commun Dis* 1976; 8:18-27.

Sherlock IA, Piesman J. Controle da transmissão da doença de chagas, pelo combate aos vetores, com bendiocarb, feito pelos habitantes. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1984; 17:67-72.

Shropshire JD, Leigh B, Bordenstein SR, Duploux A, Riegler M, Brownlie JC, Bordenstein SR. Models and Nomenclature for Cytoplasmic Incompatibility: Caution over Premature Conclusions – A Response to Beckmann *et al*. *Trends Genet*. 2019; 35(6): 397-399.

Silva DO da, Pessoa GCD, Felício JC de S, Diotaiuti LG, Oliveira MT da C, Brandão ST. Boletim de Vigilância em Saúde - Controle de zoonoses: combate a percevejos de cama. Prefeitura de Belo Horizonte. 2016. Disponível em: <<https://prefeitura.pbh.gov.br/sites/default/files/estrutura-de-governo/saude/2018/publicacoes-da-vigilancia-em-saude/boletim-gvsi-percevejos.pdf>> Acesso em: 22/04/2019

Silva J J, Scott JG. Conservation of the voltage-sensitive sodium channel protein within the Insecta. *Insect Mol Biol*. 2019;1-10. doi:10.1111/imb.12605

Silva Martins WF, Wilding CS, Isaacs AT, Rippon EJ, Megy K, Donnelly MJ. Transcriptomic analysis of insecticide resistance in the lymphatic filariasis vector *Culex*

*quinquefasciatus*. Scientific Reports. 2019; 9(1):11406. doi:10.1038/s41598-019-47850-w

Silva Martins WF, Wilding CS, Steen K, Mawejje H, Antão TR, Donnelly MJ. Local selection in the presence of high levels of gene flow: Evidence of heterogeneous insecticide selection pressure across Ugandan *Culex quinquefasciatus* populations. PLoS Negl Trop Dis 2017; 11(10): e0005917. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005917>

Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Jean-François C. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Insect Biochem Mol Biol. 1999; 29(8):711–721. doi:10.1016/s0965-1748(99)00047-8

Silva-Filha MH, Regis L., Nielsen-LeRoux C, Charles JF. Low level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Dipter: Culicidae). J Econ Entomol. 1995; 88:525-30.

Sinkins SP, Braig HR, O'Neill SL. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1995; 261(1362):325–330. doi:10.1098/rspb.1995.0154

Sirivanakarn S, White GB. Neotype designation of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Proc Entomol Soc Wash. 1978; 80:360–372.

Smith TF, Waterman MS. Local homologies algorithm to align sequences. Adv Appl Math 1981; 2:482-489.

Soderlund DM, Bloomquist JR. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Roush RT, Tabashnik BE. (eds) Pesticide resistance in arthropods. Springer, Boston, MA. 1990; 58–96. doi:10.1007/978-1-4684-6429-0\_4

Soderlund DM, Bloomquist JR. Neurotoxic Actions of Pyrethroid Insecticides. Ann Rev Entomol. 1989; 34(1):77–96. doi:10.1146/annurev.en.34.010189.0004

Soderlund DM, Knipple DC. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochem Mol Biol. 2003; 33(6):563–577. doi:10.1016/s0965-1748(03)00023-7

Sparks TC, Lockwood JA, Byford RL, Graves JB, Leonard BR. The role of behavior in insecticide resistance. Pestic Sci. 1989; 26(4):383–399. doi:10.1002/ps.2780260406

Steffan WA, Evenhuis NL, Manning DL. Annotated bibliography of toxorhynchites (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology, Honolulu, Suppl. 1980; 3: 140 p.

Stouthamer R, Breeuwer J AJ, Hurst, GDD. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. Annu Rev Microbiol. 1999; 53(1), 71–102. doi:10.1146/annurev.micro.53.1.71

Su T, Cheng M-L, Melgoza A, Thieme J. Laboratory and field evaluations of Mosquiron® 0.12CRD, a new formulation of novaluron, against *Culex* Mosquitoes. J Am Mosq Contr Assoc. 2014; 30(4):284–290. doi:10.2987/14-6433r.1

Su T, Zaim M, Mulla MS. Laboratory and field evaluation of novaluron, a new insect growth regulator (IGR), against *Culex* mosquitoes. J Am Mosq Contr Assoc. 2003; 19: (In Press).

Subra R. *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, vecteur possible de la filariose urbaine à *Wuchereria bancrofti* Cobbold en Afrique de l'ouest. Rap. fin. multigr. 5ème conf. tech. OCCGE, Bobo-Dioulasso. 1965; 1:193-195.

Subra R. 1981. Biology and control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say 1823 (Diptera, Culicidae) with special reference to Africa. Insect Sci. Appl. 1: 319–338.

Subra R. Etudes écologiques sur *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, 1928, (Diptera, Culicidae) dans une zone urbaine de Savanne soudanienne ouest-africaine. Tendances endo-exophages et cycle d'agressivité. Cah. ORSTOM. Sér Ent Méd Parasit. 1972; 10:335-345.

Suchman EL, Kononko A, Plake E, Doehling M, Kleker B, Black WC, Buchatsky L, Carlson J. (2006). Effects of AeDNV infection on *Aedes aegypti* (L.) lifespan and reproduction. Biol. Control. 2006.(in press).

Sullivan JB Jr., Blose J. Organophosphate and carbamate insecticides. In: Sullivan JB, Krieger GR, eds. Hazardous materials toxicology: clinical principles of environmental health. Baltimore, Maryland, United States of America: Williams and Wilkins; 1992; 1015–1026.

Tabachnick WJ, 1991. Evolutionary genetics and arthropod born disease. The yellow fever mosquito. Am Entomologist 37: 14– 24.

Tafuri J. & Roberts J. Organophosphate poisoning. Ann Emerg Med. 1987; 16(2): 193–202. doi:10.1016/s0196-0644(87)80015-x

Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993; 10:512-526.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 2011; 28(10):2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121

Tantely ML, Tortosa P, Alout H, Berticat C, Berthomieu A, Rutee A, Dehecq J-C, Makoundou P, Labbé P, Pasteur N, Weill M. Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Réunion Island. *Insect Biochem Mol Biol* 2010; 40(4):317–324. doi:10.1016/j.ibmb.2010.02.005

Taskin BG, Dogaroglu T, Kilic S, Dogac E, Taskin V. (2016). Seasonal dynamics of insecticide resistance, multiple resistance, and morphometric variation in field populations of *Culex pipiens*. *Pestic Biochem Physiol.* 2016; 129:14–27. doi:10.1016/j.pestbp.2015.10.012

Tawatsin A, Thavara U, Bhakdeenuan P, Chomposri J, Siritasatien P, Asavadachanukorn P, Mulla MS. Field evaluation of novaluron, a chitin synthesis inhibitor larvicide, against mosquito larvae in polluted water in urban areas of Bangkok, Thailand, *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2007; 38(3): 434–441.

Thomas DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey L. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science.* 2000; 287(5462):2474-6. DOI: 10.1126/ science.287.5462.2474

Torres ALQ. Organização e evolução da família gênica carboxilesterase em artrópodes. [Dissertação] Mestrado em Biologia Computacional e Sistemas. - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2013; 123pp.

Tram U, Fredrick K, Werren JH, Sullivan W. Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility phenotype. *J Cell Sci.* 2006; 119 (17), 3655–3663.

Tsai TF, Mitchell CJ. St. Louis encephalitis, In: Monath TP (ed) *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, CRC Press, Boca Raton, USA 1989; 4:113-143.

Ukubuiwe AC, Ojianwuna CC, Olayemi IK, Arimoro FO, Omalu ICJ, Ukubuiwe CC, Baba BM. Quantifying the Influence of Larval Density on Disease Transmission Indices

in *Culex quinquefasciatus*, the Major African Vector of Filariasis. *Int J Insect Sci.* 2019; 11:1179543319856022. doi: 10.1177/1179543319856022.

Van Meer MMM, Witteveldt J, Stouthamer R. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Mol Biol.* 1999; 8(3):399–408. doi:10.1046/j.1365-2583.1999.83129.x

Vannini L, Reed TW, Willis, JH. Temporal and spatial expression of cuticular proteins of *Anopheles gambiae* implicated in insecticide resistance or differentiation of M/S incipient species. *Parasit Vectors.* 2014; 7(1), 24. doi:10.1186/1756-3305-7-24

Vaughan A, Hawkes N, Hemingway J. Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Biochem. J.* 1997; 325:359–365.

Vijverberg HPM, van den Bercken J. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Crit Rev Toxicol.* 1990; 21(2):105–126.

Vilarinhos PTR, Dias JMCS, Andrade CFS, Araújo-Coutinho CJPC. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlideos. In: Alves SB. *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz; 1998. p. 447-80.

Viswan KA, Pushpalatha E, Azhahianambi P. Application of synthetic insecticide and change in detoxifying enzyme levels in *Culex quinquefasciatus* Say. *Int J Mosq Res* 2016; 3:31-5.

Viswan KA, Syama MC, Pushpalatha E. Carboxyl Esterase and GST levels of *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* L. collected from the selected sites of Malappuram district. *Int Ed Appl Sci.* 2019; 4(7): e-ISSN : 2456-5040.

Vontas J, David J-P, Nikou D, Hemingway J, Christophides GK, Louis C, Ranson, H. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Molecular Biology.* 2007; 16(3): 315–324. doi:10.1111/j.1365-2583.2007.00728.x

Vontas JG, Small GJ, Hemingway J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J.* 2001; 357:65–72.

