

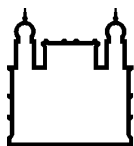
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA E DISTRIBUIÇÃO DE MUTAÇÕES *KDR*
EM POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS 1762) DO ESTADO
DO AMAPÁ

BÁRBARA DA SILVA DE SOUZA

Rio de Janeiro
Dezembro de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

BÁRBARA DA SILVA DE SOUZA

Estruturação genética e distribuição de mutações *kdr* em populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) do estado do Amapá

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

Orientador: Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Junior

RIO DE JANEIRO
Dezembro de 2021

Souza, Bárbara.

Estruturação genética e distribuição de mutações *kdr* em populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) do estado do Amapá / Bárbara Souza. - Rio de Janeiro, 2021.

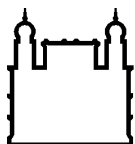
67 f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2021.

Orientador: Ademir de Jesus Martins Junior.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Resistência. 2. Piretroides. 3. Microsatélites. 4. Genética de populações. 5. Marcadores moleculares. I.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: BÁRBARA DA SILVA DE SOUZA

**ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA E DISTRIBUIÇÃO DE MUTAÇÕES *KDR* EM
POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* (LINNAEUS 1762) DO ESTADO DO
AMAPÁ**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir de Jesus Martins Junior

Aprovada em: 15 / 12 / 2021

EXAMINADORES:

Dr. Márcio Galvão Pavan – Presidente (Fiocruz/IOC)

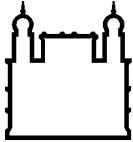
Dr. Fernando Ariel Genta (Fiocruz/IOC)

Dra. Roseli La Corte dos Santos (Universidade Federal de Sergipe)

Dra. Gabriela de Azambuja Garcia (Fiocruz/IOC)

Dra. Ana Paula Sales de Andrade Corrêa (IEPA)

Rio de Janeiro, 15 de dezembro de 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Parasitária de **Bárbara da Silva de Souza**, sob orientação do Dr. Ademir de Jesus Martins Junior. Ao décimo quinto dia do mês de dezembro de dois mil vinte e um, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: **“Estruturação genética e distribuição de mutações kdr em populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) do estado do Amapá”**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Estudos Bioquímicos e Moleculares de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Márcio Galvão Pavan – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Fernando Ariel Genta – IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Roseli La Corte dos Santos – UFS/SE, e como suplentes: Dr^a. Gabriela Azambuja Garcia- IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Ana Paula Sales de Andrade Corrêa - IEPA/AP. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovação da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre 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 da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 15 de dezembro de 2021.

Dr. Márcio Galvão Pavan (Presidente da Banca):

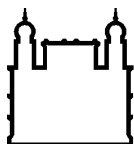
Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360.

Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimentoseac@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/iocensino

Agradecimentos

Ao Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, ao Instituto Oswaldo Cruz, aos meus colegas/ amigos de laboratório, ao meu orientador e à todas as pessoas que estiveram verdadeiramente ao meu lado durante essa difícil jornada. Por fim, ao CNPq pelo apoio financeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estruturação genética e distribuição de mutações *kdr* em populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) do estado do Amapá

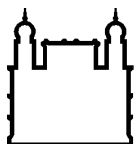
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Bárbara da Silva de Souza

O mosquito *Aedes aegypti* é vetor competente para a transmissão dos vírus dengue, chikungunya, Zika e febre amarela. O controle químico do vetor é amplamente utilizado, mas vem sendo ameaçado pela disseminação da resistência a inseticidas (RI), caracterizando-se pela seleção de alterações no comportamento ou na fisiologia do mosquito, que fazem com que o inseticida não atinja ou não encontre seu alvo no organismo do inseto. A disseminação da RI ocorre usualmente pelo fluxo gênico entre populações, que no caso do *Ae. aegypti* é facilitado pela dispersão passiva de seus ovos aderidos a mercadorias. A estruturação genética das populações naturais é, portanto, um fator fundamental que facilita ou dificulta a disseminação de alelos de resistência. Entre os principais mecanismos de RI estão as alterações no gene do canal de sódio regulado por voltagem (Na_v), que causam resistência ao efeito *knockdown* de piretroides, sendo conhecidas como mutações *kdr*. Populações de *Ae. aegypti* das localidades de Macapá e Oiapoque, no estado do Amapá, eram geneticamente distintas e apresentavam alelos *kdr* diferenciados, muito provavelmente devido ao baixo fluxo gênico entre essas duas populações, dificultado pelo acesso terrestre entre essas duas localidades, feito por uma única rodovia que cruza a densa Floresta Amazônica. Não se conhecia, no entanto, como seria a estruturação genética entre as populações de localidades ao longo daquela rodovia e, tampouco sobre ocorrência de mutações *kdr*. Por isso, avaliamos a frequência das principais mutações *kdr* em três sítios polimórficos (V410L, V1016I e F1534C) no gene Na_v de populações de *Ae. aegypti* de seis localidades do estado do Amapá (Oiapoque, Calçoene, Porto Grande, Ferreira Gomes, Tartarugalzinho e Macapá), através de genotipagem por qPCR em tempo real. Adicionalmente, investigamos a diversidade e a estruturação genética destas populações via genotipagem de 12 loci de microssatélites. Os alelos *kdr* R1 (mutante no sítio 1534) e R2 (mutante nos três sítios) foram observados nas seis populações, sendo que a de Oiapoque apresentou a maior frequência do *kdr* R2, enquanto o *kdr* R1 foi mais frequente na de Macapá. Genótipos *kdr* raros em demais regiões do Brasil, sugestivos de duplicações gênicas, foram encontrados em *Ae. aegypti* de Oiapoque e Calçoene. As análises de microssatélites mostraram baixa ou moderada diferenciação genética par-a-par, sendo que Oiapoque foi a população geneticamente mais distinta das demais e formou praticamente um único grupo genético em uma das análises de estruturação genética. Análise de Componentes Principais (DAPC) também sugeriu a população de Calçoene geneticamente diferenciada das demais, enquanto as outras populações mostraram-se mais similares entre si, sugerindo alto fluxo gênico entre elas. Ainda que a população de Oiapoque seja a mais diferenciada e estruturada, nosso estudo indica que há fluxo gênico entre esta e as demais ao longo da estrada BR-156 (AP), colaborando com a disseminação de alelos vindos da população da Guiana Francesa. Idealmente, medidas de controle químico do vetor devem ser pensadas conjuntamente entre as autoridades de ambos os lados da fronteira binacional.

Palavras-chave: resistência, piretroides, microssatélites, genética de populações.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Genetic structure and distribution of *kdr* mutations in *Aedes aegypti* (Linnaeus 1762) populations from the state of Amapá

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Bárbara da Silva de Souza

The *Aedes aegypti* mosquito is a competent vector for the transmission of dengue, chikungunya, Zika and yellow fever viruses. Chemical control of the vector is widely used but has been threatened by the spread of insecticide resistance (IR), characterized by the selection of changes in the behaviour or physiology of the mosquito, which make the insecticide not reach or not find its target in the insect's organism. The spread of IR usually occurs through gene flow between populations, which in the case of *Ae. aegypti* is facilitated by the passive dispersion of its eggs attached to commodities. The genetic structure of natural populations is, therefore, a fundamental factor that facilitates or hinders the dissemination of resistance alleles. Among the main mechanisms of IR are alterations in the voltage-regulated sodium channel (Na_v) gene, which cause resistance to the knockdown effect of pyrethroids, known as *kdr* mutations. Populations of *Ae. aegypti* from the localities of Macapá and Oiapoque, in the state of Amapá, were genetically distinct and had different *kdr* alleles, most likely due to the low gene flow between these two populations, hampered by land access between these two locations, made by a single road that crosses the dense Amazon Forest. However, it was not known how the genetic structure would be among the populations of localities along that highway, nor about the occurrence of *kdr* mutations. Therefore, we evaluated the frequency of the main *kdr* mutations at three polymorphic sites (V410L, V1016I and F1534C) in the Na_v gene of populations of *Ae. aegypti* from six locations in the state of Amapá (Oiapoque, Calçoene, Porto Grande, Ferreira Gomes, Tartarugalzinho and Macapá), using real-time qPCR genotyping. Additionally, we investigated the diversity and genetic structure of these populations via genotyping of 12 microsatellite loci. The alleles *kdr* R1 (mutant at site 1534) and R2 (mutant at all three sites) were observed in the six populations, with Oiapoque showing the highest frequency of *kdr* R2, while *kdr* R1 was more frequent in Macapá. Rare *kdr* genotypes in other regions of Brazil, suggestive of gene duplications, were found in *Ae. aegypti* from Oiapoque and Calçoene. Microsatellite analysis showed low or moderate pair-by-pair genetic differentiation, with Oiapoque being the most genetically distinct population from the others and forming practically a single genetic group in one of the genetic structuring analyses. Principal Component Analysis (DAPC) also suggested the population of Calçoene genetically differentiated from the others, while the other populations were more like each other, suggesting high gene flow between them. Although the population of Oiapoque is the most differentiated and structured, our study indicates that there is gene flow between it and the others along the BR-156 (AP) road, collaborating with the dissemination of alleles coming from the population of French Guiana. Ideally, chemical vector control measures should be devised jointly between authorities on both sides of the binational border.

Keywords: resistance, pyrethroids, microsatellites, population genetics.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	<i>Aedes aegypti</i>	14
1.2	Arboviroses	15
1.3	Controle de <i>Aedes aegypti</i>	16
1.4	Resistência a inseticidas e mutações <i>kdr</i>	18
1.5	Estruturação genética de populações de <i>Aedes aegypti</i>	20
1.6	Estado do Amapá	22
1.7	Justificativa.....	23
2.	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1.	Coleta do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	26
3.2.	Genotipagem <i>kdr</i>	27
3.3.	Genotipagem de microssatélites	29
3.4.	Análises de dados de microssatélites.....	31
4.	RESULTADOS	34
4.1.	Genotipagem das mutações <i>kdr</i>	34
4.2.	Genotipagem de microssatélites	37
5.	DISCUSSÃO	47
6.	CONCLUSÕES	54
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	14
Figura 2. Número de casos prováveis e óbitos confirmados de dengue, chikungunya, Zika, Brasil, 2008 a 2019.....	15
Figura 3. Gene do canal de sódio (Nav), destacando os principais sítios relacionados à resistência a piretroides (410, 1016 e 1534) e as combinações conhecidas de genótipos e alelos.	20
Figura 4. Casos notificados de dengue, Chikungunya e Zika no estado do Amapá de 2011 a 2021.	23
Figura 5. Localidades de coleta de <i>Aedes aegypti</i> no estado do Amapá.	27
Figura 6. Exemplo do perfil de genotipagem de um sítio <i>kdr</i> para uma população, através de reação de qPCR em tempo real..	29
Figura 7. Combinação de loci utilizados nas PCRs de genotipagens multiplex de microssatélites de <i>Aedes aegypti</i>	31
Figura 8. Frequências genotípicas de <i>kdr</i> das populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá.....	35
Figura 9. Frequências genotípicas de <i>kdr</i> por população do estado do Amapá.	36
Figura 10. Distribuição das frequências alélicas de <i>kdr</i> das populações de <i>Aedes aegypti</i> do estado do Amapá.....	37
Figura 11. Análise de variância molecular (AMOVA) entre seis populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá.	44
Figura 12. Gráfico de Evanno para as amostras de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá ($K = 2$).	45

Figura 13. Estruturação das populações de *Aedes aegypti* do Amapá. 45

Figura 14. Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) para amostras de *Aedes aegypti* do Amapá..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências de primers e sondas para os SNPs V410L, V1016I e F1534C <i>kdr</i> em <i>Aedes aegypti</i>	28
Tabela 2. Sequências dos primers para genotipagem de microssatélites em <i>Aedes aegypti</i>	30
Tabela 3. Frequências dos genótipos <i>kdr</i> nas populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá, considerando os SNPs V410L, V1016I, F1534C do <i>Nav</i>	35
Tabela 4. Frequências dos alelos <i>kdr</i> nas populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá, considerando os SNPs V410L, V1016I, F1534C do <i>Nav</i>	36
Tabela 5. Estimativas da variabilidade e diversidade genética de 12 loci de microssatélites analisados em seis populações de <i>Aedes aegypti</i> do Amapá..	37
Tabela 6. Número de alelos privados encontrados por população estudada...	39
Tabela 7. Teste para desvios de equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> (EHW).....	40
Tabela 8. Desequilíbrio de Ligação (LD) entre cada par de locus.....	42
Tabela 9. Índice de fixação (F_{ST}) e distância geográfica em km (entre parênteses) <i>Aedes aegypti</i> do Amapá (comparação par-a-par).....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP	Amapá
CAL	Calçoene
CHIKV	Vírus chikungunya
CT	do inglês: <i>Cycle Threshold</i> (“Limite de Ciclo”)
Cys	Cisteína
DENV	Vírus dengue
DNA	do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (“Ácido Desoxirribonucleico”)
FG	Ferreira Gomes
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEPA	Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá
Kdr	do inglês: <i>Knockdown resistance</i>
LAFICAVE	Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores
MAC	Macapá
MS	Ministério da Saúde
Nav	Canal de sódio regulado por voltagem
OIA	Oiapoque
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> (“Reação em Cadeia da Polimerase”)
PG	Porto Grande
qPCR	do inglês <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (“Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa”)
SNP	do inglês: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (“Polimorfismo de Nucleotídeo Simples”)
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i> (“Sequências Simples Repetidas”)
SVS	Sistema de Vigilância em Saúde
TTZ	Tartarugalzinho
ZIKV	Vírus Zika

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes aegypti*

Aedes aegypti (Diptera, Culicidae: Linnaeus, 1762) é um mosquito com grande importância epidemiológica, por ser vetor de diversos arbovírus (*Arthropod-borne virus*) que causam impacto global na saúde pública. Teve sua origem na África e se espalhou por todo o mundo, com maior ocorrência em regiões tropicais e subtropicais. Sua característica antropofílica faz com que tenha uma estreita relação com ambientes urbanos, onde encontra condições necessárias para completar seu ciclo de vida dentro e em torno dos domicílios. Passa por quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva (estádios L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Figura 1). Os ovos possuem alto grau de resistência à dessecação e isso facilita a disseminação do mosquito, principalmente de forma passiva pelo humano, através de embarcações, trens, automóveis, aviões etc. (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Os níveis de infestação e distribuição desse vetor geralmente estão associados à temperatura, precipitação e ao crescimento populacional, sobretudo quando somados com inadequada infraestrutura urbana (Gubler 2011; Yang et al. 2021).

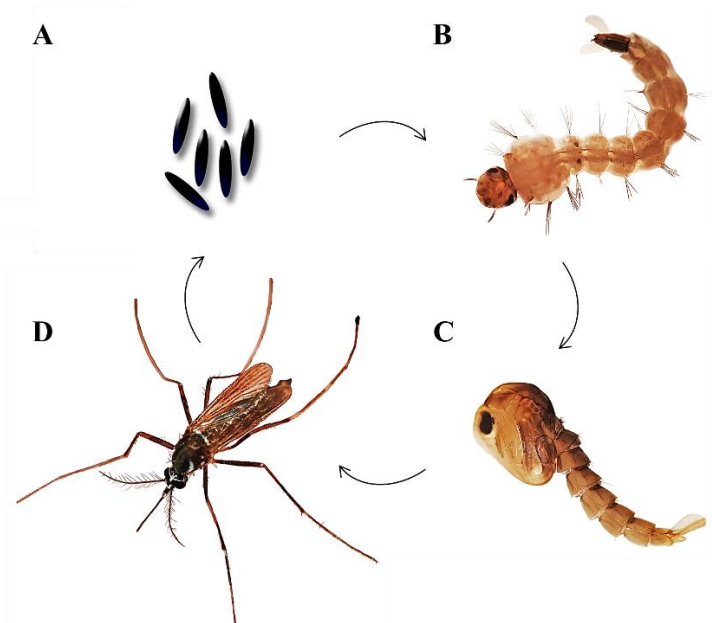


Figura 1. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*. A: ovos, B: Larva (estádio L4); C: pupa; D: mosquito fêmea.

