



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TAFAREL RIBEIRO AMARO

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL COMPARATIVA ENTRE *Aedes*
(*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) RESISTENTES E
SUSCETÍVEIS AO MALATION**



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



IDR-Paraná

Instituto de Desenvolvimento
Rural do Paraná - IAPAR-EMATER



TAFAREL RIBEIRO AMARO

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL COMPARATIVA ENTRE
Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762)
RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO MALATION**

TAFAREL RIBEIRO AMARO

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL COMPARATIVA ENTRE *Aedes*
(*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) RESISTENTES E
SUSCETÍVEIS AO MALATION**

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

Orientador: Prof. Dra. Renata da Rosa

Londrina
2022

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

T124 Amaro, Tafarel Ribeiro.

Análise Transcricional comparativa entre *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) Resistentes e Suscetíveis ao Malation / Tafarel Ribeiro Amaro. - Londrina, 2022.

47 f. : il.

Orientador: Renata da Rosa.

Coorientador: Rogério Fernandes de Souza.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2022.

Inclui bibliografia.

1. *Aedes aegypti* - Tese. 2. RNA-seq - Tese. 3. Resistência - Tese. 4. Organofosforados - Tese. I. da Rosa, Renata. II. Fernandes de Souza, Rogério. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 575.1

TAFAREL RIBEIRO AMARO

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL COMPARATIVA ENTRE *Aedes*
(*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) RESISTENTES E
SUSCETÍVEIS AO MALATION**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Renata da Rosa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Mario Antônio Navarro Silvia
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Dra. Jaqueline Fernanda Dionisio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 18 de março de 2022.

AMARO, Tafarel Ribeiro. **Análise Transcricional comparativa entre *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) Resistentes e Suscetíveis ao Malation** 2022. 36 f. 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, Londrina.

RESUMO

Considerada uma doença viral emergente, a dengue hoje é endêmica em mais de 100 países, tornando-se um problema de saúde pública devido a fácil proliferação do vírus transmitido pela picada do mosquito *Aedes spp*. Para evitar a infestação do mosquito vetor e a circulação do vírus, o uso de inseticidas do grupo dos organofosforados tornou-se bastante comum. O uso intensivo destes compostos químicos, pode selecionar indivíduos resistentes em uma população de vetores, eliminando insetos suscetíveis reduzindo a variabilidade genética. Com o monitoramento e estudo dessas populações resistentes, fica mais fácil direcionar campanhas de controle do inseto. Sendo assim, a partir do sequenciamento de RNA (RNA-seq) foi realizado um estudo comparativo da expressão gênica em populações de *Aedes aegypti* resistentes e suscetíveis ao inseticida malation (organofosforado). O sequenciamento das 6 bibliotecas de cDNA, 3 suscetíveis e 3 resistentes, resultou em um total de 149.079.613 reads paired-end que após a limpeza caiu para 86.290.453 reads. A estratégia utilizada neste trabalho foi a montagem *de novo* e com ela foi possível fazer a análise de expressão diferencial, onde foram identificados 6971 transcritos diferencialmente expressos, sendo 3.649 *down* regulados e 3.322 *up* regulados no grupo Resistente comparado ao Suscetível. Após a anotação funcional foi possível caracterizar transcritos relacionados a cutícula (proteína ecdysona E93), olfação (proteínas ligadoras de odores – OBPs) e detoxificação (citocromo P450). Diante disso nossos dados corroboram para o entendimento do processo de resistência ao Malation em *Aedes spp*, mostrando que esse evento é resultado da atuação de diversos mecanismos, e que estudos como esse, abordando a expressão diferencial são fundamentais para a otimização de novas estratégias, na busca de um controle mais eficiente desses insetos.

Palavras-chave: transcriptoma; resistência; malation; citocromo P450.

AMARO, Tafarel Ribeiro. **Análise Transcricional comparativa entre *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) Resistentes e Suscetíveis ao Malation** 2022. 36 p. 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, Londrina.

ABSTRACT

Considered an emerging viral disease, dengue is now endemic in more than 100 countries, becoming a public health problem due to the easy proliferation of the virus transmitted by the bite of the *Aedes spp* mosquito. To avoid the infestation of the mosquito vector and the circulation of the virus, the use of insecticides from the group of organophosphates has become quite common. The intensive use of these chemical compounds can select resistant individuals in a population of vectors, eliminating susceptible insects and reducing genetic variability. With the monitoring and study of these resistant populations, it becomes easier to direct insect control campaigns. Therefore, from RNA sequencing (RNA-seq) a comparative study of gene expression in populations of *Aedes aegypti* resistant and susceptible to malathion (organophosphate) insecticide was carried out. The sequencing of the 6 cDNA libraries, 3 susceptible and 3 resistant, resulted in a total of 149,079,613 *paired-end reads*, which after cleaning dropped to 86,290,453 *reads*. The strategy used in this work was the de novo assembly and with it it was possible to perform the differential expression analysis, where 6971 differentially expressed transcripts were identified, 3,649 down-regulated and 3,322 up-regulated in the Resistant compared to the Susceptible group. After functional annotation, it was possible to characterize transcripts related to cuticle (ecdysone E93 protein), olfaction (odor binding proteins - OBPs) and detoxification (cytochrome P450). Therefore, our data corroborate the understanding of the Malathion resistance process in *Aedes spp*, showing that this event is the result of the action of several mechanisms, and that studies such as this one, addressing the differential expression, are fundamental for the optimization of new strategies, in the search for a more efficient control of these insects.

Key words: transcriptome; resistance; malathion; cytochrome P450.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferenças morfológicas entre machos (A) e fêmeas (B) do mosquito *Aedes aegypti*10

Capítulo

Figura 1 – Espécies que apresentaram maior quantidade de sequências similares as do transcriptoma de *Aedes aegypti*32

Figura 2 – Distribuição dos transcritos de *Aedes aegypti* categorizados no Gene Ontology (GO) para Processo Biológico.....33

Figura 3 – Distribuição dos transcritos de *Aedes aegypti* categorizados no Gene Ontology (GO) para Funções moleculares33

Figura 4 – Distribuição dos transcritos de *Aedes aegypti* categorizados no Gene Ontology (GO) para Componentes Celulares34

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1	<i>Aedes (Stegomyia) Aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	1
1.2	DENGUE	3
1.3	MALATION	4
1.4	RESISTÊNCIA	6
1.5	SEQUENCIAMENTO DE RNA (RNA-SEQ).....	7
2	OBJETIVOS	8
2.1	OBJETIVO GERAL	8
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
3	REFERÊNCIAS	9

CAPÍTULO: EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM *Aedes Aegypti* RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO INSETICIDA MALATION

RESUMO.....	17
INTRODUÇÃO	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS	21
DISCUSSÃO	24
REFERÊNCIAS	30
CONCLUSÃO GERAL	36

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

3 *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)
4 (Hutchings; Sallum; Hutchings, 2021), é uma espécie taxonomicamente classificada
5 na ordem Diptera e pertencente a família Culicidae. Dentro do gênero *Aedes* são
6 compreendidas mais de 900 espécies, distribuídas em 44 subgêneros dos quais
7 apenas nove foram registrados nas Américas (Martins Júnior, 2009). A espécie é
8 pertencente ao subgênero *Stegomyia*, caracterizados por serem afrotropicais,
9 paleárticos e orientais. Com o desenvolvimento dos sistemas de transporte humano,
10 sua existência na fauna culicídica neotropical tornou-se passiva (Forattini, 2002). É
11 uma espécie sinantrópica de hábito diurno, estando mais ativa ao amanhecer e ao
12 anoitecer; devido ao seu alto grau de endofilia e antropofilia, é considerado um
13 mosquito agressivo e oportunista (Fiocruz, 2020).

14 Suspeita-se que essa espécie tenha sido introduzida no Brasil
15 durante o período colonial, devido ao tráfico de escravos, entre os séculos XVI e XIX
16 (Valle; Pimenta; Cunha, 2015). Com a destruição de habitats naturais, algumas
17 populações silvestres passaram por um processo de seleção, tornando sua
18 disseminação e sobrevivência mais propícia em assentamentos humanos (Powell et
19 al, 2018). Os mosquitos possuem forte adaptabilidade e estão amplamente
20 disseminados devido à sua capacidade de realizar atividades no mesmo ambiente e
21 tempo que os humanos (Natal, 2002).

22 Caracterizados como holometábolos, sofrendo metamorfose
23 completa seu ciclo de vida apresenta quatro estágios, sendo eles: ovos, larvas, pupa
24 e adultos. Após a eclosão dos ovos, as larvas passam por uma média de três mudas
25 até se tornarem pupas. Nestes estágios, eles passam por uma fase aquática e
26 posteriormente por uma fase terrestre, à medida que os adultos têm asas. Na fase
27 adulta tanto machos quanto fêmeas, se alimentam de açúcares de plantas, porém,
28 as fêmeas em particular necessitam de uma alimentação sanguínea rica em
29 proteínas que favorece o desenvolvimento completo dos ovários e a maturação dos
30 ovos (Harrington; Edman; Scott, 2001). Devido a essa alimentação preferencial de
31 sangue humano, as fêmeas foram favorecidas aumentando assim seu valor
32 adaptativo positivamente, tanto em questões reprodutivas quanto em questão de
33 sobrevivência (Harrington; Edman; Scott, 2001).

34 Morfologicamente os mosquitos da espécie *A. aegypti* apresentam

35 algumas características marcantes, entre elas a extremidade do abdômen afilada e
36 pontiaguda, onde a última parte se sobrepõe, exibindo cerdas (Consoli & Lourenço-
37 de-Oliveira, 1994). Na fase adulta são escuros, apresentando faixas pretas e
38 brancas nas pernas dando-lhes um aspecto listrado, podendo ser identificados pelo
39 padrão de escamas branco-prateadas no escudo torácico em forma de lira (Valle;
40 Pimenta; Cunha, 2015). Características morfológicas marcantes como antenas
41 franjadas e plumosas, é o que diferem os adultos machos das fêmeas, poderíamos
42 ainda acrescentar o comprimento dos palpos que são tão longos quanto a
43 probóscide nos machos e curta nas fêmeas. **(FIGURA 1)**.

44



45

46

Figura1. Diferenças morfológicas entre machos (A) e fêmeas (B) de mosquitos *Aedes aegypti*.

