



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

THAYNÁ BISSON FERRAZ LOPES

**ESTUDO GENÉTICO POPULACIONAL EM *Aedes*  
(*Stegomyia*) *Aegypti* (Linnaeus, 1762) NA CIDADE DE  
LONDRINA - PR**



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

**Thayná Bisson Ferraz Lopes**

**Estudo genético populacional em *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) na cidade de Londrina - PR**

---

Londrina – Paraná  
2019

THAYNÁ BISSON FERRAZ LOPES

**ESTUDO GENÉTICO POPULACIONAL EM *Aedes*  
(*Stegomyia*) *Aegypti* (Linnaeus, 1762) NA CIDADE DE  
LONDRINA - PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Renata da Rosa  
Co-orientador: Prof. Dr. João Antônio Cyrino Zequi

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Lopes, Thayná Bisson Ferraz.

Estudo genético populacional em *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) na cidade de Londrina - PR / Thayná Bisson Ferraz Lopes. - Londrina, 2019.  
61 f. : il.

Orientador: Renata da Rosa.

Coorientador: João Antonio Cyrino Zequi.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Genética de populações - Tese. 2. Diversidade genética - Tese. 3. DNA mitocondrial - Tese. 4. Resistência a piretroides - Tese. I. da Rosa, Renata. II. Zequi, João Antonio Cyrino. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

THAYNÁ BISSON FERRAZ LOPES

**ESTUDO GENÉTICO POPULACIONAL EM *Aedes (Stegomyia)*  
*Aegypti* (Linnaeus, 1762) NA CIDADE DE LONDRINA - PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Renata da Rosa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Mario Antonio Navarro Silva  
Universidade Federal do Paraná - UEFPR

---

Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dra. Gislayne Trindade Vilas-Bôas  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gomez  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -  
EMBRAPA

Londrina, 20 de fevereiro de 2019



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, que sempre colocaram os meus sonhos na frente dos deles. À minha irmã, o grande amor da minha vida, que desde que nasceu ilumina todos os meus dias. Vocês sabem a real dificuldade dessa trajetória acadêmica, principalmente a saudade que sentimos todos os dias devido à distância.

À minha orientadora, professora Dra. Renata da Rosa, por toda confiança. Sou muito grata por seus ensinamentos, sua dedicação e por sempre acreditar em mim e me incentivar. Felizmente teremos pelo menos mais três anos juntas e tenho que certeza que serão de muito sucesso.

Ao meu co-orientador, professor Dr. João Zequi. Agradeço imensamente por me receber em seu laboratório e por esses dois anos de parceria de pesquisa. Agradeço também por toda a contribuição no presente trabalho e em minha formação.

À CAPES, órgão de fomento à pesquisa científica, pelo apoio financeiro.

Aos membros do Laboratório de Citogenética Animal, que me auxiliaram e ensinaram muito ao longo desses últimos cinco anos. Em especial, agradeço ao Tafarel, meu grande amigo e colega de laboratório, sua colaboração foi essencial para a realização deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Entomologia Geral e Médica, em especial à Bianca, por tudo que me ensinaram, por toda paciência e por todo auxílio durante as coletas.

Aos meus amigos: os de longa data, os do laboratório, os que moram longe, os que moram perto. Vocês tornam a minha vida mais fácil e mais divertida. Obrigada, mil vezes obrigada. Vocês são os melhores amigos que alguém poderia ter.

Ao meu companheiro de vida e meu melhor amigo, Fernando. Obrigada por sempre virar sua vida de cabeça para baixo para me ajudar em tudo e estar sempre presente. Obrigada por todo carinho e dedicação comigo durante todos esses anos. Ter você por perto todos os dias faz com que tudo seja mais leve e mais feliz.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela estrutura para realização do trabalho e aos professores que contribuíram e formaram meu conhecimento acadêmico.

Ao prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza, que aceitou novamente o convite para participar da banca examinadora e colaborar com este trabalho. Agradeço também ao Prof. Dr. Mário Navarro, pela confiança e parceria para a realização do trabalho, e também agradeço pela disponibilidade e aceite do convite em fazer parte da banca.

Agradeço a todos com muita consideração e carinho, pois vocês foram essenciais para que o trabalho fosse concluído. Cada um faz parte desse trabalho, muito do que aprendi e construí devo a vocês.

LOPES, Thayná Bisson Ferraz. **Estudo genético populacional em *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) na cidade de Londrina – PR.** 2019. 61 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

## RESUMO

Londrina é um dos maiores e mais urbanizados municípios do Estado do Paraná e da região Sul do Brasil. No município, afim de evitar a infestação do mosquito vetor e a circulação de vírus, o uso de inseticidas piretroides é bastante comum. Esse composto químico têm um custo acessível e é utilizado principalmente no ambiente doméstico, porém seu uso descontrolado pode ocasionar a seleção de alelos de resistência nas populações (resistência *knockdown*). O monitoramento de mutações de resistência assim como a variabilidade genética do mosquito é importante para conhecer a estrutura das populações e direcionar campanhas de controle do inseto. Sendo assim, o presente estudo avaliou onze localidades em diferentes regiões da cidade e três localidades dentro da Universidade durante os meses de novembro e dezembro de 2017. Em relação a variabilidade genética (gene mitocondrial ND4), dezessete haplótipos foram encontrados nas cinco regiões do município, enquanto na Universidade dez haplótipos foram observados. Em ambas análises, o número haplotípico pode ser considerado elevado. O fluxo gênico foi baixo e as populações avaliadas se demonstraram estruturadas: a variação foi maior entre populações que dentro delas em ambas localidades (77,9% em Londrina e 67,7 na UEL). Em relação às mutações de resistência (Val1016Ile e Phe1534Cys *kdr*), as populações avaliadas apresentaram uma elevada frequência dos alelos mutantes: 50% para o alelo Ile<sup>*kdr*</sup> na cidade de Londrina e 57,3% na UEL, enquanto para o alelo Cys<sup>*kdr*</sup>, a frequência foi de 52% na cidade de Londrina e 62,2% nos três centros avaliados da UEL. Na Universidade, 3.321 ovos de *Ae. aegypti* foram coletados para monitoramento, com positividade de 54% nas armadilhas e proporções semelhantes de infestação nas três localidades. Os resultados demonstraram a diferenciação de cada ponto de coleta, sugerindo que ações de controle devem ser direcionadas considerando a particularidade de cada região e de cada localidade. A partir da forte presença dos alelos de resistência, é possível que a aplicação de inseticidas piretroides não seja a forma de controle ideal no município, tornando necessário o uso de outras alternativas para evitar a proliferação do mosquito e surtos de dengue e outras arboviroses.

**Palavras-chave:** DNAm. Gene ND4. Diversidade genética. Piretroide. Resistência *kdr*.

LOPES, Thayná Bisson Ferraz. **Populational genetic study of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in Londrina – PR**. 2019. 61 pp. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

## ABSTRACT

Londrina is one of the biggest and most urban cities in Paraná and in southern Brazil. In Londrina, in order to avoid the infestation of the vector mosquito and the spread of the virus, the usage of pyrethroid insecticides is common. This low-cost chemical compound is used mainly in the household environment. The uncontrolled pyrethroid use may cause the selection of resistance alleles in populations (knockdown resistance). Monitoring resistance mutations, as well as the mosquito's genetic variability, is important to learn the structure of the populations and direct insect control campaigns. Therefore, this study evaluated eleven locations in different regions of the city and three locations within the University during the months of November and December of 2017. Genetic variability-wise (ND4 mitochondrial gene), seventeen haplotypes have been found in the five regions of the city, whereas in the University, ten haplotypes have been observed. In both analyses, the haplotype number may be considered elevated. The gene flow was low, and the evaluated populations have shown to be structured: the variance was higher between populations than within themselves in both locations (77.9% in Londrina and 67.7% in UEL). In relation to resistance mutations (Val1016Ile and Phe1534Cys *kdr*), the evaluated populations represented a high frequency of mutant alleles: 50% for the Ile<sup>*kdr*</sup> allele in Londrina, and 57.3% in UEL, whereas for the Cys<sup>*kdr*</sup> allele, the frequency was 52% in Londrina, and 62.2% for the three evaluated centers in UEL. In the University, 3,321 *Ae. aegypti* eggs were collected for monitoring, with a positivity of 54% in the traps and similar rates of infestation on the three locations. The results demonstrated differentiation in each collect spot, which suggests control actions tailored to each region considering their own particularity. From the strong presence of resistance alleles, pyrethroid insecticides might not be the ideal control mechanism for Londrina, making it necessary the use of alternatives to avoid mosquito proliferation and dengue and other arbovirolosis outbreaks.

**Key words:** mtDNA. ND4 gene. Genetic diversity. Pyrethroid. Knockdown resistance.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** - Rede haplotípica gerada pelo programa Network. Os círculos são proporcionais ao número de indivíduos observados em cada haplótipo. Em negrito os haplótipos observados. Os números representam a posição das mudanças nucleotídicas .....15
- Figura 2** - Frequências alélicas dos sítios 1016 e 1534 do Nav kdr de Londrina. Localização dos pontos de coleta distribuídos nas cinco diferentes regiões da cidade. Somente a zona urbana do município foi avaliada no estudo. ....16

### CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Localizações georreferenciadas da instalação de armadilhas no campus da UEL. Fonte: PROPLAN-UEL.....30
- Figura 2** - Rede haplotípica gerada no programa Network. Os círculos são proporcionais ao número de indivíduos observados em cada haplótipo. Em negrito os haplótipos observados. Os números representam a localização dos polimorfismos .....32

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1** - Sítios variáveis nos 17 haplótipos do gene mitocondrial ND4 de *Ae. aegypti* observados na cidade de Londrina, Paraná .....14
- Tabela 2** - Frequência genotípica da mutação Val1016Ile do Nav de *Ae. aegypti* das onze localidades e da cidade de Londrina como um todo. Os valores de  $X^2$  destacados em itálico demonstraram diferença significativa ( $p>0,05$ ).....17
- Tabela 3** - Frequência genotípica da mutação Phe1534Cys do Nav de *Ae. aegypti* das onze localidades e da cidade de Londrina como um todo. Os valores de  $X^2$  destacados em itálico demonstraram diferença significativa ( $p>0,05$ ).....17
- Tabela 4** - Índices do Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* (LIRAA) em Londrina em 2017 e 2018, informados pela 17ª Regional de Saúde de Londrina. Os valores destacados com asterisco demonstram índices de alerta de risco de surto de dengue em Londrina .....19

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1** - Sítios variáveis em 10 haplótipos identificados a partir de um fragmento de 339 pb do gene mitocondrial ND4 de *Ae. aegypti*. .....31
- Tabela 2** - Número de indivíduos observados para cada haplótipo em amostras de três populações de *Aedes aegypti* da UEL.....32
- Tabela 3** - Frequência genotípica da mutação Val1016Ile do Nav de *Ae. aegypti* das três localidades e da UEL como um todo.....34
- Tabela 4** - Frequência genotípica da mutação Phe1534Cys do Nav de *Ae. aegypti* das três localidades individualmente e da UEL como um todo .....34
- Tabela 5** - Número de ovos coletados nas diferentes armadilhas instaladas nos centros de estudos da UEL com os índices de infestação durante novembro e dezembro de 2017. Índice de infestação criado pelo Laboratório de Entomologia Geral e Médica conforme densidade de ovos encontrados no mês (até 20 – Satisfatório; 21-35 – Alerta e acima de 35 – Risco) .....35

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	<i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762) .....	1
1.2	Arboviroses .....	2
1.3	Gene mitocondrial ND4 .....	5
1.4	<i>Knockdown resistance (kdr)</i> .....	7
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
2.1	Geral.....	8
2.2	Específicos .....	8
<b>CAPÍTULO 1 - "Resistência a inseticidas piretróides e variabilidade genética em populações naturais de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Diptera: Culicidae) em Londrina, Paraná (Brasil)"</b>		
	Resumo .....	10
	Introdução .....	10
	Material e Métodos .....	12
	Resultados .....	14
	Discussão .....	19
	Referências.....	21
<b>CAPÍTULO 2 - "Estudo genético populacional em <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> (Linnaeus, 1762) no campus da Universidade Estadual de Londrina, Paraná (Brasil)"</b>		
	Resumo .....	27
	Introdução .....	27
	Material e Métodos .....	29
	Resultados e Discussão .....	31
	Referências.....	36
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>41</b>

## 1 1. INTRODUÇÃO

### 2 1.1 *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

3 O gênero *Aedes* (Meigen 1818), família Culicidae, compreende 932  
4 espécies, distribuídas em 78 subgêneros, dos quais apenas oito foram registrados  
5 nas Américas Central e do Sul (WRBU, 2018). No Brasil, já foram registradas 28  
6 espécies do gênero, sendo *Ae. aegypti* a mais conhecida delas por exercer o papel  
7 de vetor de diversos vírus que podem afetar seres humanos.

8 Oriundo do Velho Mundo, provavelmente da região da Etiópia, e tendo  
9 sido originalmente descrito no Egito, o *Ae. aegypti* acompanhou a população  
10 humana em sua longa e ininterrupta migração na superfície terrestre, permanecendo  
11 onde as alterações antrópicas propiciaram a sua proliferação, devido a sua  
12 plasticidade genética (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Natal 2002). Acredita-  
13 se que o mosquito tenha sido levado para os países do Mediterrâneo e das  
14 Américas por meio de navios vindos da África, sendo disseminado pelas rotas de  
15 colonização. Nestes locais, estes se tornaram altamente eficientes na transmissão  
16 de arboviroses (Eritja et al. 2005; Weaver & Reisen, 2010). Porém, sua presença é  
17 limitada a certas localizações geográficas, dado que não são capazes de sobreviver  
18 em temperaturas muito baixas. Sua distribuição atual se dá principalmente em  
19 regiões tropicais e subtropicais das Américas, África, Oriente Médio, Sudeste  
20 Asiático e Pacífico. Pode ser encontrado até a latitude 40°N na América do Norte,  
21 em Indiana e Illinois, porém não é capaz de sobreviver aos meses de inverno  
22 rigoroso (CDC, 2018). Esses mosquitos colonizam reservatórios de água, onde  
23 depositam ovos resistentes à seca (Christophers, 1960). Sua capacidade de  
24 adaptação é tão grande que são capazes de se desenvolver em diferentes tipos de  
25 recipientes disponíveis em várias regiões do mundo. Por exemplo, em Bangladesh e  
26 Malásia, os mosquitos são encontrados com maior frequência em pequenos  
27 recipientes plásticos e pneus com água acumulada (Ferdousi et al. 2015), enquanto  
28 no Brasil, recipientes de barro e vasos de plantas são mais propícios para o seu  
29 desenvolvimento (Pinheiro & Tadei, 2002).

30 É válido ainda ressaltar que o *Ae. aegypti* está intimamente relacionado  
31 com problemas de saúde pública e medidas sociais e sanitárias. A ausência de água  
32 encanada confiável (Kuno, 1997) e coleta regular de lixo (Barrera et al. 1995)  
33 proporcionam aumento na sua proliferação, dado que até mesmo água de má  
34 qualidade e recipientes que acumulam água da chuva são ambientes propícios para

1 o seu desenvolvimento. Segundo Walker e colaboradores (2018), as modificações  
2 humanas do ambiente como irrigação e armazenamento de água, permitiram a  
3 permanência do mosquito até mesmo em ambientes mais áridos.

4 Seu ciclo de vida holometábolo com ovo, larvas e pupa está associado ao  
5 ambiente urbano, sendo um mosquito domiciliado (Forattini, 2002). Após eclosão  
6 dos ovos, as larvas aquáticas passam por três ecdises larvais, pupa e se tornam  
7 adultos terrestres. O mosquito adulto alimenta-se de seiva vegetal e as fêmeas  
8 praticam também a hematofagia, processo fundamental para a produção de seus  
9 ovos. As fêmeas de *Ae. aegypti* alimentam-se preferencialmente de sangue humano,  
10 mas também de outros mamíferos. Após a cópula, estas fazem diversos movimentos  
11 explorando e disseminando seus ovos, depositando pequenos grupos isolados em  
12 diferentes locais, o que é caracterizado como “oviposição aos saltos” (Chadee &  
13 Corbet, 1993). Para se desenvolver completamente os embriões de *Ae. aegypti*  
14 levam cerca de 77,5 horas sob uma temperatura constante de 25°C (Farnesi et al.  
15 2009), podendo entrar em diapausa após este período. E, mesmo assim, o ovo pode  
16 continuar viável por aproximadamente 450 dias (Franco, 1976). A grande resistência  
17 à dessecação proporcionada pelo exocório dos ovos que é uma estrutura quitinosa,  
18 junto a uma cutícula serosa disposta na interface entre o embrião e o ovo (Rezende  
19 et al. 2008).