1.2 Arboviroses

Os arbovírus transmitidos por *Ae. aegypti* causam importantes doenças como a dengue, Zika, chikungunya e febre amarela, em seus ciclos urbanos. A infecção pelo vírus dengue (DENV) é considerada a mais comum globalmente, com transmissão ocorrendo no mínimo em 128 países e com cerca de 4 bilhões de pessoas em risco (Stanaway et al., 2016). No Brasil, a dengue foi a arbovirose que causou os maiores problemas de saúde pública nas últimas três décadas, principalmente porque há a circulação de todos os quatro sorotipos de DENV no país (Nunes et al., 2019). Destacam-se os anos de 2015, 2016 e 2019, quando ocorreram as maiores epidemias recentes, sendo registrados cerca de 1,5 milhão de casos (Figura 2) (MS, 2020a).

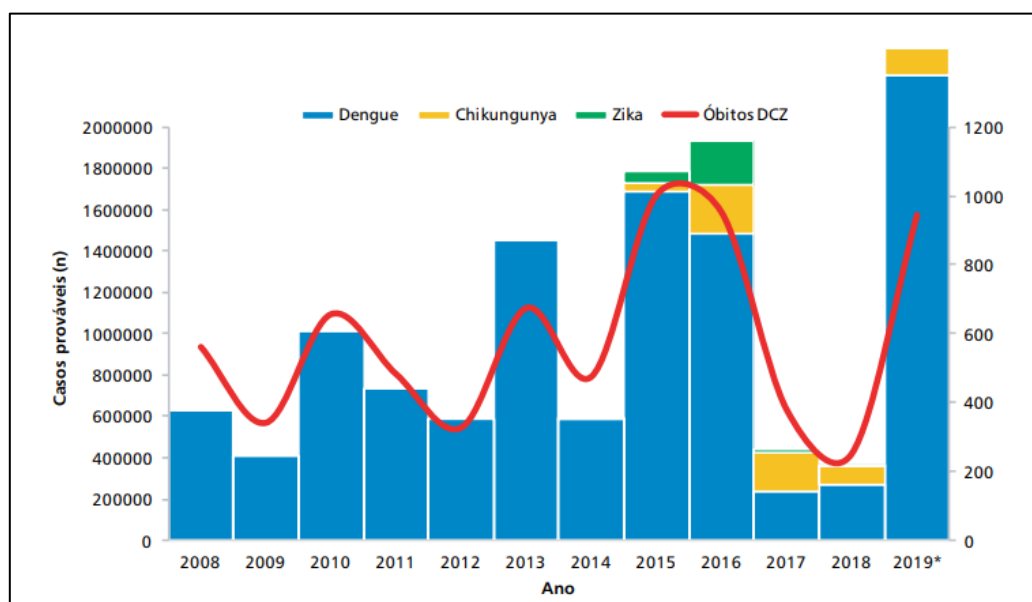


Figura 2. Número de casos prováveis e óbitos confirmados de dengue, chikungunya, Zika, Brasil, 2008 a 2019. Eixo X: anos, Eixo Y esquerdo: número de casos; Eixo Y direito: número de óbitos.

Fonte: MS, 2020a.

Além da preocupante situação epidemiológica da dengue nos últimos anos, o vírus chikungunya (CHIKV) foi registrado pela primeira vez no Brasil em 2014, no município de Oiapoque no estado do Amapá (Nunes et al., 2015), seguido pelo vírus Zika (ZIKV) em 2015, detectado inicialmente na região Nordeste (Zanluca et al., 2015). Desde então, o Brasil tem a circulação de todos esses arbovírus concomitantemente (MS, 2020a). Nesses anos de surtos, as

infecções causadas pelos vírus Zika e chikungunya foram consideradas as ocorrências epidemiológicas mais importantes nas Américas, por conta de suas complicações neurológicas como microcefalia em recém-nascidos e Síndrome de Guillain Barré (Pinheiro et al., 2016; Mlakar et al., 2016).

Há pouco tempo, o Brasil vivenciou um dos maiores surtos de febre amarela da história, alcançando a área de domínio de Mata Atlântica, onde a população não estava imunizada. O surto iniciou em 2014, teve seu pico entre 2017-2018 e apresenta efeitos até o presente, com a contínua notificação de casos em vários estados do país (MS, 2019). Os casos confirmados foram todos pelo ciclo silvestre de transmissão, mas a preocupação da reemergência da doença urbana é constante, uma vez que o vetor *Ae. aegypti* é um vetor competente, ou seja, bastante permissivo à infecção, replicação e transmissão do vírus da febre amarela, e tem potencial de reurbanizar seu ciclo de transmissão, eliminado do Brasil desde 1942 (Franco, 1969).

Simultaneamente às epidemias das arboviroses, vivemos atualmente uma sindemia de Covid-19 causada pelo novo Coronavírus (Sars-CoV-2). Com isso, os esforços dos sistemas de saúde e organizações mundiais estão majoritariamente voltados para conter a disseminação do novo coronavírus. Desde o início da sindemia no Brasil, observou-se uma diminuição significativa dos casos de arboviroses que, muito provavelmente, está associada a subnotificações e ao receio da população em procurar atendimento em unidades de saúde (MS, 2021a; Nascimento et al., 2021). Além disso, existe o risco de coinfeção entre arboviroses e covid-19, bem como a dificuldade em se ter um diagnóstico diferencial, uma vez que a sintomatologia se assemelha em alguns casos entre as patologias (Miah e Husna, 2020).

1.3 Controle de *Aedes aegypti*

A melhor forma de se evitar a propagação de arboviroses é controlando a população do *Ae. aegypti*. Até muito recentemente, o controle poderia ser feito por três principais métodos: 1) o controle mecânico, que consiste nas práticas de eliminar criadouros e reduzir o contato do vetor com o homem; 2) o controle

biológico, no qual há utilização de predadores ou patógenos capazes de reduzir a população do vetor; e 3) o controle químico, onde há o uso de inseticidas químicos para matar larvas e insetos adultos (Braga e Valle, 2007a; Braga e Valle, 2007b; Zara, 2016).

Devido ao insucesso em se controlar a densidade do vetor e, conseqüentemente, a expansão do número de casos das arboviroses associadas, nos últimos anos novas metodologias de controle têm sido aplicadas. No campo do controle biológico, citam-se a liberação de mosquitos infectados com *Wolbachia*, que são capazes de impedir a proliferação viral no mosquito, e da linhagem transgênica *RIDL* (do inglês, Liberação de Insetos que Carregam um Gene Letal Dominante) que ocasiona letalidade da prole, impactando na densidade da população alvo (Achee et al., 2019). Apesar de promissoras e eficazes, essas novas técnicas podem levar décadas até serem amplamente disseminadas para as regiões endêmicas.

Mais do que a eliminação de criadouros de larvas, o controle vetorial químico (pelo uso de inseticidas) é a estratégia mais praticada no mundo todo. Esta é uma tendência global e que, portanto, vem sendo amplamente utilizada. Os inseticidas, quando corretamente aplicados sobre uma população de insetos sensíveis, têm o potencial de diminuição drástica de sua densidade de forma muito rápida, podendo encerrar um surto de transmissão. Contudo, o uso exacerbado e sem o devido cuidado de preservação da efetividade dessa estratégia tem selecionado populações de mosquitos resistentes em todo o mundo. Este é hoje um dos principais problemas para o controle do *Aedes* (Moyes et al., 2017).

Existem algumas classes principais de inseticidas utilizadas no controle químico de vetores, como, por exemplo, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinóides, entre outros. Todas essas classes agem no sistema nervoso e tem diferentes modos de ação: organoclorados (DDT) e piretroides se ligam ao canal de sódio regulado por voltagem (Na_v) dos axônios, mantendo-os abertos e gerando impulsos nervosos repetidamente, o que ocasiona paralisia e morte (efeito *knockdown*) (Martins e Valle, 2012). Os carbamatos e organofosforados atuam na sinapse nervosa, inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE), impedindo a propagação do impulso nervoso (Alout et al., 2012). Já os neonicotinóides ativam receptores nicotínicos de acetilcolina

pós-sinápticos, o que gera impulsos nervosos contínuos, levando a paralisia e morte (Nagata et al., 1998).

1.4 Resistência a inseticidas e mutações *kdr*

Os principais mecanismos que conferem resistência a inseticidas podem ser comportamentais e fisiológicos. Na resistência comportamental, são selecionados os indivíduos que evitam naturalmente os locais borrifados/impregnados com inseticidas (Hemingway e Ranson, 2000). Quanto aos mecanismos fisiológicos, existem três barreiras principais que podem ser modificadas no organismo do inseto: o espessamento da cutícula, reduzindo a taxa de penetração do inseticida; a resistência metabólica, onde há um aumento na capacidade de metabolização do composto químico; e a resistência do sítio-alvo, quando há alguma alteração na molécula alvo do inseticida, impedindo sua ligação e, conseqüentemente, seu efeito tóxico (Braga e Valle, 2007c).

Mutações pontuais em sítios de ação dos inseticidas podem levar à substituição de aminoácidos na molécula alvo que, em última instância, pode diminuir a afinidade do inseticida à molécula. Temos o conhecimento de mutações muito bem caracterizadas, conhecidas como “*kdr*” (de *knockdown resistance*). Essas mutações ocorrem no gene que codifica o canal de sódio regulado por voltagem (Nav) e conferem resistência ao efeito *knockdown* dos inseticidas piretroides. O Nav é uma proteína transmembranar presente nos neurônios, sendo responsável pela transmissão do impulso nervoso. Além de ser alvo dos piretroides, também é alvo do DDT, outro inseticida neurotóxico de destaque na saúde pública (Martins e Valle, 2012). Em populações de *Ae. aegypti* do Brasil, há pelo menos três dessas mutações *kdr* disseminadas que, provavelmente, têm sido selecionadas pelo uso de piretroides (Costa et al., 2020).

As mutações *kdr* mais encontradas em populações brasileiras de *Ae. aegypti* consistem nas substituições dos aminoácidos Valina para Isoleucina no sítio (códon) 1016 (V1016I) do Nav e Fenilalanina para Cisteína no sítio 1534 (F1534C) (Linss et al., 2014; Brito et al., 2018; Macoris et al., 2018; Garcia et al.,

2018). Outras mutações *kdr* também são encontradas, como nos sítios 1011 e 410. No primeiro, há a troca de Isoleucina para Metionina (I1011M), mas que não sugere relevância na resistência aos piretroides (Brito et al., 2018) e no segundo, há a substituição de Valina para Leucina (V410L), que já foi vista sozinha ou em combinação com V1016I e F1534C, sendo altamente relacionada com a resistência aos piretroides (Haddi et al., 2017) (Costa et al., 2020).

O primeiro alelo *kdr* a se espalhar pela América Latina foi, provavelmente, o conhecido como R1 (mutante apenas no sítio 1534). Este haplótipo é o mais disseminado pelo Brasil e tem pelo menos duas origens filogenéticas independentes (Cosme et al., 2020), exemplo clássico de convergência adaptativa, no qual a mesma mutação apareceu em diferentes contextos genéticos, se espalharam pelo mundo e continuaram evoluindo independentemente. Em seguida, um desses alelos recebeu as mutações nos sítios 410 e 1016 em populações de *Ae. aegypti* das Américas, de forma que atualmente temos a circulação dos alelos *kdr* R1 (V410+V1016+1534C) e R2 (410L+1016I+1534F) (Figura 3). A configuração haplotípica desses alelos é geralmente determinada pela genotipagem alelo-específica, em reações independentes para cada sítio, ou ainda pelo sequenciamento de fragmentos do gene *Nav*, uma vez que se trata de um gene longo (~6.183 pb) (Cosme et al., 2020). Excepcionalmente são encontrados alguns genótipos, ainda que em baixas frequências, que sugerem a ocorrência de outros haplótipos, que sugerem duplicações gênicas (Costa et al., 2020). A forte pressão seletiva pelo uso de piretroides, o fluxo gênico facilitando a introgressão das mutações *kdr* em diferentes perfis genéticos, o custo evolutivo dessas mutações, entre outros fatores, torna esse marcador interessante não somente para a vigilância da resistência a inseticidas, mas para estudos da dinâmica evolutiva do *Ae. aegypti*.

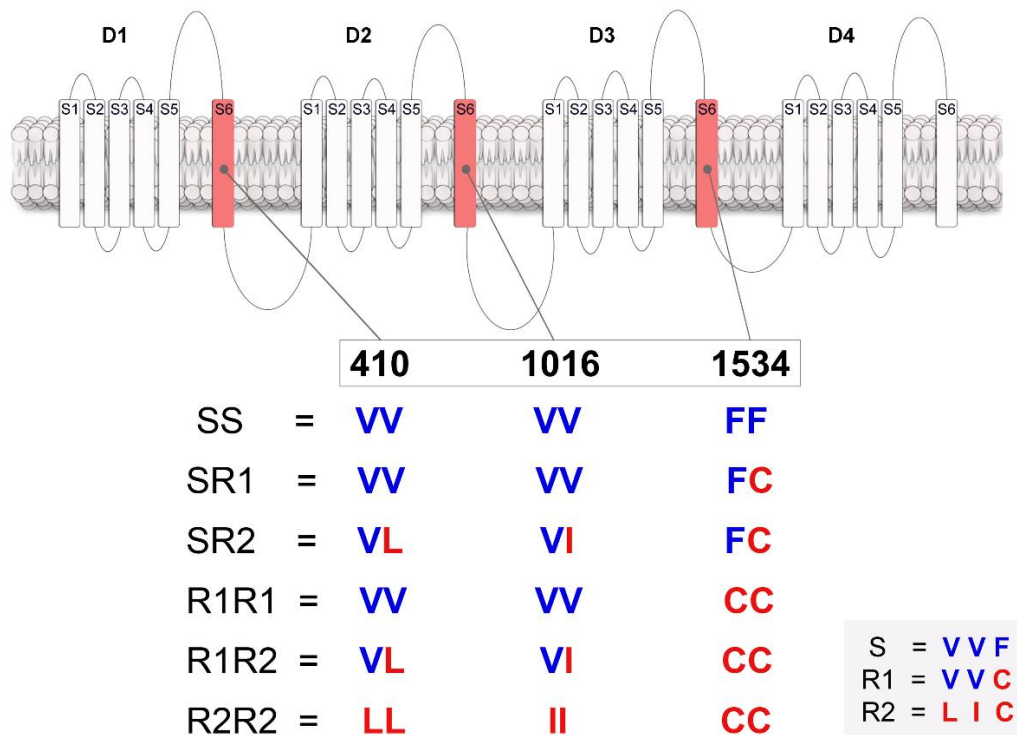


Figura 3. Gene do canal de sódio (Nav), destacando os principais sítios relacionados à resistência a piretroides (410, 1016 e 1534) e as combinações conhecidas de genótipos e alelos. V: Valina, F: Fenilalanina, C: Cisteína, L: Leucina, I: Isoleucina. SS: VV+VV+FF, SR1: VV+VV+FC, SR2: VL+VI+FC, R1R1: VV+VV+CC, R1R2: VL+VI+CC, R2R2: LL+II+CC. Aminoácidos em azul e vermelho são respectivamente selvagens e *kdr*.

1.5 Estruturação genética de populações de *Aedes aegypti*

A vigilância da ocorrência e dispersão das mutações *kdr* através de métodos moleculares se insere como prática integrada ao plano de monitoramento da resistência a inseticidas, uma vez que ajuda a inferir sobre o fenótipo de resistência a piretroides em populações naturais (Costa et al., 2020). Adicionalmente, análises sobre a estrutura e fluxo gênico entre populações podem contribuir para o entendimento da dinâmica evolutiva da emergência e dispersão de alelos de resistência. Para tanto, análises da diversidade nucleotídica de determinados marcadores são utilizadas para acessar a variabilidade genética, possibilitando identificar e explorar parâmetros evolutivos, como mutação, migração, deriva gênica e seleção natural (Hartl e Clark, 2010). Um bom exemplo de marcador são os microssatélites, também conhecidos como *Simple Sequence Repeats* (SSR). Os microssatélites se encontram distribuídos por todo genoma eucariótico, em regiões codificantes e não-codificantes (Li et

al., 2002; Vieira et al., 2016). São marcadores codominantes (possibilitam diferenciar indivíduos homocigotos e heterocigotos) e apresentam alto nível de polimorfismo multialélico, o que proporciona uma maior riqueza de informações (Schlotterer, 2000).