47

Fonte: Fiocruz

48

49

50

51

52

53

54

Vários culicídeos são responsáveis pela disseminação de doenças para os seres humanos, entretanto, *A. egypti* destaca-se como vetor potencial de diversos arbovírus e outros patógenos de saúde pública, tais como Dengue, Febre Amarela, Zika Vírus e a Chikungunya. Anualmente são estimadas cerca de 390 milhões de infecções pelo vírus da dengue, levando a morte de uma pessoa a cada 12 minutos. Cerca de 4 milhões de pessoas distribuídas em 128 países possuem

55 risco de serem infectadas (World Health Organization, 2021). No ano de 2020 foram
56 registrados 931.903 casos de dengue no Brasil, sendo a maioria no Centro Oeste,
57 seguida pela região Sul com maiores índices no Paraná (Ministério da Saúde, 2020).

58

59 **1.2 Dengue**

60 De acordo com Lopes et al. (2014), arbovíroses são doenças virais
61 causadas pelos chamados arbovírus, que compreende todos os vírus disseminados
62 por artrópodes (preferencialmente insetos e aracnídeos) no momento do repasto
63 sanguíneo. Dentre eles, pode-se citar o vírus da dengue, zika, febre amarela e o
64 chikungunya. A dengue é uma doença infecciosa causada por arbovírus do gênero
65 Flavivirus e família Flaviviridae. São reconhecidos para a mesma quatro sorotipos
66 distintos, sendo eles: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (OMS, 2009). O vírus é
67 transmitido através da picada do mosquito infectado *Aedes* (*Stegomyia*), sendo ele o
68 principal portador de importância epidemiológica na transmissão da doença,
69 considerada endêmica em mais de 100 países. Aproximadamente 500.000 pessoas
70 sofrem de dengue grave a cada ano e precisam de hospitalização, das quais
71 aproximadamente 2,5% morrem (OMS, 2019).

72 A transmissão dessas arbovíroses pode ocorrer ao homem por meio
73 das duas espécies dos mosquitos, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. O *Aedes*
74 *aegypti* é considerado o mais importante portador do DENV, enquanto o *Aedes*
75 *albopictus* é considerado o mais fraco, levando a epidemias mais brandas (Ebi;
76 Nealon, 2016). O aumento da densidade populacional em vários países a rápida
77 urbanização e a ineficácia dos programas de controle de vetores levaram ao
78 aumento da incidência da dengue em diversas regiões (Martina, 2014).

79 A dengue é citada no Brasil desde 1846 (Teixeira & Barreto, 1996).
80 Como resultado de uma campanha nacional de organização militar, o Brasil acabou
81 com a disseminação dessa doença infecciosa na década de 1950. Em 1976, devido
82 à uma epidemia descontrolada, todos os Estados Brasileiros foram atingidos,
83 gerando agravações em pelo menos 3.794 municípios (Consoli & Lourenço-de-
84 Oliveira, 1994; Teixeira & Barreto, 1996; Pimenta Jr, 2005; Câmara et al., 2007). A
85 partir de 1986, com a epidemia do Estado do Rio de Janeiro e a disseminação do
86 sorotipo 1 do vírus, a dengue passou a ter grande importância na epidemiologia, e o
87 vírus logo atingiu a região Nordeste. Com isso, a dengue tornou-se endêmica no

88 Brasil, disseminando epidemias em áreas anteriormente não afetadas, geralmente
89 relacionadas à introdução de novos sorotipos.

90 No ano de 2020 a região Sul do País teve um total de 274,7 casos
91 por 100.000 habitantes, sendo o Paraná estado com maior número de casos. De
92 acordo com a Secretaria de Estado da Saúde (SESA), no primeiro trimestre de 2020
93 foram confirmados 128.405 casos da doença no Paraná, sendo 111 mortes
94 causadas pela dengue. Para a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2009) a única
95 estratégia de controle ou prevenção da transmissão do vírus é efetivamente
96 combater os mosquitos vetores.

97 **1.3 Malation**

98 As medidas preventivas são quase que inteiramente dependentes de
99 medidas de controle destinadas a reduzir a densidade do vetor (Ranson et al., 2010).
100 Apesar da crescente atenção ao controle mecânico e à participação social, os
101 pesticidas químicos ainda são ferramentas amplamente utilizadas. No Brasil, o
102 Ministério da Saúde preconiza os inseticidas que podem ser utilizados como controle
103 do vetor, baseando-se na lista recomendada pela OMS (World Health Organization,
104 2020), sendo eles organofosforados (OP), piretróide (PI) e carbamatos (CB) (OMS
105 2012, 2016).

106 Embora existam muitos tipos de inseticidas que podem ser usados,
107 a maioria dos compostos aprovados para saúde pública pertencem às categorias PI
108 e OP, cada um tendo seu modo de ação específico e comum (PI atuam sobre os
109 canais de sódio regulados por voltagem – NaV; e OP inibem a enzima
110 acetilcolinesterase). Nota-se que a estrutura e as propriedades químicas dos
111 compostos de OP podem variar muito. A maioria dos OPs usados na saúde pública
112 tem um enxofre ligado a seus átomos de fósforo e são classificados como
113 fosforotionatos (Ware & Whitacre, 2004). Uma das exceções a essa regra é o
114 malation que apresenta dois enxofres ligado a seus átomos de fósforo, denominado
115 assim fosforoditioato sendo utilizado atualmente em todo o país para o controle de
116 vetores da dengue em fase adulta (Bloomquist, 2009).

117 O malation (fórmula molecular: C₁₀H₁₉O₆PS₂), em si é considerado
118 altamente tóxico para humanos (toxicologia categoria II) e para o meio ambiente, é
119 caracterizado como um éster de ácido fosfórico, sendo um composto alifático de
120 cadeia aberta. Disperso no ambiente seu impacto é caracterizado pela alta

121 toxicidade para animais de vida aquática e insetos polinizadores (Adapar, 2012). Foi
122 o primeiro inseticida a fazer parte do Programa da OMS para Avaliação e Teste de
123 Novos Inseticidas em 1960 (Whopes) programa com intuito de desenvolver novos
124 inseticidas (World Health Organization, 2010). Sua entrada no organismo dos insetos
125 ocorre por via de contato ou ingestão (World Health Organization , 2004). Após sua
126 absorção, o malation necessita ser bioativado no organismo por monooxigenases,
127 que realizam sua transformação ao malaoxon, sua forma mais tóxica (Hemingwayet
128 al., 2004). No organismo, é o malaoxon que interage com as esterases como sua
129 enzima alvo, a acetilcolinesterase, realizando sua fosforilação permanente e
130 inibindo-a, o que impede sua função neural (Feyereisen, 1999; Hemingway et al.,
131 2004; Scott, 1999; Ware; Whitacre, 2004).

132 No Brasil, estudos relacionados a resistência já haviam
133 documentado há mais de duas décadas populações resistentes devido ao uso
134 intensivo deste inseticida (Macoris et al., 2007). A sua reintrodução para o controle
135 de *A. aegypti* ocorreu entre os anos de 2009 e 2011, porém, poucos trabalhos
136 avaliaram o estado da resistência de populações do vetor no país a este inseticida.
137 No Estado do Paraná, a resistência foi identificada nas cidades de Foz do Iguaçu
138 (Campos et al., 2020; Leandro et al., 2020), Londrina e Maringá, além de resistência
139 sugerida em Paranaíba e Francisco Beltrão (Campos et al., 2020).

140 Entre os anos de 2017 e 2018, foi avaliada a suscetibilidade de *A.*
141 *aegypti* aos inseticidas utilizados no controle do vetor a partir de 2012, confirmando
142 de fato a sua resistência ao adulticida malation em todo o território nacional. A partir
143 disso, o Ministério da Saúde elegeu, junto a especialistas, novos inseticidas
144 preconizados pela OMS para promover o controle químico de vetores. Foram
145 priorizados, larvicidas biológicos e adulticidas com diferentes mecanismos de ação
146 dos utilizados anteriormente, uma vez que as populações de mosquitos do Brasil
147 apresentaram indícios de resistência a piretróides e organofosforados. Foram
148 escolhidos o larvicida biológico com ação tóxica de *Saccharopolyspora spinosa*,
149 adulticida residual Clotianidina+Deltametrina e adulticida espacial UBV
150 Praletrina+Imidacloprida (Brasil Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em
151 Saúde, 2019). Desde fevereiro de 2020, o inseticida espacial UBV Cielo©
152 (Praletrina + Imidacloprida) substituiu o malation nas ações de controle no Paraná
153 (Governo do Estado do Paraná, 2020; Secretaria de Estado da Saúde do Paraná,
154 2019).

155

156 **1.4 Resistência**

157 A Organização Mundial da Saúde (OMS) define resistência como o
158 desenvolvimento da capacidade da linhagem de um organismo de tolerar um
159 determinado produto tóxico, que é letal para a maioria dos indivíduos da população
160 da mesma espécie (Moreira; Mansur; Figueira-Mansur, 2012). A resistência é
161 caracterizada como um fenômeno estritamente genético, com mutações que afetam
162 as proteínas alvos dos inseticidas e/ou o seu metabolismo (Li; Schuler; Berenbaum,
163 2007).

164 O uso contínuo de inseticidas pode gerar uma seleção de
165 indivíduos resistentes em uma população, eliminando assim os suscetíveis e
166 reduzindo sua variabilidade genética. A resistência a um determinado princípio
167 ativo não é criada, o que ocorre, é a seleção de indivíduos que naturalmente
168 possuem características pré adaptativas favoráveis a sua sobrevivência (Braga;
169 Valle, 2007;).

170 Em populações de *A. aegypti* a resistência ao malation já foi
171 observada em vários países como, por exemplo: a Índia (Soni et al., 2018),
172 Paquistão (Arslan et al., 33 2016) e Indonésia (Hamid et al., 2017) na Ásia; a
173 Jamaica (Francis et al., 2017) e México (López-Solís et al., 2020) na América do
174 Norte; e, na América do Sul, a Guiana Francesa (Guidez et al., 2020), Peru (Pinto et
175 al., 2019) e Brasil (Campos et al., 2020).

176 Em relação aos mecanismos envolvidos com a resistência aos
177 inseticidas, são citados como principais quatro tipos específicos, sendo eles:
178 comportamental (onde o inseto evita o contato com inseticida); redução da
179 penetração (caracterizado pelo espessamento ou a modificação de algumas
180 características físico-químicas da cutícula podendo gerar diminuição de sua
181 permeabilidade); resistência metabólica (que permite ao inseto sequestrar ou
182 degradar o inseticida a uma forma não tóxica antes que a molécula alcance o sítio
183 de ação); e insensibilidade do sítio alvo (que ocorre por modificações nas moléculas
184 alvo, tornando a ligação menos eficiente ao princípio ativo, tornando o organismo
185 total ou parcialmente resistente a esta molécula).