Walker T, Song S, Sinkins SP. *Wolbachia* in the *Culex pipiens* group mosquitoes: introgression and superinfection. *J Hered.* 2008; 100(2):192–196. doi:10.1093/jhered/esn079

- Wang J, Chuang K, Ahluwalia M, Patel S, Umblas N, Mirel D, Higuchi R, Germer S. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with T<sub>m</sub>-shift primers. *BioTechniques*. 2005; 39(6):885–893. doi:10.2144/000112028
- Wang Z-M, Li C-X, Xing D, Yu Y-H, Liu N, Xue R-D, Dong Y-D, Zhao T-Y. Detection and widespread distribution of sodium channel alleles characteristic of insecticide resistance in *Culex pipiens* complex mosquitoes in China. *Medical and Veterinary Entomology* 2012; 26(2):228–232. doi:10.1111/j.1365-2915.2011.00985.x
- Ware G, Whitacre D. An introduction to insecticides, 4<sup>a</sup> ed. In: *The Pesticide Book*, 6<sup>a</sup> ed (eds O. Willoughby), Meister Pro Information Resources, Willoughby, OH, USA, 2004. Disponível em: < <https://ipmworld.umn.edu/ware-intro-insecticides> > Acesso em: 07/04/2019
- Watson GB. Actions of Insecticidal Spinosyns on  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Responses from Small-Diameter Cockroach Neurons. *Pestic Biochem Physiol*. 2001;71(1):20–8.
- Weill M, Fort P, Raymond M, Pasteur N. Acetylcholinesterase gene responsible for insecticide resistance and applications thereof. United States. Centre National de la Recherche Scientifique. Universite de Montpellier. Patente: 8198061. 2012; 161pp. Disponível em: < <http://www.freepatentsonline.com/8198061.pdf> > Acesso em: 24/09/2018
- Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond, M. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature*. 2003; 423(6936):136–137. doi:10.1038/423136b
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol*. 2004; 13(1):1–7. doi:10.1111/j.1365-2583.2004.00452.x
- Weinstein P, Laird M, Browne G. Exotic and endemic mosquitoes in new zealand as potential arbovirus vectors. *Occas Pap Minist Health*, Wellington, New Zealand, 1997, 16.
- Werren JH, Bartos JD. Recombination in *Wolbachia*. *Curr Biol*. 2001; 11(6):431–435. doi:10.1016/s0960-9822(01)00101-4
- Werren JH, Zhang W, Guo LR. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive parasites of arthropods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1995; 261(1360):55–63. doi:10.1098/rspb.1995.0117



Wheeler CM. Control of typhus in Italy 1943-1944 by use of DDT. Am J Public Health. 1946; 36: 119-129.

White GB. The present importance of domestic mosquitoes (*Culex pipiens fatigans* Wiedemann) in East Africa and recent steps towards their control. E. Afr. med. J. 1971; 48, 266-274.

WHO - World Health Organization. Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors, Global Malaria Programme. 2012;132pp. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44846/9789241564472\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44846/9789241564472_eng.pdf)> Acesso em: 25/10/2019

WHO - World Health Organization. Insecticides seventh report of the expert committee. Technical Report Series No. 125, 1957; 31p.

WHO - World Health Organization. Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations: Interim guidance for entomologists. In: WHO/ZIKV/VC/161: World Health Organization; 2016, 13pp.

WHOPES. Discriminating concentrations of insecticides for adult mosquitoes. WHO Pesticide Evaluation Scheme. 2016. Disponível em: <[https://www.who.int/neglected\\_diseases/vector\\_ecology/resources/en/Diagnostic\\_concentrations.pdf?ua=1](https://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/resources/en/Diagnostic_concentrations.pdf?ua=1)> Acesso em: 18/04/2018

Wiedemann CRW. Ausereuropäische zweiflügelige Insekten. 1828. Vol vol. 1. Hamm. 608 pp.

Wiesmann, R, Gasser R, Grob, H. (1951). Über ein neuartiges, selektives Aphizid mit Tiefenwirkung. Experientia. 1951; 7(3):117–120. doi:10.1007/bf02165571

Wigglesworth VB. The insect cuticle. Biol Rev. 1948; 23(4): 408–451. doi:10.1111/j.1469-185x.1948.tb00566.x

Wigglesworth VB. The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and metamorphosis. Q J Microsc Sci. 1934;77:121-222.

Wilke ABB, Gomes AC, Natal D, Marrelli MT. Controle de vetores utilizando mosquitos geneticamente modificados. Rev Saúde Pública. 2009 43(5): 869-874.

Wilke ABB, Scaif S, Alphey L, Marrelli MT. DsRed2 transient expression in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2013; 108(4):529–531.

Wilke ABB, Vidal PO, Suesdek L, Marrelli MT. Population genetics of neotropical *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*. 2014;7(1): 468. doi:10.1186/s13071-014-0468-8

Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA, Devonshire AL. Identification of mutations in the houseflypara-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet*. 1996; 252(1-2):51–60. doi:10.1007/bf02173204

Wirth MC, Marquine M, Georghiou GP, Pasteur N. Esterases A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): Role in Organophosphate Resistance and Linkage. *J Med Entomol*. 1990; 27(2): 202–206. doi:10.1093/jmedent/27.2.202.

Wondji CS, Priyanka De Silva WAP, Hemingway J, Ranson H, Parakrama Karunaratne, SHP. Characterization of knockdown resistance in DDT- and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* populations from Sri Lanka. *Trop Med Int Health*. 2008; 13(4):548–555. doi:10.1111/j.1365-3156.2008.02033.x

Wong SK, Lee WO. Survey of organochlorine pesticide residues in milk in Hong Kong (1993-1995). *Journal of AOAC International*. 1997; 80:1332-1335.

World Health Organization (WHO). Environmental management for vector control: third report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control, 1980; 77pp.

Wouters W, van Den Bercken J. Action of pyrethroids. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1978; 9(6): 387–398. doi:10.1016/0306-3623(78)90023-x

Wyss JH. Screwworm eradication in the Americas. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 916:186-93.

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

Yadouléton A, Badirou K, Agbanrin R, Jöst H, Attolou R, Srinivasan R, Padonou G, Akogbéto M. Insecticide resistance status in *Culex quinquefasciatus* in Benin. *Parasit Vectors* 2015; 8(1): 17. doi:10.1186/s13071-015-0638-3.

Yahouédo GA, Chandre F, Rossignol M, Ginibre C, Balabanidou V, Mendez NGA, Pigeon O, Vontas J, Cornelie, S. Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Scientific Reports*. 2017; 7(1): 11091. doi:10.1038/s41598-017-11357-z

- Yamamoto D, Quandt FN, Narahashi T. Modification of single sodium channels by the insecticide tetramethrin. *Brain Res.* 1983; 274, 344-349.
- Yang HM, Thomé RCA. Controle ótimo do mosquito *Aedes Aegypti* via Técnica de Insetos Estéreis. Departamento de Matemática Aplicada-IMECC-Unicamp. Campinas, SP. 2007.
- Yang Y, Wu Y, Chen S, Devine GJ, Denholm I, Jewess P, Moores GD. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004; 34(8): 763–773. doi:10.1016/j.ibmb.2004.04.001
- Yanola J, Chamnanya S, Lumjuan N, Somboon P. Insecticides resistance in the *Culex quinquefasciatus* populations from northern Thailand and possible resistance mechanisms. *Acta Tropica.* 2015; 149: 232–238. doi:10.1016/j.actatropica.2015.06.011
- Yasuno M, MacDonald WW, Curtis CF, Grover KK, Rajagopalan PK, Sharma LS, Singh D, Singh KRP, Agarwal HV, Kazmi SJ, Menon PKB, Menon R, Razdan RK, Samuel D, Vaidyanathan V. A control experiment with chemosterilized male *Culex pipiens fatigans* in a village near Delhi surrounded by a breeding free zone. *Jpn J Sanitary Zool* 1976; 29:325-43
- Zhou L, Lawrence GG, Vineis JH, McAllister JC, Wirtz RA, Brogdon WG. Detection of Broadly Distributed sodium channel alleles characteristic of insect pyrethroid resistance in West Nile Virus vector *Culex pipiens* complex mosquitoes in the United States. *J Med Entomol.* 2009; 46(2): 321–327. doi:10.1603/033.046.0217
- Zhou W, Rousset F, O'Neill S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1998; 265(1395):509–515. doi:10.1098/rspb.1998.0324
- Zlotkin E. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu Rev Entomol.* 1999; 44(1):429–455. doi:10.1146/annurev.ento.44.1.429

## REVIEW

## Open Access



# Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 in Brazil: a review

Ramon Pereira Lopes<sup>1</sup>, José Bento Pereira Lima<sup>1</sup> and Ademir Jesus Martins<sup>1,2\*</sup>**Abstract**

*Culex quinquefasciatus* is a successful invasive species broadly distributed in subtropical regions, including Brazil. It is an extremely annoying mosquito due to its nocturnal biting behavior, in high-density populations and it is a potential bridge between sylvatic arbovirus from birds to man in urban territories. Herein, we present a review concerning the methods of chemical control employed against *Cx. quinquefasciatus* in Brazil since the 1950's and insecticide resistance data registered in the literature. As there is no specific national programme for *Cx. quinquefasciatus* control in Brazil, the selection of insecticide resistance is likely due in part to the well-designed chemical campaigns against *Aedes aegypti* and the elevated employment of insecticides by households and private companies. There are very few publications about insecticide resistance in *Cx. quinquefasciatus* from Brazil when compared to *Ae. aegypti*. Nevertheless, resistance to organophosphates, carbamate, DDT, pyrethroids and biolarvicides has been registered in *Cx. quinquefasciatus* populations from distinct localities of the country. Concerning physiological mechanisms selected for resistance, distinct patterns of esterases, as well as mutations in the acetylcholinesterase (*ace-1*) and voltage-gated sodium channel (*Na<sub>v</sub>*) genes, have been identified in natural populations. Given environmental changes and socioeconomical issues in the cities, in recent years we have been experiencing an increase in the number of disease cases caused by arboviruses, which may involve *Cx. quinquefasciatus* participation as a key vector. It is urgent to better understand the efficiency and susceptibility status to insecticides, as well as the genetic background of known resistant mechanisms already present in *Cx. quinquefasciatus* populations for an effective and rapid chemical control when eventually required.