Em estudos populacionais anteriores feitos com *Ae. aegypti* foi visto que muitas populações podem apresentar significativa estruturação, com características genéticas bastante distintas em diversas localidades e regiões. Essas diferenças genéticas podem até gerar, em alguns casos, diferenciação na capacidade vetorial e outros fatores importantes na epidemiologia desse vetor (Costa-Ribeiro et al., 2007). Além disso, padrões estruturais genéticos também podem estar relacionados à resistência aos inseticidas e, conseqüentemente, afetar as estratégias de controle (Paduan et al., 2006; Urdaneta-Marquez e Failloux, 2011). No Brasil, estudos mostraram nos últimos anos que a ecologia do mosquito e o comportamento humano (trânsito de pessoas e uso de inseticidas, por exemplo) são fatores que afetam significativamente a estruturação genética de populações de *Ae. aegypti*, pois podem influenciar na migração do mosquito e resultar em eventos de introdução múltipla (Monteiro et al., 2014; Kotsakiozi et al., 2017; Maitra et al., 2019).

Anteriormente, já haviam sido demonstradas diferenças na estruturação genética (através de microssatélites) e na composição de alelos *kdr* em populações de *Ae. aegypti* de Macapá e Oiapoque, ambos no Amapá (Salgueiro et al., 2019). Este cenário foi explicado pelos altos níveis de fluxo gênico entre as populações de Oiapoque com as do Caribe, vindas da Guiana Francesa, e que provavelmente não chegavam a Macapá, por conta da densa floresta amazônica entre esta cidade e a região de fronteira nacional (Costa, 2017; Salgueiro et al., 2019). Neste estudo, contribuiremos para preencher uma lacuna no conhecimento acerca da genética das populações e da distribuição de mutações *kdr* em populações de *Ae. aegypti* de localidades entre Macapá e Oiapoque.

1.6 Estado do Amapá

Localizado ao norte do Brasil, o Amapá possui uma área com cerca de 142.500 Km² e conta com uma população estimada em 878 mil habitantes, abrigando a maior parte em sua capital, Macapá. O estado é cortado por uma grande rodovia, a BR-156, que é a principal via de acesso entre as cidades. Amapá se destaca por ser região de fronteira internacional em seu extremo norte, onde está situado Oiapoque, a 590 quilômetros da capital Macapá. Oiapoque é a única cidade do Amapá que faz limite com a Guiana Francesa (Departamento Ultramarino da França na América do Sul) (IBGE, 2021).

Regiões transfronteiriças merecem um olhar diferenciado, pois tendem a sofrer influência de diferentes contextos sociopolíticos. Isso pode dificultar, por exemplo, a implementação de estratégias e políticas para o controle de vetores (Peiter, 2005). Ainda existe a questão das travessias por grupos distintos de pessoas, podendo carregar agentes patogênicos para ambos os países. A situação é ainda mais agravada devido ao intenso fluxo de garimpeiros e contrabandistas, que devido à clandestinidade de suas atividades, o acesso a informações importantes para vigilância epidemiológica fica ainda mais dificultado, colocando em risco as populações locais e, em especial, as diversas comunidades indígenas da região. Portanto, os governos brasileiro e francês têm estudado projetos voltados para a vigilância conjunta de arboviroses e outras doenças, com o objetivo de trocar conhecimento e colaborar mutuamente para melhores ações de controle na região da fronteira Brasil/Guiana (MS, 2021b).

Oiapoque, inclusive, foi uma das portas de entrada para o chikungunya no Brasil em 2014, que chegou às Américas pelo Caribe (Nunes et al., 2015), o que reafirma a importância de um monitoramento mais rigoroso nas fronteiras. Além de chikungunya, o Amapá também vem registrando altos casos de dengue e Zika, principalmente entre os anos de 2014 e 2017 (Figura 4). Nos anos de 2020 e 2021, o Amapá registrou uma alta redução dos casos de arboviroses (Figura 4), mas muito provavelmente devido à subnotificação gerada pelo transtorno da pandemia do novo Coronavírus (MS, 2021a).

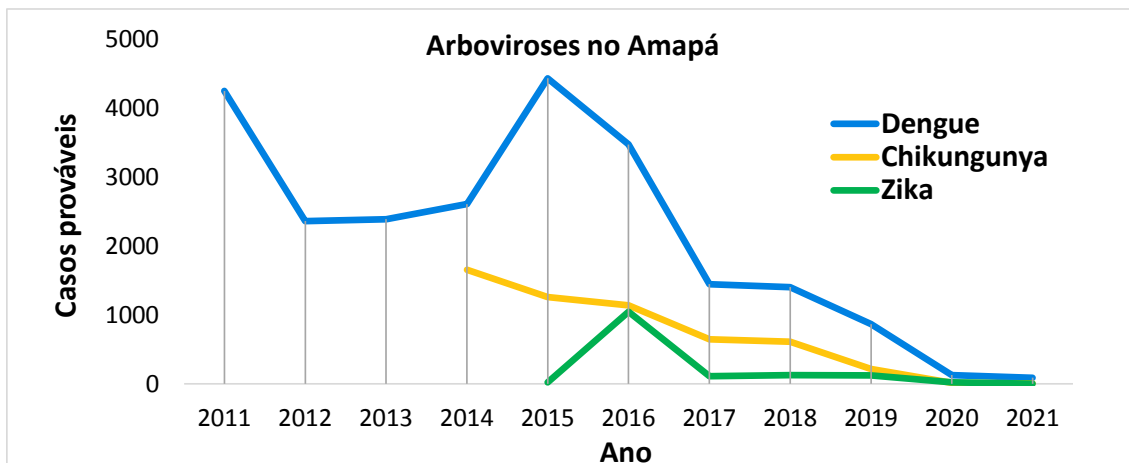


Figura 4. Casos notificados de dengue, Chikungunya e Zika no estado do Amapá de 2011 a 2021.

Fonte: dados extraídos do SVS-MS, 2016, 2019, 2020a, 2020b.

1.7 Justificativa

O conhecimento de estudos básicos sobre a fisiologia e genética de vetores pode ter grande influência no sucesso das práticas de controle destes insetos. Temos avançado no conhecimento de processos fisiológicos que tornam populações de *Ae. aegypti* resistentes a inseticidas e sobre a dinâmica evolutiva deste vetor nas diversas regiões do Brasil (Linss et al., 2014; Brito et al., 2018; Hayd et al., 2020; Costa et al., 2020; Rahman et al., 2021). Nos últimos anos as populações de *Ae. aegypti* do estado do Amapá têm despertado maior interesse. Por ser região de fronteira, serve de importante porta de entrada para populações do vetor com características distintas, como resistência a inseticidas e competência vetorial, por exemplo. Além disso, os aspectos geográficos da região levantam questões interessantes para o estudo do vetor, uma vez que o estado fica no extremo norte do Brasil e com locais relativamente isolados pela ampla cobertura vegetal e hidrográfica.

Sabendo que os transportes passivo e ativo contribuem significativamente para o fluxo gênico entre as populações, supomos que uma vez que a floresta amazônica é cortada por uma única via de transporte terrestre (BR-156), a dispersão ativa do vetor seja dificultada, o que pode justificar a diferenciação genética previamente observada entre as populações de Macapá e Oiapoque, como visto em Salgueiro et al (2019) e Costa (2017). Considerando a

importância epidemiológica de *Ae. aegypti*, a determinação da estruturação genética e fluxo gênico entre as populações avaliadas (ao longo da estrada BR-156) serão informações importantes para colaborar com o sistema de vigilância e controle do vetor no estado do Amapá, além de contribuir com informações sobre a dinâmica das suas populações.

HIPÓTESE: Como a floresta amazônica é cortada por uma única via, a dispersão do vetor é dificultada, o que justifica a diferenciação genética entre Macapá e Oiapoque, bem como distintos mecanismos de resistência, em especial *kdr*, mas ainda devemos encontrar diferentes níveis de diferenciação genética nas localidades entre os dois municípios.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a distribuição de mutações *kdr* e a estruturação genética de seis populações de *Ae. aegypti* do Amapá.

2.2 Objetivos Específicos

1. Quantificar as frequências de mutações relacionadas à resistência a inseticidas (*kdr*) do gene do canal de sódio dependente de voltagem (*Nav*) das populações.
2. Caracterizar a diversidade genética e a estruturação e fluxo gênico das populações estudadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do mosquito *Aedes aegypti*

As populações de *Ae. aegypti* foram coletadas em seis municípios do estado do Amapá: Oiapoque (OIA), Calçoene (CAL), Tartarugalzinho (TTZ), Ferreira Gomes (FG), Porto Grande (PG) e Macapá (MAC) (Figura 5). Oiapoque está situado no extremo norte do Amapá e faz fronteira com a Guiana Francesa, possui uma população de 28.524 habitantes e uma área de 23.034 km². Calçoene faz limite com Oiapoque, tem cerca de 11.493 habitantes e uma área de 14.117 km². Tartarugalzinho faz divisa com Ferreira Gomes, tem a população estimada em 18.217 habitantes e área de 6.684 km². Ferreira Gomes fica na região central do Amapá, faz limites com Macapá, Tartarugalzinho e Porto Grande, possui uma área de 4.973 km² e 8.151 habitantes. Porto Grande também fica na região central do estado, fazendo limite com Macapá e Ferreira Gomes, tem 22.927 habitantes e uma área de 4.428 km². Macapá é a capital do estado do Amapá, abriga a maior parte da população do estado, que é estimada em 522.357 habitantes, possuindo uma área de 6.563 km². Todas as localidades têm como acesso principal a rodovia BR-156 (IBGE, 2021).

As coletas foram feitas no mês de agosto de 2020, exceto em Macapá, que foi feita em outubro/2020, pela equipe do Laboratório de Entomologia Médica do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA), coordenada pelo Dr. Allan Kardec Ribeiro Galardo, através de armadilhas ovitrampas, conforme metodologia indicada pelo Ministério da Saúde (Campos et al., 2020). No total, foram distribuídas 50 ovitrampas em cada município. A distribuição em Calçoene, Ferreira Gomes, Porto Grande e Tartarugalzinho foi feita de forma randômica nos municípios como um todo. Já em Macapá e Oiapoque, a distribuição foi feita mais à margem da rodovia BR-156. Os ovos foram postos para eclodir naquele laboratório, e os adultos resultantes (F0) foram acondicionados em sílica gel e enviados ao Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ).

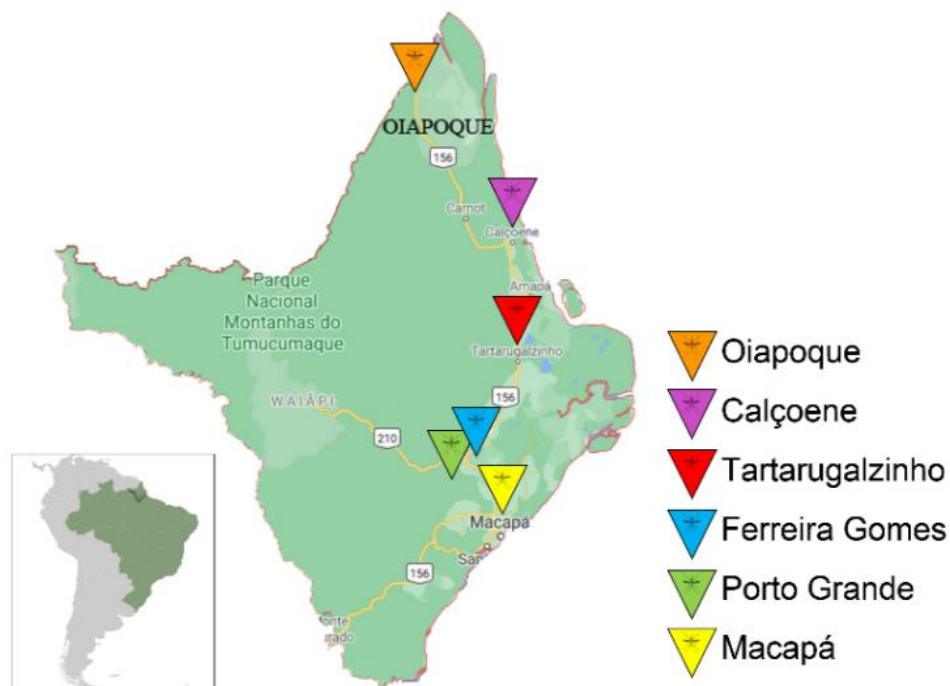


Figura 5. Localidades de coleta de *Aedes aegypti* no estado do Amapá.

3.2. Genotipagem *kdr*

Para as genotipagens, realizamos a extração de DNA individual de mosquitos inteiros, preferencialmente machos, da geração F0 (primeira geração proveniente da coleta dos ovos), através do método utilizando o tampão TNES (Tris-HCl 0,25 M; NaCl. 2 M; EDTA 0,1M; SDS 2,5% pH 7,5), descrito por Martins et al (2007). O DNA de cada amostra foi quantificado através do NanoDrop (*Thermo Scientific NanoDrop One C Spectrophotometer*) e as amostras foram normalizadas para 20 ng/μL. Cerca de 45 indivíduos de cada população foram genotipados para a detecção das mutações *kdr* V410L, V1016I e F1543C, através da qPCR em tempo real utilizando o kit *TaqMan Genotyping Master Mix – Applied Biosystems (ThermoFisher)* (ver Tabela 1 com as sequências dos primers e sondas), essencialmente como descrito em Costa et. al (2020).

Tabela 1. Sequências de primers e sondas para os SNPs V410L, V1016I e F1534C *kdr* em *Aedes aegypti*.

Sítio	ID	Varição	Primers	Sondas
410	AN2XA9W	GTA/TTA (Val/Leu)	For: GTGGCACATGCTCTTCTTCATT Rev: GGCGACAATGGCCAAGATC	Val: VIC-TCGTTCTACCTTGTAATT-NFQ Leu: FAM-TTCGTTCTACCTTTTAAATT-NFQ
1016	AHS1DL6	GTA/ATA (Val/Ile)	For: CGTGCTAACCGACAAATTGTTTCC Rev: GACAAAAGCAAGGCTAAGAAAAGGT	Val: VIC-CCCGCACAGGTACTIONA-FAM Ile: FAM-CCGCACAGATACTIONA-NFQ
1534	AHWSL61	TTC/TGC (Phe/Cys)	For: TCGCGAGACCAACATCTACATG Rev: GATGATGACACCGATGAACAGATTC	Phe: VIC-AACGACCCGAAGATGA-NFQ Cys: FAM-ACGACCCGACGATGA-NFQ

ID: identificação, For: *forward*, Rev: *reverse*, Val: Valina, Leu: Leucina, Ile: Isoleucina, Phe: Fenilalanina, Cys: Cisteína.

As reações foram realizadas de forma independente para cada sítio *kdr* e consistiram em 1x de *TaqMan Genotyping Master Mix*, 1x da sonda respectiva para cada SNP, 1 µL do DNA (20 ng) e água ultrapura q.s.p., somando 10 µL de reação total, executadas no equipamento *QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems)*, sob condições padrão: 45 ciclos com uma etapa de desnaturação de DNA (95 °C por 15 seg) e anelamento de primers e sondas (60 °C por 1 min), seguido pela extensão final (60 °C por 30 seg). As análises de genotipagem foram realizadas pelo *software online Genotype Analysis Module V3.9 (Applied Biosystems, na plataforma ThermoFisher Cloud)* (Figura 6), utilizando o perfil apresentado no CT 40. Os gráficos de frequências alélicas e genóticas foram realizados no *GraphPad Prism 9*. A partir da genotipagem dos três SNPs, e considerando os três alelos S, R1 e R2 comumente encontrados em populações brasileiras de *Ae. aegypti* (Costa et al, 2020), espera-se a combinação total de seis genótipos (Figura 3).

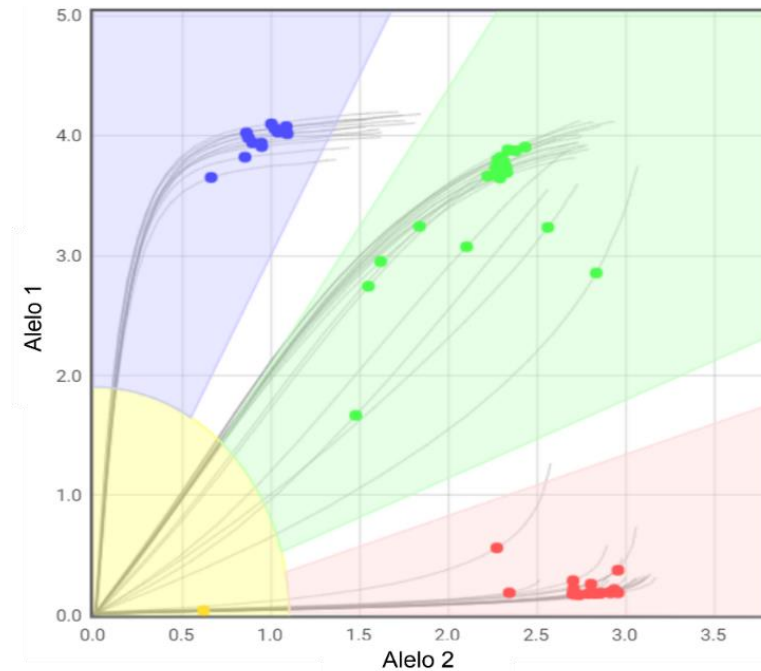


Figura 6. Exemplo do perfil de genotipagem de um sítio *kdr* para uma população, através de reação de qPCR em tempo real. Gráfico gerado pela plataforma ThermoFisher Cloud. Genótipos homozigotos (azul e vermelho) e heterozigoto (verde).