186

187

188

189 1.5 Sequenciamento de RNA (RNA-seq)

190 O Sequenciamento de Nova Geração (do inglês, *Next Generation*
191 *Sequencing* – NGS) revolucionou as ciências genômicas. Existem hoje diversas
192 tecnologias voltadas para o sequenciamento do DNA em larga escala, tais como as
193 plataformas da 454/Roche, Illumina, ABI SOLID, Pacific Biosciences, Ion Torrent,
194 Oxford Nanopore e Qiagen GeneReader. A diferença entre elas se dá principalmente
195 ao mecanismo químico empregado, tamanho e quantidade de *reads* gerados.

196 Entretanto, todas estas plataformas são capazes de produzir um
197 enorme volume de dados associado a um baixo custo, por meio do sequenciamento
198 de milhões de pares de bases em uma única corrida (Ansorge, 2009; Mardis, 2017).
199 Com o desenvolvimento dessas tecnologias juntamente com a disponibilidade de
200 diversas ferramentas de bioinformática, a análise dos transcriptomas baseado no
201 sequenciamento de RNA (RNA-seq) tornou-se muito mais acessível no campo da
202 investigação biológica.

203 É dado como transcriptoma o conjunto transcrito por completo de um
204 organismo, de um grupo de células e até células específicas sob determinadas
205 condições fisiológicas, nas quais o RNA é sintetizado a partir de moléculas de DNA
206 por meio do processo de transcrição (Moore, 1993). O sequenciamento de RNA de
207 alto desempenho (conhecido como RNA-seq) é uma das tecnologias utilizadas para
208 esse fim. O termo representa o transcriptoma obtido pelo sequenciamento do DNA
209 complementar (cDNA). Devido à sua alta sensibilidade, é considerado pelos
210 pesquisadores como sendo um método e transcriptoma revolucionário para
211 caracterizar organismos (Pinto et al., 2011).

212 Assim, a utilização dessa tecnologia pode auxiliar no estudo
213 genômico da resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*, como vem sendo abordado
214 em outros estudos direcionados a essa mesma espécie de insetos vetores,
215 (Coatsworth, Heather, et al; 2021), (Sun, Haina, et al; 2021), (de Carvalho, Stephanie
216 S., et al; 2021), e em outras espécies como *Anticarsia gemmatalis* citada por Pezenti
217 e colaboradores em 2021.

218 2. OBJETIVOS

219

220 2.1 Objetivo Geral

221 Analisar a expressão gênica de populações de *Aedes aegypti*
222 resistentes e suscetíveis ao inseticida organofosforado malation.

223

224 2.2 Objetivos Específicos

- 225 • Obter os transcritos das populações de *Aedes aegypti* resistentes
226 (grupo exposto ao inseticida) e os suscetíveis (grupo não exposto)
227 ao inseticida químico do grupo organofosforado (Malation) por meio
228 da técnica de RNA-Seq;
- 229 • Analisar o perfil transcricional de *A. aegypti* com auxílio de
230 ferramentas de bioinformática;
- 231 • Eleger genes potencialmente relacionados ao mecanismo de
232 resistência desse inseto.

233

234

235 3. REFERÊNCIAS

236

237 Adapar. Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. Ministério da Agricultura,
238 Pecuária e Abastecimento. MLT 500 ec cheminova Registro sob nº 01598705. 2012.

239 Disponível em:

240 <http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=198>.

241 Acesso em: 04/08/2021

242

243 Ansorge, Wilhelm J. Técnicas de sequenciamento de DNA de última geração. *New*
244 *biotechnology*, v. 25, n. 4, pág. 195-203, 2009.

245

246 Arslan, A. et al. Spatial distribution and insecticide susceptibility status of *Aedes*
247 *aegypti* and *Aedes albopictus* in dengue affected urban areas of Rawalpindi,
248 Pakistan. *Journal of Vector Borne Diseases*, v. 53, p. 136–143, 2016.

249

250 Bloomquist Jr, (2009). Insecticides: Chemistries and Characteristics. Em “University
251 of Minnesota's electronic textbook of Integrated Pest Management”. Disponível em:
252 <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm> Acesso em: 18/10/2021

253

254 Braga, I. A.; Valle, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência.
255 *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007a.

256

257 Braga, I. A.; Valle, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da resistência e
258 alternativas de controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, n. 4, p.
259 295–302, 2007b.

260

261 Brasil Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Informativa no
262 103/2019-CGAR/DEIDT/SVS/MS.

263

264 Câmara, F. P; Câmara, D. C. P.; Matos, R. R. C. D., Pereira, S. R. F. G., Santos, G.
265 T. D., & Theophilo, R. L. G. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil:
266 características regionais e dinâmicas. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2007.

267
268 Campos, K. B. et al. Assessment of the susceptibility status of *Aedes aegypti*
269 (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in a nation-wide
270 monitoring of insecticide resistance performed in Brazil from 2017 to 2018. *Parasites*
271 & *Vectors*, v. 13, n. 1, p. 531, 27 dez. 2020.
272
273 Coatsworth, Heather, et al. "Transcriptome comparison of dengue-susceptible and-
274 resistant field derived strains of Colombian *Aedes aegypti* using RNA-
275 sequencing." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 116 (2021).
276
277 Consoli, R. A. G. B. & Lourenço-de-Oliveira, R. Principais mosquitos de importância
278 sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994.
279
280 de Carvalho, Stephanie S., et al. "*Aedes aegypti* post-emergence transcriptome:
281 Unveiling the molecular basis for the hematophagic and gonotrophic
282 capacitation." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 15.1 (2021): e0008915.
283
284 Ebi, K. L.; Nealon, J. Dengue in a changing climate. *Environmental Research*, v. 151,
285 p. 115–123, 2016.
286
287 Feyereisen, R. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, v. 44, p. 507–
288 533, 1999.
289
290 Forattini, O. P. Evaluation of Toxicity of Phenolic. Compounds Using *Aedes aegypti*
291 (Diptera: Culicidae) and *Artemia salina*. *Culicidologia médica*. São Paulo: Edusp,
292 2002.
293
294 Francis, S. et al. Insecticide resistance to permethrin and malathion and associated
295 mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from St. Andrew Jamaica. *PLOS ONE*, v.
296 12, n. 6, p. e0179673, 26 jun. 2017.
297
298 Guidez, A. et al. Spatiotemporal multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti*

299 populations in French Guiana: need for alternative vector control. Memórias do
300 Instituto Oswaldo Cruz, v. 115, n. 12, p. 1–9, 2020.

301
302 Hamid, P. H. et al. *Aedes aegypti* resistance development to commonly used
303 insecticides in Jakarta, Indonesia. PLOS ONE, v. 12, n. 12, p. e0189680, 18 dez.
304 2017.

305
306 Governo do Estado do Paraná. Força-tarefa contra dengue apresenta primeiros
307 resultados positivos. 2020. Disponível em: Acesso em: 28 out. 2021.

308
309 Harrington, L. C.; Edman, J. D.; Scott, T. W. Why Do Female *Aedes aegypti* (Diptera:
310 Culicidae) Feed Preferentially and Frequently on Human Blood? Journal of Medical
311 Entomology, v. 38, n. 3, p. 411–422, 2001.

312
313 Hemingway, J. et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes.
314 Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 34, n. 7, p. 653–665, jul. 2004.

315
316 Hutchings, R.; Sallum, M.; Hutchings, R. Culicidae in Catálogo Taxonômico da Fauna
317 do Brasil. Disponível em: Acesso em: 23 de Agosto de 2021.

318
319 Leandro, A. DE S. et al. Malathion insecticide resistance in *Aedes aegypti*: laboratory
320 conditions and in situ experimental approach through adult entomological
321 surveillance. Tropical Medicine & International Health, v. 25, n. 10, p. 1271–1282, 6
322 out. 2020.

323
324 Li, X.; Schuler, M. A.; Berenbaum, M. R. Molecular mechanisms of metabolic
325 resistance to synthetic and natural xenobiotics. Annu. Rev. Entomol. 52, 231-253.
326 2007.

327
328 Lopes, N., Nozawa, C., & Linhares, R. E. C. General features and epidemiology of
329 emerging arboviruses in Brazil/Características gerais e epidemiologia dos arbovírus
330 emergentes no Brasil. Rev Pan-Amaz Saude, 2014.

- 331
332 López Solís, A. D. et al. Resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* y *Aedes*
333 *albopictus* (Diptera: Culicidae) de Tapachula, Chiapas, México. Salud Pública de
334 México, v. 62, n. 4, p. 439, 12 jun. 2020.
- 335
336 Macoris, M. D. L. D. G. et al. Association of insecticide use and alteration on *Aedes*
337 *aegypti* susceptibility status. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 102, n. 8, p.
338 895–900, dez. 2007.
- 339
340 Mardis, Elaine R. DNA sequencing technologies: 2006–2016. Protocolos da
341 natureza , v. 12, n. 2, pág. 213-218, 2017.
- 342
343 Martina, B. E. E. Dengue pathogenesis: A disease driven by the host response.
344 Science Progress, v. 97, n. 3, p. 197–214, 2014.
- 345
346 Martin, J. A.; Wang, Z. Next-generation transcriptome assembly. Nature Reviews
347 Genetics, vol. 12, 2011.
- 348
349 Martins Junior, A. J. Diversidade do gene de canal de sódio regulado por voltagem
350 de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) e resistência a piretróide. Rio
351 de Janeiro: Tese de Doutorado, 2009.
- 352
353 Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico 41. Monitoramento dos casos de
354 arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (dengue, chikungunya e zika),
355 semanas epidemiológicas 1 a 38, 2020.
- 356
357 Moore, J. B.; Shiau, S. P.; Reitzer, L. J. Alterations of highly conserved residues in
358 the regulatory domain of nitro-gen regulator I (NtrC) of *Escherichia coli*. Journal of
359 Bacteriology. 1993.
- 360
361 Moreira, M. F.; Mansur, J. F.; Figueira-Mansur, J. Resistência e Inseticidas:
362 Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. In: Tópicos Avançados

363 em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em
364 Entomologia Molecular, INCT, 2012.

365

366 Natal, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico*, 64(2), 2002.

367

368 OMS (2012). World Health Organization: Whopes recommended insecticides for
369 space spraying. Geneva, Switzerland.

370 http://www.who.int/whopes/Insecticides_for_space_spraying_Jul_2012.pdf. Accessed
371 08/09/2021.