20

## 21 **1.2 Arboviroses**

22 As arboviroses são doenças virais causadas pelos arbovírus (*ARthropod-*  
23 *BOrne virus*), assim denominados por parte de seu ciclo de replicação ocorrer nos  
24 insetos, além de serem veiculados a partir de artrópodes hematófagos durante o  
25 repasto sanguíneo (Lopes et al. 2014).

26 Quatro famílias virais de arbovírus são conhecidos por causar doenças  
27 em humanos: Togaviridae, Bunyaviridae, Flaviviridae e Reoviridae. A família  
28 Flaviviridae é composta por três gêneros, dentre eles o gênero *Flavivirus*. Este  
29 engloba vírus como o da dengue (DENV) e seus quatro sorotipos, sendo este  
30 considerado o vírus mais importante em circulação do Brasil (Lopes et al. 2014).  
31 Outro vírus pertencente a esse gênero é o Zika (ZIKV) que, desde 2015, foi  
32 notificada no Brasil como a causa de microcefalia e da síndrome de Guillain-Barré. A  
33 família Togaviridae, anteriormente classificada junto a outros grupos de vírus,  
34 recentemente foi redefinida como família distinta distribuída em dois gêneros, sendo

1 um deles o *Alphavirus*. O vírus Chikungunya (CHIKV) pertence a esse gênero,  
2 descrito pela primeira vez durante um surto no sul da Tanzânia em 1952, é  
3 responsável por causar uma doença com alguns sinais clínicos comuns aos da  
4 dengue e Zika (WHO, 2018). Além dos sintomas parecidos, os vírus da febre  
5 amarela, DENV, ZIKV e CHIKV compartilham os mesmos vetores, os mosquitos *Ae.*  
6 *aegypti* e *Ae. albopictus*, sendo o primeiro o principal vetor, e transmitidas durante o  
7 repasto sanguíneo (Chouin-Carneiro et al. 2016; WHO, 2018).

8 A dengue é uma doença viral emergente e pandêmica. A infecção pode  
9 ser assintomática, leve ou grave, podendo ainda tornar-se letal (Ministério da Saúde,  
10 2018). Segundo o Sistema Estadual de Saúde (SES) e o Sistema de Informação de  
11 Agravos de Notificação (SINAN), 12.463.346 casos de dengue clássica foram  
12 registrados no Brasil no período de 1990 a 2016, dentre eles 365.232 casos na  
13 região Sul e 342.544 casos no Paraná, tornando este o Estado com maior número  
14 de casos na região Sul do Brasil.

15 A doença do vírus Zika (ZIKV) é considerada um modelo de infecção  
16 emergente, dado que recentemente foi descrita em áreas geográficas onde não  
17 existia anteriormente (Díaz-Menéndez & Crespillo-Andújar, 2017). Dentre as  
18 principais complicações estão a microcefalia e a síndrome Guillain-Barré, mas já  
19 foram relatadas isquemia cerebral, meningoencefalomielite, encefalite aguda e  
20 polineuropatias relacionadas ao potencial neuropatogênico do vírus, de maneira  
21 similar a outros flavivírus (Barcellos et al. 2016; Carteux et al. 2016).

22 Chikungunya ou “febre do Chikungunya” é uma infecção viral emergente  
23 responsável por causar febres muito altas e dores articulares que podem persistir  
24 durante anos, até mesmo tornarem-se crônicas. Após a picada de um mosquito  
25 infectado, o início da doença ocorre geralmente entre 4 e 8 dias, variando entre 2 a  
26 12 dias. Dentre os sintomas descritos, febre alta e dores articulares muito fortes são  
27 as mais comuns, porém dores musculares, dores de cabeça, náusea, fadiga e  
28 erupções cutâneas já foram relatados (WHO, 2018). Em geral a infecção ocorre de  
29 maneira branda, porém pode não ser reconhecida, ou até mesmo mal diagnosticada  
30 em áreas onde a dengue ocorre. Tratamentos com drogas antivirais e vacina contra  
31 Chikungunya inexistem.

32 O conceito de semana epidemiológica (SE) é utilizado para a  
33 apresentação da distribuição temporal dos casos, número de óbitos e coeficiente de  
34 incidências de infecções. Foi estabelecido por convenção internacional, afim de

1 facilitar a comparação entre dados. As semanas epidemiológicas são contadas de  
2 domingo a sábado; a primeira semana do ano é a que contém o maior número de  
3 dias de janeiro e a última a que contém o maior número de dias de dezembro,  
4 muitas vezes não coincidindo com o calendário.

5 Segundo o Ministério da Saúde (2018), no ano de 2017, entre as  
6 semanas epidemiológicas 1 e 52 (1/1 a 30/12), 252.054 casos prováveis de dengue  
7 foram registrados no Brasil, com incidência de 122,3 casos/100 mil habitantes. O  
8 Estado do Paraná registrou 4.195 casos prováveis, sendo o Estado com maior  
9 incidência do Sul do País. O município de Londrina esteve em destaque entre os  
10 municípios com maior incidência de casos prováveis de dengue, especialmente no  
11 mês de dezembro (63,4 casos/100 mil habitantes). Foram 514 casos acumulados  
12 durante o ano. Em 2016 entre a SE 1 e a SE 52, foram registrados 1.483.623 casos  
13 prováveis de dengue, e em 2015, 1.688.688 casos no mesmo período. Em 2018, até  
14 a SE 49 (31/12/2017 a 10/12/2018), foram registrados 247.393 casos prováveis de  
15 dengue no país, com uma incidência de 118,7 casos/100 mil habitantes.

16 Durante a SE 1 a 52 de 2017, 185.737 casos prováveis de febre de  
17 chikungunya foram registrados no Brasil, sendo 229 casos prováveis registrados no  
18 Estado do Paraná. Em 2016, SE 1 a SE 52, foram registrados 277.882 casos  
19 prováveis de febre de chikungunya, e em 2015, 38.499 casos no País. Em 2016,  
20 foram registrados 216.207 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no Brasil durante  
21 o mesmo período. Para a febre do vírus Zika em 2017 (SE 1 a 52), 17.452 casos  
22 prováveis foram registrados no País, sendo 61 deles no Estado do Paraná. No  
23 Estado nenhum óbito foi confirmado. Em 2018, até a SE 49 (31/12/2017 a  
24 10/12/2018), foram registrados 85.221 casos prováveis de febre de chikungunya no  
25 País; enquanto para o vírus da Zika, 8.024 casos prováveis foram registrados (até a  
26 SE 46, 31/12/2017 a 17/11/2018).

27 Atualmente, um dos componentes das ações de vigilância em focos de  
28 mosquitos vetores é LIRAA (Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti*). É  
29 uma ferramenta importante pois permite identificar os criadouros predominantes e a  
30 situação de infestação dos municípios, além de permitir o direcionamento das ações  
31 de controle para as áreas mais críticas. Resultados inferiores a 1%, indicam  
32 condições satisfatórias. Resultados entre 1 e 3,9%: indicam situação de alerta.  
33 Resultado superior a 4% demonstram risco de surto de dengue. Segundo

1 levantamento da 17ª Regional de Saúde (Londrina, PR), no ano de 2017, o 1º LIRAA  
2 apontou índice de infestação em 4,1%, enquanto o segundo em 5,3%. O terceiro  
3 LIRAA do ano apontou índice de 5%, enquanto o último realizado no ano teve índice  
4 de 4,3%. Durante os quatro levantamentos realizados no ano de 2017, três  
5 demonstraram estado de alerta para infestação do mosquito (Inf. pessoal).

6 A partir dos dados de boletins epidemiológicos é possível observar a  
7 diminuição do número de casos prováveis de dengue, Zika e Chikungunya ao longo  
8 dos anos de 2017 e 2018 se comparados aos anos anteriores de 2015 e 2016. A  
9 diminuição pode estar relacionada as atividades realizadas pelo Ministério da Saúde,  
10 como consta nos boletins epidemiológicos, como a realização de workshops, cursos,  
11 campanhas de conscientização, monitoramento do levantamento entomológico  
12 (LIRAA, LIA e armadilhas), repasse de recursos financeiros, elaboração de  
13 estratégias de combate ao mosquito, mapeamento de áreas de risco e  
14 monitoramento de resistência do vetor. Porém, condições climáticas e regime de  
15 chuvas devem ser levados em consideração.

16

### 17 **1.3 Gene mitocondrial ND4**

18 Diversos genes mitocondriais estão relacionados a estudos populacionais  
19 devido às próprias características do DNA mitocondrial (DNAMt) como herança  
20 materna, quantidade elevada de cópias nas células, genoma compacto e taxa de  
21 mutação elevada (se comparada com DNA nuclear). Um dos genes do DNAMt é o  
22 ND4, que codifica a subunidade 4 da enzima NADH desidrogenase. Esta proteína é  
23 parte de um grande complexo enzimático conhecido como complexo I, que é ativo  
24 nas mitocôndrias. Durante a fosforilação oxidativa, os complexos enzimáticos  
25 mitocondriais realizam reações químicas que impulsionam a produção de ATP. O  
26 complexo I especificamente é responsável pelo primeiro passo no processo de  
27 transporte de elétrons, realizando a transferência elétrons de uma molécula de  
28 NADH para uma molécula de ubiquinona. Os elétrons são então passados da  
29 ubiquinona por meio de outros complexos enzimáticos, fornecendo energia para a  
30 geração de ATP.

31 Em estudos com *Ae. aegypti*, o gene ND4 tem demonstrado ser uma  
32 excelente ferramenta de caracterização e diferenciação genética. Costa-da-Silva et  
33 al. (2005) avaliaram três populações de *Aedes aegypti* do Peru e observaram três  
34 haplótipos diferentes, sendo um deles geneticamente distante, sugerindo a

1 existência de pelo menos duas linhagens da espécie no país. Herrera et al. (2006)  
2 observaram sete haplótipos em populações dessa espécie da Venezuela, sugerindo  
3 fortes evidências de isolamento por distância e uma significativa diferenciação  
4 populacional.

5 Afim de analisar a estrutura genética e filogeográfica de *Ae. aegypti*,  
6 Bracco et al. (2007) avaliaram o segmento do gene ND4 de 36 populações do  
7 continente americano (Brasil, Peru, Venezuela, Guatemala e Estados Unidos), três  
8 da África (Guiné, Senegal e Uganda), e três da Ásia (Singapura, Camboja e Taiti).  
9 Vinte haplótipos distintos foram encontrados, sendo 14 exclusivos para as Américas  
10 e quatro para a África e países asiáticos. Os demais são comuns a dois ou mais  
11 continentes. Aguirre-Obando e colaboradores (2015) avaliaram quatro populações  
12 distintas de *Aedes aegypti* na Colômbia e puderam observar a presença de apenas  
13 três haplótipos diferentes e uma baixa diversidade nucleotídica. Isso provavelmente  
14 ocorreu dado a pequena distância entre as regiões estudadas (menos de 17km),  
15 sugerindo que o fluxo gênico é restrito. Os haplótipos indicaram uma relação  
16 próxima entre populações mexicanas e norte americanas, demonstrando a dispersão  
17 passiva do mosquito por diferentes países.

18 Esses estudos demonstram a importância do estudo do gene mitocondrial  
19 ND4, resultando em uma caracterização da estrutura genética populacional de  
20 insetos vetores de patógenos, extremamente importante no subsídio de programas  
21 de controle, produção de vacinas e manutenção da saúde pública. Além disso é  
22 possível obter um maior conhecimento sobre os padrões de distribuição de  
23 haplótipos, que podem demonstrar a origem dos mosquitos e ilustrar a sua  
24 dispersão. É possível ainda ressaltar que um conhecimento genético das  
25 populações é também importante na evolução de mecanismos de resistência a  
26 inseticidas, os quais podem gerar populações diferenciadas e resistentes, assim  
27 como dificultar o controle das mesmas.

28

#### 29 **1.4 Knockdown resistance (*kdr*)**

30 O aumento na frequência dos alelos selecionados na população pelos  
31 inseticidas é responsável pela formação de populações altamente resistentes.  
32 Dentre os inseticidas conhecidos, é possível ressaltar o grupo dos piretroides,  
33 comumente utilizados com o objetivo de eliminar mosquitos adultos. Esses  
34 inseticidas agem na manutenção dos canais de sódio voltagem-dependente na

1 conformação aberta, ocasionando a propagação contínua do impulso nervoso e a  
2 consequente morte do inseto (Braga & Valle, 2007).

3 Mutações em proteínas transmembrana do canal de sódio voltagem-  
4 dependente ( $Na_v$ ) que reduzem a ligação aos piretróides são conhecidas como  
5 “*knockdown resistance*” (*kdr*). O termo refere-se a perda imediata da coordenação  
6 dos insetos causada por exposição aos inseticidas e a recuperação após o efeito  
7 dos mesmos (Saavedra-Rodriguez et al. 2007). Como relatado em diversas  
8 espécies (Vais et al. 2000), o *kdr* é considerado um importante mecanismo de  
9 resistência e se dá por uma redução de 10 a 20 vezes na sensibilidade dos sítios-  
10 alvos a piretróides (Davies et al. 2008). Os genes associados ao fenótipo *kdr*,  
11 apresentam-se de forma recessiva, ou seja, a expressão desse mecanismo de  
12 resistência só é possível em condição de homozigose (Davies et al. 2008).

13 Para *Ae. aegypti*, várias mutações *kdr* já foram identificadas, sendo duas  
14 delas nas posições 1016 e 1534 no segmento 6 dos domínios II e III do  $Na_v$ ,  
15 respectivamente. Ambos segmentos são bastante relacionados a resistência *kdr*  
16 aos piretróides (Rinkevich et al. 2013; Dong et al. 2014). A mutação na posição  
17 1016 se dá por uma transição A/G na primeira base do códon 1016, modificando  
18 uma Valina por uma Isoleucina (Val1016Ile), observada por Saavedra-Rodriguez e  
19 colaboradores em 2007 em populações latino-americanas de *Ae. aegypti*. No Brasil,  
20 essa mutação também já foi observada por Martins e colaboradores (2009). A  
21 mutação 1534 troca uma Fenilalanina por uma Cisteína (Phe1534Cys), já  
22 observada em populações de *Ae. aegypti* por Linss e colaboradores (2014) em  
23 diferentes Estados do País. Apesar de muitas outras terem sido identificadas, as  
24 mutações Val1016Ile e Phe1534Cys são duas das cinco mutações  
25 comprovadamente relacionadas à perda de sensibilidade aos piretróides  
26 (Saavedra-Rodriguez et al., 2018).

27 Sendo assim, o conhecimento sobre as mutações específicas em  
28 proteínas de canais de sódio-voltagem dependente, principalmente as responsáveis  
29 por conferir resistência a inseticidas piretróides, se torna essencial, dado que esses  
30 são comumente de uso doméstico e fazem parte da composição de muitos  
31 repelentes de insetos distribuídos comercialmente. Como são produtos de fácil  
32 acesso da população humana e seu uso não é controlado como deveria,  
33 informações sobre o padrão de distribuição da resistência em populações do  
34 mosquito torna-se essencial em estratégias de manejo do vetor.

1

## 2 2. OBJETIVOS

### 3 2.1 Objetivo geral

4 O presente trabalho teve por objetivo geral uma análise genética de *Ae.*  
5 *aegypti* coletados em diferentes regiões do município de Londrina a fim de avaliar a  
6 estrutura populacional e a resistência à piretroides.

7

### 8 2.2 Objetivos específicos

- 9 ❖ Avaliar a variabilidade genética de diferentes populações de *Ae. aegypti*  
10 utilizando o gene mitocondrial ND4;
- 11 ❖ Verificar a presença das mutações Na<sub>v</sub>, Val1016Ile e Phe1534Cys  
12 associadas a resistência *knockdown* como possível mecanismo de  
13 resistência a inseticidas piretroides;
- 14 ❖ Correlacionar os dados genéticos e de infestação de *Ae. aegypti* para  
15 obter um panorama do risco de circulação das arboviroses em Londrina.

## CAPÍTULO 1

**“Resistência a inseticidas piretróides e variabilidade genética em populações naturais de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) em Londrina, Paraná (Brasil)”**

1 **Resistência a inseticidas piretróides e variabilidade genética em populações**  
2 **naturais de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) em Londrina,**  
3 **Paraná (Brasil)**

4 Thayná Bisson Ferraz Lopes<sup>1</sup>, Tafarel Ribeiro Amaro<sup>1</sup>, João Antonio Cyrino Zequi<sup>2</sup>, Renata  
5 da Rosa<sup>1</sup>.

6 1. Laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Biologia Geral, Universidade  
7 Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. 2. Laboratório de Entomologia Geral e  
8 Médica, Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina,  
9 Londrina, Paraná, Brasil.