**Keywords:** Vector control, Southern house mosquito, Insecticide resistance monitoring, Urban vector, Filarial vector

**Background**

*Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) known as the southern house mosquito, is a subtropical mosquito belonging to the complex *Culex pipiens*, present in the Americas, Australia, Asia, Africa, Middle East and New Zealand, as well as being broadly distributed in Brazil [1, 2]. Amongst the several species in genus *Culex* registered in Brazil [3], *Cx. quinquefasciatus* stands out as the most abundant and anthropophilic species [4]. In addition to the considerable discomfort caused by the nocturnal biting behavior, *Cx. quinquefasciatus* is the

main vector of several pathogens, especially including the nematode *Wuchereria bancrofti* (agent of bancroftian filariasis) and the West Nile virus [5, 6]. As mosquitoes from the complex *Cx. pipiens* feed both on human and bird blood, they may potentially transport sylvatic arboviruses from migratory birds to man in urban territories [7]. This mosquito is also a potential vector of the arboviruses responsible for the Rift Valley fever [8] and Saint Louis encephalitis [9]. In the recent Brazilian Zika outbreak, samples of *Cx. quinquefasciatus* from urban environments were detected to be infected with ZIKV, suggesting participation in a new cycle of this emergent arbovirus in some regions [10, 11]. Similarly, its role has also been implied in the transmission of the emergent Mayaro virus in urban centers [12]. Other studies considering systems of infection in the laboratory demonstrated

\*Correspondence: ademirjr@ioc.fiocruz.br

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodos Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil  
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2019. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

**Anexo I - Publicação realizada na revista *Parasites & Vectors*.**

that *Cx. quinquefasciatus* would also be competent to transmit the protozoan *Plasmodium relictum* (agent of bird malaria) [13] and *Hepatozoon breinli*, an intracellular parasite infecting birds, reptiles, amphibians and rodents [14]. An extensive list of viruses, protozoans and nematodes isolated from *Cx. quinquefasciatus* under natural and laboratory conditions can be found elsewhere [15].

In the absence of effective vaccines available against most of the *Culex*-transmitted pathogens, the best strategy to avoid transmission relies on the chemical control of the mosquito [16]. At the end of the last century, the World Health Organization (WHO) launched a manual focused on mosquito vector control, including *Culex* spp., highlighting the necessity of measures to prevent their reproduction and dispersion [17]. Although *Culex* spp. females preferentially lay their eggs in collections of water, either stagnant or gentle flow, rich in organic matter, *Cx. quinquefasciatus* is very opportunistic so that any permanent or temporary collection of water may serve as a potential breeding site for their larvae [1, 18]. Therefore, vector control planning has to focus on breeding-site elimination or treatment by improving the basic sanitary infrastructure of water supply and waste destination, as well as activities to promote community engagement within an environmental agenda. However, given the accelerated and disorganized process of urbanization in the last decades, especially in the tropical, low-income countries, these tasks are too complex to be fully achieved. Additionally, even in well-developed regions, the density of these mosquitoes may be positively correlated with seasonal high temperatures [19, 20]. In this scenario, chemical larvicides or polystyrene granules can be applied to water collections. Insecticide residual spraying (IRS) in the interior of the houses is generally not effective against *Cx. quinquefasciatus* given its habit of posing on substrates generally not treated with insecticide, such as cloth, curtains and other suspended fabrics, instead of resting on the walls and ceiling [17].

The first official actions in Brazil specifically targeting *Cx. quinquefasciatus* based on chemical control were during the years 1951–1955, as a first phase of a governmental campaign to control Bancroftian filariasis [21]. This campaign was coordinated by the National Service of Malaria, opting the use of hexachlorobenzene (BHC), dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and dieldrin as residual action insecticides [22]. The second phase of this campaign was initiated in 1956, with the creation of the National Department of Rural Endemics (DNERu). By 1960, 120,339 midguts were dissected from female mosquitoes caught in filariasis endemic areas, which recognized *Cx. quinquefasciatus* (at that time named *Cx. pipiens fatigans*) as the main vector in the country [21]. In the following decade, Brazilian national campaigns

against filariasis were coordinated by the Superintendence of Public Health Campaigns (SUCAM). These campaigns aimed at eradicating or controlling the filariasis transmission in endemic areas by treating committed persons with the chemotherapy diethylcarbamazine, as well as decreasing the density of the mosquito by improving the sanitary infrastructure and applying residual insecticides (BHC and dieldrin) against both larvae and adult stages of *Cx. quinquefasciatus* [22].

The employment of residual insecticides (BHC, DDT and dieldrin) for controlling adult mosquitoes was incipiently effective. Nevertheless, they became ineffective, their use being suspended [22]. Given the lack of an efficient adulticide together with the high cost of larvicide applications in the breeding sites, the chemical treatment was discontinued and the national programmes centralized their actions on the treatment of human cases and health educational programmes [22]. Currently, the Brazilian Ministry of Health (MoH) acquires the insecticides and provides them to the states, which supply the municipalities. In turn, the municipalities have autonomy to complement alternative compounds in their territories, as long as they are approved by the WHO and the Brazilian National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) [23]. There is no specific national programme for combating *Culex*, as most of the governmental actions against this mosquito are a side-effect of the well-structured programme for *Aedes aegypti* control. In this sense, most of the insecticide selection pressure geared toward *Cx. quinquefasciatus* populations in Brazil is substantially derived from that targeting *Ae. aegypti* [24].

In the last three decades the main larvicides utilized in Brazil under national scale against *Ae. aegypti* have been the organophosphate temephos, followed by the IGRs (insect growth regulators class) diflubenzuron, novaluron and more recently, pyriproxyfen. Pyrethroids were adopted as adulticides from 2000 until 2013 when the organophosphate malathion began to be implemented, as the only permissible alternative after reports that pyrethroid resistance in *Ae. aegypti* was apparent all over the country [23, 25]. Nevertheless, commercial pyrethroids have intensively been sprayed inside the dwellings as well as under thermo-fogging or ultra-low volume in the peri-domicile by private companies. In addition to neurotoxic insecticides, as recommended by the WHO [26], the bacterium *Lysinibacillus sphaericus* (*Lbs*), previously known as *Bacillus sphaericus* (*Bs*) [27], is also indicated and largely enlisted as a biolarvicide for *Culex* control [28]. *Lysinibacillus sphaericus* began to be exploited on a large scale for *Culex* control in Brazil since 1989, ever since used as a larvicide by the Filariasis Elimination Programme in Recife/PE and on the border of the Pinheiro River in São Paulo [29, 30].

## Anexo I - Publicação realizada na revista *Parasites & Vectors* (continuação).

Likewise, as with *Aedes* and *Anopheles* mosquitoes, the exacerbated use of insecticides has been selecting resistant *Cx. quinquefasciatus* populations around the world [31–34]. Resistance to insecticides is a multi-factorial genetic trait, preceding insecticide exposure. Normally, the frequency of resistant insects in natural populations is very low in an environment free of insecticides, i.e. without a selection pressure. Hence, the continuous application of insecticides favorably selects the resistant individuals, while those susceptible are progressively eliminated, reducing the genetic variability of the target population [35]. Depending on the intensity of the selection pressure over genetically well-structured and isolate populations, resistance may become irreversible due to the lack of susceptible mosquitoes to contribute their genes to the next generations, where migration among other populations is absent or very low [36]. In Brazil, in addition to the chemicals employed in governmental campaigns, the uncontrolled application by households increases during arbovirus outbreaks and also when targeting *Culex* itself due to its usual high densities and annoying nocturnal biting behavior [37, 38]. As the odor of pyrethroids is less noxious to the people, this class of insecticide is largely preferred [39, 40]. There is evidence that this excessive household use of chemicals is the main factor contributing to pyrethroid resistance selection in *Ae. aegypti* [41, 42], *Cx. quinquefasciatus* populations as such being likely to experience a similar phenomenon.

There are four main classes of mechanisms attributed to resistance in a mosquito population: behavioral changes, decrease of cuticular penetration, increase in the metabolic detoxification and alteration in the insecticide target-molecule, these two latter mechanisms being the mostly molecularly elucidated [43–45]. An increase in the metabolic detoxification may occur due to an increase in the detoxification power, generally related to the classes of enzymes esterases, glutathione S-transferases (GSTs) and multi-function oxidases P450s, which are able to modify or break up the insecticide molecules before they reach their target. In turn, target-site alterations inhibit the interaction between the insecticide and its action target molecules, rendering the insecticide less effective or even ineffective [46].