372

373 OMS (2016). World Health Organization: Monitoring and managing insecticide
374 resistance in *Aedes* mosquito populations: Interim guidance for entomologists.

375 Geneva, Switzerland (WHO/ZIKV/VC/16.1)

376

377 OMS (2019). World Health Organization: Monitoring and managing insecticide
378 resistance in *Aedes* mosquito populations: Interim guidance for entomologists.

379 Geneva, Switzerland (WHO/ZIKV/VC/16.1).

380

381 Pezenti, Larissa Forim et al. Análise do perfil transcricional de cepas suscetíveis e
382 resistentes de *Anticarsia gemmatalis* e sua resposta ao *Bacillus*
383 *thuringiensis*. *Genomics*, v. 113, n. 4, pág. 2264-2275, 2021.

384

385 Pimenta Jr, F. G. Desenvolvimento e validação de um instrumento para avaliar o
386 Programa Nacional de Controle da Dengue no âmbito municipal [dissertação]. Rio de
387 Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz, 2005.

388

389 Pinto, A. C. et al. Application of RNASeq to reveal the transcript profile in bacteria.
390 *Genet Mol Res* 10(3):1707-18, 2011.

391

392 Pinto, J. et al. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in three
393 populations of *Aedes aegypti* from Peru. *Parasites & Vectors*, v. 12, n. 1, p. 494, 22
394 dez. 2019.

395
396 Powell, Jeffrey R., Andrea Gloria-Soria, and Panayiota Kotsakiozi. "Recent history of
397 *Aedes aegypti*: Vector genomics and epidemiology records." *Bioscience* 68.11
398 (2018): 854-860.
399
400 Ranson H, Burhani J, Lumjuan N, Black WC. Insecticide resistance in dengue
401 vectors. TropIKA.net Journal, 2010.
402
403 Robertson, G. et al. De novo assembly and analysis of RNA-seq data. *Nature*
404 *Methods*, vol.7, n.11, 2010.
405
406 Scott, J. G. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and*
407 *Molecular Biology*, v. 29, n. 9, p. 757–777, 1999.
408
409 Soni, M. et al. Bioassay and molecular study for detection of insecticide resistance
410 dengue causing mosquito vectors. *Journal of Medical Microbiology*, v. 36, n. 3, p.
411 435–438, 2018.
412
413 Teixeira, M. G., Barreto, M. L. & Guerra, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção
414 do dengue. *Informe Epidemiológico do SUS* 8, 1999.
415
416 Townson, H, Nathan, MB, Zaim M, Guillet P, Manga L,; Bos R, et al. Exploiting the
417 potential of vector control for disease prevention. *Bulletin of the World Health*
418 *Organization: the International Journal of Public Health*, 2005.
419
420 Trapnell, Cole; Pachter, Lior; Salzberg, Steven L. TopHat: discovering splice
421 junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, v. 25, n. 9, p. 1105-1111, 2009.
422
423 Valle, D.; Pimenta, D. N.; Cunha, R. V. *Dengue: Teorias e práticas*. 1ª ed. Rio de
424 Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2015.
425
426 Wang, Zhong; Gerstein, Mark; Snyder, Michael. RNA-Seq: a revolutionary tool for

427 transcriptomics. Nature reviews genetics, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

428

429 Ware GW & Whitacre DM (2004). An introduction to insecticides [online]; Minnesota.

430 disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>

431

432 World Health Organization. 2017. Epidemiology. Disponível em:

433 <http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>. Acesso em 08/10/2021.

434

435 World Health Organization. 2017. What is dengue? Disponível em:

436 <http://www.who.int/denguecontrol/disease/en/>. Acesso em: 08/10/2021.

437

CAPÍTULO

**“EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM *Aedes Aegypti* RESISTENTES E
SUSCETÍVEIS AO INSETICIDA MALATION”**

Este manuscrito será submetido à publicação na revista **PLos One**

1 **ANÁLISE TRANSCRICIONAL COMPARATIVA ENTRE *Aedes (Stegomyia)***
2 ***aegypti* (Linnaeus, 1762) RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO MALATION**

3 Tafarel Ribeiro Amaro¹, Thayná Bisson Ferraz López¹, Rogério Fernandes de
4 Souza², Angela Maria Palacio Cortés³, Mario Antonio Navarro Silvia³, Renata
5 da Rosa¹.

6
7 1. Laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Biologia Geral,
8 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. 2. Laboratório de
9 Bioinformática, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de
10 Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. 3. Laboratório de Morfologia e Fisiologia de
11 Culicidae e Chironomidae, Departamento de Zoologia do Setor de Ciências
12 Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

13

14

15 **Resumo**

16

17 A dengue é considerada uma doença viral emergente, atualmente endêmica
18 em mais de 100 países, e se tornou um problema de saúde pública devido à
19 fácil disseminação do vírus transmitido pela picada do mosquito *Aedes aegypti*.
20 A fim de evitar a infestação por mosquitos e a disseminação do vírus, o uso de
21 inseticidas, do grupo dos organofosforados, tornou-se bastante comum. O uso
22 intensivo e diferenciado desses compostos pode gerar seleção de indivíduos
23 resistentes em populações de vetores, eliminando os indivíduos suscetíveis e
24 reduzindo sua variabilidade genética. À medida que essas populações
25 resistentes são monitoradas e estudadas, orientar as atividades de controle de
26 insetos se torna mais assertivo. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi
27 realizar uma análise do perfil transcricional de populações de *Aedes aegypti*
28 resistentes e suscetíveis ao inseticida melation. Seis bibliotecas de cDNA foram
29 sequenciadas, sendo 3 sensíveis e 3 resistentes, totalizando 149.079.613
30 leituras paired-end e 86.290.453 leituras obtidas após a limpeza. A estratégia
31 utilizada neste trabalho foi a montagem *de novo* onde foi possível identificar
32 6.971 transcritos diferencialmente expressos, 3.649 regulados negativamente e
33 3.322 regulados positivamente no grupo resistente comparado ao grupo
34 suscetível. Após a anotação funcional foi possível caracterizar transcritos
35 relacionados a cutícula (proteína ecdysona E93), olfação (proteínas ligadoras
36 de odores – OBPs) e detoxificação (citocromo P450), relacionados à
37 resistência. Assim, nossos dados confirmam que o processo de resistência ao
38 malation em *A. aegypti* é resultado da ação de múltiplos mecanismos, e que os
39 estudos associados à expressão diferencial das espécies forma a base para a
40 otimização de novas estratégias para buscar um controle mais eficaz sem o
41 uso excessivo desses insetos com inseticidas.

42

43 **Palavras-chave:** Transcriptoma, resistência, malation, citocromo P450

44

45

46

47

48

49 **Introdução**

50

51 Doenças causadas por patógenos transmitidos por vetores matam mais de 1
52 milhão de pessoas em todo o mundo a cada ano. Quatro em cada cinco
53 pessoas vivem em áreas do mundo com risco de transmissão de arbovírus,
54 considerada negligenciada pela OMS, entre elas a dengue. O vírus da dengue
55 é transmitido aos seres humanos através das picadas de mosquitos fêmeas
56 infectadas, principalmente da espécie *Aedes aegypti*. Outras espécies do
57 gênero *Aedes* também podem atuar como vetores, mas sua contribuição é
58 secundária (World Health Organization, 2019). Esses números são resultado
59 de uma soma de fatores, como a falta de infraestrutura urbana e a facilidade
60 de ploriferação do vetor (Cunha, 2015).

61 Os pesticidas químicos são amplamente utilizados no controle
62 de vetores. No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza os inseticidas que
63 podem ser utilizados, baseando-se na lista recomendada pela OMS (World
64 Health Organization, 2020), sendo eles organofosforados (OP), piretróide (PI)
65 e carbamatos (CB) (OMS 2012, 2016).

66 O malation (fórmula molecular: $C_{10}H_{19}O_6PS_2$), é considerado
67 altamente tóxico para humanos (categoria II) e para o meio ambiente, é
68 caracterizado como um éster de ácido fosfórico, sendo um composto alifático
69 de cadeia aberta. Disperso no ambiente seu impacto é caracterizado pela alta
70 toxicidade para animais de vida aquática e insetos polinizadores (Adapar,
71 2012). Nos insetos sua ingestão se dá por via de contato ou ingestão (World
72 Health Organization, 2004). Após sua absorção, o malation necessita ser
73 bioativado no organismo por monooxigenases, que realizam sua transformação
74 ao malaoxon, sua forma mais tóxica (Hemingway et al., 2004). No organismo, é
75 o malaoxon que interage com as esterases como sua enzima alvo, a
76 acetilcolinesterase, realizando sua fosforilação permanente e inibindo-a, o que
77 impede sua função neural (Feyereisen, 1999; Hemingway et al., 2004; Scott,
78 1999; Ware; Whitacre, 2004).

79 O uso de inseticidas químicos no controle de vetores atua como
80 pressão de seleção, acarretando sérios problemas de populações resistentes
81 (Moreira; Mansur; Figueira-Mansur, 2012). O conhecimento de como e em
82 quais vias metabólicas esses compostos agem são de extrema importância

83 para melhorar as ações de controle do vetor, a análise baseada no
84 sequenciamento de RNA (RNA-seq) tornou-se uma ferramenta indispensável
85 no campo da investigação biológica. Diante disso, foi realizada uma análise da
86 expressão diferencial em *A. aegypti* resistentes e suscetíveis, na tentativa de
87 identificar possíveis genes candidatos e os principais mecanismos envolvidos
88 com a resistência ao inseticida melation.