10 **Resumo**

11 Londrina é o segundo município mais populoso do Estado do Paraná, localizado na  
12 região Sul do Brasil, e compreende grandes áreas urbanizadas. Seu clima  
13 subtropical com regime de chuvas em todas as estações, aliado a alta densidade  
14 demográfica tornam a cidade propícia para o ciclo do mosquito *Aedes aegypti*. Nos  
15 últimos anos, Londrina apresentou elevados índices de infestação e foi uma das  
16 cidades do Estado com maior número de casos registrados de dengue. Compostos  
17 químicos são aplicados com objetivo de controle do vetor do vírus, porém, seu uso  
18 intenso pode influenciar na composição genética do mosquito, ocasionando a  
19 seleção de populações altamente resistentes. Diante disso, neste trabalho foi  
20 realizada a análise genética em populações de *Aedes aegypti* coletadas em onze  
21 localidades da cidade de Londrina. Para isso, foi realizada a análise de variabilidade  
22 genética e a avaliação da presença de duas mutações de resistência a inseticidas  
23 piretróides (Val1016Ile e Phe1534Cys). A análise do gene mitocondrial ND4 de 220  
24 indivíduos demonstrou a presença de 17 haplótipos, um número elevado em  
25 comparação com outros estudos. Os alelos de resistência *kdr* avaliados estão  
26 presentes na cidade, com a frequência de 50% para a mutação Val1016Ile e 48%  
27 para a mutação Phe1534Cys em 330 indivíduos genotipados. O baixo fluxo gênico  
28 observado e a diferenciação elevada entre as populações sugerem a influência de  
29 deriva genética no loco mitocondrial ND4 no município. Além disso, fica evidente a  
30 forte presença de alelos de resistência *kdr* na cidade, demonstrando que a aplicação  
31 de piretróides pode não ser uma estratégia viável no controle do vetor. Sendo assim,  
32 o presente trabalho demonstrou a necessidade de monitoramento genético aliado a  
33 outras ferramentas de vigilância entomológica para criação de estratégias de  
34 combate ao mosquito.

35  
36 **Palavras-chave:** DNAm; gene ND4; resistência *knockdown*; PCR alelo-específica;  
37 canal sódio-voltagem dependente.

38  
39 **Introdução**

40 A Dengue é uma infecção viral (DENV) transmitida pelo mosquito *Aedes*  
41 *aegypti*, podendo se manifestar de forma assintomática, leve ou grave [1]. Desde  
42 1846 a dengue já é referenciada no Brasil, porém somente em 1986 obteve sua  
43 importância epidemiológica, a partir do surgimento de uma epidemia no Estado do  
44 Rio de Janeiro, tornando-se endêmica no País [2].

1 Segundo o Sistema Estadual de Saúde (SES) e o Sistema de Informação  
2 de Agravos de Notificação (SINAN), 12.463.346 casos de dengue clássica foram  
3 registrados no Brasil no período de 1990 a 2016, dentre eles 365.232 casos na  
4 região Sul e 342.544 casos no Estado do Paraná, tornando este o Estado com maior  
5 número de casos na região Sul do Brasil. No ano de 2017, 4.195 casos prováveis  
6 foram registrados no Estado, com a maior incidência do Sul do País [3]. O município  
7 de Londrina esteve em destaque no mesmo ano entre os municípios com maior  
8 incidência de casos prováveis de dengue, especialmente no mês de dezembro (63,4  
9 casos/100 mil habitantes).

10 No Brasil, estratégias de monitoramento e controle e já acontecem há  
11 muitos anos de forma clássica utilizando-se do LIRAA (Levantamento Rápido de  
12 Índices para *Ae. aegypti*) e também de procedimentos de controle larval por  
13 reguladores de crescimento e adultos por inseticidas sintéticos. Os inseticidas  
14 piretroides são empregados no controle do mosquito desde 2000 como uma  
15 alternativa aos organofosforados e a primeira documentação de resistência no País  
16 ocorreu poucos anos depois [4, 5]. Atualmente o piretroide sintético é a forma de  
17 controle mais utilizada pela população, pois tem fácil acesso de compra nos  
18 mercados e uso prático no interior das residências para controle de adultos de *Ae.*  
19 *aegypti* [6].

20 A resistência a piretroides é recorrente na maioria das regiões onde *Ae.*  
21 *aegypti* é estabelecido [7]. Estudos demonstram que mutações que afetam proteínas  
22 do canal sódio-voltagem-dependente ( $Na_v$ ) podem desempenhar um papel na  
23 resistência a piretroides.  $Na_v$  são proteínas transmembrana do canal de sódio  
24 voltagem-dependente compostas por quatro domínios homólogos (I-IV), cada um  
25 com seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6), presentes nos axônios neuronais [8].  
26 Mutações em  $Na_v$  que reduzem a ligação aos piretróides são conhecidas como  
27 “*knockdown resistance*” (*kdr*), devido à perda imediata da coordenação dos insetos  
28 causada por exposição aos inseticidas e a recuperação após o efeito dos mesmos.

29 Mundialmente, onze mutações *kdr* em  $Na_v$  foram observadas em várias  
30 populações de *Ae. aegypti* ( $AaNa_v$ ), e em sua grande maioria, conferindo algum grau  
31 de resistência a piretroide [6]. No Brasil, algumas mutações já foram relatadas,  
32 sendo a mutação Phe1534Cys uma das cinco comprovadamente relacionadas à  
33 perda de sensibilidade aos piretroides, e em co-ocorrência com a mutação  
34 Val1016Ile [9, 10]. A mutação Val1016Ile é resultado da substituição de uma valina  
35 por uma isoleucina (GTA-ATA) e a mutação Phe1534Cys resulta na substituição de  
36 uma fenilalanina por uma cisteína (TTC-TGC), e estão localizadas, respectivamente  
37 nas regiões IIS6 e IIS6 de  $Na_v$  [10].

38 O monitoramento da susceptibilidade a inseticidas e a presença de  
39 mutações é uma estratégia importante na ampliação do conhecimento sobre os  
40 mecanismos de resistência [6, 11]. A interação com a análise de diversidade  
41 genética de populações de *Ae. aegypti* pode ser aplicada com o objetivo de  
42 conhecer a estrutura das populações, afim de compreender a dinâmica das  
43 mesmas, fornecendo dados que podem levar a novas medidas de controle.

1 A caracterização da estrutura genética e de fluxo gênico de insetos  
2 vetores de patógenos é extremamente importante no subsídio de programas de  
3 controle, produção de vacinas e manutenção da saúde pública. O DNA mitocondrial  
4 (mtDNA) é alvo de estudos de genética de populações de *Ae. aegypti* de diferentes  
5 localidades, em especial o gene mitocondrial ND4, que codifica a subunidade 4 da  
6 enzima NADH desidrogenase, importante no processo de fosforilação oxidativa. No  
7 Brasil, alguns estudos populacionais já foram realizados [12, 13], incluindo algumas  
8 populações do Paraná [14] e até mesmo a cidade de Londrina [15]. Esse tipo de  
9 análise pode fornecer dados para a caracterização da estrutura populacional, bem  
10 como fornecer base para que novas metodologias de controle do *Ae. aegypti* sejam  
11 implantadas.

12  
13 A integração de diferentes estratégias de controle do vetor, considerando  
14 as alternativas disponíveis e as características regionais específicas, parece ser um  
15 mecanismo viável para a redução da infestação dos mosquitos e a incidência das  
16 arboviroses transmitidas por eles, dado que uma solução única para o controle do  
17 *Ae. aegypti* no Brasil é inexistente [16]. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi  
18 investigar a variabilidade genética de *Ae. aegypti* na cidade de Londrina utilizando o  
19 gene ND4 e, pela primeira vez, avaliar a presença de mutações de resistência *kdr* no  
20 município.

## 21 22 **Material e métodos**

### 23 *Coleta*

24 Onze localidades foram selecionadas em cinco regiões da cidade de  
25 Londrina para coleta de ovos por armadilhas de oviposição georreferenciadas: (1)  
26 Conjunto Maria Cecília, (2) Conjunto Aquiles Stenghel (Região Norte); (3) União da  
27 Vitória, (4) Parque das Indústrias (Região Sul); (5) Armindo Guazzi, (6) Vila Ricardo  
28 (Região Leste); (7) Jardim Bandeirantes, (8) Leonor (Região Oeste); (9) Vila Casoni,  
29 (10) Centro Social Urbano, (11) Vila Brasil (Região Centro). Todas as coletas foram  
30 autorizadas pela Secretaria de Saúde do município e pelo ICMBio (número 27414-  
31 1). A coleta dos ovos ocorreu entre os meses de novembro a dezembro de 2017.

32 Ovos coletados foram submersos em água no laboratório de Entomologia  
33 Geral e Médica (Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina)  
34 para eclosão, sendo as larvas mantidas em condições controladas ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  
35 umidade  $80 \pm 10\%$  e fotoperíodo 14:10 horas) e alimentadas com ração para peixe  
36 (Tretamix, autoclavada) em partículas de 1mm até a obtenção dos adultos. Para  
37 identificação dos exemplares de *Aedes aegypti* foram utilizadas as chaves  
38 dicotômicas de Consoli e Oliveira (1994) [17], Forattini (2002) [18] e WRBU (2018)  
39 [19] com auxílio de microscópio estereoscópico Opton (40X) CH30LF100. Trinta  
40 adultos de cada localidade de coleta foram selecionados após a identificação. Os  
41 mosquitos foram individualmente armazenados em etanol absoluto a  $-20^\circ\text{C}$  para as  
42 análises posteriores.

### 43 44 *Amplificação do gene mitocondrial ND4*

1 A extração de DNA total foi realizada segundo Aguirre-Obando et al.  
2 (2015) [20]. Duzentos e vinte adultos (20 de cada localidade) foram selecionados  
3 para avaliação do gene ND4. Dois *primers* foram utilizados na amplificação, um  
4 *primer* ND4F: 5'-ATT GCC TAA GGC TCA TGT AG-3' e um *primer* reverso de  
5 ND4R: 5'-TCG GCT TAG TAG TAG ATTC-3' [21]. As reações de PCR e  
6 sequenciamento seguiram Twerdochlib et al. (2012). O alinhamento das sequências  
7 obtidas foi realizado no programa BioEdit versão 7.0.5 [22], ferramenta ClustalW  
8 [23]. As sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no GenBank,  
9 utilizando a ferramenta Tblastx para confirmação do fragmento amplificado. A  
10 relação entre os haplótipos foi inferida por meio da construção de uma rede de  
11 haplótipos, elaborada com o auxílio do programa Network [24]. A diversidade  
12 genética e os testes de neutralidade (D de Tajima e Fs de Fu) foram calculados no  
13 programa DnaSP versão 6 [25]. A análise de variância molecular (AMOVA) foi  
14 realizada com o programa Arlequin versão 3.5 [26]. A estrutura populacional foi  
15 determinada usando o índice de fixação de Wright ( $F_{ST}$ , Wright 1921) e fluxo gênico  
16 (Nm) foi obtido pelo programa Arlequin 3.5 [26].

#### 17 *Genotipagem dos sítios Na<sub>v</sub> 1016 e 1534 de Ae. aegypti*

18 Para a mutação Val1016Ile foram utilizados os seguintes *primers*:  
19 1016Val 5'-GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCA CAA ATT GTT TCC  
20 CAC CCG CAC CGG-3', 1016Ile 5'-GCG GGC ACA AAT TGT TTC CCA CCC GCA  
21 CTG A-3' e um *reverse* comum para ambos 5'-GGA TGA ACC GAA ATT GGA CAA  
22 AAG C-3'. As condições de amplificação ocorreram segundo Saavedra Rodriguez et  
23 al. (2007) [27] e Martins et al. (2009) [28]. Para a mutação Phe1534Cys foram  
24 utilizados os *primers* "reverse" comum para ambos alelos 5'-TCT GCT CGT TGA  
25 AGT TGT CGA T-3', dois *primers forward* alelo-específicos 1534Phe<sup>+</sup> 5'-GCG GGC  
26 TCT ACT TTG TGT TCT TCA TCA TAT T-3' e 1534Cys<sup>kdR</sup> 5'-GCG GGC AGG GCG  
27 GCG GGG GCG GGG CCT CTA CTT TGT GTT CTT CAT CAT GTG-3'. As  
28 condições de amplificação ocorreram segundo Harris et al. (2010) [29]. Para  
29 verificação alelos amplificados foi preparado um gel de poliacrilamida a 10% corado  
30 com SYBR® Safe (Kasvi:6x). 30 amostras de cada localidade foram genotipadas  
31 para ambas mutações. Ao analisar o *amplicons*, o genótipo e frequências alélicas  
32 foram calculados e o teste da hipótese do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foi  
33 realizado. Estas análises foram conduzidas de duas maneiras diferentes: primeiro,  
34 cada região do município foi considerada e analisada individualmente e segundo,  
35 todas os pontos de coleta foram agrupados e analisados em conjunto.

36

37

38

39

## 40 **Resultados**

### 41 *Estrutura populacional*

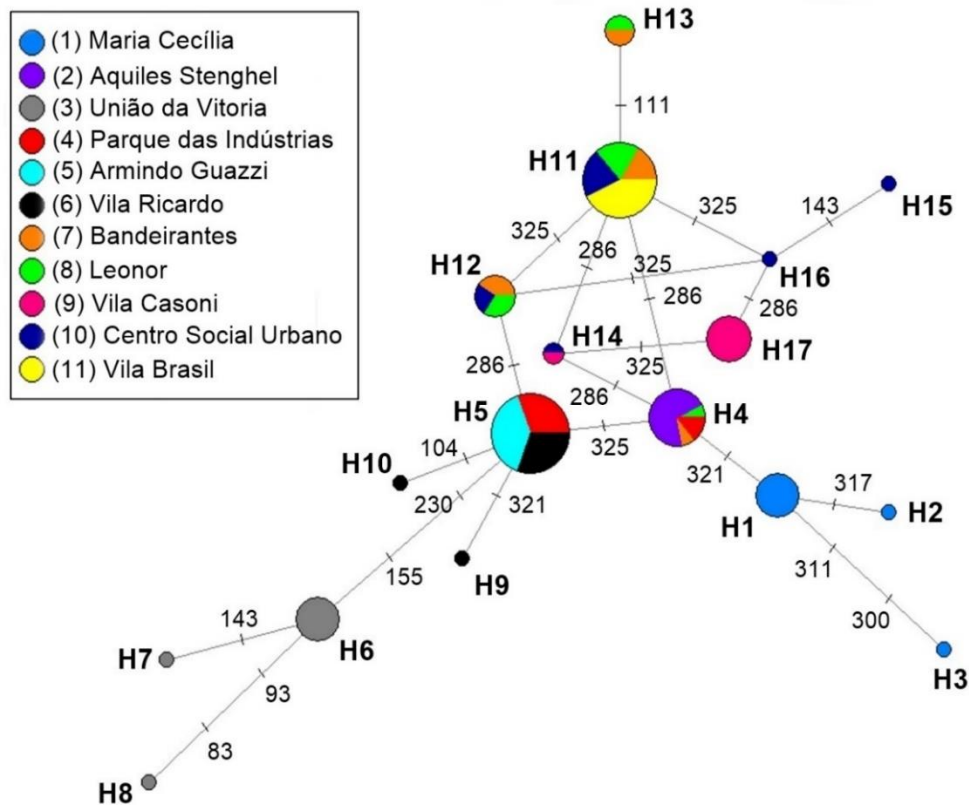
1 O produto amplificado do gene ND4 foi de 339pb com a existência de 13  
 2 sítios polimórficos e 326 monomórficos (Tabela 1). A análise do fragmento  
 3 amplificado resultou em 17 haplótipos (Figura 1). Os haplótipos mais frequentes  
 4 foram H5 e H11 (Figura 1). Os haplótipos foram definidos por quatro transições  
 5 G↔A (sítios 104, 143, 321 e 325) e nove transversões A↔T (sítios 93, 321), T↔G  
 6 (sítios 111, 155, 286), C↔A (sítios 230 e 300) e C↔G (sítios 311 e 317). A  
 7 composição média de nucleotídeos foi de 41,1% de Adenina, 29,4% de Timina,  
 8 21,5% de Citosina e 8,0% de Guanina.

9 **Tabela 1.** Sítios variáveis nos 17 haplótipos do gene mitocondrial ND4 de *Ae. aegypti* observados na  
 10 cidade de Londrina, Paraná.