In 2011, the Brazilian MoH launched a surveillance and control methods guide against *Cx. quinquefasciatus*, recommending the use of neurotoxic (pyrethroids, carbamates or organophosphates) and IGR compounds (juvenile hormones analogues and benzophenil ureas, as chitin synthesis inhibitors) in conjunction with the biolarvicide *Lbs* [5], very similarly as indicated against *Ae. aegypti*. The compounds currently indicated by the MoH are: organophosphates and pyrethroids for adult control and spinosyns; bacterium biolarvicides; benzophenilureas;

juvenile hormone analogues; and organophosphates against larvae [47]. Nevertheless, there are some reports of *Cx. quinquefasciatus* populations resistant to some of these compounds in the country (see Fig. 1). A list with insecticide resistance data available in the literature, including susceptibility tests, biochemical and molecular assays, distributed per region and year are provided in Table 1.

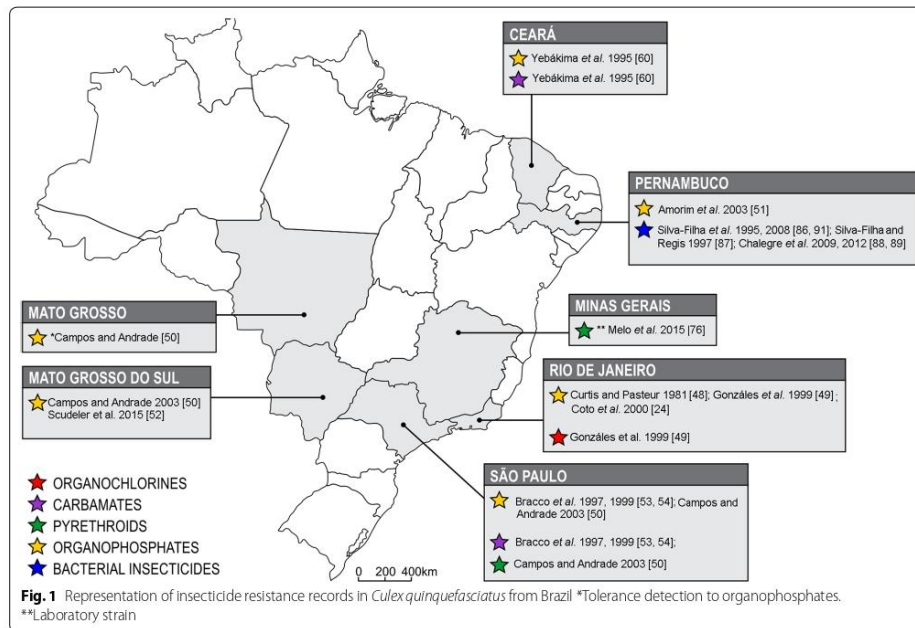
#### Organophosphates and carbamates

First reports of organophosphate resistance in *Cx. quinquefasciatus* from Brazil came from Rio de Janeiro populations evaluated with chlorpyrifos in 1978 [48] and later in 1994 [49]. Resistance to the larvicide temephos was described in populations from Campinas (São Paulo State) [50], Santa Cruz do Capibaribe (Pernambuco State) and Campo Grande [51] and Navirai [52] (Mato Grosso do Sul State). In addition, a population from Cuiabá (Mato Grosso State) collected in 2000 was classified as “tolerant”, while *Ae. aegypti* collected at the same site and year were susceptible to the insecticide [50]. Resistance to the carbamate propoxur was evidenced in *Cx. quinquefasciatus* collected in the region of Pinheiros River in the center of São Paulo, in 1995 and 1996 [53]. Also, in São Paulo, resistance was detected to both organophosphates malathion and fenitrothion [53, 54] and to malathion (RR<sub>50</sub> of 43.81) in Rio de Janeiro [24].

High levels of resistance to malathion were also observed in *Cx. quinquefasciatus* from other Latin American countries such as Cuba (RR<sub>50</sub> of 207.91 and 135.97) and to a lesser extent Venezuela (RR<sub>50</sub> of 16.11). The authors considered that the intense employment of the OP temephos, malathion and propoxur and also pyrethroids, for the first dengue outbreaks in the 1980’s, contributed to control *Ae. aegypti*, however inducing resistance in *Cx. quinquefasciatus* to OPs and propoxur [55, 56]. In Brazil, resistance to temephos is currently disseminated in *Ae. aegypti* populations throughout the country which forced the National Dengue Control Programme to replace this chemical by Insect Growth Regulators (IGRs) compounds [25]. This scenario of disseminated resistance to temephos might as well be extended to *Cx. quinquefasciatus*. For example, more than 40,000 kg of temephos were applied in the city of Santa Cruz do Capibaribe alone against *Ae. aegypti* during 2007–2010 which was likely the source of pressure that selected resistant *Cx. quinquefasciatus* in the region [51].

Organophosphates and carbamates both target the acetylcholinesterase enzyme (AChE), causing the accumulation of the neurotransmitter acetylcholine in a synaptic shift, which inhibits the interruption of a nervous impulse and therefore, kills the insect. The metabolic

## Anexo I - Publicação realizada na revista *Parasites & Vectors* (continuação).



enzyme participation also plays an important role in organophosphate resistance in *Culex*. For instance, a gene or a set of esterase genes suffered several duplications, causing the increase of their codified enzymes and consequently, more sequestration of the insecticide molecule [57–59]. The register of detoxifying enzyme quantification associated with insecticide resistance in *Cx. quinquefasciatus* from Brazil was noted in populations from Fortaleza [60], São Paulo [53], Santa Cruz do Capibaribe [51] and Rio de Janeiro [24, 49].

A single nucleotide polymorphism (SNP) in the acetylcholinesterase gene (*ace-1*) with the substitution of a Gly by a Ser in the 119 codon (G119S, *ace-1<sup>R</sup>* allele) is a target site mechanism mostly displayed in *Culex* populations resistant to organophosphates. The same G119S SNP is also found in other insects, including *Anopheles* mosquitoes [61–63]. Other mutations (F290V and F331W) were also described in the *Culex ace-1* gene, also possibly related to resistance to organophosphates [64–67]. The G119S was the only *ace-1* mutation found in *Cx. quinquefasciatus* from Brazil, in the localities of São Paulo [53], Recife [64], Santa Cruz do Capibaribe [51] and Rio de Janeiro [68].

#### Organochlorines and pyrethroids

The organochlorine DDT and the pyrethroids act in the voltage-gated sodium channel ( $Na_v$ ) in the neuron membranes, prolonging its open state. This interaction results in a repetitive firing of the nervous impulse, leading the insect to involuntary muscle spasms, exhaustion and death, a phenomenon known as knockdown effect [69]. Organochlorine may also inhibit the gamma-aminobutyric acid (GABA)-gated chloride channel. This is the case of cyclodienes, such as dieldrin which antagonizes the effects of the GABA receptor by preventing chloride ions from entering the neurons, thus inhibiting the return to resting state after an impulse transmission. A classical mutation (A302S) in the GABA receptor induces resistance to dieldrin, thus being referred to as RDL in several insects including *Cx. quinquefasciatus* [70, 71]. No substitution in the GABA gene has been reported in populations from Brazil. Increase in the action of detoxifying enzymes is usually related to DDT- and pyrethroid resistance, especially GST and monooxygenases P450 classes [72, 73]. However, given the diversity of multiple genes in these classes, it is difficult to find the same specific molecular marker for metabolic resistance across distinct

**Anexo I - Publicação realizada na revista *Parasites & Vectors* (continuação).**

**Table 1** List of insecticide resistance data on *Culex quinquefasciatus* field-collected in Brazil

Macro Region	State	Region	Year	Insecticide	Bioassay Dose-response RR <sub>50</sub> (LC <sub>50</sub> or LT <sub>50</sub> ) or RR <sub>95</sub> (LC <sub>95</sub> )	Diagnostic-dose		Biochemical and molecular assays		
						Dose (%mortality)	Status <sup>d</sup>	Method	Detected mechanism	Reference
North	Amazonas	Manaus	1978	Chlorpyrifos	1.3 (0.0008)	–	S	–	–	Curtis & Pasteur [48]
North-East	Pernambuco	Recife	1995	–	–	–	–	Sequencing	G1195 ace-1 <sup>R</sup>	Weill et al. [64]
		Coque <sup>a</sup>	1991–1993	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	9.7 (0.0367)	–	Low resistance	Binding experiments	Slight decrease in the receptor concentration	Silva-Filha et al. [86]
			1991–1993	<i>Bacillus thuringiensis</i> svar. <i>israelensis</i>	2.0 (0.01)	–	S	–	–	Silva-Filha et al. [86]
			1996	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	1.3–7.3 (0.0013–0.0313)	–	Low resistance	–	–	Silva-Filha & Regis [87]
			1996	<i>Bacillus thuringiensis</i> svar. <i>israelensis</i>	1.0 (0.009)	–	S	–	–	Silva-Filha & Regis [87]
		Água Fria <sup>a</sup>	2005–2010	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	2.7–8.6 (0.008–0.024)	–	Low resistance	AS-PCR	cqm <sub>1REC</sub> (0.033–0.055) <sup>b</sup> ; cqm <sub>1REC-D25</sub> (0.002) <sup>c</sup>	Silva-Filha et al.; Chalegre et al. [88, 89, 91]
		Azeitona <sup>a</sup>	2009–2010	Temephos	1 (0.006)	–	S	–	–	Amorim et al. [51]
			1999	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	–	–	–	AS-PCR	cqm <sub>1REC</sub> (0.002) <sup>b</sup> ; cqm <sub>1REC-D16</sub> (0.006) <sup>c</sup>	Chalegre et al. [89]
		Roda de Fogo <sup>b</sup>	1999	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	–	–	–	AS-PCR	cqm <sub>1REC</sub> (0.017) <sup>e</sup>	Chalegre et al. [89]
		Fazenda Nova	2007	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	3.7 (0.011)	–	S	AS-PCR	cqm <sub>1REC</sub> (0.0029) <sup>e</sup>	Chalegre et al. [88]
		Pelinhos <sup>a</sup>	2007	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	4 (0.012)	–	S	AS-PCR	cqm <sub>1REC</sub> (0.0061) <sup>e</sup>	Chalegre et al. [88]
		Jaboatão dos Guararapes	2009–2010	Temephos	1 (0.006)	–	S	–	–	Amorim et al. [51]
			2010	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	4.3 (0.017)	–	S	AS-PCR	cqm <sub>1REC</sub> (0.001) <sup>b</sup> ; cqm <sub>1REC-D16</sub> (0.003) <sup>c</sup>	Chalegre et al. [89]
			2010	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	–	–	–	Multiplex PCR	cqm <sub>1REC</sub> (0.003) <sup>b</sup> ; cqm <sub>1REC-2</sub> (0.002) <sup>c</sup>	Menezes et al. [85]
			2009–2010	Temephos	0.57 (0.002)	–	S	–	–	Amorim et al. [51]