3.3. Genotipagem de microssatélites

Cerca de 45 indivíduos (F0) de cada uma das seis populações do Amapá foram genotipados para 12 loci de microssatélites (AC1, AC2, AC4, AC5, AG1, AG2, AG5, CT2, A1, A9, B2 e B3 – Tabela 2), bem caracterizados como polimórficos e amplamente utilizados em estudos de populações americanas de *Ae. aegypti* (Brown et al., 2011; Slotman et al., 2007; Monteiro et al., 2014). As genotipagens seguiram o protocolo padronizado por Brown et al (2011), com o kit de amplificação *Type-it PCR Master Mix* (Qiagen). Os *primers* foram sintetizados de acordo com o protocolo desenvolvido por Schuelke (2000), no qual consiste na inserção de uma sequência universal (cauda M13) na cauda 5' dos *primers forwards*, que se anela com a sequência de *primer* complementar marcada com fluorescência (FAM ou HEX) (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências dos primers para genotipagem de microssatélites em *Aedes aegypti*.

Nome (loci)	Primers (5' - 3')	Tamanho	Fluorescência	Repetição
AC1_for	TCCGGTGGGTTAAGGATAGA	195-211	FAM	DI
AC1_rev	ACTTCACGCTCCAGCAATCT			
AC2_for	AATACAACGCGATCGACTCC	180-188	FAM	DI
AC2_rev	AACGATTAGCTGCTCCGAAA			
AC4_for	GCGAATCGGTTCCCATAGTA	128-130	FAM	DI
AC4_rev	CTTTATCGATCGACGCCATT			
AC5_for	TGGATTGTTCTTAACAAACACGAT	146-197	FAM	DI
AC5_rev	CGATCTCACTACGGGTTTCG			
AG1_for	AATCCCCACACAAACACACC	115-121	HEX	DI
AG1_rev	GGCCGTGGTGTACTCTCTC			
AG2_for	TCCCCTTCAAACCTAATGG	113-174	HEX	DI
AG2_rev	TTTGCCCTCGTATGCTCTCT			
AG5_for	TGATCTTGAGAAGGCATCCA	166-178	HEX	DI
AG5_rev	CGTTATCCTTTCATCACTTGTTTG			
CT2_for	CGCAGTAGGCGATATTCGTT	182-190	HEX	DI
CT2_rev	ACCACCACCAACACCATTCT			
A1_for	GACGTAAACCGAGTGGGAGA	156-174	FAM	TRI
A1_rev	GCATTTAACCGCGCTAGAAC			
A9_for	GCAGCATGCACTTCACATTT	182-191	FAM	TRI
A9_rev	CGAATGGCATCTGATTCAAG			
B2_for	GGAAACACTTGCAGGGACAT	95-113	HEX	TRI
B2_rev	GCAGATGGTGGCAGTAGTGA			
B3_for	GCAAGTTGCAAAGTGCTCAA	166-175	HEX	TRI
B3_rev	ACCCACCGTTTGCTTTGTAG			
*FAM	FAM-TCCCAGTCACGACGT			
*HEX	HEX-TCCCAGTCACGACGT			

DI: repetições dinucleotídicas, TRI: repetições trinucleotídicas. *sondas fluorescentes.

A inserção da cauda M13 permite a otimização e minimização dos custos, pois as amplificações são feitas de forma *multiplex*, ou seja, quatro *loci* por genotipagem (Figura 7). As reações de PCR continham 1x de *Type-it Multiplex PCR Master Mix* (Qiagen), 25 nM dos *primers forwards*, 250 nM dos *primers reverse* e 500 nM do oligo com cauda M13 marcada com fluorescência, com volume final de 10 μ L, seguindo as condições de amplificação a 94 °C por 10 min, com 35 ciclos a 94 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg e uma etapa final de 72 °C por 5 min. Após as amplificações, as amostras foram enviadas para a Plataforma Tecnológica (RPT-01) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) para genotipagem por eletroforese capilar em um sequenciador ABI 3130 (*Applied Biosystems*), com um padrão de tamanho interno *GeneScan LIZ 500* (*Applied Biosystems*).

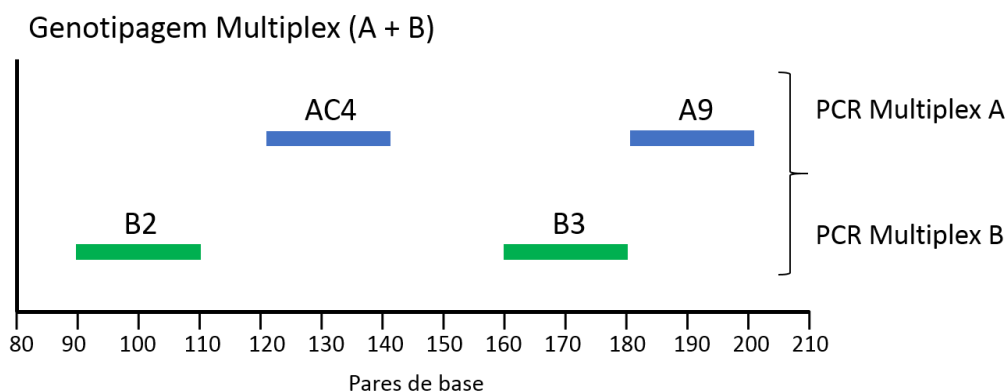


Figura 7. Combinação de loci utilizados nas PCRs de genotipagens multiplex de microssatélites de *Aedes aegypti*. As bandas azuis representam a fluorescência FAM e as bandas verdes a fluorescência HEX. A e B exemplificam amplificações de dois loci de uma vez: AC4/A9 e B2/B3, respectivamente (permitindo a genotipagem de 4 loci em apenas uma reação). Fonte: Modificado de Lima, 2017.

3.4. Análises de dados de microssatélites

A identificação dos alelos foi feita utilizando o software *Geneious* 9.1.8 (Kearse et al., 2012), através de um *plug-in* desenvolvido para análise de fragmentos ABI (*Geneious Microsatellite Plugin*). Após essa análise inicial, os dados foram exportados para o programa *GenAlEx* 6.5 (Peakall e Smouse, 2012), onde foram analisados parâmetros que inferem variabilidade, diversidade

e diferenciação genética, como riqueza alélica (N_a), número de alelos efetivos (N_e), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}), alelos privados, índice de fixação (F_{ST}) e Análise de Variância Molecular (AMOVA). A riqueza alélica define o número de alelos diferentes em uma população. O Número de alelos efetivos estima quantos alelos contribuem efetivamente para a população. A heterozigosidade de um marcador depende do número de alelos e de suas frequências numa população. A H_e é uma previsão baseada na frequência alélica conhecida, proveniente das amostras individuais, e sua média é obtida pela média aritmética de todos os loci estudados. Já a heterozigosidade média observada é obtida pela soma dos valores de cada loci, dividida pelo número total de loci analisados. O F_{IS} mede o grau de endocruzamento dentro de uma população e os alelos privados são alelos exclusivos de determinadas populações. O índice de fixação (F_{ST}) mede a proporção da variância total das frequências alélicas que ocorre entre subpopulações, ou seja, é um parâmetro usado para determinar a diferenciação genética. AMOVA estima a percentagem de variância entre os grupos, mas considera níveis hierárquicos de diferenciação dentre e entre as populações (Templeton, 2011).

O programa *Genepop 4.7.5* (Raymond e Rousset, 1995; Rousset, 2008) foi usado para analisar o desequilíbrio de ligação (LD), teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE). O software *Structure 2.3.4* (Pritchard et al., 2000) foi empregado para avaliar se houve estruturação entre as populações estudadas, baseando-se no valor do número de grupos genéticos (K). Para determinação do melhor valor de K, foram utilizadas 10 corridas independentes com 500.000 iterações de cadeias de Monte Carlo (MCMC), excluindo 20% das cadeias iniciais (*burn-in*). Em seguida, os dados gerados foram analisados através do *Structure Harvester 2.3* (Earl e Vonholdt, 2012) para determinar a melhor quantidade de grupos genéticos (k), a partir de uma análise do gráfico de ΔK (Evanno et al., 2005). Por último, os arquivos gerados foram executados no programa *Clumpak Clustering Markov Packager Across K* (Kopelman et al., 2015), no qual foi realizado um consenso das 10 corridas feitas no programa *Structure*, gerando o gráfico representativo da estrutura genética das populações. A análise Bayesiana de agrupamento populacional avaliada pelo programa *Structure* foi utilizada para quantificar o número provável de

populações geneticamente homogêneas (K). O método Bayesiano não assume a existência de populações pré-definidas, além de assumir que em cada população os loci estão em HWE e equilíbrio de ligação.

A Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) também foi realizada utilizando o pacote *Adegenet* (Jombart 2008, Jombart et al., 2010) no programa R (*R Core Team* 2018). DAPC é usada para inferir o número de grupos de indivíduos geneticamente relacionados. A abordagem estatística desse método é multivariada, no qual a variância de amostra é particionada em um componente entre grupos e dentro do grupo, a fim de maximizar a discriminação entre os grupos. Primeiramente, os dados são transformados usando uma Análise de Componentes Principais (PCA) e, posteriormente, os clusters são identificados usando a Análise Discriminante (DA).

4. RESULTADOS

4.1. Genotipagem das mutações *kdr*

No total, 272 indivíduos foram genotipados para os três sítios 410, 1016 e 1534 do *Nav*. Todas as populações analisadas apresentaram os dois alelos *kdr* conhecidos: R1 (*kdr* apenas no sítio 1534 – VVC) e R2 (*kdr* nos sítios 410, 1016 e 1534 – LIC). Foram observados ao todo seis genótipos esperados pela combinação dos alelos clássicos S (tipo selvagem – VVF), R1 e R2, além de dois genótipos “raros”: LL+VI+CC (X) e LL+VI+FC (Y), assim chamados por serem previamente observados em frequências muito baixas em populações brasileiras de *Ae. aegypti* (Costa et al., 2020) (Tabela 3, Figura 8).

De modo geral, o genótipo menos encontrado foi o SS (selvagem) e o mais frequente foi o R1R1 (homozigoto *kdr* apenas no sítio 1534) (Figura 9). Na população de Porto Grande só foram observados alelos *kdr* e, por outro lado, a população com maior frequência do alelo S foi Macapá, que também foi a única população onde não foi encontrado o genótipo R2R2 (Figuras 8 e 9). A resistência a piretroides mediada por alteração no canal de sódio, via mutações *kdr*, tem característica recessiva, ou seja, precisa estar presente em ambos os cromossomos. Portanto, com relação ao somatório dos genótipos que presumivelmente conferem resistência a piretroides, ou seja, com mutação *kdr* em homozigose (Brito et al., 2018), todas as populações apresentaram alta frequência de “genótipos de resistência” (R1R1, R1R2 e R2R2), sendo a de Macapá a menor (76,7%). Já nas demais, as frequências ficaram acima de 90%, com 100% em Porto Grande (Tabela 3).

Macapá teve a menor frequência do alelo R2 (9,3%) e a maior do R1 (78%). Por outro lado, Oiapoque teve a maior frequência do alelo R2 (66,3%) e a menor do R1 (15,2%) (Tabela 4). Os genótipos “raros” LL+VI+CC (X) foram observados nas populações de Calçoene (8,7%) e Oiapoque (2,2%), sendo o LL+VI+FC (Y) encontrado apenas em Oiapoque (28,3%) (Tabela 3, Figura 9). Portanto, estes genótipos com baixíssima frequência na média das populações do restante do Brasil (Costa et al., 2020) estão com frequências relativamente altas nestas populações. As frequências genotípicas estão representadas na

Tabela 3, o gráfico geral dos genótipos na Figura 8, frequência genotípica por população na Figura 9 e frequências alélicas por população na Tabela 4 e Figura 10.

Tabela 3. Frequências dos genótipos *kdr* nas populações de *Aedes aegypti* do Amapá, considerando os SNPs V410L, V1016I, F1534C do *Nav*.

Pop	N	SS	SR1	SR2	R1R1	R1R2	R2R2	LL+VI+CC	LL+VI+FC
CAL	46	0	8.7	0	34.8	32.6	15.2	8.7	0
OIA	46	0	0	6.5	2.2	26.1	34.8	2.2	28.3
PG	45	0	0	0	37.8	31.1	31.1	0	0
FG	46	0	2.2	0	26.1	45.7	26.1	0	0
TTZ	46	0	0	8.7	37	32.6	21.7	0	0
MAC	43	2.3	14	7	65.1	11.6	0	0	0

Pop: população, N: número de indivíduos, CAL: Calçoene, OIA: Oiapoque, PG: Porto Grande, FG: Ferreira Gomes, TTZ: Tartarugalzinho, MAC: Macapá, SS: VV+VV+FF, SR1: VV+VV+FC, SR2: VL+VI+FC, R1R1: VV+VV+CC, R1R2: VL+VI+CC, R2R2: LL+II+CC, X: LL+VI+CC, Y: LL+VI+FC

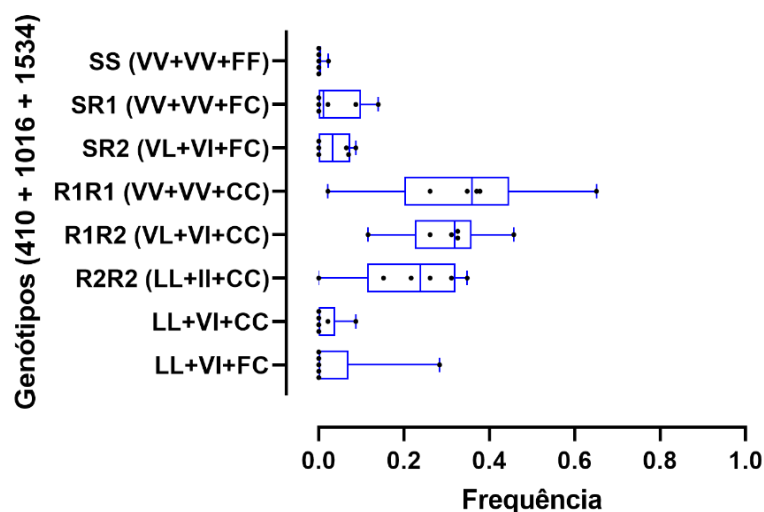


Figura 8. Frequências genotípicas de *kdr* das populações de *Aedes aegypti* do Amapá. Gráficos tipo box-plot, em que cada ponto indica a frequência do respectivo genótipo de cada população (Calçoene, Oiapoque, Porto Grande, Ferreira Gomes, Tartarugalzinho e Macapá). As caixas indicam valores da mediana, quartis inferior e superior, e valores mínimos e máximos nas extremidades.

