

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MONIQUE ANE DA LUZ FERREIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E GENOTIPAGEM DAS  
MUTAÇÕES VAL1016ILE E PHE1534CYS DE POPULAÇÕES  
NATURAIS DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762  
(DIPTERA: CULICIDAE) DO PARANÁ, BRASIL.**

CURITIBA

2016

MONIQUE ANE DA LUZ FERREIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E GENOTIPAGEM DAS  
MUTAÇÕES VAL1016ILE E PHE1534CYS DE POPULAÇÕES  
NATURAIS DE *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, 1762  
(DIPTERA: CULICIDAE) DO PARANÁ, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

CURITIBA

2016

MONIQUE ANE DA LUZ FERREIRA

“VARIABILIDADE GENÉTICA E GENOTIPAGEM DAS MUTAÇÕES  
VAL1016ILE E PHE1534CYS DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Aedes*  
(*Stegomyia*) *Aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) DO  
PARANÁ, BRASIL”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



---

Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva (Orientador)  
(UFPR)



---

Profa. Dra. Adriana Lacerda Twerdochlib  
(FPP/PR)



---

Dra. Débora Rebecchi Baggio  
(Empresa Forrest Innovations/PR)

Curitiba, 21 de setembro de 2016.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me dar toda sabedoria e entendimento necessário para concluir mais esta etapa em minha vida.

Ao meu orientador Professor Mário Antônio Navarro da Silva pela oportunidade, ensinamento e pelo apoio.

Ao meu marido pelo carinho, amor, dedicação, compreensão e companheirismo, fundamentais nesta jornada.

Aos meus padrinhos, que acima de tudo foram grandes incentivadores e será sempre um exemplo de vida.

À minha família, sempre me ajudando em todos os momentos, agradeço muito por tudo, principalmente minha mãe por sempre me apoiar.

Ao meu irmão e toda a sua trupe (Soraya, Isabella, Gustavo, Irene e Júlio) que tornam a minha vida em Curitiba mais feliz.

Aos amigos de todas as horas Helo e Uruba, pela amizade inigualável e todas as conversas sempre produtivas.

As meninas da sala três e companheiras de laboratório, Betina, Gisele e Thalita e as agregadas Cami, Mafer e Sil, que fizeram com que esta etapa fosse mais divertida e gostosa, muito obrigada por tornarem meus dias mais alegres.

Aos amigos do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária: Débora e Vini, obrigada pela amizade, ensinamentos e agradável convivência. Sem esquecer o Oscar, fundamental para a qualidade deste trabalho, obrigada pela parceria.

Ao CNPq pelo apoio para a realização desta pesquisa com a concessão da bolsa de estudo.

Meu carinho e gratidão a todos que de alguma forma participaram desta trajetória!!!

**Monique.**



Joaquin Salvador Tejón – Quino

## RESUMO

*Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), é considerado de grande importância epidemiológica por ser vetor dos vírus da dengue, da febre amarela, Chikungunya e Zika vírus. Está globalmente distribuído pelos trópicos e em todos os estados brasileiros. A utilização de controle químico resulta numa intensa pressão de seleção, ampliando a população de resistentes. Estudos envolvendo o monitoramento da resistência herdada por esta espécie, frente aos inseticidas, assim como o conhecimento da diversidade genética, podem subsidiar no delineamento de estratégias de controle desse vetor, podendo repercutir na redução do contato vetor hospedeiro. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a frequência das mutações *kdr* Val1016Ile e Phe1534Cys relacionadas com a resistência a piretróide e detectar a variação genética do gene NADH desidrogenase, subunidade 4 - ND4, do DNA mitocondrial de seis populações naturais de *Ae. aegypti* do Estado do Paraná – Brasil: Alvorada do Sul, Marilena, Maringá, Nova Londrina, Paranavaí e São Carlos do Ivaí. Para avaliar a presença das mutações *kdr* foram genotipados 345 adultos de *Ae. aegypti* provenientes das seis populações do Paraná. Para a análise da variabilidade genética foram amostrados de 13 a 29 adultos de cada população, totalizando 120 adultos. Os resultados das populações avaliadas apresentaram polimorfismos simultâneos, no entanto a média da frequência da junção dos alelos mutantes 1016Ile + 1534Cys foi de 55%, indicando que metade das populações apresenta altos índices dos dois alelos mutantes. Com relação ao estudo da diversidade genética a análise mostrou a existência de 40 haplótipos e 44 sítios polimórficos polimórficos. O haplótipo H1 foi o mais frequente, representando 57,5% do total, não sendo detectado apenas na população de Alvorada do Sul. Os haplótipos obtidos para as populações do Paraná quando comparados com os disponíveis para América indicam uma relação com as populações provenientes da Amazônia Brasileira, Sudeste do Brasil, Peru, México e América do Norte. A diversidade genética foi reduzida,  $h = 0,301$ ;  $\pi = 0,005$ ;  $k = 0,655$ . Os testes de neutralidade não foram significativos, indicando que o polimorfismo genético está de acordo com o modelo neutro de mutações. A variação genética foi maior dentro das populações (86,28%), sendo a análise significativa ( $F_{ST} = 0,13$ ) demonstrando estruturação genética. Conclui-se que as ações de controle do *Ae. aegypti* no Paraná utilizando piretróides devem ser

avaliadas levando-se em consideração à presença significativa das mutações envolvidas no mecanismo de resistência. A variabilidade genética reduzida indica à intensa pressão de seleção ocasionada pela ação do controle químico, utilizado para combater o vetor, os valores sugerem uma redução no tamanho das populações embora positivo no curto prazo, podem resultar na perda de eficiência na repetição continuada do mesmo produto no controle químico do vetor.

Palavras-chave: Canal de sódio voltagem dependente. Controle químico. *Kdr* Diversidade genética. ND4.

## ABSTRACT

*Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), is considered of great epidemiological importance being the vector of dengue virus, yellow fever, Chikungunya and Zika virus. It is globally distributed in the tropics, and all Brazilian states. The use of chemical control, results in an intense selection pressure, increasing the population of resistant. Studies involving the monitoring of resistance inherited by this species, compared to insecticides, as well as knowledge of genetic diversity, can support the development of this vector control strategies, which may cause the reduction of contact vector / host. Thus, this study aimed to evaluate the frequency of kdr mutations Val1016Ile and Phe1534Cys related to resistance to pyrethroid and detect the genetic variation of the NADH dehydrogenase gene, subunit 4 - ND4, the mitochondrial DNA of six natural populations of *Ae. aegypti* of Paraná – Brazil: : Alvorada do Sul, Marilena, Maringá, Nova Londrina, Paranavaí and São Carlos do Ivaí. To evaluate the presence of kdr mutations were genotyped 345 of *Ae. aegypti* from the six populations of Paraná. For the analysis of genetic variability were sampled 13-29 adult population each, totaling 120 adults. The results of the evaluated populations showed simultaneous polymorphisms, however the average frequency of the junction mutant alleles 1016Ile + 1534Cys was 55%, indicating that half of the population has high levels of both mutant alleles. Regarding the study of genetic diversity analyzes showed 40 haplotypes and 44 polymorphisms. The Haplotype H1 was the most frequent, accounting for 57.5% of the total, not being detected only in the population of Alvorada do Sul. The haplotypes obtained for the populations of Paraná when compared with those available to America indicates a relationship with the population from Brazilian Amazon, southeast Brazil, Peru, Mexico and North America. Genetic diversity was low,  $h = 0.301$ ;  $\pi = 0.005$ ;  $k = 0.655$ , neutral tests were not significant, indicating that the polymorphism is according to the model of neutral mutations. Genetic variation was greater within populations (86.28%), with meaningful analysis ( $F_{ST} = 0.13$ ) demonstrating genetic structure. It is concluded that the control actions of *Ae aegypti* at Parana using pyrethroids must be evaluated taking into consideration the significant presence of mutations involved in resistance mechanism. The limited genetic diversity indicates the intense selection pressure caused by the action of chemical control, used to combat the vector, values suggest a reduction in size of the population although



positive in the short term, can result in loss of efficiency in the continuous repetition of the same product in vector chemical control.

Keywords: sodium channel voltage dependent. Chemical control. Kdr Genetic diversity. ND4.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01: Mapa global da distribuição prevista de *Ae. aegypti* (a partir de 0- azul para 1- vermelho) resolução espacial de 5 km × 5 km.....17
- Figura 02: Canal de sódio voltagem dependente - abaixo especificada a posição dos sítios 1016 e 1534. Adaptado de Wakeling, 2012.....22
- Figura 03: Mapa do Estado do Paraná indicando os Municípios aonde foram realizadas as coletas.....26
- Figura 04: Amostras amplificadas do fragmento do gene *ND4* em gel de agarose. M: Marcador molecular de 400 pb; 1 ao 14 são amostras ,e controle negativo....33
- Figura 05: Amplificação do fragmento do gene envolvido com a resistência aos piretróides através da mutação Val1016Ile(A) e Phe1534Cys (B).....35
- Figura 06: Rede de haplótipos do gene *ND4* de *A. aegypti* para as seis populações do Paraná. Para a construção da rede de haplótipos utilizou-se um haplótipo de cada. Os círculos menores, que ligam os haplótipos identificados, correspondem aos haplótipos não amostrados (*missing haplotypes*) e classificados como intermediários.....44
- Figura 07: Rede de haplótipos do gene *ND4* de *Ae. aegypti* para as populações das Américas Gonçalves *et al.* (2012) incluindo os haplótipos dos seis minucípios do Paraná do presente estudo. Os Indivíduos referentes a esta análise foram renomeados com PR junto ao número do haplótipo(ex:H1PR), para diferenciar dos haplótipos (H) encontrados por Gonçalves *et al.* (2012).....45
- Figura 08: Correlação entre as distâncias genética e geográfica utilizando o teste de Mantel para as seis populações de *Ae. aegypti*.....47

Figura 9: Dendrograma observado entre os 40 haplótipos de *Aedes aegypti*. Utilizou-se o método de Neighbor-Joining, seguindo o modelo de distância genética de Tamura-Nei. Os valores de bootstrap encontram-se nos ramos. *Aedes albopictus* como grupo externo.....48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Informações gerais dos municípios aonde foram coletadas as populações de <i>Ae. aegypti</i> utilizadas neste estudo.....	27
Tabela 02: Número de espécimes utilizados nas análises moleculares nos seis municípios do Estado do Paraná.....	28
Tabela 03: <i>Primers</i> utilizados para a mutação Val1016Ile.....	30
Tabela 04: <i>Primers</i> utilizados para a mutação Phe1534Cys.....	31
Tabela 05: Frequências genótípicas e alélicas da mutação Val1016Ile das populações de <i>Aedes aegypti</i> nos municípios Paranaenses.....	36
Tabela 06: Frequências genótípicas e alélicas da mutação Phe1534Cys das populações de <i>Aedes aegypti</i> nos municípios Paranaenses.....	37
Tabela 7: Alelos em ambos os sítios.....	38
Tabela 08: Frequências Alélicas dos sítios ligados 1016 + 1534 dos seis municípios do Paraná.....	38
Tabela 09: Frequências genótípicas dos sítios 1016 +1534 ligados e Equilíbrio Hardy-Weinberg.....	39
Tabela 10: Dados referentes à variabilidade genética.....	40
Tabela 11: Frequências Haplotípicas nas seis populações de <i>Ae. aegypti</i> do Paraná.....	41
Tabela 12: Posições variáveis nos 40 haplótipos do fragmento do gene ND4 de <i>Ae. aegypti</i> observados nas seis populações do Paraná.....	43

Tabela 13: Diversidade genética e testes de neutralidade calculados para as seis populações de <i>Ae. aegypti</i> .....	46
Tabela 14: Análise da variância molecular (AMOVA) considerando as populações de <i>Aedes aegypti</i> das seis populações do Paraná .....	46
Tabela 15: Valores de $F_{st}$ par-a-par (acima da diagonal) e número efetivo de migrantes (abaixo da diagonal). Os valores de p com asterisco apresentaram diferenças significativas( $P < 0,05$ ).....	46

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AMOVA - análise da variância molecular

pb - Pares de base

CA - Carbamatos

CHKV - Vírus Chikungunya

Cys- Cisteína

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EHW - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Ile - isoleucina

*kdr - knockdown resistance*

LEMV- Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária

MoReNAa - Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti*

ND4 - nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 4

OC – Organoclorados

OMS – Organização Mundial da Saúde

OP - Organofosforados

Phe – Fenilalanina

PY - Piretróide

RIDL - *Release of Insect Carrying a Dominant Lethal gene*

SDS - Dodecilo Sulfato de Sódio

TBE - Tris Hidrocloro + Borato + EDTA

TE - Tris Hidrocloro + EDTA

Val - valina

X<sup>2</sup> - Chi quadrado

ZIKV – Zika Vírus

WHO – *World Health Organization*

WHOPES - *World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 <i>Aedes aegypti</i> - O Vetor e a Saúde Pública.....	16
1.2 Controle do vetor.....	18
1.3 Piretróides (PYs) e o fenótipo <i>Kdr</i> .....	20
1.4 Diversidade Genética.....	22
<b>2.JUSTIFICATIVA</b> .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	25
3.1 Objetivo geral .....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
4.1 Locais de Coleta.....	26
4.2 Procedimentos em Campo.....	27
4.3 Procedimentos em Laboratório.....	27
4.3.1 Extração de DNA .....	29
4.3.2 PCR alelo-específica para as mutações Val1016Ile e Phe1534Cys.....	29
4.3.3 Amplificação, Purificação, Sequenciamento e análises do fragmento do gene ND4.....	32
4.3.4 Análises – ND4.....	33
<b>5. RESULTADOS</b> .....	35
5.1 Frequências Genotípicas e Alélicas da mutação Val1016Ile.....	35
5.2 Frequências Genotípicas e Alélicas da mutação Phe1534Cys.....	36
5.3 Agrupamento genotípico nos sítios 1016 e 1534 do Canal de Sódio-Voltagem Dependente.....	37
5.4 Variabilidade Genética - ND4.....	40
5.4.1 Distribuição e frequência dos haplótipos.....	40
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	49
6.1 <i>KDR</i> .....	49
6.2 Variabilidade genética.....	52
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55

## INTRODUÇÃO

### 1.1 *Aedes aegypti* - O Vetor e a Saúde Pública

A família Culicidae (Ordem Diptera), compreende um diverso grupo de mosquitos distribuídos mundialmente. Esta família apresenta duas subfamílias Anophelinae (482 espécies) e Culicinae (3.119 espécies) e 3.601 espécies. Culicinae está dividida em 11 Tribos, sendo que destas, a Tribo Aedini é a maior com 1.261 espécies (Harbach, 2007, Wilkerson *et al.*, 2015).

Inserido na Tribo Aedini encontramos o gênero *Aedes*, que assim como os gêneros *Anopheles* e *Culex*, possuem muitas espécies vetoras de arbovírus e outros patógenos, tornando-os mais conhecidos devido à importância à saúde pública (Wilkerson *et al.*, 2015).

*Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), é um culicídeo com origem no continente Africano (Christophers, 1960). Estudos sobre a biologia evolutiva e genética de populações apoiam a hipótese do *Ae. aegypti* Africano ser a linhagem ancestral do vetor, contudo, as populações que estão fora da África pertencem a uma das duas linhagens principais, estas associadas ao Oeste ou Leste da África (Brown *et al.*, 2011, Moore *et al.* 2013).

A introdução do vetor nas Américas ocorreu através de barcos vindos da Europa, durante as primeiras explorações e colonizações, o primeiro registro no Brasil foi em 1898 e em 1976 ocorreu à reintrodução do vetor no país (Braga & Valle, 2007b).

Esta espécie é encontrada entre as latitudes 45°n e 35° s, nas regiões tropicais e subtropicais (WHO 2013). Kraemer *et al.*, 2015 indicam a probabilidade de ocorrência de *Ae. aegypti* baseando-se nos dados mais atualizados relacionados ao conhecimento da localização da espécie, combinadas às informações referentes às condições ambientais em todo o mundo (Figura 1).