89

90 **Material e Métodos**

91

92 *Material Biológico e Bioensaio*

93

94 Os exemplares de *Aedes aegypti* foram coletados pela equipe do Laboratório
95 de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae (Lamfic2) do
96 Departamento de Zoologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade
97 Federal do Paraná (Paraná, Brasil) em trabalho conjunto com a Secretaria
98 Estadual de Saúde do Paraná e Secretaria Municipal de Saúde de Paranaguá.
99 As fêmeas selecionadas, foram obtidas de ovos coletados utilizando
100 armadilhas do tipo ovitrampas instaladas no município de Paranaguá em maio
101 de 2020, já as fêmeas suscetíveis, foram obtidas da colônia da linhagem
102 *Rockefeller geração F1* vindas da Fiocruz mantidas no Lamfic2 em sala
103 apropriada com temperatura controlada em $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e luminosidade natural. As
104 fêmeas coletadas no município de Paranaguá, foram selecionadas segundo
105 metodologia sugerida pela OMS (WHO, 2016). A exposição ao composto
106 químico foi realizada utilizando um kit formado por dois tubos de 12 cm × 4 cm.
107 No primeiro tubo foi feita a cobertura do mesmo com papel filtro 1MM
108 Whatman® (11,9 × 11,9 cm) previamente impregnado com Malation
109 (Pestanal® 98 % Sigma-Aldrich), já o segundo ficou responsável por ser o local
110 de descanso das fêmeas após essa exposição para futura avaliação. No total
111 foram expostas 200 fêmeas oriundas do campo à concentração de malation
112 que causa 95% da mortalidade da colônia *Rockefeller*. Grupos de até 25
113 fêmeas, sem ingestão de sangue e de um até três dias de vida foram expostas
114 ao inseticida por uma hora.

115 Após a exposição as fêmeas foram transferidas para a outra face do
116 tubo contendo um papel filtro sem inseticida e alimentadas com mel 10%.
117 Passadas 24h da exposição as fêmeas que sobreviveram foram imersas ainda

118 vivas no nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para posterior obtenção do
119 RNA. Os bioensaios foram conduzidos em condições de temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$)
120 e umidade (80%) controladas. As fêmeas da colônia *Rockefeller* utilizadas
121 como controle não foram expostas ao inseticida.

122

123 *Extração de RNA e sequenciamento dos mosquitos*

124

125 Para a obtenção do RNA foram separados grupos de 12 a 14 fêmeas
126 por réplica (pool) da população oriunda do campo, denominada resistente (3
127 réplicas) e da população controle, denominada como suscetível (3 réplicas)
128 controle. A extração do RNA foi realizada usando o kit de extração RNeasy
129 Mini Kit – Qiagen seguindo as recomendações do fabricante. A eluição final dos
130 ácidos nucleicos foi feita em 30 μL de água livre de RNAses. Após a extração e
131 purificação as amostras foram armazenadas em freezer -80°C até a etapa do
132 sequenciamento. A preparação e sequenciamento das bibliotecas de cDNA foi
133 realizado no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em
134 Ciências da Vida (LaCTAD), na universidade Estadual de Campinas
135 (UNICAMP). Com o sequenciamento realizado na plataforma Illumina
136 HiSeq2500 com leituras paired-end (2x100bp), com dados de saída em
137 arquivos FASTQ.

138

139 *3.4 Processamento e análise de dados*

140

141 Os parâmetros de qualidade das bibliotecas foram verificados com
142 auxílio da ferramenta FastQC v0.11.9
143 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) (Andrews, 2010) e
144 sua limpeza realizada com o TrimGalore v0.39 (Krueger, 2015) em terminal
145 GNU/Linux, onde foi feita a retirada dos adaptadores, assim como os *reads*
146 menores que 40 bases e com Phred Score < 20 . A montagem do transcriptoma
147 com estratégia de novo foi realizada com o Trinity V2.8.5
148 (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>) (Grabherr et al., 2011). E as
149 estatísticas de qualidade da montagem de novo obtidas utilizando o
150 TrinityStats.pl e o Bowtie2 v2.3.5 ([http://bowtie2](http://bowtie2.bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml)
151 [bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml](http://bowtie2.bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml)) (Langmead e Salzberg, 2012).

152 O mapeamento e a contagem dos *reads* de cada biblioteca ao
153 transcriptoma foi realizado com os softwares Bowtie2 v2.3.5 e Bedtools

154 v2.30.0. A análise de expressão diferencial comparando insetos resistentes
155 versus suscetíveis foi realizada com o pacote DESeq2 v1.26.0
156 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>) (Love et al.,
157 2014), usando o RStudio v2021.09.0 Build 351 (<https://rstudio.com/>). Os
158 transcritos diferencialmente expressos, que apresentaram uma probabilidade
159 ajustada de p menor que o limite alfa de 5% ($p_{adj} < 0,05$) foram isolados com a
160 ferramenta Samtools v1.11 e convertidos em sequências peptídicas com o
161 programa CodAn v1.2. Essas sequências peptídicas foram submetidas ao
162 BlastKOALA v2.2 (<https://www.kegg.jp/blastkoala/>) para caracterização
163 funcional do transcriptoma, usando como referência o banco de sequências
164 ortólogas KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Kanehisa e
165 Goto, 2000). As respectivas sequências nucleotídicas dos transcritos
166 diferencialmente expressos foram montadas a partir do CodAn e anotadas por
167 meio do software Blast2GO v.6.03 (<https://www.blast2go.com/>) (CONESA et al.,
168 2005). Para analisar a similaridade foi utilizado o BLASTx no banco de dados
169 de proteínas não- redundantes do NCBI National Center for Biotechnology
170 Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), tendo como parâmetros E-value \leq
171 1.0E-3.

172

173 **Resultados**

174

175 *Sequenciamento e montagem do transcriptoma*

176

177 O sequenciamento das seis bibliotecas de cDNA para os grupos:
178 controle (AEC) e resistentes (AER), resultaram em um total de 149.079.613
179 *reads paired-end* de 100 pb.

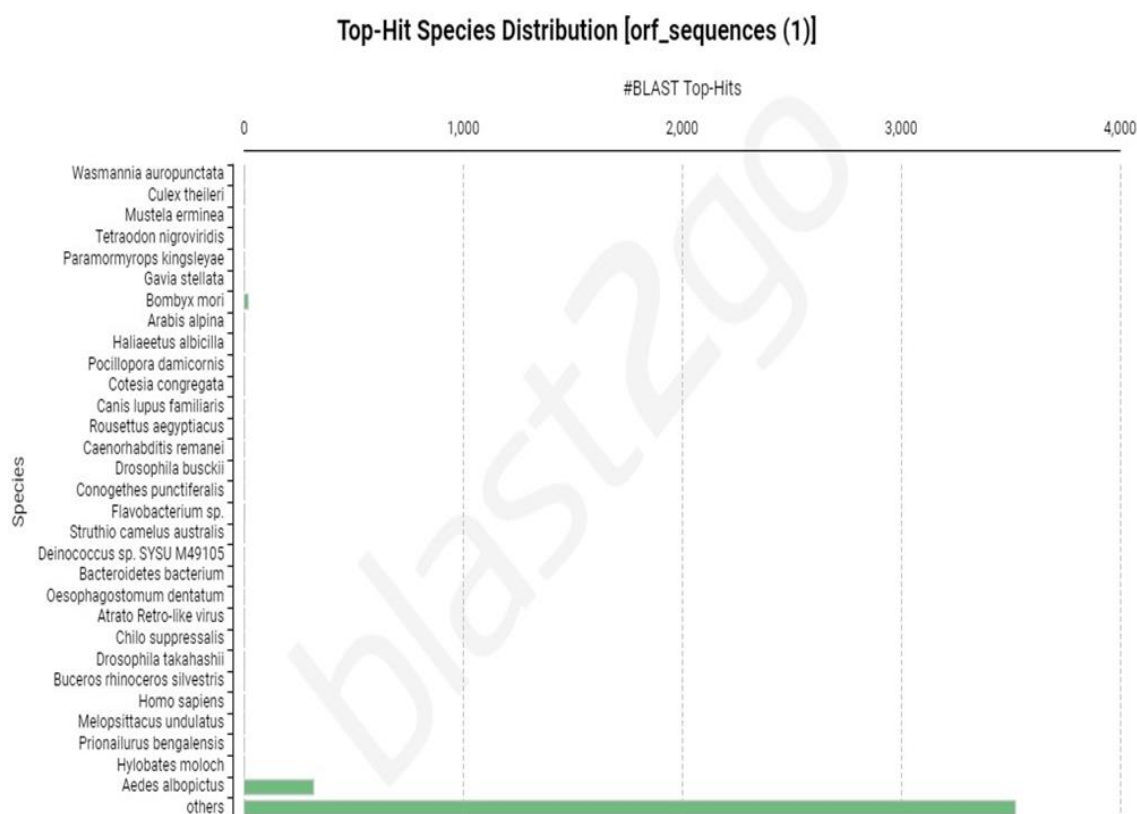
180

181 Após limpeza e filtragem resultaram em 86.290.453 *reads* que foram
182 utilizados na montagem. As análises de qualidade de montagem gerada pelo
183 TrinityStarts.pl apontaram 96.690 transcritos, sendo 49.366 genes, um N50 de
184 2841 pb, e tamanho médio de *contig* de 639. Junto ao TrinityStarts.pl para a
185 análise de qualidade, também foram utilizados o programa Bowtie e a
186 ferramenta BUSCO, que comparando o transcriptoma com o banco de dados
187 de insetos identificou 96,2% das sequências completas, e quando comparado a
188 Ordem Diptera identificou 91,1%.

188

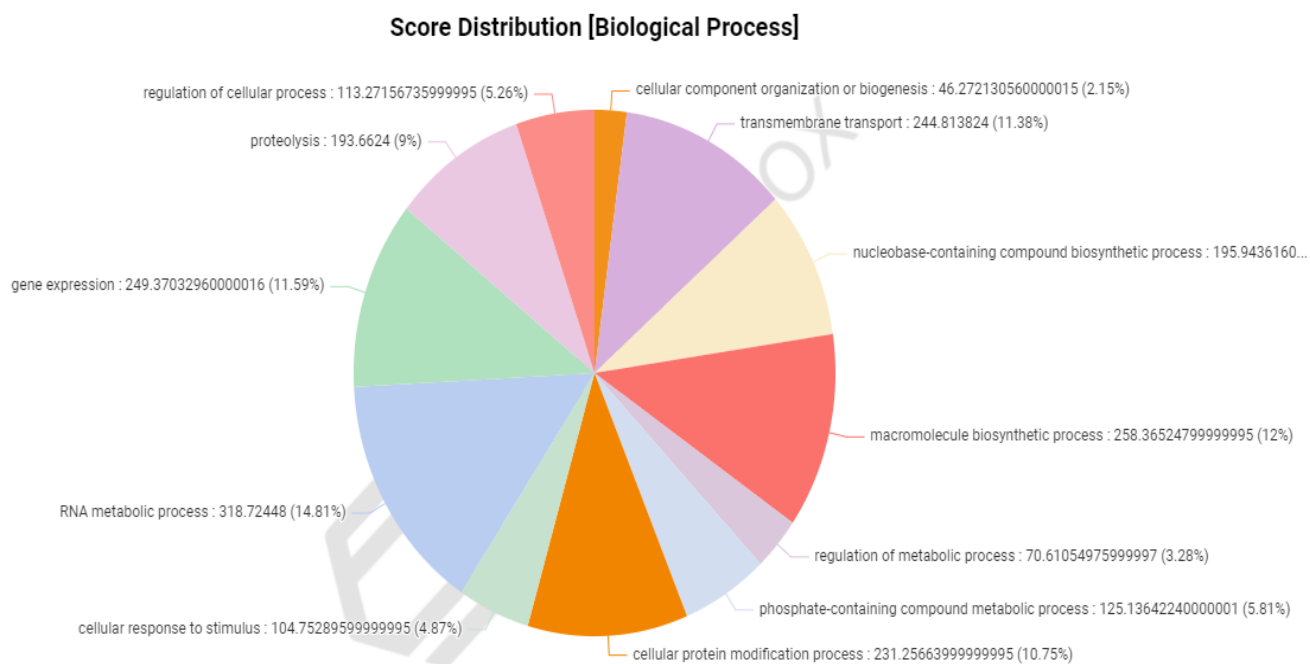
189 *Expressão diferencial e anotação funcional*