**Anexo I - Publicação realizada na revista *Parasites & Vectors* (continuação).**



**Table 1 (continued)**

Macro Region	State	Region	Year	Insecticide	Bioassay Dose-response RR <sub>50</sub> (LC <sub>50</sub> or LT <sub>50</sub> ) or RR <sub>95</sub> (LC <sub>95</sub> )	Diagnostic-dose		Biochemical and molecular assays			
						Dose (%mortality)	Status <sup>d</sup>	Method	Detected mechanism	Reference	
Center-West	Mato Grosso	Gloria do Goitá Ipoluita	2009–2010	Temephos	1.5 (0.009)	–	S	–	Amorim et al. [51]		
			2009–2010	Temephos	0.6 (0.0019)	–	S	–	Amorim et al. [51]		
			2010	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	3.3 (0.013)	–	S	AS-PCR	cqm I <sub>18C</sub> (0.003) <sup>e</sup> Chalegrie et al. [89]		
Center-West	Mato Grosso do Sul	Santa Cruz do Capibaribe	2009–2010	Temephos	5.8 (0.036)	–	Moderate resist- ance	Enzymatic assays and AS-PCR	G119S-ace-1 <sup>R</sup> (0.11) <sup>f</sup> ; α-esterase (> 30%); β-esterase (> 17%)	Amorim et al. [51]	
			1993	–	–	–	–	Enzymatic assays	Esterase C2	Yebakima et al. [60]	
Center-West	Mato Grosso do Sul	Cuiabá	2000	Temephos	–	0.012–0.06 ppm (95–100%)	Tolerant	–	–	Campos & Andrade [50]	
			1998	Temephos	–	0.04 ppm (88.08); 0.045 ppm (93.71%)	R	–	Metabolic resistance (suggested)	Campos & Andrade [50]	
South-East	Rio de Janeiro	Naviraí	2012	–	–	–	–	AS-PCR	L1014F kdr mutation (0.01) <sup>g</sup>	Steinhagem et al. [77]	
			2013	Temephos	–	0.004 ppm (18–20%)	R	–	–	–	Scudeler et al. [52]
South-East	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	1978	Chlorpyrifos	2.2 (0.001)	–	Low resistance	–	–	Curtis & Pasteur [48]	
			1994	Malathion	2.2 (0.15)	–	S	Sinergist tests	Mixed function oxidase and increased esterases	–	González et al. [49]
South-East	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	–	Chlorpyrifos	78.9 (0.0005)	–	R	–	Mixed function oxidase and increased esterases	–	
			–	Pirimiphos- methyl	4.4 (0.026)	–	S	–	–	–	–
			–	Propoxur	5.1 (0.51)	–	S	Sinergist tests	Mixed function oxidase and increased esterases	–	–
South-East	Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	–	Cypermethrin	3.4 (0.0008)	–	S	–	–	–	

**Anexo I - Publicação realizada na revista *Parasites & Vectors* (continuação).**

**Table 1 (continued)**

Macro Region	State	Region	Year	Insecticide	Bioassay Dose-response RR <sub>50</sub> (LC <sub>50</sub> or LT <sub>50</sub> ) or RR <sub>95</sub> (LC <sub>95</sub> )	Diagnostic-dose		Biochemical and molecular assays		Reference
						Dose (%mortality)	Status <sup>d</sup>	Method	Detected mechanism	
				Delta-methrin	3.2 (0.0003)	-	S	-	-	
				Lambda-cyhalothrin	6.0 (0.0003)	-	S	Sinergist tests	Mixed function oxidase and increased esterases	
				DDT	11.8 (0.025)	-	R	-	-	
			1995	Malathion	43.81 (0.609)	-	R	Enzymatic assays	Elevated esterase and altered AChE	Coto et al. [24]
			2012	-	-	-	-	AS-PCR	L1014F kdr mutation (0.04) <sup>e</sup>	Steinhagem et al. [77]
			2012	-	-	-	-	-	L1014F kdr mutation (0.07) <sup>e</sup>	
			2005	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	0.6–2.85 (0.009–0.0454)	-	S	-	-	Andrade et al. [30]
			2006	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	5 (0.015)	-	S	-	-	Silva-Filha et al. [91]
			1995	Fenitrothion, malathion and propoxur	-	1% (47.5%); 5% (58.8%); 0.1% (59.4%)	R	-	-	Bracco et al. [53]
			1995	DDT and permethrin	-	4% 0.25% (1.00%)	S	-	-	
			1995–1996	Fenitrothion, malathion and propoxur	11.20 (136.3) <sup>f</sup> ; 3.33 (32.9) <sup>g</sup> ; 3.01 (200) <sup>e</sup>	-	R	Enzymatic assays	G1195 ace-1 <sup>R</sup> (0.12–0.17) <sup>g</sup> ; α-esterase (> 11.2%)	Bracco et al. [54]
			1999–2001	Temephos	6.36 (0.0076)	-	R	-	Metabolic resistance (suggested)	Campos & Andrade [50]
			1999–2001	Cypermethrin	-	0.0096 ppm (11.17%)	R	-	Metabolic resistance (suggested)	
			1999–2001	Cyfluthrin	-	0.002–0.03 ppm (0.42–47.5%)	R	-	Metabolic resistance (suggested)	

**Anexo I - Publicação realizada na revista *Parasites & Vectors* (continuação).**

**Table 1 (continued)**

Macro Region	State	Region	Year	Insecticide	Bioassay Dose-response RR <sub>50</sub> (LC <sub>50</sub> or LT <sub>50</sub> ) or RR <sub>95</sub> (LC <sub>95</sub> )	Diagnostic-dose		Biochemical and molecular assays		Reference
						Dose (%mortality)	Status <sup>d</sup>	Method	Detected mechanism	
South	Minas Gerais	Belo Horizonte	2012	–	–	–	–	AS-PCR	L1014F kdr mutation (0.04) <sup>e</sup>	Steinbagem et al. [77]
	Rio Grande do Sul	Porto Alegre	1989–1991	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> and <i>Bacillus thur- ingiensis</i> svar. <i>israelensis</i>	–	1250 mg/m <sup>2</sup> (100%)	S	–	–	Ruas-Nero et al. [97]
		Feliz	1989–1991	Tetramethrine/ PBO	–	5 mg/m <sup>2</sup> (97.87%)	S	–	–	
			1989–1991	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> and <i>Bacillus thur- ingiensis</i> svar. <i>israelensis</i>	–	1250 mg/m <sup>2</sup> (100%)	S	–	–	
			1989–1991	Temephos and fenitrothion	0.86 <sup>b</sup> (7.4 × 10 <sup>3</sup> ) and 1.39 <sup>b</sup> (0.24)	–	S	–	–	

Note: LC50 and LC95 expressed in ppm l.a.

<sup>a</sup> Recife Metropolitan Area

<sup>b</sup> Lethal concentrations plus standard errors calculated after log transformations and anti-log values between brackets

<sup>c</sup> Lethal time: LT<sub>50</sub>

<sup>d</sup> In accordance to the original reference

<sup>e</sup> Allelic frequency

Abbreviation: AS-PCR, allelic-specific polymerase chain reaction

Anexo I - Publicação realizada na revista *Parasites & Vectors* (continuação).

species or even among populations of a same species. In the case of the target-site alterations, however, the same SNPs are found in distinct species, as is the case of the substitution Leu by Phe in the 1014 site of the *Na<sub>v</sub>* gene, known as the classical *kdr* (knockdown resistance) mutation [74].