O vetor foi vinculado e reconhecido como transmissor da febre amarela em 1881, no entanto, a ligação do mosquito como vetor do vírus da dengue foi evidenciado em 1906 (Braga & Valle, 2007b).



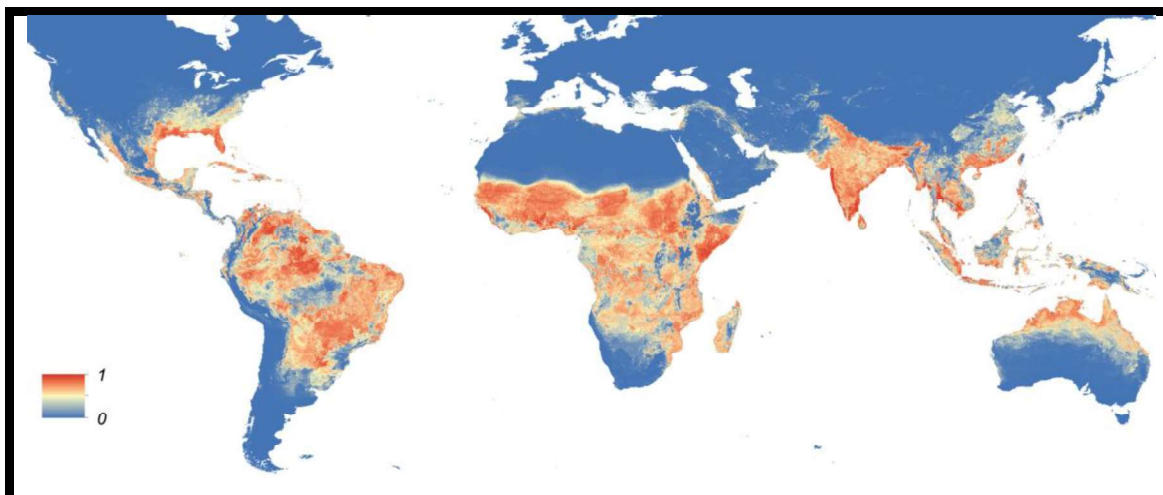


Figura 1: Mapa global da distribuição prevista de *Ae. aegypti*. (a partir de 0- azul para 1- vermelho, resolução espacial de 5 km × 5 km). Fonte: Kraemer *et al.*, (2015).

As epidemias de dengue estavam presentes em nove países antes de 1970, atualmente é endêmica em mais de 100 países (Gubler, 1998; WHO, 2016).

No Brasil a dengue adquiriu importância epidemiológica a partir de 1986, devido à epidemia no Estado do Rio de Janeiro e a circulação logo alcançou a Região Nordeste (Schatzmayr, 2000; Braga & Valle, 2007b).

No Estado do Paraná a primeira notificação de casos autóctones de dengue, ou seja, com a origem da infecção no próprio Estado, ocorreu em 1993, no período de agosto de 2015 a junho de 2016 foram notificados 48.789 casos autóctones de dengue (SESA-PR, 2016).

A preocupação envolvendo o vetor *Ae. aegypti* ganhou outra dimensão, pois além das viroses conhecidas, outros arbovírus estão agravando a situação global, o vírus Chikungunya (CHKV) e o Zika (ZIKV) vírus. O primeiro registro do ZIKV no Brasil foi em 2015, e a análise filogenética sugere que esta população do nordeste brasileiro pertence ao clado asiático (Zanluccha *et al.*, 2015).

A OMS relatou a transmissão autóctone de ZIKV em 55 países, destes, 42 registraram o primeiro caso de ZIKV, diante desta situação a Organização Mundial da saúde declarou em primeiro de fevereiro de 2016 emergência de saúde pública internacional, em setembro do mesmo ano a transmissão de ZIKV está sendo indicada em 67 países (Cayla *et al.*, 2016; WHO, 2016).

O ZIKV estava associado a diagnósticos leves antes do surto de 2015 no Brasil, onde ocorreu um aumento dramático nos casos de microcefalia e da

síndrome de Guillain-Barré, ambas relacionadas à suas propriedades neurotrópicas (Solomon *et al.*, 2016).

A associação entre Síndrome de Guillain-Barré e ZIKV foi descrita na Polinésia Francesa em 2013 (Oehler *et al.*, 2014). Nos anos de 2015 e 2016 o aumento de casos da síndrome de Guillain-Barré foi observado em 13 países, no Brasil 1.198 casos de microcefalia e outros transtornos neurológicos foram detectados (Caylá *et al.*, 2016).

O Paraná registrou um caso autóctone de CHKV confirmado e outros três casos importados, ZIKV foram registrados 84 casos desde agosto de 2015, sendo 32 casos autóctones, 38 importados e 14 indefinidos sobre a origem (SESA-PR, 2016).

## 1.2 Controle do vetor

Em 2002 a secretaria municipal de saúde do Paraná, assim como as demais secretarias do país e com o apoio do Ministério da Saúde, passaram a gerir e a executar as ações do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que se baseava em componentes principais como a vigilância epidemiológica, o combate ao vetor por diferentes meios, assistência aos pacientes, ações de saneamento ambiental, ações integradas de educação em saúde, comunicação e mobilização social, sustentação político-social e acompanhamento do PNCD (Ministério da Saúde, 2002).

No controle do *Ae. aegypti* são utilizados uma combinação de métodos que inclui o controle mecânico, biológico e químico, sendo que o controle mecânico envolve a participação da população e das autoridades públicas, essenciais para redução dos criadouros do vetor (Braga & Valle 2007b).

No controle biológico temos como exemplo a utilização do *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) que demonstrou ser um larvicida eficaz, causando elevada mortalidade nas larvas contaminadas, este fato ocorre devido à liberação de toxinas que são ativadas no intestino das larvas, onde causam ruptura das membranas celulares provocando alterações no intestino, levando a sua morte (Boyce *et al.*, 2013)

Para a realização do controle químico do vetor, muitos inseticidas foram desenvolvidos, porém quatro classes de inseticidas são utilizadas em saúde

pública: os organoclorados (OC), piretróides (PY), carbamatos (CA) e organofosforados (OP), todos estes inseticidas são neurotóxicos, porém OC e PY atuam na transmissão axônica, enquanto CA e OP agem na transmissão sináptica, no entanto, o efeito final é o mesmo hiperativação de neurônios e músculos, resultando na paralisia e morte (Braga & Valle 2007b).

No Brasil, os produtos utilizados para o controle químico estão sustentados na recomendação global, *World Health Organization* (WHO), por meio do *World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme* (WHOPES) (Valle *et al.*, 2015).

De acordo com a organização, WHOPES, são recomendados nove princípios ativos para o controle de larvas, sendo que cinco são neurotóxicos (Clorpirifos, Fention, Pirimifós-metil, Temephos e Spinosad), três são reguladores do desenvolvimento (Diflubenzuron, Novaluron e Piriproxifen), conhecidos como IGR (*Insect Growth Regulator*) e um Biolarvicida contendo Bti (WHOPES, 2010).

Os adulticidas recomendados pela mesma organização são cinco (Malathion, Deltametrina, Lambda-cialotrina, Permetrina e Transcifenotrina) todos neurotóxicos, dos quais com exceção do Malation, OP, todos os outros são PYs (WHOPES, 2010).

Atualmente, em abril de 2016 o Estado do Paraná iniciou um novo ciclo de aplicação do fumacê/nebulização (PY), através de novos veículos devem incorporar a frota, equipada para a aplicação do inseticida em todo o Paraná (SESA-PR, 2016). Essa nebulização não é seletiva, e seu uso indiscriminado para combate de outros insetos não é recomendado (WHO, 2016).

Para que o controle não se baseie apenas na utilização destes inseticidas químicos outras opções de controle estão sendo testadas, e baseadas em vertentes referentes à eliminação do vetor ou substituição das populações do inseto por outra da mesma espécie (Harrys *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2011; Maciel-de-Freitas *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014; Ritchie, 2014; Carvalho *et al.*, 2015; Joubert *et al.*, 2016; Ritchie *et al.*, 2015).

Um exemplo são os mosquitos transgênicos, também conhecidos como RIDL (*Release of Insect Carrying a Dominant Lethal gene*), tratam-se de linhagens de *Ae. aegypti* machos criadas em laboratório que carregam um gene dominante letal para a prole (Carvalho *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2015).

Uma alternativa também são os mosquitos infectados com a bactéria endossimbiótica *Wolbachia pipientis*, utilizadas como estratégias de controle demonstraram que, ao colonizar os mosquitos, provoca esterilidade e redução da transmissão de arbovírus, portanto, bloqueando a transmissão do vírus da dengue no *Aedes aegypti*, ocorrendo uma vantagem reprodutiva devido à chamada 'incompatibilidade citoplasmática', ou seja, fêmeas com *Wolbachia* sempre geram descendentes com *Wolbachia* no processo de reprodução, independentemente do macho possuir ou não a bactéria, portanto, o sucesso desta estratégia está diretamente ligado à capacidade de reprodução do inseto (Ritchie *et al.*, 2014; Ritchie *et al.*, 2015; Joubert *et al.*, 2016).

Diante da falta de uma solução única e plausível para o controle do *Ae. aegypti*, a integração de diferentes estratégias de controle do vetor, parece ser o mecanismo viável para a redução da infestação dos mosquitos e a incidência das arboviroses transmitidas por eles.

### 1.3 Piretróides (PYs) e o fenótipo *Kdr*

Os PYs são uma importante classe de inseticidas neurotóxicos, o uso de cipermetrina e deltametrina, representam aproximadamente 25% do mercado mundial, e isto se deve ao fato de agir rapidamente, ser biodegradáveis, não cumulativo e raramente tóxico a aves e mamíferos (Braga & Valle, 2007; Santos *et al.*, 2007).

Geralmente, a exposição dos seres humanos aos PYs ocorre pela ingestão de resíduos presentes nos alimentos e inalação após o uso no interior de domicílios (Santos *et al.*, 2007).

O fato deste vetor ser um mosquito essencialmente urbano faz com que ele esteja constantemente exposto aos inseticidas, liberados por ações do agente público quanto no privado, portanto, vulneráveis a pressão de seleção em direção a resistência, de populações naturais de *Ae. aegypti* (Martins *et al.*, 2009; Ranson, *et al.*, 2010).

A resistência aos PYs foi detectada apenas alguns anos após a sua utilização, e foi relacionada à pressão de seleção exercida pelo uso contínuo do Organoclorado DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) no passado (Pereira-da-Cunha *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2009).

Entre os quatro mecanismos de resistência apontados por Montella (2007), trataremos sobre a modificação do sítio alvo, que são alterações na sequência de DNA que codificam a molécula alvo do inseticida.

Os PYs atuam no sistema nervoso central e periférico do inseto, tendo como alvo o canal de sódio voltagem - dependente, localizado na membrana do axônio dos neurônios (Davies *et al.*, 2007).

Os canais de sódio dependentes de voltagem são essenciais para a iniciação e propagação do potencial de ação em neurônios e outras células excitáveis, agem modificando a cinética de propagação do canal, prolongando ou impedindo o fechamento normal do canal (Catterall, 2000).

A estrutura destes canais compreende quatro domínios homólogos (I, II, III e IV) sendo cada domínio composto por seis segmentos (S-1 a S-6) (Figura 2), a interação entre o inseticida e o canal de sódio pode ocorrer em qualquer um dos domínios, no entanto, essa ligação ocorre com mais frequência no domínio II e apresentam maior afinidade pelo canal aberto (Wakeling *et al.*, 2012).

A constância do canal aberto após a ligação do PY ao seu sítio alvo faz com que ocorram repetitivas descargas motoras, causando hiperexcitabilidade, paralisia e morte do inseto, esta situação é conhecida como efeito *knockdown*, portanto, o funcionamento correto do potencial de ação através do canal de sódio é essencial para a propagação dos impulsos nervosos do inseto (Martins & Valle, 2012).

Mutações no canal de sódio dependentes de voltagem provocam o efeito *Kdr* (*Knockdown Resistance*), termo genérico aplicado a insetos, que ao entrar em contato com o inseticida perdem momentaneamente a atividade coordenada, recuperando após o efeito do mesmo, estas mutações *Kdr* podem levar a mudanças de conformação em todo o canal, a substituição de um único aminoácido neste canal pode estar associada às mutações *Kdr* (Kawada, 2009; Garcia, 2009).

A primeira mutação identificada como responsável pelo efeito *Kdr* foi à substituição de uma *Leucina* por uma *Phenilalanina* na posição 1014 (Leu1014Phe) no segmento IIS6 do canal de sódio voltagem dependente de *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Martins & Valle, 2012).

A presença de mutações pontuais em genes estruturais é o mecanismo mais comum de resistência, e para que estas mutações sejam selecionadas favoravelmente, a mudança no aminoácido deve diminuir a união ao inseticida, porém sem causar perda da função primária do sítio-alvo (Montella *et al.*, 2007).

Mutações em posições diferentes têm sido registradas em populações de *Ae. aegypti* da América Latina e do Sudeste Asiático, e estão relacionadas com a resistência à PYs (Martins & Valle, 2012).

Neste trabalho as mutações analisadas estão localizadas nos sítios 1016 e 1534. A mutação Val1016Ile é resultado da substituição de uma valina por uma isoleucina (GTA-ATA) e a mutação Phe1534Cys resultou na substituição de uma fenilalanina por uma cisteína (TTC-TGC), e estão localizadas, respectivamente nas regiões IIS6 e IIS6 dos canais de sódio, conhecidos pelo envolvimento na interação com piretróides (Figura 2) (Linss *et al.*, 2014).

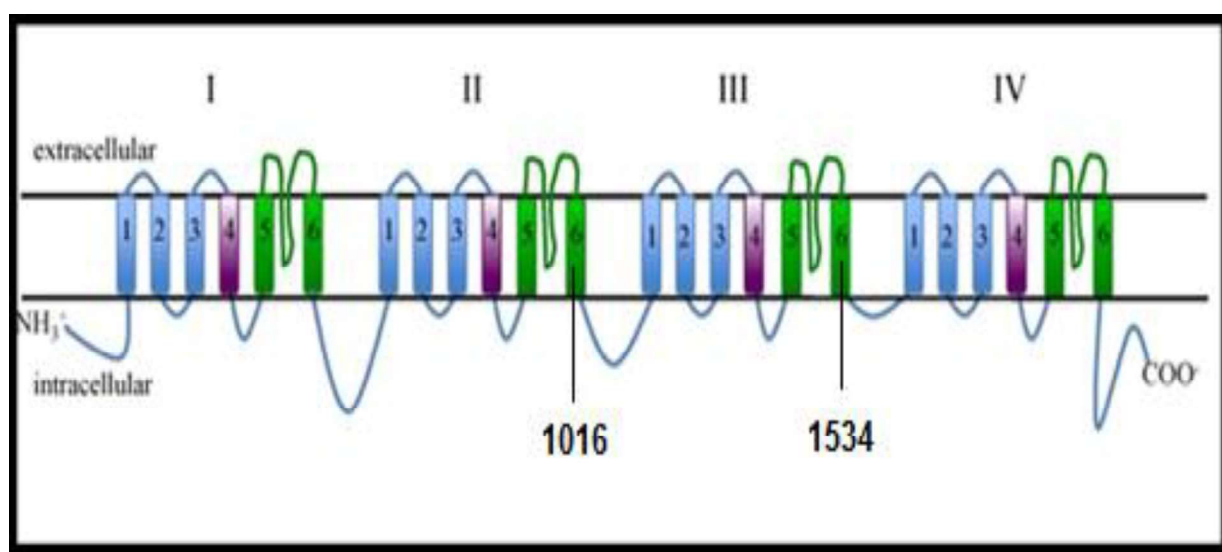


Figura 2: Canal de sódio voltagem - dependente. Domínios homólogos (I-IV), cada um com seis segmentos hidrofóbicos (1-6). Abaixo estão especificadas a posição dos sítios 1016 e 1534 - Adaptado de Wakeling *et al.*, 2012.