190
 191 A análise de expressão diferencial comparando os grupos
 192 Resistentes (AER) vs grupos Suscetíveis/Controle (AEC), identificou **6971**
 193 transcritos diferencialmente expressos ($p_{adj} < 0,05$), sendo 3.649 *down*
 194 regulados e 3.322 *up* regulados no grupo Resistente comparado ao Suscetível.
 195 Após serem submetidos ao programa CodAn, isso resultou nas 3.920
 196 seqüências submetidas ao Blast2Go, sendo a maioria *down* regulados. A
 197 anotação desses transcritos no Blast2GO apontou que as espécies que
 198 apresentaram uma maior quantidade de seqüências similares às do
 199 transcriptoma de *Aedes aegypti* foram: *Aedes albopictus* (Diptera) com 317
 200 transcritos, *Bombyx mori* (Lepidoptera) com 18 e outras espécies não
 201 identificadas com 3522 (Figura 2).

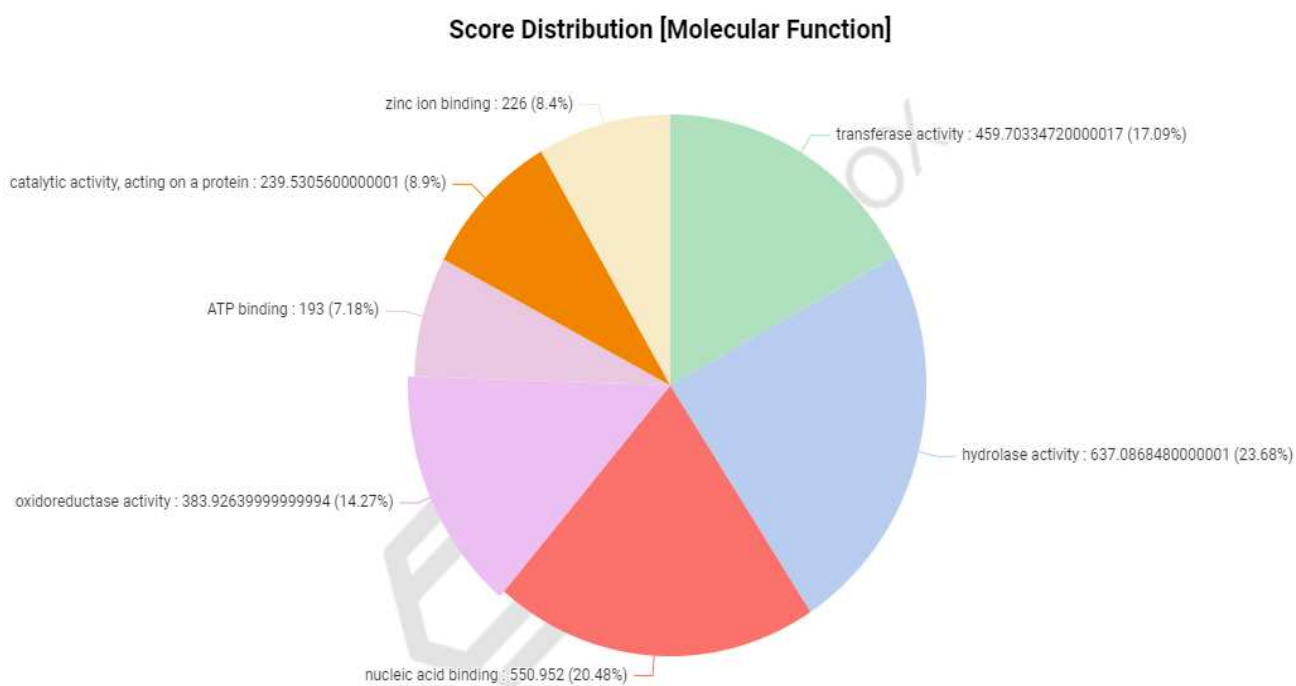


202
 203 **Figura 1.** Distribuição das espécies com mais hits para os dados proveniente da montagem *de*
 204 *novu* do transcriptoma *A. aegypti* submetidos a anotação funcional pelo software Blast2GO.
 205

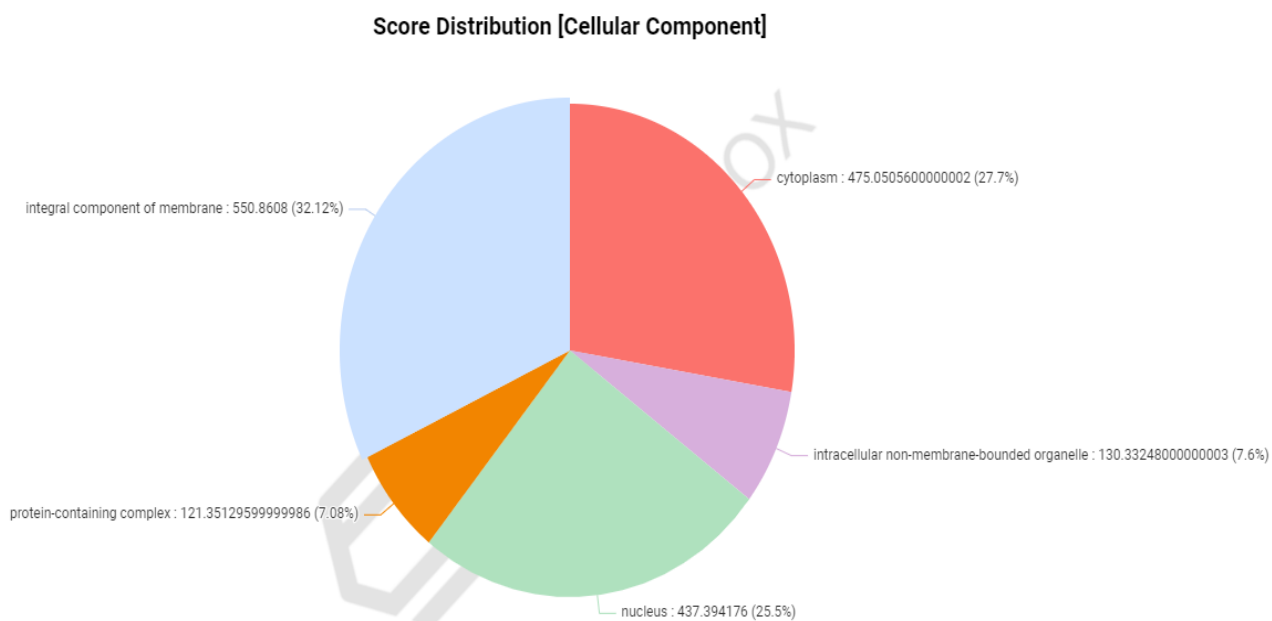
206 De acordo com o Gene Ontology, que baseia a anotação funcional das
 207 seqüências diferencialmente expressas da espécie em si (*Aedes aegypti*), em
 208 três principais categorias, sendo elas: Processos Biológicos (gráfico 1),
 209 Funções Moleculares (gráfico 2) e Componentes Celulares (gráfico 3).



210 **Figura 2 -** Distribuição dos transcritos de *Aedes aegypti* entre as categorias anotadas no Gene
211 Ontology (GO) para Processos biológicos.



212 **Figura 3 -** Distribuição dos transcritos de *Aedes aegypti* entre as categorias anotadas no Gene
213 Ontology (GO) para Funções moleculares.



214 **Figura 4** - Distribuição dos transcritos de *Aedes aegypti* entre as categorias anotadas no Gene
 215 Ontology (GO) para Componentes Celulares.

216 **Discussão**

217

218 *Genes relacionados a resistência em Aedes aegypti*

219

220

221 No presente estudo foram identificados 3920 genes diferencialmente
 222 expressos entre as populações de fêmeas de *A. aegypti*, resistentes e
 223 suscetíveis expostos ao Malation. A partir da predição gênica feita pela
 224 anotação funcional foi possível interpretar e dividir os transcritos de acordo com
 225 o mecanismo de ação, dividindo-os em 4 grupos: (i) Genes responsáveis pela
 226 formação da cutícula (ecdysone, endocuticle structural glycoprotein, larval
 227 cuticle protein, juvenile hormone epoxide hydrolase e a actin); (ii) Genes
 228 envolvidos com o processo de detoxificação (cytochrome P450, esterase e a
 229 glutathione); (iii) Genes do sistema sensorial de olfação (multidrug resistance-
 230 associated protein e o odorant receptor); (iv) Genes envolvidos com a
 231 transmissão neuronal (acetylcholinesterase).

231

232

233 *Genes relacionados a cutícula*

234

235

236

As propriedades da cutícula do inseto, incluindo força, flexibilidade e permeabilidade são determinadas não apenas pelo exoesqueleto de quitina,

237 mas também pelas combinações de diferentes proteínas cuticulares (Andersen
238 et al.,1995). Além de várias funções, ela é o primeiro mecanismo utilizado
239 como barreira contra a penetração de compostos externos (Balabanidou et al.,
240 2018).

241 Dos genes que podem estar diretas ou indiretamente relacionados à
242 cutícula, no caso de *A. aegypti* (glicoproteína endocuticular, proteína da
243 cutícula larval e cecoprin), não houve super expressão relatada nos insetos da
244 população resistente, estando todos os 12 transcritos encontrados para a
245 mesma, *down* regulados quando comparados aos mosquitos suscetíveis. Já no
246 caso dos genes relacionados a Ecdysona, foram relatados 4 genes *up*
247 regulados na população resistente em relação a suscetível, deixando claro que
248 essa proteína pode ter correlação com a resistência.