There is one report of a *Cx. quinquefasciatus* population from Rio de Janeiro collected in 1994 resistant to DDT [49]. The use of this compound had been discontinued against mosquitoes since 1971 and finally prohibited in Brazil in 1985 [75]. Therefore, this could result from a persisted resistance selected by DDT itself or cross-resistance by the use of other compounds. Resistance to the pyrethroids cyfluthrin and cypermethrin was identified in a population from Campinas collected in 1999, whilst simultaneously collected *Ae. aegypti* were susceptible [50]. In addition, there was resistance to deltamethrin in a laboratory strain from Divinópolis [76]. Resistance to deltamethrin emerged and spread very rapidly in *Ae. aegypti* since its introduction by national campaigns against the dengue vector in 2000. One decade later, high levels of resistance to this chemical were acquired throughout the country, especially during dengue epidemic seasons, probably with an important contribution of the use of household insecticide sprays, all pyrethroid-based products [25, 41]. This environment with constant insecticide application near and inside the houses has likewise been selecting resistance to pyrethroids in *Cx. quinquefasciatus*.

To date, there has only been one report for a *kdr* mutation in *Cx. quinquefasciatus* from Brazil in which the classical L1014F was detected, yet under low frequencies (4–7%) in samples from Campo Grande, Rio de Janeiro, Niterói and Belo Horizonte [77]. In these localities, resistance to deltamethrin was apparent in *Ae. aegypti* probably related to *kdr* mutations [78]. Similarly, L1014F was detected in *Cx. quinquefasciatus* from Mexico, indirectly exposed to pyrethroids targeting *Ae. aegypti* during dengue control campaigns [79]. Other substitutions were found in the same 1014 aminoacid position (L1014S, L1014C) in the *Cx. pipiens* complex [80]. However, none were ever observed in *Cx. quinquefasciatus* from Brazil, other than L1014F.

#### Biolarvicides

*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) and *Lysinibacillus sphaericus* (*Lbs*) are bacteria that produce endotoxins that are activated by mosquito larvae intestinal proteases and bind to specific receptors in the intestinal epithelium, causing degeneration and consequently, killing the larvae [81, 82]. The *Lbs* is more suitable for controlling *Cx. quinquefasciatus* because it presents higher activity in polluted water when compared to *Bti* [83].

The *cqm1* gene encodes an epithelial protein to which the toxin binds. Some mutations in the *cqm1* gene were associated with *Lbs* resistance. For example, a deletion of 19 nucleotides (*cqm1<sub>REC</sub>*) and the substitution of a guanine (G) to an adenine (A) in the codon 1324 (*cqm1<sub>REC-2</sub>*), both present in *Cx. quinquefasciatus* field populations from Recife [84, 85]. Resistance to *Lbs* was found in a *Cx. quinquefasciatus* populations from Coque, an urban area of Recife, only two years after its implementation in 1991, reaching a resistance ratio 10-fold higher than the susceptible control [86]. However, this resistance was later reversed with the interruption of the biolarvicide application in that locality [87]. In other areas of Recife city, *Lsb* continued to be enlisted and several studies have been evaluating the levels of susceptibility to this bioinsecticide in the city as well as identifying new molecular markers [88–90]. These studies have shown that the frequency of resistant individuals in Recife city remains at low levels, even with the continued application of the bacterial insecticide, either alone or in combination with other larvicides such as *Bti* [91–94]. In a recent study in Colombia, *Lbs* proved to be efficient against both *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti* field populations, suggesting it as an interesting alternative to chemical insecticides [28].

#### Conclusions

In accordance with the WHO Global Vector Control Response [95], the emergence and spread of vector-transmitted diseases is likely to be intensified in the following years, especially those with the participation of urban mosquitoes such as *Culex* spp., given their strong adaptation to climate changes and inefficient urban sanitary infrastructures. Therefore, as the application of insecticides is a primarily action against *Cx. quinquefasciatus* in Brazil, it is urgent to investigate the status of susceptibility/resistance of natural populations to all the chemical compounds available for use. Effective vector control in Brazil is a complex and multifactorial task considering the continental dimensions together with the greatly heterogeneous ecological and demographic aspects [96]. Future successful campaigns based on the use of chemicals have to implement a constant monitoring of insecticide effectiveness, employing integrated methods against all targeted species and considering a plan well adapted to regional peculiarities.

#### Abbreviations

DDT: dichlorodiphenyltrichloroethane; *ace-1*: acetylcholinesterase 1 gene; AchE: acetylcholinesterase enzyme; *Na<sub>v</sub>*: voltage-gated sodium channel gene; WHO: World Health Organization; IRS: insecticide residual spraying; MoH: Ministry of Health; IGR: insect growth regulator; RR: resistance ratio; OP: organophosphate; SNP: single nucleotide polymorphism; *kdr*: knockdown resistance.

**Anexo I - Publicação realizada na revista *Parasites & Vectors* (continuação).**

**Acknowledgements**

The authors thank Mitchell Raymond Lishon for the language revision of this document.

**Authors' contributions**

RML compiled the literature search and drafted the review. AJM revised and reviewed the manuscript together with JBPL. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding**

This study was partially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES) (Finance Code 001), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 423002/2016-3) and the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (Processo: E-26/203.177/2016).

**Availability of data and materials**

Not applicable.

**Ethics approval and consent to participate**

Not applicable.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Author details**

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>2</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 31 July 2019 Accepted: 10 December 2019

Published online: 18 December 2019

**References**

- Forattini OP. Espécie de *Culex* (*Culex*). In: Forattini OP, editor. *Culicidologia Médica*. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo; 2002. p. 693–722.
- Farajollahi A, Fonseca DM, Kramer LD, Marm Kilpatrick A. "Bird biting" mosquitoes and human disease: a review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infect Genet Evol*. 2011;11:1577–85.
- Tissot AC, da Silva MAN. Lista das espécies de Culicidae (Diptera) depositadas na Coleção de Entomologia Pe. J. S. Moure. *Rev Bras Entomol*. 2008;52:263–8.
- Consoil FAGB, Lourenço de Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 1994.
- Brasil. Guia de vigilância do *Culex quinquefasciatus*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Francisco Anilton Alves Araújo, Marcelo Santalucia. 3rd ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
- Lima-Camara TN. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Rev Saude Publica*. 2016;50:36.
- Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, et al. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science*. 2004;303:1535–8.
- Meehan JN. The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977–78. Description of the epizootic and virological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1979;73:618–23.
- Monath TP, Tsai TF. St. Louis encephalitis: lessons from the last decade. *Am J Trop Med Hyg*. 1987;37:405–595.
- Ayres CFJ, Guedes DRD, Paiva MHS, Morais-Sobral MC, Krokovsky L, Machado LC, et al. Zika virus detection, isolation and genome sequencing through Culicidae sampling during the epidemic in Vitória, Espírito Santo, Brazil. *Parasit Vectors*. 2019;12:220.
- Guedes DR, Paiva MH, Donato MM, Barbosa PP, Krokovsky L, Rocha SWDS, et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg Microbes Infect*. 2017;6:e69.
- Serra OP, Cardoso BF, Ribeiro ALM, dos Santos FAL, Shesharenko RD. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111:20–9.
- Atkinson CT, Woods KL, Dusek RJ. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected iiwi (*Vestiaria coccinea*). *Parasitology*. 1995;111(Suppl. 1):59–69.
- Mackerras MJ. The life history of a Hepatozoon (Sporozoa: Adeleidea) of varanid lizards in Australia. *Aust J Zool*. 1962;10:35–44.
- Bhattacharya S, Basu P. The southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*: profile of a smart vector. *J Entomol Zool Stud*. 2016;4:73–81.
- WHO. World Health Organization position statement on integrated vector management to control malaria and lymphatic filariasis. *Weekly Epidemiological Record*. 2011;86:113–28.
- Rozendaal JA. Vector control methods for use by individuals and communities. Geneva: World Health Organization; 1997.
- Leyva IM, Marquetti CM, Montada DL. Segregation of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) niche under laboratory conditions. *Rev Cubana Med Trop*. 2012;64:206–11.
- Barbosa RMR, Regis LN. Monitoring temporal fluctuations of *Culex quinquefasciatus* using oviposition traps containing attractant and larvicide in an urban environment in Recife, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:451–5.
- David MR, Ribeiro GS, Freitas RM. Bionomics of *Culex quinquefasciatus* within urban areas of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. *Rev. Saude Publica*. 2012;46:858–65.
- Medeiros Z, Menezes JA, Cesse EP, Lessa F. Controle da filariose linfática no Brasil, 1951–2000. *Epidemiol Serv Saude*. 2003;12:77–86.
- Rocha EMM, Fontes G. Filariose bancroftiana no Brasil. *Rev Saude Publica*. 1998;32:98–105.
- Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Araujo 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;2016:8603263.
- Coto MM, Lazcano JA, de Fernandez DM, Soca A. Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after its use in *Aedes aegypti* control programs. *J Am Mosq Control Assoc*. 2000;16:324–30.
- Valle D, Bellinato DF, Viana-Medeiros PF, Lima JBP, Martins Junior AJ. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;114:e180544.
- Chavasse DC, Yap HH. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: World Health Organization; 1997.
- Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolersans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007;57:1117–25.
- Santana-Martinez JC, Silva JJ, Dussan J. Efficacy of *Lysinibacillus sphaericus* against mixed-cultures of field-collected and laboratory larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bull Entomol Res*. 2019;109:1111–8.
- Regis LN, Silva-Filha MH, de Oliveira CMF, Rios EM, Silva SB, Furtado AF. Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995;90:115–9.
- Andrade CFS, Campos JC, Cabrinil I, Marques Filho CAM, Hibi S. Suscetibilidade de populações de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) sujeitas ao controle com *Bacillus sphaericus* Neide no rio Pinheiros, São Paulo. *BioAssay*. 2007;2:1–4.
- Delannay G, Goinin D, Kellaou K, Ramdini C, Gustave J, Vega-Rúa A. Multiple insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* populations from Guadeloupe (French West Indies) and associated mechanisms. *PLoS One*. 2018;13:e0199615.
- Ndhouptouen E, Talipouo A, Djiappi-Tchamen B, Djamouko-Djonkam L, Kopya E, Ngadjou CS, et al. *Culex* species diversity, susceptibility to insecticides and role as potential vector of lymphatic filariasis in the city of Yaoundé, Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13:e0007229.
- Skovmand O, Sanogo E. Resistance of *Culex quinquefasciatus* to selected chemical and biological pesticides. *Med Res Arch*. 2018;6:1–9.
- Ukpai OM, Ekedo CM. Insecticide susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Umudike, Ikwano LGA Abia State, Nigeria. *Int J Mosq Res*. 2019;6:114–8.