#### 1.4 Variabilidade Genética

A diversidade genética de populações de *Ae. aegypti* têm sido analisados com o objetivo de conhecer a estrutura genética e, então, compreender a dinâmica das populações e os fatores que podem interagir com elas, como a competência vetorial, resistência a inseticidas e a adaptação ecológica,

fornecendo dados que podem levar a novas medidas de controle (Martins & Valle, 2012).

A variabilidade genética em populações naturais de *Ae. aegypti* têm sido investigadas utilizando marcadores moleculares como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Hiragi *et al.*, 2009), microssatélites (Paupy *et al.*, 2010), SNPs (single nucleotide polymorphism) (Hemme *et al.*, 2010), e DNAm (DNA mitocondrial) principalmente utilizando ND4 (Gorrochotegui- Escalante *et al.*, 2002; Costa-da-Silva *et al.*, 2005; Herrera *et al.*, 2006, Bracco *et al.*, 2007; Bosio *et al.*, 2005; Herrera *et al.*, 2006; Paduan & Ribolla, 2008; Urdaneta-Marquez *et al.*, 2008; Lima-Junior & Scarpassa, 2009; Bona *et al.*, 2012; Twerdochlib *et al.*, 2012; Aguirre-Obando *et al.*, 2015; Nunes *et al.*, 2016).

A constatação de polimorfismos envolve a amplificação, o sequenciamento e o alinhamento das sequências, obtidas de cada indivíduo estudado, resultando em um alinhamento global (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013).

As análises genéticas utilizando o DNA mitocondrial de *Ae. aegypti*, em particular, ocorrem no gene ND4 (codificante da subunidade 4 da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase - NADH desidrogenase), pois, apresentam sequências polimórficas, portanto, o gene mitocondrial ND4 é uma ótima ferramenta para a análise de estrutura populacional genética e eventos de colonização em *Ae. aegypti* (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2002; Twerdochlib *et al.*, 2012).

Os estudos populacionais e filogenéticos apresentam uma peculiaridade na utilização do DNAm devido a presença de pseudogenes. Pseudogenes mitocondriais nucleares (NUMTs) são inserções de genes mitocondriais que evoluem independentemente do genoma mitocondrial, devido ao fato do DNAm e NUMTs possuírem genealogias e história evolutiva separadas, como consequência essas sequências não funcionais podem acumular mutações livremente, portanto, amostras com misturas de DNAm e NUMTs afetam o resultado de análises (Hlaing *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2012).

A pressão exercida artificialmente com a utilização do controle químico pode influenciar a variabilidade genética das populações de *Ae. aegypti*, assim como a presença do efeito *Kdr*.

## 2 JUSTIFICATIVA

O vetor *Aedes aegypti* tem utilizado com sucesso os espaços urbanos para o seu desenvolvimento e multiplicação, determinando o agravamento do quadro de saúde pública, principalmente com a ampliação no número de arbovírus veiculados por este vetor. Este recrudescimento da presença do vetor na área urbana é decorrência de múltiplos fatores relacionados tanto às características biológicas do vetor como de determinantes sociais e econômicos que mantêm em situação precária a qualidade da estrutura urbana.

Com agravamento da transmissão de arbovírus, como o *Zika* vírus com terríveis sequelas, principalmente em recém-nascidos, somado a transmissão do vírus da dengue e *Chikungunya*, o caminho do controle químico de forma preponderante embora seja uma solução rápida no curto prazo, não é sustentável diante da seleção da resistência que determina em grande medida a redução da eficiência deste componente de controle, principalmente quando utilizado com frequência. O monitoramento do quadro de resistência na população do vetor é essencial.

Diante da necessidade de investigar como a pressão de seleção a estes inseticidas pode afetar a estrutura genética e a frequência alélica dos sítios ligados 1016 e 1534 que conferem resistência aos piretróides, serão investigadas populações de *Ae aegypti* do Estado do Paraná, que apresentou quadro de agravamento da transmissão de arbovírus.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Analisar a variabilidade genética e verificar a presença e frequência das mutações Val1016Ile e Phe1534Cys e dos sítios ligados 1016 e 1534 no gene do canal de sódio de diferentes populações de *Ae. aegypti* provenientes do Estado do Paraná – Brasil.

#### 3.2 Específicos

- Verificar a presença e frequência das mutações Val1016Ile e Phe1534Cys no gene do canal de sódio encontradas em seis populações de campo de *Ae. aegypti* do Estado do Paraná, destas, duas populações analisadas por regiões.
- Analisar a presença e frequência dos sítios ligados 1016 e 1534.
- Verificar a frequência das mutações Val1016Ile e Phe1534Cys e dos sítios ligados 1016 e 1534, nos dois municípios analisados por regiões.
- Analisar a diversidade genética e fluxo genético das seis populações de *Ae. aegypti* localizadas no Estado do Paraná, utilizando o marcador mitocondrial - ND4.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

O Estado do Paraná ( $25^{\circ}15'07,52''$  S e  $52^{\circ}01'17,55''$  O) localizado na região Sul do país, é uma das 27 unidades federativas do Brasil e o sexto estado mais populoso, sendo a população estimada em 2010 com 10.439.601 habitantes, destes, 8.906.442 habitantes viviam na zona urbana e 1.533.159 na zona rural (IBGE, 2010).

O Paraná abrange uma área de 199.307,22 km<sup>2</sup> está dividido em 39 microrregiões e 10 mesorregiões, subdivididos em 399 municípios. Localizado entre planície litorânea e três planaltos.

Foram analisadas populações de *Ae. aegypti* provenientes de seis municípios localizados no Estado do Paraná - Brasil: Alvorada do Sul, Marilena, Maringá, Nova Londrina, Paranavaí e São Carlos do Ivaí (Figura 3). O Clima é Subtropical (*Alvorada do Sul*, *Maringá*, *Marilena*, *Nova Londrina* e *São Carlos do Ivaí*) e Tropical de altitude (*Paranavaí*).

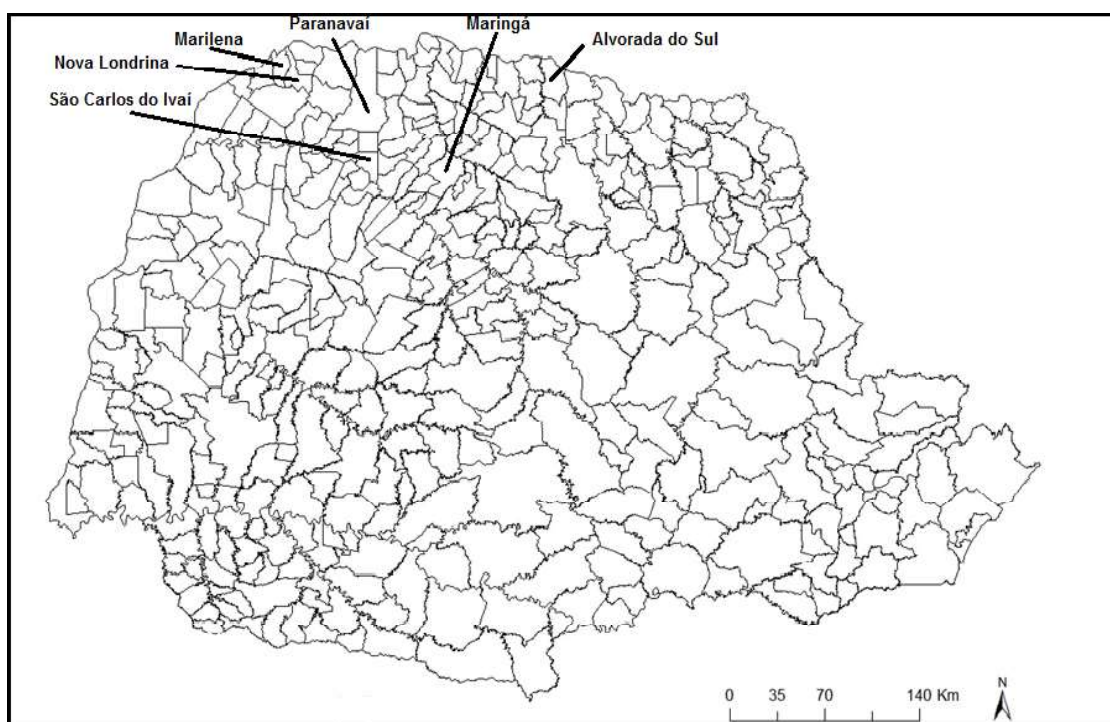


Figura 3: Mapa do Estado do Paraná indicando os Municípios aonde ocorreram às coletas.

Na tabela 1, encontram-se informações relacionadas para cada ponto de coleta.

Tabela 1 – Relação dos municípios e os respectivos códigos, as coordenadas geográficas e período de amostragem das populações de *Aedes aegypti*.

Fonte: IBGE 2010

Município	Código	Coordenadas	Mesorregião	População	Coleta
<b>Alvorada do Sul</b>	AS	22° 46' 48" S 51° 13' 51" O	Norte Central	10.298 hab.	2014
<b>Marilena</b>	MR	22° 44' 09" S 53° 02' 24" O	Noroeste	6.854 hab.	2014
<b>Maringá</b>	MG	22° 44' 09" S 53° 02' 24" O	Norte Central	391.698 hab.	2013
<b>Nova Londrina</b>	NL	22° 45' 57" S 52° 59' 06" O	Noroeste	13.461 hab.	2014
<b>Paranavaí</b>	PV	23° 04' 22" S 52° 27' 54" O	Noroeste	86.218 hab.	2013
<b>São Carlos do Ivaí</b>	SC	23° 18' 54" S 52° 28' 33" O	Noroeste	6.352 hab.	2013

#### 4.2 Procedimentos de coleta

Entre os anos de 2013 e 2014, os respectivos Núcleos de Entomologia da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná coletaram ovos de *Aedes spp*, no âmbito da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência de *Aedes aegypti* (MoReNAa).

As coletas foram realizadas semanalmente utilizando armadilhas de oviposição, conhecidas como ovitrampas (Fay & Elialson, 1966). Após a coleta das ovitrampas, o material foi encaminhado ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) localizado na Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zoologia.

#### 4.3 Procedimentos em laboratório

A criação foi realizada no LEMV em condições similares de temperatura ( $25 \pm 1$  °C), umidade ( $80 \pm 10$  %) e fotoperíodo (12h: 12h). As palhetas com os ovos foram submersas em copos plásticos de 770 mL contendo água desclorada e ração para gatos triturada (Purina® Cat Chow ® aproximadamente 10 gr), por

48 horas para induzir a eclosão das larvas. Após a eclosão, as larvas foram criadas segundo protocolo padrão do laboratório até a emergência dos adultos. Para cada município, foram coletados machos de *Ae. aegypti* recém-emergidos para a verificação das mutações Val1016Ile e Phe1534Cys assim como o gene ND4. Cada adulto foi previamente congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  em álcool absoluto (99,5%) individualizados em tubo de 1,5 mL.

Na tabela 2 encontra-se o número total de espécimes utilizados nas análises dos seis municípios do Estado do Paraná, especificando os dois Municípios analisados por regiões, Alvorada do sul e Maringá, ambos amostrados em seis regiões diferentes.

Tabela 2: Número de espécimes utilizados nas análises moleculares nos seis municípios do Estado do Paraná. \*Município analisado por regiões

<b>CÓD</b>	<b>MUNICÍPIO</b>	<b>Val1016Ile</b>	<b>Phe1534Cys</b>	<b>ND4</b>
<b>*AS</b>	<b>Alvorada do Sul</b>	<b>114</b>	<b>114</b>	<b>13</b>
	Zona Norte	20	20	
	Zona Sul	18	18	
	Zona Leste	19	19	
	Zona Oeste	18	18	
	Centro	20	20	
	Povoado	19	19	
<b>*MG</b>	<b>Maringá</b>	<b>110</b>	<b>110</b>	<b>18</b>
	Regional 1	20	20	
	Regional 2	18	18	
	Regional 3	20	20	
	Regional 4	12	12	
	Regional 5	20	20	
	Regional 6	20	20	
<b>MR</b>	<b>Marilena</b>	<b>33</b>	<b>33</b>	<b>13</b>
<b>NL</b>	<b>Nova Londrina</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>19</b>
<b>PV</b>	<b>Paranavaí</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>
<b>SC</b>	<b>São Carlos do Ivaí</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>29</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>345</b>	<b>345</b>	<b>120</b>

As palhetas dos municípios analisados por regiões foram separadas, e a criação ocorreu de acordo com a localização específica, esta separação foi feita em decorrência do método de coleta estabelecido pelas respectivas secretarias dos municípios.

#### 4.3.1. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada individualmente utilizando o protocolo publicado por Bona *et al.* (2012). Em cada tubo foram adicionados 160 µL de tampão de lise (TrisHCl 0,5 M, NaCl 4M, EDTA 0,5 M). Os mosquitos foram macerados em homogeneizador. Após, foi adicionado 20 µL de SDS 10% para rompimento das células. Os tubos foram incubados em banho durante 30 minutos a 60°C. Para desproteinização, foram adicionados em cada tubo 50 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) e, em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm, em centrífuga refrigerada a 15 °C.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL já identificado e adicionado 80 µL de acetato de amônio (7,5 M) e 300 µL de etanol 96%. As amostras foram homogeneizadas por inversão e levadas ao congelador a -20°C por 30 minutos para precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 13.000 rpm a 15 °C. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e adicionado 300 µL de álcool 70% para lavar o precipitado. As amostras foram centrifugadas novamente durante 5 minutos a 13.000 rpm e a 15 °C.

O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não se perder o *pellet*. Os tubos foram colocados na estufa a 37 °C para evaporar o etanol. O DNA foi ressuspensão em 30 µL de TE 1X (TrisHCl 0,5 M, EDTA 0,05 M pH 8.0) e armazenado a -20 °C. A quantificação do DNA foi realizada com o espectrofotômetro NanoDrop®.

#### 4.3.2 PCR alelo-específica para as mutações Val1016Ile e Phe1534Cys

Foi utilizada a técnica PCR alelo-específica para analisar a presença da mutação Val1016Ile e Phe1534Cys. Os iniciadores (*primer*) utilizados encontram-se nas tabelas 3 e 4.

As reações de PCR para a mutação Val1016Ile foram conduzidas utilizando o Kit Promega® contendo 2 U Taq DNA Polimerase; Tampão 1X; MgCl<sub>2</sub> 4mM; 12,5 pmols de *primer* comum para ambos os alelos e *primer* específico para o alelo selvagem (Val) e para o alelo mutante (Ile), dNTP 200µM (Amresco, Solon, OH), 100 ng/µL de DNA e água MilliQ® para completar o volume final de 12 µL.

Estas reações foram conduzidas mediante os seguintes parâmetros: um ciclo para desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 62°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, este ciclo repetido 26 vezes.

As reações referentes à mutação Phe1534Cys foram conduzidas utilizando o Kit Promega® contendo 2 U de Taq DNA Polimerase, Tampão 1X; MgCl<sub>2</sub> 4mM, 12,5 pmols de *primer* comum para ambos os alelos (Phe/Cys) e *primer* específico para o alelo selvagem (Phe) e para o alelo mutante (Cys), dNTP 200µM (Amresco, Solon, OH), 100 ng/µL de DNA e água MilliQ® para completar o volume final de 12 µL.

Os parâmetros para a mutação Phe1534Cys foram; um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 1 ciclo de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, este ciclo repetido 28 vezes.

Em cada experimento foi utilizado um controle negativo (reação sem DNA) e três controles positivos. Os controles positivos foram doados pela FIOCRUZ e a cepa Rockefeller de *Ae. aegypti* suscetível a inseticida, são mantidos pelo LEMV.

Tabela 3: *Primers* utilizados para a mutação Val1016Ile

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>pb</b>
<b>1016Val</b> <sup>+</sup>	GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCA CAA ATT GTT TCC CAC CCG CAC CGG	98
<b>1016Ile</b> <sup><i>kdr</i></sup>	GCG GGC ACA AAT TGT TTC CCA CCC GCA CTG A	78
<b>1016Val/Ile</b>	GGA TGA ACC GAA ATT GGA CAA AAG C	78-98

(<sup>+</sup>) alelos selvagens; (<sup>*kdr*</sup>) alelos mutantes ( Saavedra-Rodriguez *et al.*,2007).