Haplótipo	Posições das mudanças nucleotídicas												N	
	83	93	104	111	143	155	230	286	300	311	317	321		325
H1	G	A	G	T	G	T	C	T	C	C	C	G	G	16
H2	G	A	G	T	G	T	C	T	C	C	G	G	G	2
H3	G	A	G	T	G	T	C	T	A	G	C	G	G	2
H4	G	A	G	T	G	T	C	T	C	C	C	A	G	28
H5	G	A	G	T	G	T	C	T	C	C	C	A	A	52
H6	G	A	G	T	G	G	A	T	C	C	C	A	A	16
H7	G	A	G	T	A	G	A	T	C	C	C	A	A	2
H8	T	T	G	T	G	G	A	T	C	C	C	A	A	2
H9	G	A	G	T	G	T	C	T	C	C	C	T	A	2
H10	G	A	A	T	G	T	C	T	C	C	C	A	A	2
H11	G	A	G	T	G	T	C	G	C	C	C	A	G	47
H12	G	A	G	T	G	T	C	G	C	C	C	A	A	15
H13	G	A	G	G	G	T	C	G	C	C	C	A	G	8
H14	G	A	G	T	G	T	C	C	C	C	C	A	G	4
H15	G	A	G	T	C	T	C	G	C	C	C	A	T	2
H16	G	A	G	T	G	T	C	G	C	C	C	A	T	2
H17	G	A	G	T	G	T	C	C	C	C	C	A	T	18

11 N = Número de indivíduos que compartilham cada haplótipo.

12 A diversidade haplotípica ( $H_d$ ) foi de  $0,862 \pm 0,011$  (média  $\pm$  desvio  
 13 padrão,  $n = 220$ ), a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) foi de  $0,0055 \pm 0,0003$  e de 1,876  
 14 diferenças nucleotídicas em média. Os resultados do teste de neutralidade não  
 15 foram significativos e estavam de acordo com as suposições do modelo de mutação  
 16 neutra ( $p > 0,10$ ,  $D$  de Tajima  $-0,8799$ ,  $F_s$  de Fu  $-4,8888$ ). A estimativa de fluxo  
 17 gênico foi de  $N_m = 0,14$ .



1

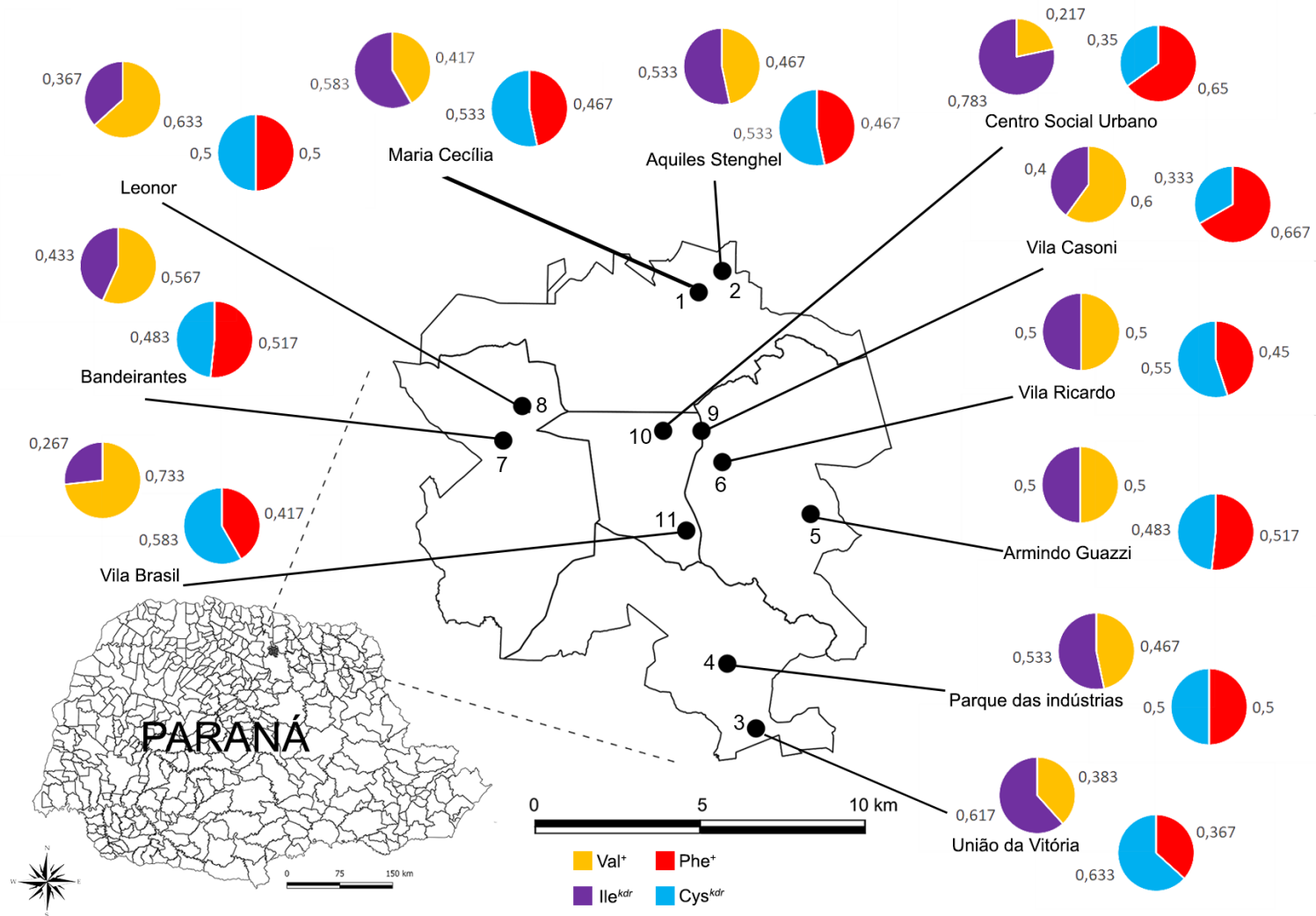
2 **Figura 1.** Rede haplotípica gerada para o loco mitocondrial ND4. Os círculos são proporcionais ao  
 3 número de indivíduos observados em cada haplótipo. Em negrito os haplótipos observados. Os  
 4 números representam a posição das mudanças nucleotídicas.

5 A análise da variância molecular (AMOVA,  $F_{st} = 0,78$ ,  $p < 0,05$ ) indicou  
 6 diferenciação (estruturação) genética. Maior variação ocorreu entre populações  
 7 (77,9%) que dentro das populações (22,1%).

#### 8 *Genotipagem dos fragmentos 1016 e 1534 do Nav*

9 Um total de 330 indivíduos foram genotipados para ambas mutações (30  
 10 de cada localidade) (Figura 2). Para a mutação Val1016Ile, 30% (98) eram  
 11 homozigotos dominantes (Val/Val<sup>+</sup>), 40% (133) heterozigotos (Val<sup>+</sup>/Ile<sup>kdr</sup>) e 30% (99)  
 12 eram homozigotos recessivos (Ile/Ile<sup>kdr</sup>). A frequência do alelo Val<sup>+</sup> foi 0,5 e do alelo  
 13 Ile<sup>kdr</sup> foi de 0,5 para a cidade de Londrina. Avaliando todas as populações em  
 14 conjunto, a cidade de Londrina não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg para a  
 15 mutação Val1016Ile (Tabela 2).

16 Para a mutação Phe1534Cys, 30% (99) eram homozigotos dominantes  
 17 (Phe/Phe<sup>+</sup>), 36% (120) heterozigotos (Phe<sup>+</sup>/Cys<sup>kdr</sup>) e 34% (111) eram homozigotos  
 18 recessivos (Cys/Cys<sup>kdr</sup>). A frequência do alelo Phe<sup>+</sup> foi 0,48 e do alelo Cys<sup>kdr</sup> foi de  
 19 0,52 para a cidade de Londrina. Avaliando todas as populações em conjunto, a  
 20 cidade de Londrina não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg para a mutação  
 21 Phe1534Cys (Tabela 3).



**Figura 2.** Frequências alélicas observadas na genotipagem dos sítios 1016 e 1534 do  $Na_v$  *kdr* de Londrina. Localização dos pontos de coleta distribuídos nas cinco diferentes regiões da cidade. Somente a zona urbana do município foi avaliada no estudo.

- 1 **Tabela 2.** Frequência genotípica da mutação Val1016Ile do Na<sub>v</sub> de *Ae. aegypti* das onze localidades e  
 2 da cidade de Londrina como um todo. Os valores de X<sup>2</sup> destacados em itálico demonstraram  
 3 diferença significativa (p>0,05).

Região	UBS	N	Frequência genotípica			EHW* X <sup>2</sup>
			Val/Val <sup>+</sup>	Val <sup>+</sup> /Ile <sup>kdr</sup>	Ile/Ile <sup>kdr</sup>	
Norte	Maria Cecília	30	0,167	0,5	0,333	0,024
	Aquiles Stenghel	30	0,133	0,667	0,2	3,453
Sul	Parque das Indústrias	30	0,267	0,4	0,333	1,157
	União da Vitória	30	0,333	0,1	0,567	18,652
Leste	Armindo Guazzi	30	0,333	0,333	0,333	3,333
	Vila Ricardo	30	0,333	0,333	0,333	3,333
Oeste	Leonor	30	0,333	0,6	0,067	2,555
	Bandeirantes	30	0,2	0,733	0,067	7,297
Centro	Centro Social Urbano	30	0,167	0,1	0,733	14,927
	Vila Brasil	30	0,667	0,133	0,2	13,032
	Vila Casoni	30	0,33	0,533	0,133	0,371
<b>Londrina</b>		330	0,297	0,403	0,3	12,411

- 4 \*Equilíbrio de Hardy-Weinberg: teste do Chi-quadrado com grau de liberdade 1.

- 5 **Tabela 3.** Frequência genotípica da mutação Phe1534Cys do Na<sub>v</sub> de *Ae. aegypti* das onze  
 6 localidades e da cidade de Londrina como um todo. Os valores de X<sup>2</sup> destacados em itálico  
 7 demonstraram diferença significativa (p>0,05).

Região	UBS	N	Frequência genotípica			EHW* X <sup>2</sup>
			Phe/Phe <sup>+</sup>	Phe <sup>+</sup> /Cys <sup>kdr</sup>	Cys/Cys <sup>kdr</sup>	
Norte	Maria Cecília	30	0,2	0,533	0,267	0,153
	Aquiles Stenghel	30	0,1	0,733	0,167	6,718
Sul	Parque das Indústrias	30	0,267	0,2	0,533	9,726
	União da Vitória	30	0,333	0,333	0,333	3,333
Leste	Armindo Guazzi	30	0,367	0,3	0,333	4,783
	Vila Ricardo	30	0,334	0,233	0,333	8,383
Oeste	Leonor	30	0,167	0,666	0,167	3,333
	Bandeirantes	30	0,267	0,5	0,233	-
Centro	Centro Social Urbano	30	0,433	0	0,567	30
	Vila Brasil	30	0,167	0,5	0,333	0,024
	Vila Casoni	30	0,667	0	0,333	30
<b>Londrina</b>		330	0,3	0,363	0,337	24,372

- 8 \*Equilíbrio de Hardy-Weinberg: teste do Chi-quadrado com grau de liberdade 1

**Tabela 3.** Número de indivíduos observados para cada haplótipo em amostras de onze populações de *Aedes aegypti* de Londrina.

<b>Localidade</b>	<b>H1</b>	<b>H2</b>	<b>H3</b>	<b>H4</b>	<b>H5</b>	<b>H6</b>	<b>H7</b>	<b>H8</b>	<b>H9</b>	<b>H10</b>	<b>H11</b>	<b>H12</b>	<b>H13</b>	<b>H14</b>	<b>H15</b>	<b>H16</b>	<b>H17</b>	<b>Total</b>
Maria Cecília	16	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
Aquiles Stenghel	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
União da Vitória	0	0	0	0	0	16	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
Parque das Indústrias	0	0	0	4	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
Armindo Guazzi	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
Vila Ricardo	0	0	0	0	16	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	20
Bandeirantes	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	8	6	4	0	0	0	0	20
Leonor	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	9	5	4	0	0	0	0	20
Centro Social Urbano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	4	0	2	2	2	0	20
Vila Brasil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	20
Vila Casoni	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	18	20
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>28</b>	<b>52</b>	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>47</b>	<b>15</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>18</b>	<b>220</b>

## 1 Discussão

2  
3 O LIRAA é utilizado no Brasil com objetivo de avaliar a densidade larvária  
4 do mosquito *Aedes aegypti*. Esse levantamento apresenta, de maneira rápida e  
5 segura, os índices prediais (percentual de edifícios positivos (com a presença de  
6 larvas do mosquito) e de Breteau (relação entre o número de recipientes positivos e  
7 o número de imóveis pesquisados). Ele é empregado como instrumento de  
8 avaliação dos resultados das medidas de controle, pois inclui dados referentes aos  
9 tipos de recipientes, tornando possível redirecionar e/ou intensificar algumas  
10 intervenções e também alterar as estratégias de controle adotadas [30]. Índices  
11 superiores a 4% demonstram risco de surto de dengue. Em Londrina, no ano de  
12 2017, dentre os quatro levantamentos realizados no ano, somente em um deles a  
13 cidade não apresentava risco de epidemia de dengue (Tabela 4). No ano de 2018, o  
14 primeiro levantamento do LIRAA demonstrou um índice elevado, onde a cada 100  
15 casas vistoriadas pelos agentes, 12 apresentaram focos do mosquito. Este foi o  
16 segundo maior índice registrado na cidade desde 1988 [31]. Apesar dos dois últimos  
17 levantamentos do ano não apontarem alerta de risco, o último se demonstra  
18 alarmante, pois está muito próximo ao limite de tolerância. Esses dados demonstram  
19 a necessidade de monitoramento e políticas de controle do vetor na cidade.

20  
21 **Tabela 4.** Índices do Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* (LIRAA) em Londrina em  
22 2017 e 2018, informados pela 17ª Regional de Saúde de Londrina. Os valores destacados com  
23 asterisco demonstram índices de alerta de risco de surto de dengue em Londrina.

Ano	1º LIRAA	2º LIRAA	3º LIRAA	4º LIRAA
2017	4,1*	5,3*	0,50	4,30*
2018	12,1*	4,7*	1,6	3,9

24  
25 A análise do gene ND4 demonstrou uma diversidade haplotípica elevada  
26 (Hd = 0,862) se comparada com um estudo anterior realizado na cidade de Londrina  
27 (Hd = 0,730) [15] e em Foz do Iguaçu, outra cidade do Estado (Hd = 0,131) [14]. A  
28 diversidade genética foi baixa ( $\pi = 0,005$ ) se comparado com resultados observados  
29 em outras populações do Paraná ( $\pi = 0,015$ ), o que pode estar ocorrendo devido ao  
30 domínio de alguns haplótipos mais raros, como os haplótipos H2-H3, H7-H10 e H15-  
31 16. Exceto alguns haplótipos (H4, H5, H11 e H12), todos os outros são de regiões  
32 exclusivas, demonstrando a particularidade de cada região da cidade de Londrina  
33 (Figura 1).

34 O baixo fluxo gênico observado entre as populações de Londrina ( $N_m =$   
35 0,14), assim como a diferenciação elevada (77,9%) demonstram uma formação de  
36 populações estruturadas (diferenciadas). O valor elevado e significativo de  $F_{st} = 0,78$   
37 (índice de fixação) também reafirma essa estruturação. Esses resultados sugerem  
38 que as populações estão sob influência de deriva, que atua no aumento da variação  
39 genética entre as populações.

40 Medidas químicas usadas nos programas de controle de vetores afetam a  
41 diversidade genética das populações de *Ae. aegypti*, e como resultado, podem  
42 induzir alterações genéticas através de efeitos de gargalo e deriva [32]. Na América  
43 do Sul, em países como Brasil, Argentina, Guiana Francesa, Colômbia, Peru e  
44 Venezuela, sucessivos programas de controle implementados nos últimos anos para  
45 erradicar o *Ae. aegypti* e controlar a dengue e outras arboviroses, ocasionaram

1 efeitos demográficos que levaram a uma intensa deriva genética e um elevado nível  
2 de diferenciação genética em escalas continental e local [32, 33]. Além disso, esses  
3 efeitos de deriva podem ser explicados devido à própria característica biológica do  
4 mosquito vetor: as fêmeas realizam uma fraca dispersão, que não ultrapassa  
5 algumas centenas de metros durante sua vida, se estabelecendo em regiões  
6 restritas [34]. A possibilidade de dispersão dos mosquitos a longa distância ocorre  
7 somente de forma passiva (ovos e adultos transportados em automóveis e  
8 transporte público; recipientes com ovos sendo movidos para diferentes localidades),  
9 o que pode explicar a coexistência de alguns haplótipos em diferentes localidades.

10 Em relação as mutações de resistência *kdr* a piretroides, as elevadas  
11 frequências dos alelos mutantes observadas em grande parte das populações  
12 avaliadas são preocupantes, pois os polimorfismos têm tendência a aumentar de  
13 frequência se a pressão de seleção for constante, podendo eventualmente atingir a  
14 fixação [35]. No presente estudo, considerando todos os pontos em geral, os alelos  
15 de resistência *kdr* apareceram em uma frequência de 50% para a mutação  
16 Val1016Ile e 48% para a mutação Phe1534Cys. Apesar do alelo dominante ainda  
17 apresentar maior frequência que o recessivo mutante em algumas localidades, como  
18 nas localidades 8, 9 e 11 para a mutação Val1016Ile e 5, 7, 9 e 10 para a mutação  
19 Phe1535Cys, é válido ressaltar que a heterozigosidade deve ser levada em conta. A  
20 região Oeste, por exemplo, possui uma frequência elevada do genótipo heterozigoto  
21 para ambas mutações (Tabelas 2 e 3), e que, apesar de não conferir o fenótipo de  
22 resistência, carrega o alelo resistente que pode ser transferido pelos mosquitos ao  
23 longo das gerações.