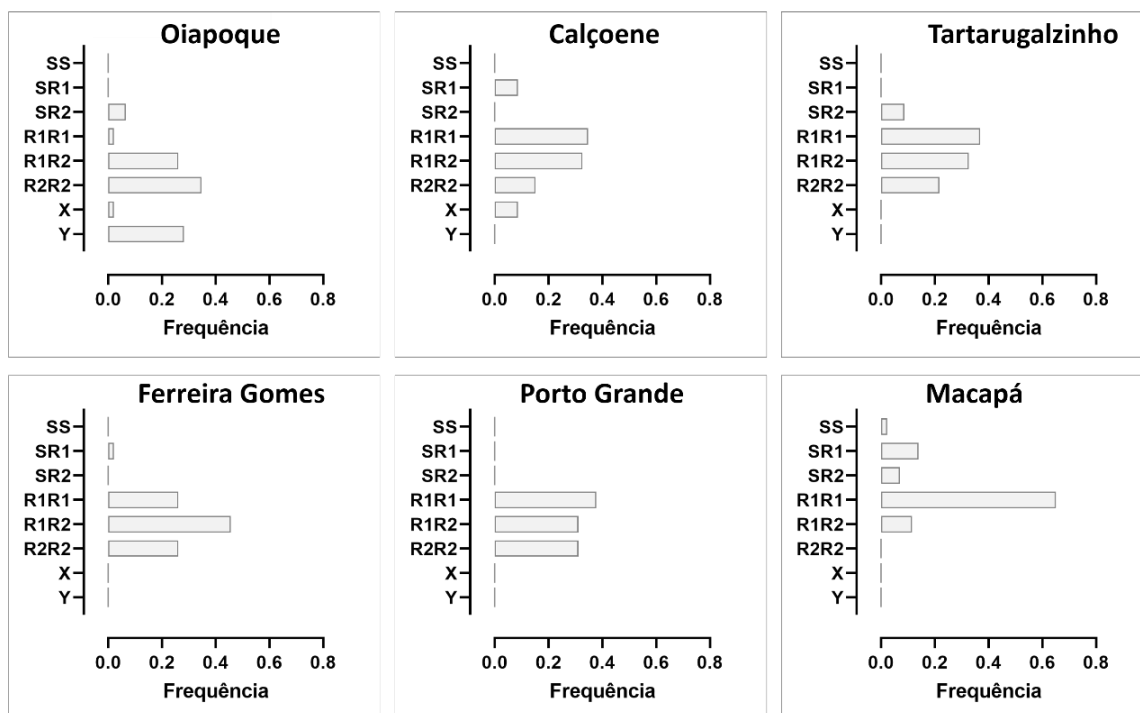


Figura 9. Frequências genótípicas de *kdr* por população do estado do Amapá.
X e Y representam os genótipos “raros” LL+VI+CC e LL+VI+FC, respectivamente.

Tabela 4. Frequências dos alelos *kdr* nas populações de *Aedes aegypti* do Amapá, considerando os SNPs V410L, V1016I, F1534C do *Na_v*.

Pop	N	S (VVF)	R1 (VVC)	R2 (LIC)	LVC	LVF
CAL	46	4.3	55.4	35.9	4.3	0
OIA	46	3.2	15.2	66.3	1.1	14.1
PG	45	0	53.3	47	0	0
FG	46	1.1	50	48.9	0	0
TTZ	46	4.3	53.2	42.4	0	0
MAC	43	12.8	78	9.3	0	0

Pop: população, N: número de indivíduos, CAL: Calçoene, OIA: Oiapoque, PG: Porto Grande, FG: Ferreira Gomes, TTZ: Tartarugalzinho, MAC: Macapá.

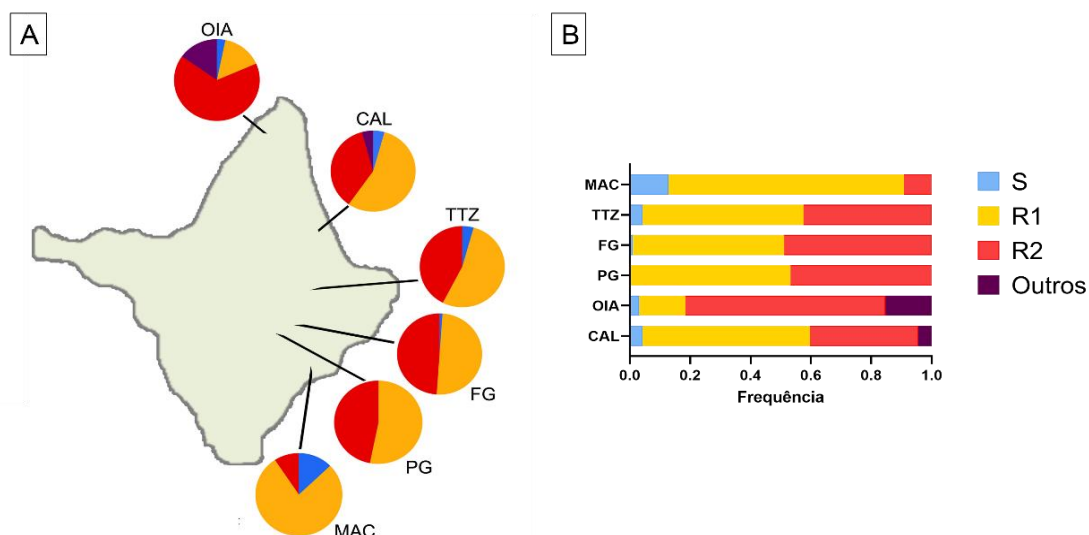


Figura 10. Distribuição das frequências alélicas de *kdr* das populações de *Aedes aegypti* do estado do Amapá. A: Mapa do Amapá com a distribuição dos alelos *kdr* indicada nas localidades. B: Frequências alélicas por população. OIA: Oiapoque, CAL: Calçoene, TTZ: Tartarugalzinho, FG: Ferreira Gomes, PG: Porto Grande, MAC: Macapá. S: alelo selvagem (VVF), R1: mutante no sítio 1534 (VVC), R2: mutante nos três sítios (LIC), Outros: LIC (R2), LVC, LVF, LIF.

4.2. Genotipagem de microssatélites

Ao todo, 288 amostras foram genotipadas para os 12 loci de microssatélites. A partir disso, estimamos variabilidade e diversidade genética das populações através de alguns parâmetros, como riqueza alélica (N_a), número efetivo (N_e), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) e coeficiente de endogamia (F_{IS}). Podemos observar os valores desses parâmetros, bem como as frequências alélicas por população na Tabela 5. Todos os loci mostraram-se polimórficos, com o número de alelos variando de 2 (AC4) a 17 (AG2) (Tabela 5) e foram encontrados alelos privados em quatro das seis populações analisadas, em sua maioria no locus AG2, que foi o mais polimórfico (Tabela 6).

Tabela 5. Estimativas da variabilidade e diversidade genética de 12 loci de microssatélites analisados em seis populações de *Aedes aegypti* do Amapá.

Locus	Alelo/n	CAL	OIA	PG	FG	TTZ	MAC
AC4	N	48	48	46	47	47	45
	130	0,604	0,469	0,500	0,479	0,447	0,644
	132	0,396	0,531	0,500	0,521	0,553	0,356
A9	N	48	48	44	47	44	43
	182	0,000	0,448	0,159	0,032	0,159	0,140

		188	0,604	0,094	0,625	0,851	0,670	0,477
		191	0,260	0,083	0,193	0,106	0,148	0,384
		194	0,135	0,375	0,023	0,011	0,023	0,000
B2	N		48	48	46	47	48	45
		95	0,167	0,031	0,228	0,053	0,240	0,044
		113	0,833	0,969	0,772	0,947	0,760	0,956
B3	N		48	48	45	47	47	45
		166	0,417	0,219	0,500	0,798	0,596	0,544
		172	0,323	0,583	0,500	0,202	0,394	0,456
		175	0,260	0,198	0,000	0,000	0,011	0,000
AC5	N		48	45	45	46	47	43
		152	0,063	0,000	0,078	0,196	0,021	0,070
		156	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000
		158	0,427	0,167	0,500	0,250	0,521	0,407
		159	0,458	0,478	0,333	0,239	0,309	0,337
		160	0,052	0,256	0,089	0,315	0,149	0,186
AC1	N		48	47	45	47	47	44
		195	0,063	0,181	0,000	0,000	0,011	0,080
		197	0,375	0,436	0,278	0,277	0,309	0,250
		199	0,344	0,032	0,222	0,032	0,213	0,057
		201	0,010	0,043	0,111	0,149	0,128	0,170
		203	0,000	0,000	0,011	0,011	0,011	0,000
		209	0,208	0,309	0,378	0,532	0,330	0,443
AG1	N		48	47	45	47	48	45
		117	0,146	0,043	0,011	0,000	0,031	0,000
		119	0,125	0,447	0,078	0,149	0,219	0,000
		121	0,438	0,330	0,711	0,628	0,615	0,411
		123	0,292	0,181	0,200	0,223	0,135	0,589
AG5	N		47	47	45	47	46	45
		166	0,213	0,032	0,189	0,085	0,130	0,133
		168	0,085	0,000	0,100	0,043	0,054	0,067
		170	0,160	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000
		172	0,011	0,138	0,000	0,011	0,000	0,000
		176	0,181	0,117	0,367	0,489	0,413	0,256
		178	0,351	0,691	0,344	0,372	0,402	0,444
		180	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100
A1	N		48	46	45	48	47	43
		158	0,000	0,065	0,144	0,031	0,117	0,047
		162	0,219	0,587	0,289	0,365	0,351	0,442
		168	0,781	0,348	0,567	0,604	0,532	0,512
AC2	N		48	46	45	48	46	43
		184	0,427	0,511	0,244	0,333	0,337	0,547
		186	0,000	0,000	0,089	0,156	0,054	0,000
		188	0,573	0,489	0,667	0,469	0,609	0,453
		190	0,000	0,000	0,000	0,042	0,000	0,000
AG2	N		48	45	44	47	47	43

117	0,646	0,256	0,420	0,340	0,298	0,140	
119	0,104	0,056	0,000	0,000	0,000	0,012	
121	0,052	0,178	0,295	0,298	0,447	0,419	
131	0,010	0,233	0,000	0,000	0,011	0,023	
133	0,052	0,011	0,045	0,011	0,096	0,000	
135	0,000	0,044	0,000	0,000	0,000	0,000	
137	0,000	0,156	0,080	0,128	0,000	0,058	
139	0,000	0,067	0,000	0,191	0,000	0,233	
141	0,073	0,000	0,000	0,000	0,000	0,023	
143	0,063	0,000	0,000	0,000	0,000	0,058	
145	0,000	0,000	0,125	0,032	0,032	0,000	
147	0,000	0,000	0,023	0,000	0,021	0,000	
149	0,000	0,000	0,011	0,000	0,032	0,000	
151	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	
157	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,023	
159	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	
161	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053	0,000	
CT2	N	48	46	44	46	47	43
	184	0,510	0,196	0,273	0,424	0,330	0,314
	188	0,188	0,370	0,659	0,522	0,500	0,453
	194	0,302	0,435	0,068	0,054	0,170	0,233
N_a		3,583	3,750	3,583	3,583	3,917	3,583
N_e		2,497	2,623	2,403	2,336	2,438	2,510
H_o		0,528	0,538	0,548	0,567	0,576	0,564
H_e		0,559	0,562	0,554	0,510	0,567	0,553
F_{IS}		0,052	0,029	0,008	-0,097	-0,024	0,058

N_a: riqueza alélica, N_e: número de alelos efetivos, H_o: heterozigidade observada, H_e: heterozigidade esperada, F_{IS}: coeficiente de endogamia. CAL: Calçoene, OIA: Oiapoque, PG: Porto Grande, FG: Ferreira Gomes, TTZ: Tartarugalzinho, MAC: Macapá.

Tabela 6. Número de alelos privados encontrados por população estudada.

Pop	Locus	Alelo	Freq
OIA	AC5	156	0,100
OIA	AG2	135	0,044
FG	AC2	190	0,042
TTZ	AG2	151	0,011
TTZ	AG2	161	0,053
MAC	AG5	180	0,100
MAC	AG2	157	0,023
MAC	AG2	159	0,012

Pop: população, Freq: frequência, CAL: Calçoene, OIA: Oiapoque, PG: Porto Grande, FG: Ferreira Gomes, TTZ: Tartarugalzinho, MAC: Macapá.

Todos os loci de microssatélites foram testados para desvios de equilíbrio *Hardy-Weinberg* (EHW) e os loci que se mostraram com maiores desvios

significativos dentre as populações foram AC1, AG5 e AG2 (Tabela 7). A maioria desses loci que apresentaram desvios significativos possuem valores de F_{IS} positivos, o que indica que as populações tenham excesso de homozigotos. O teste de desequilíbrio de ligação (LD) também foi realizado (Tabela 8), de forma que os valores observados revelaram independência na maioria dos loci.

Tabela 7. Teste para desvios de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Pop	Locus	P-val	S.E.
CAL	AC4	0.5454	-
CAL	A9	0.0000	-
CAL	B2	0.3228	-
CAL	B3	0.8879	-
CAL	AC5	0.0318	-
CAL	AC1	0.6703	0.0009
CAL	AG1	0.0292	-
CAL	AG5	0.0000	0.0000
CAL	A1	1.000	-
CAL	AC2	0.5546	-
CAL	AG2	0.0000	0.0000
CAL	CT2	0.3341	-
OIA	AC4	0.7776	-
OIA	A9	0.0018	-
OIA	B2	1.000	-
OIA	B3	0.3823	-
OIA	AC5	0.1381	-
OIA	AC1	0.1451	0.0007
OIA	AG1	0.0240	-
OIA	AG5	0.9397	0.0005
OIA	A1	0.4639	-
OIA	AC2	1.000	-
OIA	AG2	0.0000	0.0000
OIA	CT2	0.0874	-
PG	AC4	0.7727	-
PG	A9	0.0178	-
PG	B2	0.6747	-
PG	B3	0.5593	-
PG	AC5	0.1806	-
PG	AC1	0.0608	0.0005
PG	AG1	0.1111	-
PG	AG5	0.0050	-
PG	A1	0.9046	-

PG	AC2	0.5894	-
PG	AG2	0.3410	0.0017
PG	CT2	0.0702	-
FG	AC4	1.000	-
FG	A9	0.6788	-
FG	B2	1.000	-
FG	B3	0.3618	-
FG	AC5	0.0084	-
FG	AC1	0.0005	0.0000
FG	AG1	0.8074	-
FG	AG5	0.0000	0.0000
FG	A1	0.0000	-
FG	AC2	0.2272	-
FG	AG2	0.0198	0.0003
FG	CT2	1.000	-
TTZ	AC4	0.5577	-
TTZ	A9	0.0002	-
TTZ	B2	0.7086	-
TTZ	B3	1.000	-
TTZ	AC5	0.4544	-
TTZ	AC1	0.0005	0.0000
TTZ	AG1	0.2638	-
TTZ	AG5	0.2910	-
TTZ	A1	0.2464	-
TTZ	AC2	0.0831	-
TTZ	AG2	0.0195	0.0007
TTZ	CT2	0.0092	-
MAC	AC4	1.000	-
MAC	A9	0.0201	-
MAC	B2	0.0004	-
MAC	B3	0.7647	-
MAC	AC5	0.0524	-
MAC	AC1	0.0171	0.0002
MAC	AG1	1.000	-
MAC	AG5	0.0400	0.0004
MAC	A1	0.0512	-
MAC	AC2	0.1265	-
MAC	AG2	0.0007	0.0001
MAC	CT2	0.0970	-

Pop: população, Freq: frequência, CAL: Calçoene, OIA: Oiapoque, PG: Porto Grande, FG: Ferreira Gomes, TTZ: Tartarugalzinho, MAC: Macapá. P-valor < 0.05 = pouco significativo, P < 0.01 = significância média, P < 0.001 = muito significativo. Locus com desvios significantes estão em negrito. S.E.: *Standard Error*.

Tabela 8. Desequilíbrio de Ligação (LD) entre cada par de locus.