Tabela 4: *Primers* utilizados para a mutação Phe1534Cys

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>pb</b>
<b>1534 Phe</b> <sup>+</sup>	TCT ACT TTG TGT TCT TCA T CA TAT T	78
<b>1534 Cys</b> <sup><i>kdr</i></sup>	TCT ACT TTG TGT TCT TCA TCA TGT G	98
<b>1534 Phe/Cys</b>	TCT GCT CGT TGA AGT TGT CGA T	78-98

<sup>(+)</sup> alelos selvagens; <sup>(*kdr*)</sup> alelos mutantes (Harris *et al.*,2010).

O resultado da amplificação foi avaliado em gel de poliacrilamida a 10%, contendo 3 µL de amostra da PCR. O amplificado avaliado contém 2 µL de Ladder ultra-específico 25bp (Invitrogen) e 1 µL de corante safer dye (KASVI®). Após a eletroforese, o gel foi transferido para o transiluminador para visualização de bandas (Figura 4). A verificação da amplificação do fragmento do gene envolvido com a resistência aos piretróides ocorre quando somente uma banda de 78bp indica homozigoto recessivo (Ile/Ile); duas bandas entre 98 e 78 bp indica heterozigoto (Val/Ile) e somente uma banda de 98 pb indica homozigoto dominante (Val/ Val). O inverso ocorre no caso da mutação Phe1534Cys em que no homozigoto recessivo (Cys/Cys) a localização da única banda ocorre em 98 pb.

A frequência genotípica  $f(x)$  representa a porcentagem de ocorrência de um determinado genótipo, por exemplo,  $x = \text{Val/Val}$ ,  $\text{Val/Ile}$  ou  $\text{Ile/Ile}$ , em relação ao número total de indivíduos observados dentro de uma população. O calculo foi feito da seguinte maneira:

$$f(x) = \frac{\text{número de indivíduos com genótipo } x}{\text{número total de indivíduos}}$$

A frequência alélica  $f(y)$  representa a porcentagem de ocorrência de determinado alelo, por exemplo,  $y = \text{alelo dominante (Val)}$  ou  $\text{alelo recessivo (Ile)}$ , em relação ao número total de alelos observados dentro de uma população. Para o calculo, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$f(A) = \frac{2 \times \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo AA} + \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo Aa}}{2 \times \text{n}^\circ \text{ total de indivíduo}}$$

$$f(a) = \frac{2 \times \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo aa} + \text{n}^\circ \text{ de indivíduos com genótipo Aa}}{2 \times \text{n}^\circ \text{ total de indivíduo}}$$

Os genótipos de mosquitos individuais para ambos os locais foram calculadas primeiro, independentemente: no sítio 1016 Val/Val (selvagens), Val/Ile (heterozigoto) e Ile/Ile (*Kdr*), e no sítio 1534 Phe/Phe (selvagens), Phe/ Cys (heterozigoto) e Cys/Cys (*Kdr*), posteriormente foram calculados os sítios agrupados.

O equilíbrio de Hardy -Weinberg descreve a influencia da reprodução ao acaso nas frequências alélicas e genótípicas numa população infinitamente grande. O equilíbrio foi avaliado pela equação clássica, sendo a hipótese nula de equilíbrio verificada por um teste qui-quadrado com três graus de liberdade, quando seis genótipos foram evidenciados (Heartl, 2008).

#### 4.3.3 Amplificação, Purificação e Sequenciamento - ND4

A amplificação do segmento de aproximadamente 336 pb do gene que expressa a subunidade 4 da enzima mitocondrial NADH desidrogenase foi realizada utilizando 20 ng/ $\mu$ L de DNA, pelo método PCR. As reações foram preparadas utilizando as seguintes concentrações finais das soluções: 10 pmols de cada iniciador (IDT, Coralville, IA, USA), Tampão 1 X (Sigma-Aldrich), 3mM MgCl<sub>2</sub> (Promega®), 5 U Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich), 0,2 mM dNTPs (Amresco), e água Milli-Q® para completar o volume final de 50  $\mu$ L de reação para cada tubo.

Os iniciadores utilizados na amplificação do segmento do gene ND4 foram: *Forward* (iniciador universal): 5'-ATT GCC TAA GGC TCA TGT AG-3'; *Reverse* (iniciador reverso): 5'-TCG GCT TCC TAG TCG TTC AT-3' (Costa da Silva, *et al.*, 2005).

As amostras foram amplificadas com as seguintes condições PCR: temperatura inicial de 94 ° C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 ° C durante 1 minuto, 56 ° C durante 30 segundos e 72 ° C por 1 minuto e finalizando numa temperatura de extensão de 72 ° C durante 7 minutos. Em cada experimento foi utilizado um controle negativo (sem DNA).

O resultado da amplificação foi avaliado em gel de agarose a 1% contendo 4  $\mu$ l de amostra da PCR, 2  $\mu$ l do marcador com peso molecular 100 Pb (Ladder-Invitrogen) e de 1  $\mu$ l de corante safer dye (KASVI) (Figura 4).



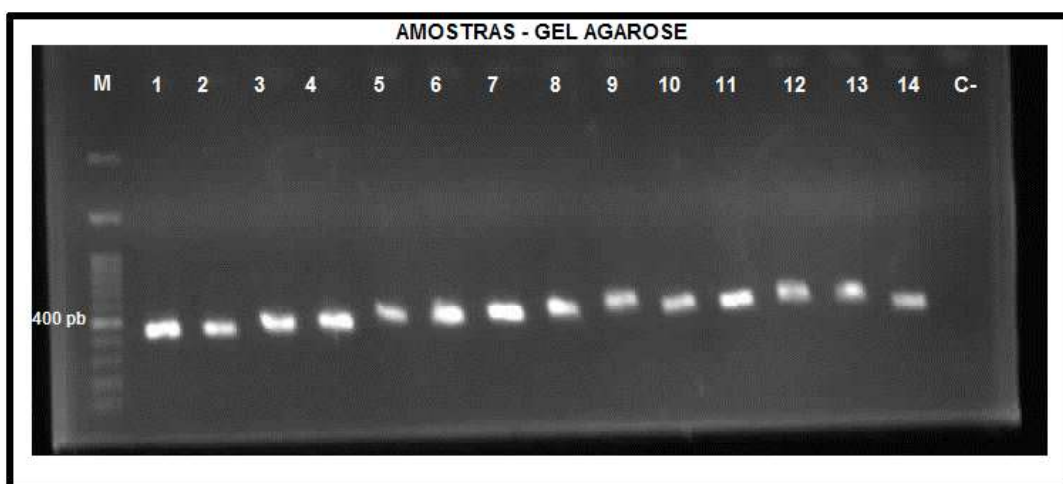


Figura 4: Amplificações do fragmento do gene *ND4* em gel de agarose. **M**: Marcador molecular de 400 pb; 1 ao 14 são amostras de populações de *Aedes aegypti* do Paraná, e **C-** é o controle negativo.

A Purificação do produto amplificado foi feita com o kit Qiaquick® *PCR purification Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany), segundo instruções do Fabricante.

Para a Reação de Sequenciamento foi utilizado o Kit ABI Big Dye Terminator®, 20 ng/μL de DNA purificado, 10 pmols de *primer* de sequenciamento e água MilliQ® autoclavada, para um volume final de 10 μL de reação. Para cada amostra foram preparadas reações *Forward* e *Reverse*. Em seguida, as amostras foram para o termociclador sob os seguintes parâmetros: 96 °C durante 1 minuto, seguido de 1 ciclo a 96 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 10 segundos e 60 °C por 2 minutos, este ciclo se repete 60 vezes. Após a amplificação, foi realizada a precipitação, as amostras precipitadas foram encaminhadas para o sequenciamento através da utilização do equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems) no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

#### 4.3.4 Análises moleculares – ND4

As sequências geradas foram analisadas no Staden Package versão 1.5 e o alinhamento foi realizado no software Geneious, ferramenta ClustalW e para a checagem das sequencias foi utilizado o Chromas, versão 2.1. As sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta tblastx para confirmação do fragmento amplificado.

A genealogia entre os haplótipos foi inferida por meio da construção de uma rede de haplótipos, que foi elaborada com o auxílio do programa TCS versão 1.21 (Clement *et al.*, 2000). Este programa estima a relação entre haplótipos com base no método de parcimônia, agrupando-os a partir das mutações obtidas em suas sequências. Tal genealogia é baseada no cálculo das frequências destes haplótipos nas populações amostradas, usando um algoritmo descrito por Templeton *et al.* (1992). Portanto, a rede de haplótipos gerada é uma reconstrução evolutiva da história genealógica da variação genética encontrada nas amostras de DNA que experimentaram pouca ou nenhuma recombinação (Templeton, 2001).

A diversidade genética e os testes de neutralidade foram calculados no programa DnaSP, versão 5.0 (Librado & Rozas 2009). A análise de variação molecular (AMOVA) foi realizada através do programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006). A estruturação das populações foi verificada através do índice de fixação ( $F_{ST}$ ) de Wright (1921) e a estimativa de fluxo gênico (Nm), obtidos pelo programa Arlequin versão 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006). Foi feita a correção de Bonferroni.

O isolamento genético por distância foi testado com auxílio do programa GenAlEx6 (Peakall & Smouse, 2012) utilizando uma matriz de distância geográfica (km) obtida através do Google Earth 6.0 e uma matriz de distância genética utilizando os valores da comparação par-a-par de  $F_{ST}$ . O software Mega versão 5.05 (Tamura *et al.*, 2007) foi usado para gerar uma árvore com o método de *Neighbor-Joining*, seguindo o modelo de distância genética de Tamura-Nei, com o emprego de 1000 réplicas. Os valores Bootstrap foram estimados com 1000 réplicas. *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1894 (GenBank # EF153761) foi usado como grupo externo.

## 5 RESULTADOS

No total deste trabalho foram genotipados 690 indivíduos para as seis populações de *Ae. aegypti* referentes às mutações *kdr* Val1016Ile e Phe1534Cys ligadas á resistência aos PYs. Os resultados foram analisados conforme mostra a figura 5.

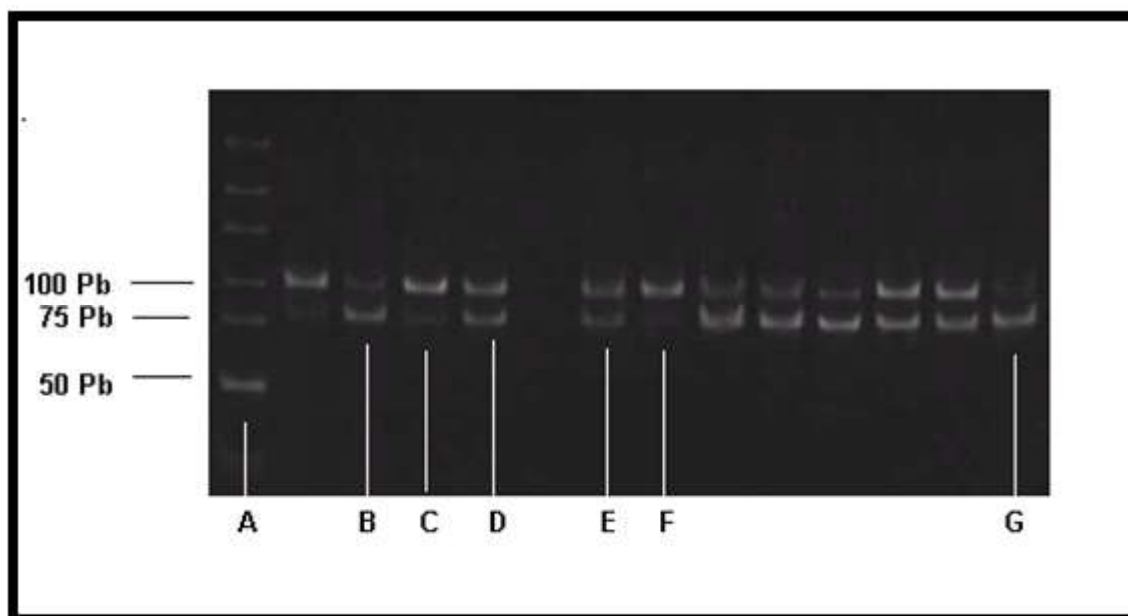


Figura 5 : Verificação da amplificação do fragmento do gene envolvido com a resistência aos piretróides. A. Marcador molecular ultra-específico 25pb. B. Somente banda de 78bp indica indivíduo homozigoto recessivo (Ile/Ile); C. Somente banda de 98 pb indica indivíduo homozigoto dominante (Val/Val); D. Bandas entre 98 e 78 bp indica indivíduo heterozigoto (Val/Ile); Referente á mutação Phe1534Cys: E. indivíduo heterozigoto (Phe/Cys); F. Somente banda de 98 pb indica indivíduo homozigoto recessivo (Cys/Cys); G. indivíduo homozigoto dominante (Phe/ Phe);

### 5.1 Frequências Genotípicas e Alélicas da mutação Val1016Ile

Foram genotipados 345 indivíduos para as seis populações de *Ae. aegypti* referentes à mutação *kdr* Val1016Ile, os resultados indicam que destes, 20% eram homozigotos dominantes (Val/Val); 50% heterozigotos (Val/Ile) e 30% homozigoto recessivo (Ile/Ile).

A média das frequências alélicas mostrou que aproximadamente metade da população analisada apresenta o alelo mutante 1016Ile (55%). As frequências genotípicas e alélicas por município encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Frequências Genotípicas e Alélicas da mutação Val1016Ile nas populações de *Aedes aegypti* de seis municípios Paranaenses.

Município	N	Frequência Genotípica			Freq. Alélica	
		Val/Val <sup>+</sup>	Val <sup>+</sup> /Ile <sup>kdr</sup>	Ile /Ile <sup>kdr</sup>	Val <sup>+</sup>	Ile <sup>kdr</sup>
<b>Alvorada do Sul</b>	<b>114</b>	<b>0,096</b>	<b>0,579</b>	<b>0,325</b>	<b>0,386</b>	<b>0,614</b>
Zona Norte	20	0,000	0,600	0,400	0,300	0,700
Zona Sul	18	0,000	0,667	0,333	0,333	0,667
Zona Leste	19	0,100	0,500	0,400	0,350	0,650
Zona Oeste	18	0,000	0,176	0,824	0,088	0,912
Centro	20	0,000	0,750	0,250	0,375	0,625
Povoado	19	0,526	0,263	0,211	0,658	0,342
<b>Maringá</b>	<b>110</b>	<b>0,137</b>	<b>0,445</b>	<b>0,418</b>	<b>0,359</b>	<b>0,641</b>
Regional 1	20	0,200	0,450	0,350	0,425	0,575
Regional 2	18	0,111	0,167	0,722	0,194	0,806
Regional 3	20	0,150	0,750	0,100	0,525	0,475
Regional 4	12	0,083	0,667	0,250	0,417	0,583
Regional 5	20	0,150	0,150	0,700	0,225	0,775
Regional 6	20	0,100	0,550	0,350	0,375	0,625
<b>Marilena</b>	<b>33</b>	<b>0,182</b>	<b>0,576</b>	<b>0,242</b>	<b>0,470</b>	<b>0,530</b>
<b>Nova Londrina</b>	<b>30</b>	<b>0,300</b>	<b>0,600</b>	<b>0,100</b>	<b>0,600</b>	<b>0,400</b>
<b>Paranavaí</b>	<b>28</b>	<b>0,107</b>	<b>0,500</b>	<b>0,393</b>	<b>0,357</b>	<b>0,643</b>
<b>São Carlos do Ivaí</b>	<b>30</b>	<b>0,367</b>	<b>0,300</b>	<b>0,333</b>	<b>0,517</b>	<b>0,483</b>

(+) alelos selvagens; (<sup>kdr</sup>) alelos mutantes

## 5.2 Frequências Genotípicas e Alélicas da mutação Phe1534Cys

Foram genotipados 345 indivíduos para as seis populações de *A. aegypti* referentes à mutação *kdr* Phe1534Cys. Sendo que, 5% eram homozigotos dominantes (Phe/Phe); 36 % heterozigotos (Phe/Cys) e 59% homozigoto recessivo (Cys/Cys). A média das frequências alélicas alcançou 78,2% da população analisada apresentando o alelo mutante 1534Cys.