24  
25 Em algumas localidades, a frequência alélica se mostrou equivalente: nos  
26 pontos 5 e 6 para a mutação Val1016Ile e nos pontos 4 e 8 para a mutação  
27 Phe1534Cys. É válido ressaltar a particularidade de algumas localidades da cidade:  
28 no ponto 10 (Centro Social Urbano), há uma maior frequência do alelo Ile<sup>*kdr*</sup> que do  
29 alelo Val<sup>+</sup>, enquanto a frequência do alelo Cys<sup>*kdr*</sup> é menor que de Phe<sup>+</sup>. No ponto 11  
30 (Vila Brasil), isso ocorre de forma contrária: há uma maior frequência do alelo Val<sup>+</sup>  
31 que do alelo Ile<sup>*kdr*</sup>, enquanto que a frequência do alelo Cys<sup>*kdr*</sup> é maior que de Phe<sup>+</sup>.

32  
33 Nos últimos anos, como uma alternativa ao uso de inseticidas e um  
34 auxílio ao monitoramento, outras formas de controle têm sido introduzidas no Brasil.  
35 Alguns compostos naturais, como óleos essenciais, são potenciais larvicidas contra  
36 o *Ae. aegypti* [36, 37, 38]. A vantagem desses compostos é o fato de demonstrarem  
37 efeitos prolongados após a sua aplicação, além de serem inofensivos para humanos  
38 (muitos são utilizados como aromatizantes na indústria alimentícia). Outra alternativa  
39 considerada foi a introdução da bactéria *Wolbachia*, capaz de reduzir pela metade o  
40 tempo de vida de um mosquito adulto e ocasionando incompatibilidade  
41 citoplasmática completa, o que resulta em uma progênie estéril [39, 40]. Ainda há o  
42 emprego de estratégias aliadas a genética, como a liberação de mosquitos  
43 transgênicos. O objetivo dessa estratégia consiste em reduzir ou mesmo eliminar  
44 espécies de mosquitos por meio do desenvolvimento de genes letais ou capazes de  
45 tornar os insetos estéreis, além da transformação ou substituição da população, por  
46 meio da introdução de um gene efector para reduzir ou bloquear a transmissão da  
47 doença na população selvagem [41, 42].

1 Os resultados observados no presente trabalho demonstram que o gene  
2 mitocondrial ND4 é uma ferramenta importante na epidemiologia molecular, ao  
3 demonstrar a distribuição de haplótipos na cidade e a diferenciação das populações,  
4 aliado a presença e padrões de distribuição de mutações de resistência a  
5 piretroides. Dessa forma, esses marcadores podem colaborar para intervenções dos  
6 programas de controle em diferentes localidades da cidade de maneira direcionada.  
7 Além disso, os dados demonstram uma necessidade de se utilizar estratégias  
8 alternativas, algumas já disponíveis, ao uso de inseticidas piretroides.

### **Agradecimentos**

Os autores são gratos a Universidade Estadual de Londrina (UEL), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Departamento de Biologia Geral, por disponibilizar toda estrutura laboratorial para realização desse trabalho. A CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro e a Secretaria Municipal de Saúde de Londrina e ao ICMBio pela autorização das coletas.

### **Referências**

1. Dengue and severe dengue [Internet]. Who.int. 2018 [Accessed 7 July 2018]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
2. Martins, A, Belinato, T, Lima, J, Valle, D. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Pest Manag Sci*. 2008;64(6), 676-680.
3. Boletim epidemiológico Vol.52 [Internet]. Ministério da Saúde 2018 [Accessed 02 January 2019]. Available from <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf>>.
4. Lima J, da Silva Soares S, Valle D, Ramos R, Ribeiro Galardo A, da-Cunha M et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68(3):329-333.
5. Da-Cunha M, Lima J, Brogdon W, Moya G, Valle D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(4):441-4

6. Saavedra-Rodriguez K, Maloof F, Campbell C, Garcia-Rejon J, Lenhart A, Penilla P et al. Parallel evolution of vgsc mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. *Sci Rep.* 2018;8(1).
7. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases [Internet]. *Apps.who.int.* 2013 [Accessed 8 January 2018]. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80245/WHO\\_HTM\\_NTD\\_2013.2\\_eng.pdf;sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80245/WHO_HTM_NTD_2013.2_eng.pdf;sequence=1)
8. Catterall W. Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup>Channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16(1):521-555.
9. Lima, E, Paiva, M, de Araújo, A, da Silva, E, da Silva, U, de Oliveira, L, ..., Wilding, C. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & vectors.* 2011;4(1), 5.
10. Linss J, Brito L, Garcia G, Araki A, Bruno R, Lima J et al. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasites & Vectors.* 2014;7(1):25.
11. Braga, I. and Valle, D. *Aedes aegypti*: resistance, surveillance and monitoring, and control alternatives in Brazil. *Epidemiol Serv Saude.* 2007;16(4), pp.295-302.
12. Bracco J, Capurro M, Lourenço-de-Oliveira R, Sallum M. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(5):573-580.
13. Lima Júnior R, Scarpassa V. Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. *Genet Mol Biol.* 2009;32(2):414-422.
14. Bona A, Piccoli C, Leandro A, Kafka R, Twerdochilib A, Navarro-Silva M. Genetic profile and molecular resistance of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) in Foz do Iguaçu (Brazil), at the border with Argentina and Paraguay. *Zoologia (Curitiba).* 2012;29(6):540-548.
15. Twerdochilib A, Bonna A, Leite S, Chitolina R, Westphal B, Navarro-Silva M. Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial ND4 gene. *Rev Bras etomol.* 2012;56(2):249-256.
16. Zara, A-L-D-S-A, Santos, S-M-D, Fernandes-Oliveira, E-S, Carvalho, R-G, & Coelho, G-E. *Aedes aegypti* control strategies: a review. *Epidemiol Serv Saude.* 2016;25(2), 391-404.
17. Consoli R, Oliveira R. Main mosquitos of sanitary importance in Brazil. Rio de Janeiro, RJ: Editora FIOCRUZ; 1994.

18. Forattini, O. P. (2002). Evaluation of Toxicity of Phenolic Compounds Using *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Artemia salina*. **Culicidologia médica**. São Paulo: Edusp; 2:864
19. WRBU: SOUTHCOM Medically Important Arthropods Keys [Internet]. Wrbu.org. 2018 [Accessed 23 July 2018]. Available from: [http://www.wrbu.org/aors/southcom\\_Keys.html](http://www.wrbu.org/aors/southcom_Keys.html)
20. Aguirre-Obando O, Bona A, Duque L-J, Navarro-Silva M. Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Zoologia (Curitiba)*. 2015;32(1):14-22.
21. Costa-da-Silva A, Capurro M, Bracco J. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(6):539-544.
22. Hall, T. Bioedit v 7.0.5. Ibis Therapeutics, a division of Isis Pharmaceuticals, Carlsbad; 2005.
23. Thompson J, Higgins D, Gibson T. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(22):4673-4680.
24. Bandelt H, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 1999;16(1):37-48.
25. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio J, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins S et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol Biol Evol*. 2017;34(12):3299-3302.
26. Excoffier L, Lischer H. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. 2010;10(3):564-567.
27. Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores A, Fernandez-Salas I et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*. 2007;16(6):785-798.
28. Martins A, Lima J, Peixoto A, Valle D. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Trop Med Int Health*. 2009;14(11):1351-1355.
29. Harris A, Ranson H, Rajatileka S. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(2):277-284.
30. Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti*—LIRAA—para Vigilância Entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil. Metodologia para Avaliação dos Índices de Breteau e Predial e Tipo de Recipientes. [Internet] Ministério da

- Saúde. 2013 [Accessed 20 January 2019] Available from: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=dengue-964&alias=1460-levantamento-rapido-indices-para-aedes-aegypti-liraa-2a-edicao-0&Itemid=965](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-964&alias=1460-levantamento-rapido-indices-para-aedes-aegypti-liraa-2a-edicao-0&Itemid=965)
31. Saúde divulga resultado do primeiro LIRAA de 2018. [Internet] Prefeitura de Londrina. 2018 [Accessed 29 December 2018] Available from: [http://www1.londrina.pr.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=28590:saude-divulga-resultado-do-primeiro-liraa-de-2018&catid=101:saude&Itemid=2346](http://www1.londrina.pr.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=28590:saude-divulga-resultado-do-primeiro-liraa-de-2018&catid=101:saude&Itemid=2346)
  32. Urdaneta-Marquez L, Failloux A. Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infect Genet Evol.* 2011;11(2):253-261.
  33. Paupy C, Le Goff G, Brengues C, Guerra M, Revollo J, Barja Simon Z et al. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infect Genet Evol.* 2012;12(6):1260-1269.
  34. Honório N, Silva W, Leite P, Gonçalves J, Lounibos L, Lourenço-de-Oliveira R. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(2):191-198.
  35. Martins, A, Valle, D. The pyrethroid knockdown resistance. In *Insecticides-Basic and Other Applications.* 2012.
  36. Santos S, Silva V, Melo M, Barbosa J, Santos R, de Sousa D et al. Toxic Effects on and Structure-Toxicity Relationships of Phenylpropanoids, Terpenes, and Related Compounds in *Aedes aegypti* Larvae. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010;10(10):1049-1054.
  37. Santos S, Melo M, Cardoso A, Santos R, de Sousa D, Cavalcanti S. Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere.* 2011;84(1):150-153.
  38. Pereira T, Rocha M, Sucupira P, Carvalho F, Moreira L. *Wolbachia* significantly impacts the vector competence of *Aedes aegypti* for Mayaro virus. *Sci Rep.* 2018;8(1).
  39. McMeniman C, Lane R, Cass B, Fong A, Sidhu M, Wang Y et al. Stable Introduction of a Life-Shortening *Wolbachia* Infection into the Mosquito *Aedes aegypti*. *Science.* 2009;323(5910):141-144.
  40. Yeap H, Mee P, Walker T, Weeks A, O'Neill S, Johnson P et al. Dynamics of the "Popcorn" *Wolbachia* Infection in Outbred *Aedes aegypti* Informs Prospects for Mosquito Vector Control. *Genetics.* 2010;187(2):583-595.
  41. Carvalho D, Costa-da-Silva A, Lees R, Capurro M. Two step male release strategy using transgenic mosquito lines to control transmission of vector-borne

diseases. *Acta Trop.* 2014;132:S170-S177.

42. Araújo H, Carvalho D, Ioshino R, Costa-da-Silva A, Capurro M. *Aedes aegypti* Control Strategies in Brazil: Incorporation of New Technologies to Overcome the Persistence of Dengue Epidemics. *Insects.* 2015;6(2):576-594.

## CAPÍTULO 2

**“Estudo genético populacional em *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) no *campus* da Universidade Estadual de Londrina, Paraná (Brasil)”**

# 1 **Estudo genético populacional em *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)** 2 **no *campus* da Universidade Estadual de Londrina, Paraná (Brasil)**

3 Thayná Bisson Ferraz Lopes<sup>1</sup>, Tafarel Ribeiro Amaro<sup>1</sup>, Bianca Piraccini Silva<sup>2</sup>, João Antonio  
4 Cyrino Zequi<sup>2</sup>, Renata da Rosa<sup>1</sup>.

5 1. Laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Biologia Geral, Universidade  
6 Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. 2. Laboratório de Entomologia Geral e  
7 Médica, Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina,  
8 Londrina, Paraná, Brasil.

## 9 **Resumo**

10 *Aedes aegypti* é vetor dos quatro sorotipos do vírus da dengue. O monitoramento do  
11 mosquito aliado a estratégias de controle específicas ainda é o método mais eficaz  
12 para evitar a transmissão dos vírus, que ocorre durante o repasto sanguíneo. No  
13 Brasil, a aplicação de inseticidas piretroides é realizada como forma de controle, a  
14 fim de eliminar mosquitos adultos. Porém, o uso doméstico e indiscriminado desses  
15 compostos pode ocasionar a seleção de variedades alélicas resistentes. A  
16 Universidade Estadual de Londrina (UEL), está localizada na cidade de Londrina,  
17 uma das cidades com maiores índices de infestação de *Ae. aegypti* do Paraná e  
18 com maior número de casos de dengue e outras arboviroses no Sul do Brasil. A  
19 Universidade abriga uma comunidade muito diversa, originária de diferentes regiões  
20 da cidade e do País. Sendo assim, o presente estudo avaliou duas mutações de  
21 resistência a inseticidas piretroides (Val1016Ile e Phe1534Cys) e variabilidade  
22 genética (gene mitocondrial ND4) em populações naturais de *Ae. aegypti* no *campus*  
23 da UEL em três localidades. Dez haplótipos foram observados na análise do gene  
24 ND4. A frequência do alelo recessivo de resistência *kdr* 1016Ile foi de 57,3% e de  
25 1534Cys foi de 62,2%. Em relação ao monitoramento do vetor, 3.321 ovos foram  
26 coletados nos três centros, com índice de positividade de armadilhas de 54%. Esses  
27 resultados demonstram uma elevada presença de alelos de resistência a piretroides  
28 e evidenciaram a diferenciação e estruturação genética entre de cada centro. Além  
29 disso, o trabalho demonstrou que o uso de piretroides dentro do *campus*  
30 possivelmente não seria uma ferramenta viável e evidenciou a necessidade do uso  
31 de mais de uma ferramenta de avaliação, monitoramento e controle, pois ainda não  
32 há uma estratégia única e eficaz no controle de *Ae. aegypti*.

33 **Palavras-chave:** resistência *knockdown*; piretroide; canal sódio-voltagem  
34 dependente; DNA mitocondrial; gene ND4.

## 35 **Introdução**

36 Dengue, Zika e Chikungunya são infecções virais que compartilham o  
37 mesmo inseto vetor, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Ações antrópicas colaboraram  
38 para a disseminação do mosquito na área urbana e sua expansão descontrolada. A  
39 espécie acumula-se em locais com potencial para acumulação de água, a exemplo  
40 de reservatórios [1], pneus descartados [2], calhas entupidas, materiais recicláveis,  
41 vasos de plantas, garrafas, reservatórios de água externo de refrigeradores,  
42 recipientes de ar condicionado [3], algumas espécies de bromélias no ambiente  
43 urbano entre outros [3-5].

44 O monitoramento com controle específico do vetor nas fases de ovos e  
45 larvas é a melhor forma de evitar surtos das doenças [6, 7]. A metodologia de

1 monitoramento utilizada no Brasil é o LIRAA (Levantamento Rápido de Índices para  
2 *Aedes aegypti*) [8], que identifica os criadouros predominantes e a situação de  
3 infestação do município a cada três meses e permite o direcionamento das ações de  
4 controle para as áreas mais críticas. Entretanto, poucas são as estratégias de  
5 educação para saúde e ações efetivas de controle do mosquito [9-12].

6 Com o objetivo de eliminar os adultos, a utilização de inseticidas  
7 piretroides, um composto químico sintético presente na composição de repelentes e  
8 inseticidas de uso doméstico, é comum no País. Porém, o uso desenfreado desses  
9 compostos por campanhas governamentais e por aplicação doméstica  
10 descontrolada ocasiona a seleção de insetos altamente resistentes [13]. Desde 2000  
11 os piretroides são utilizados no Brasil e poucos anos depois a resistência dos  
12 mosquitos já foi documentada [14, 15].

13 Esses inseticidas agem em proteínas transmembrana do canal de sódio  
14 voltagem-dependente ( $Na_v$ ) deixando-o na conformação aberta, ocasionando a  
15 propagação contínua do impulso nervoso e a consequente morte do mosquito [9].  
16 Porém, algumas mutações em  $Na_v$  reduzem a ligação aos piretroides, conhecidas  
17 como mutações *kdr* (*knockdown*), ocasionando a perda imediata da coordenação  
18 dos insetos quando em exposição aos inseticidas e a recuperação logo após o efeito  
19 dos mesmos [16].

20 O conhecimento sobre a distribuição de mutações de resistência e  
21 diversidade genética é importante, pois populações que sofrem pressão de seleção  
22 com inseticidas químicos podem ter sua estrutura genética alterada, assim como sua  
23 capacidade e competência vetorial [17]. Além disso, de maneira integrada podem  
24 fornecer informações para melhoria das ações de monitoramento e controle do  
25 vetor, reduzindo a transmissão de vírus como o da dengue [18]. Uma ferramenta  
26 importante que tem sido utilizada nas últimas décadas tanto para inferir a  
27 diversidade genética e avaliar o fluxo gênico de *Ae. aegypti* é a análise do DNA  
28 mitocondrial [19-22]. Um gene mitocondrial comumente utilizado em estudos  
29 populacionais do mosquito é o ND4, que codifica a subunidade 4 da enzima NADH  
30 desidrogenase, importante no processo de fosforilação oxidativa e geração de ATP.