Locus (par)	X ²	P-Valor
AC4 / A9	>61.606999	<1.15e-08
AC4 / B2	15.541.556	0.213147
A9 / B2	14.480.565	0.271078
AC4 / B3	>70.343976	<2.76e-10
A9 / B3	46.591.034	5.49e-06
B2 / B3	15.650.004	0.207797
AC4 / AC5	13.974.290	0.302353
A9 / AC5	43.315.598	2.00e-05
B2 / AC5	37.712.624	0.000171
B3 / AC5	29.666.275	0.003134
AC4 / AC1	>85.791461	<3.21e-13
A9 / AC1	>76.295514	<2.09e-11
B2 / AC1	27.919.502	0.005684
B3 / AC1	>67.705095	<8.59e-10
AC5 / AC1	>62.500463	<7.87e-09
AC4 / AG1	30.659.627	0.002220
A9 / AG1	38.884.766	0.000110
B2 / AG1	10.984.474	0.530250
B3 / AG1	25.246.395	0.013697
AC5 / AG1	>72.091735	<1.30e-10
AC1 / AG1	>48.047096	<3.07e-06
AC4 / AG5	>55.738040	<1.27e-08
A9 / AG5	>61.361882	<1.27e-08
B2 / AG5	23.950.577	0.020658
B3 / AG5	33.692.005	0.000754
AC5 / AG5	>54.167364	<2.55e-07
AC1 / AG5	40.287.617	6.44e-05
AG1 / AG5	>46.961712	<4.73e-06
AC4 / A1	36.080.616	0.000314
A9 / A1	32.334.980	0.001228
B2 / A1	13.582.972	0.328127
B3 / A1	52.138.229	5.86e-07
AC5 / A1	38.033.238	0.000152
AC1 / A1	42.047.064	3.27e-05
AG1 / A1	39.958.981	7.30e-05
AG5 / A1	31.595.561	0.001597
AC4 / AC2	22.686.314	0.030510
A9 / AC2	25.688.359	0.011877
B2 / AC2	17.597.384	0.128473
B3 / AC2	18.122.596	0.112018
AC5 / AC2	>55.421129	<1.52e-07
AC1 / AC2	27.496.725	0.006550

AG1 / AC2	>86.419069	<2.43e-13
AG5 / AC2	29.071.264	0.003845
A1 / AC2	39.393.964	9.06e-05
AC4 / AG2	36.432.604	0.000276
A9 / AG2	>63.623205	<4.89e-09
B2 / AG2	23.543.238	0.023452
B3 / AG2	51.181.144	8.65e-07
AC5 / AG2	67.138.600	1.09e-09
AC1 / AG2	>77.744909	<1.11e-11
AG1 / AG2	>106.817461	<2.54e-17
AG5 / AG2	45.612.267	8.09e-06
A1 / AG2	46.968.560	4.72e-06
AC2 / AG2	44.843.615	1.10e-05
AC4 / CT2	22.313.924	0.034148
A9 / CT2	>49.181844	<1.94e-06
B2 / CT2	16.283.053	0.178613
B3 / CT2	26.299.380	0.009734
AC5 / CT2	>90.219090	<4.48e-14
AC1 / CT2	38.862.001	0.000111
AG1 / CT2	44.025.231	1.51e-05
AG5 / CT2	31.936.814	0.001415
A1 / CT2	29.917.554	0.002873
AC2 / CT2	32.076.152	0.001347
AG2 / CT2	47.218.682	4.27e-06

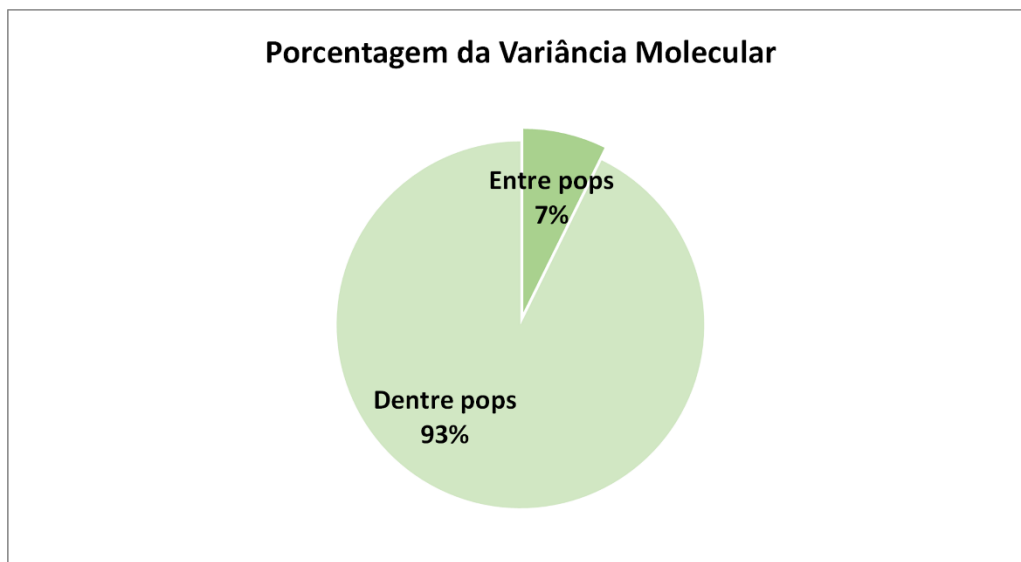
X²: Teste qui-quadrado, P-valor: probabilidade de significância.

Os valores de F_{ST} variaram de 0.007 (entre Tartarugalzinho e Porto Grande) a 0,084 (entre Oiapoque e Ferreira Gomes), indicando baixas a moderadas diferenciações genéticas. Oiapoque foi a população que apresentou os maiores valores de F_{ST} , mostrando diferenciação genética moderada com todas as populações (Tabela 9). A Tabela 9 também apresenta a distância geográfica em km via BR-156 ao lado dos valores de F_{ST} . Em relação à variabilidade avaliada pela AMOVA (Análise de Variância Molecular), os mosquitos apresentaram baixa diferenciação entre as populações (7%) (Figura 11).

Tabela 9. Índice de fixação (F_{ST}) e distância geográfica em km (entre parênteses entre as seis populações de *Aedes aegypti* do Amapá (comparação par-a-par).

	CAL	OIA	PG	FG	TTZ	MAC
CAL	.					
OIA	0,068 (219)	.				
PG	0,036 (262)	0,072 (476)	.			
FG	0,052 (232)	0,084 (446)	0,030 (37)	.		
TTZ	0,035 (136)	0,063 (349)	0,007 (126)	0,024 (97)	.	
MAC	0,044 (364)	0,051 (583)	0,037 (112)	0,037 (139)	0,033 (228)	.

As cores clara e escura indicam, respectivamente, baixa ($< 0,05$) e moderada (entre 0,05 e 0,15) diferenciação genética. CAL: Calçoene, OIA: Oiapoque, PG: Porto Grande, FG: Ferreira Gomes, TTZ: Tartarugalzinho, MAC: Macapá.



Fonte de variação	d.f.	SS	%
Entre Pops	5	150,052	7%
Dentre Pops	570	2001,896	93%
Total	575	2151,948	100%

Figura 11. Análise de variância molecular (AMOVA) entre seis populações de *Aedes aegypti* do Amapá. d.f.: grau de liberdade; SS: Soma dos quadrados.

Em relação à análise Bayesiana de agrupamento populacional avaliada pelo programa *Structure*, o número mais provável de agrupamentos genéticos observado foi $K = 2$, segundo análise do gráfico de Evanno (Figura 12). Na Figura 13 podemos ver o gráfico de barras, considerando $K = 2$ e $K = 3$, onde as populações de Oiapoque e Calçoene foram as que mais se destacaram,

principalmente a de Oiapoque, que mostrou praticamente um único grupo genético em $K = 2$.

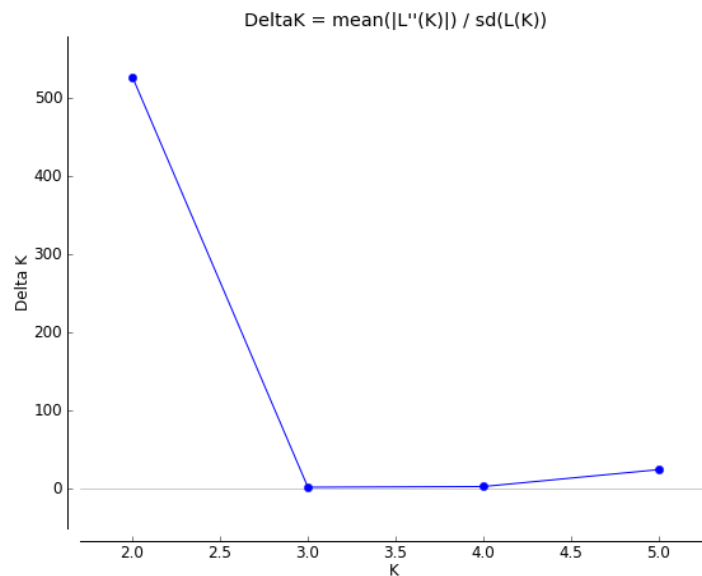


Figura 12. Gráfico de *Evanno* para as amostras de *Aedes aegypti* do Amapá ($K = 2$).

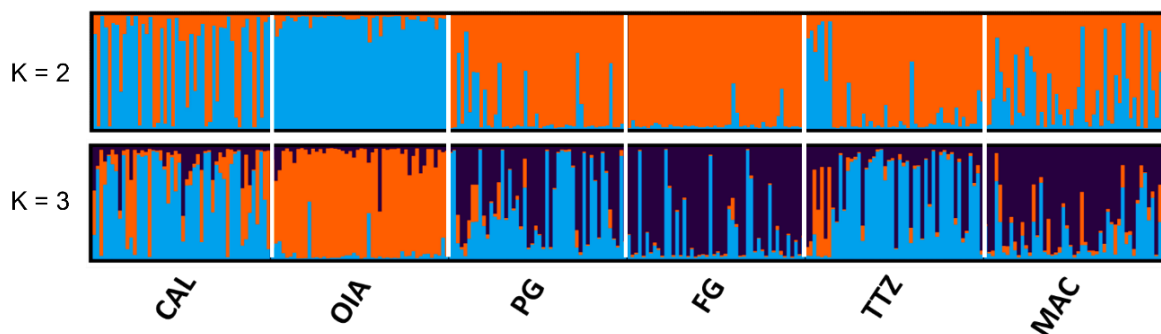


Figura 13. Estruturação das populações de *Aedes aegypti* do Amapá. Gráfico de barras do *Structure*, onde o genótipo multilocus de cada indivíduo é representado por uma barra, com a probabilidade de representação de cada cluster ($K = 2$ e $K = 3$), indicada por cores diferentes. CAL: Calçoene, OIA: Oiapoque, PG: Porto Grande, FG: Ferreira Gomes, TTZ: Tartarugalzinho, MAC: Macapá.

Nossa análise DAPC mostrou maior estruturação populacional em Oiapoque e Calçoene, corroborando com os resultados das análises de F_{ST} e Bayesiana (em $K = 3$). Essa análise não se baseia em nenhum modelo genético populacional, nem pressupõe EHW OU LD (Jombart et.al., 2010). Baseando-se nos pontos de amostragens, o gráfico revelou que espécimes de *Ae. aegypti* de Oiapoque e Calçoene foram as mais isoladas de espécimes de outros locais de amostragem. As demais amostras das outras populações aparecem aglomeradas (Figura 14).

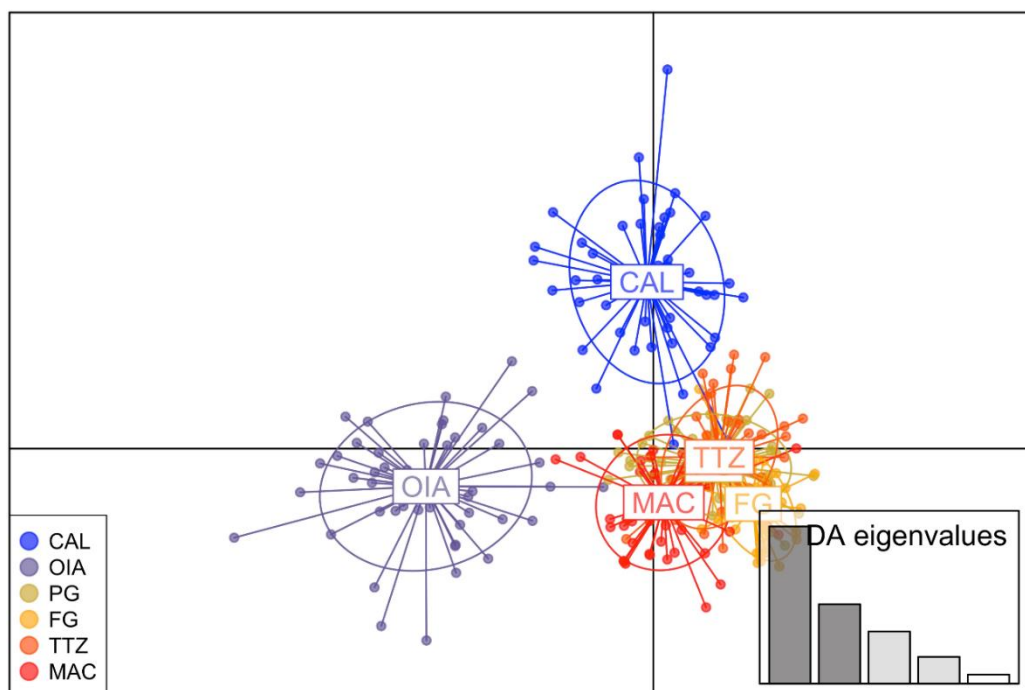


Figura 14. Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) para amostras de *Aedes aegypti* do Amapá. O gráfico representa os indivíduos como pontos e os grupos como elipses. As cores correspondem aos subgrupos identificados pela análise. CAL: Calçoene, OIA: Oiapoque, PG: Porto Grande, FG: Ferreira Gomes (sobreposto por TTZ), TTZ: Tartarugalzinho, MAC: Macapá.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo estimamos a frequência de mutações *kdr*, a variação e a estruturação genética de populações de *Ae. aegypti* no eixo Macapá-Oiapoque (via BR-156), no estado do Amapá, trazendo resultados inéditos.

Comparativamente ao restante do país, a região amazônica (onde se insere o Amapá) apresenta a maior concentração de populações de *Ae. aegypti* com ausência do alelo selvagem S (Costa et al., 2020). Nesta região, principalmente, há também o combate a outros vetores dentro ou próximo dos centros urbanos, como flebotomíneos, triatomíneos e especialmente anofelinos, cujo controle químico é feito com piretroides (OMS, 2019). Então, é provável que estes programas governamentais (não integrados) de controle de vetores se somem ao uso doméstico de piretroides (Maciel-de-Freitas et al., 2014), propiciando que os alelos *kdr* estejam constantemente sendo favoravelmente selecionados nas populações de *Ae. aegypti* destas localidades.

Historicamente, a resistência a piretroides no Brasil foi observada logo após o início de sua aplicação no campo em 2000 (da-Cunha et al., 2005). Com a disseminação da resistência, houve uma substituição dos piretroides pelo malathion (organofosforado) (MS, 2009). No entanto, os piretroides ainda são amplamente utilizados, como já mencionado, nas residências e em programas de controle de outros vetores. Atualmente, no Brasil, os principais inseticidas usados em Saúde Pública contra o *Ae. aegypti* são das classes dos organofosforados (malathion) e a mistura de neonicotinóides com piretroides (Cielo e Fludora) (MS, 2020b; MS, 2020c). A perspectiva é de que mesmo os insetos resistentes aos piretroides sejam mortos pela ação dos neonicotinóides.

Em 2014, os primeiros casos de chikungunya começaram a ser confirmados no país, inicialmente no Amapá (Oiapoque) e Feira de Santana (Bahia) (Nunes et al., 2015). Logo após, Oiapoque decretou situação de emergência e o Ministério da Saúde recomendou a intensificação do uso de inseticidas para controlar o vetor (MS, 2014). Antes dessa situação alarmante com a chegada da chikungunya, altos níveis de resistência em populações de *Ae. aegypti* já eram relatadas nessa localidade (Valle et al., 2019). Com a intensificação do controle químico após os surtos, Oiapoque se destacou cada

vez mais pela alta resistência a piretroides (Costa, 2017; Salgueiro et al., 2019; Costa et al., 2020). Essa alta resistência também foi vista na população de Macapá através de bioensaios feitos com piretroides, onde foi necessário 46 vezes mais inseticida para atingir a mortalidade da metade dessa população (em relação a cepa suscetível). Por outro lado, a população de Oiapoque precisou de três vezes mais inseticida que a de Macapá para matar metade de sua população (Costa, 2017). O estado do Amapá, como um todo, gera bastante interesse, por ser rodeado pela Floresta Amazônica e por fazer fronteira com a Guiana Francesa através de Oiapoque. Esta é uma importante porta de entrada para o Brasil, principalmente para quem vem da selva amazônica e do Caribe em direção a Macapá, capital do Amapá.

Diferentemente das políticas de controles de vetores adotadas no Brasil, o uso de inseticidas em Saúde Pública na Guiana Francesa é mais restrito: a deltametrina (piretroides) é o único inseticida autorizado e disponível para pulverizações espaciais contra mosquitos adultos desde 2011 até a atualidade, além do uso de mosquiteiros impregnados com piretroides, que são distribuídos gratuitamente em áreas endêmicas de malária (Epelboin et al., 2018). O uso do organofosforado malathion até chegou a ser liberado na década de 1990, mas teve sua proibição pela União Europeia em 2009, por questões de segurança humana e ambiental (Dusfour et al., 2011). Entretanto, a pulverização com malathion foi liberada excepcionalmente por apenas seis meses durante o surto de chikungunya em 2014. Portanto, os piretroides continuam sendo os únicos compostos usados no controle da Guiana, não apenas pelas autoridades, mas também pela população, através do amplo uso doméstico, assim como no Brasil (Epelboin et al., 2018). Por consequência disso, populações de *Ae. aegypti* da Guiana Francesa vêm apresentando alto grau de resistência a piretroides, impactando na efetividade do controle químico (Dusfour et al., 2015; Faucon et al., 2017). Desde 2011, duas mutações *kdr* V1016I e F1534C associadas à resistência a piretroides foram relatadas na capital (Caiena) (Dusfour et al., 2015).