As frequências genotípicas e alélicas por município encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Frequências Genotípicas e Alélicas da mutação Phe1534Cys nas populações de *Aedes aegypti* de seis municípios Paranaenses.

Município	N	Frequência Genotípica			Freq.Alélica	
		Phe/Phe <sup>+</sup>	Phe <sup>+</sup> /Cys <sup>kdr</sup>	Cys/Cys <sup>kdr</sup>	Phe <sup>+</sup>	Cys <sup>kdr</sup>
<b>Alvorada do Sul</b>	<b>114</b>	<b>0,018</b>	<b>0,333</b>	<b>0,649</b>	<b>0,184</b>	<b>0,816</b>
Zona Norte	20	0,000	0,300	0,700	0,150	0,850
Zona Sul	18	0,000	0,278	0,722	0,139	0,861
Zona Leste	20	0,000	0,600	0,400	0,300	0,700
Zona Oeste	20	0,050	0,150	0,800	0,125	0,875
Centro	20	0,000	0,150	0,850	0,075	0,925
Povoado	20	0,263	0,474	0,263	0,500	0,500
<b>Maringá</b>	<b>110</b>	<b>0,027</b>	<b>0,373</b>	<b>0,600</b>	<b>0,214</b>	<b>0,786</b>
Regional 1	20	0,000	0,450	0,550	0,225	0,775
Regional 2	18	0,000	0,278	0,722	0,139	0,661
Regional 3	20	0,000	0,600	0,400	0,300	0,700
Regional 4	12	0,000	0,667	0,333	0,333	0,667
Regional 5	20	0,050	0,200	0,750	0,150	0,850
Regional 6	20	0,100	0,150	0,750	0,175	0,825
<b>Marilena</b>	<b>33</b>	<b>0,182</b>	<b>0,485</b>	<b>0,455</b>	<b>0,303</b>	<b>0,697</b>
<b>Nova Londrina</b>	<b>30</b>	<b>0,100</b>	<b>0,467</b>	<b>0,433</b>	<b>0,333</b>	<b>0,667</b>
<b>Paranavaí</b>	<b>28</b>	<b>0,00</b>	<b>0,179</b>	<b>0,821</b>	<b>0,089</b>	<b>0,911</b>
<b>São Carlos do Ivaí</b>	<b>30</b>	<b>0,00</b>	<b>0,367</b>	<b>0,633</b>	<b>0,183</b>	<b>0,817</b>

(<sup>+</sup>) alelos selvagens; (<sup>kdr</sup>) alelos mutantes

### 5.3 Agrupamento genotípico nos sítios 1016 e 1534 do Canal de Sódio-Voltagem Dependente

Os alelos encontrados em ambos os sítios foram avaliados e comparados para observação da ocorrência simultânea dos polimorfismos analisados no gene *kdr* de *Ae. aegypti* (Tabelas 7 e 8). As frequências genotípicas estão representadas separadamente na tabela 9.

Tabela 7: Alelos em ambos os sítios.

Alelos	Sigla
Val1016 <sup>+</sup> + Phe1534 <sup>+</sup>	S
Val1016 <sup>+</sup> + Cys1534 <sup>kdr</sup>	R1
1016 <sup>kdr</sup> + Cys1534 <sup>kdr</sup>	R2
Ile1016 <sup>kdr</sup> + Phe1534 <sup>+</sup>	RX

(<sup>+</sup>) alelos selvagens; (<sup>kdr</sup>) alelos mutantes

Com base na composição destes genótipos, conclui-se que três alelos estavam presentes nas amostras avaliadas: 1016 Val<sup>+</sup> + 1534Phe<sup>+</sup> (S), 1016 Val<sup>+</sup> + 1534 Cys<sup>kdr</sup> (R1) e 1016 Ile<sup>kdr</sup> + 1534 Cys<sup>kdr</sup> (R2). Nenhum indivíduo desta população apresentou alelos selvagens Val1016<sup>+</sup>/Phe1534<sup>+</sup> (RX) simultaneamente.

A frequência da ligação S (dois alelos selvagens) mostra uma média de 22%, assim como a ligação R1 (alelo selvagem 1016Val + alelo Kdr 1534Cys) foi de 23%, mostrando uma média próxima de S, porém a média da frequência das ligações R2 (dois alelos Kdr) foi de 55%, indicando que metade da população apresenta os dois alelos mutantes.

A frequência genotípica foi avaliada a partir dos seis genótipos individuais encontrados (Tabela 8).

Tabela 8: Frequências alélicas dos sítios ligados 1016 +1534.

	S	R1	R2
<b>Município</b>	1016 Val + 1534 Phe	1016 Val + 1534 Cys	1016 Ile + 1534 Cys
<b>Alvorada do Sul</b>	<b>0,184</b>	<b>0,202</b>	<b>0,614</b>
Zona Norte	0,150	0,150	0,700
Zona Sul	0,139	0,194	0,667
Zona Leste	0,300	0,050	0,650
Zona Oeste	0,088	0,00	0,912
Centro	0,075	0,300	0,625
Povoado	0,500	0,158	0,342
<b>Maringá</b>	<b>0,214</b>	<b>0,145</b>	<b>0,641</b>

Regional 1	0,225	0,200	0,575
Regional 2	0,139	0,056	0,806
Regional 3	0,300	0,125	0,575
Regional 4	0,154	0,115	0,577
Regional 5	0,150	0,075	0,775
Regional 6	0,175	0,125	0,700
<b>Marilena</b>	<b>0,303</b>	<b>0,167</b>	<b>0,530</b>
<b>Nova Londrina</b>	<b>0,333</b>	<b>0,267</b>	<b>0,400</b>
<b>Paranavaí</b>	<b>0,089</b>	<b>0,268</b>	<b>0,643</b>
<b>São Carlos do Ivaí</b>	<b>0,183</b>	<b>0,333</b>	<b>0,483</b>

S-Selvagem, R1- Um alelo *Kdr*, R2- Dois alelos *Kdr*

O agrupamento dos dois polimorfismos nos mostra o elevado número nos genótipos que apresentam a combinação quando o alelo mutante está presente e valores baixíssimos para as combinações contendo alelos selvagens. Portanto, a frequência dos sítios ligados Ile/Ile + Cys/Cys foram os valores mais elevados, seguidos da combinação Val/Ile + Phe/Cys, nestas duas combinações não ocorreram valores nulos, como pode ser visto nos demais agrupamentos (Tabela:9)

Tabela 9: Frequências genotípicas dos sítios ligados 1016 +1534 e Equilíbrio de Hardy-Weiberg ( $p < 0,05$ ).

Local	N	Val/Val Phe/Phe	Val/Val Phe/Cys*	Val/Ile* Phe/Cys*	Val/Val Cys/Cys*	Val/Ile* Cys/Cys*	Ile/Ile* Cys/Cys*	EHW $\chi^2$
<b>AS</b>	<b>114</b>	<b>0,018</b>	<b>0,026</b>	<b>0,307</b>	<b>0,053</b>	<b>0,272</b>	<b>0,325</b>	<b>9,2</b>
ZN	20	0,000	0,000	0,300	0,300	0,000	0,400	
ZS	18	0,000	0,000	0,278	0,000	0,389	0,333	
ZL	20	0,000	0,100	0,500	0,000	0,000	0,400	
ZO	20	0,000	0,000	0,175	0,000	0,000	0,825	
CT	20	0,000	0,000	0,150	0,000	0,600	0,250	
PE	20	0,263	0,263	0,211	0,000	0,053	0,211	
<b>MG</b>	<b>110</b>	<b>0,027</b>	<b>0,100</b>	<b>0,273</b>	<b>0,009</b>	<b>0,173</b>	<b>0,418</b>	<b>4,2</b>
R1	20	0,000	0,150	0,300	0,060	0,150	0,350	
R2	18	0,000	0,111	0,167	0,000	0,000	0,722	
R3	20	0,000	0,150	0,450	0,000	0,300	0,100	
R4	12	0,000	0,083	0,583	0,000	0,083	0,250	

R5	20	0,050	0,100	0,100	0,000	0,050	0,700	
R6	20	0,000	0,000	0,150	0,000	0,400	0,350	
<b>MR</b>	<b>33</b>	<b>0,061</b>	<b>0,091</b>	<b>0,394</b>	<b>0,030</b>	<b>0,182</b>	<b>0,242</b>	<b>1,1</b>
<b>NL</b>	<b>30</b>	<b>0,100</b>	<b>0,133</b>	<b>0,333</b>	<b>0,067</b>	<b>0,267</b>	<b>0,100</b>	<b>2,0</b>
<b>PV</b>	<b>28</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,179</b>	<b>0,107</b>	<b>0,321</b>	<b>0,393</b>	<b>3,1</b>
<b>SC</b>	<b>30</b>	<b>0,000</b>	<b>0,200</b>	<b>0,167</b>	<b>0,161</b>	<b>0,133</b>	<b>0,333</b>	<b>8,0</b>

\* Alelos mutantes – AS - Alvorada do Sul, MG - Maringá, MR - Marilena, NL - Nova Londrina, PV - Paranavaí, SC - São Carlos do Ivaí, ZN - Zona Norte, ZS - Zona Sul, ZL - Zona Leste, ZO – Zona Oeste, C - Centro, PE - Povoado, R1-Regional 1, R2 - Regional 2, R3- Regional 3, R4- Regional 4, R5- Regional 5, R6-regional 6.

#### 5.4 Variabilidade Genética - ND4

##### 5.4.1 Distribuição e frequência dos haplótipos

O produto amplificado do gene ND4 foi de 257 pb com a existência de 44 sítios polimórficos e 213 sítios monomórficos, as análises de 120 indivíduos mostraram a existência de 40 haplótipos (Tabela 10).

Tabela 10: Dados referentes à variabilidade genética

Variabilidade Genética	
Número de sequências	120
Número de haplótipos	40
Número de sítio polimórficos	44
Número de transversões	25
Diversidade haplotípica	$h=0,301$

A frequência relativa total dos 40 haplótipos nas seis populações de *Ae. aegypti* e a frequência relativa dos haplótipos em cada população estão representadas na tabela 11. O haplótipo H1 foi o mais frequente, representando 57,5% do total de haplótipos, sendo detectado na maioria das populações, com exceção de Alvorada do Sul (Tabela 11).



Tabela 11: Frequências Haplotípicas observadas em seis populações naturais de *Aedes aegypti* do estado de Paraná.

Haplótipos	AS	MR	MG	NL	PV	SC	Total	(%)
H1	0,0	3,0	12,0	3,0	26,0	25,0	69,0	57,5
H2			4,0				4,0	3,33
H3	2,0	1,0					3,0	2,50
H4				2,0			2,0	1,66
H5	1,0			1,0			2,0	1,66
H6		2,0					2,0	1,66
H7	1,0	1,0					2,0	1,66
H8	1,0			1,0			2,0	1,66
H9				2,0			2,0	1,66
H10		2,0					2,0	1,66
H11				1,0			1,0	0,83
H12				1,0			1,0	0,83
H13			1,0				1,0	0,83
H14	1,0						1,0	0,83
H15	1,0						1,0	0,83
H16	1,0						1,0	0,83
H17	1,0						1,0	0,83
H18		1,0					1,0	0,83
H19				1,0			1,0	0,83
H20				1,0			1,0	0,83
H 21	1,0						1,0	0,83
H22				1,0			1,0	0,83
H23				1,0			1,0	0,83
H24				1,0			1,0	0,83
H25				1,0			1,0	0,83
H26				1,0			1,0	0,83
H27				1,0			1,0	0,83
H28		1,0					1,0	0,83
H29	1,0						1,0	0,83
H30		1,0					1,0	0,83
H31					1,0		1,0	0,83
H32			1,0				1,0	0,83
H33						1,0	1,0	0,83
H34		1,0					1,0	0,83
H35	1,0						1,0	0,83
H36	1,0						1,0	0,83
H37					1,0		1,0	0,83
H38						1,0	1,0	0,83
H39						1,0	1,0	0,83
H40						1,0	1,0	0,83

AS-Alvorada do Sul; MR-Marilena; MG-Maringá, NL-Nova Londrina; PV-Paranavaí; SC-São Carlos do Ivaí

Os haplótipos foram distinguidos por 21 transições, ou seja, a transformação de uma purina, Adenina (A) ou Guanina (G) numa outra purina ( $A \leftrightarrow G$ ), ou uma pirimidina, Citosina (C) ou Timina (T), em outra pirimidina ( $C \leftrightarrow T$ ), neste caso foram 11 transições  $C \leftrightarrow T$  e 10  $A \leftrightarrow G$  (Tabela 12).

Também foram registradas 25 transversões, ou seja, quando uma purina sofre mutação e se torna uma pirimidina, ou vice-versa, neste caso foram 4 ( $A \leftrightarrow C$ ), 10 ( $A \leftrightarrow T$ ), 8 ( $G \leftrightarrow T$ ) e 3 ( $G \leftrightarrow C$ ) (Tabela 12).

Com base no método da parcimônia, foi gerada uma rede de haplótipos, conforme mostra a Figura 6. Posteriormente foram utilizados os haplótipos disponíveis para América relatados por Gonçalves *et al.*, 2012 para que fosse possível a junção destes haplótipos com os encontrados nestas populações do Paraná e com isso formar uma nova rede de genealógica (Figura 7).

A junção das redes de haplótipos deste trabalho (HPR) com a rede de Gonçalves *et al.*, 2012 (H), mostrou uma ligação entre o haplótipo H1 (México e América do Norte) e o haplótipo H2PR (Maringá) e outra ligação entre H6 (Amazônia Brasileira, Sudeste do Brasil, Peru, México e América do Norte) e H39PR (São Carlos do Ivaí), também ligado ao H2PR, assim como H1.

Outra ligação ocorre entre H1PR (maioria) e H11 (Amazônia Brasileira), que vai ligar em H1 (México e América do Norte). Indicando que as populações do Paraná possuem ligações globais prováveis provenientes da Amazônia Brasileira, Sudeste do Brasil, Peru, México e América do Norte.