249 Em mosquitos fêmeas, a alimentação repetida com sangue é essencial
250 para a manutenção dos ciclos gonadotróficos e serve como base para a
251 transmissão do patógeno. Want et al. (2021) deixou evidente a importância da
252 proteína ecdysona (E93), visto que a mesma regula e interfere no ciclo
253 reprodutivo das fêmeas, tal interferência induzida pela ecdysona faz com que o
254 primeiro ciclo gonadotrófico interrompa o segundo. Tal informação e análise se
255 torna crucial para que possa se fazer a interrupção do ciclo, assegurando
256 assim que a proliferação do mosquito e a transmissão da doença sejam
257 minimizadas.

258

259 *Genes relacionados a olfação*

260

261 Em animais, o sistema sensorial é essencial para a obtenção das
262 informações necessárias à realização de um grande número de atividades.
263 Entre os sentidos, o olfato é provavelmente o mais importante dos insetos,
264 permitindo-lhes detectar, distinguir e responder a uma gama de compostos
265 presentes no ambiente (Lorenzo e Melo, 2012).

266 Sua importância neste grupo pode ser evidenciada pela complexidade
267 das antenas, órgãos dedicados fundamentalmente à detecção de estímulos
268 olfativos, mecânicos, térmicos ou hídricos. Além das antenas, os insetos
269 podem detectar odores mediante sensilas presentes nos palpos maxilares ou
270 labiais. Tais moléculas de odor podem desencadear comportamentos de base
271 inata e, também, aqueles desenvolvidos mediante experiências, como produto

272 de processos de aprendizado.

273 No presente estudo foram observados 9 genes de proteínas ligantes de
274 odor com expressão diferencial entre os grupos (R vs S). Sendo 5 deles *up*
275 regulados nos insetos resistentes, denominadas como Proteínas ligadoras de
276 Odores – OBPs. A primeira OBP caracterizada em insetos foi uma proteína de
277 ligação de feromônio da antena de machos do bicho-da-seda, *Antheraea*
278 *polyphemus* (Vogt & Riddiford, 1981). Posteriormente, Kanaujia e Kaissling
279 (1985) demonstraram que moléculas de feromônio na presença destas
280 proteínas eram facilmente solubilizadas, estes resultados sugeriam que ocorria
281 uma ligação entre a molécula de feromônio e a proteína.

282 Genes relacionados a olfação em *A. aegypti* já foram relatados em
283 outros estudos (Wang et al., 2020), onde foi evidenciado que o mesmo gene
284 pode ser expresso em diferentes tecidos quimiossensoriais, incluindo a antena,
285 a probóscide das fêmeas, os espiráculos torácicos, as glândulas reprodutivas
286 masculinas, onde é transferido para as fêmeas durante o acasalamento, e nas
287 glândulas salivares (Li, S. et al., 2008).

288 Baseado nos resultados da expressão diferencial entre os grupos de
289 *Aedes* resistentes e suscetíveis, podemos inferir que a resistência apontada
290 nesse inseto atua por meio de diferentes mecanismos. Sejam eles por meio
291 cuticular, onde a penetração do inseticida se torna mais difícil, por genes
292 relacionados a olfação que influenciam na percepção do inseticida por meio de
293 receptores odorantes, acarretando em uma mudança comportamental de fuga
294 do inseto, ou por meio de genes relacionados ao funcionamento metabólico,
295 onde proteínas antioxidantes atuam no processo de detoxificação dos mesmos.
296 Estudos como esse são fundamentais para a otimização de novas estratégias,
297 buscando um controle mais eficiente desses insetos.

298

299

300 **Genes relacionados ao mecanismo de detoxificação**

301

302 A evolução da resistência xenobiótica em insetos deve-se
303 principalmente ao aumento da capacidade metabólica do sistema de
304 desintoxicação (Liu et al., 2007). A resistência metabólica é caracterizada por
305 envolver um grupo de famílias de enzimas, essas famílias podem
306 superexpressar ou sofrer alterações estruturais moleculares durante o

307 processo de resistência, aumentando assim sua capacidade de desintoxicar os
308 inseticidas (Hemingway, 2000; Hemingway et al., 2004; Braga e Valle, 2007;
309 Russel et al., 2011).

310 Neste trabalho, foi evidenciado a presença e a provável importância
311 de genes relacionados ao mecanismo de detoxificação, visto que, 6 classes de
312 transcritos apontados como possíveis candidatos à resistência foram
313 identificadas. Sendo evidenciados 11 transcritos para o citocromo P450, 8 para
314 a glutathione, 6 para a esterase, 5 para a carboxilesterase, 4 para a
315 sulfotransferase e 2 para a acetilcolinesterase. Onde a Citocromo P450, a
316 Esterase e a Glutathione tiveram maior índice de superexpressão (*up* regulados)
317 nos insetos resistentes quando comparados aos suscetíveis .

318 As glutathione S-transferases (GSTs) são enzimas envolvidas em
319 vários processos biológicos distintos. Em insetos, os GSTs, desempenham um
320 papel fundamental no metabolismo dos xenobióticos usados para controlar as
321 populações vetoriais. Atuam catalisando a conjugação de diversos eletrófilos
322 com a glutathione reduzida (GSH) e, conseqüentemente, desintoxicando
323 compostos tóxicos endógenos e exógenos. Aqui dos 8 transcritos, 6 deles
324 foram *Up* regulados na população resistente em relação aos suscetíveis.

325 Em estudos recentes (Lien et al. 2019; Helvecio et al. 2020) onde
326 também foram encontrados transcritos relacionados a resistência, a glutathione
327 teve um aumento de expressão significativo em populações de *A. aegypti*
328 quando expostos a diferentes tipos de inseticidas, incluindo piretróides,
329 organofosforados, carbamato e organoclorados.

330 A esterase é uma enzima que atua hidrolisando as ligações éster
331 dos pesticidas, sequestrando-os mais rapidamente do que seu metabolismo.
332 Portanto, isso evita que esses compostos atinjam o local de ação. Geralmente
333 estão associados à resistência a inseticidas organofosforados, carbamatos e
334 piretróides (Li et al., 2007; Hotelier et al., 2010; Bass e Field, 2011).

335 No presente trabalho a expressão gênica relacionada a esterase foi
336 de 5 transcritos *up* regulados em insetos resistentes., Corroborando com este
337 estudo, a superexpressão do gene da esterase já foi encontrada associada à
338 resistência ao malation (Goindin et al., 2017; Marcombe et al., 2019; Thornton
339 et al., 2020), bem como a outros organofosforados, como o temefós (Goindin et
340 al., 2017; Marcombe et al., 2009, 2012; Strode et al., 2012) e até piretróides

341 (Saavedra Rodriguez et al., 2019). O mecanismo mais comum de resistência
342 envolvendo as esterases é a amplificação gênica que promove o sequestro
343 aumentado de inseticida (Grigoraki et al., 2016).

344 O citocromo P450, também conhecido como monooxigenase, é um
345 grupo de enzimas responsáveis pelo metabolismo oxidativo de diversos
346 compostos endógenos e exógenos (Scott e Wen, 2001). Já foi relatado que
347 essas enzimas desempenham um papel importante na desintoxicação de
348 inseticidas, mostrando serem *up* reguladas nos insetos resistentes estudados
349 em relação aos suscetíveis *down* regulados (Scott e Georghiou, 1986; Bergé et
350 al., 1998; Feyereisen, 2005).

351 O aumento de expressão gênica da citocromo oxidase P450 e suas
352 isoformas já foi registrado para organofosforados, piretróides e neonicotinóides
353 (Reid et al., 2014; Riaz et al., 2013; Saavedra-Rodriguez et al., 2019; Strode et
354 al., 2012; Vontas et al., 2012), porém, poucos estudos ainda não continham
355 informações específicas relacionadas ao uso de malation. Vários estudos têm
356 mostrado que a citocromo oxidase P450 está relacionada principalmente à
357 resistência aos piretróides, enquanto o envolvimento de organofosforados se
358 mostra escasso.

359

360 *Outros genes envolvidos com o processo de resistência*

361

362 Além dos genes citados acima, foram identificados diferentes grupos
363 envolvidos com a resistência, exemplo disso é a enzima fosfatase alcalina
364 (ALP), que possui diferentes funções nos insetos, como na citólise dos tecidos
365 durante o desenvolvimento do inseto e a atuação como hidrolase durante os
366 estágios finais do processo de digestão para a atividade sistêmica fisiológica
367 em insetos, maturação das gônadas e mudas metamórficas.

368 Ademais, as fosfatases desenvolvem resistência a inseticidas
369 catalisando a remoção de grupos fosfato (hidrolisando ligações de éster de
370 fosfato de inseticidas organofosforados sintéticos) (Callaghan 1991). Em 2019
371 Hamadah investigou a atividade da enzima fosfatase em *Rhynchophorus*
372 *ferrugineus* usando compostos comerciais como piriproxifeno, neemazal e
373 espinetoram. Para ALP, o neemazal ficou clara a baixa inibição, mas no caso
374 do piriproxifeno e o espinetoram houve inibição significativa em relação a
375 enzima.

376 Como apontado em diversos artigos os mecanismos envolvidos com a
377 resistência aos inseticidas são complexos e dinâmicos, o que acreditamos
378 estar ocorrendo no caso de *Aedes aegypti*, evidenciando que estudos nessa
379 área são de extrema importância para a geração de novas informações.

380

381

382 **Agradecimentos**

383

384 Os autores são gratos a Universidade Estadual de Londrina (UEL),
385 Centro de Ciências Biológicas (CCB), Departamento de Biologia Geral, por
386 disponibilizar toda estrutura laboratorial para realização desse trabalho. Ao
387 laboratório de Bioinformática pelo auxílio de extrema importância para com este
388 trabalho, ao Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae
389 (Lamfic2) do Departamento de Zoologia do Setor de Ciências Biológicas da
390 Universidade Federal do Paraná (Paraná, Brasil). A CAPES e ao CNPq pelo
391 suporte financeiro.

392 **5. REFERÊNCIAS**

393 Andersen, S. O., Hojrup, P., Roepstorff, P. (1995). Insect cuticular
394 proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25, 153–176. doi: 10.1016/0965-
395 1748(94)00052-J

396

397 Andrews, S. (2010) FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput
398 Sequence Data. Disponível em:
399 <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. 394 Acesso:
400 Setembro/2021.