Nossa análise de mutações *kdr*, ligadas à resistência a piretroides, sugerem que todas as populações de *Ae. aegypti* do Amapá devem ser resistentes a estes compostos, pelo menos no que concerne ao mecanismo de resistência por alteração no sítio-alvo. Como os alelos *kdr* têm efeito recessivo

e o alelo *kdr* R2 confere maiores níveis de resistência a piretroides em relação ao *kdr* R1 (Brito et al., 2018), a população de Oiapoque deve ser mais resistente, já que apresentou a maior frequência do genótipo *kdr* R2R2. Da mesma forma, espera-se que a população de Macapá seja a mais susceptível, uma vez que apresentou a menor frequência do alelo *kdr* R2, com nenhum genótipo R2R2.

O alelo *kdr* R2 ainda estava ausente na população de *Ae. aegypti* de Macapá em coletas realizadas em 2015 (Costa, 2017), sendo observado pela primeira vez em uma coleta de 2018 (5.6%) (Costa et al., 2020), aumentando de frequência em 2020, como aqui encontrado (9.3%). O genótipo *kdr* homozigoto R2R2, no entanto, se ocorrer, deve estar em baixa frequência e segue sem ter sido detectado. O alelo *kdr* R2 pode estar chegando em Macapá a partir de populações oriundas de localidades mais fortemente conectadas, como a de Belém/PA, que possui alta frequência do alelo R2 (38%) (Costa et al., 2020), ou mesmo de populações do eixo Oiapoque-Macapá, uma vez que observamos altas frequências desse alelo nas populações aqui analisadas. A população de Oiapoque apresentou a maior frequência do alelo *kdr* R2 (66.3%), que se mantém alta desde as coletas de 2015 (Costa, 2017). As demais populações estudadas obtiveram um aumento do *kdr* R2, além da presença inédita do genótipo R2R2 em uma delas (Calçoene).

A frequência do alelo *kdr* R2 está aumentando nas populações de *Ae. aegypti* do Amapá em substituição ao *kdr* R1. As populações de Macapá e Oiapoque foram as que apresentaram, respectivamente, a maior (78%) e a menor (15.2%) frequência do *kdr* R1. Esta mesma tendência se manteve em relação ao alelo selvagem S que, apesar de ter tido uma queda em todas as populações e não ter sido encontrado em uma delas (Porto Grande), teve sua maior frequência relatada em Macapá (12.8%). Manter o alelo S preservado em populações naturais é de extrema importância para tentar reduzir a resistência à inseticidas, uma vez que este alelo deve aumentar de frequência na ausência de pressão de inseticida, pois as mutações *kdr* tem um alto custo no fitness (Brito et al., 2018).

Curiosamente, encontramos dois genótipos *kdr* diferenciados, LL+VI+CC e LL+VI+FC, raramente observados em outras populações brasileiras (Costa et al., 2020). Estes foram encontrados em frequências relativamente altas em Oiapoque, principalmente LL+VI+FC (28%). A população de Calçoene, que está

geograficamente mais próxima de Oiapoque, também apresentou o genótipo LL+VI+CC (8.7%). A ausência destes genótipos nas demais populações do Amapá sugere que seus respectivos alelos estejam sendo importados de populações da Guiana Francesa (fronteira com Oiapoque) e, possivelmente, tendem a se espalhar para as demais localidades, através do transporte passivo de ovos de *Ae. aegypti*. Estudos em paralelos de nosso grupo sugerem que os genótipos LL+VI+FC e LL+VI+CC sejam resultantes de duplicações gênicas, que mantêm cópias distintas do gene do canal de sódio no mesmo cromossomo (Martins et al., 2013; Brito et al., 2018; Costa et al., 2020). O papel dessas duplicações gênicas na seleção para a resistência a piretroides ainda está por ser definido. É possível que estas duplicações estejam sendo selecionadas para propiciar maiores níveis de resistência, ou ainda para diminuir o custo no *fitness* ligados às mutações *kdr* (Belinato e Martins 2016).

A frequência dos alelos *kdr* vem aumentando muito no Brasil nos últimos anos (Macoris et al., 2018; Costa et al., 2020). O alelo *kdr* R1 foi encontrado em todas as populações de *Ae. aegypti* brasileiras avaliadas no último monitoramento de mutações *kdr* no país (123 populações) (Costa et al., 2020) e este, provavelmente, foi o primeiro alelo *kdr* a se espalhar na América Latina (Cosme et al., 2020). Por outro lado, o alelo *kdr* R2 vem se expandindo rapidamente em *Ae. aegypti* de diversas localidades do continente (Cosme et al., 2020; Saavedra-Rodriguez et al., 2018), uma tendência seguida pelas populações do Amapá. Tal fenômeno pode estar relacionado com o fato de o alelo *kdr* R2 conferir maiores níveis de resistência a piretroides em comparação ao *kdr* R1 (Brito et al., 2018), uma vez que a pressão seletiva causada pelo uso de inseticidas piretroides ainda é alta, principalmente através do uso doméstico (Maciel-de-Freitas et al., 2014; Macoris et al., 2018; Garcia et al., 2018).

Além de mutações *kdr*, outros mecanismos fisiológicos para a resistência a inseticidas já foram observados em populações de *Ae. aegypti* da região, como expressão aumentada dos genes de P450 *CYP6BB2*, *CYP9J10*, *CYP9J28* em populações de Macapá, Oiapoque (Costa, 2017) e até de populações caribenhas (Dusfour et al., 2015; Faucon et al., 2015). Estes genes pertencem a famílias supergênicas de enzimas detoxificantes, cuja expressão alterada pode se dar pela seleção de alterações na regulação da expressão gênica ou por duplicações do gene (Montella et al., 2012). É importante que se investigue a dinâmica

destes genes, e possivelmente outros, relacionados à resistência metabólica nas populações de *Ae. aegypti* do Amapá.

Entender a genética das populações naturais do vetor pode melhorar o sucesso de ações interventivas, no sentido de se conhecer aspectos como o tamanho efetivo da população, a conectividade entre as populações vizinhas e a dinâmica evolutiva como um todo (Gloria-Soria et al., 2016). As populações de *Ae. aegypti* de Oiapoque (AP-Brasil) e Saint-Georges (Guiana Francesa) têm grande fluxo gênico, o que impacta diretamente na estrutura genética do mosquito (Salgueiro et al., 2019). Essa dinâmica populacional, com maior ou menor fluxo gênico, por exemplo, pode acabar resultando em diferentes padrões de distribuição de mutações *kdr*. Sabe-se que a população de *Ae. aegypti* de Macapá era geneticamente distinta da população de Oiapoque, que por sua vez, era muito mais semelhante à da Guiana Francesa (pelo alto nível de fluxo gênico) (Salgueiro et al., 2019). Nossos resultados confirmaram este perfil através do uso de marcadores microssatélites e pela identificação de alelos *kdr*. As comparações feitas aqui entre as seis populações do Amapá mostraram os maiores valores de F_{ST} (índice de Fixação) nos pares com a de Oiapoque, que foi isolada praticamente em um único grupo genético na análise Bayesiana (em $K = 2$) e mostrou maior estruturação na Análise de Componentes Principais (DAPC). Além de Oiapoque, Calçoene também mostrou estruturação genética nas análises Bayesiana e DAPC. Portanto, nossos resultados a partir de coletas feitas 5-6 anos mais tarde reforçaram que a população de Oiapoque é geneticamente mais diferenciada das demais e com maior frequência de genótipos *kdr*, no entanto podemos notar que já encontramos diferentes níveis de estruturação genética na localidade mais próxima de Oiapoque (Calçoene). A densa floresta continua sendo a explicação mais provável para a manutenção desta diferença em Oiapoque, uma vez que dificulta a migração ativa do vetor, mas não impede totalmente.

Embora o Rio Oiapoque, marcando a fronteira entre Brasil e Guiana Francesa, impeça a dispersão ativa do vetor entre os lados, a curta distância e o intenso fluxo de pessoas e mercadorias entre Oiapoque e Saint-Georges, facilitam a migração passiva do mosquito, que pode ocorrer através da condução de ovos ou larvas que permanecem em cargas/mercadorias transportadas (Gonçalves-da-Silva et al., 2012). Um estudo que também utilizou marcadores

microssatélites para avaliar a estrutura genética espacial de *Ae. aegypti* em diversas localidades espalhadas pela Ásia e África, revelou similaridade entre os locais distantes, mas que são interligadas por estradas principais, sugerindo que as rotas de transporte conduzidas por pessoas podem resultar na migração passiva por longas distâncias dos mosquitos (Hlaing et al., 2010). Isso explicaria o porquê de Oiapoque e Macapá terem apresentado a menor diferenciação genética (menor valor de F_{ST}), em comparação com Oiapoque e as demais localidades, apesar de apresentarem a maior distância via BR-156 (364 km). Ou seja, como a destinação de pessoas e mercadorias é mais intensa entre Oiapoque e a capital do Estado, faz mais sentido que o fluxo gênico Oiapoque-Macapá seja mais intenso do que Oiapoque com as demais.

Os alelos *kdr* em populações de *Ae. aegypti* do Brasil tendem a ser regionalmente distribuídos, coincidindo, aproximadamente, com os grupos genéticos de *Ae. aegypti* no país: apesar do *kdr* R1 ser o mais disperso por todo país, encontramos as maiores frequências deste alelo na região Norte e Nordeste, sendo o *kdr* R2 mais prevalente nas populações Centro-Oeste e Sudeste (Linss et al., 2014; Costa et al., 2020). Baseando-se no uso de marcadores microssatélites, estudos concluíram que as populações contemporâneas de *Ae. aegypti* do Brasil descendem de pelo menos dois grupos geneticamente distintos, que reinfestaram o país após a erradicação na década de 1970. Estas recolonizações prováveis vieram de populações de *Ae. aegypti* da Venezuela para o Norte do Brasil, e de populações do Caribe para o Sudeste do Brasil (Monteiro et al., 2014; Kotsakiozi et al., 2017). Sob esta perspectiva, as populações da Guiana Francesa e Oiapoque são originárias do grupo caribenho, enquanto Macapá agrupa com as populações do norte do Brasil, originárias da Venezuela (Salgueiro et al. 2019).

Marcadores genéticos sob pressão seletiva, como é o caso do *kdr*, não necessariamente refletem a estruturação genômica global do organismo. É preciso conhecer com maiores detalhes as condições de uso de inseticidas, a densidade populacional do vetor, a dinâmica de fluxo gênico entre os mosquitos provenientes de cada localidade, assim como o custo no fitness de cada alelo *kdr*, a fim de melhor correlacionarmos a distribuição de *kdr* com a estruturação genética. Com isso, temos disponíveis ferramentas moleculares potentes (como SSR e SNP-chip, por exemplo) para avaliação de fluxo gênico e identificação de

regiões genômicas sob pressão de seleção que podem melhorar nosso entendimento acerca da dinâmica evolutiva do *Ae. aegypti* e, conseqüentemente, contribuir com seu controle.

Este estudo contribuiu para o conhecimento de um dos principais mecanismos envolvidos na resistência a piretroides em populações de *Ae. aegypti* do Amapá, além de trazer informações inéditas de localidades entre o trecho Macapá-Oiapoque, não somente acerca das mutações *kdr*, como também sobre a genética de populações. Já era esperado encontrar uma grande diferença nas populações de Oiapoque, como visto em trabalhos anteriores (Salgueiro et al., 2019; Costa, 2017): populações de Oiapoque são geneticamente muito mais semelhantes às da Guiana Francesa, devido ao alto fluxo gênico que essas populações possuem. No entanto, nosso estudo apresenta indícios de trocas de alelos entre Oiapoque e populações situadas ao longo da estrada BR-156 (AP), sugerindo que os transportes passivo e ativo tendem a influenciar no fluxo gênico e, conseqüentemente, na estrutura genética das populações de *Ae. aegypti* do Amapá, colaborando cada vez mais com a disseminação de alelos vindos da Guiana Francesa. Logo, reforçamos a importância de criar medidas de controle em cooperação transnacional, uma vez que as fronteiras não impedem a transição dos mosquitos.

6. CONCLUSÕES

- As populações de *Ae. aegypti* do Amapá, principalmente Oiapoque, apresentam altas frequências das mutações *kdr*, sugerindo que todas as populações devem ser resistentes aos inseticidas piretroides;
- A análise de *kdr* indicou a evidente predominância do alelo R1 em Macapá e do R2 em Oiapoque, mostrando que essas populações têm diferenças na distribuição de alelos *kdr*;
- Genótipos *kdr* “raros” foram encontrados em Oiapoque e Calçoene. Um deles em alta frequência em Oiapoque, sugerindo que foram importados da Guiana Francesa e estão se espalhando pelo Amapá;
- As análises de diferenciação genética (F_{ST}) mostraram que Oiapoque foi a população geneticamente mais distante das demais;
- As análises de estruturação genética (tanto Bayesiana quanto DAPC) indicaram que Oiapoque e Calçoene foram as populações mais estruturadas, enquanto as outras populações apresentaram uma grande mistura genética.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achee, N. L., Grieco, J. P., Vatandoost, H., Seixas, G., Pinto, J., Ching-Ng, L., Martins, A. J., Juntarajumnong, W., Corbel, V., Gouagna, C., David, J. P., Logan, J. G., Orsborne, J., Marois, E., Devine, G. J., & Vontas, J. (2019). Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006822>.

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

Belinato, T. A., & Martins, A. J. (2016). Insecticide Resistance and Fitness Cost. *Insecticides Resistance*. <https://doi.org/10.5772/61826>.

Braga, I. A., & Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e alternativas de controle no Brasil*. *Epidemiol. Serv. Saúde*, *16*(4), 295–302.

Braga, I. A., & Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, *16*(4), 279–293. <https://doi.org/10.5123/s1679-49742007000400006>.

Braga, I. A., & Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil* *Aedes aegypti*: History of Control in Brazil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 2007, *16*(2), 113–118.

Brito, L. P., Carrara, L., Freitas, R. M. De, Lima, J. B. P., & Martins, A. J. (2018). Levels of Resistance to Pyrethroid among Distinct kdr Alleles in *Aedes aegypti* Laboratory Lines and Frequency of kdr Alleles in 27 Natural Populations from Rio de Janeiro, Brazil. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2410819>.

Brown, J. E., McBride, C. S., Johnson, P., Ritchie, S., Paupy, C., Bossin, H., Lutomiah, J., Fernandez-Salas, I., Ponlawat, A., Cornel, A. J., Black IV, W. C.,

Gorrochotegui-Escalante, N., Urdaneta-Marquez, L., Sylla, M., Slotman, M., Murray, K. O., Walker, C., & Powell, J. R. (2011). Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple “domestications” of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1717), 2446–2454. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2469>.

Campos, K. B., Martins, A. J., Rodovalho, C. de M., Bellinato, D. F., Dias, L. dos S., Macoris, M. de L. da G., Andrighetti, M. T. M., Lima, J. B. P., & Obara, M. T. (2020). Assessment of the susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in a nation-wide monitoring of insecticide resistance performed in Brazil from 2017 to 2018. *Parasites & Vectors*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04406-6>.

Consoli, R. A. G. B., & Oliveira, R. L. de. (1994). Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. In *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. <https://doi.org/10.7476/9788575412909>.

Cosme, L., Gloria-Soria, A. I., Caccone, A., Robert Powell, J., & Jesus MartinsID, A. (2020). Evolution of *kdr* haplotypes in worldwide populations of *Aedes aegypti*: Independent origins of the F1534C *kdr* mutation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008219>.

Costa, M. M. (2017). *Avaliação da resistência a inseticidas e mecanismos selecionados em populações de Aedes aegypti Linnaeus 1762 (Diptera, Culicidae) da fronteira entre Brasil e Guiana Francesa*. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ/ INSTITUTO OSWALDO CRUZ.

Costa, M. M., Campos, K. B., Brito, L. P., Roux, E., Melo Rodovalho, C., Bellinato, D. F., Lima, J. B. P., & Martins, A. J. (2020). *Kdr* genotyping in *Aedes aegypti* from Brazil on a nation-wide scale from 2017 to 2018. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-70029-7>.