**Anexo I - Publicação realizada na revista *Parasites & Vectors* (continuação).**

35. WHO. Insecticide resistance and vector control: tenth report of the Expert Committee on Insecticides. Geneva: World Health Organization; 1960.
36. Crow JF. Genetics of insect resistance to chemicals. *Annu Rev Entomol.* 1957;2:227–46.
37. Zylberkan M, Farias A. A invasão dos pemilongos: incidência dos insetos dobra na capital. *Revista Veja SP.* 2017. <https://vejasp.abril.com.br/cidades/infestacao-pemilongo-sao-paulo/> Accessed 07 May 2019.
38. Garcia GA, Sylvestre G, Aguiar R, da Costa GB, Martins AJ, Lima JB, et al. Matching the genetics of released and local *Aedes aegypti* populations is critical to assure *Wolbachia* invasion. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13:e0007023.
39. Diel C, Facchini LA, Dallagnol MM. Inseticidas domésticos: padrão de uso segundo a renda per capita. *Rev Saude Publica.* 2003;37:83–90.
40. Oliveira LB, Maria R, Nunes P, Santana M, Rosa A, Mariana N, et al. Profile of the population use of household insecticides against mosquitoes. *Semin Cienc Biol Saude.* 2015;36:79–92.
41. Macoris ML, Martins AJ, Andrighetti MTM, Lima JBP, Valle D. Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: lessons from São Paulo State, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:e0006390.
42. Gray L, Florez SD, Bareiro AM, Valdillo-Sánchez J, González-Olvera G, Lenhart A, et al. Experimental evaluation of the impact of household aerosolized insecticides on pyrethroid resistance *Aedes aegypti*. *Sci Rep.* 2018;8:12535.
43. Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol.* 2000;45:371–91.
44. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. *Epidemiol Serv Saude.* 2007;16:295–302.
45. Liu N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu Rev Entomol.* 2015;60:537–59.
46. Brogdon WG, McAllister JC. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis.* 1998;4:605–13.
47. Brasil. Ministério da Saúde. Controle de Vetores: Inseticidas recomendados. 2019. <http://portals.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/control-de-vetores> Accessed 02 May 2019.
48. Curtis CE, Pasteur N. Organophosphate resistance in vector populations of the complex of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Res.* 1981;71:153–61.
49. González T, Bisset JA, Díaz C, Rodríguez MM, Brandolini MB. Insecticide resistance in a *Culex quinquefasciatus* strain from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94:121–2.
50. Campos J, Andrade CFS. Laval susceptibility of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations to chemical insecticides. *Rev Saude Publica.* 2003;37:523–7.
51. Amorim LB, Helvecio E, de Oliveira CMF, Ayres CFJ. Susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) populations to the chemical insecticide temephos in Pernambuco, Brazil. *Pest Manag Sci.* 2013;69:1307–14.
52. Scudeler C, Arruda E, Andrade C, Silva T, Fernandes M, Teixeira T, Cabrini I. Larval susceptibility of two *Culex quinquefasciatus* populations (Diptera: Culicidae) temephos® in the city of Naviraí, MS, Brazil. *Orbital: Electron J Chem.* 2015;7:270–4.
53. Bracco JE, Dalbon M, Marinotti O, Barata JM. Resistance to organophosphorus and carbamate insecticides in a population of *Culex quinquefasciatus*. *Rev Saude Publica.* 1997;31:182–3.
54. Bracco JE, Barata JMS, Marinotti O. Evaluation of insecticide resistance and biochemical mechanisms in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94:115–20.
55. Bisset JA, Rodrigues MM, Diaz C, Ortiz E, Marquetti MC, Hemingway J. The mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *Bull Entomol Res.* 1990;80:245–50.
56. Reyes-Lugo M, Neus M. Resistencia del mosquito *Culex quinquefasciatus* Say 1823 (Diptera: Culicidae) a insecticidas en el estado Zulia, Venezuela. *Rev Gent Fac Cien.* 2000;10:441–7.
57. Bourguet D, Pasteur N, Bisset J, Raymond M. Determination of Ace.1 genotypes in single mosquitoes: toward an ecumenical biochemical test. *Pestic Biochem Physiol.* 1996;55:122–8.
58. Lenormand T, Guillemaud T, Bourguet D, Raymond M. Appearance and sweep of a gene duplication: adaptive response and potential for new functions in the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution.* 1998;52:1705–12.
59. Labbé P, Berthomieu A, Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T, Weill M. Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol.* 2007;24:1056–67.
60. Yebakima A, Yp-Tcha MM, Reiter P, Bisset J, Delay B, Chevillon C, Pasteur N. Detoxifying esterases in *Culex pipiens quinquefasciatus* from the Caribbean countries. *J Am Mosq Control Assoc.* 1995;11:363–6.
61. Alout H, Djogbénou L, Berticat C, Chandre F, Weill M. Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetylcholinesterase 1 biochemical properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008;150:271–7.
62. Fournier D, Bride JM, Hoffmann F, Karch F. Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticide. *J Biol Chem.* 1992;267:14270–4.
63. Fournier D, Mutéro A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1994;108:19–31.
64. Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, et al. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature.* 2003;423:136–7.
65. Alout H, Berthomieu A, Cui F, Tan Y, Berticat C, Qiao CL, Weill M. Different amino-acid substitutions confer insecticide resistance through a cytochrome P450 in *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) from China. *J Med Entomol.* 2007;44:463–9.
66. 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;37:41–7.
67. Wirth MC, Georgiadiou GP. Organophosphate resistance in *Culex pipiens* from Cyprus. *J Am Mosq Control Assoc.* 1996;12:112–8. <https://pdfs.semanticscholar.org/ac13/856ce1538aa0d0e23abfa569a1ee30e3f71.pdf>. Accessed 29 Nov 2019.
68. Longo C. Mutações envolvidas com a resistência a inseticidas em populações naturais de *Culex quinquefasciatus* (Say 1823) do Rio de Janeiro. Monografia. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro; 2016.
69. Bloomquist JR. Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol.* 1996;41:163–90.
70. Sattelle DB. GABA receptors of insects. *Adv Insect Physiol.* 1990;22:1–113.
71. Tantely ML, Tortosa P, Alout H, Berticat C, Berthomieu A, Rutee A, et al. Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Réunion Island. *Insect Biochem Mol Biol.* 2010;40:317–24.
72. Terriere LC, Yu SJ. Induction of detoxifying enzymes in insects. *J Agric Food Chem.* 1974;22:366–73.
73. Hemingway J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol.* 2000;30:1009–15.
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.* 1996;252:51–60.
75. D'Amato C, Torres JPM, Malm O. DDT (diclorodifeniltricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental: uma revisão. *Quim Nova.* 2002;25:995–1002.
76. de Melo AR, Castro DSB, Alves SN. Response of *Culex quinquefasciatus* larvae to three insecticides. *Rev Ins Med Trop Sao Paulo.* 2015;57:540.
77. Steinhagem, FM, Lima, JBP, Valle D, Martins AJ. Kdr mutation in *Culex quinquefasciatus* populations from Brazil. IN: XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine. 2012. <https://www.sbtm.org.br/portals/congressos/> Accessed 04 Jun 2019.
78. Martins AJ, Lima JB, Peixoto AA, Valle D. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Trop Med Int Health.* 2009;14:1351–5.
79. Ponce G, Sanchez IP, García SM, Torrado JM, Lopez-Monroy B, Flores AE. First report of L1014F *kdr* mutation in *Culex quinquefasciatus* in Mexico. *Insect Sci.* 2016;23:829–34.
80. Scott JG, Yoshimizu MH, Kasai S. Pyrethroid resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *Pestic Biochem Physiol.* 2015;120:68–76.
81. Charles JF, Nielsen-LeRoux C, Delécluse A. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Ann Rev Entomol.* 1996;41:451–72.
82. Knowles BH, Ellar DJ. Colloid-osmotic lysis is the general mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. *Biochim Biophys Acta.* 1987;924:509–18.