## Tabela 12 FORMATO PAISAGEM

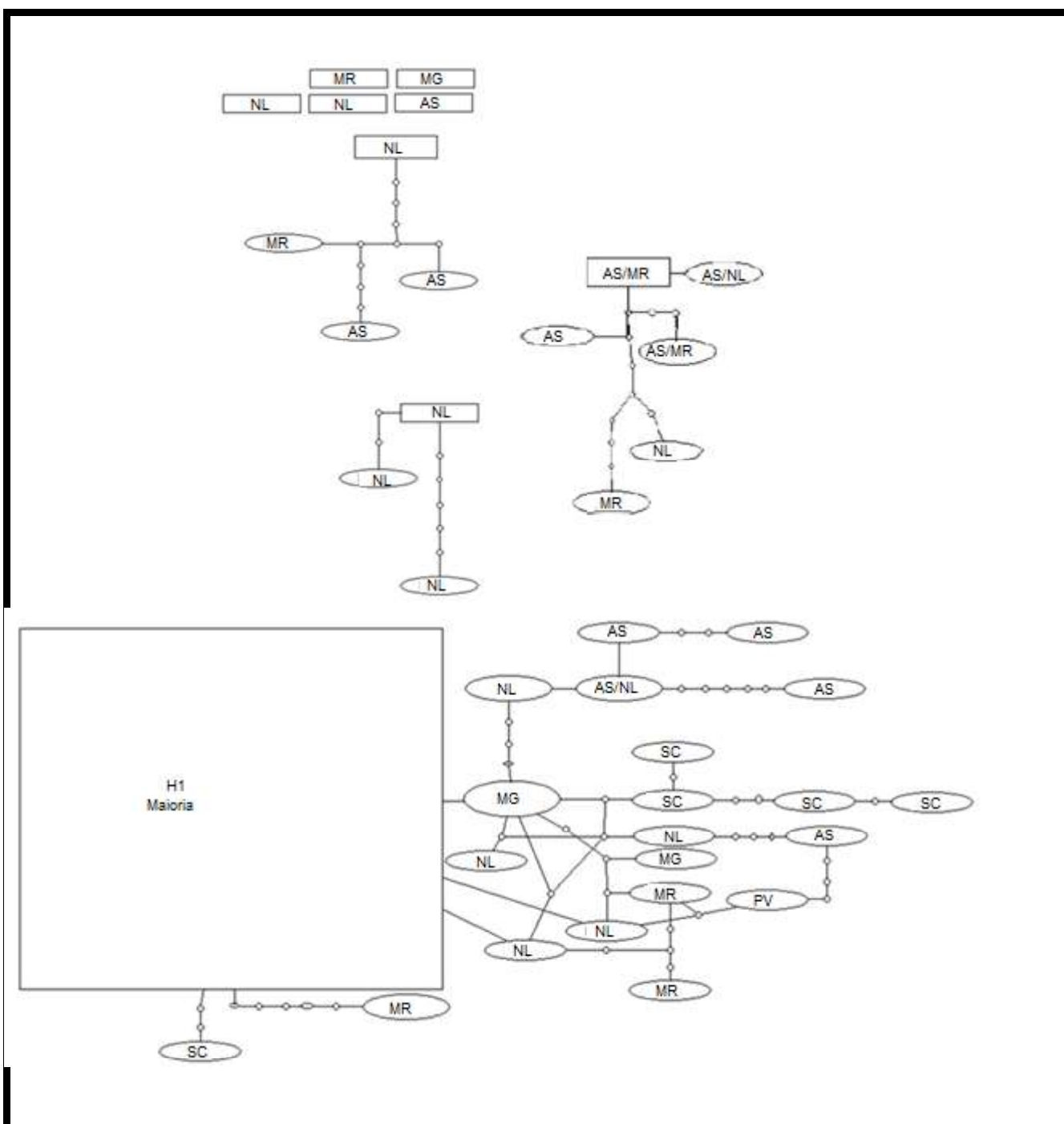


Figura 6: Rede de haplótipos do gene *ND4* de *Ae. aegypti* para as seis populações do Paraná . O retângulo representa o haplótipo ancestral, sendo H1 representado pela maioria. O tamanho das elipses é proporcional ao número de indivíduos encontrados em cada haplótipo. Os círculos menores, que ligam os haplótipos identificados, correspondem aos haplótipos não amostrados (*missing haplotypes*) e classificados como intermediários. AS - Alvorada do Sul; MR - Marilena; MG -Maringá, NL - Nova Londrina; PV - Paranavaí; SC - São Carlos do Ivaí.

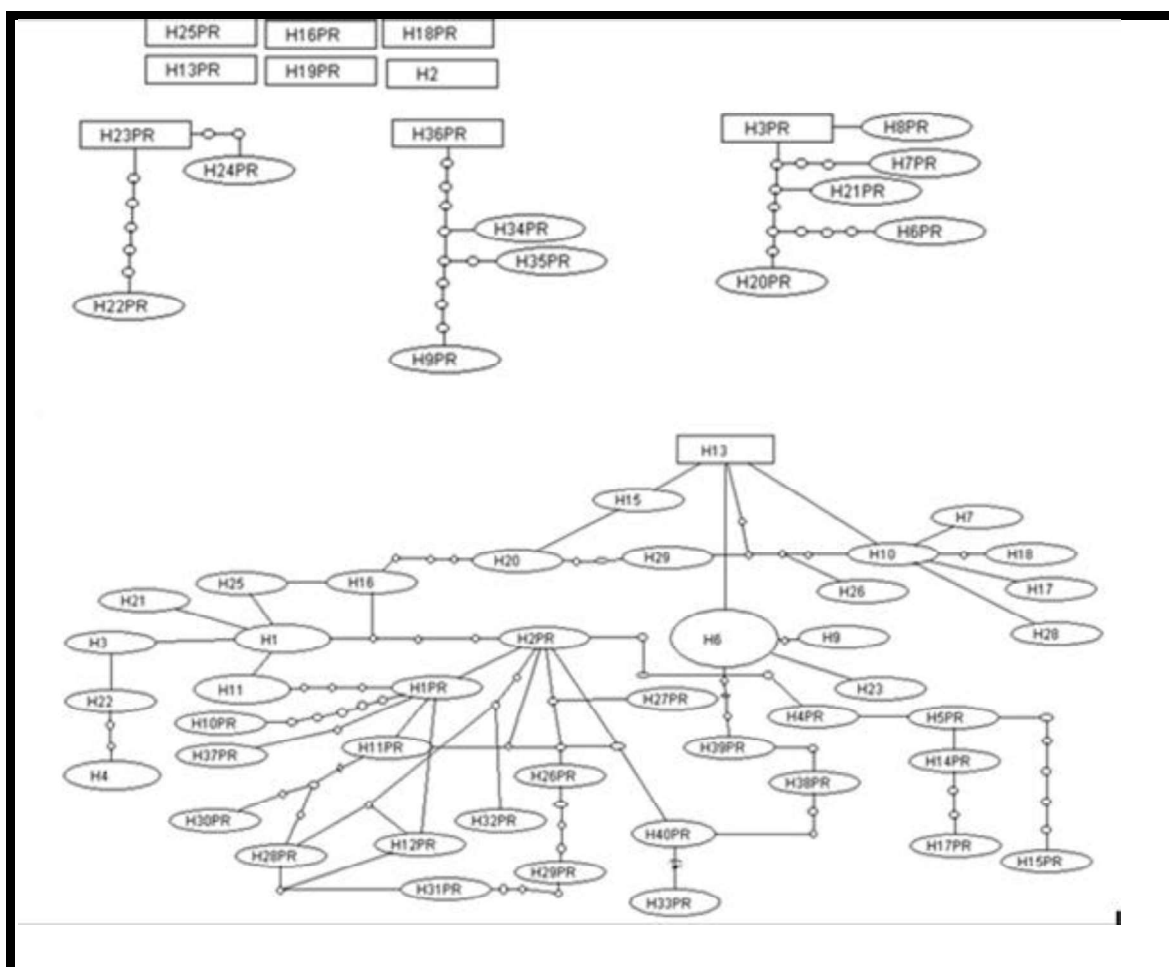


Figura 7: Rede de haplótipos do gene ND4 de *Ae. aegypti* para as populações das Américas Gonçalves *et al.* (2012) incluindo os haplótipos dos seis municípios do Paraná do presente estudo. Os indivíduos referentes a esta análise foram renomeados com PR junto ao número do haplótipo (ex:H1PR), para diferenciar dos haplótipos (H) encontrados por Gonçalves *et al.* (2012). O retângulo representa o haplótipo ancestral. Os círculos menores, que ligam os haplótipos identificados, correspondem aos haplótipos não amostrados (*missing haplotypes*) e classificados como intermediários.

#### 5.4.2 Diversidade genética, testes de neutralidade e AMOVA

As populações do Paraná apresentaram uma diversidade haplotípica de  $h=0,301$ , uma diversidade nucleotídica de  $\pi = 0,005$  e o número médio de diferenças nucleotídicas de  $k = 0,655$ . Os testes de neutralidade de Tajima's D e Fu & Li's D, Fu & Li's F e Fu & Li's Fs não foram significativos para esta amostra ( $P > 0,10$ ), indicando que estão de acordo com o modelo neutro de mutações (Tabela 13).

Tabela 13: Diversidade genética e testes de neutralidade calculados para as seis populações de *Ae. aegypti*.

Diversidade			Testes de Neutralidade			
K	H	$\Pi$	Tajima's D	Fu & Li's D	Fu & Li's F	Fu & Li's Fs
0,655	0,301	0,005	-1,61663	-0,08608	-0,74613	-3,616

K = Nº médio de diferenças nucleotídicas; h = diversidade haplotípica;  $\pi$  = diversidade nucleotídica. Nível de significância para os testes de neutralidade  $P > 0,005$ .

A análise da variância molecular (AMOVA), suportou que a variação genética foi maior dentro das populações (86,28%), enquanto entre as populações foi baixa (13,72), sendo a análise significativa ( $F_{ST} = 0,13$ ;  $P < 0,05$ ), suportando a hipótese de estruturação genética (Tabela 14).

Tabela 14: Análise da variância molecular (AMOVA) considerando as populações de *Aedes aegypti* dos seis municípios.

Tipo de Variação	GI	Varição (%)	Índice de fixação	p-valor
Entre populaces	5	13,72	$F_{st}=0,13$	$p < 0,05$
Dentro das populaces	114	86,28		
Total	119			

GL = graus de liberdade; P = significância

A diferenciação genética, representada pelos valores par-a-par de  $F_{ST}$  e os valores de Nm (número de migrantes por geração), referentes às seis populações de *Ae. aegypti* após a correção de Bonferroni (Rice, 1989) são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15: Valores de  $F_{st}$  par-a-par (acima da diagonal) e número efetivo de migrantes (abaixo da diagonal). Os valores de p com asterisco apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

	AS	MR	MG	NL	PV	SC
AS	/	0,018	0,000	0,099*	0,000	0,000
MR	3,39 (185)	/	0,027	0,495*	0,000	0,000
MG	1,91 (100)	4,60 (130)	/	0,108*	0,009	0,027
NL	15,05 (179)	inf (7)	9,23 (130)	/	0,000	0,000
PV	0,73 (129)	1,24 (71)	8,65 (66)	2,69 (64)	/	0,000
SC	0,72 (139)	1,13 (88)	11,04 (57)	2,45 (81)	7,50 (26)	/

Inf. = infinito; Distância geográfica entre parêntesis (Km)

A hipótese de isolamento por distância de acordo com o coeficiente de correlação do teste de Mantel foi testada e revelou a existência de correlação entre a distância genética ( $F_{ST}$ ) e distância geográfica (Km) ( $R^2 = 0.0691$ ;  $P < 0,05$ ) nas populações de *Ae. aegypti* (Figura 8).

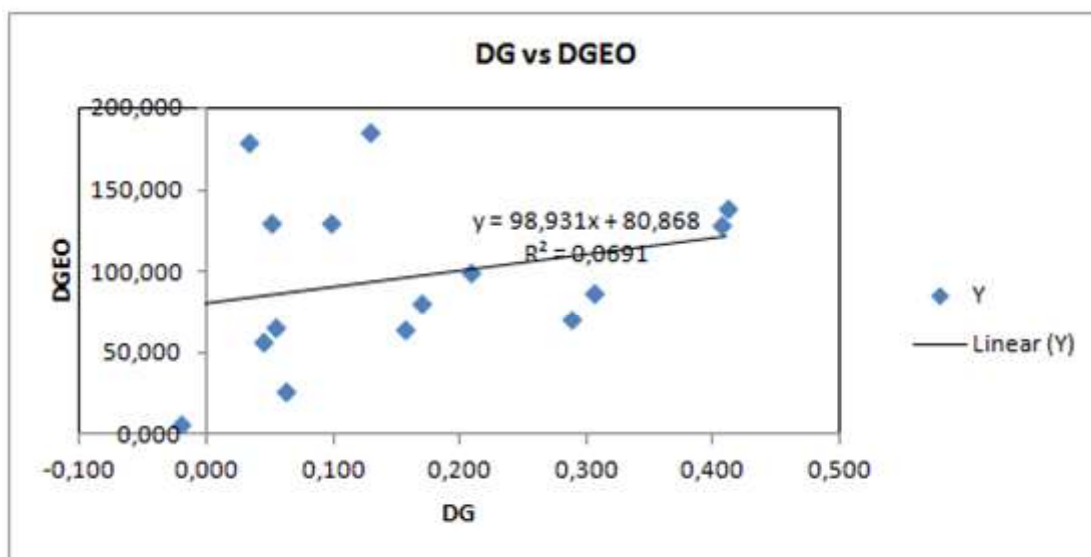


Figura 8: Correlação entre as distâncias genética e geográfica utilizando o teste de Mantel das seis populações de *Aedes aegypti*.

Estes resultados indicam diferenças entre as populações bem como possível migração.

Foi construído um dendrograma baseado no método de agrupamento de vizinhos (Neighbor-Joining) para demonstrar a relação genética existente entre os 40 haplótipos encontrados. Para tanto, regiões homólogas do gene ND4 de *Ae. albopictus* foram utilizadas como grupos externo (outgroups) (Figura 9). Neste dendrograma podemos observar uma politomia, com quatro grupos distintos, portanto mais de duas linhagens descendentes.

O haplótipo H1 representado pela maioria dos indivíduos está localizado no grupo um, neste grupo estão inseridos indivíduos dos seis municípios. Os indivíduos de São Carlos do Ivaí encontram-se apenas no grupo um. Os grupos três e quatro são bem parecidos, compostos principalmente por Alvorada do Sul e Marilena. O grupo dois é bem diverso, não constando apenas indivíduos provenientes de São Carlos do Ivaí.

Este dendrograma nos mostra uma politomia indicando diversidade entre indivíduos.

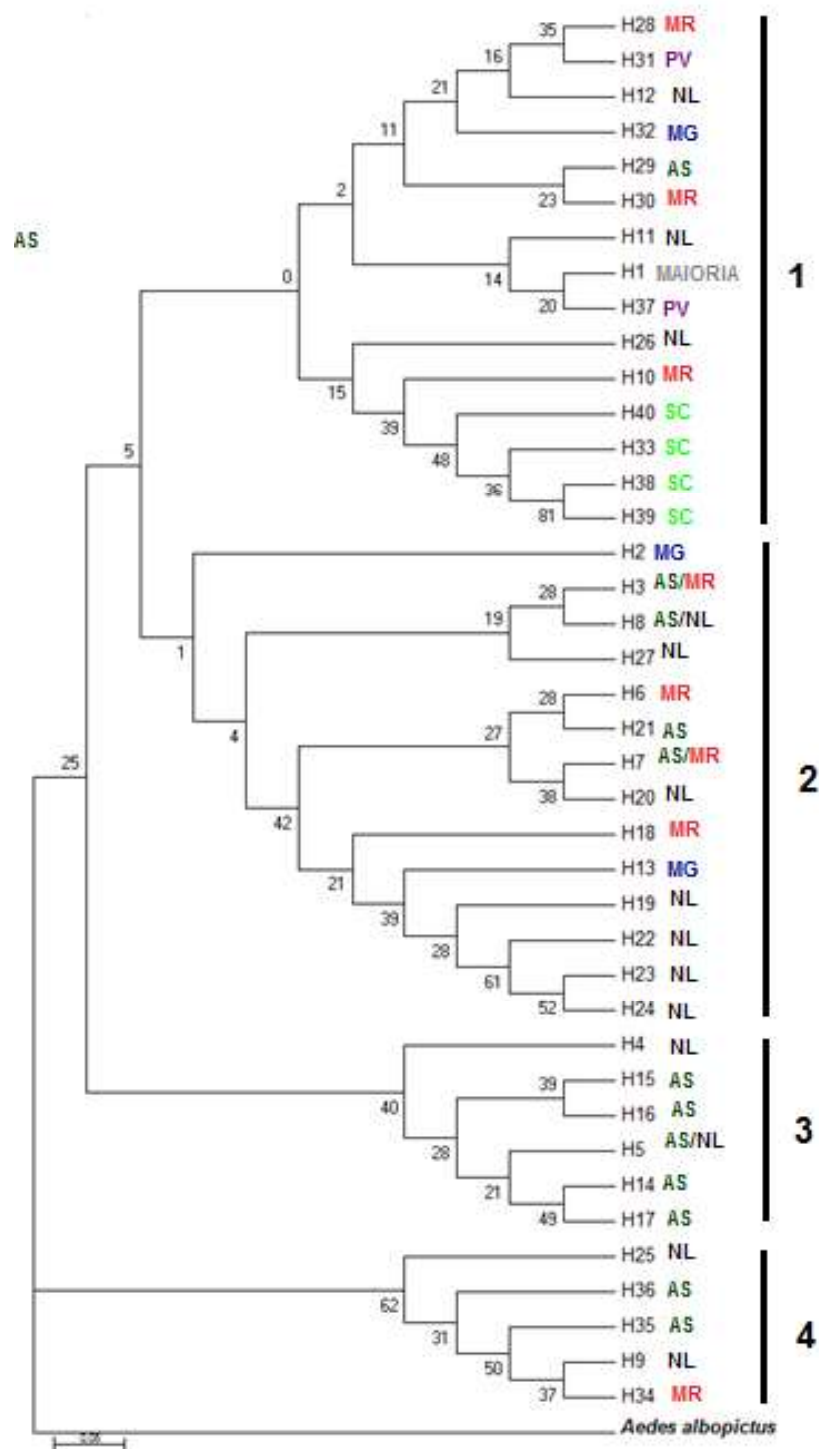


Figura 9. Dendrograma observado entre os 40 haplótipos de *Aedes aegypti* dividido em com quatro grupos. Utilizou-se o método de Neighbor-Joining, seguindo o modelo de distância genética de Tamura-Nei. Os valores de bootstrap encontram-se nos ramos. *Aedes albopictus* como grupo externo. AS - Alvorada do Sul; MR - Marilena; MG -Maringá, NL - Nova Londrina; PV - Paranavaí; SC - São Carlos do Ivaí



## 6. DISCUSSÃO

As mutações *Kdr* estão realmente presentes nas populações de *Ae. aegypti* do Estado do Paraná. Os valores de diversidade genética foram considerados baixos, e as populações estão geneticamente estruturadas.