Costa-Ribeiro, M. C. V., Lourenço-de-Oliveira, R., & Failloux, A. B. (2007). Low gene flow of *Aedes aegypti* between dengue-endemic and dengue-free areas in southeastern and southern Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(2), 303–309. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.303>.

Da-Cunha, M. P., Lima, J. B. P., Brogdon, W. G., Moya, G. E., & Valle, D. (2005). Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *100*(4), 441–444. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000400017>.

Dusfour, I., Thalmensy, V., Gaborit, P., Issaly, J., Carinci, R., & Girod, R. (2011). Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *106*(3), 346–352. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000300015>.

Dusfour, I., Zorrilla, P., Guidez, A., Issaly, J., Girod, R., Guillaumot, L., Robello, C., & Strode, C. (2015). Deltamethrin Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* Populations from Three French Overseas Territories Worldwide. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0004226>.

Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, *4*(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.

Epelboin, Y., Chaney, S. C., Guidez, A., Habchi-Hanriot, N., Talaga, S., Wang, L., & Dusfour, I. (2018). Successes and failures of sixty years of vector control in French Guiana: what is the next step? *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *113*(5), 1–10. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170398>.

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, *14*(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.

Faucon, F., Gaude, T., Dusfour, I., Navratil, V., Corbel, V., Juntarajumnong, W., Girod, R., Poupardin, R., Boyer, F., Reynaud, S., & David, J. P. (2017). In the hunt for genomic markers of metabolic resistance to pyrethroids in the mosquito

Aedes aegypti: An integrated next-generation sequencing approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0005526>.

Garcia, G. de A., David, M. R., Martins, A. de J., Maciel-de-Freitas, R., Linss, J. G. B., Araújo, S. C., Lima, J. B. P., & Valle, D. (2018). The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006227>.

Franco, O. (1969). *História da Febre-Amarela no Brasil*. Ministério da Saúde.

Gloria-Soria, A., Ayala, D., Bheecarry, A., Calderon-Arguedas, O., Chadee, D. D., Chiappero, M., Coetzee, M., Elahee, K. Bin, Fernandez-Salas, I., Kamal, H. A., Kamgang, B., Khater, E. I. M., Kramer, L. D., Kramer, V., Lopez-Solis, A., Lutomiah, J., Martins, A., Micieli, M. V., Paupy, C., ... Powell, J. R. (2016). Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. *Molecular Ecology*, 25(21), 5377–5395. <https://doi.org/10.1111/MEC.13866>.

Gonçalves da Silva, A., Cunha, I. C., Santos, W. S., Luz, S. L., Ribolla, P. E., & Abad-Franch, F. (2012). Gene flow networks among American *Aedes aegypti* populations. *Evolutionary applications*, 5(7), 664–676. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2012.00244.x>

Gubler, D. J. (2011). Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Tropical Medicine and Health*, 39(4 Suppl), 3–11. <https://doi.org/10.2149/TMH.2011-S05>.

Haddi, K., Tomé, H. V. V., Du, Y., Valbon, W. R., Nomura, Y., Martins, G. F., Dong, K., & Oliveira, E. E. (2017). Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep46549>.

Hartl, D. A.; Clark, A. G. (2010). *Princípios de Genética de Populações*. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660p.

Hayd, R. L. N., Carrara, L., De Melo Lima, J., De Almeida, N. C. V., Lima, J. B. P., & Martins, A. J. (2020). Evaluation of resistance to pyrethroid and organophosphate adulticides and kdr genotyping in *Aedes aegypti* populations from Roraima, the northernmost Brazilian State. *Parasites and Vectors*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04127-w>.

Hemingway, J., & Ranson, H. (2000). INSECTICIDE RESISTANCE IN INSECT VECTORS OF HUMAN DISEASE. *Annual Review of Entomology*, *Vol. 45*, 79–102. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.371>.

Hlaing, T., Tun-Lin, W., Somboon, P., Socheat, D., Setha, T., Min, S., Thaug, S., Anyaele, O., De Silva, B., Chang, M. S., Prakash, A., Linton, Y., & Walton, C. (2010). Spatial genetic structure of *Aedes aegypti* mosquitoes in mainland Southeast Asia. *Evolutionary Applications*, *3*(4), 319–339. <https://doi.org/10.1111/J.1752-4571.2009.00113.X>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2021). Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ap/panorama>.

Jombart, T., & Bateman, A. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, *24*(11), 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTN129>.

Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, *11*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94/FIGURES/9>.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging

population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>.

Kotsakiozi, P., Gloria-Soria, A., Caccone, A., Evans, B., Schama, R., Martins, A. J., & Powell, J. R. (2017). Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), e0005653. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0005653>.

Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., & Nevo, E. (2002). Microsatellites: Genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. *Molecular Ecology*, 11(12), 2453–2465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x>.

Lima, Letícia Ferreira. Análise do comportamento de oviposição do mosquito *Aedes aegypti* em Paquetá/RJ. 2017. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Computacional e Sistemas)-Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

Linss, J. G. B., Brito, L. P., Garcia, G. A., Araki, A. S., Bruno, R. V., Lima, J. B. P., Valle, D., & Martins, A. J. (2014). Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-25>.

Maciel-de-Freitas R, Avendanho FC, Santos R, Sylvestre G, Araújo SC, Lima JBP, et al. (2014) Undesirable Consequences of Insecticide Resistance following *Aedes aegypti* Control Activities Due to a Dengue Outbreak. PLoS ONE 9(3): e92424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092424>.

Macoris, M. de L., Martins, A. J., Andrighetti, M. T. M., Lima, J. B. P., & Valle, D. (2018). Pyrethroid resistance persists after ten years without usage against *Aedes aegypti* in governmental campaigns: Lessons from São Paulo State, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(3), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006390>.

Maitra, A., Cunha-Machado, A. S., de Souza Leandro, A., Costa, F. M. da, & Scarpassa, V. M. (2019). Exploring deeper genetic structures: *Aedes aegypti* in Brazil. *Acta Tropica*, *195*(January), 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.04.027>.

Malone, R. W., Homan, J., Callahan, M. V., Glasspool-Malone, J., Damodaran, L., Schneider, A. D. B., Zimler, R., Talton, J., Cobb, R. R., Ruzic, I., Smith-Gagen, J., Janies, D., Wilson, J., Hone, D., Hone, S., Bavari, S., Soloveva, V., & Weaver, S. (2016). Zika Virus: Medical Countermeasure Development Challenges. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(3), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004530>.

Martins, A. J., Brito, L. P., Linss, J. G. B., Rivas, G. B. da S., Machado, R., Bruno, R. V., Lima, J. B. P., Valle, D., & Peixoto, A. A. (2013). Evidence for gene duplication in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti*. *Evolution, Medicine, and Public Health*, *2013*(1), 148–160. <https://doi.org/10.1093/EMPH/EOT012>.

Martins, A. J., Brito, L. P., Linss, J. G. B., Rivas, G. B. da S., Machado, R., Bruno, R. V., Lima, J. B. P., Valle, D., & Peixoto, A. A. (2013). Evidence for gene duplication in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti*. *Evolution, Medicine, and Public Health*, *2013*(1), 148–160. <https://doi.org/10.1093/EMPH/EOT012>.

Martins, A., & Valle, D. (2012). The Pyrethroid Knockdown Resistance. *Insecticides - Basic and Other Applications*, May 2014. <https://doi.org/10.5772/30588>.

Martins, J., Solomon, S. E., Mikheyev, A. S., Mueller, U. G., Ortiz, A., & Bacci, M. (2007). Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: Evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). *Insect Molecular Biology*, *16*(6), 777–784. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00771.x>.

Miah, M. A., & Husna, A. (2021). Coinfection, coepidemics of COVID-19, and dengue in dengue-endemic countries: A serious health concern. *Journal of Medical Virology*, *93*(1), 161–162. <https://doi.org/10.1002/JMV.26269>.

Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., Kolenc, M., Resman Rus, K., Vesnaver Vipotnik, T., Fabjan Vodusek, V., Vizjak, A., Pižem, J., Petrovec, M., & Avšič Županc, T. (2016). Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine*, 374(10), 951–958. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1600651>.

Monteiro, F. A., Shama, R., Martins, A. J., Gloria-Soria, A., Brown, J. E., & Powell, J. R. (2014). Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003167>.

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

Moyes, C. L., Vontas, J., Martins, A. J., Ng, L. C., Koou, S. Y., Dusfour, I., Raghavendra, K., Pinto, J., Corbel, V., David, J. P., & Weetman, D. (2021). Correction to: Contemporary status of insecticide resistance in the major aedes vectors of arboviruses infecting humans (PLoS Negl Trop Dis). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(1), 1–2. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009084>.

MS. Ministério da Saúde. (2009). Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. In *Secretaria de Vigilância em Saúde*. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf.

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

MS. Ministério da Saúde. (2019). Boletim epidemiológico 16 anos. Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2019. *Ministério Da Saúde*, 50 (n.esp). <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf>.

MS. Ministério da Saúde. (2020a). Óbito por arboviroses no Brasil, 2008 a 2019. *Boletim Epidemiológico* 33, 51, 31. <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/21/Boletim-epidemiologico-SVS-33.pdf>.

MS. Ministério da Saúde. (2020b). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Coordenação da Vigilância de Arboviroses. *NOTA TÉCNICA Nº 1/2020-CGAR/DEIDT/SVS/MS*.

MS. Ministério da Saúde. (2020c). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Coordenação da Vigilância de Arboviroses. *NOTA TÉCNICA Nº 5/2020-CGAR/DEIDT/SVS/MS*.

MS. Ministério da Saúde. (2021a). Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika). *Boletim Epidemiológico Arboviroses*, 51(24), 1–13.

MS. Ministério da Saúde. (2021b). Brasil e Guiana Francesa compartilham conhecimentos sobre combate as doenças vetoriais na fronteira. <https://www.portal.ap.gov.br/noticia/2406/brasil-e-guiana-francesa-compartilham-conhecimentos-sobre-combate-a-doencas-vetoriais-na-fronteira>.

Nagata K, Song JH, Shono T, Narahashi T (1998). Modulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor-channel by the nitromethylene heterocycle imidacloprid. *J Pharmacol Exp Ther.*;285:731–738.

Nascimento, C. S., Correia, J. P. S., Temóteo, C. C. S., & Campos, A. L. B. (2021). Impactos no perfil epidemiológico da Dengue em meio a Pandemia da COVID-19 em Sergipe. *Research, Society and Development*, 10(5), e3610514544. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14544>.

Nunes, M. R. T., Faria, N. R., de Vasconcelos, J. M., Golding, N., Kraemer, M. U. G., de Oliveira, L. F., da Silva Azevedo, R. do S., da Silva, D. E. A., da Silva, E. V. P., da Silva, S. P., Carvalho, V. L., Coelho, G. E., Cruz, A. C. R., Rodrigues, S. G., da Silva Gonçalves Vianez, J. L., Nunes, B. T. D., Cardoso, J. F., Tesh, R. B., Hay, S. I., ... da Costa Vasconcelos, P. F. (2015). Emergence

and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>.

Nunes, P. C. G., Daumas, R. P., Sánchez-Arcila, J. C., Nogueira, R. M. R., Horta, M. A. P., & Dos Santos, F. B. (2019). 30 years of fatal dengue cases in Brazil: A review. *BMC Public Health*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12889-019-6641-4/FIGURES/4>.

OMS. Organização Mundial da Saúde (2019). Guidelines for Malaria Vector Control. In *Guidelines for Malaria Vector Control*. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/310862/9789241550499-eng.pdf?ua=1%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30844152>.

Paduan, K., Araújo, J. P., & Ribolla, P. E. M. (2006). Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2), 391–395. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000200030>.

Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.

Peiter, P. C. (2005). A Geografia da Saúde na Faixa de Fronteira Continental do Brasil na Passagem do Milênio. *Instituto de Geociências*, 379.

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 204(2), 391–393. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.195164>.

Pinheiro, T. J., Guimarães, L. F., Silva, M. T. T., & Soares, C. N. (2016). Neurological manifestations of chikungunya and zika infections. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 74(11), 937–943. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20160138>.

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>.

Rahman, R. U., Cosme, L. V., Costa, M. M., Carrara, L., Lima, J. B. P., & Martins, A. J. (2021). Insecticide resistance and genetic structure of *Aedes aegypti* populations from Rio de Janeiro state, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *15*(2), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008492>.

Rousset, F., & Raymond, M. (1995). GENEPOP (version 3.3): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, *86*, 248–249.

Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, *8*(1), 103–106. <https://doi.org/10.1111/J.1471-8286.2007.01931.X>.

Saavedra-Rodriguez, K., Maloof, F. V., Campbell, C. L., Garcia-Rejon, J., Lenhart, A., Penilla, P., Rodriguez, A., Sandoval, A. A., Flores, A. E., Ponce, G., Lozano, S., & Black, W. C. (2018). Parallel evolution of *Vgsc* mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. *Scientific Reports* 2018 8:1, *8*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25222-0>.

Salgueiro, P., Restrepo-Zabaleta, J., Costa, M., Galardo, A. K. R., Pinto, J., Gaborit, P., Guidez, A., Martins, A. J., & Dusfour, I. (2019). Liaisons dangereuses: cross-border gene flow and dispersal of insecticide resistance-associated genes in the mosquito *Aedes aegypti* from Brazil and French Guiana. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *114*(8). <https://doi.org/10.1590/0074-02760190120>.

Schlotterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, *109*(6), 365–371. <https://doi.org/10.1007/s004120000089>.

Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments: A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *PRISM*, *18*(February), 1–2.

Slotman, M. A., Kelly, N. B., Harrington, L. C., Kitthawee, S., Jones, J. W., Scott, T. W., Caccone, A., & Powell, J. R. (2007). Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue

and yellow fever. *Molecular Ecology Notes*, 7(1), 168–171. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01533.x>.

Stanaway, J. D., Shepard, D. S., Undurraga, E. A., Halasa, Y. A., Coffeng, L. E., Brady, O. J., Hay, S. I., Bedi, N., Bensenor, I. M., Castañeda-Orjuela, C. A., Chuang, T. W., Gibney, K. B., Memish, Z. A., Rafay, A., Ukwaja, K. N., Yonemoto, N., & Murray, C. J. L. (2016). The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(6), 712–723. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00026-8).

SVS-MS. Sistema de Vigilância em Saúde. (2016). *Análise Epidemiológica Situacional da Dengue, Chikungunya e Febre pelo vírus Zika no estado do Amapá no período de 2011 a 2015*.

SVS-MS. Sistema de Vigilância em Saúde. (2019). Comparativo dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika vírus no estado do Amapá por município de residência. Ano 2017 e 2018. *Boletim Epidemiológico*, 2017–2020.

SVS-MS. Sistema de Vigilância em Saúde. (2020a). Monitoramento dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika vírus no estado do Amapá por município de residência. Anos 2018 e 2019. *Boletim Epidemiológico*.

SVS-MS. Sistema de Vigilância em Saúde. (2020b). Monitoramento/Comparativo dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika vírus no estado do Amapá por município de residência. Anos 2019 e 2020. *Boletim Epidemiológico*.

Templeton, A. R. (2011). *Genética de Populações e Teoria Microevolutiva*. 1. Ed. Sociedade.

Urdaneta-Marquez, L., & Failloux, A. B. (2011). Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.11.020>.

Valle, D., Bellinato, D. F., Viana-Medeiros, P. F., Lima, J. B. P., & Martins Junior, A. D. J. (2019). Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes*

aegypti from Brazil between 1985 and 2017. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 114(3). <https://doi.org/10.1590/0074-02760180544>.

Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. de F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), 312. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>.

Yang, B., Borgert, B. A., Alto, B. W., Boohene, C. K., Brew, J., Deutsch, K., DeValerio, J. T., Dinglasan, R. R., Dixon, D., Faella, J. M., Fisher-Grainger, S. L., Glass, G. E., Hayes, R., Hoel, D. F., Horton, A., Janusauskaite, A., Kellner, B., Kraemer, M. U. G., Lucas, K. J., ... Cummings, D. A. T. (2021). Modelling distributions of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* using climate, host density and interspecies competition. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(3), e0009063. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0009063>.

Zanluca, C., De Melo, V. C. A., Mosimann, A. L. P., Dos Santos, G. I. V., dos Santos, C. N. D., & Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), 569–572. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>.

Zara, A. L. de S. A., Santos, S. M. Dos, Fernandes-Oliveira, E. S., Carvalho, R. G., & Coelho, G. E. (2016). Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiologia e Servicos de Saude: Revista Do Sistema Unico de Saude Do Brasil*, 25(2), 391–404. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000200017>.