## Anexo I - Publicação realizada na revista *Parasites & Vectors* (continuação).

83. de Barjac H, Sutherland DJ. Bacterial control of mosquitoes & black flies. London: Unwin Hyman Ltd; 1991.
84. Romão TP, de Melo Chalegre KD, Key S, Ayres CF, de Oliveira CM, de-Melo-Neto OP, Silva-Filha MH. A second independent resistance mechanism to *Bacillus sphaericus* binary toxin targets its alpha-glucosidase receptor in *Culex quinquefasciatus*. *FEBS J*. 2006;273:1556–68.
85. Menezes HSG, Chalegre KDM, Romão TP, Oliveira CMF, de-Melo-Neto OP, Silva-Filha MHNL. A new allele conferring resistance to *Lysinibacillus sphaericus* is detected in low frequency in *Culex quinquefasciatus* field populations. *Parasit Vectors*. 2016;9:70.
86. Silva-Filha MH, Regis L, Nielsen-LeRoux C, Charles JF. Low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Econ Entomol*. 1995;88:525–30.
87. Silva-Filha MH, Regis L. Reversal of low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of the southern house mosquito (Diptera: Culicidae) from an urban area of Recife, Brazil. *J Econ Entomol*. 1997;90:299–303.
88. Chalegre KDD, Romão TP, Amorim LB, Anastacio DB, de Barros RA, de Oliveira CM, et al. Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:1044–9.
89. Chalegre KD, Romão TP, Tavares DA, Santos EM, Ferreira LM, Oliveira CM, et al. Novel mutations associated with resistance to *Bacillus sphaericus* in a polymorphic region of the *Culex quinquefasciatus* *cqm1* gene. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78:6321–6.
90. Rezende TMT, Romão TP, Batista M, Berry C, Adang MJ, Silva-Filha MHNL. Identification of Cry48Aa/Cry49Aa toxin ligands in the midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae. *Insect Biochem Mol Biol*. 2017;88:63–70.
91. Silva-Filha MHNL, Chalegre KDM, Anastacio DB, Oliveira CMF, Silva SB, Acioli RV, et al. *Culex quinquefasciatus* field populations subjected to treatment with *Bacillus sphaericus* did not display high resistance levels. *Biol Control*. 2008;44:227–34.
92. Amorim LB, de Barros RA, Chalegre KDD, de Oliveira CMF, Regis LN, Silva-Filha M. Stability of *Culex quinquefasciatus* resistance to *Bacillus sphaericus* evaluated by molecular tools. *Insect Biochem Mol Biol*. 2010;40:311–6.
93. de Santos EM, de Chalegre KD, de Albuquerque AL, Regis L, Oliveira CMF, Silva-Filha MHNL, et al. Frequency of resistance alleles to *Lysinibacillus sphaericus* in a *Culex quinquefasciatus* population treated with a *L. sphaericus*/Bti biolarvicide. *Biol Control*. 2019;132:95–101.
94. de Santos EM, Regis LN, Silva-Filha MHNL, Barbosa RMR, de Melo-Santos MAV, Gomes TCS, Oliveira CMF. The effectiveness of a combined bacterial larvicide for mosquito control in an endemic urban area in Brazil. *Biol Control*. 2018;121:190–8.
95. WHO. Global Vector Control Response 2017–2030. Geneva: World Health Organization; 2017.
96. Tauli PL. Perspectives of vector borne diseases control in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39:275–7.
97. Ruas-Neto AL, Silveira SM, Colares ERC. Mosquito control based on larvicides in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: choice of the control agent. *Cad Saude Públ*. 1994;10:222–30.

#### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

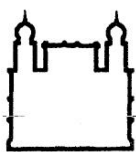
- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



**Anexo I - Publicação realizada na revista *Parasites & Vectors* (continuação).**



Instituto Oswaldo Cruz  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

## LICENÇA

**L-004/2018**

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-003/2018), intitulado “**Estudos da fisiologia, desenvolvimento e controle de artrópodes vetores**”, sob a responsabilidade de **José Bento Pereira Lima** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 31/03/2022 e inclui o uso total de:

Animal	espécie ou linhagem	quant (total)	♂	♀	idade	peso	origem (*)
<input checked="" type="checkbox"/> camundongo	Mus musculus (Swiss Webster)		96				ICTB/Fiocruz
<input type="checkbox"/> Rato							
<input type="checkbox"/> Coelho							
<input type="checkbox"/> Hamster							
<input type="checkbox"/> Aves							
<input type="checkbox"/> primata não humano							
<input checked="" type="checkbox"/> Outros	Cavia porcellus		72	72			ICTB/Fiocruz

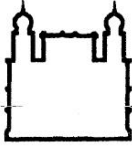
**Observação:** Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 19 de março de 2018.

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil  
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056

**Anexo II – Licença para a utilização de cobaias anestesiadas na alimentação de mosquitos no LAFICAVE.**





Instituto Oswaldo Cruz  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

Flávio Alves Lara  
Coordenador da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz  
Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil  
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056

**Anexo II – Licença para a utilização de cobaias anestesiadas na alimentação de mosquitos no LAFICAVE (continuação).**

	ÉXON 20																																	ÍNTRON											1
	1	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	566	666	666	666	667	777	777	777	888	888	888	899	999	999	999								
	M	L	V	G	D	V	S	C	I	P	F	F	L	A	T	V	V	I	G	N	L/E	V																							
#NaV_1	C	ATG	CTG	GTG	GGC	GAC	GTG	TCC	TGC	ATT	CCG	TTC	TTC	TTG	GCC	ACC	GTA	GTG	ATA	GGA	AAT	TTA	GTC	GTG	AGT	ATT	CCA	GCG	TGA	AGT	CTT	AGC	GAT	TGA											
#NaV_2	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
#NaV_3	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
#NaV_5	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
#NaV_6	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
#NaV_7	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
#NaV_8	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
#NaV_9	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
#NaV_10	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
#NaV_11	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
#NaV_12	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
#NaV_13	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						
#NaV_14	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...						

	ÍNTRON																																					
	111	111	111	111	111	111	122	222	222	223	333	333	333	444	444	444	455	555	555	556	666	666	666	666	666	777	777	777	788	888	888	889	999	999	999			
	000	000	000	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111		
	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678		
#NaV_1	TCT	AGT	GTG	CGC	GCT	AGA	GCT	GTC	AAA	ACA	TCG	CCA	ACA	GCA	TGC	AAG	AAA	AGG	TGG	GAA	CGA	AAA	ACT	TTA	AGG	TCA	CAT	TTG	TAC	CTT	TGA	TGT	AAA					
#NaV_2	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#NaV_3	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#NaV_4	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#NaV_5	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#NaV_6	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#NaV_7	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#NaV_8	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#NaV_9	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#NaV_10	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#NaV_11	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#NaV_12	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#NaV_13	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
#NaV_14	.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

**Anexo III – Alinhamento de nucleotídeos e aminoácidos do fragmento de 461 pares de bases correspondente ao sítio IIS6 do *Nav* de *Culex quinquefasciatus*.** A substituição de nucleotídeos A-T, correspondente a mutação *kdr* está destacada em vermelho. A linha azul indica a localização do fim do éxon 20 e início do intron.



ÉXON 21

334	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	444	4
990	000	000	000	111	111	111	122	222	222	223	333	333	333	444	444	444	455	555	555	556	6	
890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	1	
	V	L	N	L	F	L	A	L	L	L	S	N	F	G	S	S	S	L	S	A		
#NaV_1	CAG	GTT	CTT	AAC	CTT	TTC	TTA	GCC	TTG	CTT	TTG	TCC	AAC	TTT	GGT	TCC	TCA	AGT	CTG	TCG	GCG	A
#NaV_2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
#NaV_3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
#NaV_4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
#NaV_5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
#NaV_6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
#NaV_7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
#NaV_8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
#NaV_9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
#NaV_10	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
#NaV_11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
#NaV_12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
#NaV_13	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.
#NaV_14	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.

**Anexo III – Alinhamento de nucleotídeos e aminoácidos do fragmento de 461 pares de bases correspondente ao sítio IIS6 do *Na<sub>v</sub>* de *Culex quinquefasciatus* (continuação). A linha azul indica a localização do fim do íntron e início do éxon 21.**

















	ÉXON 3																			
	666	667	777	777	777	777	777	777	777	777	777	777	777	777	777	777	777	777	777	7
	999	990	000	000	000	111	111	111	122	222	222	223	333	333	333	444	444	4		
	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	6		
	L	F	L	G	T	P	E/K	A	P	G	N	A	G	L	F	D	Q			
#ace-1_1	CTC	TTC	CTG	GGC	ACA	CCG	GAG	GCA	CCC	GGT	AAC	GCG	GGG	CTG	TTT	GAT	CAG	A		
#ace-1_2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_4	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_5	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_6	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_7	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_8	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_9	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_10	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_13	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_14	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_15	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_17	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_18	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_19	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_20	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_21	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_22	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_23	...	...	...	...	...	...	A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_24	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_25	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_26	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_27	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_28	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_29	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_30	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_31	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_32	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_33	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_34	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_35	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_36	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_37	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_38	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		
#ace-1_39	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		

**Anexo IV - Alinhamento de nucleotídeos e aminoácidos do fragmento de 746 pares de bases do gene ace-1 de *Culex quinquefasciatus* (continuação).**

A mutação não-sinônima está destacada em vermelho.



	ÉXON 21					
	444	444	444	444	444	4
	000	011	111	111	112	2
	678	901	234	567	890	1
	A	L	L	L	S	
# Consensus Hap. NaV_Culex	GCC	TTG	CTT	TTG	TCC	A
# Consensus Amostras wspA +	...	...	...	...	...	.
# Consensus NaV_Ae.albopictus	...	...	...	...	...	.

**Anexo V – Alinhamento de nucleotídeos e aminoácidos do fragmento correspondente ao sítio IIS6 do *Nav* de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes albopictus*. (continuação).** A localização da substituição de aminoácidos L-F, correspondente a mutação *kdr* está destacada em vermelho. A linha azul indica a localização do fim do éxon 20 e início do éxon 21