### 6.1 KDR

Os inseticidas apresentam um papel relevante nos programas de controle do vetor *Ae. aegypti*, no entanto, o uso contínuo destes inseticidas tem favorecido a seleção de populações resistentes em diversas localidades, como é o caso de Cuba (Rodríguez *et al.* 2012), Venezuela (Álvarez *et al.* 2006; Seixas *et al.*, 2013), Caribe (Rawlins, S.C., 1998), Peru (Vargas *et al.* 2006) e Bolívia (Schofield *et al.* 1984).

No Brasil foram detectadas populações resistentes a piretróides em vários municípios (Duque *et al.* 2004, Beserra *et al.* 2007; Martins *et al.* 2009, Lima *et al.* 2011, Bona *et al.* 2012). O primeiro registro de resistência a este grupo de inseticidas foi detectada em 2001 nos Estados de Alagoas, Sergipe e Rio de Janeiro (Pereira-Da-Cunha *et al.* 2005).

As ações de controle mostram a grande capacidade de adaptação, variabilidade genética e, conseqüentemente, elevados valores de heterozigose, presente nesta espécie, e pode ser a razão pela qual sua erradicação é difícil de ser realizada (Foratini, 2002).

Vários polimorfismos já foram identificados e descritos em *Ae. aegypti* no segmento S6 do domínio II, como as substituições Glicina→Valina na posição 923, Valina→Isoleucina na posição 952, Histina→Lisina na posição 961, Leucina→Triptofano na posição 982 e Isoleucina→Valina. Posteriormente foram identificados dois novos polimorfismos associados a resistência a PYs, Valina→Metionina na posição 1011 e Valina→Isoleucina na posição 1016, e logo após foi identificada a substituição de Ac. aspártico→Tirosina na posição 1794 (Bregues *et al.*, 2003; Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2009).

Os dois polimorfismos analisados no gene do canal de sódio das seis populações do presente estudo equivalem à substituição dos aminoácidos Fenilalanina por uma Cisteína na posição 1534 (Phe1534Cys) e a substituição de uma Valina por uma Isoleucina na posição 1016 (Val1016Ile).

A mutação Val1016Ile já foi amplamente documentada no Brasil e no Mundo. No Grand Cayman (Harris *et al.*, 2010), em Martinique (Marcombe *et al.*, 2012), na Colômbia (Aguirre-Obando *et al.*, 2015), Ilha da Madeira-Portugal (Seixas *et al.*, 2013), em outras populações da América Latina (Saavedra- Rodriguez *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009) e populações brasileiras, como São Paulo, Goiás, Roraima, Amapá, Pará, Ceará, Alagoas, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e Nova Iguaçu (Aguirre-Obando *et al.*, 2015; Batista, 2012; Bona *et al.*, 2012; Garcia *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009;).

As frequências genotípicas encontradas neste trabalho mostram que metade das populações apresentam indivíduos heterozigotos e que um terço estão resistentes, sendo que mais de 50 % da população apresenta o alelo mutante 1016Ile.

A substituição Val1016 já foi verificada no município de Jacarezinho, também localizado no Estado do Paraná, corroborando com os resultados encontrados, uma vez que a população de Jacarezinho também apresentou elevada frequência genotípica de indivíduos heterozigotos e homozigotos recessivos (Aguirre-Obando *et al.*, 2016).

Em relação à mutação Phe1534Cys, aonde a substituição de um único par de bases muda o códon de TTC para TGC no domínio III, subunidade 6 no gene *kdr*, resultando na troca de uma Fenilalanina por uma Cisteína no sítio 1534, foi relatado em populações do Vietnã (Kawada *et al.*, 2009), Grand Cayman (Harris *et al.*, 2010), sugerindo que a substituição no sítio 1534 confere alta resistência a piretroides e a DDT em populações de *Ae. aegypti*. Yanola *et al.* (2010) obtiveram resultados similares em populações da Tailândia conferindo resistência à permetrina, assim como em Martinique (Marcombe *et al.*, 2012), altas frequências de 1534Cys foram observados nestas localidades.

Na América do Sul o 1º registro da mutação Phe1534Cys foi relatado por Seixas *et al.*, 2013, em populações do Brasil e da Venezuela, este trabalho indicou a fixação quase completa do alelo mutante, Madeira (98%) e Venezuela (100%) e populações com uma frequência média para a população Brasil (23%). Posteriormente esta mutação foi relatada em outros estados brasileiros por Linss *et al.*, 2014. Outros estudos relataram frequências de moderadas a altas, sendo

21% no Vietnã, 77% na Tailândia e 68% nas Ilhas Cayman (Kawada et al., 2009, Harris et al., 2010, Yanola et al., 2010). Altas frequências do alelo mutante 1534Cys também foram encontradas nas populações do Paraná, apresentando uma média de 79%.

Em relação ao agrupamento genotípico dos sítios, nos mostra a ocorrência desses polimorfismos em simultâneo, e esta junção podem modular os níveis de resistência a piretróides (Linss et al. 2014).

Existem pelo menos, sete polimorfismos diferentes descritos no canal de sódio de *Ae. aegypti*, mas apenas as posições 1016 e 1534 estão claramente relacionados à resistência, onde os polimorfismos são encontrados em um domínio do canal de sódio que interage diretamente com a molécula de piretroide (Du et al. 2013).

Análises em populações de *Ae. aegypti* mostrando a distribuição das mutações Val1016Ile e Phe1534Cys foram descritas recentemente em 30 populações brasileiras, mostrando que estes alelos encontram-se distribuídos de forma regionalizada no país, sendo a distribuição da mutação Phe1534Cys por todo o território e as duas mutações *Kdr* ocorrem principalmente na região centro-sul (Linss et al. 2014).

Corroborando com os resultados encontrados para o Brasil, o presente trabalho mostra a ocorrência dos polimorfismos em todas as populações avaliadas no Paraná. As elevadas frequências de alelos mutantes nas seis populações são preocupantes, pois os polimorfismos têm tendência a aumentar de frequência se a pressão de seleção for constante, podendo eventualmente atingir a fixação (Martins & Valle 2009).

Está claro que uma maior variabilidade (quando sob pressão de seleção) tem à possibilidade de selecionar os indivíduos resistentes, este fato ocorre, pois os inseticidas exercem pressão de seleção e, com isso, fenótipos específicos são selecionados e, conseqüentemente, ocorre o aumento da frequência (Saavedra-Rodriguez et al., 2007).

Por tanto, monitorar a presença e evolução desses polimorfismos é imprescindível para uso adequado dos controles químicos e com isso o controle do vetor por este meio seja eficiente.

## 6.2 Variabilidade Genética

O DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado nas últimas décadas para inferir a variabilidade genética, fluxo gênico e história evolutiva de *Ae. aegypti* (Bona *et al.* 2012, Calvez *et al.*, 2016; Gonçalves *et al.* 2012; Paupy *et al.* 2012, Twerdochlib *et al.*, 2012).

As populações de *Ae. aegypti* neste estudo estão geneticamente estruturadas, fato previamente relatado em populações do México (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2002), Peru (Costa-da-Silva *et al.*, 2005), Venezuela (Herrera *et al.*, 2006; Urdaneta-Marquez *et al.*, 2008), Bolívia (Paupy *et al.*, 2012) e Colômbia (Aguirre-Obando *et al.*, 2015).

Um padrão também observado em populações do Brasil (Bracco *et al.*, 2007, Lima-Júnior & Scarpassa, 2009), incluindo algumas populações do Paraná (Bona, *et al.*, 2012; Twerdochlib *et al.*, 2012).

Os valores de diversidade genética foram considerados baixos para as populações do Paraná se comparados com os resultados previamente observados nas populações do Paraná ( $h = 0.30$  e  $\pi = 0.005$ ), valores altos de diversidade ( $h = 0.70$  e  $\pi = 0.015$ ) já foram relatados para *Ae. aegypti* neste Estado, em que dos dez municípios analisados três municípios são os mesmos verificados neste trabalho, sendo eles Maringá, Nova Londrina e Paranavaí. Estes dados demonstram que está havendo uma redução da diversidade genética ao longo do tempo (Twerdochlib *et al.*, 2012).

Os valores baixos encontrados referentes à diversidade nucleotídica ( $\pi = 0.005$ ), também foram relatados nas populações da Bolívia  $\pi = 0.001$  (Paupy *et al.*, 2012), e nas populações da Tailândia  $\pi = 0.008$  (Bosio *et al.*, 2005).

Os valores baixos de diversidade genética sugerem uma redução no tamanho da população, que pode ter sido provocada pelas campanhas de controle químico e ou associados a outras medidas de redução da população do vetor (Herrera *et al.*, 2006).

No entanto, comparados a estes resultados existem estudos que mostram alta diversidade genética em áreas que também são continuamente submetidas ao controle químico, como em populações do México  $\pi = 0,0143$  (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2002), da Venezuela  $\pi = 0,020$  (Herrera *et al.*, 2006), assim como no Brasil Paduan & Ribolla (2008) detectaram em cinco estados

brasileiros o valor foi de  $\pi = 0.011$ , resultado semelhante a este foi relatado em populações da Amazônia  $\pi = 0,0113$  (Lima-Júnior & Scarpassa, 2009).

As populações apresentaram diferentes linhagens mitocondriais nos quais os haplótipos mais frequentes estiveram no grupo I, o que está em concordância com outros estudos (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2002; Bosio *et al.*, 2005; Herrera *et al.*, 2006; Bracco *et al.*, 2007, Paduan & Ribola, 2008; Twerdochlib *et al.*, 2012; Aguirre-Obando *et al.*, 2015;).

Há relatos de dois grandes grupos genéticos presentes no Brasil, um descendente da Venezuela e provavelmente outros países da América do norte e outro do Caribe (Monteiro *et al.*, 2014). Outra indicação de que populações de *Ae. aegypti* brasileiras possam ser provenientes do Caribe e não de populações asiáticas é o fato de ter sido encontrado, na população brasileira, o mesmo alelo referente a mutação *kdr* Val1016Ile no Caribe, e não Val1016Gly, que é comumente observada em populações asiáticas (Linss *et al.*, 2014). Além disso, estudando um conjunto diversificado de SNPs e dados de sequências de genes nucleares descobriram que *Ae. aegypti* provavelmente veio da África Ocidental para o Novo Mundo, onde se dispersa para a Ásia e Austrália (Brown *et al.*, 2013).

A análise da diversidade genética mostrou a existência de 40 haplótipos e 44 polimorfismos, e o dendograma apresentou uma politomia. Os haplótipos obtidos para as populações do Paraná quando comparados com os disponíveis para América indicam uma relação com as populações provenientes da Amazônia Brasileira, Sudeste do Brasil, Peru, México e América do Norte.

A diversidade genética foi reduzida, e a variação genética foi maior dentro das populações, sendo a análise significativa demonstrando estruturação genética.

Os resultados das mutações *Kdr* para as populações avaliadas apresentaram polimorfismos simultâneos, indicando que metade das populações apresenta altos índices dos dois alelos mutantes.

## 7 CONCLUSÃO

As populações analisadas neste estudo indicam que a ação de controle do vetor utilizando PYs está comprometida devido à presença de genótipo que confere resistência aos PYs utilizados no controle químico do vetor.

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram a presença de indivíduos com gene para resistência em todas as populações avaliadas, e para ambas as mutações, mas principalmente para a mutação Phe1534Cys.

A forte presença dos alelos mutantes 1016Ile e 1534Cys indica a necessidade de acompanhamento da frequência de mutações relacionadas à resistência, com isso, é possível auxiliar na eficiência dos programas de controle do vetor.

As análises referentes à variação genética demonstraram que as populações de *Ae. aegypti* do Paraná estão estruturadas geneticamente, o fato da variabilidade genética estar reduzida, muitas vezes é devido à intensa pressão de seleção ocasionada pelas ações de controle químico e ou outras estratégias de controle vetorial.

Ao eleger o controle químico como fonte primária de controle vetorial, é necessário o acompanhamento do monitoramento da presença do genótipo da resistência nas populações do vetor, para que esta ferramenta tenha efetividade, afinal, a pressão exercida artificialmente com a utilização do controle químico pode influenciar a variabilidade genética das populações de *Ae. aegypti*, assim como a presença das mutações *Kdr*.

## REFERÊNCIAS

- Aguirre-Obando, O. A.; A. J. Pietribon.; A. C. D. Bona & Navarro-Silva, M.A. 2015. **Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Colombia.** *Zoologia* 32 (1): 14–22.
- Aguirre-Obando, O. A.; A. C. D. Bona; J. E. Duque & M. A. Navarro-Silva. 2016. **Contrasting of insecticide resistance and Knockdown resistance (kdr) *Aedes aegypti* in populations from Jacarezinho (Brazil) after a dengue outbreak.** *Rev Bras Entomologia*.
- Álvarez, L.; A. Briceno & M. Oviedo. 2006. **Resistencia al Temephos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del occidente de Venezuela.** *Revista Colombiana de Entomologia* 32(2): 172-175.
- Batista, E. 2012. **Evolução de mutações no gene do canal de sódio associadas à resistência tipo kdr em populações de *Aedes (Stegomyia) aegypti* do estado de São Paulo.** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
- Beserra, E.; C. Fernandes; M. de Queiroga & F. de Castro. 2007. **Resistência de Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao Organofosforado Temefós na Paraíba.** *Neotropical Entomology* 36(2):303-307.
- Bona, A.C. D; C. Picolli; A. Leandro; R. Kafka; A. Twerdochlib & M.A. Navarro-Silva, 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* 29 (6): 540–548.
- Bosio, C.H.; L. Harrington; J. Jones; D .Norris & T. SCOTT. 2005. **Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using mitochondrial Dna.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72(4): 434– 442.

Boyce, R; A. Lenhart; A. Kroeger; R. Velayudhan; B. Roberts & O. Horstick. 2013. **Bacillus thuringiensis israelensis (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review**. Tropical Medicine and International, volume 18 n 5 pp 564–577.

Bracco, J. E.; M. L. Capurro; R. Lourenço-de-Oliveira & M. A. M. SALLUM. 2007. **Genetic variability of Aedes aegypti in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 102: 573–580.

Braga, I. A. & D. Valle. 2007. **Aedes aegypti: History of Control in Brazil**. Epidemiol. e Serv. de Saúde, v.16, p.113-118.

Braga, I. A. & D. Valle. 2007b. **Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos de ação e resistência**. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília,16(4):279-293.