31 A Universidade Estadual de Londrina (UEL) é uma instituição de ensino  
32 superior pública, localizada na cidade de Londrina, Estado do Paraná (Brasil). Sua  
33 comunidade interna engloba estudantes de graduação, pós-graduação e servidores,  
34 que totalizam aproximadamente 23.000 pessoas (PRORH-UEL 2018), além de  
35 atender a comunidade externa em seus órgãos complementares. A circulação de  
36 pessoas dentro do campus da Universidade é elevada e a diversidade da  
37 comunidade interna é grande por se tratar de um ambiente universitário, muitas  
38 pessoas são originárias de diferentes regiões da cidade de Londrina e de outros  
39 Estados do Brasil. O *campus* está dividido em nove centros de estudos e diversos  
40 órgãos de apoio e de serviços.

41 Devido à dimensão do *campus* (1.500.017,33 metros quadrados) e a  
42 grande circulação de pessoas, o monitoramento de *Ae. aegypti* é contínuo,  
43 utilizando-se ovitrampas para eficiente acompanhamento e tomadas de ações  
44 específicas [23, 24]. Além disso, existem diversos relatos sobre a ocorrência de  
45 dengue, sendo associada à contaminação por mosquitos do *campus* (Inf. pessoal).

46 Diante disso, diferentes ferramentas de análise da estrutura populacional  
47 são de grande importância para o conhecimento sobre o comportamento dos

1 vetores, além de fornecer base para o desenvolvimento de novas estratégias de  
2 controle. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar a variabilidade genética  
3 de *Ae. aegypti* de três localidades dentro da Universidade Estadual de Londrina  
4 utilizando o gene ND4 e avaliar a presença de mutações de resistência *kdr* no  
5 *campus*.

6

## 7 **Material e métodos**

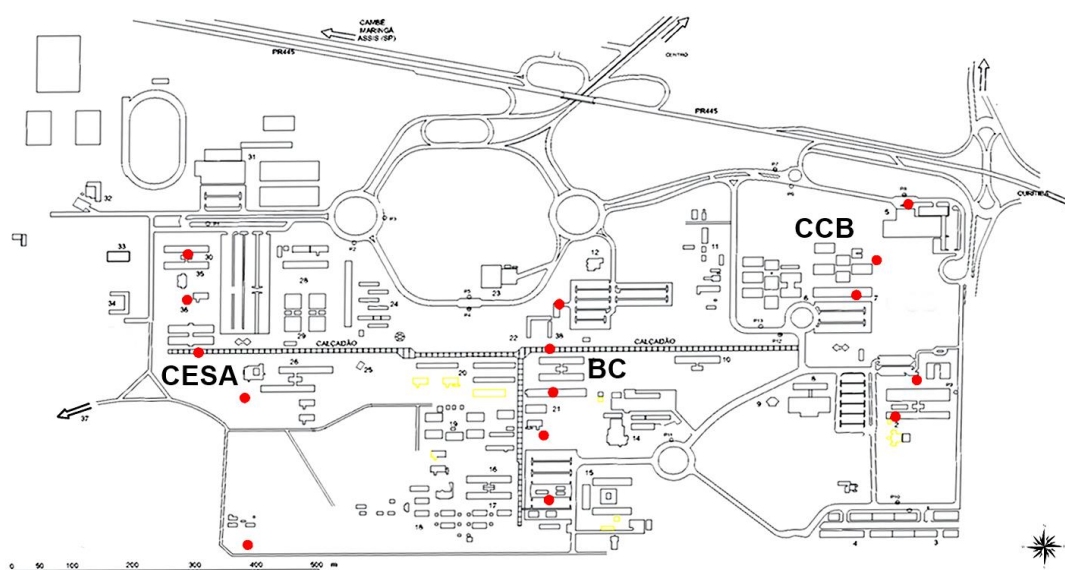
### 8 *Coleta*

9 Três localidades foram selecionadas para instalação de armadilhas de  
10 oviposição dentro do *campus* da Universidade Estadual de Londrina: o Centro de  
11 Ciências Biológicas (CCB), a Biblioteca Central (BC) e o Centro de Estudos Sociais  
12 Aplicados (CESA). São locais equidistantes (aproximadamente 500 m) com  
13 influências antrópicas distintas (Figura 1). O CCB e a BC estão circundadas por  
14 outros prédios, com grande fluxo de pessoas e o CESA, caracteriza-se como área  
15 limítrofe entre os prédios do *campus* e ambiente de fragmento florestal, devido a  
16 suas proximidades com o bosque da universidade.

17 A obtenção dos ovos de *Aedes aegypti* foi realizada segundo Depoli et al.  
18 (2016) [23]. Vasos plásticos de coloração preta com capacidade de 500 mL foram  
19 utilizados como armadilhas para oviposição. Em seu interior foram adicionados 300  
20 mL da mistura atrativa para os mosquitos, fluido constituído por 250 mL de água  
21 destilada e 50 mL de água fenada obtidas através da adição de 34 g de capim  
22 Colômbio [*Megathyrus maximus* (Jacq.)] em 8 L de água, fermentado por cinco dias  
23 em balde plástico na temperatura ambiente. No interior das armadilhas foi  
24 introduzido um filete de *Duratre* de 15 x 3 cm. Os ovos foram coletados entre os  
25 meses de novembro e dezembro de 2017. As instalações das ovitrampas permitiram  
26 determinar o índice de densidade vetorial que é a média de ovos (IDV), de  
27 positividade de ovos (IPO), que é a porcentagem expressa pelo número de  
28 ovitrampas positivas dividida pelo número total de ovitrampas instaladas. Da mesma  
29 forma, foi calculado o índice de densidade de ovo (IDO), que é a relação entre  
30 número de ovos sobre o número de ovitrampas positivas [25].

31 No Laboratório de Entomologia Geral e Médica da Universidade Estadual  
32 de Londrina, foram induzidos à eclosão sendo submersos em água destilada em  
33 bacias plásticas (23 cm de diâmetro x 10cm de profundidade) coberta com microfilo  
34 (malha 1 mm). Os insetos foram acondicionados em câmara incubadora BOD a  $25 \pm$   
35  $2^\circ\text{C}$ , umidade  $80 \pm 10\%$  com fotoperíodo 14:10 horas) e alimentação com ração para  
36 peixe (partículas de 1mm) até a obtenção dos adultos. Adultos foram identificados  
37 utilizando-se capturador de Castro com auxílio de microscópio estereoscópico Opton  
38 (40X) CH30LF100 com uso das chaves dicotômicas de Consoli e Oliveira (1994)  
39 [26], Forattini (2002) [27] e WRBU (2018) [28] com auxílio de microscópio  
40 estereoscópico Opton (40X). Os mosquitos foram individualmente armazenados em  
41 etanol absoluto a  $-20^\circ\text{C}$  para as análises posteriores.

42



1

2 **Figura 1:** Localizações georreferenciadas da instalação de armadilhas no *campus* da UEL. Fonte:  
3 PROPLAN-UDEL.

#### 4 *Amplificação do gene mitocondrial ND4*

5 A extração de DNA total foi realizada segundo Aguirre-Obando et al.,  
6 (2015) [29]. Sessenta adultos (vinte de cada localidade) foram selecionados para  
7 avaliação do gene ND4. Dois *primers* foram utilizados na amplificação, um *primer*  
8 universal ND4F: 5'-ATT GCC TAA GGC TCA TGT AG-3' e um *primer* reverso de  
9 ND4R: 5'-TCG GCT TAG TAG TAG ATTC-3' (Costa-da-Silva et al. 2005) [30]. As  
10 reações de PCR e sequenciamento seguiram Twerdochlib et al. (2012) [22]. O  
11 alinhamento das sequências obtidas foi realizado no programa BioEdit versão 7.0.5  
12 [31], ferramenta ClustalW [32]. As sequências obtidas foram comparadas com as  
13 disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta TBlastx para confirmação do  
14 fragmento amplificado. A genealogia entre os haplótipos foi inferida por meio da  
15 construção de uma rede de haplótipos, elaborada com o auxílio do programa  
16 Network [33]. A diversidade genética e os testes de neutralidade (D de Tajima e Fs  
17 de Fu) foram calculados no programa DnaSP versão 6 [34]. A análise de variação  
18 molecular (AMOVA) foi realizada com o programa Arlequin versão 3.5 [35]. A  
19 estrutura populacional foi determinada usando o índice de fixação de Wright ( $F_{ST}$ ,  
20 Wright 1921) e fluxo gênico (Nm) foi obtido pelo programa Arlequin 3.5 [35].

#### 21 *Genotipagem dos sítios Na<sub>v</sub> 1016 e 1534 de Ae. aegypti*

22 Para a mutação Val1016Ile foram utilizados os seguintes *primers*:  
23 1016Val 5'-GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCA CAA ATT GTT TCC  
24 CAC CCG CAC CGG-3', 1016Ile 5'-GCG GGC ACA AAT TGT TTC CCA CCC GCA  
25 CTG A-3' e um *reverse* comum para ambos 5'-GGA TGA ACC GAA ATT GGA CAA  
26 AAG C-3'. As condições de amplificação ocorreram segundo Saavedra Rodriguez et  
27 al. (2007) [16] e Martins et al. (2009) [11]. Para a mutação Phe1534Cys foram  
28 utilizados os *primers* "reverse" comum para ambos alelos 5'-TCT GCT CGT TGA  
29 AGT TGT CGA T-3', dois *primers forward* alelo-específicos 1534Phe<sup>+</sup> 5'-GCG GGC  
30 TCT ACT TTG TGT TCT TCA TCA TAT T-3' e 1534Cys<sup>kdR</sup> 5'-GCG GGC AGG GCG

1 GCG GGG GCG GGG CCT CTA CTT TGT GTT CTT CAT CAT GTG-3'. As  
 2 condições de amplificação ocorreram segundo Harris et al. (2010) [36]. Para  
 3 verificação alelos amplificados foi preparado um gel de poliacrilamida a 10% corado  
 4 com SYBR® Safe (Kasvi:6x). Para verificação dos alelos amplificados para a  
 5 mutação Phe1534Cys foi preparado um gel de agarose a 2,5%, contendo 8µL de  
 6 amostra de PCR, 5 µL do marcador e 2 µL do corante SYBR® Safe. 30 amostras de  
 7 cada localidade foram genotipadas para ambas mutações. Ao analisar o *amplicons*,  
 8 o genótipo e frequências alélicas foram calculados e o teste da hipótese do equilíbrio  
 9 de Hardy-Weinberg (HW) foi realizado.

10

## 11 Resultados e discussão

12 O produto amplificado do gene mitocondrial ND4 foi de 339pb com a  
 13 existência de 12 sítios polimórficos e 327 monomórficos (Tabela 1). A análise do  
 14 fragmento amplificado resultou em 10 haplótipos (H1-H10). Os mais frequentes  
 15 foram H7 e H9 (Figura 2; Tabela 2). Os haplótipos foram definidos por quatro  
 16 transições: G↔A (sítio 79) e T↔C (sítios 118, 132 e 134) e oito transversões: A↔T  
 17 (sítios 114, 279 e 290), G↔C (sítios 143, 158, 167 e 317) e G↔T (sítio 286). A  
 18 composição média de nucleotídeos foi de 40,8% Adenina, 29,3% Timina, 21,8%  
 19 Citosina e 8,1% Guanina.

20 **Tabela 1.** Sítios variáveis em 10 haplótipos identificados a partir de um fragmento de 339 pb do gene  
 21 mitocondrial ND4 de *Ae. aegypti*.

Haplótipo	Posições das mudanças nucleotídicas												N
	79	114	118	132	134	143	158	167	279	286	290	317	
H1	A	T	C	C	C	G	C	C	A	T	A	C	6
H2	A	T	T	T	C	G	G	G	A	T	A	C	4
H3	A	T	T	T	C	G	C	C	A	T	T	C	3
H4	A	T	T	T	C	G	G	G	A	T	T	C	3
H5	A	T	T	C	C	C	G	C	A	T	A	C	4
H6	A	T	T	T	C	G	G	G	A	G	A	C	6
H7	G	T	T	T	C	G	G	G	A	G	A	G	9
H8	G	A	T	T	C	G	G	G	A	G	A	G	5
H9	A	T	T	C	C	G	G	G	T	T	A	C	13
H10	A	T	T	C	T	G	G	G	T	T	A	C	7

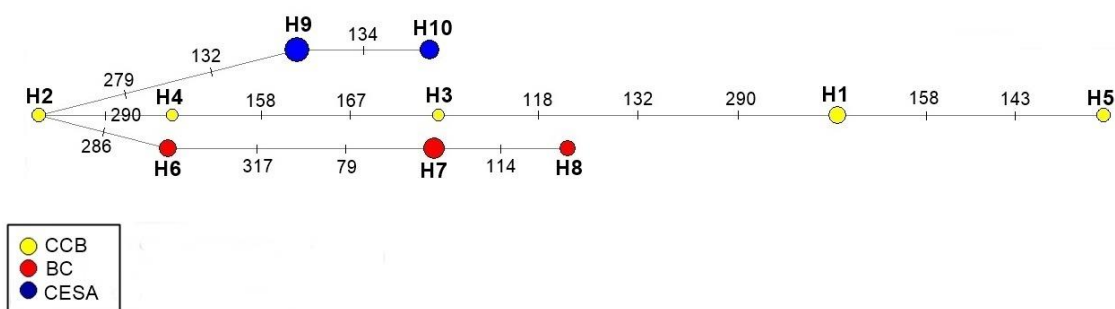
22

23 **Tabela 2.** Número de indivíduos observados para cada haplótipo em amostras de três populações de  
 24 *Aedes aegypti* da UEL.  
 25

Localidade	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	Total
CCB	6	4	3	3	4	0	0	0	0	0	20

BC	0	0	0	0	0	6	9	5	0	0	20
CESA	0	0	0	0	0	0	0	0	13	7	20
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>7</b>	<b>60</b>

1



2

3

4

5

6

**Figura 2.** Rede haplotípica para o loco mitocondrial ND4. Os círculos são proporcionais ao número de indivíduos observados em cada haplótipo. Em negrito os haplótipos observados. Os números representam a localização dos polimorfismos.

7

8

9

10

11

12

13

14

A diversidade haplotípica foi de  $0,891 \pm 0,016$  (média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 60$ ), podendo ser considerada mais elevada, em comparação com outro estudo realizado anteriormente na cidade de Londrina ( $H_d = 0,730$ ) [22]. A diversidade genética foi muito próxima ( $\pi = 0,010$ ) em comparação com outras populações do Paraná ( $\pi = 0,015$ ). A diversidade nucleotídica observada foi de  $0,0109 \pm 0,0006$  e de 3,702 diferenças nucleotídicas em média. Os resultados do teste de neutralidade não foram significativos e estavam de acordo com as suposições do modelo de mutação neutra ( $p > 0,10$ ,  $D$  de Tajima 1,25761,  $F_s$  de Fu 0,897).

15

16

17

18

19

20

Nenhum dos sítios polimórficos coincidiram com os observados por Twerdochlib et al (2012). No presente trabalho ficou evidente a exclusividade dos haplótipos em cada localidade: H1-H5 para o CCB, H6-H8 para a BC e H9-H10 para o CESA (Figura 2). Apesar da distância geográfica entre os pontos ser muito pequena, a pressão em cada localidade é diferente e isso condiz com os resultados obtidos.

21

22

23

24

25

26

27

28

29

As particularidades de cada centro estudado devem ser levadas em consideração. O CCB fica localizado em uma das extremidades do *campus* da UEL com proximidade da rodovia e é um local de abundante constante circulação, inclusive da comunidade externa, pois abriga o Hospital das Clínicas. A Biblioteca Central fica localizada na região central do *campus*, próxima ao Restaurante Universitário e em ambos a circulação de pessoas é elevada, pois uma grande parcela da comunidade interna de todos os centros frequenta essas localidades. O CESA está localizado em outra extremidade do *campus*, com uma proximidade do Horto da Universidade, um local mais conservado e com vegetação.

30

31

32

A análise da variância molecular (AMOVA,  $F_{st} = 0,68$ ,  $p < 0,05$ ) indicou elevada diferenciação (estruturação) genética. A maior variação ocorreu entre populações (67,7%) que dentro das populações (32,3%). O resultado significativo e

1 elevado de AMOVA assim como as particularidades de cada localidade demonstram  
2 que podem existir diferentes pressões sendo exercidas em cada uma. O valor baixo  
3 de fluxo gênico ( $Nm = 0,12$ ) também reafirma essa possibilidade, pois demonstra  
4 que a transferência desse gene entre as populações é mais restrita, aliada a  
5 característica biológica de dispersão reduzida do mosquito [37].