401

402 Balabanidou, V., Grigoraki, L., Vontas, J. (2018). Insect cuticle: a critical
403 determinant of insecticide resistance. *Curr Opin Insect Sci*, 27:68-74. doi:
404 10.1016/j.cois.2018.03.001.

405

406 Bass, Chris; Field, Linda M. Ampliação gênica e resistência a
407 inseticidas. *Ciência do manejo de pragas*, v. 67, n. 8, pág. 886-890, 2011.

408

409 Bolger, Anthony M.; Lohse, Marc; Usadel, Bjoern. Trimmomatic: a
410 flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, v. 30, n. 15, p. 2114-
411 2120, 2014.

412

413 Braga, I. A.; Valle, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e
414 resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007a.

415

416 Braga, I. A.; Valle, D. *Aedes aegypti*: vigilância, monitoramento da
417 resistência e alternativas de controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de*
418 *Saúde*, v. 16, n. 4, p. 295–302, 2007b.

419

420 Callaghan A. 1991. Resistência a inseticidas: mecanismo e métodos de
421 detecção. *Sci. Progresso*. 75: 423 – 438.

422

423

424 Conesa, A. Götz, S., García-Gómez, J. M. et al. (2005). Blast2GO: a

425 universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics
426 research. *Bioinformatics*, 21(18):3674-3676. doi: 10.1093/bioinformatics/bti610.

427

428 Feyereisen, R. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, v.
429 44, p. 507–533, 1999.

430

431 Francis, S. et al. Insecticide resistance to permethrin and malathion and
432 associated mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from St. Andrew
433 Jamaica. *PLOS ONE*, v. 12, n. 6, p. e0179673, 26 jun. 2017.

434

435 Garcia, G. DE A. et al. The impact of insecticide applications on the
436 dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from
437 different Brazilian regions. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 2, p.
438 e0006227, 12 fev. 2018.

439

440 Grabherr, Manfred G. et al. Full-length transcriptome assembly from
441 RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*, v. 29, n. 7,
442 p. 644, 2011.

443

444 Goindin, Daniella et al. Níveis de resistência a inseticidas a deltametrina,
445 malatião e temefós e mecanismos associados em mosquitos *Aedes aegypti*
446 das ilhas Guadalupe e Saint Martin (Índias Ocidentais Francesas). *Doenças*
447 *infecciosas da pobreza*, v. 6, n. 1, pág. 1-15, 2017.

448

449 Guidez, A. et al. Spatiotemporal multiple insecticide resistance in *Aedes*
450 *aegypti* populations in French Guiana: need for alternative vector control.
451 *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 115, n. 12, p. 1–9, 2020.

452

453 Hamid, P. H. et al. *Aedes aegypti* resistance development to commonly
454 used insecticides in Jakarta, Indonesia. *PLOS ONE*, v. 12, n. 12, p. e0189680,
455 18 dez. 2017.

456

457 Helvecio, Elisama et al. Polimorfismos em GSTE2 estão associados à
458 resistência ao temefós em *Aedes aegypti*. *Bioquímica e fisiologia de*

459 pesticidas , v. 165, p. 104464, 2020.

460

461 Hemingway, J. (2000). The molecular basis of two contrasting metabolic
462 mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30:1009-
463 1015. doi: 10.1016/s0965-1748(00)00079-5

464

465 Hemingway, J. et al. The molecular basis of insecticide resistance in
466 mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, n. 7, p. 653–665,
467 jul. 2004.

468

469 Hotelier, Thierry et al. Resistência a inseticidas através de mutações em
470 colinesterases ou carboxilesterases: mineração de dados no banco de dados
471 ESTHER. *Journal of Pesticide Science* , p. 1006190139-1006190139, 2010.

472

473 Kanehisa, Minoru; GOTO, Susumu. KEGG: enciclopédia kyoto de genes
474 e genomas. *Pesquisa de ácidos nucléicos* , v. 28, n. 1, pág. 27-30, 2000.

475

476 Langmead, Ben; Salzberg, Steven L. Alinhamento de leitura com
477 intervalo rápido com Bowtie 2. *Nature methods* , v. 9, n. 4, pág. 357-359, 2012.

478

479 Leandro, A. DE S. et al. Malathion insecticide resistance in *Aedes*
480 *aegypti*: laboratory conditions and in situ experimental approach through adult
481 entomological surveillance. *Tropical Medicine & International Health*, v. 25, n.
482 10, p. 1271–1282, 6 out. 2021.

483

484 Lien, Nguyen Thi Kim et al. Sequenciamento do transcriptoma e análise
485 de alterações associadas à resistência a inseticidas no mosquito da dengue
486 (*Aedes aegypti*) no Vietnã. *The American Journal of Tropical Medicine and*
487 *Hygiene* , v. 100, n. 5, pág. 1240, 2019.

488

489 Li, X.; Schuler, M. A.; Berenbaum, M. R. Molecular mechanisms of
490 metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*
491 52, 231-253. 2007.

492

493 Liu, N., Liu, H., Zhu, F. et al. (2007). Differential expression of genes in
494 pyrethroid resistant and susceptible mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *Gene*,
495 394:61–68. doi: 10.1016/j.gene.2007.01.032.

496

497 López Solís, A. D. et al. Resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* y
498 *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) de Tapachula, Chiapas, México. *Salud*
499 *Pública de México*, v. 62, n. 4, p. 439, 12 jun. 2020.

500

501 Lorenzo, M. G., Melo, A. C. A. (2012). Olfacção e Comportamento. In:
502 Neto, M. A. C. S., Winter, C., Vaz Jr, C. T. I. S. *Tópicos Avançados em*
503 *Entomologia Molecular*. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em
504 *Entomologia Molecular INCT-EM*.

505

506 Love, M. I., Huber, W., Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold
507 change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*,
508 15,550. doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8.

509

510 Marcombe, Sébastien et al. Distribuição da resistência a inseticidas e
511 mecanismos envolvidos no vetor arbovírus *Aedes aegypti* no Laos e
512 implicações para o controle vetorial. *PLoS doenças tropicais negligenciadas* , v.
513 13, n. 12, pág. e0007852, 2019.

514

515 Pezenti, Larissa Forim et al. Análise do perfil transcricional de cepas
516 suscetíveis e resistentes de *Anticarsia gemmatalis* e sua resposta ao *Bacillus*
517 *thuringiensis*. *Genomics* , v. 113, n. 4, pág. 2264-2275, 2021.

518

519 Reid, William R. et al. Análise transcricional de quatro família 4 P450s
520 em uma cepa de Porto Rico de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) em
521 comparação com uma cepa de Orlando e seus possíveis papéis funcionais na
522 resistência à permetrina. *Journal of medical entomology* , v. 51, n. 3, pág. 605-
523 615, 2014.

524

525 Riaz, Muhammad Asam et al. Mecanismos moleculares associados ao
526 aumento da tolerância ao inseticida neonicotinóide imidaclopride no vetor da

- 527 dengue *Aedes aegypti*. *Aquatic Toxicology* , v. 126, p. 326-337, 2013.
- 528
- 529 Saavedra-Rodriguez, Karla et al. Transcrição de genes de
530 desintoxicação após seleção de permetrina no mosquito *Aedes*
531 *aegypti*. *Biologia molecular de insetos* , v. 21, n. 1, pág. 61-77, 2012.
- 532
- 533 Saavedra-Rodriguez , K. et al. Exome-wide association of deltamethrin
534 resistance in *Aedes aegypti* from Mexico. *Insect molecular biology*, v. 28, n. 5,
535 p. 591-604, 2019.
- 536
- 537 Scott, Jeffrey G.; Wen, Zhimou. Citocromos P450 de insetos: a ponta do
538 iceberg. *Ciência do manejo de pragas* , v. 57, n. 10, pág. 958-967, 2001.
- 539
- 540 Snutad, D. P. & Simmons, M. J. *Fundamentos de Genética*. Rio de
541 Janeiro (RJ). Guanabara Koogan. S.A. 6ª ed., 2013.
- 542
- 543 Sim, Shuzhen; Ramirez, José L .; Dimopoulos, George. A infecção pelo
544 vírus da dengue na glândula salivar do *Aedes aegypti* e no aparelho
545 quimiossensorial induz genes que modulam a infecção e o comportamento de
546 alimentação do sangue. *Patógenos PLoS* , v. 8, n. 3, pág. e1002631, 2012.
- 547
- 548 Soni, M. et al. Bioassay and molecular study for detection of insecticide
549 resistance dengue causing mosquito vectors. *Journal of Medical Microbiology*,
550 v. 36, n. 3, p. 435–438, 2018.
- 551
- 552 Thornton, Jonathan et al. Seleção e reversão de resistência a inseticidas
553 em duas linhagens de *Aedes aegypti*. *Wellcome Open Research* , v. 5, 2020.
- 554
- 555 Vogt, Richard G .; Riddiford, Lynn M. Ligação e inativação de feromônios
556 por antenas de mariposa. *Nature* , v. 293, n. 5828, pág. 161-163, 1981.
- 557
- 558 Vontas, J. et al. Resistência a inseticidas nos principais vetores da
559 dengue *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*. *Pesticidas Bioquímica e Fisiologia* ,
560 v. 104, n. 2, pág. 126-131, 2012.

561

562 Wang, N., Li, J., Shang, Z. et al. (2020). Increased Responses of
563 Phenoloxidase in Chlorantraniliprole Resistance of *Plutella xylostella*
564 (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Insect Science*, 20(4). doi:
565 10.1093/jisesa/ieaa066.

566

567 World Health Organization. 2016. *Epidemiology*. Disponível em:
568 <http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>. Acesso em 08/10/2021.

569

570 World Health Organization . 2019. *Epidemiology*. Disponível em:
571 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
572 Acesso em 29/10/2021.

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595 CONCLUSÃO GERAL

596

597 Diante dos dados aqui apresentados fica evidente que o processo de
598 resistência ao Malation em *A. aegypti* é resultado da atuação de diversos
599 mecanismos, seja (i) cuticular interferindo na penetração do composto, (ii)
600 metabólico acelerando os processos de detoxificação, ou (iii) olfativo, onde o
601 aumento da percepção do odor gera uma mudança comportamental no inseto.
602 Entender os genes e mecanismos relacionados a resistência a inseticida nessa
603 espécie é urgente e necessário para o desenvolvimento de abordagens mais
604 eficientes no controle de vetores.

605