Brown, J. E.; C. S. McBride; P. Johnson; S. Ritchie; C. Paupy; H. Bossin; J. Lutomiah; I. F. Salas; A. Ponlawat; A. J. Cornel; W. C. Black IV; N. Gorrochotegui-Escalante; L. Urdaneta-Marquez; M. Sylla; M. Slotman; K. O. Murray; C. Walker & J. R. Powell. 2011. **Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple “domestications” of Aedes aegypti, a major vector of human diseases**. Human association in Aedes aegypti J. Proc. R. Soc. B. 278, 2446–2454.

Brown, J. E.; B. R. Evans; W. Zheng; V. Obas; L. B. Martinez; A. Egizi; H. Zhao; A. Caccone & J. R. Powell. 2013. **Human Impacts Have Shaped Historical and Recent Evolution in Aedes Aegypti, the Dengue and Yellow Fever Mosquito**. Evolution, Lancaster, v. 68, n. 2, p. 514525.

Calvez, E.; L. Guillaumot; L. Millet; J. Marie; H. Bossin & V. Rama. 2016. **Genetic Diversity and Phylogeny of Aedes aegypti, the Main Arbovirus Vector in the Pacific**. PLoS Negl Trop Dis,10.



Catterall, W. A. 2000. **From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels**. *Neuron*, 26: 13–25.

Carvalho, D.O.; D. Nimmo; N. Naish; A. R. McKemey, Gray P; Wilke, A.B.B., Mass, 2014. **Production of Genetically Modified *Aedes aegypti* for Field Releases in Brazil**. *J. Vis. Exp.*

Carvalho, D.O.; A. R. McKemey; L. Garziera; R. Lacroix; C. A. Donnelly; L. Alphey; A. Malavasi; M. L. Capurro. 2015. **Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes**. *PLoS Negl Trop*

Caylà, J.A; A. Joan; C. Domínguez; E. R. Valina; F. de Orya, A. Vázquez; C. F. Fortunya. 2016. **La infección por virus Zika: una nueva emergencia de salud pública com gran impacto mediático**. *Gac Sanit.*

Clement, M. ; D. Posada & K. Crandall. 2000. **TCS: a computer program to estimate gene genealogies**. *Molecular Ecology* 9 (10): 1657-1660

Christophers, S.R. 1960. ***Aedes aegypti*: the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure**. Cambridge University Press.

Costa da Silva, A.; M. Capurro & J. Bracco. 2005. **Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 639-644.

Davies, T. G.; L. M. Field; P. N. Usherwood, & Williamson, M.S. 2007. **DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels**. *IUBMB Life*, Vol.59, No. 3, (Mar), pp. 151- 162..

Du, Y.; Y. Nomura; G. Satar; Z. Hu & R. Nauen. 2013. **Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel.** Proc Natl Acad Sci USA.

Duque, J.; M. Martins; A. Anjos; E. Kuwabara & M.A. Navarro-Silva. 2004. **Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina, Brasil.** Revista de Saúde Pública 38: 842-843.

Excoffier, L; G. Laval & S. Schneider. 2006. **An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis, v. 3.01.** Computational and Molecular Population Genetics Lab., Institute of Zoology, University of Berne.

Fay, R. W. & D.A. Elialson. 1966. **A preferred oviposition sites as surveillance methods for *Aedes aegypti*.** Mosquito News 26: 531-535.

Forattini, O. P. 2002 **Culicidologia Médica.** 2. ed. São Paulo: EDUSP.

Garcia, G.P.; A. E. Flores; I. Fernandez-Salas; K. Saavedra-Rodriguez & G Reyes-Solis. 2009. **Recent Rapid Rise of a Permethrin Knock Down Resistance Allele in *Aedes aegypti* in México.** *PLOS Neglected Tropical Diseases* 3(10).

Gonçalves, A.; I. Cunha; W. Santos; S. Luz; P. Ribolla & F. Abad-Franch. 2012. **Gene flow networks among American *Aedes aegypti* populations.** *Evolutionary Applications* 5(7): 664-676.

Gorrochotegui-Escalante, N.; C. Gomez-Machorro; S. Lozano-Fuentes;, I. Fernandez-Salas; M. da L. Munoz; J. A. Farfan-Ale; J. Garcia-Rejon; B. J. Beaty & W. C. Black IV. 2002. **Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66: 213–222.

Gubler, D. J. 1998. ***Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40: 571-578.

Harbach, R. E., 2007. **The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny.** *Zootaxa*, v. 1668, p. 591-638.

Harrys, A.; S. Rajatileka & H. Ranson. 2011. **Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83(2): 277–284.

Hemme, R. R.; C.L. Thomas; D. Chadee & D.W. Severson. 2010. **Influence of urban landscapes on population dynamics in a short- distance migrant mosquito: Evidence for the dengue vector *Aedes aegypti*.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, p. 634-643

Herrera, F.; L. UrdanetaUR; J. Rivero; N. Zoghbi; J. Ruiz; G. Carrasquel; J. Martínez; M. Pernalete; P. Villegas; A. Montoya; Y. Rubio-Palis & E. Rojas. 2006. **Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101(6): 625-633.

Hiragi, C. K.; S. E. Martins; P. Queiroz; L. Lima & R. Monnerat. 2009.

**Variabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Utilizando Marcadores de RAPD.** *Neotropical Entomology* 38(4): 542-547.

Hlaing, T.; W. Tun-Lin; P. Somboon; D. Socheat; T. Setha; C. Min; M. Seng & W. Catherine. 2009. **Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies.** *BMC Genetics*10: 1-12.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm>.

Joubert, D. A.; T. Walker; L.B. Carrington; Duong Hue,T; P. Cameron; P. Simmons; L. Scott & O'Neill. 2016. **Establishment of a Wolbachia Superinfection in Aedes aegypti Mosquitoes as a Potential Approach for Future Resistance** Management. PLOSPathogens.

Kawada H; Y. Higa; O. Komagata; S Kasai & T. Tomita. 2009. **Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant Aedes aegypti populations in Vietnam.** PLoS Negl Trop Dis, 3:e527.

Kraemer, M. U. G; M. E. Sinka; K. A. Duda; A. Mylne; F. M. Shearer; O. J. Brady; J. P. Messina; C. M. Barker; C.G. Moore; R. G. Carvalho; G.E Coelho; W. Van Bortel; G. Hendrickx; F. Schaffner; G. R. W. Wint; I. R. F. Elyazar; Teng & H. Hay. 2015. **The global distribution of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Ae. albopictus** e life science.org

Librado, P & J. Rozas. 2009. **DnaSP versión 5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** Bioinformatics 25, 1451–1452.

Lima, E.; M. Santos; A. DE Araújo; É. Gomes da Silva; U. Mariano da Silva; L. N. Oliveira; A. Santana; C. Nogueira; C. Paiva Neto; M. Goulart, C. Wilding; C. Junqueira; M. Melo Santos. 2011. **Insecticide resistance in Aedes aegypti populations from Ceará, Brazil.** Parasites & Vectors 4(5): 1-12.

Lima-Junior, R. & V. Scarpassa. 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.; L. P. Brito; G. A. Garcia; A. S. Araki; R. V. Bruno; J. B. P. Lima; D. Valle & A. J. Martins. 2014. **Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys kdr mutations in Aedes aegypti Brazilian natural populations.** Parasit Vectors. 7: 25.

Maciel-de-Freitas R, Aguiar R, Bruno RV, Guimaraes MC, Lourenco-de-Oliveira, R. 2012. **Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America?** Mem Inst Oswaldo Cruz, 107:828–829.

Mantel, N . 1967. **The detection of disease clustering and a generalized regression approach.** Cancer Res 27:209-22.

Marcombe, S.; R. B. Mathieu; N. Pocquet; M. A. Riaz & R. Poupardin. 2012. **Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors.** PLoS One, 7:e30989.

Martins, A. J.; J. Lima; A. Peixoto & D. Valle. 2009. **Frequency of Val1016Ile mutations in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations.** Tropical Medicine & International Health, v.14, p. 1351-1355.

Martins A. J. & D. Valle. 2012. **The pyrethroid knockdown resistance.** In Insecticides – Basic and Other Applications. Edited by Soloneski S, Larramendy M. Rijeka: InTech;17–38.

Ministério da Saúde. 2002. **Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD).** Brasilia: Ministério da Saúde; 32 p.

Monteiro, F. A.; R. Schama; A.J.Martins; A.S. Gloria; J. E. Brown & J. R. Powell. 2014. **Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program.** PLoSNegITrop. 8(9):3167.

Montella, I. R.; A. J. Martins; P. F. Viana-Medeiros; J.B. Lima & I. A. Braga. 2007. **Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004.** Am J Trop Med Hyg, 77:467–477.

Moore, M.; M. Sylla; L. Goss; M. W. Burugu; R . Sang. 2013. **Dual African Origins of Global *Aedes aegypti* s.l. Populations Revealed by Mitochondrial DNA**. PLoS Negl Trop Dis 7(4).

Nunes, C. A.; C. R. González; V. Obrequea; B. Riquelme; C. Reyesb & M. Rojasa. 2016. **Molecular characterization of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) of Easter Island based on analysis of the mitochondrial ND4 gene**. Rev. Bras. entomol. vol.60 no.2.

Oehler , E.; L . Watrin; P. Larre; I. Leparc-Goffart; S. Lastere; F. Valour; L. Baudouin; H. Mallet; D. Musso & F. Ghawche. 2013. **Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia..** Euro Surveill. 2014;19(9).

Paduan, K. S. & P. E. M. Ribolla. 2008. **Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil**. Journal Medical Entomology, v. 45, p. 59-67.

Paupy, C.; C. Brengues; O. Ndiathc; C. Totyb; J.P. Herveb & F. Simard. 2010. **Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal**. Infection, Genetics and Evolution, v. 10, p. 473-480.

Paupy, C.; G. Le Goff; C. Brengues; M. Guerra; J. Revollo; Z. Barja; H. Jeanpierre & D. Fontenille. 2012. **Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia**. Infection, Genetics and Evolution 12: 1260– 1269.

Peakall, R. & P. Smouse. 2012. **GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update**. Bioinformatics 28: 2537-2539.

Pereira-da-Cunha, M.; J. Pereira; W. Brogdon; G. Moya & D. Valle. 2005. **Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003.** Memórias Instituto Oswaldo Cruz 100(4): 441-444.

**Ranson, H.; J. Burhani; N. Lumjuan & W.C. Black. 2010.** Insecticide resistance in dengue vectors. TropIKA.net vol.1 no.1

Rawlins, S. C. 1998. **Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance.** Revista Panamericana American Journal Public Health 4: 243-251.

Rice, W. R. 1989. **Evolution.** Vol.43, Nº 1, pp223-225.

Ritchie, S. A. 2014. **Overview Rear and release: a new paradigm for dengue control.** Austral Entomology 53, 363–36.

Ritchie, S.A.; M. Townsend, C. J. Paton; A.G. Callahan & A. Hoffmann. 2015. **Application of wMelPopWolbachia Strain to Crash Local Populations of *Aedes aegypti*.** PLoS Negl Trop Dis 9(7).

Rodríguez, M.; J. Bisset; C. Hernández; Y. Ricardo; L. French; O. Pérez & I. Fuentes. 2012. **Caracterización parcial de la actividad de esterasas en una cepa de *Aedes aegypti* resistente a temefos.** Revista Cubana de Medicina Tropical 64(3): 256-267.

Saavedra-Rodriguez K; L. Urdaneta-Marquez ; S. Rajatileka; M. Moulton & A. E. Flores. 2007. **A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*.** Insect Mol Biol. 16:785–798.

Seixas, G; P. Salgueiro; A. C. Silva; M. Campos; K. Spenassatto; M. Reyes-Lugo; M. T. Novo; P. E. M. Ribolla; J. P. S. S. Pinto & C. A. Sousa. 2013. ***Aedes aegypti***

**on Madeira Island (Portugal): genetic variation of a recently introduced dengue vector.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108(Suppl. I): 3-10.

Santos, M. A. T.; M. A. Areas & F.G. Reyes. 2007. **Piretróides – uma visão geral.** *Alimentos e Nutrição* 18: 339-349.

SESA-PR. Secretaria de Estado de Saúde do Paraná. 2010. **Série Histórica da dengue – casos notificados e confirmados no Paraná de 1991 a 2008.**

Disponível em: [http://saude.pr.gov.br/arquivos/File/boletimdengue/serie\\_historica](http://saude.pr.gov.br/arquivos/File/boletimdengue/serie_historica).

SESA-PR. **Secretaria de Estado de Saúde do Paraná.** 2016. Disponível em:<http://www.saude.pr.gov.br>

Schofield, C.; J. Hemingway & S. Balderrama. 1984. **Insecticide resistance in Bolivian Aedes aegypti.** Boletín Informativo del CENETROP, 10: 22-28.

Schatzmayr, H. G. 2000. **Dengue situation by year** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2000;95:179-181.

Solomon, I. H.; D. A. Milner & R. D. Folkerth. 2016. **Neuropathology of Zika Virus Infection.** J Neuroinfect Dis . 2016 June ; 7(2).

Tajima, F. 1989 **Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphisms.** Genetics 123:585-595.

Tamura, K., J.; M. Dudley Nei & S. Kumar. 2007. **MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.** Molecular Biology and Evolution 24:1596–1599.

Templeton, A. R.; K.A. Crandall & C. F. Sing. 1992. **A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data: III. Cladogram estimation.** Genetics, v.132, p.619-633.



Templeton, A. R. 2001. **Using phylogeographic analyses analyses of gene trees to test species status and processes**. *Molecular Ecol.*, v.10, p.779-791.

Turchetto-Zolet , A. C.; A. L. A. Segatto; C. Turchetto; C. Palma-Silva; L. Brandão de Freitas. 2013, **Guia prático para estudos filogeográficos**. Editora SBG Sociedade Brasileira de Genética Ribeirão Preto, SP.

Twerdochlib, A.; A. C.D. Bona; S. Leite; R. Chitolina; B. Westphal & 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; CH. Bosio; F. Herrera; Y. Rubio-Palis, M. Salasek & W. Black. 2008. **Genetic Relationships among Aedes aegypti Collections in Venezuela as Determined by Mitochondrial DNA Variation and Nuclear Single Nucleotide Polymorphisms**. *Am. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78(3): 479–491.

Vargas, F.; O. Córdova & A. Alvarado. 2006. **Determinacion de La resistência a inseticidas enETERMINACIÓN Aedes aegypti, Anopheles albimanus Y Lutzomyia peruensis Procedentes Del Norte Peruano**. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 23(4): 259-264.

Valle, D.; D. N. Pimenta & R. V. Cunha. 2015. **Dengue: Teorias e Práticas**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz 458 p. ISBN: 978-85-7541- 456-9.

Zanluca,C.; V. C. A. de Melo; A. L. P. Mosimann; G. I. V. dos Santos; C. N. D. dos Santos & K. Luz. 2015. **First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil**. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 110(4): 569-572.

Yanola, J.; P, Somboon; C. Walton; N. Woottichai & P. La-aiied. 2010. **A novel F1552/C1552 point mutation in the Aedes aegypti voltage-gated sodium**

**channel gene associated with permethrin resistance.** Pestic. Bioch. and Physiol. 96 (2010) 127–131.

Walker, T, P.H.; Johnson; L.A. Moreira; I. Iturbe-Ormaetxe & F. D. Frentiu. 2011 **The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged Aedes aegypti populations.** Nature, 476:450–453.

Wakeling, E. N., Neal, A. P., and Atchison, W. D. (2012). **Pyrethroids and Their Effects on Ion Channels.** In: Soundararajan RP (ed.) Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides, ISBN: 978-953-51-0680-7, InTech, Rijeka, Croatia.

WHO– World Health Organization 2013. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases.** Disponível em <[www.who.int/iris/.../9789241564540\\_eng.pdf](http://www.who.int/iris/.../9789241564540_eng.pdf)

WHO - **World Health Organization.** 2016. Disponível em <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/>

WHOPES - **World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme.** 2010. Disponível em <http://www.who.int/whopes/en/>

Wilkerson, R. C.; Y. M. Linton; D. M. Fonseca; T. R. Schultz & D. C. Price; D. A. Strickman. 2015. **Making Mosquito Taxonomy Useful: AS table Classification of Tribe Aedini that Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships.** PLoS ONE 10(7).