6 Um total de 90 indivíduos foram genotipados para os fragmentos 1016 e  
7 1534 do  $Na_v$ . Para a mutação Val1016Ile, 17% (15) eram homozigotos dominantes  
8 (Val/Val), 52% (47) heterozigotos (Val/Ile) e 31% (28) eram homozigotos recessivos  
9 (Ile/Ile). As populações do CCB, da BC e do CESA estão em equilíbrio de Hardy-  
10 Weinberg e as três populações da UEL estão em equilíbrio como um todo (Tabela  
11 3). Para a mutação Phe1534Cys, 7% (10) eram homozigotos dominantes (Phe/Phe),  
12 53% (16) heterozigotos (Phe/Cys) e 40% (12) eram homozigotos recessivos  
13 (Cys/Cys). As populações do CCB, da BC e do CESA estão em equilíbrio de Hardy-  
14 Weinberg e as três populações da UEL estão em equilíbrio como um todo (Tabela  
15 4).

16 A presença dos alelos recessivos de resistência 1016Ile e 1534Cys  
17 tiveram uma frequência maior nas três populações avaliadas e nas três populações  
18 como um todo (Tabelas 3 e 4). A mutação Phe1534Cys já foi comprovadamente  
19 relacionada a resistência a piretroides [38], o que torna os resultados obtidos  
20 alarmantes. A elevada frequência dos genótipos heterozigotos  $Val^+/Ile^{kdr}$  e  
21  $Phe^+/Cys^{kdr}$  em todas as localidades também é preocupante, pois, apesar de ambos  
22 genótipos não conferirem o fenótipo de resistência, carregam o alelo de resistência  
23 que pode ser transferido pelos mosquitos ao longo das gerações. Em caso de  
24 pressão constante, esses alelos podem atingir a fixação [39].

25  
26 Esses dados demonstram que a aplicação de inseticidas piretroides no  
27 *campus* da Universidade Estadual de Londrina provavelmente não teriam efeito no  
28 controle do *Ae. aegypti* e novas medidas devem ser tomadas, a exemplo do  
29 monitoramento contínuo com método eficiente como as ovitrampas que podem  
30 complementar o LIRAA (evitando assim o uso de inseticidas sintéticos). Caso isso  
31 ocorra a aplicação de inseticidas, e sabendo-se da relevante presença de alelos que  
32 conferem resistência, há necessidade de utilizar outros compostos adulticidas de  
33 forma racional.

34

35

36

37

38 **Tabela 3.** Frequência genotípica da mutação Val1016Ile do  $Na_v$  de *Ae. aegypti* das três localidades e  
39 da UEL como um todo.

Localidade	N	Frequência genotípica			Frequência alélica		EHW* $\chi^2$
		Val/Val <sup>+</sup>	Val <sup>+</sup> /Ile <sup>kdr</sup>	Ile/Ile <sup>kdr</sup>	p	q	
Centro de Ciências Biológicas	30	0,1	0,6	0,3	0,4	0,6	1,875

Biblioteca Central	30	0,3	0,367	0,333	0,48	0,51	2,12
Centro de Estudos Sociais Aplicados	30	0,1	0,6	0,3	0,4	0,6	1,875
<b>UEL</b>	<b>90</b>	<b>0,167</b>	<b>0,522</b>	<b>0,311</b>	<b>0,427</b>	<b>0,573</b>	<b>0,4</b>

\*Equilíbrio de Hardy-Weinberg: teste do Chi-quadrado com grau de liberdade 1 ( $p > 0,05$ ).

2

**Tabela 4.** Frequência genotípica da mutação Phe1534Cys do Nav de *Ae. aegypti* das três localidades individualmente e da UEL como um todo.

Localidade	N	Frequência genotípica			Frequência alélica		EHW* X <sup>2</sup>
		Phe/Phe <sup>+</sup>	Phe <sup>+</sup> /Cys <sup>kdr</sup>	Cys/Cys <sup>kdr</sup>	p	q	
Centro de Ciências Biológicas	30	0,067	0,533	0,4	0,333	0,667	1,2
Biblioteca Central	30	0,2	0,5	0,3	0,45	0,55	0,003
Centro de Estudos Sociais Aplicados	30	0,067	0,567	0,366	0,35	0,65	1,807
<b>UEL</b>	<b>90</b>	<b>0,111</b>	<b>0,533</b>	<b>0,356</b>	<b>0,378</b>	<b>0,622</b>	<b>1,627</b>

\*Equilíbrio de Hardy-Weinberg: teste do Chi-quadrado com grau de liberdade 1 ( $p > 0,05$ ).

6

Nos dois meses de levantamento de mosquitos (novembro e dezembro de 2017) coletou-se 3.321 ovos nos três Centros (Tabela 5). O índice de Positividade de armadilhas foi de 54%. A relação das densidades de ovos e a situação de infestação observados comprovam que o *Ae. aegypti* está presente em proporções semelhantes de infestação em todo o *campus* conforme teste de Kruskal-Wallis ( $p = 0,77$ ;  $H = 0,5218$ ). Essa importante relação de infestação por armadilhas que é um método sensível para detecção do vetor [40], com os demais dados relacionados as populações de *Ae. aegypti* das três localidades, deixam claro que o mosquito sofre pouco deslocamento em uma pequena área, pois CCB, BC e CESA são equidistantes em cerca de 550 metros.

17

**Tabela 5.** Número de ovos coletados nas diferentes armadilhas instaladas nos centros de estudos da UEL com os índices de infestação durante novembro e dezembro de 2017. Índice de infestação criado pelo Laboratório de Entomologia Geral e Médica conforme densidade de ovos encontrados no mês (até 20 – Satisfatório; 21-35 – Alerta e acima de 35 – Risco).

Centro	IDV*		IPO** (%)		IDO***		Total de Ovos		Situação de Infestação	
	Nov.	Dez.	Nov.	Dez.	Nov.	Dez.	Nov.	Dez.	Nov.	Dez.
<b>CCB</b>	22,2 (0-90)	14,4 (0-73)	71,8	45	30,9	32,1	712	289	Alerta	Alerta
<b>BC</b>	22,4	18	55,5	57,8	40,3	31	807	342	Risco	Alerta

	(0-80)	(0-91)									
<b>CESA</b>	2,9	61,9	17,5	76,4	5,9	81	118	1053	Satisfatório	Risco	
	(0-22)	(0-342)									

1 \*IDV-Índice de densidade vetorial (média de ovos)

2 \*\*IPO-Índice de positividade de ovos

3 \*\*\*IDO-Índice de densidade de ovos

4

5 Outra situação importante é a questão da resistência ao gene *kdr*. Os  
6 mosquitos coletados nos centros que estão nos limítrofes da Universidade (CCB e  
7 CESA) sofrem ação externa principalmente pela população com uso de piretroides,  
8 e os resultados demonstraram esse uso por meio da elevada frequência de alelos de  
9 resistência. Na Biblioteca Central (BC), área de uso comum na Universidade por sua  
10 comunidade interna, não se utiliza ou se aplica de forma institucional piretroide para  
11 controle de mosquitos, já que a Universidade mantém um programa de  
12 acompanhamento contínuo e interdisciplinar com foco no monitoramento do vetor  
13 (GT Aedes UEL – portaria 1302/2016). Sendo assim, é possível sugerir que possa  
14 estar ocorrendo a entrada desse composto sintético nessa localidade de alguma  
15 outra forma externa.

16 No presente trabalho também fica nítido que mesmo em local de  
17 monitoramento contínuo com ovitrampas e realização de outras ações educacionais  
18 de forma constante, o *Ae. aegypti* está presente. Suas populações tendem a ser  
19 estruturadas e distintas geneticamente com baixo fluxo gênico. Assim como o  $Na_v$ , o  
20 gene ND4 pode estar sofrendo influências de produtos sintéticos, dado que essas  
21 medidas químicas utilizadas em programas de controle de *Ae. aegypti* afetam a  
22 diversidade genética das populações do mosquito [18].

23 Sendo assim, o monitoramento do vetor, sua variabilidade genética e  
24 mutações relacionadas a resistência devem ser levados em consideração mesmo  
25 em pequenas áreas. Isso porque, as populações podem ter respostas diferentes  
26 quando ocorrem as ações de controle por piretroides, elevando-se assim a  
27 complexidade de um controle efetivo. Ações integradas como as realizadas no  
28 presente estudo devem ser levadas em consideração junto aos planos de  
29 monitoramento e controle de *Ae. aegypti* para uma eficiência de redução do vetor,  
30 reduzindo também a circulação viral.

## Agradecimentos

Os autores são gratos a Universidade Estadual de Londrina (UEL), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Departamento de Biologia Geral, por disponibilizar toda estrutura laboratorial para realização desse trabalho. A CAPES pelo suporte financeiro e a Secretaria Municipal de Saúde de Londrina, por permitir a coleta dos espécimes.

## Referências

1. Forattini, O-P, Brito, M-D. Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. *Revista de Saúde Pública*, 2003;37:676-677.
2. Getachew D, Tekie H, Gebre-Michael T, Balkew M, Mesfin A. Breeding Sites of *Aedes aegypti*: Potential Dengue Vectors in Dire Dawa, East Ethiopia. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2015;2015:1-8.
3. Horta, M-A-P, Ferreira, A-P, de Oliveira, R-B, Wermelinger, E-D, Ker, F-T-D-O, Ferreira, A-C-N, Catita, C-M-S. The effects of urban growth on dengue. *Braz J Health Promot*. 2013;26(4):534-542.
4. Varejão J, Santos C, Rezende H, Bevilacqua L, Falqueto A. *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) breeding sites in native bromeliads in Vitória City, ES. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(3):238-240.
5. Oliveira V, Almeida Neto L. Ocorrência de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em bromélias cultivadas no Jardim Botânico Municipal de Bauru, São Paulo, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2017;33(1).
6. Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations: Interim guidance for entomologists. [Internet]. *Apps.who.int*. 2016 [Accessed 22 January 2019]. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204588/WHO\\_ZIKV\\_VC\\_11.1\\_eng.pdf?sequence=2](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204588/WHO_ZIKV_VC_11.1_eng.pdf?sequence=2)
7. Dengue and severe dengue. [Internet]. *Who.int*. 2018 [Accessed 23 January 2019]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
8. Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti*—LIRAA—para Vigilância Entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil. Metodologia para Avaliação dos Índices de Breteau e Predial e Tipo de Recipientes. [Internet] Ministério da Saúde. 2013 [Accessed 20 January 2019] Available from: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=dengue-964&alias=1460-levantamento-rapido-indices-para-aedes-aegypti-liraa-2a-edicao-0&Itemid=965](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-964&alias=1460-levantamento-rapido-indices-para-aedes-aegypti-liraa-2a-edicao-0&Itemid=965)
9. Braga, I, Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde* 16 (4): 279-293.

10. Montella I, Viana-Medeiros P, Martins A, Braga I, Lima J, Valle D. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(3):467-477.
11. Martins A, Lima J, Peixoto A, Valle D. Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Trop Med Int Health.* 2009;14(11):1351-1355.
12. Aponte A, Penilla R, Rodríguez A, Ocampo C. Mechanisms of pyrethroid resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* from Colombia. *Acta Trop.* 2019;191:146-154.
13. Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pest Biochem Physiol.* 2012;104(2):126-131.
14. Lima J, da Silva Soares S, Valle D, Ramos R, Ribeiro Galardo A, da-Cunha M et al. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(3):329-333.
15. Da-Cunha M, Lima J, Brogdon W, Moya G, Valle D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(4):441-444.
16. Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores A, Fernandez-Salas I et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 2007;16(6):785-798.
17. Hiragi, C, Simões, K, Martins, E, Queiroz, P, Lima, L, Monnerat, R. Genetic variability in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) populations using RAPD markers. *Neotrop Entomol,* 2009;38(4), 542-547.
18. Urdaneta-Marquez L, Failloux A. Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infect Genet Evol.* 2011;11(2):253-261.
19. Bona A, Piccoli C, Leandro A, Kafka R, Twerdochilib A, Navarro-Silva M. Genetic profile and molecular resistance of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) in Foz do Iguaçu (Brazil), at the border with Argentina and Paraguay. *Zoologia (Curitiba).* 2012;29(6):540-548.
20. Calvez, E, Guillaumot, L, Millet, L, Marie, J, Bossin, H, Rama, V, ..., Dupont-Rouzeyrol, M. Genetic diversity and phylogeny of *Aedes aegypti*, the main arbovirus vector in the Pacific. *PLoS Negl Trop Dis,* 2016;10(1), e0004374.
21. Paupy C, Le Goff G, Brengues C, Guerra M, Revollo J, Barja Simon Z et al. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and

- yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infect Genet Evol.* 2012;12(6):1260-1269.
22. Twerdochlib A, Bonna A, Leite S, Chitolina R, Westphal B, Navarro-Silva M. Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial ND4 gene. *Rev Bras etomol.* 2012;56(2):249-256.
  23. Depoli, P, Zequi, J, Nascimento, K, Lopes, J. Eficácia de Ovitrapas com Diferentes Atrativos na Vigilância e Controle de *Aedes*. *EntomoBrasilis*, 2016;9(1), 51-55.
  24. Oliveira, A-A, Santos, F-P, Lopes, J, Zequi, J-A-C. Monitoramento e controle de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1984) com uso de ovitrapas. *Seminário Ciências Biológicas e da Saúde*. 2018.
  25. Gomes A. Medidas dos níveis de infestação urbana para *aedes (stegomyia) aegypti* e *aedes (stegomyia) albopictus* em Programa de Vigilância Entomológica. *Informe Epidemiológico do Sus*. 1998;7(3):49-57.
  26. Consoli R, Oliveira R. *Main mosquitos of sanitary importance in Brazil*. Rio de Janeiro, RJ: Editora FIOCRUZ; 1994.
  27. Forattini, O-P. Evaluation of Toxicity of Phenolic Compounds Using *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Artemia salina*. *Culicidologia médica*. 2002;2:864.
  28. WRBU: SOUTHCOM Medically Important Arthropods Keys [Internet]. *Wrbu.org*. 2018 [Accessed 23 July 2018]. Available from: [http://www.wrbu.org/aors/southcom\\_Keys.html](http://www.wrbu.org/aors/southcom_Keys.html)
  29. Aguirre-Obando O, Bona A, Duque L. J, Navarro-Silva M. Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Zoologia (Curitiba)*. 2015;32(1):14-22.
  30. Costa-da-Silva A, Capurro M, Bracco J. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(6):539-544.
  31. Hall, T. *Bioedit v 7.0.5*. Ibis Therapeutics, a division of Isis Pharmaceuticals, Carlsbad; 2005.
  32. Thompson J, Higgins D, Gibson T. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(22):4673-4680.
  33. Bandelt H, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 1999;16(1):37-48.
  34. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio J, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins S et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of

- Large Data Sets. *Mol Biol Evol.* 2017;34(12):3299-3302.
35. Excoffier L, Lischer H. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10(3):564-567.
  36. Harris A, Ranson H, Rajatileka S. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(2):277-284.
  37. Honório N, Silva W, Leite P, Gonçalves J, Lounibos L, Lourenço-de-Oliveira R. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(2):191-198.
  38. Saavedra-Rodriguez K, Maloof F, Campbell C, Garcia-Rejon J, Lenhart A, Penilla P et al. Parallel evolution of vgsc mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. *Sci Rep.* 2018;8(1).
  39. Martins, A, Valle, D. [Internet] The pyrethroid knockdown resistance. In *Insecticides-Basic and Other Applications* [Accessed 19 January 2019] Available from: [http://cdn.intechopen.com/pdfs/27797/InTech-The\\_pyrethroid\\_knockdown\\_resistance.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/27797/InTech-The_pyrethroid_knockdown_resistance.pdf)
  40. Silva W, Soares-da-Silva J, Ferreira F, Rodrigues I, Tadei W, Zequi J. Oviposition of *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 and *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) under laboratory and field conditions using ovitraps associated to different control agents, Manaus, Amazonas, Brazil. *Rev Bras Entomol.* 2018;62(4):304-310.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise das diferentes populações de *Aedes aegypti* da cidade de Londrina permitiram concluir que:

- ❖ Em relação ao gene ND4, um elevado número de haplótipos foi encontrado e as populações avaliadas estão geneticamente estruturadas e com um baixo fluxo gênico;
- ❖ As mutações Val1016Ile e Phe1534Cys estão presentes na cidade de Londrina, demonstrando que a aplicação do inseticida piretroide pode não apresentar o resultado esperado no município;
- ❖ As frequências dos alelos que conferem resistência são elevadas, demonstrando a necessidade de uma avaliação de outras possíveis mutações na cidade e de uso de estratégias alternativas de controle do mosquito adulto;
- ❖ O genótipo heterozigoto é muito evidente nas populações avaliadas e torna os resultados preocupantes, pois esses alelos de resistência podem ser transferidos para as próximas gerações do mosquito e atingir a fixação;
- ❖ A Universidade Estadual de Londrina apresentou um elevado índice de ovos do mosquito no período avaliado, demonstrando que mesmo em um ambiente monitorado, o *Ae. aegypti* está presente e apresenta risco alto de infestação;
- ❖ A cidade de Londrina, uma cidade com alto grau de urbanização e com elevada densidade demográfica e condições climáticas propícias para o desenvolvimento do mosquito, necessita de um monitoramento genético aliado ao LIRAA e campanhas de conscientização da população.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre-Obando, O. A., Bona, A. C. D., Duque, L., Jonny, E., & Navarro-Silva, M. A. (2015). Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) from Colombia. **Zoologia** (Curitiba), 32(1), 14-22.
- Araújo, H., Carvalho, D., Ioshino, R., Costa-da-Silva, A., & Capurro, M. (2015). *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. **Insects**, 6(2), 576-594.
- Aponte, A., Penilla, R. P., Rodríguez, A. D., & Ocampo, C. B. (2019). Mechanisms of pyrethroid resistance in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* from Colombia. **Acta tropica**, 191, 146-154.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular biology and evolution**, 16(1), 37-48.
- Barrera, R., Navarro, J. C., Rodríguez, M., Domingo, J., Domínguez, D., & González García, J. E. (1995). **Public service deficiencies and *Aedes aegypti* breeding sites in Venezuela.**
- Barcellos, C., Xavier, D. R., Pavão, A. L., Boccolini, C. S., Pina, M. F., Pedroso, M., ... & Romão, A. R. (2016). Increased hospitalizations for neuropathies as indicators of Zika virus infection, according to Health Information System Data, Brazil. **Emerging infectious diseases**, 22(11), 1894.
- Bona, A. C. D., Piccoli, C. F., Leandro, A. D. S., Kafka, R., Twerdochilib, A. L., & Navarro-Silva, M. A. (2012). Genetic profile and molecular resistance of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) in Foz do Iguaçu (Brazil), at the border with Argentina and Paraguay. **Zoologia** (Curitiba), 29(6), 540-548.
- Bracco, J. E., Capurro, M. L., Lourenço-de-Oliveira, R., & Sallum, M. A. M. (2007). Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102(5), 573-580.
- Braga, I. A., Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde** 16 (4): 279-293.
- Calvez, E., Guillaumot, L., Millet, L., Marie, J., Bossin, H., Rama, V., ... & Dupont-Rouzeyrol, M. (2016). Genetic diversity and phylogeny of *Aedes aegypti*, the main arbovirus vector in the Pacific. **PLoS neglected tropical diseases**, 10(1), e0004374.
- Carteaux, G., Maquart, M., Bedet, A., Contou, D., Brugières, P., Fourati, S., ... & Mekontso, D. A. (2016). Zika virus associated with meningoencephalitis. **The New England journal of medicine**, 374(16), 1595.
- Carvalho, D. O., Costa-da-Silva, A. L., Lees, R. S., & Capurro, M. L. (2014). Two step male release strategy using transgenic mosquito lines to control transmission of

vector-borne diseases. **Acta tropica**, 132, S170-S177.

Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. **Annual review of cell and developmental biology**, 16(1), 521-555.

Chadee, D. D., Corbet, P. S. (1993). The gonotrophic status and diel pattern of entry to outdoor oviposition sites of female *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology** 87.3:263-268.

Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D., ... & Failloux, A. B. (2016). Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika virus. **PLoS neglected tropical diseases**, 10(3), e0004543.

Christophers, S. (1960). *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. *Aedes aegypti* (L.) the Yellow Fever Mosquito: its Life History, **Bionomics and Structure**.

Consoli, R. A. G. B. & Lourenço-de-Oliveira, R. (1994). **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 228p.

Carvalho, D. O., Costa-da-Silva, A. L., Lees, R. S., & Capurro, M. L. (2014). Two step male release strategy using transgenic mosquito lines to control transmission of vector-borne diseases. **Acta tropica**, 132, S170-S177.

Carvalho, D. O., McKemey, A. R., Garziera, L., Lacroix, R., Donnelly, C. A., Alphey, L., ... & Capurro, M. L. (2015). Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. **PLoS neglected tropical diseases**, 9(7), e0003864.

Costa-da-Silva, A. L. D., Capurro, M. L., & Bracco, J. E. (2005). Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100(6), 539-544.

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.

Davies, T. G. M., O'Reilly, A. O., Field, L. M., Wallace, B. A., Williamson, M. S. (2008). Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modeling. **Pes. Management Science**. 64: 1126-1130.

De Azambuja Garcia, G., Sylvestre, G., Aguiar, R., da Costa, G. B., Martins, A. J., Lima, J. B. P., ... & Hoffmann, A. A. (2019). Matching the genetics of released and local *Aedes aegypti* populations is critical to assure *Wolbachia* invasion. **PLoS neglected tropical diseases**, 13(1), e0007023.

Depoli, P. A. C., Zequi, J. A. C., Nascimento, K. L. C., & Lopes, J. 2016. Eficácia de Ovitrapas com Diferentes Atrativos na Vigilância e Controle de *Aedes*.

**EntomoBrasilis**, 9(1), 51-55.

Díaz-Menéndez, M., Crespillo-Andújar, C. (2017). The Epidemiology. In **Zika Virus Infection** (pp. 3-11). Springer, Cham.

Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., ... & Zhorov, B. S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. **Insect biochemistry and molecular biology**, 50, 1-17.

Eritja, R., Escosa, R., Lucientes, J., Marques, E., Roiz, D., & Ruiz, S. (2005). Worldwide invasion of vector mosquitoes: present European distribution and challenges for Spain. **Biological invasions**, 7(1), 87.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, 10(3), 564-567.

Farnesi L. C., Martins A. J., Valle D., Rezende G.L. 2009. Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. **Mem. Inst Oswaldo Cruz**, 104: 124-126.

Ferdousi, F., Yoshimatsu, S., Ma, E., Sohel, N., & Wagatsuma, Y. (2015). Identification of essential containers for *Aedes* larval breeding to control dengue in Dhaka, Bangladesh. **Tropical medicine and health**, 43(4), 253-264.

Forattini, O. P. (2002) Evaluation of Toxicity of Phenolic Compounds Using *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Artemia salina*. **Culicidologia médica**. São Paulo: Edusp; 2:864.

Forattini, O. P., & Brito, M. D. (2003). Reservatórios domiciliares de água e controle do *Aedes aegypti*. **Revista de Saúde Pública**, 37, 676-677.

Getachew, D., Tekie, H., Gebre-Michael, T., Balkew, M., & Mesfin, A. (2015). Breeding sites of *Aedes aegypti*: potential dengue vectors in Dire Dawa, East Ethiopia. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, 2015.

Gomes, A. C. (1998). Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* e *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* em programas de Vigilância Entomológica. **Informe Epidemiológico do Sistema Único de Saúde**, 7: 49-57.

Hall, T. (2005). Bioedit v 7.0. 5. **Ibis Therapeutics, a division of Isis Pharmaceuticals**, Carlsbad.

Harris, A. F., Rajatileka, S., & Ranson, H. 2010. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 83(2), 277-284.

Herrera, F., Urdaneta, L., Rivero, J., Zoghbi, N., Ruiz, J., Carrasquel, G., ... & Rubio-Palis, Y. (2006). Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 101(6), 625-633.

- Hiragi, C., Simões, K., Martins, E., Queiroz, P., Lima, L., & Monnerat, R. (2009). Variabilidade genética em populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) utilizando marcadores de RAPD. **Neotropical Entomology**, 38(4), 542-547.
- Honório, N. A., Silva, W. D. C., Leite, P. J., Gonçalves, J. M., Lounibos, L. P., & Lourenço-de-Oliveira, R. (2003). Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 98(2), 191-198.
- Horta, M. A. P., Ferreira, A. P., de Oliveira, R. B., Wermelinger, E. D., Ker, F. T. D. O., Ferreira, A. C. N., & Catita, C. M. S. (2013). The effects of urban growth on dengue. **Brazilian Journal in Health Promotion**, 26(4), 534-542.
- Kuno, G. (1997). Factors influencing the transmission of dengue viruses. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**, 1, 23-39.
- Lima J. B. P., da-Cunha M. P., Da Silva R. C., et al. (2003) Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 68, 329–333.
- Lima, E. P., Paiva, M. H. S., de Araújo, A. P., da Silva, É. V. G., da Silva, U. M., de Oliveira, L. N., ... & Wilding, C. S. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. **Parasites & vectors**, 4(1), 5.
- Lima Júnior, R. S., & Scarpassa, V. M. (2009). Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. **Genetics and Molecular Biology**, 32(2), 414-422.
- Linss, J. G. B., Brito, L. P., Garcia, G. A., Araki, A. S., Bruno, R. V., Lima, J. B. P., ... & Martins, A. J. (2014). Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. **Parasites & vectors**, 7(1), 25.
- Lopes, N., Nozawa, C., & Linhares, R. E. C. (2014). General features and epidemiology of emerging arboviruses in Brazil/Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, 55-64.
- Martins, A. J., Belinato, T. A., Lima, J. B. P., & Valle, D. (2008). Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. **Pest management science**, 64(6), 676-680.
- Martins, A. J., Lima, J. B. P., Peixoto, A. A., & Valle, D. (2009). Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. **Tropical Medicine & International Health**, 14(11), 1351-1355.
- Martins, A. J., & Valle, D. (2012). The pyrethroid knockdown resistance. In **Insecticides-Basic and Other Applications**. InTech.

McMeniman, C. J., Lane, R. V., Cass, B. N., Fong, A. W., Sidhu, M., Wang, Y. F., & O'Neill, S. L. (2009). Stable introduction of a life-shortening Wolbachia infection into the mosquito *Aedes aegypti*. **Science**, 323(5910), 141-144.

Ministério da Saúde. (2013). **Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti*—LIRAA—para Vigilância Entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil. Metodologia para Avaliação dos Índices de Breteau e Predial e Tipo de Recipientes**. Disponível em:

<[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=dengue-964&alias=1460-levantamento-rapido-indices-para-aedes-aegypti-liraa-2a-edicao-0&Itemid=965](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-964&alias=1460-levantamento-rapido-indices-para-aedes-aegypti-liraa-2a-edicao-0&Itemid=965)>

Acesso em: 20 jan. 2019

Ministério da Saúde. (2018). **Boletim epidemiológico Vol.52**. Brasília, 2018.

Disponível em: <

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf>>.

Ministério da Saúde. (2018). **Chikungunya**. Disponível em:

<<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/chikungunya>>. Acesso em: 18 ago. 2018

Ministério da Saúde. (2018). **Dengue**. Disponível em:

<<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/dengue>>. Acesso em: 18 ago. 2018

Ministério da Saúde. (2018). **Zika Vírus**. Disponível em:

<<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus>>. Acesso em: 18 ago. 2018

Montella, I. R., Martins, A. J., Viana-Medeiros, P. F., Lima, J. B. P., Braga, I. A., & Valle, D. (2007). Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 77(3), 467-477.

Natal, D. (2002). Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, 64(2), 205-207.

Oliveira, V. C. D., & Almeida Neto, L. C. D. (2017). *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in bromeliads grown in the Bauru Municipal Botanical Gardens, São Paulo, Brazil. **Cadernos de saúde pública**, 33(1).

Oliveira, A. A., Santos, F. P., Lopes, J., Zequi, J. A. C. (2018). Monitoramento e controle de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1984) com uso de ovitrampas. **Semina**.

Paupy, C., Le Goff, G., Brengues, C., Guerra, M., Revollo, J., Simon, Z. B., ... & Fontenille, D. (2012). Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(6), 1260-1269.

Pereira, Á. I. S., Pereira, A. D. G. S., Sobrinho, L., Palma, O., Cantanhede, E. D. K. P., & Siqueira, L. F. S. (2014). Atividade antimicrobiana no combate às larvas do

mosquito *Aedes aegypti*: homogeneização dos óleos essenciais do linalol e eugenol. *Educación química*, 25(4), 446-449.

Pereira, T. N., Rocha, M. N., Sucupira, P. H. F., Carvalho, F. D., & Moreira, L. A. (2018). *Wolbachia* significantly impacts the vector competence of *Aedes aegypti* for Mayaro virus. **Scientific reports**, 8(1), 6889.

Pinheiro, V. C. S., Tadei, W. P. (2002). Frequency, diversity, and productivity study on the *Aedes aegypti* most preferred containers in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 44(5), 245-250.

Rezende, G. L., Martins, A. J., Gentile, C., Farnesi, L. C., Pelajo-Machado, M., Peixoto, A. A., & Valle, D. (2008). Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. **BMC developmental biology**, 8(1), 82.

Rinkevich, F. D., Du, Y., & Dong, K. (2013). Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. **Pesticide biochemistry and physiology**, 106(3), 93-100.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. **Molecular biology and evolution**, 34(12), 3299-3302.

Saavedra-Rodriguez, K., Urdaneta-Marquez, L., Rajatileka, S., Moulton, M., Flores, A. E., Fernandez-Salas, I., & Ranson, H. (2007). A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. **Insect molecular biology**, 16(6), 785-798.

Saavedra-Rodriguez, K., Maloof, F. V., Campbell, C. L., Garcia-Rejon, J., Lenhart, A., Penilla, P., ... & Lozano, S. (2018). Parallel evolution of *vgsc* mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. **Scientific reports**, 8.

Santos, S. R., Silva, V. B., Melo, M. A., Barbosa, J. D., Santos, R. L., de Sousa, D. P., & Cavalcanti, S. C. (2010). Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 10(10), 1049-1054.

Santos, S. R., Melo, M. A., Cardoso, A. V., Santos, R. L., de Sousa, D. P., & Cavalcanti, S. C. (2011). Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**, 84(1), 150-153.

Silva, W. R. D., Soares-da-Silva, J., Ferreira, F. A. D. S., Rodrigues, I. B., Tadei, W. P., & Zequi, J. A. C. (2018). Oviposition of *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 and *Aedes albopictus* Skuse, 1894 (Diptera: Culicidae) under laboratory and field conditions using ovitraps associated to different control agents, Manaus, Amazonas, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, 62(4), 304-310.

Thompson, J. D., Higgins, D., & Gibson, T. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 11: 4673-4680.

Twerdochlib, A. L., Bonna, A. C. D., Leite, S. S., Chitolina, R. F., Westphal, B., & Navarro-Silva, M. A. (2012). Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial ND4 gene. **Revista Brasileira de Entomologia**, 56(2), 249-256.

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.

Vais, H., Atkinson, S., Eldursi, N., Devonshire, A. L., Williamson, M. S., & Usherwood, P. N. R. (2000). A single amino acid change makes a rat neuronal sodium channel highly sensitive to pyrethroid insecticides. **FEBS letters**, 470(2), 135-138.

Varejão, J. B. M., Santos, C. B. D., Rezende, H. R., Bevilacqua, L. C., & Falqueto, A. (2005). *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) breeding sites in native bromeliads in Vitória City, ES. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 38(3), 238-240.

Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., Della Torre, A., & Ranson, H. (2012). Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 104(2), 126-131.

Walker, K. R., Williamson, D., Carrière, Y., Reyes-Castro, P. A., Haenchen, S., Hayden, M. H., ... & Ernst, K. C. (2018). Socioeconomic and Human Behavioral Factors Associated With *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Immature Habitat in Tucson, AZ. **Journal of medical entomology**.

Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU). (2018). **Southcom Arthropod Identification Key**. Suitland, Estados Unidos. Disponível em: <[http://www.wrbu.org/aors/southcom\\_Keys.html](http://www.wrbu.org/aors/southcom_Keys.html)>. Acesso em: 23 jul. 2018

Weaver, S. C., Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. **Antiviral research**, 85(2), 328-345.

World Health Organization (WHO). (2018). **Chikungunya**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>>. Acesso em: 07 jul. 2018

World Health Organization (WHO). (2013). **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Disponível em: <[http://appswho.int/iris/bitstream/10665/77950/1/9789241564540\\_eng.pdf](http://appswho.int/iris/bitstream/10665/77950/1/9789241564540_eng.pdf)> Acesso em: 08 jan. 2018

World Health Organization (WHO). (2018). **Dengue and Severe Dengue**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and>>

severe-dengue>. Acesso em: 07 jul. 2018

World Health Organization (WHO). (2018). **Vector-borne diseases**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>>. Acesso em: 07 jul. 2018

World Health Organization (WHO). (2018). **Zika vírus disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/emergencies/diseases/zika/en/>>. Acesso em: 07 jul. 2018

Yeap, H. L., Mee, P., Walker, T., Weeks, A. R., O'Neill, S. L., Johnson, P., ... & Hoffmann, A. A. (2011). Dynamics of the “popcorn” Wolbachia infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control. **Genetics**, 187(2), 583-595.

Zara, A. L. D. S. A., Santos, S. M. D., Fernandes-Oliveira, E. S., Carvalho, R. G., & Coelho, G. E. (2016). *Aedes aegypti* control strategies: a review. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 25(2), 391-404.